



HAL
open science

Analyse de biomarqueurs peptidiques et protéiques de la maladie d'Alzheimer, de l'électrophorèse capillaire aux microsystèmes

Kiarach Mesbah

► To cite this version:

Kiarach Mesbah. Analyse de biomarqueurs peptidiques et protéiques de la maladie d'Alzheimer, de l'électrophorèse capillaire aux microsystèmes. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112089 . tel-01191468

HAL Id: tel-01191468

<https://theses.hal.science/tel-01191468>

Submitted on 2 Sep 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.



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 : CHIMIE DE PARIS SUD

*Laboratoire de Protéines et Nanotechnologies en Sciences Analytiques
Institut Galien de Paris Sud - UMR 8612 CNRS/Université Paris-Sud
UFR Pharmacie, Université Paris-Sud*

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Kiarach MESBAH

**Analyse de biomarqueurs peptidiques et protéiques
de la maladie d'Alzheimer : de l'électrophorèse
capillaire aux microsystèmes**

Date de soutenance : 26/05/2014

Composition du jury :

Directrice de thèse :	Pr. Myriam TAVERNA	PR (Université Paris-Sud, Chatenay-Malabry)
Président du Jury :	Pr. Pedro De Oliveira	PR (Université Paris-Sud, Orsay)
Rapporteur :	Pr. Marianne FILLET	PR (Université de Liège, Liège)
Rapporteur :	Pr. Pierre GAREIL	PR (Directeur scientifique (ENSCP, Paris)
Examineur :	Pr. Sylvain LEHMANN	PUPH (CHU Montpellier)
Examineur :	Dr. Jean Louis VIOVY	DR CNRS (Institut Curie, Paris)

Remerciements

Mes sincères remerciements vont au Pr. Marianne Fillet et au Pr. Pierre Gareil pour avoir accepté de rapporter ce travail. Je remercie également le Dr. Jean Louis Viony, le Pr. Sylvain Lehmann, ainsi que le Dr. Pedro de Oliveira pour avoir consenti à examiner ce manuscrit.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Pr. Myriam Taverna pour m'avoir permis de réaliser cette thèse de doctorat dans son laboratoire. Je la remercie pour son soutien précieux tant sur le plan scientifique que sur le plan personnel. Malgré un emploi du temps constamment chargé, elle est toujours restée disponible pour suivre les travaux de ma thèse et m'a toujours affichée sa confiance qui m'a aidée dans les moments de doute. Pour toutes ces années exceptionnelles passées dans son laboratoire, je la remercie infiniment.

Je tiens fortement à remercier tous les membres permanents du laboratoire où j'ai passé de belles années enrichissantes tant sur le plan scientifique que personnel : Isabelle le Potier, Claire Smadja, Thuy Tran, Antoine Pallandre et Marie-Claude Amnella. Je tiens également à remercier Sylvie Zemmour et Patricia Livet pour leur aide précieuse à la compréhension des mécanismes administratifs si complexes du CNRS et de la Faculté de Pharmacie. Mes remerciements vont également à Sarah Glumm qui m'a fait découvrir les joies de l'encadrement, tout en me replongeant dans ce bel univers de la langue allemande.

Je souhaite remercier tout particulièrement mes camarades doctorants, avec qui j'ai partagé mon quotidien lors de ces dernières années, les moments d'extase devant de supers résultats comme les moments de dépit devant l'échec de nos expériences respectives. De vraies amitiés ce sont liées et pour cela je remercie vivement Ludivine, Sonia, Dimitri, Romain, Farid, Ly, Ichraf, Monica, Mohamed, Nacéra, et Anne-Lise.

Enfin, je tiens à remercier les personnes qui comptent le plus pour moi et sans qui je ne serais pas ici aujourd'hui ; mes parents, Florya et Massoud, pour l'amour et le soutien qu'ils me portent au quotidien et les valeurs qu'ils m'ont inculquées, mais aussi mon bien aimé petit frère, Kianouch. Une attention particulière est adressée à celle qui fait partie depuis quelques temps déjà à ma famille, celle pour qui j'éprouve un amour sans faille et qui tend à me rendre toujours meilleur, Sophie.

Abréviations

μ EC : Micro-électrophorèse capillaire	MAPS : 3-(triméthoxysilyl)propyl-methacrylate
μ eo : Mobilité électrophorétique	MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jakob
ACN : Acétonitrile	MeOH : Méthanol
APP : Protéine précurseur de l'amyloïde	MMSE : Mini mental state evaluation
A β : β -amyloïde	NAS : N-acryloyloxysuccinimide
BACE-1 : β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1	NFT : Enchevêtrements neuro-fibrillaires (neurofibrillary tangle)
COC : Cyclic olefin copolymer	PC : Polycarbonate
CV : Coefficient de variation	PD : Maladie de Parkinson
DCL : Déficit cognitif léger	PDD : Maladie de Parkinson avec démence
DMA : N,N-diméthylacrylamide	PDMS : Poly(diméthylsiloxane)
DMF : Diméthylformamide	PEGDA : Polyéthylène glycol diméthacrylate
DMSO : Diméthylsulfoxyde	PEO : Polyéthylène oxyde
EC : Electrophorèse capillaire	PFPE : Perfluoropolyéther
ECZ : Electrophorèse de zone libre	PHF : Paires de filaments appariés en hélice (paired helical filaments)
ELISA : Méthode immuno-enzymatique (enzyme-linked immunosorbent assay)	PIB : Pittsburgh compound B
eo : Ecoulement électroosmotique	PMA : Poly(methyl acrylate)
EpDMA : Epoxy-poly-(diméthylacrylamide)	PMMA : Polyméthacrylate de méthyle
EtOH : Ethanol	p-tau : tau phosphorylée ou phospho-tau
FI : Force ionique	SELDI-TOF : Surface enhanced laser desorption/ionization - time of flight
GFA P : Glial fibrillary acidic protein	SM : Spectrométrie de masse
GMA : Glycidyl methacrylate	SRM : Selected reaction monitoring
HCl : Acide chlorhydrique	TEP : Tomographie par émission de positrons
H-FABP : Heat-fatty acid binding protein	TEP-FDG : Tomographie par émission de positrons au F-fluorodésoxyglucose
IRM : Imagerie par résonance magnétique	t-tau : tau total
LCR : Liquide céphalo-rachidien	
LIF : Fluorescence induite par laser	
MA : Maladie d'Alzheimer	
MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight	

Symboles

μ_{ep} : Mobilité électrophorétique

B : Réservoir contenant le tampon

BW : Réservoir contenant le rejet du tampon

E : Champ électrique

μ_{ep} : Migration électrophorétique

G : Conductance

L_{eff} : Longueur effective du canal de séparation

L : Longueur du capillaire.

L_d : Longueur effective du capillaire

L_t : Longueur totale du capillaire

P : Puissance

S : Réservoir contenant l'échantillon

S/N : Rapport signal/bruit

SW : Réservoir contenant le rejet de l'échantillon

T : Température

T_g : Température de transition vitreuse

t : Temps de migration

v_{app} : Vitesse apparente

v_{eo} : Vitesse électroosmotique

v_{ep} : Vitesse électrophorétique

V : Tension électrique

W : Energie d'irradiation

δ : Epaisseur de la double couche

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

ϵ_0 : Permittivité du vide

ϵ_r : Constante diélectrique du milieu

ζ : Potentiel zêta

η : Viscosité

θ : Angle de contact

λ_{em} : Longueur d'onde d'émission

λ_{ex} : Longueur d'onde d'excitation

σ : Densité de charges

$\sigma_{adsorption}$: Contribution de l'adsorption sur la variance totale

$\sigma_{diffusion\ longitudinale}$: Contribution de la diffusion longitudinale sur la variance totale

$\sigma_{effet\ Joule}$: Contribution de l'effet joule sur la variance totale

$\sigma_{injection}$: Contribution de l'injection sur la variance totale

$\sigma_{\Delta\ conductivité}$: Contribution de la différence de conductivité sur la variance total

Table des Matières

Introduction générale	1
A - Partie bibliographique	6
1. Etat de l'art sur la Maladie d'Alzheimer (MA)	6
1.1. Epidémiologie de la maladie	6
1.2. Neurophysiopathologie de la maladie	9
1.2.1. Formation des plaques seniles ou amyloïdogénèse	9
1.2.2. Dégénérescence neurofibrillaire (DNF) ou tauopathie	12
1.3. Les stades de la maladie	14
1.3.1. Le stade préclinique	15
1.3.2. Le stade prodromique ou DCL	16
1.3.3. Le stade de la démence	16
2. Diagnostic de la MA et biomarqueurs	18
2.1. Quelques définitions	18
2.1.1. Le diagnostic	18
2.1.2. Les Biomarqueurs	18
2.2. Les biomarqueurs et la MA	19
2.2.1. Les biomarqueurs moléculaires et biochimiques validés	20
2.2.1.1. Le peptide A β 1-42	20
2.2.1.2. La protéine tau	22
2.2.1.3. Combinaison de tau et A β	23
2.2.2. Les biomarqueurs potentiels de la MA	23
2.2.2.1. La β -sécrétase 1 ou BACE 1	24
2.2.2.2. Les protéines sAPP β et sAPP α	24
2.2.2.3. Les formes tronquées des peptides A β	25
2.2.2.4. Les oligomères	26

2.2.2.5. Les autres biomarqueurs candidats	26
2.2.3. Le diagnostic actuel de la MA	28
2.2.3.1. Les tests cognitifs	29
2.2.3.2. Les techniques d'imagerie	30
2.2.3.2.1. L'IRM	30
2.2.3.2.2. Le TEP-SCAN	31
2.2.4. Les analyses biologiques	32
3. Généralités sur les techniques de séparation électrophorétique de protéines	38
3.1. L'électrophorèse capillaire (EC)	38
3.1.1. Principe de base	38
3.1.1.1. L'écoulement électroosmotique	38
3.1.1.2. La mobilité électrophorétique	41
3.1.2. Les phénomènes de dispersion	41
3.1.2.1. L'effet Joule	42
3.1.2.2. Les interactions de surface et l'adsorption des analytes	43
3.1.2.2.1. Influence des paramètres externes sur l'adsorption des protéines	44
3.1.2.2.2. Influence des propriétés intrinsèques des protéines sur l'adsorption	46
3.1.2.2.3. Influence des propriétés de surface sur l'adsorption.....	48
3.1.2.2.4. Mécanismes d'adsorption des protéines	48
3.1.3. Les modes de séparation des protéines et peptides	49
3.1.3.1. Electrophorèse de zone (ECZ)	49
3.1.3.2. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)	51
3.1.3.3. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)	51
3.1.3.4. Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MEKC) ..	51
3.1.4. Les revêtements de surface pour l'analyse de biomolécules protéiques et peptidiques	52
3.1.4.1. Introduction	52
3.1.4.2. Les revêtements dynamiques	53

3.1.4.3.	Les revêtements physisorbés semi-permanents	54
3.1.4.4.	Conclusion	59
3.1.4.5.	<i>Revue 1 : Contribution of CE to the analysis of protein or peptide biomarkers of various diseases</i>	60
3.2.	Electrophorèse capillaire en puce de protéines et peptides pour le diagnostic médical	74
3.2.1.	Intérêts et avantages de la miniaturisation	74
3.2.2.	Séparation de biomarqueurs protéiques et peptidiques par MEC	76
4.	Références de la partie bibliographique	80
B -	Partie expérimentale	92
1.	Introduction	92
2.	Marquage des biomarqueurs protéiques par des agents fluorescents	95
2.1.	Introduction	95
2.2.	Etat de l'art sur le marquage des protéines dans les fluides complexes	96
2.2.1.	Stratégies de marquage et fluorophores associés	96
2.2.1.1.	Les voies de marquage	96
2.2.1.2.	Les modes de marquage compatibles avec l'EC	100
2.2.2.	Le multimarquage	101
2.2.3.	Réactions de marquage dans les matrices complexes	103
2.3.	Résultats	105
2.3.1.	Structure et propriétés des protéines étudiées	108
2.3.2.	Dérivation off-line des protéines par les groupements sulfhydriles ..	110
2.3.2.1.	Choix des fluorophores	110
2.3.2.2.	Essais préliminaires de dérivation off-line	111
2.3.2.2.1.	La S100B	111
2.3.2.2.2.	La H-FABP	115
2.3.2.2.3.	La GFAP	115
2.3.3.	Dérivation et analyse de l'ubiquitine	117

3.2.3.1.	Evolution de la μ eo en fonction du pH	162
3.2.3.2.	Revêtement DMA-NAS-MAPS pour l'analyse des peptides amyloïdes	164
3.2.3.3.	Comparaison du PEO et de l'EpDMA comme revêtements pour l'analyse des peptides amyloïdes en puce	167
3.2.3.3.1.	Introduction.....	167
3.2.3.3.2.	<i>Article 2 : Physically adsorbed neutral polymers as coatings for the high resolution electrophoretic separation of Aβ peptides on glass microchip</i>	<i>168</i>
3.3.	Conclusion	183
4.	Etude de matériaux alternatifs au verre pour la μEC	186
4.1.	Introduction	186
4.2.	Caractéristiques et propriétés des matériaux pour la μ EC	188
4.2.1.	Caractéristiques requises d'un matériau pour son utilisation en μ EC	188
4.2.2.	Propriétés et caractéristiques des matériaux alternatifs au verre	189
4.2.3.	Rappel des différents matériaux polymériques utilisés pour l'analyse de protéines en μ EC	192
4.3.	Résultats	193
4.3.1.	Etude du COC	193
4.3.2.	Etude du thiolène.....	197
4.3.2.1.	<i>Article 3 : Thiolenes as a new material for on-chip electrophoretic separations of proteins</i>	<i>198</i>
4.4.	Conclusion	214
5.	Références de la partie expérimentale	216
	Conclusion	221
	Matériels et méthodes	226

Introduction générale

En Europe, près de 6 millions de personnes souffrent de démence. 50 à 70% de ces démences sont liées à la maladie d'Alzheimer (MA). Cette situation continue inévitablement d'augmenter avec le vieillissement de la population, particulièrement au sein des pays occidentaux et développés. Ce phénomène constitue un problème sanitaire et sociétal majeur à travers le monde, tant les souffrances liées à ces démences sont dramatiques pour le patient comme pour sa famille. De plus, les coûts associés à cette pathologie augmentent sensiblement d'année en année, pesant sur l'économie mondiale et sur les systèmes de santé des différents pays. Aujourd'hui, la MA coûte par exemple à l'Europe près de 55 milliards d'euros par an.

La MA est une maladie neurodégénérative progressive, qui présente généralement une évolution lente. Les personnes atteintes par cette neurodégénérescence ne présentent généralement aucun signe clinique évident lors des 10 premières années de la pathologie. Le diagnostic actuel repose essentiellement sur une combinaison de tests cognitifs, de techniques d'imagerie et d'analyses biochimiques de fluides biologiques. Cependant, ce diagnostic n'est généralement permis qu'à un stade avancé et irréversible de la maladie. Néanmoins, des variations significatives de la concentration de plusieurs biomarqueurs validés (peptide A β 1-42, protéine tau phosphorylée et protéine tau totale) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peuvent être observées plus d'une dizaine d'années avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. En parallèle, le diagnostic médical connaît actuellement une révolution majeure grâce aux nouvelles techniques (approches protéomiques, métabolomiques, génomiques), qui permettent la découverte continue de nouveaux biomarqueurs moléculaires, et grâce au développement de signatures multibiomarqueurs. L'impact de ces découvertes est cependant souvent entravé par les faibles quantités de ces nombreux biomarqueurs dans les fluides biologiques. Un test diagnostique précoce de la MA basé sur une quantification précise de ces biomarqueurs dans le LCR permettrait d'ouvrir la voie vers de nouvelles approches thérapeutiques. Pour le moment, aucun traitement curatif n'existe, mais des efforts considérables et prometteurs sont mobilisés pour le développement de médicaments neuroprotecteurs capables de retarder l'évolution de la maladie.

Les laboratoires sur puces sont des instruments émergents et leur performance prometteuse devrait permettre d'ici peu de constituer des instruments biomédicaux de grande valeur. Les avantages de ces instruments analytiques incluent la miniaturisation, la facilité d'intégration de modules analytiques répondant aux problématiques diverses de l'analyse d'échantillons

biologiques, comme des étapes de filtration, d'extraction sélective, de préconcentration et de réaction chimique ou immunochimique, qui peuvent être couplées à des modules de séparation et de détection variés (électrochimie, fluorescence, conductimétrie). De plus, les temps d'analyse sont courts et de faibles quantités d'échantillon biologique sont nécessaires au processus de quantification des biomarqueurs. Ces dispositifs ont déjà démontré de hautes performances pour le diagnostic de maladies majeures dont certains cancers, des maladies cardiovasculaires, rénales et thyroïdiennes, ou du diabète.

Cependant, dans le cas des pathologies neurodégénératives, un outil diagnostique idéal doit permettre un dépistage précoce de la maladie, plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des signes cliniques, seul espoir dans l'état actuel des thérapies disponibles, de limiter l'évolution de la maladie vers un stade irréversible. Cette obligation impose donc plusieurs contraintes de taille. Tout d'abord les concentrations des biomarqueurs disponibles dans les liquides biologiques sont extrêmement faibles au stade précoce de ces maladies, ce qui nécessite des méthodes ultrasensibles. De plus, certains processus physiopathologiques et les modifications des mécanismes biochimiques entraînés dans le cas de différentes maladies neurodégénératives peuvent s'avérer similaires. Il est donc important de développer des signatures multibiomarqueurs très spécifiques afin de discriminer une pathologie neurodégénérative d'une autre.

Dans ce contexte, le projet européen NADINE a vu le jour en 2010, en se fixant comme objectif le développement d'un outil de diagnostic, au format du laboratoire sur puce, capable de détecter à partir d'un fluide biologique (LCR ou sang) un ensemble de biomarqueurs reflétant spécifiquement un type de maladie neurodégénérative naissante. Ce dispositif miniaturisé est destiné à intégrer plusieurs modules analytiques complémentaires, de la préparation de l'échantillon à la détection des biomarqueurs. Chaque module doit apporter une réponse à un défi analytique spécifique lié à la quantification des biomarqueurs dans les fluides biologiques. Ces défis se traduisent par exemple par la nécessité de purifier le fluide biologique afin de se débarrasser des impuretés et interférents non ciblés, de préconcentrer les biomarqueurs d'intérêt pour permettre leur détection malgré les concentrations très faibles auxquelles on les retrouve dans certains liquides biologiques, ou encore de séparer et détecter simultanément de multiples espèces d'intérêt pour augmenter le pouvoir diagnostique de l'instrument. L'un des prototypes imaginé au début de ce projet est illustré sur la **Figure 1**.

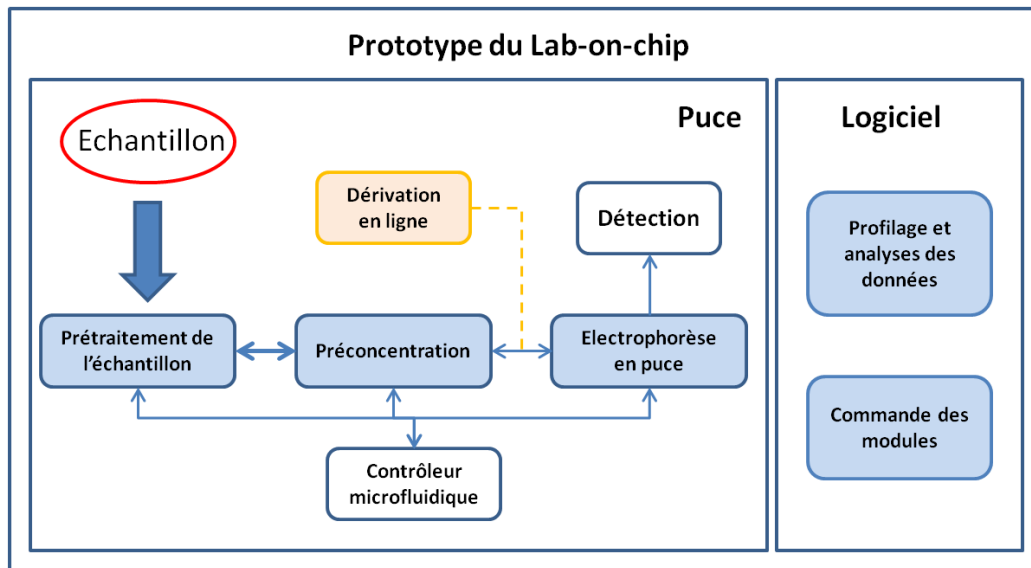


Figure 1 : Représentation schématique de l'un des prototypes de microsystème imaginé dans le cadre du projet NADINE pour l'analyse de biomarqueurs de la MA.

L'objectif de cette thèse a consisté à proposer des stratégies innovantes et hautement performantes pour la séparation et la détection de différents biomarqueurs protéiques et peptidiques de discrimination de la MA compatibles avec l'intégration de différentes étapes analytiques au sein d'un microsystème. Un choix judicieux parmi les biomarqueurs potentiels décrits comme candidats prometteurs pour la discrimination des différentes maladies neurodégénératives a été primordial. En effet, il est apparu indispensable de privilégier les biomarqueurs pour lesquels le développement de méthodes de séparation électrocinétique apporte une réponse aux problématiques d'analyse rencontrées avec les tests immunochimiques classiquement utilisés ou en l'absence de tests ELISA. C'est essentiellement le cas pour l'ubiquitine et pour certains peptides de la famille des β -amyloïdes ($A\beta$) pour lesquels les stratégies ELISA restent insuffisantes. Pour la détection ultrasensible des biomarqueurs, la stratégie qui consiste à les marquer directement lors de la séparation est la stratégie la plus adaptée pour une intégration aisée au sein d'un microsystème permettant l'obtention d'une méthode automatisée de l'étape d'injection à la détection. De plus, la fluorescence permet en théorie l'obtention de limites de détection compatibles avec la quantification de ces biomarqueurs et elle est très facile à mettre en place pour la détection au sein de microsystèmes. Le choix du mode de séparation a également été déterminant pour la séparation hautement résolutive des différents peptides β -amyloïdes qui présentent des structures très proches. Enfin, un autre objectif principal a été de mettre au point des stratégies de recouvrement des différents matériaux utilisés comme substrats pour les microsystèmes, comme le verre, le cyclic olefin copolymer

(COC) ou le thiolène. En effet, l'analyse de biomarqueurs protéiques et peptidiques par microélectrophorèse capillaire (μ EC) entraîne généralement l'adsorption de ceux-ci sur les parois des microcanaux, dégradant ainsi les performances analytiques, d'autant plus que l'échantillon à analyser est un fluide biologique contenant une multitude de biomolécules.

Mes travaux au sein du projet NADINE ont consisté (i) à développer des méthodes de dérivation intracapillaire des biomarqueurs déjà validés ou d'autres candidats potentiels pour leur apporter des propriétés de fluorescence et les détecter en microsystème et (ii) développer l'unité miniaturisée de séparation électrocinétique de différents biomarqueurs, notamment de plusieurs peptides β -amyloïdes, impliquant l'étude de différents traitements de surface des canaux ainsi que l'étude et la comparaison de différents types de matériaux pour la fabrication des puces.

La partie bibliographique de ce manuscrit décrit d'abord l'état de l'art sur la MA et ses implications neuropathologiques. Elle s'intéresse ensuite aux biomarqueurs validés ou identifiés comme candidats potentiels pour cette maladie et aux méthodes de diagnostic qui sont actuellement utilisées. Parce que l'une des voies possibles de séparation des biomarqueurs en puce repose sur le principe de migration électrophorétique, un chapitre est consacré à l'apport de l'électrophorèse capillaire (EC) pour l'analyse de protéines et rappelle les principes généraux, les limites de cette technique pour l'analyse de biomolécules protéiques et les solutions disponibles pour les contourner. Ce chapitre résume également les intérêts et les avantages de la miniaturisation de la technique d'électrophorèse capillaire ainsi que l'état de l'art sur l'analyse en microsystème de protéines et peptides par électrophorèse.

La partie expérimentale de ce manuscrit se compose de trois grands chapitres retraçant les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse. Le premier chapitre est dédié au marquage de biomarqueurs protéiques de la MA par des agents fluorescents. Les biomarqueurs retenus ici sont la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP), la protéine S100B, la protéine de liaison aux acides gras spécifique du myocarde (H-FABP) et l'ubiquitine. Toutes ces protéines ont des profils de concentration qui varient lors des pathologies neurodégénératives. Après un rappel des principes de la dérivation des protéines par fluorescence et des stratégies envisageables, une étude préliminaire de comparaison des performances de différents fluorophores pour le marquage de protéines au niveau de leur fonction amine ou sulfhydryle est présentée. Une méthode de dérivation au cours de la séparation de l'ubiquitine, méthode qui a été développée en vue de son

intégration au sein d'un microsysteme, est enfin décrite. Cette méthode optimisée a permis d'atteindre des limites de détection compatibles avec la quantification de l'ubiquitine dans le LCR. Le deuxième chapitre de la partie expérimentale s'intéresse à l'analyse des biomarqueurs de la MA issus de la famille des peptides β -amyloïdes en microsysteme en verre par EC de zone. Les problématiques liées à l'analyse de ces peptides sont explicitées et en particulier celles qui sont liées à l'adsorption de ces espèces sur les parois des microcanaux. Par la suite, l'apport de plusieurs revêtements polymériques neutres sur les performances de séparation des peptides en μ EC en puce en verre est étudié. Deux de ces polymères n'avaient encore jamais été décrits lors du démarrage de cette thèse. Ce deuxième chapitre se termine par la description d'une méthode de séparation de peptides β -amyloïdes qui a été optimisée pour permettre une séparation hautement résolutive de différentes combinaisons de peptides pertinents pour le diagnostic de la MA.

Enfin, le troisième chapitre de la partie expérimentale se concentre sur l'apport de matériaux polymères alternatifs au verre pour la microfabrication de puces et leur application à la séparation électrocinétique des protéines. Après avoir rappelé les propriétés des différents matériaux disponibles et les caractéristiques nécessaires pour leur utilisation en μ EC, il résume les travaux décrits dans la littérature pour l'analyse de protéines dans des systèmes miniaturisés à substrat polymérique. Deux matériaux, le COC et le thiolène, sont en particulier décrits comme substrats pour la microfabrication des puces. De nouvelles stratégies de recouvrement des canaux de ces substrats polymériques sont alors explorées car elles ont permis de séparer pour la toute première fois des protéines modèles avec des puces en thiolène.

A - Partie bibliographique

1. Etat de l'art sur la maladie d'Alzheimer (MA)

1.1. Epidémiologie de la maladie

Une démence est un syndrome généralement chronique ou évolutif qui se caractérise par une altération des fonctions cognitives plus importante que lors du vieillissement normal. D'après les récentes statistiques du World Alzheimer Report (WAR) de l'Alzheimer's Disease International (Wimo A., Prince M., 2010), 35 millions de personnes dans le monde en 2010 vivent avec une démence, toute origine pathologique confondue. La répartition des malades à travers le globe est inégale. Près de 2/3 des personnes atteintes de démence vivent dans des pays à revenu faible et moyen, principalement en Asie avec 16 millions de malades. Viennent ensuite l'Europe avec 10 millions, l'Amérique avec près de 8 millions et l'Afrique avec un peu moins de 2 millions de personnes atteintes.

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus répandue dans le monde, loin devant la démence vasculaire, la démence fronto-temporale et la démence à corps de Lewy. On estime le pourcentage de patients atteints de cette maladie compris entre 60 et 80% de la population démente, ce qui représente environ 25 millions de personnes dans le monde et plus de 6 millions en Europe (Thies W., Bleiler L., 2011). La France compte environ 800 000 personnes atteintes de la MA avec environ 200 000 nouveaux cas par an (Haute Autorité de Santé, 2011).

L'estimation de la prévalence de la MA, à savoir le pourcentage de malades par rapport à la population totale à un instant donné, se situe en dessous de 0,5% pour l'ensemble de la population mondiale. Cependant, la prévalence de la MA augmente exponentiellement avec l'âge. En effet, elle passe de 3% pour les personnes âgées de plus de 60 ans à presque 50% pour les personnes de 85 ans et plus. Si l'Asie présente de loin le plus grand nombre de personnes souffrant de la MA, le pourcentage de patients en Europe et sur le continent américain est bien supérieur à la moyenne mondiale, avec près de 4,5% pour les personnes de plus de 60 ans.

L'augmentation de l'espérance de vie additionnée à la diminution des taux de naissances présage une nette augmentation de la proportion de personnes de plus de 65 ans qui sera touchée par cette maladie. Il est estimé que la proportion de personnes souffrant de démence, et donc

principalement de la MA, passera de 35,6 millions en 2010 à 65,7 millions en 2030 et 115,4 millions en 2050 (**Tableau I**).

Régions	Population > 60 ans (millions)	Prévalence estimée (%)	Nombres de personnes atteintes de démence (millions)		
	2010	2010	2010	2030	2050
Asie	406,6	3,9	15,9	33,0	60,9
Europe	160,2	6,2	10,0	14,0	18,7
Amérique	120,7	6,5	7,8	14,8	27,1
Afrique	71,1	2,6	1,9	3,9	8,7
Monde	758,5	4,7	35,6	65,7	115,4

Tableau I : Estimation de la prévalence des démences dans le monde chez les plus de 60 ans et projections sur la période 2010-2050 selon le WAR (Wimo A., Prince M., 2010).

Les facteurs de risque de la MA sont multiples et cumulatifs, l'âge étant le principal. Dans la quasi-totalité des cas, la MA est sporadique. Cependant, dans de rares cas, des facteurs de risque génétiques ont été mis en évidence. Le principal facteur de risque génétique est lié à l'un des trois allèles existants de l'apoprotéine, une protéine d'importance neurologique qui assure des fonctions de transport lipidique. Les porteurs de l'allèle E4 du gène de l'apoprotéine, soit environ 14% de la population mondiale (Farrer, L.A. *et al.*, 1997), ont plus de chance de développer la MA : 3,2 fois plus en cas d'hétérozygotie E3/E4 et 15 fois plus en cas d'homozygotie E4/E4 (Hyman M. *et al.*, 2011).

Il existe d'autres facteurs de risque liés à la MA (**Tableaux II et III**). Une méta-analyse minutieuse des données recueillis entre 1980 et 2011 pour plus de 400 000 personnes a montré que le faible niveau d'instruction augmente le risque de développer la MA et qu'un haut niveau d'études a des effets protecteurs contre la maladie (Meng X. *et al.*, 2012). Parallèlement, certains facteurs environnementaux tels que les expositions à certains métaux (mercure, aluminium, plomb) ont été décrits comme favorisant la MA (Mutter J. *et al.*, 2010). Du point de vue de la

psychologie, une autre méta-analyse a démontré une augmentation du risque de développer la MA chez les personnes ayant des antécédents d'épisodes dépressifs (Ownby R.L. *et al.*, 2006). L'état général du système cardiovasculaire a lui aussi un impact direct sur la santé du cerveau de par l'apport en oxygène et en nutriments. Un nombre croissant d'études apporte des preuves quant à l'implication de certaines maladies touchant le système cardiovasculaire tels que le diabète de type 2 ou l'hypertension artérielle (Barnes L.L. *et al.*, 2011).

Antécédents pathologiques chez le patient	Impact sur le développement de la MA	Mécanismes possibles
Maladie cardiovasculaire	Négatif	Destruction du parenchyme Augmentation des dépôts A β amyloïdes Stress oxydant
Hypertension	Négatif	Maladie microvasculaire
Diabète de type II	Négatif	Troubles cérébrovasculaires Compétition entre la clairance de l'insuline et des A β

Tableau II : Influence d'antécédents pathologiques sur les facteurs de risque de la MA et mécanismes possibles (Mayeux R. *et al.*, 2012).

Hygiène de vie du patient	Impact sur le développement de la MA	Mécanismes possibles
Fumeur	Négatif	Troubles cérébrovasculaires
Obésité	Négatif	Augmentation du risque de diabète de type II
Haut niveau	Positif	Renforcement cognitif

d'éducation		
Pratique d'activités ludiques	Positif	Amélioration du métabolisme lipidique Stimulation mentale
Régime alimentaire méditerranéen	Positif	Effets protecteurs des antioxydants et/ou des anti-inflammatoires
Activité physique régulière	Positif	Plasticité du cerveau Amélioration de la vascularisation cérébrale

Tableau III : Impact de l'hygiène de vie sur les facteurs de risques de la MA et mécanismes possibles (Mayeux R. *et al.*, 2012).

La MA est donc une maladie complexe, liée à une multitude de facteurs de plus ou moins faible importance mais cumulatifs (Blennow K. *et al.*, 2006), entraînant un large spectre de signes cliniques (McKhann G.M. *et al.*, 2011).

1.2. Neurophysiopathologie de la maladie

La MA est une maladie progressive, dégénérative et mortelle, qui détruit les cellules du système nerveux. Comme les autres démences, la MA ne fait pas partie du processus normal de vieillissement. C'est une pathologie chronique évolutive qui détériore les fonctions cognitives du patient, comme les performances mnésiques. Ces troubles de la mémoire résultent de l'atteinte des neurones localisés dans la région de l'hippocampe, siège de la mémoire. La maladie se propage ensuite dans d'autres zones du cerveau, menant à la disparition progressive des notions d'espace et de temps, de la reconnaissance des objets et des personnes, des mécanismes du langage, du raisonnement et de la réflexion. Les lésions cérébrales caractéristiques des personnes atteintes de la MA sont la présence de plaques séniles, fabriquées au cours d'un processus appelé amyloïdogénèse, et l'apparition d'enchevêtrements neurofibrillaires, qui résultent de l'agrégation intra-neuronale de protéines tau phosphorylées (Braak, H. *et al.*, 1997 ; Jellinger K.A. *et al.*, 1998).

1.2.1. Formation des plaques séniles ou amyloïdogénèse

Les peptides β -amyloïdes ($A\beta$) sont naturellement produits par le métabolisme cérébral tout au long de la vie et sont composés de 36 à 43 acides aminés. Les peptides β -amyloïdes sont issus de la protéolyse de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par une série d'actions enzymatiques successives de la β -sécrétase (BACE-1) et de la γ -sécrétase. (Figure 2). Différentes formes de peptides sont produites en fonction du site de clivage des deux enzymes : les peptides $A\beta$ 1-42, $A\beta$ 2-42 et $A\beta$ 3-42, notés $A\beta$ x-42, sont tronqués en N-terminal, tandis que les peptides $A\beta$ 1-38 et $A\beta$ 1-40, notés $A\beta$ 1-x, sont tronqués en C-terminal. Il existe aussi des peptides tronqués des deux côtés de la séquence d'acides aminés, tels que les peptides $A\beta$ 2-40 et $A\beta$ 3-40. Le peptide $A\beta$ 1-40 est bien plus abondant que la forme nuisible et sujette à l'agrégation $A\beta$ 1-42.

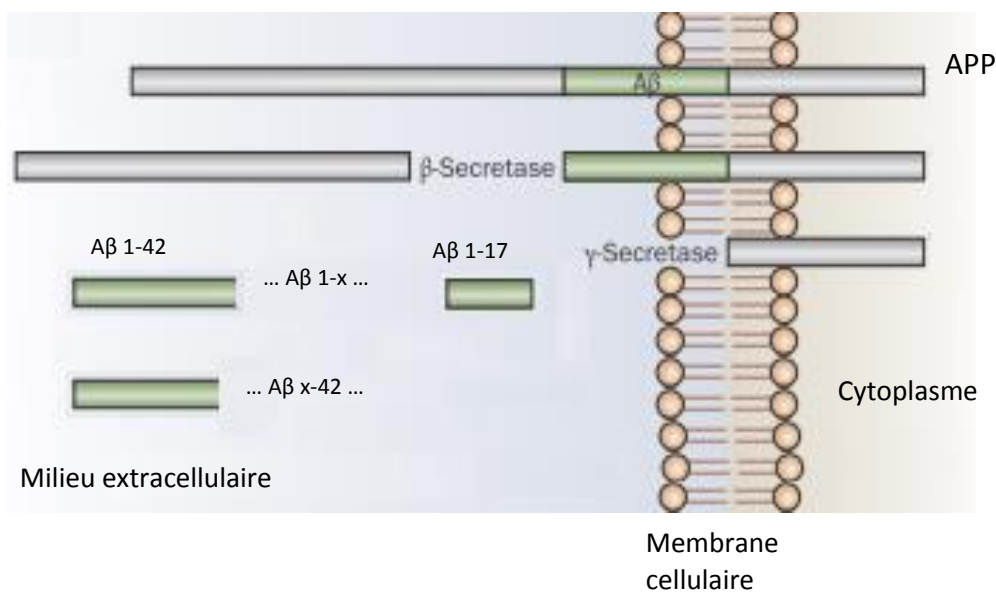


Figure 2 : Processus de clivage enzymatique de l'APP par la β -sécrétase et la γ -sécrétase et formation des différents peptides $A\beta$ selon le site de clivage (Blennow K. *et al.*, 2010).

Un déséquilibre entre la production et la clairance des peptides β -amyloïdes est favorable à l'agrégation de ces peptides, entraînant leur accumulation toxique dans le cerveau. Ce dysfonctionnement semble être l'un des facteurs initiaux de la MA. Cette hypothèse, dite hypothèse amyloïde ou amyloïdogénèse, est basée sur l'étude des formes génétiques de la MA et sur le fait que le peptide $A\beta$ 1-42, majoritaire dans les plaques, est toxique vis-à-vis des cellules neuronales (Selkoe D.J. *et al.*, 2001 ; Tanzi R.E. *et al.*, 2005).

L'une des caractéristiques physiopathologiques de la MA serait donc la formation extracellulaire de plaques amyloïdes. On retrouve ces dépôts de peptides amyloïdes, de forme sphérique et plus

ou moins compacte, dans le domaine extracellulaire de la substance grise du cortex cérébral des patients atteints de la maladie. Ces plaques sont la résultante de l'accumulation et du dépôt de peptide β -amyloïdes et en particulier de $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 (Masters C.L. *et al.*, 1985 ; Kang J. *et al.*, 1987). Les peptides $A\beta$ 1-42 s'auto-agrègent spontanément pour former de multiples formes coexistantes. Dans la MA, les peptides $A\beta$ s'accumulent dans le parenchyme nerveux pour former des dépôts diffus, appelés dépôts pré-amyloïdes. Ces dépôts contiennent essentiellement le peptide $A\beta$ 1-42 et probablement des peptides x-42, puisque clivés et hétérogènes dans leur partie N-terminale (Sergeant N. *et al.*, 2003). Ces peptides se compactent progressivement pour former des dimères, des oligomères, des polymères, des proto-filaments, des filaments, puis des fibrilles (Roher A.E. *et al.*, 2000).

Le réarrangement des peptides $A\beta$ en feuillet beta, dès la forme dimérique, mène à la production des oligomères solubles de plus haut poids moléculaire qui forment les fibres insolubles composant les plaques amyloïdes avancées ou dépôts amyloïdes (Figure 3). Par la suite, ces dépôts pré-amyloïde et amyloïdes, envahissent la presque totalité du cortex cérébral (Yamaguchi H. *et al.*, 1988).

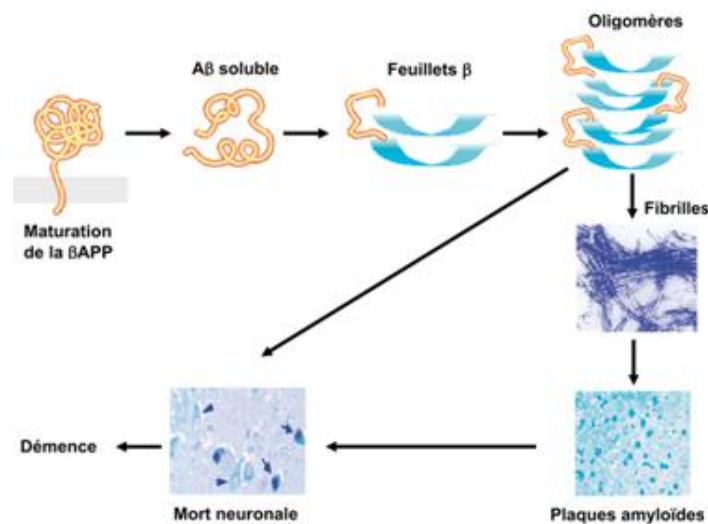


Figure 3 : Processus de mort neuronale menant au stade de la démence chez les patients atteints de la MA : du clivage de l'APP à la formation des plaques amyloïdes.

Les oligomères solubles composées de 3 à 8 monomères seraient les formes les plus neurotoxiques (Figure 4). La toxicité augmente très largement avec la concentration de ces oligomères (Cizas P. *et al.*, 2010). La sévérité de la détérioration cognitive dans la MA serait

également reliée au taux d'oligomères solubles dans le liquide céphalorachidien (LCR) et non à la concentration totale en peptides A β dans le LCR (Lue L.F. *et al.*, 1999).

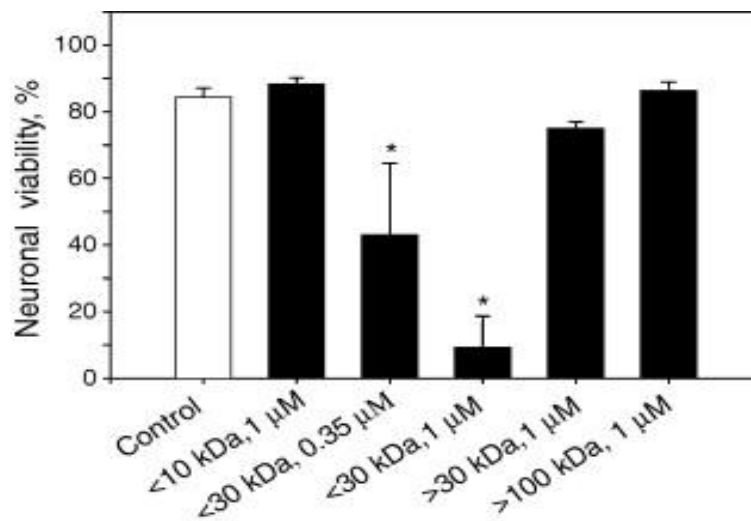


Figure 4 : Effets de la taille des oligomères des peptides A β 1–42 sur leur toxicité vis-à-vis du système neuronal (Cizas P. *et al.*, 2010).

1.2.2. Dégénérescence neurofibrillaire (DNF) ou tauopathie

L'autre hypothèse qui expliquerait la physiopathologie de la MA est étroitement liée à l'hypothèse de l'amyloïdogénèse. Elle repose sur le comportement spécifique de la protéine tau lors de maladies neurodégénératives, et particulièrement de la MA.

La protéine tau est normalement abondante dans les axones et permet la stabilisation des microtubules, qui constituent à la fois le vecteur du transport intra-neuronal et les structures de soutien de l'espace tridimensionnel du neurone. La forme hyper-phosphorylée de tau est insoluble et présente peu d'affinité pour les microtubules. Dans le processus normal, des enzymes contrôlent l'ajout et la suppression des groupements phosphates afin de réguler le taux de phosphorylation nécessaire. La phosphorylation est toutefois un phénomène complexe impliqué dans la régulation de plusieurs processus, notamment du développement neuronal.

Dans l'hypothèse de la dégénérescence neurofibrillaire, l'hyper-phosphorylation de la protéine tau entrainerait son accumulation intra-neuronale sous forme de fibrilles constituées de filaments appelés enchevêtrements neuro-fibrillaires (NFT) ou de paires de filaments appariés en hélice (PHF) (Figure 5).

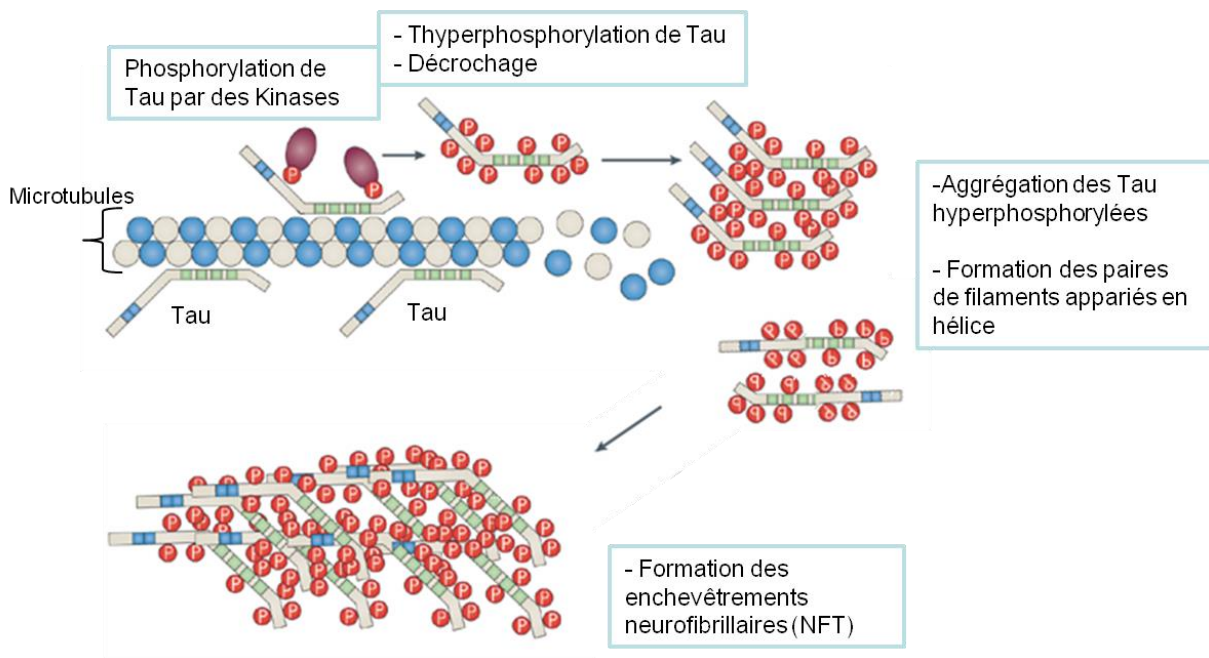


Figure 5 : Processus de phosphorylation de la protéine tau et de formation des NFT et des PHF dans le développement de la MA (Götz J., Ittner L.M., 2008).

Ces filaments pathologiques sont d'excellents marqueurs ultra-structuraux du processus dégénératif de la MA. Le nombre de NFT est en effet relié à la sévérité de la MA. Les NFT sont principalement composés des formes anormalement hyper-phosphorylées de la protéine tau et de ses formes agrégées.

Tout comme les oligomères de peptides $A\beta$, les agrégats intermédiaires des protéines tau hyper-phosphorylées sont cytotoxiques (Khlistunova I. *et al.*, 2006) et dégradent les capacités cognitives (Santacruz K. *et al.*, 2005 ; Oddo S. *et al.*, 2006). Cependant, des études ont montré que les PHF pourraient être inoffensives puisque la surcharge en NFT est indépendante de la réduction du transport axonal et du nombre de neurones (Andorfer C. *et al.*, 2003). Au contraire, les NFT pourraient être une réponse protectrice contre le stress oxydant induit par la toxicité neuronale des oligomères $A\beta$, en séquestrant ces formes agrégées intermédiaires en leur sein (Lee H.G. *et al.*, 2005). Le stress oxydant est l'un des premiers effets néfastes observés dans la MA. Il décroît avec la progression de la MA et la formation des NFT (Nunomura A. *et al.*, 2001). Néanmoins, les taux élevés des formes phosphorylées tau 181, tau 231 et de tau totale dans le fluide céphalorachidien

constituent, ensemble, un biomarqueur précis pour la prédiction d'une MA naissante chez les patients ayant une déficience cognitive légère (Mattsson N. *et al.*, 2009).

1.3. Les stades de la maladie

La MA est une maladie neurodégénérative progressive. Les caractéristiques neuropathologiques de la maladie telles que l'accumulation extracellulaire de plaques séniles, la formation intracellulaire de dégénérescences fibrillaires et la perte des neurones et synapses, sont la résultante d'une dégradation progressive et évolutive de processus biologiques normaux (Braak H. *et al.*, 1991 ; Thal D.R. *et al.*, 2002). De ce fait, la démence représente le dernier stade du processus pathologique qui commence plusieurs décennies avant l'apparition des symptômes cliniquement visibles. Les troubles de la mémoire sont les premiers signes cliniques qui apparaissent, environ une quinzaine d'années avant le diagnostic prévisionnel d'une démence liée à la MA. Ils sont suivis des troubles du langage et de la compréhension (Figure 6).

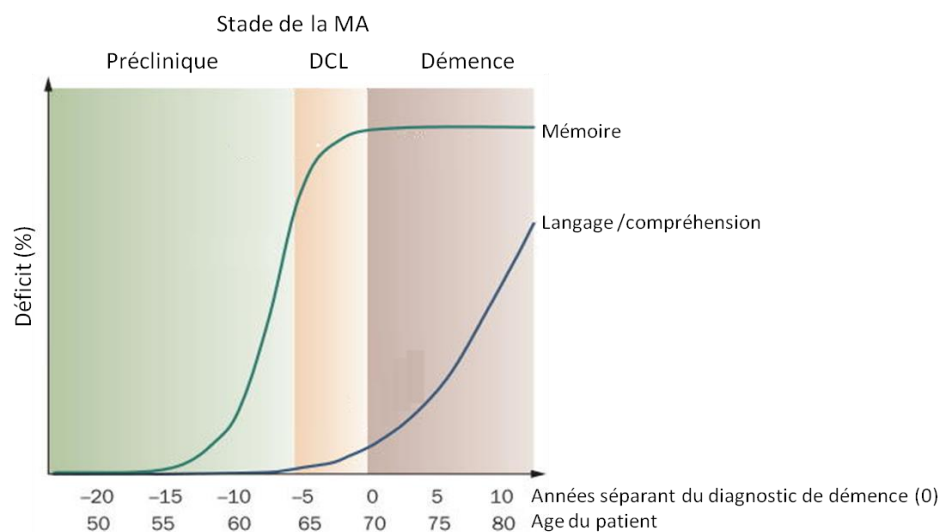


Figure 6 : Evolution des déficits en matière de mémoire, de langage et de compréhension lors des différents stades de la MA, en fonction de l'âge moyen des patients et du nombre d'années séparant les changements cognitifs du diagnostic de la MA (Frisoni G.B. *et al.*, 2010).

Trois stades de la MA se dégagent selon l'évolution neurophysiologique et clinique de la maladie. Le premier stade est dit pré-symptomatique ou préclinique. La MA évolue ensuite vers le stade dit prodromique, plus communément appelé déficit cognitif léger (DCL), puis vers le stade final

de la démence. La différenciation des stades de la MA repose sur les évolutions neurophysiologiques et cliniques observées chez le patient. En effet, les changements quantitatifs des indicateurs biochimiques cérébraux relatifs au processus de développement de la maladie et qualifiés de biomarqueurs, sont la base du modèle actuel décrivant le continuum de la MA (Jack C.R. *et al.*, 2010). Au cours des trois stades de la maladie, on observe des changements neurophysiologiques anormaux liés aux biomarqueurs de l'amyloïdogénèse, le peptide A β 1-42, et de la tauopathie, la protéine t-tau et p-tau, ainsi que des changements de l'anatomie cérébrale (Figure 7).

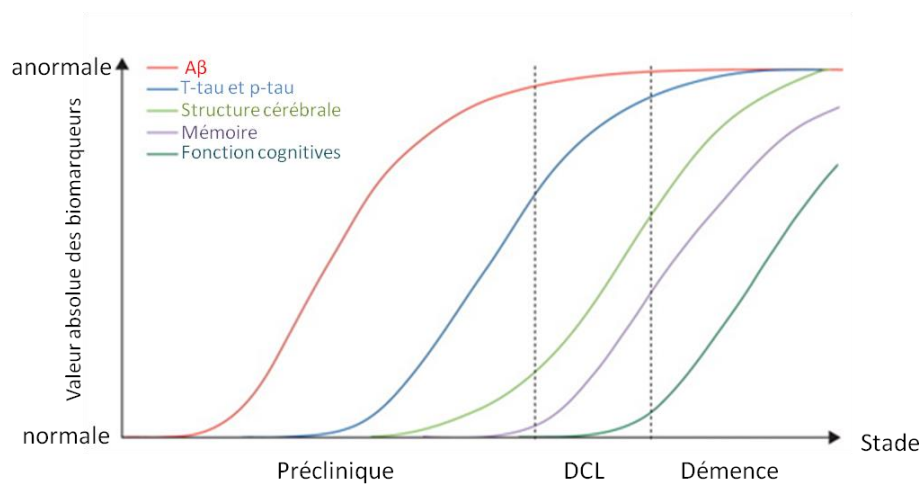


Figure 7 : Evolution des différents biomarqueurs (en valeurs absolues) d'un profil normal à anormal au cours des trois principaux stades de développement de la MA. A β représente la concentration dans le LCR du peptide A β 1-42 ou les dépôts amyloïdes visibles en imagerie TEP. T-tau et p-tau représentent la concentration de t-tau et p-tau dans le LCR. La structure cérébrale est obtenue par IRM structurale (Jack C.R. *et al.*, 2010)

1.3.1. Le stade préclinique

Un patient en phase préclinique présente des fonctions cognitives normales et une détérioration de certains mécanismes biochimiques au niveau cérébral. La pathologie n'est cependant pas assez sévère pour impacter sur les fonctions cognitives du patient. Cette phase de la maladie a été décrite suite à de nombreuses années d'études sur la composition du LCR et grâce à une technique d'imagerie, la tomographie par émission de positons (TEP). Les changements concernant les peptides A β 1-42 ont ainsi été mis en évidence. Plusieurs études ont démontré une

diminution significative de la concentration en A β 1-42 dans le LCR chez des patients ayant une cognition normale mais qui ont par la suite développé la MA. Aucun changement relatif à la protéine tau n'a été observé chez ces patients (Skoog I. *et al.*, 2003 ; Gustafson D.R., 2007 ; Stomrud E. 2007). De plus récentes études ont également montré une diminution des peptides A β 1-42 dans le LCR associée à une atrophie cérébrale chez des patients cognitivement normaux (Fagan A.M. *et al.*, 2009 ; Fjell A.M. *et al.*, 2010). En effet, à ce stade, les changements concernent essentiellement les peptides amyloïdes A β 1-42. Les techniques d'imagerie TEP-PIB permettent de localiser les zones cérébrales de rétention des peptides A β 1-42 et ainsi, de conforter un début de pathologie silencieuse (Fagan A.M. *et al.*, 2009). A ce stade, les changements induits par la MA sont exclusivement liés à l'hypothèse amyloïdogénèse et sont visibles essentiellement grâce aux techniques d'imagerie TEP.

1.3.2. Le stade prodromique ou DCL

Les cas de DCL sont assez hétérogènes et les patients qui en souffrent peuvent voir leur état évoluer vers diverses pathologie comme la MA, la démence vasculaire, la démence fronto-temporale ou la démence avec corps de Lewy. Cependant, la plupart des personnes présente un déclin cognitif normal lié à l'âge (Petersen R.C. *et al.*, 2003). Concernant les cas qui évoluent vers la MA, le facteur de risque est multiplié par trois pour les patients qui souffrent de DCL par rapport à des personnes cognitivement saines (Bennett D.A. *et al.*, 2002). Le stade prodromique de la MA est très bien caractérisé chez les patients souffrant de DCL par les biomarqueurs du LCR (Blennow K., Hampel H., 2003). En effet, le suivi de patients atteints de DCL évoluant vers la MA a montré que la quantification combinée de trois biomarqueurs du LCR, le peptide A β 1-42, la protéine tau totale (t-tau) et la protéine tau hyper-phosphorylée (p-tau) permet un diagnostic avec une sensibilité de 95% (Hansson O. *et al.*, 2006). Ces biomarqueurs ont également montré un pouvoir discriminant entre les patients évoluant vers la MA et ceux évoluant vers un DCL stable (Blennow K., Hampel H., 2003). Au stade prodromique de la MA, la tauopathie et l'amyloïdogénèse ont été amorcées. Les concentrations de tau total et de tau phosphorylées dans le LCR augmentent, tandis que celle du A β 1-42 diminue (Diniz B.S. *et al.*, 2008). Une atrophie de l'hippocampe devient également visible par IRM (McDonald C.R. *et al.*, 2009).

1.3.3. Le stade de la démence

A ce stade de la MA, les patients présentent de grands troubles mnésiques et d'apprentissage, additionnés à d'autres troubles cognitifs, comme des troubles visuels, des troubles de la perception spatiale ou des troubles du mouvement. Le patient peut également présenter des symptômes liés à d'autres pathologies telles que des maladies cardiovasculaires ou d'autres types de démence. L'analyse neurophysiologique des patients permet donc de décrire ce stade en discriminant la MA d'autres pathologies. L'analyse des concentrations des trois biomarqueurs A β 1-42, t-tau et p-tau permet en effet de discriminer des patients souffrant de la MA vis-à-vis de patients sains et de patients souffrant d'autres type de démence comme la démence à corps de Lewy, la démence vasculaire ou la démence fronto-temporale (Koopman K. *et al.*, 2009 ; Shaw L.M. *et al.*, 2009 ; Bian H. *et al.*, 2008). Tout comme le stade prodromique, l'évolution vers la démence est relié à la diminution en concentration du peptide A β 1-42 dans le LCR du fait de la formation des plaques séniles et à l'augmentation en concentration de t-tau et p-tau dans le LCR du fait de la dégénérescence neurofibrillaire. Les plaques séniles et les NFT sont également présents en plus grande quantité dans le cerveau que dans les stades précédents.

2. Diagnostic de la MA et biomarqueurs

2.1. Quelques définitions

2.1.1. Le diagnostic

En médecine, le diagnostic est la démarche par laquelle est déterminée l'affection dont souffre le patient. Il repose généralement sur l'étude des symptômes décrits par le patient ou observés par le médecin. Dans le cas de la MA, les symptômes visibles apparaissent uniquement à un état avancé et irréversible de la maladie. Cependant, le processus physiopathologique de la MA commence des années, voire des décennies avant l'apparition de premiers troubles cognitifs (Morris J.C. *et al.*, 2005). De ce fait, la recherche actuelle se concentre en partie sur la découverte d'outils de diagnostic basés notamment sur la mesure de marqueurs spécifiques, les biomarqueurs. Pour juger de la performance d'un test de diagnostic, deux notions sont principalement utilisées : la sensibilité et la spécificité. La sensibilité est la probabilité d'obtenir un test positif pour un patient qui est bien atteint de la pathologie. La spécificité est la probabilité d'obtenir un test négatif pour un patient qui n'est pas atteint de la pathologie.

2.1.2. Les biomarqueurs

La définition d'un biomarqueur est encore sujette à réflexion. De nombreux groupes de travail ont œuvré à mettre en place une définition universelle. La définition la plus citée aujourd'hui, reste celle du Biomarkers Definition Working Group, qui décrit en 2001 un biomarqueur comme une caractéristique objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathologique ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2001), la définition est plus large et englobe presque toute mesure reflétant une interaction entre un système biologique et un danger potentiel, pouvant être de nature chimique, physique ou biologique. La réponse

mesurée peut être fonctionnelle ou physiologique, biochimique au niveau cellulaire, ou encore une interaction moléculaire.

Les biomarqueurs sont sujets à plusieurs types de classifications. Ils se répartissent d'abord au sein de quatre groupes distincts, selon leur fonctionnalité : les biomarqueurs physiopathologiques et les biomarqueurs de diagnostic ; les biomarqueurs pronostics ; les biomarqueurs prédictifs de la pharmacodynamie et enfin, les biomarqueurs prédictifs de l'effet thérapeutique (European Medicines Agency, 2010). Ce travail de thèse se focalise sur la première catégorie de biomarqueurs. En effet, les biomarqueurs physiopathologiques ont pour objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour approfondir la connaissance des mécanismes physiopathologiques et pour diagnostiquer les patients atteints de la pathologie étudiée, ici la MA. Leur utilisation comme outil de diagnostic repose sur leur quantification au sein de fluides biologiques ou de tissus cérébraux, notamment dans le cas de la MA.

Il existe également une classification des biomarqueurs en fonction de leur performance et de leur degré de validation : les biomarqueurs potentiels ; les biomarqueurs validés ; les biomarqueurs qualifiés et enfin, les critères de substitution (U.S. Food and Drug Administration ; *Guidance for Industry : Pharmacogenomic Data Submission*). Les biomarqueurs potentiels sont ceux pour lesquels il a été démontré une corrélation avec la pathologie, généralement sur un échantillon limité de patients. Un biomarqueur validé est un biomarqueur mesuré par une méthode analytique aux performances établies et pour lequel il existe suffisamment d'éléments scientifiques pour démontrer la signification clinique, toxicologique ou pharmacologique des données générées par le biomarqueur. Un biomarqueur qualifié est un biomarqueur validé ayant obtenu une certification des autorités de santé selon un processus d'évaluation des données de validation concernant le biomarqueur. Enfin, les critères de substitution sont des biomarqueurs qualifiés pour lesquels de nombreux essais cliniques contrôlés par les autorités de santé ont été réalisés sur des populations en nombre satisfaisant. La corrélation entre le biomarqueur concerné et le paramètre biologique ciblé doit être avérée.

Plusieurs biomarqueurs de la MA, de spécificité et sensibilité satisfaisantes, existent pour le diagnostic de la MA. Mais la recherche de nouveaux biomarqueurs plus performants et plus discriminants vis-à-vis d'autres pathologies dégénératives est toujours très active.

2.2. Les biomarqueurs et la MA

Le LCR étant en contact direct avec l'espace extracellulaire cérébrale, il reflète au mieux les mécanismes biochimiques au niveau cérébral. Le LCR est donc un fluide biologique de premier choix pour le diagnostic de la MA et pour la découverte de nouveaux biomarqueurs de cette pathologie. Cependant, des équipes de scientifiques recherchent également des biomarqueurs de la MA dans des liquides biologiques alternatifs au LCR, plus accessibles, comme le sang (Blennow K. *et al.*, 2010), les urines (Di Domenico F. *et al.*, 2010) ou la salive (Bermejo-Pareja F. *et al.*, 2010). Les deux principaux biomarqueurs validés présents dans le LCR sont le peptide A β 1-42 et la protéine tau, qui sont respectivement les constituants principaux des plaques séniles et des dégénérescences fibrillaires (Jack C.R. *et al.*, 2010).

2.2.1. Les biomarqueurs moléculaires et biochimiques validés

2.2.1.1. Le peptide A β 1-42

La corrélation entre les plaques séniles et les peptides amyloïdes date des années 1980, lorsque des chercheurs réussissent à purifier les plaques séniles et les dépôts de l'angiopathie cérébrale. Ils découvrent que les constituants principaux sont les peptides amyloïdes (Glenner G.G., Wong C.W., 1984). Le peptide A β 1-42, très hydrophobe, est l'espèce la plus abondante de ces plaques (Masters C.L. *et al.*, 1985).

Les β -amyloïdes sont une famille de peptides issus du métabolisme cellulaire et sont sécrétés dans le LCR. Cette découverte est à la base des travaux sur les biomarqueurs A β (Seubert P. *et al.*, 1992). En effet, les peptides amyloïdes, dont A β 1-42, sont issus du clivage de l'APP, la protéine précurseur de l'amyloïde, par deux enzymes, la β -sécrétase (BACE-1) et la γ -sécrétase.

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'accumulation de ces agrégats de l'isoforme A β 1-42 représente l'un des processus neurodégénératifs de la MA, l'amyloïdogénèse (Blennow K. *et al.*, 2006 ; Querfurth H.W. *et al.*, 2010). Le dosage de ce peptide dans le LCR a permis de conforter son implication dans le processus de la pathologie. En effet, une corrélation entre la concentration post-mortem de peptide A β 1-42 dans le LCR et le niveau de présence des plaques lors d'autopsies a été démontré par plusieurs travaux de recherche (Strozyk D. *et al.*, 2003 ; Tapiola T. *et al.*, 2009).

Différents tests biochimiques ont donc été développés pour évaluer la quantité de ces isoformes dans le LCR. La concentration de ces peptides dans le LCR a été mesurée par différentes méthodes ELISA. Dans le cas de la MA, une grande majorité des études a mis en évidence une diminution de la concentration du LCR en peptides A β 1-42 cumulée à une augmentation de la présence des plaques séniles par rapport à des individus non déments (Rosenmann H. *et al.*, 2012). Dans certaines études, la présence du peptide A β 1-42 décroît même de près de 50% par rapport à la concentration d'échantillons contrôles (Sunderland T. *et al.*, 2003 ; Blennow K. *et al.*, 2004). De nombreuses études ont également montré une diminution de la quantité de A β 1-42 dans le LCR associée à une augmentation des agrégats dans le cerveau bien avant l'apparition de symptômes cognitifs (Jack C.R. *et al.*, 2010 ; Perrin R.J. *et al.*, 2009). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle le processus d'agrégation dysfonctionnel des peptides amyloïdes débute des décennies avant l'apparition des symptômes cliniques et de la perte des fonctions cognitives.

Cependant, même si la discrimination entre des patients atteints de la MA et des individus non déments semble être possible grâce à la quantification du peptide A β 1-42, entre autres, dans le LCR, la discrimination entre les patients atteints de la MA et ceux atteints d'autres formes de démence est davantage limitée si elle est basée sur le peptide A β 1-42. En effet, les études comparatives de la concentration du peptide chez les patients atteints de la MA et ceux atteints d'autres démences sont nombreuses et les résultats sont assez contradictoires. Certaines études font état de concentrations identiques en peptide A β 1-42 dans le LCR de patients atteints de la MA et de patients atteints de démences à corps de Lewy (Parnetti L. *et al.*, 2001 ; Gomez-Tortosa E. *et al.*, 2003). D'autres études relatent des concentrations plus élevées chez les patients avec DCL que chez les patients atteints de la MA (Kasuga K. *et al.*, 2010). D'autres études encore démontrent des concentrations plus faibles chez les patients avec DCL que chez les personnes souffrant de la MA (Parnetti L. *et al.*, 2008). Ces résultats conflictuels sont clairement illustrés sur la **Figure 8**. La concentration du peptide A β 1-42 dans le LCR a été mesurée chez un groupe de patients contrôles non déments et a été comparée à celles obtenue dans le LCR de groupes de patients atteints de différentes pathologies. Le chevauchement des concentrations entre les différentes pathologies est conséquent.

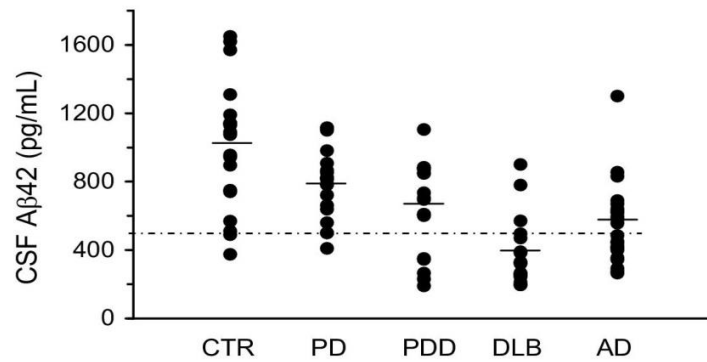


Figure 8 : Nuages de points des concentrations du peptide A β 1-42 obtenues pour 5 groupes de patients : un groupe contrôle sain (CTR), un groupe atteint de la maladie de Parkinson (PD), un groupe atteint de la maladie de Parkinson avec démence (PDD), un groupe avec la démence à corps de Lewy (DLB) et un groupe avec la MA (AD) (Parnetti L. *et al.*, 2008).

L'utilisation combinée du peptide A β 1-42 et des formes de la protéine tau ou d'autres formes de peptides amyloïdes semble répondre à cette problématique de discrimination entre les différentes démences (Rosenmann H. *et al.*, 2012).

2.2.1.2. La protéine tau

Il existe plusieurs isoformes (1 à 6) de la protéine tau dans le LCR. Cette protéine possède de très nombreux sites de phosphorylation (79 sérines et threonines potentiellement phosphorylées). La protéine tau est essentielle à la stabilisation de certaines cellules, notamment les neurones du cerveau. Dans le cas de la MA, la tauopathie se traduit par l'agrégation des protéines tau qui serait à l'origine de la dégénérescence neuronale.

En tant que biomarqueur de diagnostic, les concentrations des différentes formes de la protéine tau sont mesurées dans le LCR. La méthode ELISA est la plus couramment utilisée pour mesurer la protéine tau totale (t-tau). Cette technique repose sur des anticorps monoclonaux qui détectent tous les isoformes de tau, indépendamment de leur site de phosphorylation (Blennow K. *et al.*, 1995). La mesure de la protéine tau phosphorylée (p-tau) dans le LCR est réalisée le plus couramment à l'aide d'anticorps spécifiques des trois sites de phosphorylation considérés comme les plus pathologiques : la threonine 181, la serine 199 et la threonine 231 (Kohnken R. *et al.*, 2000 ; Vanmechelen E. *et al.*, 2000).

Dans plusieurs études, des différences de concentration ont été mises en évidence dans le LCR de patients souffrant de la MA et dans le LCR de patients contrôles sains. En effet, les concentrations de p-tau 181, p-tau 199 et p-tau 231 sont en augmentation chez les patients atteints de la MA (Buerger K. *et al.*, 2002 ; Hampel H. *et al.*, 2004 ; Blennow K. *et al.*, 2004 ; Mattson M.P. *et al.*, 2009). En parallèle, de nombreuses études ont rapporté de sensibles augmentations de t-tau dans le LCR des patients souffrant de la MA, de l'ordre de 300% par rapport aux concentrations contrôles chez les patients non déments (Sunderland T. *et al.*, 2003 ; Blennow K. *et al.*, 2004).

La discrimination des patients souffrant de la MA et de ceux souffrant d'autres types de démences à l'aide des concentrations des différentes formes de la protéine tau semble significativement meilleure que celle offerte par la mesure du peptide A β 1-42 seul dans le LCR. En effet, la grande majorité des études concluent que de plus faibles concentrations de la protéine tau, quelle que soit la forme, se retrouvent dans le LCR de patients présentant des démences non relatives à la MA. Plusieurs équipes ont ainsi démontré des différences significatives de concentrations de t-tau et de p-tau 181, principalement chez les patients atteints de DCL ou de la maladie de Parkinson, par rapport aux patients souffrant de la MA (Buerger K. *et al.*, 2002 ; Gomez-Tortosa E. *et al.*, 2003 ; Kasuga K. *et al.*, 2010). Des taux moins élevés de p-tau 199 et p-tau 231 ont également été mis en évidence chez des patients déments ne présentant pas la MA (Hampel H. *et al.*, 2004). L'utilisation de ratios entre t-tau et p-tau, quelle que soit la forme phosphorylée, s'est montrée performante pour le diagnostic différentiel entre la MA et la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Hort J. *et al.*, 2008).

2.2.1.3. Combinaison de tau et A β 1-42

De nombreuses publications ont démontré que la combinaison de p-tau, t-tau et A β 1-42 améliore le diagnostic de la MA en matière de spécificité et de sensibilité par rapport à la mesure des marqueurs seuls (Galasko D. *et al.*, 1998 ; Reimenschneider M. *et al.*, 2002 ; Maddalena A. *et al.*, 2003 ; Zetterberg H. *et al.*, 2003 ; Hansson O. *et al.*, 2006). Finalement, une signature multibiomarqueurs basée sur les concentrations dans le LCR de la protéine t-tau, de la protéine p-tau 181 et du peptide A β 1-42 a été validée *in vivo* pour le diagnostic de la MA (Blennow K. *et al.*, 2009 ; Blennow K. *et al.*, 2010).

2.2.2. Les biomarqueurs potentiels de la MA

De nombreuses équipes à travers le monde ont publié des travaux sur des biomarqueurs potentiels de la MA autres que ceux validés, à savoir le peptide A β 1-42 et la protéine tau, sous forme t-tau ou de p-tau. Cependant, peu de ces biomarqueurs affichent une haute sensibilité et spécificité. Blennow *et al.* (2010) ont répertorié des candidats biomarqueurs ayant démontré des qualités dans plusieurs études indépendantes. Ils se classent en deux catégories : ceux présents dans le LCR et ceux issus du plasma sanguin. Quelques travaux se sont intéressés à des liquides biologiques beaucoup plus accessibles comme la salive (Bermejo-Pareja F. *et al.*, 2010) et l'urine (Pratico D. *et al.*, 2010) mais les concentrations de biomarqueurs potentiels sont beaucoup plus faibles que dans le LCR, ce qui rend les conclusions sur une éventuelle corrélation quasiment impossible pour le moment. Les études sur le LCR sont donc plus nombreuses car ce liquide reflète de manière optimale les processus cérébraux de par sa proximité avec le cerveau. La plus grande complexité du milieu sanguin et les plus faibles concentrations des biomarqueurs potentiels qui y sont retrouvées sont également au désavantage de ce liquide.

2.2.2.1. La β -sécrétase 1 ou BACE 1

La production des peptides A β résulte du clivage de l'APP par deux enzymes dont la BACE 1. Plusieurs études se sont donc intéressées aux niveaux d'activité de la BACE 1 dans le LCR. Cependant, les conclusions des différentes études ne vont pas toujours dans le même sens.

En effet, plusieurs études montrent que l'expression et l'activité enzymatique de la BACE 1 sont en augmentation dans le cerveau de patients décédés de la MA (Fukumoto H. *et al.*, 2002 ; Yang L.B. *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré dans plusieurs études une augmentation de la concentration et de l'activité de la BACE 1 dans le LCR de patients présentant des troubles cognitifs légers à forme prodromique de la MA (Holsinger R.M. *et al.*, 2004 ; Zhong Z. *et al.*, 2007 ; Zetterberg H. *et al.*, 2008). Cependant, d'autres travaux n'ont pas montré de différence de concentration de BACE 1 chez les patients atteints de la MA et les patients atteints de troubles cognitifs légers (Mulder S.D. *et al.*, 2010).

Une plus large étude menée récemment chez des patients souffrant de la MA et des patients contrôles sains n'a pas conclu à une corrélation entre les niveaux de concentration et d'activité de l'enzyme dans le LCR et l'atteinte ou non du patient (Rosen C. *et al.*, 2012). Néanmoins, selon Blennow *et al.* (2012), l'activité de BACE 1 semble s'élever légèrement aux stades très précoces de

la maladie et cette élévation peut être considérée comme une manifestation pathogène précoce de la MA.

2.2.2.2 Les protéines sAPP β et sAPP α

Le processus de clivage enzymatique de l'APP par la BACE 1 et l' α -sécrétase génère respectivement les protéines sAPP β et sAPP α . Ces deux formes sont secrétées dans l'espace extracellulaire et peuvent éventuellement migrer vers le LCR (Blennow K. *et al.*, 2012). Dans des cas sporadiques de la MA et chez les patients avec DCL, les concentrations en sAPP β et sAPP α ne varient pas ou très légèrement (Olsson T. *et al.*, 2003 ; Zetterberg H. *et al.*, 2008 ; Lewczuk P. *et al.*, 2010). Cependant, ces deux formes protéiques peuvent être des biomarqueurs précieux permettant de suivre l'impact de traitements thérapeutiques sur le métabolisme de l'APP lors d'essais cliniques (Rosen C. *et al.*, 2012).

2.2.2.3 Les formes tronquées des peptides A β

Bien que le peptide A β 1-42 soit le plus abondant dans les plaques séniles, il existe de nombreux variants de peptides amyloïdes dans le LCR et dans le sang. Ces variants diffèrent par leur longueur et résultent du clivage en N-terminal ou en C-terminal du peptide A β 1-42 (Wiltfang J. *et al.*, 2002 ; Maler J.M. *et al.*, 2007). Les formes les plus abondantes dans le LCR sont les peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42 (Wiltfang J. *et al.*, 2002). Le peptide A β 1-40 compte pour 60 à 70% des A β totaux (Portelius E. *et al.*, 2006). Aucun changement de la concentration de A β 1-40 seul n'a été enregistré dans le LCR de patients atteints de la MA et aucune corrélation entre le nombre de plaques séniles et le taux de A β 1-40 dans le LCR n'a été constatée, *a contrario* de ce qui est observé avec le peptide A β 1-42 (Fagan A.M. *et al.*, 2006 ; Fagan A.M. *et al.*, 2009).

Il a cependant été démontré à plusieurs reprises que certains rapports, comme le taux A β 1-42 / A β 1-40 dans le LCR, diminuent de manière plus prononcée que la forme A β 1-42 seule chez les patients présentant la MA ou un trouble cognitif léger (Mehta P.D. *et al.*, 2000 ; Hansson H. *et al.*, 2007). Dans ce sens, de nombreuses combinaisons de peptides ont été comparées afin d'aboutir à des tests diagnostiques de grande sensibilité et de grande spécificité. Il a par exemple été confirmé dans une large étude que le ratio des peptides A β 1-42 / A β 1-38 permet d'améliorer la discrimination des patients atteints de la MA de patients ne souffrant pas de cette pathologie (Volker W. *et al.*, 2009). Un autre rapport intéressant, A β 1-42 / (A β 1-42 + A β 1-40 + A β 1-38),

proposé par Verpillot *et al.* (2011), a permis une forte discrimination des patients atteints de la MA de patients contrôles non déments, mais cette étude a été réalisée à partir d'un faible nombre d'échantillons de LCR.

D'autres variants tels que des peptides tronqués en C-terminal ont démontré leur potentiel pour le diagnostic. Esselmann *et al.* (2011) ont récemment déposé un brevet valorisant l'utilisation des rapports des peptides A β 1-42 / A β 2-42 ou des peptides A β 1-42 / A β 2-40 pour l'obtention d'un test diagnostic performant de la MA.

2.2.2.4. Les oligomères

Les agrégats fibrillaires insolubles de peptides A β qui composent les plaques séniles ont longtemps été considérés comme l'une des caractéristiques pathologiques centrales de la toxicité des plaques et donc du processus de la MA. Mais de récentes études suggèrent que les oligomères solubles de peptides A β sont très toxiques, probablement plus que les agrégats fibrillaires (Sakono M. *et al.*, 2010). Il a été démontré qu'ils peuvent inhiber la potentialisation à long terme, *in vivo*, un des mécanismes principaux utilisés par le cerveau pour stocker les souvenirs (Walsh D.M. *et al.*, 2002). De plus, ils seraient co-responsable d'une phosphorylation anormale de la protéine tau et de la dystrophie des neurites (Zempel H. *et al.*, 2010). La quantification des oligomères dans le LCR a depuis été largement évaluée. Cependant, les oligomères sont présents en très faible quantité dans le LCR par rapport aux autres formes de peptides A β . Ils représentent probablement moins de 1% des A β totaux dans le LCR, rendant extrêmement difficile et peu reproductible la mesure de ces oligomères.

Cependant, plusieurs groupes ont démontré une concentration plus élevée d'oligomères solubles dans le cerveau (Bruggink K.A. *et al.*, 2013 ; Shankar G.M. *et al.*, 2008) et dans le LCR (Gao C.M. *et al.*, 2010 ; Fukumoto H. *et al.*, 2010) de patients souffrant de la MA. D'autres études n'ont pas établi de différence entre les patients MA et les patients contrôles (Bruggink K.A. *et al.*, 2012 ; Santos A.N. *et al.*, 2012). De plus, une augmentation de la concentration de ces oligomères dans le LCR a été identifiée chez des patients âgés sans troubles cognitifs et présentant les caractéristiques d'un développement imminent de la MA. Le taux de ces oligomères a également été corrélé à la concentration totale de la protéine tau dans le LCR de ces patients. En conclusion, les oligomères solubles sont des candidats pertinents en tant que biomarqueurs de la MA. Les

difficultés majeures étant la quantification de ces espèces peu concentrées et la reconnaissance spécifique des anticorps largement utilisés pour les détecter.

2.2.2.5. Les autres biomarqueurs candidats

Les éléments structuraux des astrocytes sont également de bons indicateurs de la neuroinflammation liée aux démences. La GFAP est l'un des principaux composants des neurofilaments intermédiaires des astrocytes (Kamphuis W. *et al.*, 2012). La S100B est exprimée par ces derniers pour réguler les flux de calcium et influe entre autre sur l'extension neuritique et axonale. Les protéines GFAP et S100B sont largement utilisées comme marqueurs immunohistochimiques et biochimiques des astrocytes (Fagan A.M., Perrin R.J., 2012). Ces deux protéines ont été proposées par plusieurs équipes de recherche comme des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic de la MA mais aussi de la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ). En effet, une augmentation de leur concentration a été démontrée dans le LCR de patients atteints de la MA contrairement aux patients contrôles sains (Jesse S. *et al.*, 2009). De plus, l'augmentation de leur concentration est significativement différente chez des personnes atteintes de la MA et de MCJ et permet une discrimination des deux pathologies (van Eijk J.J.J *et al.*, 2010). La GFAP semble également être un marqueur de la sévérité de la pathologie (Fukuyama R. *et al.*, 2001). La GFAP et la S100B pourraient donc augmenter le pouvoir discriminant d'un test diagnostique de la MA vis-à-vis d'autres démences lors d'une utilisation combinée avec les marqueurs validés.

La H-FABP est une protéine impliquée dans le métabolisme des acides gras spécifiques du myocarde et dans leur transport. Elle est également un biomarqueur de l'infarctus du myocarde (McCann C.J. *et al.*, 2008). Bien que sa présence et son rôle dans le cerveau et plus particulièrement dans le LCR ne soient pas encore compris, cette protéine semble être un candidat prometteur en tant que biomarqueur de la MA. En effet, plusieurs études ont démontré que la concentration de H-FABP dans le LCR de patients atteints de la MA augmente sensiblement contrairement aux cas des patients sains contrôles (Hu W. *et al.*, 2010 ; Craig-Schapiro R. *et al.*, 2011 ; Hu W. *et al.*, 2010 ; Chiasserini D. *et al.*, 2010). La H-FABP semble également permettre de discriminer les patients souffrant de DCL stable de ceux dont le DCL évoluera vers la MA. En effet, le ratio FABP / A β 1-42 permet d'atteindre une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% du test diagnostique, permettant ainsi de discriminer les patients atteints de DCL non évolutive et ceux dont le DCL évoluera en MA (Chiasserini D. *et al.*, 2010).

Les protéines neuronales et synaptiques issues du LCR peuvent également être considérées comme des biomarqueurs potentiels de la MA. La visinin-like protéine 1 (vLP-1) est une protéine captrice de calcium, fortement exprimé dans le LCR. La première étude clinique sur cette protéine a démontré une augmentation marquée de sa concentration dans le LCR de patients atteints de la MA par rapport à des patients sains contrôles (Laterza O.F. *et al.*, 2006). Le pouvoir diagnostique de cette protéine pour la discrimination de patients sains et de patients atteints de la MA s'est montré similaire à celui de la protéine t-tau, de la protéine p-tau ou du peptide A β 1-42 seuls, affichant une spécificité et une sensibilité du test de plus de 80% (Lee J.M. *et al.*, 2008). La protéine vLP-1 semble donc elle aussi être un biomarqueur prometteur de la MA.

Les neurofilaments sont des composants structuraux des axones. Leur concentration est augmentée dans le LCR dans les cas de démence vasculaire (Sjögren M. *et al.*, 2001) et d'hydrocéphalie à pression normale (Agren-Wilsson A. *et al.*, 2007). Une étude comparative a démontré une augmentation de la concentration de ces protéines dans le LCR chez des patients atteints de démence fronto-temporale, tandis que dans le LCR des patients atteints de la MA, leur concentration est comparable à celle d'un patient sain (Sjögren M. *et al.*, 2000). Les neurofilaments semblent donc être des biomarqueurs potentiels capables de discriminer les patients atteints de la MA de patients atteints d'autres types de démence.

Les protéines synaptiques reflètent parfaitement le fonctionnement synaptique ou cognitif. De nombreuses protéines présynaptiques et postsynaptiques ont été identifiées dans le LCR, comme par exemple la synaptotagmine, la GaP-43, la SNAP 25 ou la neurogranin (Davidsson P. *et al.*, 1999). Parmi celles-ci, la GaP-43 a fait l'objet d'une étude de quantification dans le LCR de patients aux profils pathologiques différents. Cette étude a montré une augmentation plus marquée de la concentration de la GaP-43 dans le LCR de patients atteints de la MA que chez des personnes saines ou souffrants de démence fronto-temporale (Sjögren M. *et al.*, 2001). Cette étude a également mis en évidence une très forte corrélation entre la concentration de la GaP-43 et celle de t-tau, ce qui suggère que ces deux biomarqueurs reflètent de manière équivalente la dégénération axonale et synaptique.

2.2.3. Le diagnostic actuel de la MA

Le diagnostic définitif de la MA ne peut être réalisé qu'au cours d'une autopsie du patient décédé, car cette opération permet d'accéder aux tissus du cerveau et de les analyser en profondeur.

Cependant, la combinaison de certains tests permet aux neurologues de diagnostiquer la MA chez un patient et de la discriminer des autres démences avec une certaine marge d'erreur. Ces tests reposent sur des tests cognitifs, des techniques d'imagerie et des analyses biochimiques de fluides biologiques. Ce processus de diagnostic est cependant long et fait intervenir des professionnels de santé aux compétences complémentaires.

Selon la Haute Autorité de Santé (2011), une démarche diagnostique doit être proposée dès lors que des troubles cognitifs et des troubles de la mémoire sont constatés chez une personne. L'évaluation initiale de l'état du patient se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, un médecin généraliste évalue le type et l'origine de la plainte et reconstitue l'histoire de la maladie avec le patient et son accompagnateur, tout en étudiant d'éventuels changements de comportement et un retentissement des troubles sur les activités quotidiennes. Un examen clinique juge ensuite de l'état général et cardio-vasculaire du patient. Puis, le patient subit une évaluation cognitive globale et approfondie. En présence d'un trouble cognitif avéré, le patient effectue alors des examens paracliniques de diagnostic. Trois différentes méthodes de diagnostic sont utilisées : les tests cognitifs, les techniques d'imagerie et les tests biochimiques.

2.2.3.1. Les tests cognitifs

Les tests d'évaluation cognitive, plus communément appelés tests de mémoire, sont incontournables pour repérer et diagnostiquer la MA. Ces tests permettent d'évaluer différentes fonctions cognitives parmi lesquelles la mémoire, le langage, les praxies et l'attention.

La Haute Autorité de Santé recommande d'effectuer une évaluation globale de manière standardisée à l'aide du Mini-Mental State Examination (MMSE) ou du test de Folstein (Folstein M.F. *et al.*, 1975). Ce test de référence est pratiqué par le neurologue. Il explore l'orientation spatio-temporelle, l'apprentissage, la mémoire, l'attention, le calcul, le raisonnement, le langage et les praxies constructives. Les résultats du test sont influencés par l'âge, le niveau socio-culturel, l'activité professionnelle et sociale, ainsi que l'état affectif (anxiété et dépression) et le niveau de vigilance du patient. De ce fait, il doit être réalisé par un médecin expérimenté et spécialisé.

Le MMSE discrimine les sujets à risque mais ne peut suffire seule à poser le diagnostic de la MA. Certaines études démontrent que le MMSE conduit à une faible sensibilité (Cumming T.B. *et al.*, 2013), en particulier chez les patients atteints de DCL (Beyermann S. *et al.*, 2013). Une large étude

réalisée sur plus de mille patients démontre que si l'on s'appuie sur la limite haute du score de 24 au MMSE (score en dessous duquel l'hypothèse de la MA est validée), le MMSE affiche une sensibilité de seulement 66% et une forte spécificité de 99%. Cette faible valeur de sensibilité s'explique en partie par l'incapacité du test à détecter des patients lorsqu'ils possèdent un niveau d'instruction élevé (O'Bryant S.E. *et al.*, 2008).

D'autres tests cognitifs, tels que l'épreuve de Grober et Buschke, le test des 5 mots de Dubois, le Codex ou encore le Montreal Cognitive Assessment sont également réalisés, mais moins fréquemment que le MMSE.

2.2.3.2. Les techniques d'imagerie

La Haute Autorité de Santé recommande une imagerie cérébrale systématique à l'aide de la technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour tout trouble cognitif avéré récemment découvert. La combinaison de l'IRM avec d'autres techniques d'imagerie telles que la tomographie par émission de positons (TEP) permet de récolter des informations cruciales quant à l'atteinte du cerveau, d'où la place grandissante de l'imagerie dans le processus de diagnostic. Cependant l'atrophie du cerveau et les changements du métabolisme cérébral du glucose mis en évidence par les différentes techniques d'imagerie et caractéristiques de l'évolution de la MA, apparaissent à un stade plus avancé de la maladie que les variations de concentration des peptides A β 1-42 dans le LCR (Bateman R.J. *et al.*, 2012).

2.2.3.2.1. L'IRM

L'IRM permet des analyses macroscopiques *in vivo* renseignant sur la perte neuronale et synaptique, qui se caractérise par une atrophie cérébrale spécifique. De nombreuses études ont montré que l'IRM structurale était une technique performante pour le suivi de la progression de la MA (Frisoni G.B. *et al.*, 2010) et constituait ainsi un biomarqueur validé de la MA.

L'IRM la plus répandue et la plus performante en matière de diagnostic est celle qui évalue l'atrophie de l'hippocampe. Une échelle visuelle correspondant à l'avancement de l'atrophie est couramment utilisée et permet un diagnostic discriminant les patients atteints de la MA des patients cognitivement sains, avec une sensibilité et une spécificité comprises entre 80 et 85%

(Duara R., *et al.*, 2008). L'étude de cette région permet également d'anticiper le déclin cognitif vers la MA de patients présentant des troubles cognitifs légers (Korf E.S. *et al.*, 2004).

Un autre diagnostic repose sur l'évaluation visuelle de l'atrophie du lobe temporal médian. L'exactitude de ce diagnostic a été évalué sur des cas vérifiés de la MA. De plus, il permet une discrimination de la MA par rapport à la démence à corps de Lewy et à la déficience cognitive vasculaire (Burton E.J., *et al.*, 2009). La sévérité de l'atrophie du lobe temporal médian, et en particulier l'atrophie hippocampique, reflète ainsi l'état d'avancement de la neurodégénérescence (Figure 9).

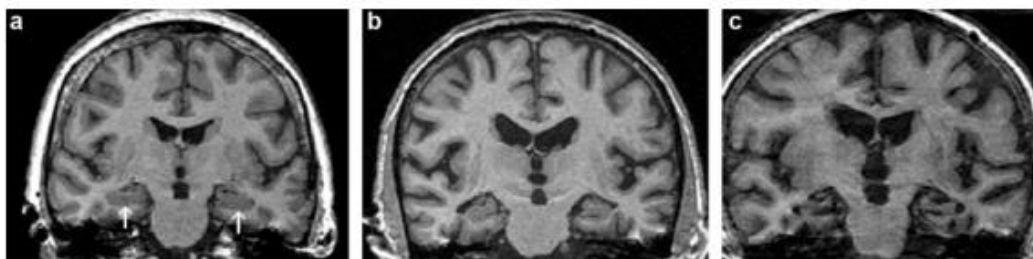


Figure 9 : Coupes coronales d'IRM montrant l'atrophie hippocampique existant chez les patients atteints de la MA. a) Hippocampe normal (flèche blanche) chez un sujet âgé sain. b) Atrophie hippocampique débutant chez un patient atteint de la MA. c) Atrophie hippocampique plus marquée. (Colliot O. *et al.*, 2008).

2.2.3.2.2. Le TEP-SCAN

La tomographie par émission de positons (TEP) est une méthode d'imagerie médicale qui permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par les positons (ou positrons) issus de la désintégration d'un produit radioactif injecté au préalable. La TEP est une imagerie **fonctionnelle** et non **structurelle** comme le scanner et l'IRM. Elle **mesure certaines activités biochimiques** du cerveau. Il existe deux principales techniques de TEP pour le diagnostic de la MA : la TEP amyloïde et la TEP-FDG.

Le TEP amyloïde est une technique récente et de plus en plus utilisée, qui permet de visualiser et de quantifier les dépôts de β -amyloïdes dans le cerveau de patients grâce à un radio-traceur, le Pittsburgh Compound B (PIB), qui se lie spécifiquement aux dépôts fibrillaires amyloïdes (Tolboom N. *et al.*, 2009). Le PIB est un dérivé de la thioflavine T. Klunk *et al.* (2004) ont mis en

évidence une augmentation de la rétention du ^{11}C -PIB dans les zones cérébrales les plus sujettes aux dépôts amyloïdes chez les personnes atteintes de la MA par rapport aux patients sains (Klunk W.E. *et al.*, 2004). Une augmentation de la rétention du PIB semble aussi corrélée à un déclin plus rapide de la mémoire et des fonctions cognitives (Resnick S.M. *et al.*, 2010). De plus, des études ont montrés que 10 à 30% des personnes âgées avec une cognition normale étaient PIB positif, c'est-à-dire dans la phase précoce de formation de dépôts amyloïdes (Quigley H. *et al.*, 2010).

L'autre technique, la **FDG-PET**, utilise le [^{18}F]fluorodeoxyglucose pour détecter les changements liés au métabolisme du glucose et pour quantifier le flux sanguin cérébral. De nombreuses études ont montré que l'activité métabolique se trouvait altérée dans les régions atrophiées chez les patients atteints de la MA (Minoshima S. *et al.*, 1997 ; Habeck C.G. *et al.*, 2008 ; Sadeghi N. *et al.*, 2008). Des régions plus distantes sont également affectées par ces changements (Matsuda H. *et al.*, 2002). la **FDG-PET** affiche de hautes sensibilités pour le diagnostic de la MA (Schroeter M.L. *et al.*, 2009 ; Jack C.R. *et al.*, 2010).

La **Figure 10** illustre l'apport des deux techniques et leur performance. L'image PET-PIB montre une nette différence de rétention du PIB chez le patient avec la MA et chez le patient contrôle. Néanmoins, de faibles quantités de liaisons non spécifiques sont constatées dans la matière blanche du cerveau. Chez le patient avec la MA, on observe de fortes rétentions du PIB, surtout au niveau du cortex frontal et temporo-pariétal. En ce qui concerne le FDG-PET, le patient contrôle présente un métabolisme normal. Le patient atteint de la MA présente quant à lui un hypo-métabolisme, surtout au niveau du cortex temporo-pariétal, et un métabolisme quasi-normal dans le cortex frontal.

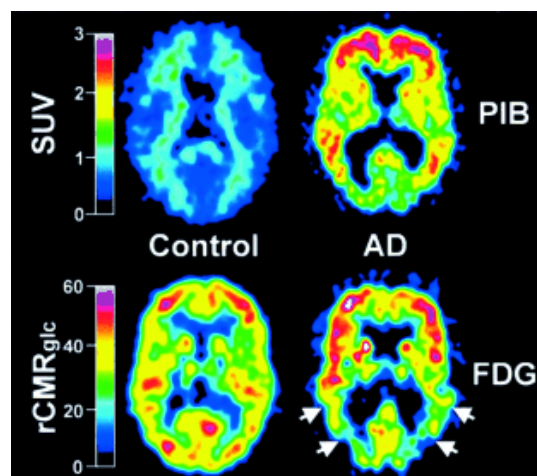


Figure 10 : Comparaison d'une image PET-PIB (en haut) et d'une image PET-FDG (en bas) obtenues chez un patient contrôle (à gauche) et chez un patient atteint de la MA (à droite) (Klunk W.E. *et al.*, 2004).

2.2.4. Les analyses biologiques

Actuellement, différentes méthodes analytiques sont utilisées pour la quantification du peptide A β 1-42 et de la protéine tau dans le LCR. Cependant, la majorité des méthodes utilisées en routine et en clinique est basée sur les méthodes d'affinité immunologique de type ELISA, ou plus récemment sur les tests multiplex pour la détection simultanée de plusieurs biomarqueurs.

Il existe plusieurs variantes des tests ELISA : les tests directs, les tests indirects et les tests en sandwich (Figure 11). Dans ce dernier cas, une quantité connue d'anticorps de capture recouvrant la surface du dispositif se lie spécifiquement avec l'antigène cible présent dans l'échantillon. Un anticorps de détection, ou anticorps primaire, également spécifique de l'antigène, est ajouté. Un anticorps secondaire conjugué à une enzyme est ensuite dirigé contre l'anticorps de détection. Enfin, un substrat est ajouté et converti par l'enzyme en une forme colorée ou fluorescente détectable par un spectrophotomètre.

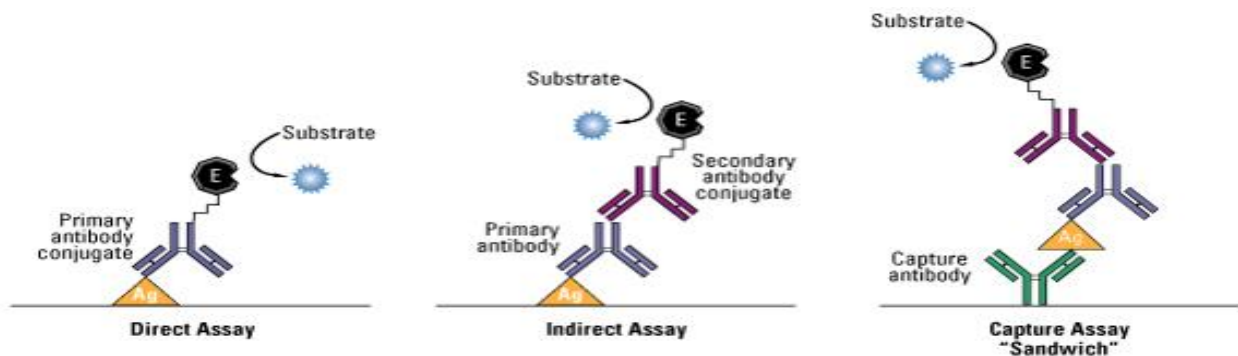


Figure 11 : Principe des trois principaux tests ELISA.

Les multiplexing assays sont des techniques analytiques qui permettent la détection et la quantification simultanée de plusieurs analytes, offrant ainsi un gain de temps, d'argent et une économie d'échantillon. Il existe différentes analyses de ce type pour l'étude d'échantillons biologiques dans le domaine de la neurodégénérescence. La plupart d'entre elles repose sur le principe des tests ELISA. C'est le cas de la technologie xMAP, basée sur le principe de la cytométrie en flux (Figure 12). Cette technique se base sur l'utilisation de microsphères,

contenant un mélange précis de deux agents fluorescents permettant l'obtention de plus de 500 signatures fluorescentes différentes. Ces microsphères sont ensuite utilisées comme supports solides sur lesquels sont greffés des anticorps différents en fonction de la signature fluorescente de la microsphère. Une fois les analytes cibles reconnus par les anticorps de capture, un anticorps secondaire conjugué à une biotine se fixe sur la cible. Enfin, une streptavidine conjuguée à un fluorophore se fixe sur le système. Le fluorophore présente une longueur d'onde d'excitation maximum différente de celles des microsphères. Ceci permet grâce à l'excitation des microsphères par deux lasers de longueurs d'onde d'excitation différentes, d'identifier, d'une part la cible correspondant au signal spécifique du mélange de fluorophores présent à l'intérieur des billes, et d'autre part, de quantifier cette cible grâce à l'intensité d'émission du fluorophore présent à la surface des billes.

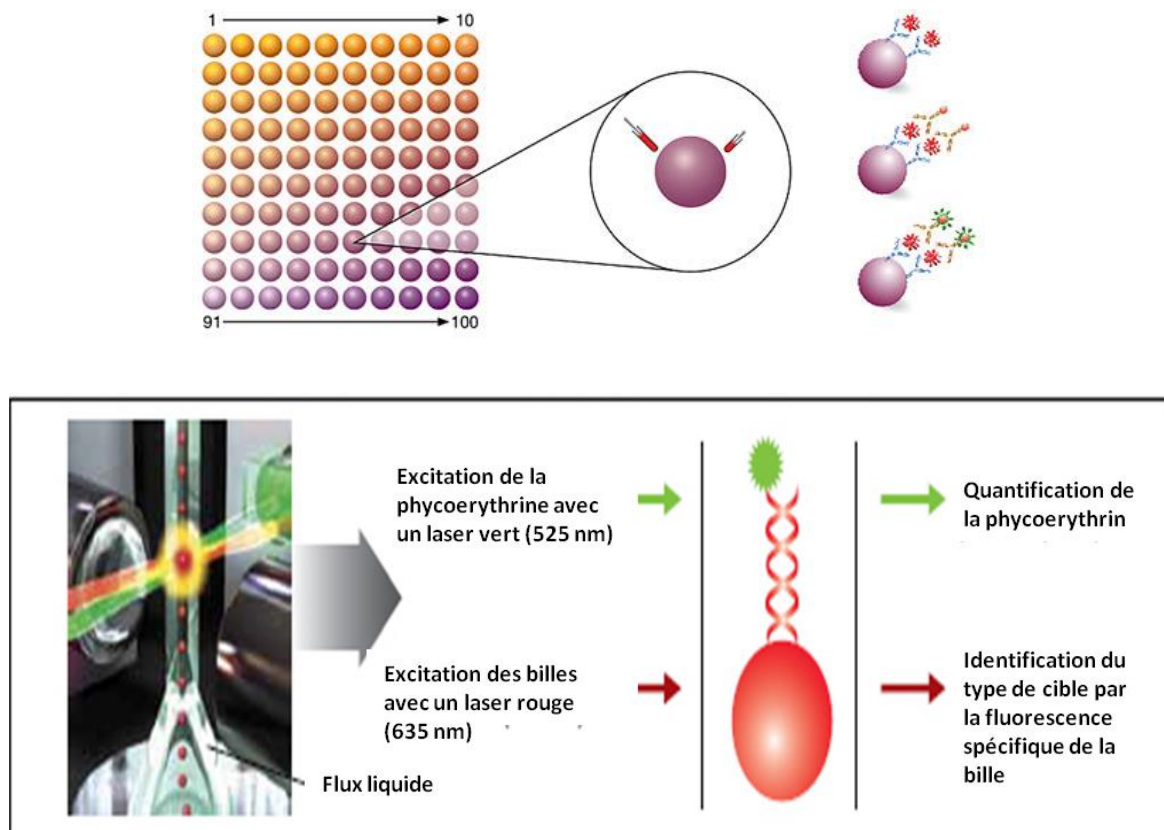


Figure 12 : Schéma représentatif de la technologie xMap. Chaque série de billes contient un mélange de deux agents fluorescents spécifiques d'un anticorps de capture du biomarqueur. Ces anticorps sont ensuite greffés sur les billes en fonction de leur signature. Une fois l'antigène reconnu, un anticorps biotinylé se lie à l'analyte. Enfin, une streptavidine conjuguée à la phycoérythrine est ajoutée pour initier le signal fluorescent.

Une technique alternative est la Meso Scale Discovery. Cette technologie est très similaire au test ELISA de type sandwich, à l'exception du fait que la réaction enzymatique est remplacée par une réaction électrochimiluminescente. Cette technique reposant sur le principe de l'ELISA permet la détection rapide et sensible des divers biomarqueurs dans le LCR comme A β 1-42, t-tau et p-tau.

Les techniques biochimiques de mesure des biomarqueurs de la MA dans le LCR présentent cependant quelques limites liées aux écarts de mesures observés, empêchant ainsi leur utilisation en routine clinique. En effet, plusieurs études comparatives de données obtenues à l'aide de tests biochimiques identiques dans différents laboratoires de recherche ont démontré une grande variabilité des concentrations des biomarqueurs validés A β 1-42, t-tau et p-tau dans le LCR (Mattsson N. *et al.*, 2009 ; Visser P.J. *et al.*, 2009). Ce constat a été confirmé par des études de contrôle-qualité inter-laboratoires (Lewczuk P. *et al.*, 2006 ; Mattsson N. *et al.*, 2011 ; Verwey N.A. *et al.*, 2009). Une étude comparative mondiale, basée sur les données de treize laboratoires, a estimé les coefficients de variation des mesures du peptide A β 1-42 à 37% et des formes de la protéine tau à 16%. De nombreux facteurs peuvent être à l'origine de ce manque d'harmonie entre les valeurs mesurées. L'une des principales causes est liée à l'échantillon de patients constituant les différentes études. En effet, des disparités peuvent exister sur les caractéristiques démographiques des patients, les protocoles de recrutement, les états d'avancement de la maladie au sein des échantillons, ou les critères diagnostics employés pour les mesures (Dumurgier J. *et al.*, 2013). Les conditions d'utilisation des échantillons de LCR peuvent également se trouver à l'origine de ces écarts de mesure. En effet, la gestion de ce liquide biologique est particulièrement délicate et des conditions variables de prélèvement, de transport ou de stockage peuvent jouer sur la concentration des biomarqueurs accessibles dans le liquide (Dumurgier J. *et al.*, 2013). Enfin, les divergences des mesures rapportées sont également liées à la variabilité de la qualité des tests immunochimiques de type ELISA en fonction de leur numéro de lot qui influe sur leur performance. Le manque d'harmonie des protocoles de mesure employés peut également être à l'origine des résultats contradictoires. Le manque de spécificité de certains anticorps et la variabilité de la qualité des anticorps commerciaux disponibles d'un kit à l'autre constitue également l'une des limites de ces tests. Des recommandations sur les pratiques pré-analytiques et analytiques ont été proposées récemment afin de standardiser le processus complet de mesure de biomarqueurs dans le LCR et de diminuer la variabilité des résultats d'une étude à l'autre (Vanderstichele H. *et al.*, 2012 ; del Campo M. *et al.*, 2012).

Il existe une autre limite, spécifique aux multiplexing assays. Celle-ci est liée au fait que les échantillons biologiques contiennent des protéines et des peptides à des concentrations très variables et éloignées les unes des autres. En effet, même si les méthodes présentent des gammes de calibration assez larges en concentration, il est impossible de corréliser toutes les concentrations des différents biomarqueurs avec les courbes d'étalonnage. Les combinaisons d'analytes doivent donc être judicieusement choisies.

A ce jour, la quantification des biomarqueurs dans le LCR est essentiellement basée sur la disponibilité d'anticorps spécifiques de haute performance, permettant leur utilisation au sein de tests ELISA ou immunohistochimique (Issaq H.J. *et al.*, 2008). Afin de contourner les limites de ces tests, des techniques alternatives ne faisant pas intervenir d'anticorps sont proposées dans la littérature et en particulier celles qui se basent sur la spectrométrie de masse (SM) pour la quantification des biomarqueurs. La SM a longtemps été utile à la découverte et à l'identification des protéines et peptides présents dans le LCR ou dans le plasma, du fait de sa capacité à analyser simultanément de très nombreux composés. Différentes variantes de la SM ont été appliquées dans ce but. Parmi celles-ci, le mode SELDI-TOF ou MALDI-TOF ont démontré leur potentiel pour le profilage ou le screening des protéines ou peptides dans le LCR (Berven F.S. *et al.*, 2007 ; Simonsen A.H. *et al.*, 2010). Cependant, les méthodes classiques de SM sont peu efficaces dans une optique de quantification des protéines identifiées (Kroksveen A.C. *et al.*, 2011). En revanche, les méthodes de SM de type Selected Reaction Monitoring (SRM) sont depuis de nombreuses années des méthodes de référence pour l'analyse quantitative des petites molécules, en particulier les médicaments et leurs métabolites (Lescuyer P. *et al.*, 2012). Avec le développement récent de méthodes de SM capables de détecter de plus grandes molécules, cette technique devient applicable à la quantification des peptides et des protéines à l'aide d'un standard interne marqué avec un isotope lourd (Anderson L. *et al.*, 2006). Ce type d'analyse est classiquement effectué avec un spectromètre de masse de type triple quadrupole ou quadrupole-trap couplé à un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC). Récemment, une méthode de spectrométrie de masse de type SRM permettant de quantifier des protéines et peptides de manière sensible et spécifique a été développée et adaptée à la quantification des peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42 dans le LCR (Pannee J. *et al.*, 2013). Dans cette méthode, un isotope lourd et stable de chacun des peptides A β de l'étude sont utilisés comme standards internes pour la quantification des peptides dans le LCR.

La puissance diagnostique de la méthode SRM a été évaluée sur deux échantillons indépendants comprenant des patients atteints de la MA à différents niveaux de sévérité et des patients sains contrôles. La méthode a permis d'atteindre des limites de quantification suffisamment basses, de l'ordre de 62,5 pg/ml pour le peptide A β 1-42, permettant la quantification des peptides A β dans le LCR. De plus, cette méthode affiche des coefficients de variation des mesures situés en dessous de 10%, ce qui est inférieur aux variations couramment obtenues avec les tests immunochimiques (Bjerke M. *et al.*, 2010). La méthode a ensuite été comparée à un test de type ELISA pour vérifier son pouvoir de discrimination entre les populations atteintes de la MA et les populations saines. La SRM a permis de distinguer les deux groupes de manière équivalente à l'ELISA, avec une sensibilité de 93% et une spécificité de 80% pour le premier groupe et une sensibilité et une spécificité de 86,7% pour le second groupe. L'utilisation combinée du rapport des concentrations A β 1-42/ A β 1-40 et de cette méthode a de plus montré une augmentation du pouvoir de discrimination des deux populations. Du fait de la haute sensibilité affichée, de la capacité de la méthode à quantifier les peptides A β au sein du LCR sans souffrir des effets de matrice, de la reproductibilité satisfaisante obtenue et du pouvoir diagnostique équivalent aux tests ELISA, la SRM semble être une alternative de choix pour la quantification de biomarqueurs dans le LCR, en contournant les problématiques liées à l'utilisation d'anticorps.

3. Généralité sur les techniques de séparation électrophorétique de protéines

3.1. L'électrophorèse capillaire (EC)

3.1.1. Principe de base

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique d'analyse permettant la séparation électrophorétique de molécules de tailles très variables au sein d'un capillaire de faible diamètre interne, le plus couramment composé de silice vierge fondue. La migration des analytes est la résultante de la migration électrophorétique (ep) propre aux composés dans un électrolyte donné et de l'écoulement électroosmotique (eo).

3.1.1.1. L'écoulement électroosmotique

L'écoulement électroosmotique (eo) correspond à l'écoulement du liquide contenu dans le capillaire sous l'action d'un champ électrique. L'eo est directement lié à la présence d'une double couche, la double couche de Helmholtz, à la surface du capillaire rempli d'un électrolyte (**Figure 13**).

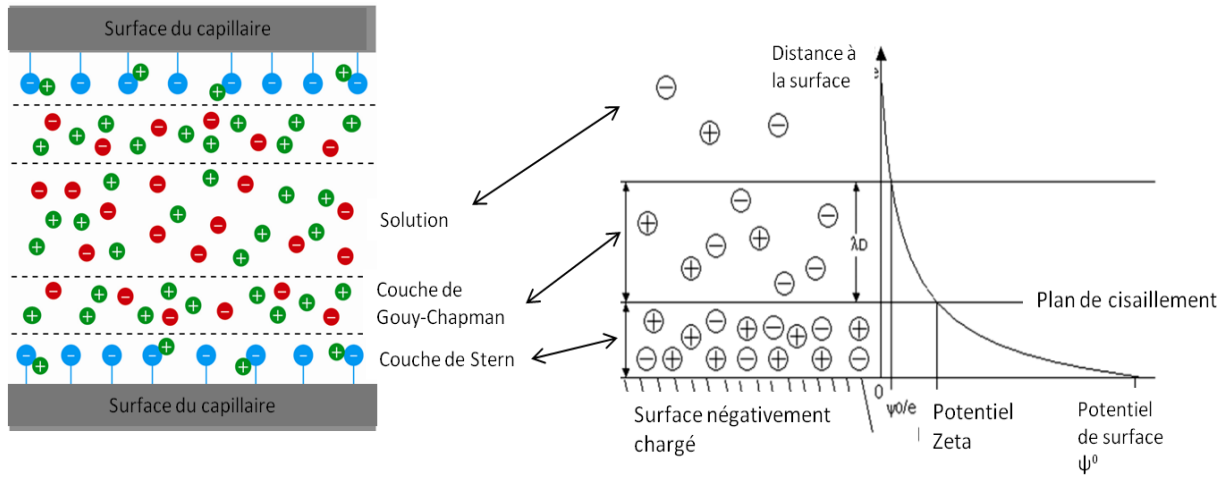


Figure 13 : Section d'un capillaire de silice vierge rempli d'électrolyte illustrant la succession des couches formées sous l'action d'un champ électrique (à gauche) et représentation de la double couche électrique et du potentiel zêta à la surface d'un capillaire de silice ionisé (à droite) (Pallandre A. *et al.*, 2006).

En effet, les capillaires de silice vierge étant composés de groupements silanols ionisés à partir de pH 2-3 (Taverna M. *et al.*, 2003 ; Burgot G. *et al.*, 2011), la charge de surface négative exerce un pouvoir d'attraction des ions chargés positivement et un pouvoir de répulsion des ions chargés négativement dans l'électrolyte. Selon le principe de l'électroneutralité, une grande partie des charges négatives de surface est compensée par des ions de charge opposée, formant ainsi une première couche stable et organisée appelée couche de Stern. Cette couche compacte est composée d'ions oxoniums, de molécules d'eau polaires et des cations présents dans l'électrolyte. Une seconde couche plus épaisse et plus éloignée, nommée couche de Gouy-Chapman ou couche diffuse, se compose des cations solvatés et de molécules d'eau.

La limite entre la couche de Stern et la couche de Gouy-Chapman est appelée le plan de cisaillement. Elle représente la distance à la surface à partir de laquelle les cations de la double couche vont migrer vers la cathode sous l'effet du champ électrique. En ce point, le potentiel électrique est appelé potentiel zeta (Booth F., 1948 ; Kirby B.J. *et al.*, 2004). Le potentiel zêta, ou potentiel électrocinétique, est caractéristique de la double couche électrique présente à la surface du capillaire. Ce potentiel s'exprime selon l'équation suivante :

$$\zeta = \frac{\delta \cdot \sigma}{\epsilon r \cdot \epsilon_0}$$

Où ζ est le potentiel zêta (V), δ l'épaisseur de la double couche électrostatique (m), σ la densité de charge de surface du capillaire ($C \cdot m^{-2}$), ϵ_r la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} C^2 \cdot N^{-1} \cdot m^{-2}$) et ϵ_0 la constante diélectrique de l'électrolyte.

Le potentiel zêta augmente en valeur absolue avec le pH et varie inversement à la concentration des cations et de leur charge. Il est aussi inversement proportionnel à la force ionique de l'électrolyte et dépend de la nature des contre-ions qui vont former la double couche. Dans le cas des capillaires de silice vierge, le potentiel zêta est négatif du fait de la charge de surface négative. Il est donc pH-dépendant, car la charge de surface augmente avec le pH du fait de l'ionisation des groupements silanols.

Sous l'action d'un champ électrique, les cations de la couche diffuse sont donc attirés vers la cathode, tandis que les cations de la couche compacte sont retenus par des interactions électrostatiques fortes les liants aux groupements silanols. Cette migration de la couche extérieure va entraîner, sous l'influence des forces de frottement, l'ensemble des composés de l'électrolyte vers la cathode. Cette migration représente l'eo. L'eo s'effectue donc dans le sens de la migration des cations et se dit cationique. Ce phénomène peut être décrit par l'équation de Helmholtz-Smoluchowski, qui définit la vitesse linéaire de l'eo comme dépendante de la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) et du champ électrique appliqué (E) :

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = - \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} E$$

Où v_{eo} est la vitesse électroosmotique ($cm \cdot s^{-1}$), μ_{eo} la mobilité électroosmotique ($cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$), E le champ électrique ($V \cdot cm^{-1}$), ζ le potentiel zêta (V), η la viscosité de l'électrolyte (cP), ϵ_0 la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} C^2 \cdot N^{-1} \cdot m^{-2}$) et ϵ_r la constante diélectrique de l'électrolyte.

Plusieurs facteurs peuvent donc influencer la μ_{eo} , notamment le pH de l'électrolyte, sa force ionique, sa composition et sa viscosité. La vitesse de l'eo peut également être modifiée par le potentiel zêta de surface. Il est en effet possible de modifier la surface des capillaires en silice

vièrge afin de modifier les charges de surface du capillaire et donc de réduire ou inverser le potentiel zèta.

Le profil de l'èo est plat comparé au profil parabolique obtenu par les techniques de séparation chromatographique, où l'écoulement des fluides se fait par pression hydrodynamique (Figure 14). Ce profil plat s'explique par le fait que la vitesse de l'èo est indépendante de la distance à la surface, ce qui favorise des résolutions élevées (Grossman P.D. *et al.*, 1992).



Figure 14 : Profil des écoulements en chromatographie liquide (à gauche) et en électrophorèse capillaire (à droite).

3.1.1.2. La mobilité électrophorétique

L'électromigration ou migration électrophorétique (μ_{ep}) correspond au déplacement d'une espèce chargée sous l'action d'un champ électrique. La vitesse électrophorétique résultante, linéaire et constante, est donc fonction du champ électrique de la mobilité électrophorétique propre à l'espèce ionique :

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E$$

Où v_{ep} est la vitesse électrophorétique ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$), E le champ électrique ($\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$) et μ_{ep} la mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

La migration électrophorétique des composés cationiques s'effectue dans le sens du champ électrique ($\mu_{ep} > 0$) et celle des composés anioniques dans le sens inverse ($\mu_{ep} < 0$). La mobilité électrophorétique est propre à chaque composé et aux propriétés physico-chimiques de l'électrolyte. Dans le cas d'une dilution infinie, μ_{ep} peut s'exprimer par l'équation suivante :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta Rh}$$

Où μ_{ep} est la mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), η la viscosité de l'électrolyte (cP), q la charge de l'analyte et Rh son rayon hydrodynamique.

La μ_{ep} d'un composé chargé est dépendante de plusieurs paramètres tels que le pH (qui influe sur l'état d'ionisation du composé), la force ionique de l'électrolyte, sa viscosité et ses propriétés de solvation (qui influent sur le rayon hydrodynamique du composé). La température influe également sur la μ_{ep} à travers son influence sur la viscosité de l'électrolyte.

3.1.2. Les phénomènes de dispersion

L'électrophorèse capillaire offre des séparations de grande efficacité qui présentent souvent de hautes résolutions, principalement du fait du profil d'écoulement plat. Dans des conditions idéales, les phénomènes de dispersion ne sont liés qu'au mécanisme de diffusion moléculaire. Cependant, dans la pratique, les performances peuvent être limitées par les phénomènes de dispersion se traduisant par un élargissement des pics. Plusieurs processus cumulatifs sont à l'origine de ce phénomène. Les principaux facteurs de dispersion rencontrés en EC sont les suivants : la diffusion longitudinale, l'effet Joule, les phénomènes d'adsorption sur la paroi du capillaire, les dispersions liées à l'injection et les différences de conductivité entre l'électrolyte et l'échantillon. L'apport de chaque phénomène à la diffusion totale observée est caractérisé par des écarts-types dans l'équation suivante :

$$\sigma = \sigma_{\text{injection}} + \sigma_{\text{effet Joule}} + \sigma_{\text{adsorption}} + \sigma_{\text{diffusion longitudinale}} + \sigma_{\Delta \text{conductivité}}$$

La dispersion est d'abord due à la diffusion longitudinale de l'échantillon, liée à l'introduction d'une zone concentrée qui génère un gradient de concentration lors du transfert de masse par diffusion des molécules. Les facteurs sont également responsables de la dispersion de l'échantillon mais leur impact peut être modulé. La dispersion liée à l'injection est en générale négligeable en EC du fait des très faibles volumes injectés, de l'ordre du nanolitre. L'effet Joule et les phénomènes d'adsorption à la surface des capillaires sont particulièrement importants dans l'analyse de protéines.

3.1.2.1. L'effet Joule

L'effet Joule est une résultante du passage d'un courant à travers un électrolyte. Il se manifeste par une augmentation de l'énergie interne et conduit à une augmentation générale de la température au sein du capillaire. Il génère également un gradient radial de température au sein du capillaire découlant du transport de la chaleur vers l'extérieur. Ce phénomène doit être régulé lors des séparations électrocinétiques car ces gradients augmentent les phénomènes de dispersion et réduisent l'efficacité des séparations (Ross D. *et al.*, 2001). L'effet Joule peut être exprimé par la puissance dissipée par effet Joule selon l'équation suivante :

$$P = G.V^2 = (\sigma.\pi.d_i^2.V^2)/(4.L)$$

Où **P** est la puissance, **G** la conductance (S), **V** la tension électrique (V), **σ** la conductivité (S.m⁻¹), **d_i** le diamètre interne du capillaire (m) et **L** la longueur du capillaire.

Les phénomènes de dispersion liés à l'effet Joule et entraînant des élargissements de bande sont connus depuis longtemps (Tiselius A. *et al.*, 1932). Hjerten propose en 1967 d'utiliser des capillaires de faible diamètre et composés de matériaux de faible conductance ou résistivité afin de réduire l'effet Joule lors de la séparation de composés sous tension électrique. En 1974, Virtanen est le premier à utiliser des capillaires en verre de faible diamètre afin de contourner les effets de convection au sein des capillaires. Enfin, Jorgensen *et al.* réalisent en 1981 les premières séparations rapides, résolutive et efficaces d'acides aminés et de peptides sur des capillaires en verres de 75 μ M de diamètre.

L'une des limites de performance des séparations en EC est liée à l'échauffement de l'électrolyte par effet Joule au sein du capillaire. L'élévation de la température du système influence plusieurs paramètres clé tels que la viscosité, la permittivité de l'électrolyte ou le potentiel zêta (Evenhuis C.J. *et al.*, 2006). En pratique, la viscosité et la permittivité électrique d'un électrolyte diminuent avec la température, alors que le potentiel zêta augmente (Evenhuis C.J. *et al.*, 2006). La conductivité des électrolytes et les coefficients de diffusion des espèces sont également impactés par ce phénomène (Knox J.H. *et al.*, 1994). L'élévation de la température dans le capillaire par effet Joule crée une hétérogénéité transversale des valeurs de diffusion moléculaire des espèces, de l'écoulement électroosmotique et de la migration électrophorétique des espèces présentes dans

le capillaire. Les vitesses disparates de migration engendrées favorisent des variations transversales des zones de concentration et des flux de diffusion (Ghosal S. 2006). La constante de diffusion des analytes augmente elle aussi avec la température (Petersen, N.J. *et al.*, 2004).

L'effet Joule peut donc avoir des effets négatifs sur les séparations électrocinétiques en EC, notamment par le phénomène d'élargissement des pics (Nelson R.J. *et al.*, 1994 ; Hjerten S. *al.*, 1990 ; Petersen N.J. *al.*, 2004) et la faible répétabilité des mesures (Knox J.H. *et al.*, 1994 ; Ikuta N. *et al.*, 2000). Le principal outil pour contrer l'échauffement du capillaire est l'installation sur les appareils d'EC d'un système de ventilation ou l'utilisation d'une cartouche thermostatée par l'action d'un liquide de refroidissement. L'effet Joule peut aussi être réduit en utilisant des électrolytes de faible conductivité, des capillaires de faible diamètre et de plus grande longueur, ou en abaissant la tension appliquée. Cependant, ces changements de paramètres se font souvent au détriment de l'efficacité et des résolutions, de la sensibilité et des temps de migration.

3.1.2.2. Les interactions de surface et l'adsorption des analytes

L'adsorption des composés, et en particulier des protéines, sur les parois du capillaire de silice vierge est un facteur limitant des performances de l'EC. En effet, ce phénomène d'adsorption influe sur les charges apparentes du capillaire, donc sur l' e_o , entraînant une perte de répétabilité des analyses en termes de temps de migration et des aires de pics. L'adsorption des composés entraîne également une perte des composés lors de l'analyse, ce qui affecte la quantification. Les interactions de surface sont également reflétées par un défaut de symétrie des pics, mais également par une perte drastique de résolution (Kinoshita M. *et al.*, 2000).

Les phénomènes d'adsorption concernent plus particulièrement les protéines et les peptides. La multitude de sites chargés au sein des séquences d'acides aminés et la grande taille de ces composés favorisent différents types d'interactions comme les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobes ou les interactions de Van der Waals (Lucy C.A. *et al.*, 2008 ; Stutz H. 2009). Ces interactions dépendent de plusieurs facteurs qui peuvent être cumulatifs tels que le pH et la force ionique de l'électrolyte ou l'état de charge de surface du capillaire. Les caractéristiques de la protéine sont également à considérer. Son point isoélectrique (pI), sa taille, sa conformation et son hydrophobie sont des paramètres qui influent fortement sur l'adsorption.

Les interactions surface/protéines sont difficiles à prédire tant les processus impliqués sont complexes. La connaissance de la charge globale théorique d'une séquence peptidique n'est pas suffisante pour appréhender l'adsorption du composé car le pI ne tient pas compte de la structure tridimensionnelle de la protéine qui, par sa conformation et donc par les charges présentes à sa surface, influence le phénomène d'adsorption (Houska M. *et al.*, 2004 ; Essa J.H. *et al.*, 2007 ; Schure M.R. *et al.*, 1993).

3.1.2.2.1. Influence des paramètres externes sur l'adsorption des protéines

Plusieurs paramètres physicochimiques liés à l'environnement du système protéine/surface influent sur le comportement des protéines au contact d'une surface. Les principaux facteurs externes sont la température, le pH et la force ionique. La température influe sur la conformation de la protéine et sur la cinétique d'adsorption des protéines sur la surface. L'élévation de la température entraîne une augmentation des coefficients de diffusion définis par l'équation de Nernst-Einstein, et donc l'accélération de la migration des protéines vers la surface. De plus, le phénomène d'adsorption est étroitement lié à l'augmentation de l'entropie du système (Norde W., 1996). Dans un système surface/protéine, l'entropie est en grande partie générée par le processus d'adsorption/désorption des molécules d'eau et des ions de la surface du capillaire ainsi que par les réarrangements structuraux que peuvent subir les protéines (Malmsten M., 1998 ; Norde W., 1986 ; Ramsden J.J., 1995). Une hausse de la température favorise ces deux phénomènes et entraîne généralement une hausse des quantités de protéines adsorbées à la surface (Koutsoukos P.G. *et al.*, 1983).

Le pH du milieu est également un paramètre important car il conditionne l'état de charge des protéines. L'état de charge des protéines dépend de leur pI, qui correspond au pH où le nombre de charges positives est équivalent au nombre de charges négatives. A un pH inférieur au pI, les protéines sont globalement chargées positivement, alors qu'à un pH supérieur au pI, elles sont globalement chargées négativement. Les taux d'adsorption sont plus importants quand les protéines et la surface présentent des charges de signe opposé, du fait de l'accélération de la migration des composés par attraction électrostatique. De plus, les répulsions électrostatiques entre protéines sont minimales au pH correspondant au pI, ce qui permet une plus grande densité de protéine accumulées au niveau des surfaces. Ainsi, les quantités de protéines adsorbées

en surface sont maximales quand le pH du milieu est proche du point isoélectrique des protéines (Bremer M.G.E.G. *et al.*, 2004 ; Demanèche S. *et al.*, 2009 ; Höök F. *et al.*, 1998)

La **Figure 15** illustre l'adsorption de la myoglobine sur un capillaire en silice vierge en fonction du pH de l'électrolyte de séparation. Le pourcentage maximum de protéines adsorbées est proche du pI de la protéine (7,2).

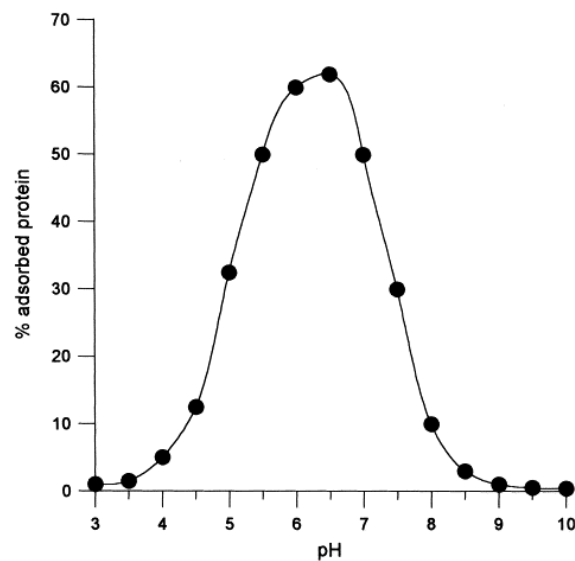


Figure 15 : Adsorption de la myoglobine sur un capillaire en silice vierge en fonction du pH de l'électrolyte de séparation à force ionique identique (Verzola B. *et al.*, 2000).

La force ionique du tampon dans lequel se trouvent les protéines est également un paramètre influençant le processus d'adsorption. Elle impacte principalement sur la longueur de Debye, c'est-à-dire la distance d'écrantage des charges présentes au niveau du plan de cisaillement vis-à-vis des ions présents en solution (Israelachvili J., 1992). Comme la longueur de Debye diminue avec l'augmentation de la force ionique, plus la force ionique est grande, plus les ions présents dans le tampon font écran aux répulsions électrostatiques entre les différentes espèces chargées du système, en particulier entre les protéines et la surface chargée. Parallèlement, en présence d'une force ionique élevée, les répulsions électrostatiques entre des espèces de même charge et les attractions électrostatiques entre des espèces de charge opposée sont réduites. Dans les deux cas, le processus d'agrégation des protéines entre elles ou d'adsorption des protéines à la surface est amplifié (Jones K.L. *et al.*, 2000). Il faut cependant noter que les forces ioniques élevées favorisent le processus d'agrégation des protéines (Vendruscolo M. *et al.*, 2007).

3.1.2.2.2. Influence des propriétés intrinsèques des protéines sur l'adsorption

Une classification des protéines selon leur comportement vis-à-vis d'une surface peut être réalisée en prenant en compte leurs propriétés, comme leur taille, leur stabilité structurelle et leur composition en acides aminés. De ce point de vue, chaque protéine possède une personnalité moléculaire unique (Andrade J.D. *et al.*, 1992). En effet, les protéines sont constituées d'une ou plusieurs chaînes de polypeptides linéaires, elles-mêmes composées d'acides aminés. Les chaînes latérales des acides aminés varient en termes de polarité : certaines sont hydrophobes, d'autres plus hydrophiles. Elles varient également selon leur charge (acides aminés basiques et acides). La structure tridimensionnelle d'une protéine dépend donc d'interactions intramoléculaires mais également de son interaction avec son environnement en fonction de sa composition.

Deux groupes de protéines peuvent néanmoins être différenciés : les protéines dites soft et les protéines dites hard. Les protéines hard sont de petites protéines, rigides, avec une stabilité interne élevée, comme la lysozyme, la β -lactoglobuline ou la α -chymotrypsine. Elles sont peu sujettes à des altérations structurales en cas d'adsorption sur une surface (Norde W. 2008). Les protéines soft possèdent quant à elles une stabilité interne faible et sont donc plus susceptibles de subir des réorganisations conformationnelles au contact d'une surface. La plupart des protéines présente dans le plasma, telles que l'albumine, la transferrine ou les immunoglobulines, sont de taille intermédiaire et dites « soft ».

Dans un but de simplification, Andrade *et al.* ont proposé de décomposer la structure complexe des protéines en fonction des propriétés de leurs domaines accessibles (chargé/neutre, polaire/apolaire, hydrophile/hydrophobe). La **Figure 16** résume les différents types d'interactions protéines/surface en fonction de la nature de la surface et des propriétés des domaines accessibles des protéines.

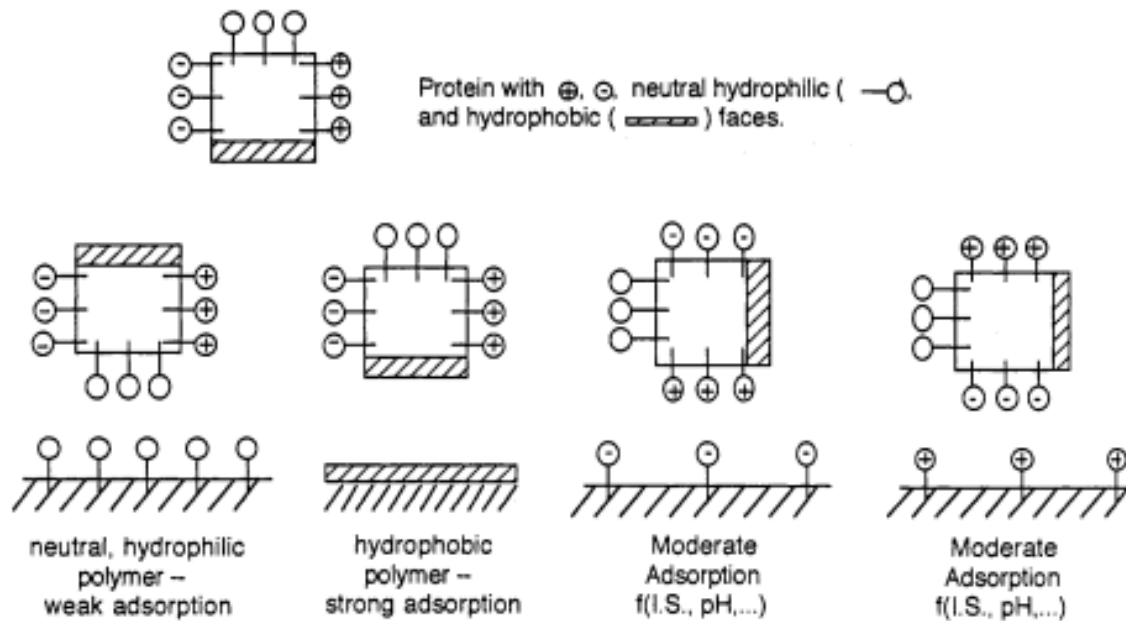


Figure 16 : Schéma des différentes interactions protéines/surface en fonction des liaisons mises en jeu (Andrade J.D. *et al.*, 1987).

Les protéines de plus haut poids moléculaire sont essentiellement composées de lipoprotéines et de glycoprotéines. Leurs comportements vis-à-vis des surfaces sont essentiellement liés à leur composition en lipides et en glycanes (Andrade J.D. *et al.*, 1987). Les lipoprotéines ont une grande affinité avec les surfaces hydrophobes et sont soumises à des déformations structurelles de par leur caractère labile. En revanche, les glycoprotéines, du fait de leur composition en glycanes hydrophiles, ne présentent que peu d'affinité avec les surfaces hydrophobes.

D'une manière générale, les petites protéines diffusent plus rapidement vers la surface. Les protéines de plus haut poids moléculaire se lient en revanche plus fortement aux surfaces car elles présentent une plus grande zone de contact.

3.1.2.2.3. Influence des propriétés de surface sur l'adsorption

Les propriétés de surface influent fortement sur la capacité d'adsorption des protéines. Les paramètres les plus importants qui influent sur ce processus sont les tensions de surface, la polarité, la charge et la morphologie de la surface. De nombreuses techniques permettent de mesurer les caractéristiques des surfaces afin de prédire les phénomènes d'adsorption. La

microscopie à force atomique permet par exemple de mettre en évidence ces facteurs. Il a été démontré que les protéines ont généralement une plus grande affinité pour les surfaces apolaires et rugueuses ou présentant une tension de surface élevée. Du fait des interactions électrostatiques, les surfaces chargées sont également plus sujettes à un phénomène d'adsorption amplifié (Rabe M. *et al.*, 2011).

3.1.2.2.4. Mécanismes d'adsorption des protéines

La compréhension du comportement des protéines à proximité d'une surface ou adsorbées en surface est primordiale à la compréhension des phénomènes d'adsorption. Ces phénomènes dépendent à la fois du comportement unitaire et global des protéines. Différents modèles mimant les mécanismes d'adsorption ont été décrits ces dernières années (Figure 17).

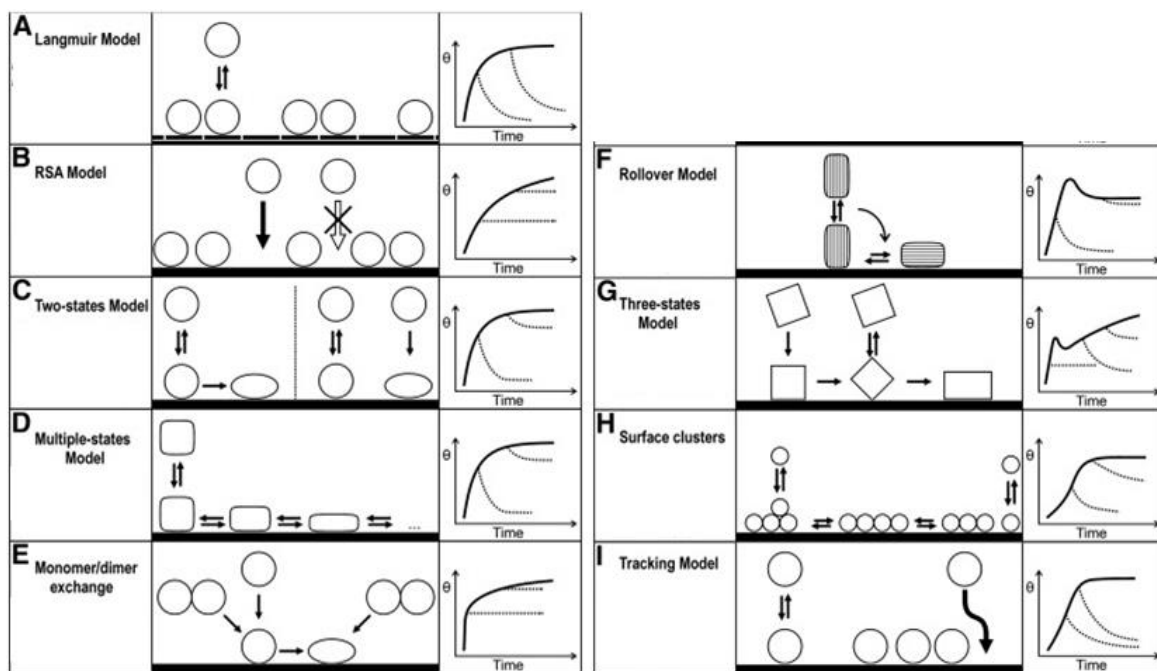


Figure 17 : Représentation schématique des différents modèles de cinétique d'adsorption des protéines sur une surface (Rabe M. *et al.*, 2011).

Le modèle le plus utilisé en tant que modèle de référence est le modèle d'adsorption de Langmuir, qui explique l'adsorption et la désorption de particules à des sites distincts de la surface (Langmuir I., 1932). Ce modèle est encore utilisé alors que la communauté scientifique s'accorde à dire qu'il est inadéquat à la description des phénomènes d'adsorption des protéines.

3.1.3. Les modes de séparation des protéines et peptides

L'EC se décline en plusieurs modes de séparation qui permettent de séparer des protéines et des peptides selon différents critères, tels que leur rapport charge sur volume (CZE), leur point isoélectrique (CIEF) ou encore leur taille (CGE).

3.1.3.1. Electrophorèse de zone (ECZ)

L'électrophorèse capillaire de zone est le mode le plus utilisé du fait de sa simplicité et de ses performances pour l'analyse de protéines. Le capillaire est rempli d'un électrolyte de pH constant et de force ionique constante. L'échantillon est introduit et le champ électrique est appliqué. Les protéines adoptent une charge en fonction du pH de l'électrolyte et de leur point isoélectrique. Elles migrent alors selon la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) et la mobilité propre à chaque composé du milieu (μ_{ep}). Dans le cas où la protéine présente un pI supérieur au pH du tampon, elle aura une charge globale positive. Les deux mobilités sont donc de même signe et s'additionnent, ce qui augmente la vitesse de migration du composé. Dans le cas où la protéine possède un pI inférieur au pH de l'électrolyte, elle présentera une charge globale négative. Dans ce cas, la μ_{ep} s'oppose à la μ_{eo} , ce qui a pour effet de diminuer la vitesse de migration. Dans le cas où le pI de la protéine est égal au pH du tampon, la protéine aura une charge globale nulle. D'une manière générale, la mobilité apparente d'un composé est la somme des deux mobilités résultantes :

$$\mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo} = (L_d \cdot L_t) / (V \cdot t)$$

Où μ_{app} est la mobilité apparente ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), μ_{ep} la mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), μ_{eo} la mobilité électroosmotique ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), L_d la longueur effective du capillaire (cm), L_t la longueur totale (cm), V la tension appliquée (V) et t le temps de migration (s).

Dans le mode ECZ, le principal facteur d'optimisation est lié aux caractéristiques de l'électrolyte, c'est-à-dire à son pH, sa force ionique et sa composition. En effet, le pH du tampon de séparation influe directement sur l'état d'ionisation des espèces mais également sur l'intensité de la μ_{eo} et sur les mobilités électrophorétiques des protéines. Lors de l'analyse d'un mélange de protéines ou de peptides, il peut être utile de prédire les différents états de charge des composés, en utilisant leur courbe de titrage, afin de choisir le pH optimal pour la séparation (**Figure 18**).

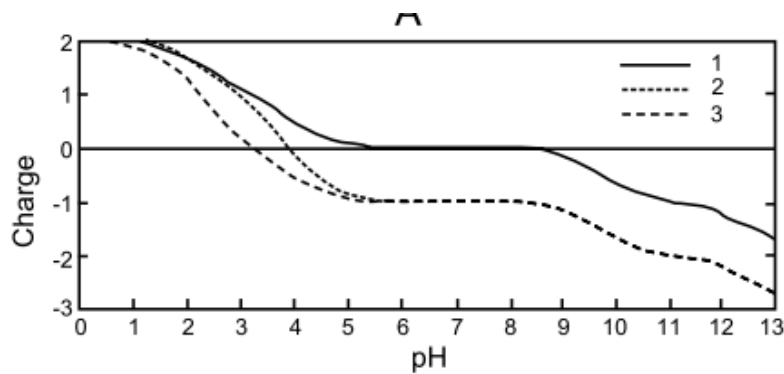


Figure 18 : Courbes représentant en fonction du pH la charge théorique de trois peptides synthétiques qui ne diffèrent que par la substitution d'un acide aminé (Bongers J. *et al.*, 1992).

Les états d'ionisation des trois peptides ci-dessus sont très proches voire identiques sur une large gamme de pH. Un pH acide semble leur fournir des charges assez différentes et semble donc favorable à leur séparation, sachant par ailleurs que leurs masses sont très similaires. La Figure 19 illustre les profils obtenus par EC-UV pour la séparation de ces trois peptides à quatre pH différents. La séparation résolutive des trois formes n'est ici possible qu'au pH 4,3.

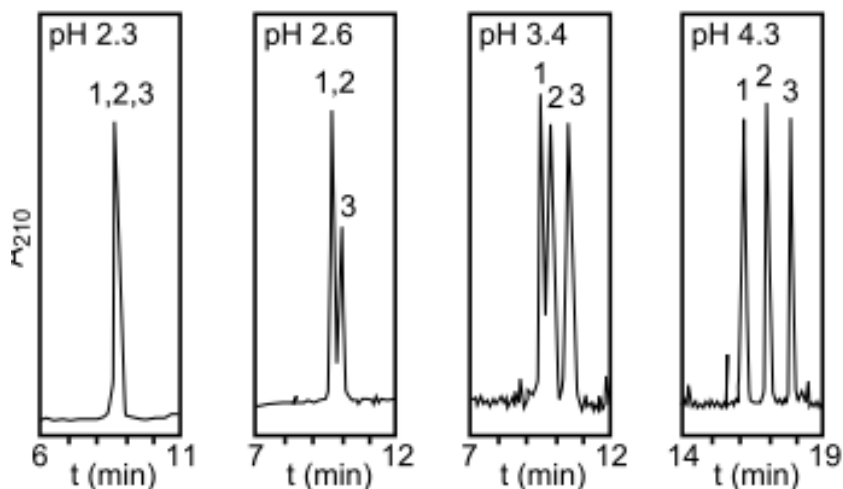


Figure 19 : Electrophérogrammes montrant la séparation par EC-UV de trois peptides dans des conditions de pH différentes (Bongers J. *et al.*, 1992).

La CZE est en général le mode le plus adapté pour la séparation de protéines et de peptides de propriétés physico-chimiques proches.

3.1.3.2. Focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)

Dans le mode CIEF, le capillaire est rempli d'ampholytes, permettant la création d'un gradient de pH au sein de celui-ci. Les ampholytes sont composés d'un mélange de tampons qui se focalisent dans le capillaire selon leurs pKa sous l'action d'un champ électrique. Ce mode permet de séparer des protéines ou des peptides selon leur point isoélectrique. Les protéines introduites vont donc migrer sous l'action d'un champ électrique selon leur charge et donc leur pI, jusqu'à leur entrée dans la zone de pH équivalant à leur pI. Dans cette zone, elles présentent une charge globale neutre et arrêtent de migrer. Les composés seront finalement détectés selon leur ordre de pI, au niveau de la fenêtre de détection par une étape de mobilisation hydrodynamique ou chimique. Il existe actuellement une variante appelée WCID, ou Whole Column Imaging Detection, qui permet de s'affranchir de l'étape de mobilisation en remplaçant la méthode de détection classique à un point par une détection dynamique de l'ensemble du capillaire (Wu J. *et al.*, 1994).

3.1.3.3. Electrophorèse capillaire en gel (CGE)

Dans le mode de séparation par CGE, les protéines ou peptides sont séparés selon leur poids moléculaire, à l'aide d'un électrolyte contenant un réseau polymérique enchevêtré et ce, généralement en l'absence d'eo. C'est une adaptation de l'électrophorèse sur gel en capillaire. La CGE est un mode particulièrement utile pour la séparation de composés de grande taille, tels que les protéines ou l'ADN, qui présentent des mobilités électrophorétiques proches. Dans le réseau de gel présent au sein du capillaire, les petits composés migrent plus vite que les grands. Les gels les plus utilisés pour remplir le capillaire sont des polymères hydrosolubles, dits remplaçables, tels que les polyacrylamides, le PEG (Lausch R. *et al.*, 1993) ou les dérivés de cellulose, ou encore l'agarose (Xu, Y., 1996).

3.1.3.4. Chromatographie électrocinétique micellaire capillaire (MEKC)

Les trois modes précédemment décrits sont les plus employés pour l'analyse de protéines, mais on peut également citer l'EC micellaire, qui consiste à introduire un tensioactif anionique ou cationique à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc) à l'électrolyte. Dans ce mode, la séparation des composés neutres est réalisée selon leur coefficient de partage (fonction de leur hydrophobie) entre la phase aqueuse et la pseudo-phase stationnaire composée de micelles. Ce mode est peu compatible avec les protéines trop volumineuses pour

entrer dans les micelles mais peut s'adapter à certains peptides. Enfin, l'électrophorèse capillaire d'affinité (ECA) et l'électrochromatographie capillaire (ECC) sont des modes qui ont été également décrits pour les protéines (Chu, Y.H. *et al.*, 1995 ; Lloyd D.K. *et al.*, 1995).

3.1.4. Les revêtements de surface pour l'analyse de biomolécules protéiques et peptidiques

3.1.4.1. Introduction

Les performances de l'EC pour l'analyse de protéines peuvent être sérieusement entravées par les interactions entre les analytes et la surface du capillaire de silice vierge. La répétabilité et l'efficacité de la séparation sont les principales victimes de ce phénomène. Que ce soit pour réaliser des séparations de protéines par CGE ou CIEF, ou pour limiter l'adsorption en CZE, le recouvrement des capillaires est le plus souvent souhaitable. Ces revêtements de surface ont pour rôle de masquer les groupements SiOH présents à la surface des capillaires. Il en résulte une diminution ou un inversement des charges de surface qui diminue efficacement les interactions électrostatiques. De plus, la viscosité de la double couche électrique augmente du fait de la présence d'agents de surface, ce qui a pour effet de réduire l'accessibilité des protéines au niveau de cette zone.

Trois principales stratégies ont été développées pour réduire l'adsorption des protéines sur les surfaces de silice et pour moduler l' ϵ_0 : les revêtements dynamiques, les revêtements semi-permanents et les revêtements permanents. Les revêtements dynamiques consistent à ajouter des petites molécules ou polymères au tampon de séparation pour masquer les charges de surface de manière éphémère. Les revêtements permanents sont des polymères fixés de manière covalente à la surface du capillaire. Ils sont particulièrement stables mais difficiles à mettre en œuvre. Les revêtements semi-permanents représentent une catégorie de polymère physisorbés à la surface du capillaire. Ils constituent une alternative intéressante entre les deux premiers modes, offrant une stabilité augmentée pour des protocoles simplifiés. Deux excellentes revues ont synthétisé les différentes approches et leurs applications (Stutz H. 2009 ; Lucy *et al.* 2008).

3.1.4.2. Les revêtements dynamiques

Un revêtement dynamique est généré par le simple ajout d'un polymère hydrosoluble dans l'électrolyte. Ce type de revêtement présente l'avantage d'être simple à préparer, de se régénérer facilement en surface et de coûter peu cher. Une simple étape de rinçage avant la séparation suffit dans la plupart des cas. La grande variété des composés disponibles permet une grande polyvalence de ce type de revêtement. En effet, de nombreuses amines, détergents ou surfactants et polymères neutres conviennent à la réalisation de ces modifications dynamiques de surface.

Les monoamines (triéthylamine, éthylamine ou triéthanolamine), les diamines (cadavérine ou putrescine) et les polyamines sont les plus fréquemment utilisées pour réduire l'adsorption des protéines à la surface des capillaires. Verzola *et al.* ont comparé l'apport de différentes amines présentes dans l'électrolyte à des concentrations croissantes sur l'adsorption de la myoglobine aux parois d'un capillaire de silice vierge. Pour chaque amine utilisée, les concentrations permettant une inhibition de 50% et de 90% de l'adsorption protéique ont été calculées (**Figure 20**). D'une manière générale, on note que plus l'amine est de petite taille, plus sa concentration doit être élevée pour atteindre une prévention efficace de l'adsorption. En effet, des concentrations de l'ordre de 193 mM à 560 mM sont nécessaires pour limiter l'adsorption à 10% lorsque l'on utilise des monoamines dans l'électrolyte, alors que les polyamines obtiennent les mêmes résultats à des concentrations bien inférieures, de l'ordre de 1 mM à 18 mM (Verzola B. *et al.*, 2000). Les amines peuvent également moduler l'eo. Dans la majorité des cas, le revêtement des groupements SiOH par les amines entraîne une diminution du flux électroosmotique, ce qui permet dans certains cas une augmentation de la résolution.

Le groupe de Righetti a développé des amines quaternisés en vue de réduire la μ_{eo} et les interactions protéines/surface. Ces pipérazines trifonctionnelles, appelées Q-Pzl, s'adsorbent à la surface des capillaires de silice par une triple interaction : une liaison ionique entre l'amine quaternaire et SiO^- , une liaison hydrogène entre l'amine tertiaire et SiOH et une liaison covalente entre l'iode terminal et SiO^- (Gelfi C. *et al.*, 2001). Plusieurs études ont montré le haut pouvoir préventif de ces amines quaternaires contre l'adsorption des protéines (Gelfi C. *et al.*, 2001 ; Sebastiano R. *et al.*, 2000). L'ajout de NaCl dans l'échantillon permet d'augmenter l'efficacité des séparations, en stabilisant les amines en surface (Gelfi, C. *et al.*, 2001).

Amine	Structure	[Amine] (mM) needed for	
		50% inhibition	90% inhibition
(a) Monoamines			
Ethylamine		76	230
Triethylamine		38	193
Triethanolamine		160	560
(b) Diamines			
Putrescine		47	170
Cadaverine		31	88
Hexamethonium bromide (HMB)		40	127
(c) Polyamines			
Spermidine		5	18
Tetraethylene pentamine (TEPA)		0.3	1.3
Spermine		0.01	1

Figure 20 : Efficacité de différentes amines pour le revêtement dynamique d'un capillaire de silice vierge pour l'analyse de la myoglobine-FITC en fonction de la concentration utilisée dans un tampon de séparation Tris-acétate, pH 5, 30mM (Verzola B. *et al.*, 2000 ; Lucy C.A. *et al.*, 2008).

3.1.4.3. Les revêtements physisorbés semi-permanents

Les revêtements semi-permanents interagissent à la surface du capillaire par des mécanismes d'adsorption physique ou physisorption de même nature que ceux qui régissent l'adsorption des protéines au niveau des parois. Contrairement aux revêtements dynamiques, le capillaire est généralement rincé avec la solution polymérique avant l'analyse et il n'est pas nécessaire d'ajouter le polymère dans l'électrolyte.

La physisorption est un processus réversible d'attachement de polymères sur une surface solide telle que les capillaires de silice vierge. Elle fait donc principalement intervenir des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes et des liaisons de Van der Waals dans le cas des capillaires de silice vierge. Une grande majorité des traitements de surface pour les capillaires

d'EC repose sur des liaisons non covalentes. Ceci peut s'expliquer par les nombreux avantages que les revêtements semi-permanents possèdent par rapport aux revêtements covalents (Doherty E.A.S. *et al.*, 2003). Ces atouts se résument par la simplicité des protocoles de revêtement, la possibilité de régénérer le traitement de surface, la moindre dépendance du processus d'attachement des polymères vis-à-vis des propriétés physicochimique de la surface et enfin, la facilité à maîtriser les propriétés de surface de la couche polymérique.

L'adsorption de polymères sur la surface de capillaires a donc largement été utilisée en EC afin de facilement et rapidement moduler les propriétés physicochimiques du capillaire. En fonction des propriétés physicochimiques des protéines et donc des interactions électrostatiques à prévenir, les revêtements polymériques sont choisis de préférence hydrophiles et selon la charge de surface souhaitée, neutre, positive ou négative.

Les polymères neutres se lient par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes entre les groupements silanols protonés de la surface du capillaire et les groupements propres aux polymères. Dans ce cas, le prétraitement de la surface du capillaire est essentiel afin de maximiser les interactions et la stabilité des revêtements. Une catégorie de polymères neutres est représentée par les dérivés de la cellulose tels que la hydroxyéthylcellulose (HEC), la hydroxypropylcellulose (HPC) ou la hydroxypropylméthylcellulose (HPMC). La méthylcellulose a été l'un des premiers traitements de surface utilisés en EC (Hjerten S., 1967). De nombreux dérivés de la cellulose ont depuis vu le jour. Les dérivés de cellulose montrent depuis longtemps moins d'affinité pour les surfaces de silice que pour le polyéthylénoxyde (PEO) par exemple, et se détachent plus facilement (Iki N. *et al.*, 1996). Une étude a montré que les traitements de surface avec le HEC et le HPMC conduit à des pourcentages d'adsorption de la myoglobine-FTIC de l'ordre de 35 à 40% dans des conditions optimisées (Verzola B. *et al.*, 2000). Cependant, d'autres études ont mis en évidence une grande répétabilité de l'eo et une bonne stabilité de la ligne de base (Anik N. *et al.*, 2012). La HPC réticulée avec le paraformaldéhyde permet d'obtenir des coefficients de variation très faibles pour les temps de migration (moins de 1% avec n=10) ainsi qu'une très haute efficacité pour la séparation de protéines standards (Sanzgiri R.D. *et al.* 2006).

Récemment, Cao *et al.* ont montré l'apport d'un copolymère à base de HEC et de diméthylaminoéthylméthacrylate (DMAEMA) pour la séparation de protéines. La **Figure 21** compare les profils obtenus pour la séparation d'un mélange de protéines acides et basiques au sein d'un capillaire de silice vierge et d'un capillaire revêtu par ce copolymère. Ce revêtement a

montré une stabilité sur plus de 30 analyses consécutives avec des coefficients de variation de l'ordre de 2% pour les temps de migration de chaque protéine au bout de la 30^{ème} analyse. De plus, les efficacités de la séparation sont conservées au bout de 30 analyses avec des coefficients de variation de 2,2% à 6,3% selon la protéine (Cao F. *et al.*, 2011).

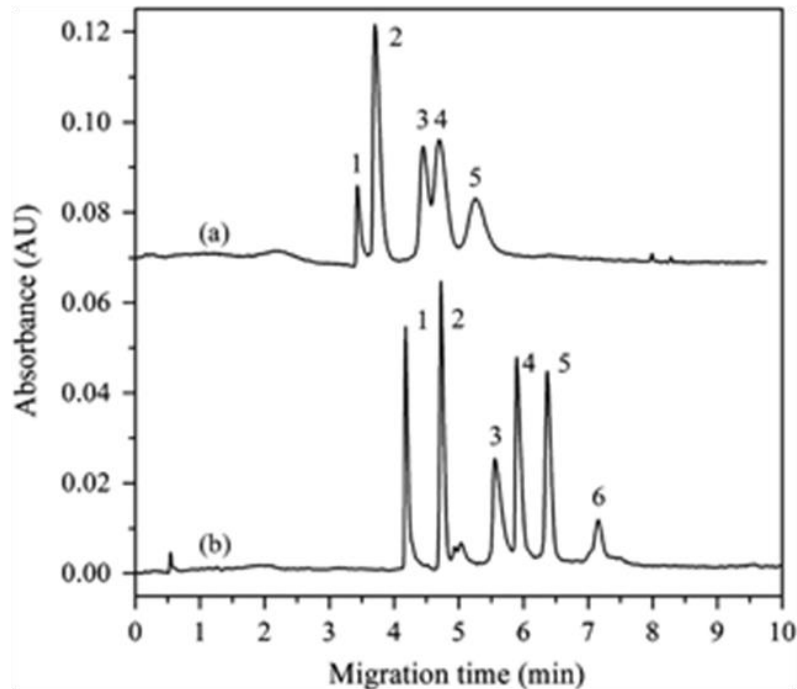


Figure 21 : Electrophérogrammes montrant la séparation d'un mélange de protéines basiques, acides et neutres au sein d'un capillaire de silice vierge (a) et d'un capillaire de HEC-*g*-PDMAEMA. Tampon de séparation : phosphate-citrate de sodium, pH 3,02. Identification des pics : (1) cytochrome c ; (2) lysozyme ; (3) myoglobine ; (4) ribonucléase A ; (5) α -chymotrypsinogène A ; (6) trypsin inhibiteur. Conditions : 20kV ; température, 25°C ; détection, UV 214 nm ; injection, 5 sec à 3,45k ; concentration du polymère, 0,2% m/v. Echantillon à 0,5 mg/mL pour chaque protéine (Cao F. *et al.*, 2011).

Les polymères à base d'acrylamide ont également suscité un grand intérêt en vue d'améliorer les performances en EC. Ils ont été introduits pour la première fois en 1985 afin de réduire le flux et l'adsorption des analytes (Hjerten S., 1985). Différents variant d'acrylamide ont été synthétisés par la suite pour la séparation de protéines. Le polydiméthylacrylamide (PDMA), plutôt hydrophobe, a montré une suppression nette de l'eo entre pH 4,4 et pH 8,4 (Albarghouthi M.N. *et al.*, 2003). Cependant, l'efficacité de la séparation de protéines modèles est faible par rapport à l'utilisation d'un polymère de polyacrylamide linéaire (LPA) ou de Poly-N-

hydroxyéthylacrylamide (PHEA) (Figure 22). Les variations de la μeo d'un facteur 3 et les hauts coefficients de variation obtenus pour les temps de migration suggèrent une adsorption des protéines en surface du capillaire. Une étude a montré que le PDMA utilisé pour la séparation de la myoglobine engendre une adsorption de l'ordre de 15% des quantités introduites (Verzola B. *et al.*, 2000). Le PHEA, plus hydrophile, permet de réduire l' μeo d'un facteur 2 par rapport à un capillaire de silice vierge et affiche une meilleure répétabilité des temps de migration que le PDMA (> 0,62% sur 50 analyses) (Albarghouthi M.N. *et al.*, 2003).

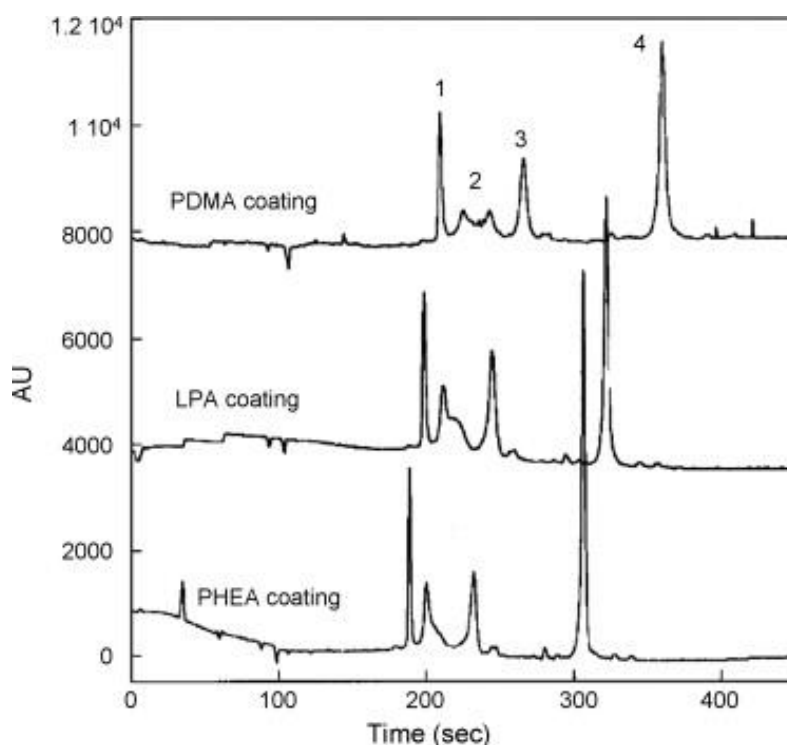


Figure 22 : Séparation en CZE-UV de protéines acides sur un capillaire revêtu de PDMA, de PHEA et de LPA. Identification des pics : (1) trypsin inhibitor ; (2) β -lactoglobulin A ; (3) β -lactoglobulin B ; (4) α -lactalbumin. Conditions : 27 cm \times 50 μm de diamètre ; L_{eff} , 20 cm ; Tampon de séparation, 25 mM Tris–Bicine pH 8,4 ; 500 V/cm ; température, 25°C ; échantillon à 0,1 mg/mL de chaque protéine ; injection, 2 sec à 0,5 psi (Albarghouthi M.N. *et al.*, 2003).

Le groupe de Chiari a développé un copolymère neutre, l'EpDMA ou polydiméthylacrylamide-co-allyl glycidyl éther afin d'augmenter l'hydrophilie du PDMA. Le groupement oxirane présent au sein du copolymère forme de plus fortes interactions avec les groupements silanols du capillaire que d'autres copolymères d'acrylamide, procurant ainsi une grande stabilité du

revêtement au cours du temps, tout en réduisant les interactions protéines/surface (Chiari M. *et al.*, 2000). L'EPDMA permet une suppression nette de l' e_o ($\leq 0,13 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et permet l'obtention de hautes efficacités pour la séparation de protéines modèles ($> 1,5$ millions de plateaux/m). En revanche, l'utilisation d'un dérivé du PDMA encore plus hydrophile, le HPDMA, affiche une perte de reproductibilité, suggérant qu'il existe un degré optimal d'hydrophilie du polymère pour contrer l'adsorption des protéines (Cretich M. *et al.*, 2002). L'EPDMA a de plus montré de grandes performances pour la séparation de protéines et d'ADN en EC et en micropuce (Loughran M. *et al.*, 2006).

D'autres polymères largement utilisés appartiennent à la famille des éthers d'oxygène. En tant qu'accepteurs d'hydrogène, ils sont plus favorables aux interactions par liaison H avec les groupements SiOH que les polymères à base de cellulose, riches en groupements hydroxydes, qui sont plutôt des donneurs d'hydrogène. Un milieu acide, favorisant la déprotonation des SiOH, est donc nécessaire pour l'adsorption du polymère à la surface (Iki N. *et al.*, 1996).

Les PEO de hauts poids moléculaires permettent également une meilleure stabilité à la surface. Cependant, un pH supérieur à 8 provoque le détachement du polymère à cause de la compétition qui s'opère entre les hydroxydes présents en solution et le PEO pour la formation des liaisons H avec la surface SiOH (Preisler J. *et al.*, 1996). Le PEO a été comparé à un capillaire commercial de polyacrylamide (PAA), démontrant des performances augmentées pour la séparation d'une protéine hautement basique, la kin17 (Tran N.T. *et al.*, 2005).

Les avantages du PEO ont été également exploités par la synthèse de copolymères à base de PEO, tels que le PEO-PPO-PEO, connu sous le nom commercial de Pluronic, ou le PEO-*block*-poly(4-vinylpyridine), développé par Liu *et al.* (2008). Le groupe de Lucy a plus récemment développé un traitement de surface en double couche associant les propriétés d'un surfactant, le dioctadécyldiméthylammonium bromide (DODAB), et celles du PEO contenant un bloc stéarate. Le DODAB, plus hydrophobe, recouvre dans ce cas la surface du capillaire en double couche à l'aide d'interactions électrostatiques fortes. La chaîne hydrocarbonée du groupement stéarate se fixe ensuite aux DODAB par des interactions hydrophobes, laissant les groupements du PEO hydrophiles en surface du capillaire, permettant ainsi une suppression de l' e_o et une inhibition de l'adsorption des protéines (MacDonald A.M. *et al.*, 2011).

La **Figure 23** présente une comparaison des profils obtenus avec un revêtement de surface DODAB/PEO entre la première et la 30^{ème} analyse. Ce copolymère offre une grande répétabilité des analyses avec des coefficients de variation des temps de migration inférieurs à 1% après 30 analyses, sans régénération.

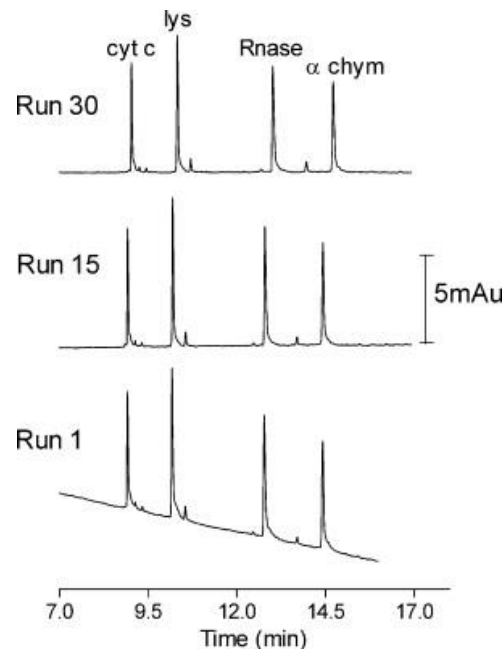


Figure 23 : Profils des séparations en CZE-UV de protéines basiques sur un capillaire revêtu par le copolymère DODAB/PEO. Conditions d'analyses: +17,5 kV; 47 cm × 50 µm, L_{eff} 40 cm; BGE: tampon phosphate de sodium, pH 3,0, 50mM; λ, 214 nm; échantillon :0,1 mg/mL de chaque protéine, injection : 3 sec à 0,5 psi; température, 25°C (MacDonald A.M. *et al.*, 2011)

3.1.4.4. Conclusion

Limiter l'adsorption des protéines ou peptides à la surface des capillaires de silice est donc un des défis majeurs en EC. Ce phénomène est à l'origine de nombreux effets indésirables et il devient l'un des principaux objectifs d'optimisation des séparations de protéines. Plusieurs revues de grande qualité ont fait état ces dernières années des interactions protéines/surface ainsi que des différents traitements de surface disponibles pour la prévention de ces effets indésirables (Lucy C.A. *et al.*, 2008 ; Stuntz H., 2009). Les revêtements de surface peuvent être classés en trois catégories : les dynamiques, les physisorbés et les covalents.

Dans le cadre de ce travail de thèse, la problématique de l'analyse de biomarqueurs par EC est centrale en vue de développer un outil de diagnostic miniaturisé de la MA. Les outils d'optimisation compatibles avec l'EC de ces biomolécules sont nombreux et permettent d'atteindre des performances élevées. Une étude détaillée de la littérature relative à l'analyse de biomarqueurs par EC a permis l'écriture d'un chapitre de livre international : *Contribution of CE to the analysis of protein or peptide biomarkers of various diseases* (**Revue 1**). Ce chapitre propose des solutions adaptées à l'analyse de biomarqueurs protéiques et peptidiques au sein de fluides biologiques et des stratégies pertinentes pour aborder la complexité de la matrice, limiter l'adsorption des biomarqueurs sur les capillaires de silice et améliorer la sensibilité de détection. Ce chapitre de livre se termine en principe par deux protocoles de laboratoire qui n'apparaîtront pas dans ce manuscrit de thèse.

3.1.4.5. *Revue 1: Contribution of CE to the analysis of protein or peptide biomarkers of various diseases*

Capillary Electrophoresis of Biomolecules, Methods in Molecular Biology, Volume 984, 2013, pp 167-190 Contribution of CE to the analysis of protein and peptide biomarkers of various diseases.

K. Mesbah^a, R. Verpillot^a, F. de l'Escaille^b, J.-B. Falmagne^b, M. Taverna^a

a Univ. Paris-Sud, UMR-CNRS 8612, Laboratory of Proteins and Nanotechnologies in Separation Sciences, 92296, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

b Analis SA, R&D DIAG, Zoning Industriel de Rhisnes, Suarlée, Belgium

Acknowledgements: This review's writing was supported by the European Union's NADINE project under Contract No. 246513.

The authors have declared no conflict of interest.

1. Introduction

With the extensive work performed in the field of Biomarker discovery, the area of diagnosis methods and tools have witnessed a considerable development in the past decade and represents currently a pivotal role in the medical and pharmaceutical environment. According to the definition given by the Working Group formed by the National Institute of Health, (1), a biomarker is « a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biologic processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention ». In this context biomarkers may be anatomic, physiologic, biochemical and molecular biologic parameters. The most commonly recognized molecular biomarkers fall into different molecule classes among which are the proteins and peptides, nucleic acids (DNA, RNA, Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), dissolved ions and gases or metabolites. One of the best-known metabolite is probably glucose enabling the diagnosis and the monitoring of diabetes mellitus.

These biochemical biomarkers can be detected in tissues or biological fluids such as blood, CerebroSpinal Fluid (CSF), urine, saliva and tears. The selection of the biological fluid for a diagnosis purpose is mainly dictated by the physiopathological process of the disease. Indeed

the concentration of the biomarkers in the selected body sample should reflect as much as possible the disease state of the patient. But other criteria are the accessibility of the fluids, their complexity and the concentration of the target analyse inside. In this chapter, we will consider specifically protein or peptide-based biomarkers which are common targets that require particular attention for the diagnosis method development. We will also focus on the different strategies already reported for their analysis by Capillary electrophoresis (CE) in the context of diagnostic test development performed on body fluids.

CE offers many advantages for the detection or quantitation of biomarkers such as high efficiency and resolution, small sample volume required, and possibility to achieve high sensitivities when coupled with Laser Induced Fluorescence detection or mass spectrometry. When dealing with biomarkers analysis by CE, we encounter to several difficulties linked first to the complexity of the sample matrix. Blood is, for instance, a biological fluid that contains many proteins and at concentrations that may be very different. This raises problems not only of interfering substances that deteriorates the separation, but also of possible interaction between the targeted analytes and the plasma proteins altering the assay accuracy. This complexity of biological fluids, generally combined to the very low abundance of the investigated biomarkers with regard to others molecules or cells present in that matrix is one of the main issue we have to deal with. In addition, proteins and peptides tend to interact with the surface of the silica capillary. In order to be resolute and sensitive, different methods to avoid this kind of interaction must be envisaged in addition to the initial CE separation system.

Once parameters allowing the analysis of the standards biomarkers by capillary electrophoresis, have been defined and optimized, the amount of biomarkers in the considered biological sample has to be compared to the method sensitivity. In most cases, the very low level of the target in the biological fluid do not allow for relevant detection in the real sample. Complementary techniques have to be applied to increase the sensitivity which can fall into two categories: those relying on preconcentration or enrichment steps and those targeting rather the detection sensitivity of the method.

2. State of art on CE strategies to analyze biomarkers in biological samples

a. Strategies to address Complexity of matrix

Biological materials that contain biomarkers consist of tissues oraqueous fluids which contain many potential interfering substances that may have similar behavior during the analysis process. In most cases; a sample preparation step has to be performed before the CE analysis in order to quantify the analytes of interest in the complex biological matrix. The sample preparation step may be needed not only to eliminate the non-interesting compounds but also to increase the biomarker concentration.

In this part, our aim is to describe an overview of innovative methods that are able to prepare samples for CE analysis in order to focus on biomarkers present in biological sample and to eliminate other high concentrated components. Strategies consisting in increasing the detectability of biomarkers will be discussed in the third part of this chapter.

Body fluids commonly used for protein analysis are plasma/serum, cerebrospinal fluid, and urine, but the non-invasive approach of using saliva or tear fluid is very attractive. Many biochemical constituents present in blood are also reflected in tears, although at lower concentrations (2). This matrix has from the analytical point of view a strong advantage due to the relative lack of impurity comparing to other biological fluids. Tears could be compared to an aqueous sample and so could lead to a CE-UV separation without any sample treatment of two proteins lysozyme and lactoferrin, two biomarkers of Sjögren's syndrome and dry eyes

disease (Keratoconjunctivitis sicca)(3)(4). The separation buffer was acidic and was combined to a cationic coating to prevent non specific adsorption. (4)

However, protein analysis from more complex matrices usually needs sample clean-up. Many analytical tools have been proposed for the pretreatment method to extract, isolate, fractionate, filtrate or concentrate the biological target from complex matrices. Methods for eliminating interfering substances can be divided in at least four classes; a first one regrouping the technique based on the affinity for a solid phase, such as particle phases and monoliths, a second composed by immuno-affinity support with antibodies, a third consisting of membrane based techniques such as dialysis or filtration and a last one for the liquid-liquid based extraction techniques such as centrifugation or precipitation. Whatever the method selected, an extensive knowledge on the physicochemical characteristics of the biomarkers is essential to select the best strategy. The main informations needed are the size or molecular mass, the isoelectric point, hydrophobicity, solubility, the binding affinity to antibody or other ligands.

When proteins or peptides extraction is needed from a biological matrix, the characteristic of the sample is critical. For instance High viscosity samples should be either diluted or at least homogenized. A sample that contains particles has to be microfiltered. High salt concentration samples can be handled by various off line techniques such as fast-protein liquid chromatography (5), desalting columns, ultrafiltration(6) or dialysis(7) to be compatible with the subsequent CE analysis.

Extraction and precipitation are considered to be harsh sample preparation techniques and therefore the functionality of the target protein or peptide is often altered. In addition they cannot easily be implemented to the capillary separation and remain off line sample pretreatments

Solid extraction phases are mainly composed of silica-based and polymer sorbents with reverse-phase, ion-exchange stationary phases, monolith sorbent, magnetic beads. Many commercial solid phases are now available. One major advantage of these supports is their possible on-line integration to the fused silica capillary inlet end to lead to an one-step analysis of complex matrix.

Immuno-affinity capillary electrophoresis (IACE) has been first reported from 1990 by Guzman et al. (8) (9). Since many applications to biomarkers have been reported in different biological fluids (10) (11)

SPE microcartridges packed inside the capillary, containing several different kinds of sorbents have been tested for the analysis of opioid peptides such as Met-enkephalin, endomorphin or dynorphin in human plasma. The analysis is based on the combination of different techniques. First a precipitation with acetonitrile, followed by a centrifugation and a filtration of the serum, prior the CE determination of peptides. In this work a C18 stationary phase is placed into the capillary inlet permitting an on line preconcentration of the peptides. The preliminary sample pretreatments were found necessary to avoid the saturation of this microcartridge. The results are quite impressive with a LOD of 100ng/ml for the analysed neuropeptides in biological fluids using UV detection. (12)

Lab-made support has also been described for the removal of interfering components and preconcentration of low abundant proteins. A butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate (BuMA-co-EDMA) monolith was employed for on-line clean-up of proteins followed by capillary electrophoresis (CE) separation. The monolith was synthesized, over a 1 cm section, by UV initiated polymerization at the inlet end of a 75 μ m diameter fused silica capillary that had been previously coated with poly (vinyl) alcohol. For the analysis of standard proteins and polypeptides biomarkers (lysozyme and trypsinogen A for acute pancreatitis and cystic fibrosis) this system proved reproducible with migration times and peak area RSD less than 5%. The BuMA-co-EDMA monolithic preconcentrator CE was coupled to a protein G

monolithic column via an Upchurch zero dead volume union for on-line removal of IgG. Although not applied to real samples, this system could lead many applications on serum samples. (13)

Most of time immuno-affinity method is developed using the antigen-antibody interaction, one of the most specific molecular recognition processes. Other kind of ligand may be used as proteins, aptamer, phage or peptide. The immunoaffinity ligands are immobilized on beads, polymeric matrix, gels or directly onto the inner surface of the channel wall.

Sample preparation of urine for the discovery of polypeptide biomarkers was obtained first by the centrifugation of the sample, then using an offline purification Pharmacia C2-column, to remove urea, electrolytes, salts and other interfering components, decrease matrix effects and enrich the target, and finally lyophilized, to eliminate the elution solution, and rediluted in water. This method allowed a CE-MS profiling of different protein in order to compare healthy and patient with diseases to discover biomarkers. (14)

In a recent work, a purification of alpha 1-acid glycoprotein and its isoforms from human serum for CZE analysis using an immunoaffinity column has been demonstrated. Different existing methods for AGP purification are compared. The house made anti-AGP column shows the best results. The natural serum samples are first precipitated in acidic conditions (near AGP pI) to eliminate the less water soluble proteins. The solution is then injected in the immunochromatographic column and fraction are collected after elution with Glycin/HCl pH 2,2 buffer. This quite simple method permits obtaining a purified AGP sample from human serum that can be analyzed by CE-UV. (15)

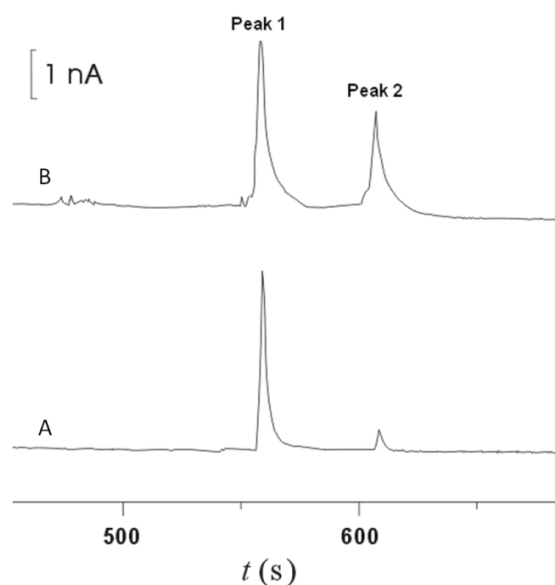


Figure 1: Illustration of CE-based enzyme immunoassay represented by typical electropherograms of Alpha fetoprotein for normal (A) and hepatitis infected (B) human serum samples. Peaks 1 and 2 correspond to anti-AFP-HRP and AFP-anti-AFP-HRP, respectively. CE conditions: BGE, 1,0 mM H₂O₂ and 10 mM Britton-Robinson buffer (BR, pH 5,0); separation voltage, 15 kV. Adapted from ref 16.

A different approach which still relies on Ab-Ag complex is the noncompetitive assay which has been successfully applied to CE with electrochemical detection for the simultaneous separation of three tumor biomarkers, PSA, CEA and HCG and for the quantification of Alpha-fetoprotein (AFP), a serum biomarker of hepatocellular carcinoma. The method consists in incubating the human serum sample containing the target antigen with an excess of labeled-Ab. The Ag-Ab complex is then separated from the noncomplexed Ab. A calibration method relating the free species and the amperometric signal permitted an evaluation of the

quantity of the different proteins. This system was able to detect PSA, HCG and CEA at respectively 19,74, 21,54 and 14,30 ng/ml in human serum sample with a recovery of more than 90%. The same system used for the detection of AFP led to a linear ranges and a detection limits (S/N = 3) respectively from 1,5 to 66,6 ng/mL and 0,48 ng/mL (16). (Figure 1)

Determination of neuropeptides in urine was carried out by IACE. The system contained Fab' fragments derived from a polyclonal antibody against the peptide. The fragments are immobilized on glass beads. The cruciform microreactor is composed of two inlets and two outlets. Four frit structures allow the path of fluid but confined the beads. The reactor is adapted to the capillary and placed in the CE instrument. (Figure 2) The sample was injected directly in the immobilized affinity ligand module, the peptide was retained, and after a few washes and conditioning with appropriate buffers, the peptide was eluted with a small plug of 0,3 M glycine-HCl buffer, pH 3,4, or neutral pH buffers containing acetonitrile or other organic solvents. The CE was performed with 50 mM sodium tetraborate as running buffer, at pH 8,5. A representative electropherogram is shown in (Figure 3). The urine specimen used in this experiment was diluted 1:1 v/v with 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 9,0 and spiked with angiotensin II and neurotensin at 5 ng/mL each. The concentration limits of detection, under the experimental conditions used for angiotensin II and neurotensin were 0,5 ng/mL. (17)

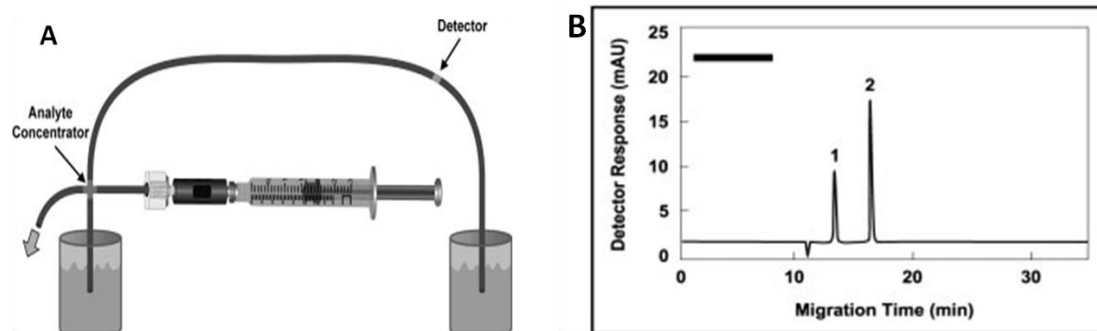


Figure 2: Schematic representation of a typical home-made IACE module, containing the analyte concentrator-microreactor device near the inlet of the capillary, adapted to a CE system (A). Application to the Analysis of two neuropeptides extracted from a urine (B). Peaks: angiotensin II (1) and neurotensin (2). CE conditions: BGE, 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 8,5; UV detection at 214 nm; 25°C; 26kV (17).

Another example of immune-based diagnosis is the method developed by Analis, for the quantification of transferrins in human serum by removing interfering substances via affinity column purification. This technique will be fully developed in the protocol section.

The immuno-based CE separation technique is widely used in clinical laboratories; readers are advised to read an interesting review detailing many applications in this domain. (18)

b. Strategies to address biomarkers adsorption to the capillary

The capillary coating takes an important place in the success of biomarkers analysis by CE. Indeed the high propensity of proteins to be adsorbed on the fused silica capillary surface can easily prevent the electrophoretic migration of low abundant biomarkers and so their detection. It can also deteriorate the resolution or lead to irreproducible separation. The adsorption process is mainly due to electrostatic interactions between silica and oppositely charge areas of the protein but it can also involve at different stages hydrogen bonding, dipole-dipole interactions, Van Der Waals forces and hydrophobic effects (19-23). A cooperative effect of the adsorption between protein molecules already adsorbed and new

analysed ones has been also described by Righetti et al (24). The amino-acid sequence, the conformation, the structural stability, the charge and size of the protein determine its adsorption tendency. (25). The extent of protein adsorption can also be related to the protein environment and medium. For instance, on hydrophilic surfaces adsorption is higher when pH is close to the protein pI. High ionic strength reduces adsorption both at pH higher and lower than protein pI. (26).

Strategies consisting of carefully optimizing the rinsing steps or the separation electrolyte are often not enough to eliminate durably this kind of interaction. To prevent protein adsorption, the best strategy consists in surface modification of the fused silica wall of the capillary with either dynamic or static coatings. Coatings also contribute to tune the electroosmotic flow in order to obtain efficient and high resolution separation of proteins or peptides. For dynamic modification the compounds which interact with the silica surface is added to the BGE. The main compounds used for dynamic modification of capillaries are monoamines, alkylamines, or polymers (neutral or cationic mainly) and detergents.

Static coatings can be physically adsorbed for a non-permanent or covalently bounded for a permanent coating. In general, higher efficiencies are achieved using static adsorbed polymer coatings. The preparation of many covalent coatings is time consuming and these coated capillaries often exhibit low stability at extreme pHs. That is why recent researches have mainly focused on physically adsorbed-coating. Physically adsorbed neutral or positively charged polymers have many advantages such as simplicity, rapidity of coating formation and possibility of regeneration. Detailed reviews are devoted to capillary coating and summarize the different polymer that can be applied to this purpose. Among these reviews the one of Lucy et al (27) and Stutz (28) are very comprehensive, giving the different strategies that can be employed.

More recently, successive multiple ionic polymer layer (SMIL) coatings have been introduced as a physically adhered innovative wall coating. In SMIL, layers of counter-charged polyelectrolytes (PE) are alternately attached onto the capillary surface by successive rinsing steps with appropriate polyanionic and polycationic polymers. Adsorption and interaction between PE layers occur via Coulomb interactions and ion-dipole bonds. (29).

Sialoforms of transferrin (Tf) or carbohydrate-deficient Tf (CDT) both in standard solution and serum samples have been successfully separated by CE using the 1, 4 diaminobutane (DAB) as a dynamic coating (30) (31). For example, DAB may be used not only for reducing protein adsorption but also to modify the EOF in order to perform high resolution separation.

Thormann Group's also compared the used of two amine modifiers, DAB and spermine as dynamic coating for analyzing CDT in human serum. Having 3 mM DAB or 0,02 mM spermine in a borate-based running buffer of pH 8,3 provided data of remarkable similarity. Data evaluated, based upon % area of disialo-Tf in relation to tetrasialo-Tf, were found to be comparable and reproducible. Furthermore, the use of DAB was noted to provide better reproducibility of detection times and higher temperatures lead to reduced run times but insufficient separability in both cases. (31)

Grafted copolymer hydroxyethylcellulose-graft-polydimethylacrylamide, a novel multifunctional separation medium, has recently been evaluated as a suitable coating suppressing EOF and allowing separation of proteins. Using the appropriate proportion of each polymer, the combination of HEC (hydroxyethylcellulose) and P4VP (Poly-4-vinylpyridin) leads to the addition of each polymer benefits in terms of separation while inhibiting the disadvantage of the polymer used alone. This innovative approach has been successfully applied to the analysis of human saliva, showing a high separation efficiency, good stability and excellent repeatability of the separation of lysozyme by CE-UV. (32)

Sassi A. et al (33) reported a sheathless CE-ESI-MS system that could be used to analyze human serum samples. This method used a covalently linked hydrophilic, positively charged

coating on the inner surface of the fused silica capillary for the separation of protein and peptides biomarker from biological fluids. The electroosmotic flow (EOF) was found to vary by less than 5% from batch-to-batch. This coating, compatible with ESI-MS, lead to detection of low concentration of different species in the approximate range of 10–100 nM in serum, and this for approximately 500 serum components.

The same team (34) developed well-defined di-block copolymers of PEO-*b*-P4VP with different molecular weight of the P4VP block synthesized by atom transfer radical polymerization. In addition to its separation performance, this copolymer has a really promising potential for real sample application and diagnosis purposes. This potential was showed by comparing this coating to fused silica capillaries for the analysis of human serum. While the non-coated capillary leads to one main peak attributed to HSA, the coated capillary allowed detection of many proteins such as transferring or IgG. Furthermore, RSD for migration time of HSA is extremely low(less than 1%). (Figure 3)

A very fast, simple and stable coating, based on a new polycationic polymer, poly-LA 313, showed high tolerance against complex biological samples (plasma and CSF). With CV of EOF less than 3%, makes poly-LA 313 a valuable coating for use in clinical analysis. This cationic polymer has been successfully used to perform CE-ESI-MS of HSA in body fluids which confirm its potential use for screening of biomarkers. (35)

A SMIL based on Polybrene and Sodium Dextran Sulfate alternance, leads to high durability coated capillary with time-efficient preparation and shows an excellent compatibility with MS. In addition, this coating procedure provides a stable EOF over a wide pH range 2–13. A Strong reliability and chemical stability have been demonstrated for this SMIL (36).

Plenty of strategies are available to decrease non specific adsorption and to tune EOF for a higher resolution separation. The real challenge is to choose the most adapted one. The target is to render the method reproducible while keeping in mind that the target protein biomarker may not significantly adsorb to the capillary wall (being either coated or uncoated) but that the plasma proteins present in the sample may well do, which will affect the overall reproducibility of the results.

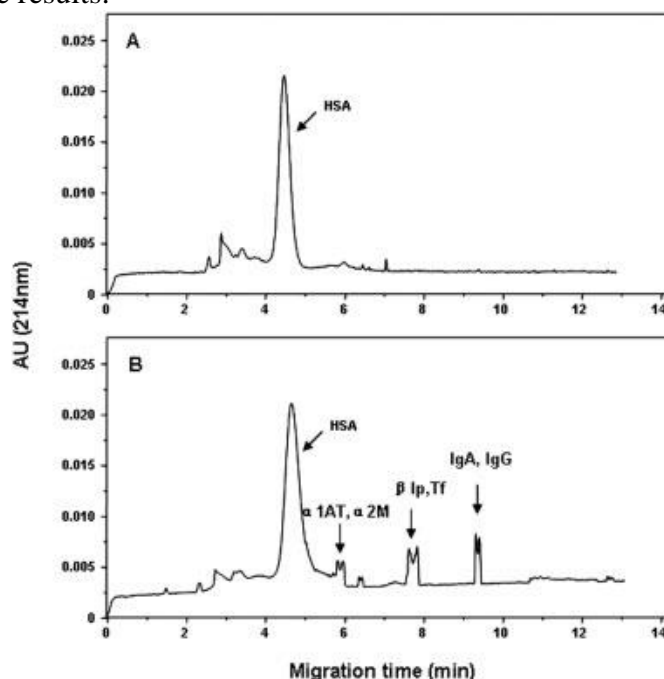


Figure 3: Electropherograms illustrating the interest of an innovative coating for plasma analysis. Separation was performed on (A) a bare fused silica capillary and (B) a PEO113-*b*-

P4VP294-coated capillary. CE condition: Separation buffer: 19 mM NaOH-Na₂B₄O₇ at pH 9,7; 500 V/cm; 40 cm capillary (30 cm to the detector); temperature 25°C; UV detection. (34)

c. Strategies to increase detection sensitivity

For many diseases, early diagnosis is required to fight efficiently against the pathology progression. At these early stages, most often the biomarkers are not present at high concentrations in body fluids. It becomes therefore a real challenge to detect and to quantify them in CSF, blood or urine. Sensitivity limitation encountered with CE analyses can be overcome through different methods.

Apart from the extraction of the biomarkers from the sample, as described in paragraph 2, one solution is to decrease the limit of detection by using more sensitive detection than UV one. This generally is performed by labeling the biomarkers with fluorescent dyes or by attaching covalently electrochemical moieties to them in order to use either Laser Induced Fluorescence detector or electrochemistry ones. However, only fluorescence, LIF, UV and DAD are currently commercially available for CE. Mass spectrometry coupled to CE was extensively applied to protein and peptide analysis and biomarker discovery over the last 5 years and can not only add complementary information to CE but also lead in some cases to increased sensitivity (37). However, the MS needs specific conditions in terms of buffer, coating, tension and sample matrices. One major and widely used technique to increase the sensitivity of CE is the Laser Induced Fluorescence detection mode. An exhaustive review focuses on analyses of biological samples by CE-LIF (38). This mode permits lower limit of detection compared to UV-detection but presents its own limitations mainly due to the optimization of the labeling method. Indeed, the derivatization of proteins and peptides, which can be done off-line or on-line the CE separation, and that can be applied to biological samples has to be optimized in order to label quantitatively the target biomarker in a reproducible manner. In addition derivatization may give rise to many species if the dye can be potentially attached to different sites in the protein. In fact, most of fluorescent dyes react directly with either amino acids containing primary or secondary amino groups or thiol function and less often to carboxyl groups. As peptides or proteins may have several groups available for labeling, for the same biomarker derivatization will result in several tagged forms with different degree of derivatization in addition to the side products generated by the reaction itself.

Derivatization of biomarkers present in a biological sample is most of the time quite problematic. The main problem is to develop a separation method with sufficient resolution to separate the peaks of interest from the potential biological interfering substances. Plenty of fluorescent dyes are commercially available, their properties and their reactivity toward the biomarker must be well studied to obtain the optimal performances.

One option to circumvent the direct derivatization of the analyte, keeping the high sensitivity afforded by electroluminescence, fluorescence or chemiluminescence method is to combine with CE separation and immuno or enzyme bioassays. Different strategies have been developed and applied to biological sample such as competitive immunoassays, non-competitive immunoassay or enzyme assays. All immunoassay methods are well described in a recent review covering the analysis of biological samples by CE-LIF. (38)

Another strategy to increase sensitivity is to preconcentrate the sample for a more sensitive detection using stacking methods which exploit electrokinetic process performed in CE and permit the compression of the injected sample plug on a narrow band after the injection and leading to a high concentration zone. Most of stacking processes are based on differences between the sample medium and the BGE. Several comprehensive reviews summarize the advances of preconcentration technique based on stacking in CE. Among these techniques we can find different categories: Field-amplified sample stacking, field amplified sample

injection, isotachopheresis, large volume sample stacking, dynamic pH junction, sweeping. Among the electrokinetically based methods, FASS, LVSS and FASI are the most common and are based on the difference of conductivity between the sample and the BGE. The main limitation of those techniques is the high conductivities of biological samples which are not compatible with these approaches. However combined to an adapted sample preparation, some applications from real matrices are reported. Several reviews summarized the advances in CE for enhancing the sensitivity. (39) (40)

Isotachopheresis is particularly useful to preconcentrate biological samples which have a high conductivity. This technique is based on the difference of conductivity of two buffers: one containing the leading ion and the second the terminating ion. The sample is injected between the two buffers. The electrophoretic mobility of the analyte must be higher than that of the terminating ion and lower than the leading ion. This concentration technique leads to assembling specific molecules into small focused zones. Concentration factors approaching 500 fold have been already reported for proteins (41)

Dynamic pH junction is also well adapted to stack samples containing peptides or proteins because the concentration mechanism is based on changes in ionization states of the analytes or electrophoretic velocities between the sample zone and the separation buffer using pH variation.

Several applications applied to biologicals sample and relying on a CE based competitive immunoassay have been already reported. A fast, selective and reproducible analysis of prion protein in blood, a biomarker for spongiform encephalopathy has been reported by Yang et al (42). A sample pretreatment of the sheep blood was needed to perform the detection of prion protein. This included centrifugation, cells lysing, liquid-liquid extraction and solid phase extraction among others techniques. Two steps are needed. First a labeled derivative of the prion protein is incubating with its specific antibody, and then the resulting free labeled protein and immuno-complex are separated. In the next step, labeled derivative protein and antibody are added to the blood sample containing the prion protein. The competition between labeled and non-labeled biomarker is observed by the decrease of the peak corresponding to the immune-complex. This decrease of area is correlated to the concentration of prion protein in the blood sample. The separation was achieved at pH 8,8 using TAPS (25mM IS) as running buffer containing 0,6% of carboxymethyl- β -cyclodextrin to suppress the adsorption and allows a rapid and high performance separation. The detection limit of the assay was estimated to be about 80 ng/mL.

In another work, the methionine enkephalin (ME) (a potential biomarker of liver disease, cirrhosis or cancer) was quantified by a similar CE based competitive immunoassay. ME concentration have been measured in human plasma using a specific antibody and a labeled-ME. With the optimized separation conditions, it was possible to separate the antibody bound to ME and free fluorescein conjugated ME by a capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence (CE-LIF) analysis using an uncoated fused-silica capillaries. The assay specificity, selectivity and accuracy were excellent with RSD less than 1% for migration time of the two species. The LOD was not reported but a comparison of ME levels in the plasma of healthy and cancer patients was possible with detection level in the nanomolar range. (43)

In a recent study different fluorophore for the labeling of 5 beta-amyloid peptides, that are potential biomarkers of Alzheimer disease, have been compared in order to analyse them simultaneously by CE-LIF.(Figure 4)

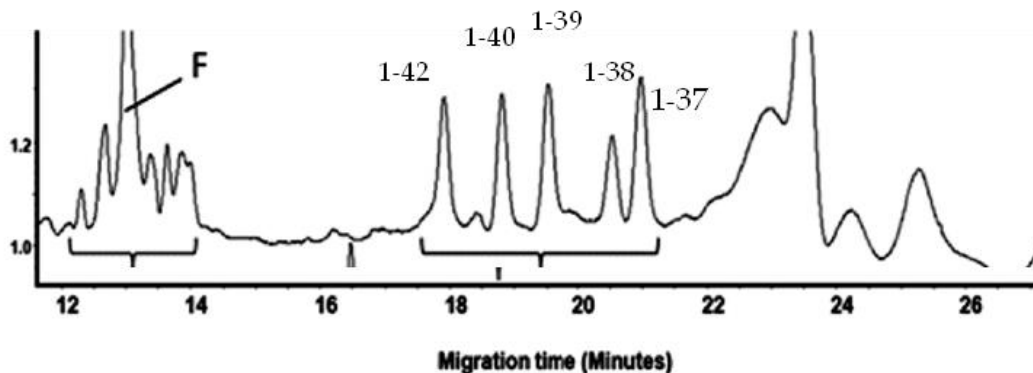


Figure 4: CE-LIF of amyloid peptides, which are potential biomarkers of Alzheimer disease, after their labeling with Fluoprobe 488. CE conditions: BGE, borate buffer pH 9; IS 40 mM with 3.25 mM of DAB; Detection: LIF (λ_{exc} 488 nm). Adapted from (44)

The Fluoprobe 488 NHS gave the best results, and LOD close to 35 nM could be obtained using a LIF detector at 488 nm. The method was applied to the separation and quantification of three of these peptides from CSF samples. To achieve the sensitivity required to detect these peptides in CSF, an off-line immune-capture was performed prior to the CE analysis (44) (Figure 5).

A fast and efficient separation of phosphorylated and non-phosphorylated forms of ERK has been developed based on an enzyme assay. (45) The principle is based on the incubation of an excess of labeled substrate and the target enzyme. After required time, the product is separated from the non-reacted substrate. The peak area corresponding to the product of the reaction is correlated to the amount of enzyme searched in the sample.

An application of LVSS was shown by Chen et al (46) for CE-LIF detection of bradykinin-related peptides, such as bradykinin, kallidin, and neurokinin A. Detection limit at the pmol/L level were obtained for BK-related peptides. In this case, in order to achieve the sample stacking without sacrificing the high resolution of CE, the sample matrix had to be removed. To this purpose, a negative voltage (-15 kV) combined to a backpressure were applied after the sample injection, to keep the analytes into the capillary while removing the sample matrix. The method was applied to the detection of bradykinin and Kallidin in human saliva and neurokinin in CSF which were successfully detected at the nanomolar level.

Combined with CE-LIF, tITP allowed the detection of different bradykinin fragments at a picomolar concentration. The t-ITP-CZE method was applied to assay the resulting peptides from BK in real human saliva and plasma samples with satisfactory results. RSD obtained for both saliva and human plasma were less than 5% and peptides were detected at concentration around 100 picomolar. (41)

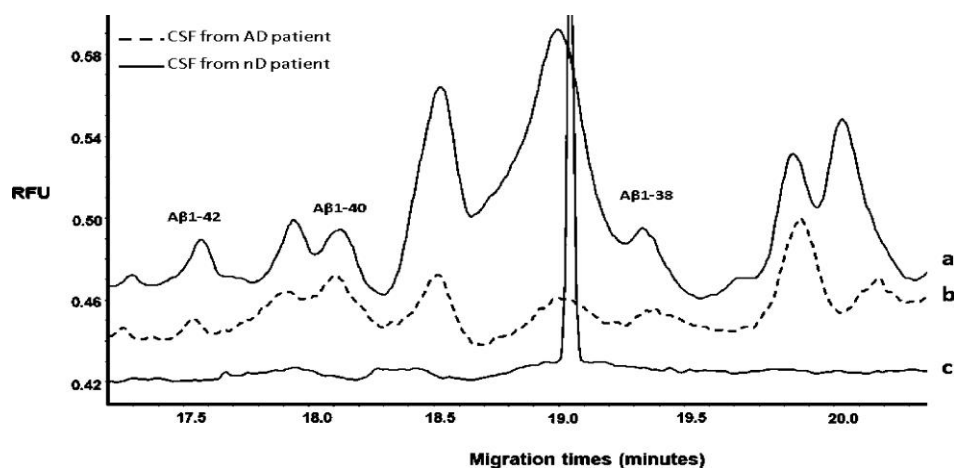


Figure 5: Application of CE-LIF condition to CSF samples for the detection of Alzheimer biomarkers. Detection of A β peptides 1-42, 1-40, and 1-38 by CE-LIF in CSF from non demented subjects (nD) (a) and patient suffering AD (b) Blank of immunocapture (c). CE conditions as in Figure 5. (44)

References

- 1- Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69(3), 89-95.
- 2- Chen R., Jin Z., Colón L.A. (1996) Analysis of tear fluid by CE/LIF: a noninvasive approach for glucose monitoring. *J Capillary Electrophor.* 3(5), 243-248.
- 3- Tomosugi N. et al, (2005) Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjögren's syndrome. *J Proteome Res* 4(3), 820-825.
- 4- Zhou L. et al, (2009) Identification of tear fluid biomarkers in dry eye syndrome using iTRAQ quantitative proteomics. *J. Proteome Res* 8(11), 4889-4905.
- 5- Van Eijk H.M.H. et al, (1999) Automated isolation of high-purity plasma albumin for isotope ratio measurements. *J. Chromatogr. B*, 731(2), 199-205.
- 6- Kakehi K. et al, (2001) Capillary electrophoresis of sialic acid-containing glycoprotein. Effect of the heterogeneity of carbohydrate chains on glycoform separation using an alpha 1-acid glycoprotein as a model. *Anal. Chem.*, 73(11), 2640-2647.
- 7- Valcárcel M., Arce L., Ríos A., (2001) Coupling continuous separation techniques to capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 924(1-2), 3-30.
- 8- Guzman, N. A., Trebilcock, M. A., Advis, J. P., (1990) *Paper presented at the First Annual Conference on Capillary Electrophoresis*, Frederick, Maryland, October 15–16, Abstract no. 12.
- 9- Guzman, N. A., Trebilcock, M. A., Advis, J. P., (1991), The Use of a Concentration Step to Collect Urinary Components Separated by Capillary Electrophoresis and

- Further Characterization of Collected Analytes by Mass Spectrometry, *J. Liq. Chromatogr.*, 14, 997–1015
- 10- J. Dalluge and Lane C. Sander, (1998) Precolumn Affinity Capillary Electrophoresis for the Identification of Clinically Relevant Proteins in Human Serum: Application to Human Cardiac Troponin I, *Anal. Chem.*, 70 (24), pp 5339–5343
 - 11- Peoples, M. C., Karnes, H. T., (2008) Microfluidic Capillary System for Immunoaffinity Separations of C-Reactive Protein in Human Serum and Cerebrospinal Fluid, *Anal. Chem.*, 80, 3853–3858
 - 12- Yang Y. Z., Boysen R. I., Hearn M.T.W. (2006) Optimization of field-amplified sample injection for analysis of peptides by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Anal Chem* 78(14), 4752–4758.
 - 13- Armenta J. Et al, (2007) Coupled affinity-hydrophobic monolithic column for on-line removal of immunoglobulin G. pre-concentrated of low abundance proteins and separation by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1148(1), 115–122.
 - 14- Kaiser T. et al, (2004) Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometer for automated and robust polypeptide determination in body fluids for clinical use, *Electrophoresis* 25(13), 2044.
 - 15- Ongay S. et al, (2010) Development of a fast and simple immunochromatographic method to purify alpha 1-acid glycoprotein from serum for analysis of its isoforms by capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta* 663(2), 206-212.
 - 16- Li X.M., Zhang F., Zhang S.S. (2008) Capillary electrophoresis enzyme immunoassay for alpha-fetoprotein and thyroxine in human serum with electrochemical detection, *J. Sep. Sci.* 31(2), 336-340.
 - 17- Guzman NA. et al, (2003) Improved solid-phase microextraction device for use in on-line immunoaffinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24, 3718–3727
 - 18- Amundsen L.K., Sirén H. (2007) Immunoaffinity CE in clinical analysis of body fluids and tissues, *Electrophoresis* 28(1-2), 99-113.
 - 19- Van der Veen M., Norde W., Stuart M.C. (2004) Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 35(1), 33–40.
 - 20- Gray J.J. et al, (2004) the interaction of proteins with solid surfaces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14(1), 110-115.
 - 21- Malmsten M. et al, (1998) Formation of Adsorbed Protein Layers, *J. Colloid. Interface Sci.* 207(2), 186-199.

- 22- Ding H.M. et al, (2005) Silica nanotubes for lysozyme immobilization. *J Colloid Interface Sci* 290(1), 102-106.
- 23- Hamrníková I. et al, (1999) Binding of proline- and hydroxyproline-containing peptides and proteins to the capillary wall. *J. Chromatogr. A* 838(1-2), 167-177
- 24- Righetti el al in (2000), Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon, *J Chromatogr A*. 2000 Jan 28;868(1):85-99.
- 25- Nakanishi K., Sakiyama T., Imamura K. (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J BiosciBioeng* 91(3), 233-244.
- 26- Essa H. et al, (2007) Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates, *J Mol.Catal. Enzym.* 49(1-4), 61-68.
- 27- Lucy CA, MacDonald AM, Gulcev MD, (2008) Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. Mar 14; 1184(1-2):81-105
- 28- Stutz H., (2009), Protein attachment onto silica surfaces--a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE, *Electrophoresis*, 30(12):2032-61.
- 29- Weinbauer M., Stutz H. (2010) Successive multiple ionic polymer layer coated capillaries in the separation of proteins - Recombinant allergen variants as a case study. *Electrophoresis* 31(11), 1805-1812.
- 30- Giordano B.C. et al, (2000) Dynamically-coated capillaries allow for capillary electrophoretic resolution of transferrin sialoforms *via* direct analysis of human serum. *J Chromatogr B* 742(1), 79-89.
- 31- Lanz C. et al, (2002) Evaluation and optimization of capillary zone electrophoresis with different dynamic capillary coatings for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum. *J Chromatogr A* 979(1-2),43-57.
- 32- Yang R.,Liu Y., Wang Y. (2009) Hydroxyethylcellulose-graft-poly (4-vinylpyridine) as a novel, adsorbed coating for protein separation by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 30(13), 2321-2327.
- 33- Sassi A.P et al, (2005) An automated, sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry platform for discovery of biomarkers in human serum. *Electrophoresis*, 26, 1500–1512

- 34- Liu H. et al, (2008) A well-defined diblock copolymer of poly-(ethylene oxide)-block-poly (4-vinylpyridine) for separation of basic proteins by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 29 (13), 2812-2819.
- 35- Puerta A. et al, (2006) Novel adsorptive polyamine coating for enhanced capillary electrophoresis of basic proteins and peptides. *J Chromatogr B*, 838(2), 113-121.
- 36- Isemura T., Kitagawa F., Otsuka K. (2009) Separation of complex mixtures of fluorobenzoic acids by capillary electrophoresis. *J Sep Sci* 32(3), 381-387.
- 37- H. Mischak, J. P. Schanstra, (2011) CE-MS in biomarker discovery, validation, and clinical application. *Proteomics Clin. Appl.*, 5, 9–23
- 38- Eva Szökő, TamásTábi, (2010), Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis*, 53, 1180-1192.
- 39- Breadmore et al, (2011) Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2008-2010), *Electrophoresis*, 32, 127-148.
- 40- Mala et al, (2011), Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis, *Electrophoresis*, 32, 116-126.
- 41- Chen et al, (2009) Assay of bradykinin metabolites in human body fluids by CE-LIF coupled with transient ITP preconcentration, *Electrophoresis*, V 30, Issue 13, pages 2300–2306.
- 42- Yang W.C., Yeung E.S., Schmerr M.J.(2005) Detection of prion protein using a capillary electrophoresis-based competitive immunoassay with laser-induced fluorescence detection and cyclodextrin-aided separation, *Electrophoresis* 26(9), 1751–1759
- 43- Babu S., Chung B.C., Lho D.S., Yoo Y.S.(2006) Capillary electrophoretic competitive immunoassay with laser-induced fluorescence detection for methionine-enkephalin. *JChromatogr* 1111(2),133-138.
- 44- Verpillot R. et al, (2011) Analysis of amyloid- β peptides in cerebrospinal fluid samples by capillary electrophoresis coupled with LIF detection. *AnalChem*83(5), 1696-1703.
- 45- Tu J. et al, (2003) Application of multiplexed capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (MCE-LIF) detection for the rapid measurement of endogenous extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) levels in cell extracts, *J.Chromatogr B* 789(2), 323-335.

46- Chen Y., Xu L., Lin J., Chen G. (2008) Assay of bradykinin-related peptides in human body fluids using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 29(6), 1302-1307.

3.2. Electrophorèse capillaire en puce de protéines et peptides pour le diagnostic médical

3.2.1. Intérêts et avantages de la miniaturisation

Les analyses biologiques pour le diagnostic clinique nécessitent rapidité, automatisation et haute sensibilité, en plus de méthodes reproductibles et robustes pour l'analyse de fluides biologiques. L'électrophorèse en puce offre de nombreux avantages quant à cette problématique et prend de fait une place importante dans la microfluidique à application biomédicale. Les analyses sur ces microdispositifs sont rapides, résolutive et peu coûteuses. Les procédés actuels de microfabrication offrent également des possibilités quasi-infinies quant à l'architecture des microsystèmes complexes et permettent ainsi l'intégration de multiples étapes analytiques telles que le marquage fluorescent, la capture et l'enrichissement par immunoextraction ou la préconcentration de l'échantillon. Les atouts des microsystèmes à électrophorèse et les besoins croissants dans le domaine du diagnostic biomédical vont certainement favoriser l'émergence de cette branche de la microfluidique.

L'EC, et par extension la micro-électrophorèse capillaire (MEC), sont reconnues pour leurs simplicité et leurs flexibilité. De nombreux modes de séparation comme l'ECZ, l'ITP, la CIEF ou l'ECG sont disponibles. De plus, la mise en place de chacune de ces méthodes est généralement possible dans un même et unique système de microcanaux, en adaptant les conditions d'analyses, le plus souvent en modifiant la composition de l'électrolyte de séparation.

La variété des matériaux disponibles permet également d'adapter les exigences analytiques aux caractéristiques des matériaux en vue d'augmenter sélectivement les performances du système (Lee, J. *et al.*, 2009). Au-delà des puces conventionnelles en verre, de nouveaux matériaux plastiques à bas coût (matière première et fabrication) ont vu le jour : le PDMS (Duffy D. C. *et al.*, 1998), le COC (Castaño-Álvarez M. *et al.*, 2005), le PMMA (Kelly R. T. *et al.*, 2003) et très récemment, le thiolène (Sikanen T. M. *et al.*, 2013). De nombreuses revues font état des grandes performances accessibles grâce aux multiples microsystèmes électrophorétiques pour la séparation de protéines (Bousse L. *et al.*, 2001 ; Dolnik V. *et al.*, 2005 ; Tran N.T. *et al.*, 2010). De nouvelles technologies de fabrication de microcanaux ont également vu le jour, comme les puces

PeT (Polyester-Toner) dont les canaux sont imprimés directement sur des films en polyester par une imprimante laser commercial à encre en poudre (toner) (Duarte, G. R. et al., 2012). L'exploitation de nouveaux matériaux, tel le PeT, combinés à des procédés de fabrication rapides et peu coûteux est un facteur clé de l'exploitation en routine et à grande échelle de cette technologie. Un comparatif des coûts, des temps de fabrication, des μeo et de la longévité de plusieurs types de puces sont comparés dans le **Tableau IV**.

	PeT	Verre	PDMS natif	Verre (Bioanalyzer 2100, Agilent)
Coût par puce (\$)	~ 0,15	~ 40,0	~ 2 à 5	~ 40,0
Temps de fabrication	> 10 minutes	~ 24 heures	~ 3 à 4 heures	NC
μeo à pH 9 ($10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	0,35	3,90	1,12	3,90
Potentiel zêta (V)	- 4,2 \pm 0,3	- 55 \pm 1	- 15 \pm 1	NC
Longévité	Jetable après quelques utilisations	Réutilisable	Réutilisable	Jetable après 12 analyses par puce

Tableau IV : Comparaison des caractéristiques de fabrication et d'utilisation de différents types de puces pour l'électrophorèse. Les μeo ont été mesurées à l'aide d'un tampon borate à pH 9 et de force ionique 20mM (Duarte G.R. et al., 2012).

Enfin, l'un des avantages incontestables de la miniaturisation est la possibilité de développer des systèmes autonomes voire portatifs. Dans ce sens, Kaigala *et al.*, ont développé un système complet de préconcentration/séparation/détection LIF, pour doser des traces d'explosifs dans l'eau. Ce laboratoire sur puce tient dans la main (**Figure 24**). L'analyse est effectuée en

isotachophorèse et la détection par fluorescence est réalisable en mode direct et indirect. En détection directe, une limite de détection de 100 picomolaires est atteinte pour détecter un agent fluorescent, Alexa Fluor 647. En mode indirect, l'analyse d'un échantillon d'eau de rivière sans prétraitement préalable a permis la détection de deux explosifs, le 2,4,6-trinitrophenol (TNP) et le 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

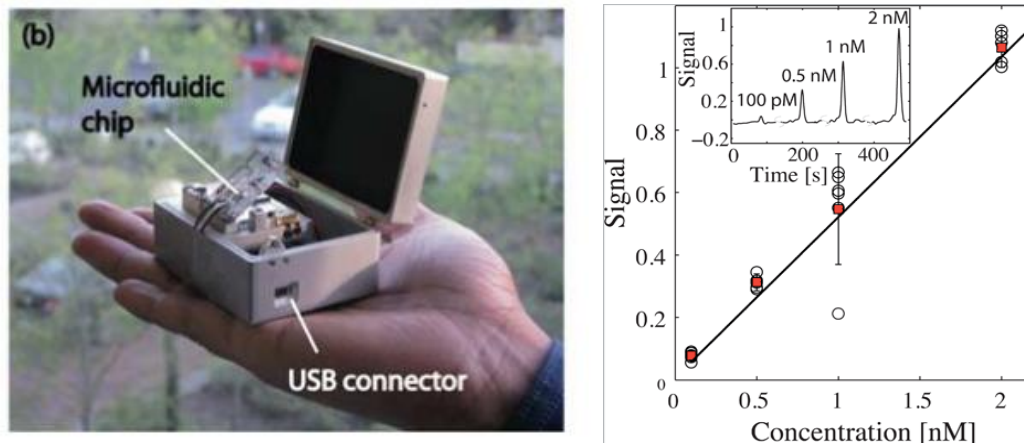


Figure 24 : Photographie du système tout-en-un miniaturisé pour l'isotachophorèse et courbe de calibration de l'Alexa Fluor 647 (Kaigala G.V. *et al.*, 2010).

3.2.2. Séparation de biomarqueurs protéiques et peptidiques par MEC

En 1992, Harrison *et al.*, ont mis au point la première puce en verre contenant un canal de séparation dans lequel une μeo comparable à celle obtenue en capillaire de silice vierge a été mesurée. (Harrison D.J. *et al.*, 1992). Depuis, la miniaturisation de l'EC a ouvert la voie à la mise au point de véritables laboratoires sur puce ou microsystemes totaux d'analyse (μTAS) pour le diagnostic de nombreuses maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires ou rénales, les pathologies neurologiques, thyroïdiennes ou infectieuses, ou encore le diabète. Un test enzymatique basé sur l'EC en puce de la protéine kinase A impliquée dans de nombreux cancer a été développé en 1999, montrant l'apport des microsystemes pour ces applications (Cohen C.B. *et al.*, 1999).

Des outils de diagnostic en puce ont également été développés pour l'analyse de lipoprotéines de basse densité (LBD) pour le diagnostic de l'artériosclérose. Ceriotti *et al.* ont mis au point un microsysteme en verre, où les canaux sont revêtus dynamiquement de méthylglucamine afin de limiter l'adsorption des LBD. En ajoutant du SDS à la solution d'électrolyte, l'efficacité des pics a également été augmentée (Ceriotti L. *et al.*, 2002).

Le nombre de systèmes totalement automatisés et commerciaux disponibles est croissant, offrant de grandes possibilités pour un usage diagnostique. Le Micro-Total Analysis System Wako i30 Auto Analyzer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japon) (Figure 25), a permis à Choi et ses collaborateurs d'évaluer le potentiel diagnostique de l' α -fétoprotéine (AFP)-L3 et de la prothrombine dans les cas de carcinomes hépatocellulaires.

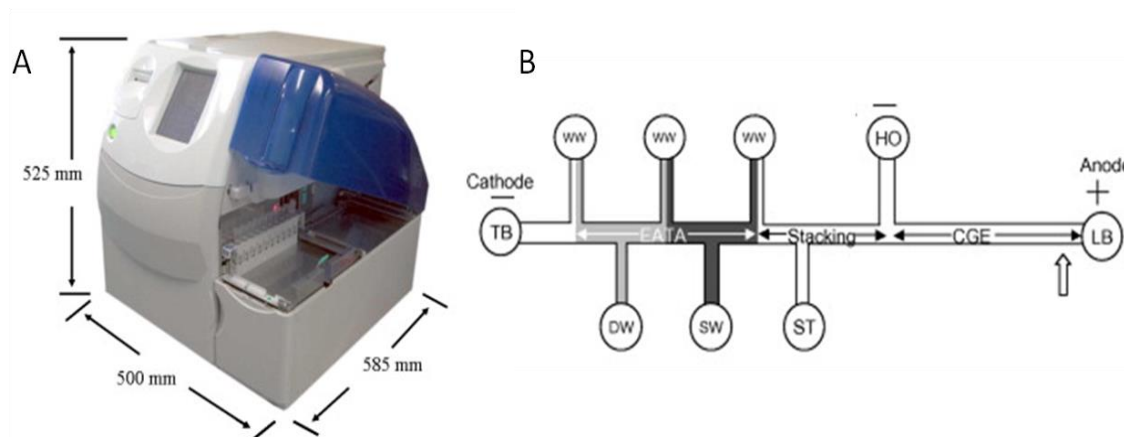


Figure 25 : A) Photographie et mensurations du système Wako i30 Auto Analyzer. B) Schéma de la puce en polyméthylméthacrylate (PMMA) utilisé pour l'analyse.

Ce microsystème d'analyse total inclut une étape de préconcentration par isotachophorèse des immunocomplexes préalablement formées entre l'AFP et les anticorps monoclonaux anti-AFP, puis une étape de marquage par un agent fluorescent dans les différents microcanaux. Il s'en suit une séparation des complexes dans une matrice de gel par MCGE puis leur détection par fluorescence. L'étude confirme que l'analyse combinée des deux protéines augmente la puissance diagnostique en ce qui concerne le carcinome hépatocellulaire (Choi J. Y. *et al.*, 2013).

La technologie des microsystèmes hybrides est également de plus en plus exploitée. Le microsystème est ici composé d'une couche de PDMS et d'une couche de verre. Qian *et al.* ont démontré que l'EC en puce hybride était un outil fiable pour l'analyse rapide de lipoprotéines de haute densité (LHD), majoritairement composées de LHD₂ et LHD₃. Les LHD₂ jouent un rôle central chez les patients atteints d'insuffisance coronarienne et leur quantification au sein des LHD est importante pour la prédiction et le diagnostic des patients atteints de coronaropathie. Afin de limiter l'adsorption des lipoprotéines à la surface des microcanaux, la hydroxypropylcellulose a été utilisée comme revêtement de surface tandis que le dodécyl- β -D-

maltoside et le SDS ont été ajoutés au tampon de séparation pour limiter les possibles interactions de surface avec les LHD. Ce microsysteme a permis de séparer avec une grande résolution les deux formes de LDH en CZE. La répétabilité de la séparation est très satisfaisante avec des coefficients de variation inférieurs à 3% pour les temps de migration et les aires de pics. Une comparaison des profils obtenus pour l'analyse de différents sérums humains a permis de confirmer que, chez les patients atteints d'insuffisance coronarienne, le pic correspondant à la forme LDH₂ disparaît contrairement aux cas des sujets sains (**Figure 26**). Les auteurs suggèrent que ce dispositif est le moyen le plus rapide, simple et efficace pour diagnostiquer un facteur de risque de cette pathologie (Qian J.J. *et al.*, 2012).

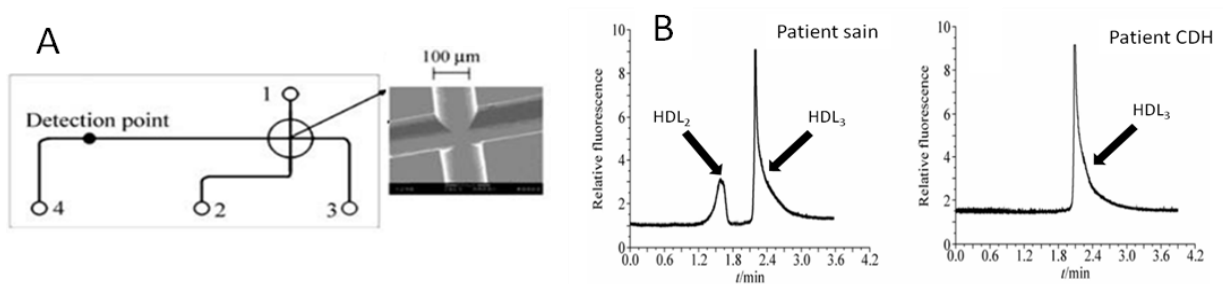


Figure 26 : A) Schéma de la puce. B) Electrophérogrammes correspondants à la séparation des deux fractions majeures de LDH, LDH₂ et LDH₃, contenues dans le sérum d'un patient sain (à gauche) et d'un patient atteint de coronaropathie (à droite) (Qian J.J. *et al.*, 2012).

Plus récemment, Kim *et al.* ont développé un microsysteme en Polyester-Toner couplant un test immunochimique à une séparation électrophorétique en vue de quantifier dans le sérum la protéine C-réactive (CRP), biomarqueur plasmatique d'un état inflammatoire. Ce dispositif utilise une simple imprimante de bureau pour la microfabrication des canaux de séparation par dépôts d'encre sur un film de polyester. Ce dispositif ne permet pas d'obtenir des séparations de protéines aussi performantes que sur les puces en verre, ce qui s'explique par la rugosité et l'imperfection des canaux imprimés.

Pour contourner le problème, une méthode d'immunoextraction appelée Cleavage Tag Immunoassay a été employée au sein même du microsysteme. Les protéines sont incubées dans une solution contenant des billes sur lesquelles sont greffées des anticorps spécifiques dans le réservoir de l'échantillon de la puce (**Figure 27**).

Une fois, le complexe anticorps/antigène formé, un agent fluorescent est ajouté et marque le complexe. L'excès de fluorescence est éliminé *via* une solution de rinçage disposée dans l'un des réservoirs de la puce, le réservoir RR. Enfin, les marqueurs fluorescents sont détachés des complexes et la solution contenant les marqueurs fluorescents est injectée dans le canal de séparation.

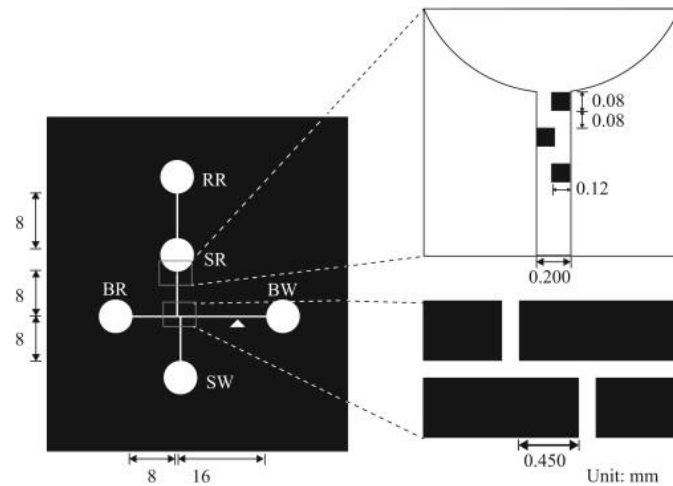


Figure 27 : Schéma d'un microsystème en PeT. SR : réservoir de l'échantillon ; SW : réservoir de l'échantillon usé ; BR : réservoir du tampon ; RR : réservoir de rinçage ; BW : réservoir du tampon usé. Des barrages sont installés à la sortie du SR pour empêcher la migration des billes.

L'avantage de cette méthode d'analyse est le temps court nécessaire au processus complet. En effet, moins de 35 minutes suffisent à la fabrication de la puce, à l'immunoextraction et à l'analyse. Ce test immunochimique sur puce a été utilisé pour quantifier avec succès la CRP dans le sérum (Figure 28). Le test affiche une LOD de 3 mg/L (Kim A.R. *et al.*, 2013).

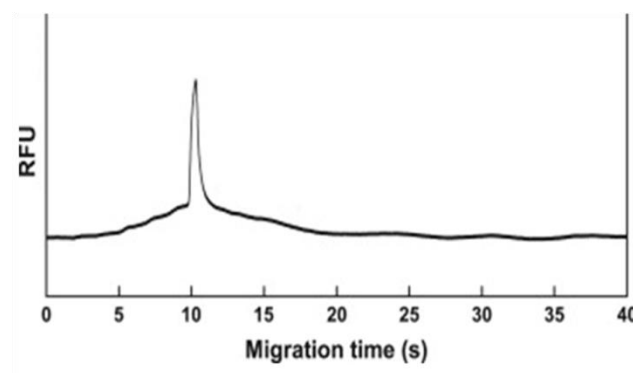


Figure 28 : Electrophérogramme correspondant à l'analyse de CRP dans une solution de sérum diluée 10 fois avec un tampon borate de pH 9,2 et de pI 20mM (Kim A.R. *et al.*, 2013).

4. Références de la partie bibliographique

- Ågren-Wilsson A., Lekman A., Sjöberg W., Rosengren L., Blennow K., Bergenheim A.T., & Malm J. (2007). *Acta Neurologica Scandinavica* 116(5) 333-339.
- Albarghouthi M.N., Stein T.M., & Barron A.E. (2003). *Electrophoresis* 24(7-8) 1166-1175.
- Anderson L., & Hunter C.L. (2006). *Molecular & Cellular Proteomics* 5(4) 573-588.
- Andrade J.D., & Hlady V. (1987). *Annals of the New York Academy of Sciences* 516(1) 158-172.
- Andrade J.D., Hlady V., & Wei A.P. (1992). *Pure and Applied Chemistry* 64 1777-1777.
- Anik N., Airiau M., Labeau M.P., Vuong C.T., & Cottet H. (2012). *Journal of Chromatography A* 1219 188-194.
- Barnes D.E., & Yaffe K. (2011). *The Lancet Neurology* 10(9) 819-828.
- Bateman R.J., Xiong C., Benzinger T.L., Fagan A.M., Goate A., Fox N.C., & Morris J.C. (2012). *New England Journal of Medicine* 367(9) 795-804.
- Bennett D.A., Wilson R.S., Schneider J.A., Evans D.A., Beckett L.A., Aggarwal N.T., & Bach J. (2002). *Neurology* 59(2) 198-205.
- Bermejo-Pareja F., Antequera D., Vargas T., Molina J.A., & Carro E. (2010). *BMC Neurology* 10(1) 108.
- Berven F.S., Kroksveen A.C., Berle M., Rajalahti T., Flikka K., Arneberg R., & Ulvik R. J. (2007). *Proteomics-Clinical Applications* 1(7) 699-711.
- Beyermann S., Trippe R. H., Bähr A.A., & Püllen R. (2013). *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie* 46(8) 740-747.
- Bian H., Van Swieten J.C., Leight S., Massimo L., Wood E., Forman M., & Grossman M. (2008). *Neurology* 70(19 Part 2) 1827-1835.
- Bjerke M., Portelius E., Minthon L., Wallin A., Anckarsäter H., Anckarsäter R., & Blennow K. (2010). *International Journal of Alzheimer's Disease* 2010.
- Blennow K. & Hampel H. (2003). *The Lancet Neurology* 2(10) 605-613.

- Blennow K. (2004). *NeuroRx* 1(2) 213-225.
- Blennow K., & Zetterberg H. (2009). *Journal of Alzheimer's Disease* 18(2) 413-417.
- Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. (2006). *The Lancet* Volume 368 Issue 9533 Pages 387-403
- Blennow K., Hampel H., Weiner M., & Zetterberg H. (2010). *Nature Reviews Neurology* 6(3) 131-144.
- Blennow K., Wallin A., Ågren H., Spenger C., Siegfried J., & Vanmechelen E. (1995). *Molecular and Chemical Neuropathology* 26(3) 231-245.
- Bongers J., Lambros T., Felix A.M., & Heimer E.P. (1992). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 15(6-7) 1115-1128.
- Booth F. (1948). *Nature* 161(4081) 83-86.
- Bousse L., Mouradian S., Minalla A., Yee H., Williams K., & Dubrow R. (2001). *Analytical Chemistry* 73(6) 1207-1212.
- Braak H. & Braak E. (1991). *Acta Neuropathologica* 82(4) 239-259.
- Braak H. & Braak E. (1997). *International Psychogeriatrics* 9(S1) 257-261.
- Bremer M.G., Duval J., Norde W., & Lyklema J. (2004). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 250(1) 29-42.
- Bruggink K.A., Jongbloed W., Biemans E.A., Veerhuis R., Claassen J.A., Kuiperij H.B., & Verbeek M.M. (2013). *Analytical Biochemistry* 433(2) 112-120.
- Bruggink K.A., Müller M., Kuiperij H.B., & Verbeek M.M. (2012). *Journal of Alzheimer's Disease* 28(4) 735-758.
- Buerger K., Zinkowski R., Teipel S.J., Tapiola T., Arai H., Blennow K., & Hampel H. (2002) *Archives of neurology* 59(8) 1267-1272.
- Burgot G., & Burgot J.L. (2011). *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques électrophorèses méthodes spectrales et méthodes thermiques*. Lavoisier.
- Burton E.J., Barber R., Mukaetova-Ladinska E.B., Robson J., Perry R.H., Jaros E., & O'Brien J. T. (2009). *Brain* 132(1) 195-203.
- Busch M.H.A., Kraak J.C., Poppe H. (1995) *Journal of Chromatography A* 695 p. 287
- Cao F., Luo Z., Zhou D., Zeng R., & Wang Y. (2011). *Electrophoresis* 32(10) 1148-1155.
- Castaño-Álvarez M., Fernández-Abedul M.T., & Costa-García A. (2005). *Electrophoresis* 26(16) 3160-3168.
- Cerioti L., Shibata T., Folmer B., Weiller B. H., Roberts M. A., de Rooij N. F., & Verpoorte E. (2002). *Electrophoresis* 23(20) 3615-3622.
- Chiari M., Cretich M., Damin F., Cerioti L., Consonni R., (2000) *Electrophoresis* 21 909–916.

- Chiasserini D., Parnetti L., Andreasson U., Zetterberg H., Giannandrea D., Calabresi P., & Blennow K. (2010). *Journal of Alzheimer's Disease* 22(4) 1281-1288.
- Choi J.Y., Jung S.W., Kim H. Y., Kim M., Kim Y., Kim D.G., & Oh E.J. (2013). *World journal of gastroenterology: WJG* 19(3) 339.
- Chu Y.H., Avila L.Z., Gao J., & Whitesides G.M. (1995). *Accounts of Chemical Research* 28(11) 461-468.
- Cifuentes A., Kok W., Poppe H., (1995). *J. Microcolumn. Sep.* 7 365-374
- Cizas P., Budvytyte R., Morkuniene R., Moldovan R., Broccio M., Lösche M., & Borutaite V. (2010). *Archives of biochemistry and biophysics* 496(2) 84-92.
- Cohen C.B., Chin-Dixon E., Jeong S., & Nikiforov T.T. (1999). *Analytical Biochemistry* 273(1) 89-97.
- Colliot O., Chételat G., Chupin M., Desgranges B., Magnin B., Benali H., & Lehericy S. (2008). *Radiology* 248(1) 194-201.
- Craig-Schapiro R., Kuhn M., Xiong C., Pickering E.H., Liu J., Misko T.P., & Holtzman D.M. (2011). *PLoS One* 6(4) e18850.
- Cretich M., Stastna M., Chrambach A., & Chiari M. (2002). *Electrophoresis* 23(14) 2274-2278.
- Cumming T.B., Churilov L., Linden T., & Bernhardt J. (2013) *Acta Neurologica Scandinavica* 128(2) 122-129.
- Davidsson P., & Nilsson C.L. (1999). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1473(2) 391-399.
- del Campo M., Mollenhauer B., Bertolotto A., Engelborghs S., Hampel H., Simonsen A. H., & Teunissen C. (2012). *Biomarkers in Medicine* 6(4) 419-430.
- Demanèche S., Chapel J.P., Monrozier L.J., & Quiquampoix H. (2009). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 70(2) 226-231.
- Di Domenico F., Sultana R., Tiu G. F., Scheff N.N., Perluigi M., Cini C., & Butterfield D.A. (2010). *Brain research* 1333 72-81.
- Diniz B.S., Pinto Jr J.A., & Forlenza O.V. (2008). *World Journal of Biological Psychiatry* 9(3) 172-182.
- Doherty E.A.S., R.J. Meagher M.N. Albarghouthi A.E. Barron (2003) *Electrophoresis* 24 p. 34
- Dolnik V., & Liu S. (2005). *Journal of Separation Science* 28(15) 1994-2009.
- Duara R., Loewenstein D.A., Potter E., Appel J., Greig M.T., Urs R., & Potter H. (2008). *Neurology* 71(24) 1986-1992.
- Duarte G.R., Coltro W.K., Borba J.C., Price C.W., Landers J.P., & Carrilho E. (2012). *Analyst* 137(11) 2692-2698.

Duffy D.C., McDonald J.C., Schueller O.J., & Whitesides G.M. (1998). *Analytical Chemistry* 70(23) 4974-4984.

Dumurgier J., Vercruyse O., Paquet C., Bombois S., Chaulet C., Laplanche J.L., & Gabelle A. (2013). *Alzheimer's & Dementia* 9(4) 406-413.

Essa J.H., Magner E., Cooney J., Hodnett B.K., (2007) *J. Mol. Catal. B Enzym.* 49 61–68.

Esselmann H., Groemer T.W., Kornhuber J., Lewczuk P., Maler J.M., & Wiltfang J. (2011). *U.S. Patent Application 13/639866*.

Evenhuis C.J., Guijt R.M., Macka M., Marriott P.J., Haddad P.R., (2006) *Analytical Chemistry* 78 2684-2693.

Fagan A.M., & Perrin R. J. (2012). *Biomarkers in Medicine* 6(4) 455-476.

Fagan A.M., Mintun M.A., Mach R.H., Lee S.Y., Dence C.S., Shah A.R., & Holtzman D.M. (2006). *Annals of Neurology* 59(3) 512-519.

Fagan A.M., Mintun M.A., Shah A.R., Aldea P., Roe C.M., Mach R.H., & Holtzman D.M. (2009). *EMBO Molecular Medicine* 1(8-9) 371-380.

Farrer L.A., Cupples L.A., Haines J.L., Hyman B., Kukull W.A., Mayeux R., & van Duijn C.M. (1997). *Jama* 278(16) 1349-1356.

Fjell A.M., Walhovd K.B., Fennema-Notestine C., McEvoy L.K., Hagler D.J., Holland D., & Dale A.M. (2010). *The Journal of Neuroscience* 30(6) 2088-2101.

Folstein M.F., Folstein S.E., & McHugh P.R. (1975). *Journal of Psychiatric Research* 12(3) 189-198.

Frisoni G.B., Fox N. C., Jack C.R., Scheltens P., & Thompson P.M. (2010). *Nature Reviews Neurology* 6(2) 67-77.

Frisoni G.B., Fox N.C., Jack C.R., Scheltens P., & Thompson P.M. (2010). *Nature Reviews Neurology* 6(2) 67-77.

Fukumoto H., Cheung B.S., Hyman B.T., & Irizarry M.C. (2002). *Archives of Neurology* 59(9) 1381-1389.

Fukumoto N., Fujii T., Combarros O., Kamboh M. I., Tsai S.J., Matsushita S., & Kunugi H. (2010). *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153(1) 235-242.

Fukuyama R., Izumoto T., & Fushiki S. (2001). *European Neurology* 46(1) 35-38.

Galasko D., Chang L., Motter R., Clark C.M., Kaye J., Knopman D., & Seubert P. (1998). *Archives of Neurology* 55(7) 937-945.

Gao C. M., Yam A. Y., Wang X., Magdangal E., Salisbury C., Peretz D., & Allauzen S. (2010). *PLoS One* 5(12) e15725.

Gelfi C., Viganó A., Ripamonti M., Righetti P.G., Sebastiano R., Citterio A., (2001) *Analytical Chemistry* 73 3862–3868

- Ghosal S. (2006) *Annu. Rev. Fluid. Mech.* 38:309-338
- Giordano B.C., Horsman K.M., Burgi D.S., Ferrance J. P., Landers (2006) *Electrophoresis* 27 1355-1362
- Glennier G.G., & Wong C.W. (1984). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(3) 885-890.
- Gómez-Tortosa E., Gonzalo I., Fanjul S., Sainz M.J., Cantarero S., Cemillán C., & del Ser T. (2003) *Archives of Neurology* 60(9) 1218-1222.
- Götz J., & Ittner L.M. (2008). *Nature Reviews Neuroscience* 9(7) 532-544.
- Graça D.C., Lescuyer P., Clerici L., Tsybin Y.O., Hartmer R., Meyer M., & Scherl A. (2012) *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* 23(10) 1750-1756.
- Grossman P.D., & Colburn J.C. (Eds.). (1992). *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Academic Press.
- Gustafson D.R., Skoog I., Rosengren L., Zetterberg H., & Blennow K. (2007). *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry* 78(5) 461-464.
- Habeck C., Foster N.L., Perneczky R., Kurz A., Alexopoulos P., Koeppe R.A., & Stern Y. (2008). *Neuroimage* 40(4) 1503-1515.
- Hampel H., Buerger K., Zinkowski R., Teipel S.J., Goernitz A., Andreasen N., & Blennow K. (2004). *Archives of General Psychiatry* 61(1) 95-02.
- Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Andreasson U., Londos E., Minthon L., & Blennow K. (2007). *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 23(5) 316-320.
- Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Londos E., Blennow K., & Minthon L. (2006). *The Lancet Neurology* 5(3) 228-234.
- Hansson O., Zetterberg H., Buchhave P., Londos E., Blennow K., & Minthon L. (2006). *The Lancet Neurology* 5(3) 228-234.
- Harrison D.J., Manz A., Fan Z., Luedi H., & Widmer H.M. (1992). *Analytical Chemistry* 64(17) 1926-1932.
- HAS. (2011). *Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées: diagnostic et prise en charge. Recommandations pour la pratique clinique*. HAS Saint-Denis.
- Hjerten S. (1967) *Chromatograph. Rev.*, 9 p. 122
- Hjerten S. (1985). *Journal of Chromatography A* 347 191-198.
- Hjerten S., *Electrophoresis* 1990 11 665-690.
- Holsinger R.M., McLean C.A., Collins S.J., Masters C.L., & Evin G. (2004). *Annals of Neurology* 55(6) 898-899.

- Höök F., Rodahl M., Kasemo B., & Brzezinski P. (1998). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(21) 12271-12276.
- Hort J., Valis M., Wabertzinek G., Taláb R., Glossová L., Bojar M., & Stourac P. (2008) *Der Nervenarzt* 79(8) 891-2.
- Houska M., Brynda E., Bohatá K., (2004) *J. Colloid Interface Sci.* 273 140–147.
- Hu W.T., Chen-Plotkin A., Arnold S.E., Grossman M., Clark C.M., Shaw L.M., & Trojanowski J.Q. (2010). *Acta Neuropathologica* 120(3) 385-399.
- Iki N., Yeung E.S., (1996) *Journal of Chromatography A* 1996 731 273–282.
- Ikuta N., Yamada Y., Hirokawa T., (2000) *Electrophoresis* 2000 21 360-366
- Israelachvili J.N., & Wennerstroem H. (1992). *The Journal of Physical Chemistry* 96(2) 520-531.
- Issaq H. J., & Veenstra T.D. (2008). *Expert Review of Proteomics* 5(6) 761-763.
- Jack Jr C. R., Knopman D. S., Jagust W. J., Shaw L. M., Aisen P. S., Weiner M. W., & Trojanowski J. Q. (2010). *The Lancet Neurology* 9(1) 119-128.
- Jellinger K.A. & Bancher C. (1998). *Alzheimer's Disease From Basic Research to Clinical Applications* (pp. 77-95). Springer Vienna.
- Jesse S., Steinacker P., Cepek L., Arnim C.V., Tumani H., Lehnert S., & Otto M. (2009). *Journal of Alzheimer's Disease* 17(3) 541-551.
- Jones K.L., O'Melia C.R. (2000) *Journal of Membrane Science* 165:31
- Jorgenson J.W., Lukacs K.D., (1981) *Analytical Chemistry* 53 1298-1302
- Kaigala G.V., Bercovici M., Behnam M., Elliott D., Santiago J.G., & Backhouse C.J. (2010). *Lab on a Chip* 10(17) 2242-2250.
- Kamphuis W., Mamber C., Moeton M., Kooijman L., Sluijs J. A., Jansen A.H., & Hol E.M. (2012). *PLoS One* 7(8) e42823.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., & Müller-Hill B. (1986). *Nature* 325(6106) 733-736.
- Kasuga K., Tokutake T., Ishikawa A., Uchiyama T., Tokuda T., Onodera O., & Ikeuchi T. (2010). *Journal of Neurology Neurosurgery & Psychiatry* 81(6) 608-610.
- Kelly R.T., & Woolley A.T. (2003). *Analytical Chemistry* 75(8) 1941-1945.
- Khlistunova I., Biernat J., Wang Y., Pickhardt M., von Bergen M., Gazova Z., & Mandelkow E. M. (2006). *Journal of Biological Chemistry* 281(2) 1205-1214.
- Kim A.R., Kim J.Y., Choi K., & Chung D.S. (2013). *Talanta* 109 20-25.
- Kinoshita M., Murakami E., Oda Y., Funakubo T., Kawakami D., Kakehi K., ... & Hayakawa T. (2000). *Journal of Chromatography A* 866(2) 261-271.
- Kirby B.J., Hasselbrink E.F.J., (2004) *Electrophoresis* 25 187-202.

Klunk W.E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist G., Holt D.P., & Långström B. (2004). *Annals of Neurology* 55(3) 306-319.

Klunk W.E., Engler H., Nordberg A., Wang Y., Blomqvist G., Holt D.P., & Långström B. (2004). *Annals of Neurology* 55(3) 306-319.

Knox J.H. and McCormack K.A. (1994) *Chromatographia* 38 207–14 215–21

Kohnken R., Buerger K., Zinkowski R., Miller C., Kerkman D., DeBernardis J., & Hampel H. (2000). *Neuroscience letters* 287(3) 187-190.

Koopman K., Le Bastard N., Martin J.J., Nagels G., De Deyn P.P., & Engelborghs S. (2009). *Neurochemistry International* 55(4) 214-218.

Korf E.S., Wahlund L.O., Visser P.J., & Scheltens P. (2004). *Neurology* 63(1) 94-100.

Koutsoukos P.G., Norde W., & Lyklema J. (1983). *Journal of Colloid and Interface Science* 95(2) 385-397.

Kroksveen A.C., Opsahl J.A., Aye T.T., Ulvik R.J., & Berven F.S. (2011). *Journal of Proteomics* 74(4) 371-388.

Langmuir I., (1932) *J Am Chem Soc* 54 p. 2798

Laterza O.F., Modur V.R., Crimmins D.L., Olander J.V., Landt Y., Lee J.M., & Ladenson J.H. (2006). *Clinical Chemistry* 52(9) 1713-1721.

Lauer H.H., McManigill D. *Analytical Chemistry*, 58 (1986) p. 166

Lausch R., Scheper T., Reif O.W., Schlösser J., Fleischer J., & Freitag R. (1993). *Journal of Chromatography A* 654(1) 190-195.

Lee H.G., Castellani R.J., Zhu X., Perry G., & Smith M.A. (2005). *International Journal of Experimental Pathology* 86(3) 133-138.

Lee J., Soper S.A., & Murray K.K. (2009). *Journal of Mass Spectrometry* 44(5) 579-593.

Lee J.M., Blennow K., Andreasen N., Laterza O., Modur V., Olander J., & Ladenson J.H. (2008). *Clinical Chemistry* 54(10) 1617-1623.

Lewczuk P., Beck G., Esselmann H., Bruckmoser R., Zimmermann R., Fiszer M., & Wiltfang J. (2006). *Clinical Chemistry* 52(2) 332-334.

Lewczuk P., Kornhuber J., Vanmechelen E., Peters O., Heuser I., Maier W., & Wiltfang J. (2010). *Experimental Neurology* 223(2) 366-370.

Liu H., Shi R., Wan W., Yang R., Wang Y., (2008) *Electrophoresis* 29 2812–2819.

Liu K.K., Davis K.L., and Morris M.D. (1994) *Analytical Chemistry* 66 3744–50

Lloyd D.K., Li S., & Ryan P. (1995). *Journal of Chromatography A* 694(1) 285-296.

Loughran M., Cretich M., Chiari M., & Suzuki H. (2005). *Sensors and Actuators B: Chemical* 107(2) 975-979.

- Lucy C.A., MacDonald A.M., & Gulcev M.D. (2008). *Journal of Chromatography A* 1184(1) 81-105.
- Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., & Rogers J. (1999). *The American Journal of Pathology* 155(3) 853-862.
- MacDonald A.M., Mahmoud F. Bahnasy and Charles A. Lucy. (2011) *Journal of Chromatography A* 1218,1: 178-184.
- Maddalena A., Papassotiropoulos A., Müller-Tillmanns B., Jung H.H., Hegi T., Nitsch R.M., & Hock C. (2003). *Archives of Neurology* 60(9) 1202-1206.
- Maler J.M., Klafki H.W., Paul S., Spitzer P., Groemer T.W., Henkel A.W., & Wiltfang J. (2007). *Proteomics* 7(20) 3815-3820.
- Malmsten M. (1998). *Journal of Colloid and Interface Science* 207(2) 186-199.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B.L., & Beyreuther K. (1985). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82(12) 4245-4249.
- Matsuda H., Kitayama N., Ohnishi T., Asada T., Nakano S., Sakamoto S., & Katoh A. (2002). *Journal of Nuclear Medicine* 43(3) 304-311.
- Mattson M.P. (2009). *Experimental Gerontology* 44(10) 625-633.
- Mattsson N., Zetterberg H., Hansson O., Andreasen N., Parnetti L., Jonsson M., & Blennow K. (2009). *Jama* 302(4) 385-393.
- Mattsson N., Zetterberg H., Hansson O., Andreasen N., Parnetti L., Jonsson M., & Blennow K. (2009). *Jama* 302(4) 385-393.
- Mayeux R., & Stern Y. (2012). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(8) a006239.
- McCann C.J., Glover B.M., Menown I.B., Moore M.J., McEneny J., Owens C.G., & Adgey J. A. (2008). *European Heart Journal* 29(23) 2843-2850.
- McCormick R.M., (1988) *Analytical Chemistry* 60 2322-2328
- McDonald C.R., McEvoy L. K., Gharapetian L., Fennema-Notestine C., Hagler D.J., Holland D., & Dale A.M. (2009). *Neurology* 73(6) 457-465.
- McKhann G.M., Knopman D.S., Chertkow H., Hyman B.T., Jack Jr C.R., Kawas C.H., & Phelps C.H. (2011). *Alzheimer's & Dementia* 7(3) 263-269.
- Mehta P.D., Pirttilä T., Mehta S.P., Sersen E. A., Aisen P.S., & Wisniewski H.M. (2000). *Archives of Neurology* 57(1) 100-105.
- Meng X., & D'Arcy C. (2012). *PLoS One* 7(6) e38268.
- Minoshima S., Giordani B., Berent S., Frey K. A., Foster N. L., & Kuhl D. E. (1997). *Annals of Neurology* 42(1) 85-94.
- Morris J. C. (2006). *Archives of Neurology* 63(1) 15-16.

- Mulder S.D., van der Flier W. M., Verheijen J.H., Mulder C., Scheltens P., Blankenstein M. A., & Veerhuis R. (2010). *Journal of Alzheimer's Disease* 20(1) 253-260.
- Mutter J., Curth A., Naumann J., Deth R., & Walach H. (2010). *Journal of Alzheimer's Disease* 22(2) 357-374.
- Nelson R.J., Burgi D.S., in: Landers J.P. (Ed.) (1994) *Handbook of Capillary Electrophoresis* CRC Press Boca Raton pp. 549-562.
- Norde W. (1986). *Advances in Colloid and Interface Science* 25 267-340.
- Norde W. (1996 January). *Macromolecular Symposia* (Vol. 103 No. 1 pp. 5-18). Hüthig & Wepf Verlag.
- Norde W. (2008). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 61(1) 1-9.
- Nunomura A., Perry G., Aliev G., Hirai K., Takeda A., Balraj E.K., & Smith M.A. (2001). *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60(8) 759-767.
- O'Bryant S.E., Humphreys J.D., Smith G.E., Ivnik R.J., Graff-Radford N.R., Petersen R.C., & Lucas J.A. (2008). *Archives of Neurology* 65(7) 963-967.
- Oddo S., Caccamo A., Tran L., Lambert M.P., Glabe C.G., Klein W.L., & LaFerla F.M. (2006). *Journal of Biological Chemistry* 281(3) 1599-1604.
- Olsson A., Höglund K., Sjögren M., Andreasen N., Minthon L., Lannfelt L., & Blennow K. (2003). *Experimental Neurology* 183(1) 74-80.
- Ownby R.L. (2006). *Geriatrics* 61(2) 30.
- Pallandre A., de Lambert B., Attia R., Jonas A.M., Viovy J.-L., (2006) *Electrophoresis* 27 584-610
- Pannee J., Portelius E., Oppermann M., Atkins A., Hornshaw M., Zegers I., & Gobom J. (2013). *Journal of Alzheimer's Disease* 33(4) 1021-1032.
- Parnetti L., Amici S., Lanari A., & Gallai V. (2001). *Mechanisms of Ageing and Development* 122(16) 2063-2069.
- Parnetti L., Tiraboschi P., Lanari A., Peducci M., Padiglioni C., D'Amore C., & Calabresi P. (2008). *Biological Psychiatry* 64(10) 850-855.
- Perrin R.J., Fagan A.M., & Holtzman D.M. (2009). *Nature* 461(7266) 916-922.
- Petersen N.J., Nikolajsen R.P.H., Mogensen K.B., Kutter J.P., *Electrophoresis* 2004 25 253-269
- Petersen R.C. (2004). *Journal of Internal Medicine* 256(3) 183-194.
- Portelius E., Westman-Brinkmalm A., Zetterberg H., & Blennow K. (2006). *Journal of Proteome Research* 5(4) 1010-1016.
- Praticò D. (2010). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801(8) 930-933.
- Preisler J., Yeung E.S., *Analytical Chemistry* 1996 68 2885-2889

- Qian J.J., Ji H.Y., Cong H., Wang H.M., & Jin Q.H. (2012). *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40(2) 230-235.
- Querfurth H.W., & LaFerla F.M. (2010). *N Engl J Med* 362(4) 329-344.
- Quigley H., Colloby S. J., & O'Brien J.T. (2011). *International Journal of Geriatric Psychiatry* 26(10) 991-999.
- Rabe M., Verdes D., & Seeger S. (2011). *Advances in Colloid and Interface Science* 162(1) 87-106.
- Ramsden J. J. (1995). *Chemical Society Reviews* 24(1) 73-78.
- Resnick S.M., Sojkova J., Zhou Y., An Y., Ye W., Holt D.P., & Wong D.F. (2010). *Neurology* 74(10) 807-815.
- Riemenschneider M., Lautenschlager N., Wagenpfeil S., Diehl J., Drzezga A., & Kurz A. (2002). *Archives of Neurology* 59(11) 1729-1734.
- Roher A.E., Baudry J., Chaney M.O., Kuo Y.M., Stine W.B., & Emmerling M.R. (2000). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1502(1) 31-43.
- Rosén C., Andreasson U., Mattsson N., Marcusson J., Minthon L., Andreasen N., & Zetterberg H. (2012). *Neuromolecular Medicine* 14(1) 65-73.
- Rosenmann H. (2012). *Journal of Molecular Neuroscience* 47(1) 1-14.
- Rosenmann H. (2012). *Journal of Molecular Neuroscience* 47(1) 1-14.
- Ross D., Gaitan M., and Locascio L.E. (2001) *Analytical Chemistry* 73 4117–23
- Sadeghi N., Foster N.L., Wang A.Y., Minoshima S., Lieberman A.P., & Tasdizen T. (2008 May). *Biomedical Imaging: From Nano to Macro 2008. ISBI 2008. 5th IEEE International Symposium on* (pp. 408-411). IEEE.
- Sakono M., & Zako T. (2010). *FEBS Journal* 277(6) 1348-1358.
- Santacruz K., Lewis J., Spire T., Paulson J., Kotilinek L., Ingelsson M., & Ashe K.H. (2005). *Science* 309(5733) 476-481.
- Santos A.N., Ewers M., Minthon L., Simm A., Silber R. E., Blennow K., & Hampel H. (2012). *Journal of Alzheimer's Disease* 29(1) 171-176.
- Sanzgiri R.D., T.A. McKinnon B.T. Cooper (2006) *Analyst* 131 p. 1034
- Schipper H.M. (2011). *Neurobiology of Aging* 32(5) 778-790.
- Schroeter M.L., Stein T., Maslowski N., & Neumann J. (2009). *Neuroimage* 47(4) 1196-1206.
- Schure M.R., Lenhoff A.M. (1993) *Analytical Chemistry*, 65 p. 3024
- Schure M.R., Lenhoff A.M., (1993) *Analytical Chemistry* 65 3024–2037.
- Sebastiano R., Gelfi C., Righetti P.G., Citterio A., (2000) *Journal of Chromatography A* 894 53–61
- Selkoe D.J. (2001). *Neuron* 32(2) 177-180.

- Sergeant N., Bombois S., Ghestem A., Drobecq H., Kostanjevecki V., Missiaen C., & Delacourte A. (2003). *Journal of Neurochemistry* 85(6) 1581-1591.
- Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Esch F., Lee M., Dovey H., Davis D., & Schenk D. (1992). *Nature* 359(6393) 325-327.
- Shankar G.M., Li S., Mehta T.H., Garcia-Munoz A., Shepardson N.E., Smith I., & Selkoe D.J. (2008). *Nature Medicine* 14(8) 837-842.
- Shaw L.M., Vanderstichele H., Knapik-Czajka M., Clark C.M., Aisen P.S., Petersen R.C., & Trojanowski J.Q. (2009). *Annals of Neurology* 65(4) 403-413.
- Sikanen T.M., Lafleur J.P., Moilanen M.E., Zhuang G., Jensen T.G., & Kutter J.P. (2013). *Journal of Micromechanics and Microengineering* 23(3) 037002.
- Simonsen A.H., Bech S., Laursen I., Salvesen L., Winge K., Waldemar G., & Hjermand L. E. (2010) *Journal of Neuroscience Methods* 191(2) 244-248.
- Sjögren M., Minthon L., Davidsson P., Granerus A.K., Clarberg A., Vanderstichele H., & Blennow K. (2000). *Journal of Neural Transmission* 107(5) 563-579.
- Sjögren M., Vanderstichele H., Ågren H., Zachrisson O., Edsbacke M., Wikkelso C., & Blennow K. (2001). *Clinical Chemistry* 47(10) 1776-1781.
- Skoog I., & Gustafson D. (2003). *Neurological Research* 25(6) 675-680.
- Stomrud E., Hansson O., Blennow K., Minthon L., & Londos E. (2007). *Dementia and geriatric cognitive disorders* 24(2) 118-124.
- Strozyk D., Blennow K., White L.R., & Launer L.J. (2003). *Neurology* 60(4) 652-656.
- Stutz H. (2009). *Electrophoresis* 30(12) 2032-2061.
- Sunderland T., Linker G., Mirza N., Putnam K.T., Friedman D.L., Kimmel L.H., & Cohen R.M. (2003). *Jama* 289(16) 2094-2103.
- Tanzi R.E., & Bertram L. (2005). *Cell* 120(4) 545-555.
- Tapiola T., Alafuzoff I., Herukka S. K., Parkkinen L., Hartikainen P., Soininen H., & Pirttilä T. (2009). *Archives of Neurology* 66(3) 382-389.
- Taverna M., Le Potier I., & Morin P. (2003). *Electrophorèse capillaire: principe*. Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation. 5(P3365) P3365-1.
- Thal D.R., Rüb U., Orantes M., & Braak H. (2002). *Neurology* 58(12) 1791-1800.
- Thies W., & Bleiler L. (2011). *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association* 7(2) 208-244.
- Tiselius A., (1932) *Biochem. J.* 1932 31 1464–1477.
- Tolboom N., Yaqub M., van der Flier W.M., Boellaard R., Luurtsema G., Windhorst A.D., & van Berckel B. N. (2009). *Journal of Nuclear Medicine* 50(2) 191-197.

- Towns J.K., F.E. Regnier *Analytical Chemistry*, 63 (1991) p. 1126
- Tran N.T., Ayed I., Pallandre A., & Taverna M. (2010). *Electrophoresis* 31(1) 147-173.
- Tran N.T., Taverna M., Miccoli L., Angulo J. F., (2005) *Electrophoresis* 26 3105–3112.
- van Eijk J.J., van Everbroeck B., Abdo W. F., Kremer B.P., & Verbeek M.M. (2010). *Journal of Alzheimer's Disease* 21(2) 569-576.
- Vanderstichele H., Bibl M., Engelborghs S., Le Bastard N., Lewczuk P., Molinuevo J. L., & Blennow K. (2012). *Alzheimer's & Dementia* 8(1) 65-73.
- Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidsson P., Van Kerschaver E., Van Der Perre B., Sjögren M., & Blennow K. (2000) *Neuroscience Letters* 285(1) 49-52.
- Vendruscolo M., & Dobson C.M. (2007). *Nature* 449 (7162) 555-555.
- Verpillot R., Esselmann H., Mohamadi M.R., Klafki H., Poirier F., Lehnert S., & Taverna M. (2011). *Analytical Chemistry* 83(5) 1696-1703.
- Verwey N.A., Van Der Flier W.M., Blennow K., Clark C., Sokolow S., De Deyn P.P., & Blankenstein M.A. (2009). *Annals of Clinical Biochemistry* 46(3) 235-240.
- Verzola B., Gelfi C., Righetti P.G., *Journal of Chromatography A* 2000 874 293–303.
- Verzola C. Gelfi P.G. Righetti *Journal of Chromatography A* 868 (2000) p. 85
- Visser P.J., Verhey F., Knol D.L., Scheltens P., Wahlund L.O., Freund-Levi Y., & Blennow K. (2009). *The Lancet Neurology* 8(7) 619-627.
- Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., & Selkoe D.J. (2002). *Nature* 416(6880) 535-539.
- Welge V., Fiege O., Lewczuk P., Mollenhauer B., Esselmann H., Klafki H.W., & Bibl M. (2009). *Journal of Neural Transmission* 116(2) 203-212.
- Wiltfang J., Esselmann H., Bibl M., Smirnov A., Otto M., Paul S., & Kornhuber J. (2002). *Journal of Neurochemistry* 81(3) 481-496.
- Wimo A., & Prince M. (2010). *World Alzheimer Report 2010: The global economic impact of dementia*. Alzheimer's Disease International. London UK.
- Wu J., & Pawliszyn J. (1994). *Analytical Chemistry* 66(6) 867-873.
- Xu Y. (1996). *Tutorial: capillary electrophoresis*. The Chemical Educator, 1,2: 1-14.
- Yamaguchi H., Hirai S., Morimatsu M., Shoji M., & Harigaya Y. (1988). *Acta Neuropathologica* 77(2) 113-119.
- Yang L.B., Lindholm K., Yan R., Citron M., Xia W., Yang X.L., & Shen Y. (2003). *Nature Medicine* 9(1) 3-4.
- Zempel H., Thies E., Mandelkow E., & Mandelkow E.M. (2010). *The Journal of Neuroscience* 30(36) 11938-11950.

Zetterberg H., Andreasson U., Hansson O., Wu G., Sankaranarayanan S., Andersson M.E., & Blennow K. (2008). *Archives of Neurology* 65(8) 1102-1107.

Zetterberg H., Wahlund L.O., & Blennow K. (2003). *Neuroscience Letters* 352(1) 67-69.

Zhong Z., Ewers M., Teipel S., Bürger K., Wallin A., Blennow K., & Shen Y. (2007). *Archives of General Psychiatry* 64(6) 718-726.

B - Partie expérimentale

1. Introduction

Le travail expérimental présenté dans ce manuscrit de thèse a été réalisé dans le cadre d'un projet européen intitulé Nanosystems for early Diagnosis of Neurodegenerative Diseases (NADINE). Ce projet d'une période de 5 ans, débuté en septembre 2010, a pour but de développer un laboratoire sur puce permettant un test diagnostique précoce des maladies neurodégénératives et en particulier de la MA. En effet, à l'heure actuelle, la MA n'est diagnostiquée que grâce à une combinaison de tests cognitifs basés sur des symptômes cliniques relativement tardifs couplée à des techniques de dosage moléculaire et d'imagerie aidant à la discrimination vis-à-vis d'autres pathologies. En effet, les biomarqueurs validés et actuellement utilisés pour le dosage dans le LCR sont les peptides β -amyloïdes 1-42 et les protéines tau et phospho-tau. Cependant, de nouveaux biomarqueurs dosés dans le LCR pourraient permettre un diagnostic encore plus précoce et plus discriminant qu'avec les méthodes actuelles.

Dans ce contexte, il est apparu nécessaire, avec le soutien et l'appui financier de l'Union Européenne, de développer une technologie basée sur l'analyse et la détection ultra-sensible de tous les biomarqueurs pertinents, dans un système miniaturisé permettant une intégration simplifiée des multiples étapes nécessaires à l'obtention de performances élevées indispensables à un outil diagnostique.

Ce projet a nécessité l'apport scientifique et technologique de groupes de recherche appartenant à différentes disciplines. Les différents groupes impliqués et leurs domaines de compétences sont listés ci-dessous :

- DTU Nanotech, Danemark : micro- et nanotechnologie, microfabrication ;

- Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, France : chimie analytique (EC et μ EC) pour l'analyse de protéines, biochimie ;
- Univerzita Pardubice, République Tchèque : développement de techniques immunochimiques ;
- Ustav Makromolekularni Chemie, République Tchèque : synthèse de polymères et de nanoparticules ;
- Institut Curie, France : microfluidique, système de préconcentration ;
- Universität Ulm, Allemagne : neurochimie et clinique des maladies neurodégénératives ;
- Universitätsklinikum Essen, Allemagne : neurobiologie moléculaire ;
- DiagnoSwiss S.A., Suisse : instrumentation microfluidique pour le diagnostic ;
- Fluigent S.A., France : instrumentation microfluidique ;
- Moravian-Biotechnology, République Tchèque : production d'anticorps mono- et polyclonaux ;
- Kungliga Tekniska Högskolan, Suède : spectrométrie de masse ;
- Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, Italie: polymères, revêtements de surface ;
- Ita-Suomen Yliopisto, FI: tests cliniques, banques biologiques ;
- Instituto Catalá de Nanotecnologia, Espagne : nanobioelectronique et biocapteurs ;
- Association pour la Recherche et le Développement des Méthodes et Processus Industriels, Armines, France : bioinformatique, biostatistique ;
- Rambøll AS, Danemark : gestion des risques, logistique et production.

Les principaux objectifs scientifiques de ce projet ont été répartis en 6 work-packages :

- 1) Le développement de nanoparticules innovantes pour la capture d'anticorps spécifiques aux biomarqueurs ciblés.
- 2) L'amélioration des technologies de micro-fabrication par l'utilisation de matériaux innovants et le développement d'instruments microfluidiques adaptés (intégration des modules, haute précision du contrôle des débits).
- 3) Le développement de mode de détection de haute sensibilité pour les biomarqueurs en microsystème.
- 4) Le développement de méthodes séparatives des biomarqueurs en puce par électrophorèse capillaire de haute résolution.

- 5) L'intégration des différents modules (purification, préconcentration, analyse, détection) et prototypage.
- 6) Le développement de tests précliniques et cliniques.

L'intégration de différents modules au sein du microsystème est un objectif majeur du développement d'un outil diagnostique. Mon travail au sein de ce projet a été de proposer des solutions à deux problématiques majeures liées aux points 3) et 4) précédents. Ces deux axes de recherche se sont focalisés sur :

- La dérivation fluorescente des biomarqueurs pour permettre leur détection en puce par fluorescence induite par laser, en proposant une méthode de dérivation puis de séparation compatible avec des analyses en microsystème.
- Le développement de conditions de séparation électrocinétique hautement résolutive des biomarqueurs au sein de puces en abordant principalement trois aspects : (i) le recouvrement des canaux des puces pour limiter l'adsorption non spécifique, (ii) la modulation de l'écoulement électroosmotique et (iii) l'étude du comportement de différents matériaux alternatifs au verre comme le cyclin olefin copolymer (COC) ou le thiolène pour la conception de puces.

La partie expérimentale de cette thèse rapporte les travaux réalisés pour répondre aux deux objectifs précédents. Cette partie expérimentale se décline en trois grands chapitres. Le premier est consacré à une étude préliminaire portant sur le marquage fluorescent de quatre biomarqueurs ayant montré leur implication dans les processus pathologiques des maladies neurodégénératives : la GFAP, la S-100B, la H-FABP et l'ubiquitine. Le second chapitre porte sur l'adaptation d'une méthode de marquage retenue pour l'ubiquitine afin de réaliser une analyse de ce biomarqueur dans le LCR selon un processus automatisé incorporant les étapes de dérivation, de séparation et de détection au sein du capillaire potentiellement transposable au format d'une puce. Ce deuxième chapitre décrit également les travaux réalisés afin d'aboutir à une séparation hautement résolutive des peptides β -amyloïdes, incluant le peptide A β 1-42, biomarqueur validé pour la MA, sur puce en verre. Toute la famille de ces peptides a été étudiée en vue d'augmenter les performances du diagnostic. Enfin, le troisième et dernier chapitre se concentre sur l'utilisation de nouveaux matériaux, le COC et le thiolène, pour la microfabrication de puces en vue de leur utilisation pour la séparation électrocinétique de protéines.

2. Marquage des biomarqueurs protéiques par des agents fluorescents

2.1. Introduction

La détection des peptides et des protéines par fluorescence native n'est possible que pour ceux qui possèdent un nombre suffisant d'acides aminés naturellement fluorescents tels la phénylalanine, le tryptophane ou la tyrosine. En effet, il est possible d'exciter ces composés à une longueur d'ondes de 275 nm mais les limites de détection sont trop hautes pour l'analyse de ces composés à de faibles concentrations (Lee T.T. *et al.*, 1992). De plus, la grande majorité des protéines et peptides ne présente pas ou très peu d'acides aminés fluorescents. Pour celles-ci, il est donc nécessaire d'utiliser des agents fluorescents qui vont leur conférer des propriétés de fluorescence afin d'atteindre de hautes sensibilités.

Pour le marquage fluorescent des biomarqueurs protéiques et peptidiques, il existe deux modes principaux : la dérivation, par liaison covalente entre un marqueur fluorescent et la biomolécule cible, et le marquage par affinité mettant en jeu des interactions non covalentes et réversibles. Les agents se liant par liaison covalente sont soit des fluorophores, dans le cas où ils présentent des propriétés fluorescentes permanentes, soit des fluorogènes, dans le cas où leur propriété de fluorescence est activée après réaction avec la protéine. Dans le cadre de nos travaux, la dérivation a été privilégiée afin d'accéder à une sensibilité suffisante de la méthode. Ces travaux ont consisté d'une part à étudier les séquences peptidiques des composés afin de proposer le marquage le plus adéquat, et d'autre part à sélectionner le marqueur le plus adapté ainsi qu'un protocole de dérivation permettant un rendement de dérivation élevé. Pour ces deux aspects, nous avons porté une attention particulière à plusieurs critères : la réduction du nombre de formes multimarquées, la réduction du nombre d'interférents et une cinétique rapide de la réaction.

L'analyse de protéines ou peptides dérivés dans les matrices biologiques est indispensable au diagnostic moléculaire. Cependant le marquage fluorescent dans ces milieux présente parfois certaines difficultés. En effet, les faibles concentrations de protéines et peptides dans ces matrices ne permettent que de faibles rendements de marquage des analytes ciblés. A ceci s'ajoute des bruits de fond importants provenant soit d'espèces interférentes présentes en grandes quantités, soit des produits d'hydrolyse du fluorophore (Ban E. *et al.*, 2013). Une problématique majeure du marquage de protéines ou peptides est liée au fait que généralement ces molécules possèdent plusieurs sites de dérivation possibles au sein de leur séquence peptidique. Ils peuvent donc être marqués de manière hétérogène et à un degré variable par l'agent fluorescent.

Des études préliminaires de dérivation ont été effectuées en utilisant la technique d'EC-LIF pour analyser les produits, et ceci sur une série de biomarqueurs potentiels. Les résultats obtenus ont ensuite permis d'aboutir au développement d'une méthode automatisée de marquage fluorescent intra-capillaire de l'ubiquitine avec une séparation hautement sensible dans le LCR qui a fait l'objet d'un article de recherche publié dans *Electrophoresis* en 2013 : *On-line capillary electrophoresis derivatization method for high sensitivity analysis of ubiquitin in filtered cerebrospinal fluid* ([Article 1](#)).

2.2. Etat de l'art sur le marquage des protéines dans les fluides biologiques

2.2.1. Stratégies de marquage et fluorophores associés

2.2.1.1. Les voies de marquage

Le marquage des protéines résulte d'une interaction entre un acide aminé de la séquence peptidique et un agent fluorescent. Le marquage peut se faire par l'intermédiaire de liaisons covalentes ou non covalentes entre la séquence peptidique et l'agent fluorescent (Veledo M.T. *et al.*, 2005). Cependant, les fluorophores d'affinité, non covalents, sont moins performants de par les faibles rendements quantiques obtenus et les faibles affinités et spécificités que présentent la plupart des sondes vis-à-vis des protéines (Yan W. *et al.*, 2006). D'une manière générale, la dérivation covalente conduit à de meilleures sensibilités en EC-LIF par rapport à celles obtenues avec des composés ayant une fluorescence native ou avec des protéines liées par des interactions non covalentes à des sondes de fluorescence (Salas-Solano O. *et al.*, 2006).

Il existe plusieurs familles de marqueurs fluorescents de type covalent. Les deux principaux groupes fonctionnels présents sur les séquences peptidiques susceptibles de se lier aux fluorophores sont les amines et les sulfhydryles. Cependant, bien que peu utilisés du fait de leur faible abondance, de leur manque de spécificité ou de leur moindre réactivité, les acides carboxyliques, les fonctions alcools, les aldéhydes ou les cétones peuvent également se lier à des agents fluorescents. Les agents fluorescents ont des caractéristiques intrinsèques qui les définissent qualitativement :

- Le rendement quantique (φ) ;
- Les longueurs d'ondes d'excitation (λ_{em}) et d'émission maximales (λ_{exc}) ;
- Le coefficient d'extinction ou absorption molaire (ϵ) ;
- La photostabilité (temps nécessaire pour diminuer l'intensité de fluorescence de 50%) ;
- L'intensité de fluorescence ou brillance ($\epsilon \cdot \varphi$) ;
- La durée de vie de fluorescence (τ).

Le **Tableau V** décrit les paramètres de cinq fluorophores différents et permet de les comparer.

	φ	$\lambda_{em}/\lambda_{exc}$ (nm)	ϵ max ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	$\epsilon \cdot \varphi$	τ (nsec)
FITC	0,93	495/521	70 000	65 100	3,8
Alexa 488	0,92	495/519	71 000	65 320	4,1
Fluoprobes 488	0,82	493/519	90 000	69 700	3,3
5-IAF	0,40	494/521	80 000	32 000	NC
Fluorescein C5- Maleimide	0,47	492-515	83 000	39 600	~ 4

Tableau V : Différents fluorophores et leurs propriétés spectrales de fluorescence.

Le rendement quantique quantifie l'efficacité de fluorescence pour une molécule donnée. Il est défini par le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Sa valeur est comprise entre 0,05 et 1 mais il peut varier en fonction de l'environnement des fluorophores, de la concentration du fluorophore ou du pH du milieu. λ_{em} et λ_{exc} représentent les longueurs d'onde d'émission et d'excitation auxquelles l'intensité de fluorescence du composé fluorescent est maximale. Le coefficient d'extinction représente le pouvoir d'absorption de la lumière d'un composé à une longueur d'onde donnée. Il relie aussi la quantité de lumière absorbée à la concentration du fluorophore en solution. L'intensité de fluorescence est le produit du rendement quantique et du coefficient d'extinction molaire. La durée de vie de fluorescence représente le temps pendant lequel un fluorophore demeure dans un état excité. Il est de l'ordre de la nanoseconde pour la plupart des fluorophores et varie en fonction de son environnement (pH, composition du milieu). Plus ce temps est court, meilleure est la sensibilité du fluorophore.

Un autre paramètre important pour juger des performances d'un agent fluorescent est la photostabilité. Elle correspond au nombre d'excitations que peut subir une molécule fluorescente avant de perdre ses propriétés d'émission de fluorescence. On peut également l'évaluer en mesurant le temps d'excitation nécessaire à la diminution de 50% de l'intensité de fluorescence du composé. La **Figure 29** représente la diminution de la réponse de fluorescence de quatre fluorophores en fonction du temps : le Fluorobes 488 NHS, l'Alexa Fluor 488 NHS, la Cyanine 2 et le FITC.

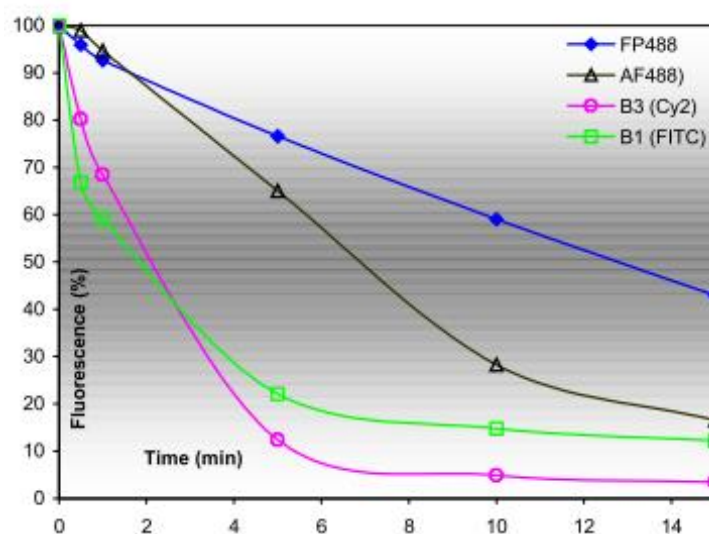


Figure 29 : Mesure de la diminution de fluorescence d'une solution de Fluorobes 488 (FP 488), d'Alexa Fluor 488 (AF 488), de Cyanine 2 (Cy2) et de FITC au cours du temps sous l'effet d'une exposition continue à une source laser de type Exfo X-Cite : λ_{exc} 488 nm (Adapté de <http://www.interchim.fr/ft/F/FP488c.pdf>).

Les deux composés contenant des succinimidyl ester, le FP 488 et l'AF 488, présentent une bien meilleure photostabilité que le FITC et le Cy2. En effet, le FITC et le Cy2 voient leur intensité de fluorescence diminuer d'un facteur 2 en moins de 3 minutes, tandis que pour l'AF 488 le processus nécessite près de 7 minutes. Au final, le composé le plus photostable est de loin le FP 488, qui a perdu 50 % de sa fluorescence au bout de 13 minutes.

Les réactifs fluorescents qui se lient à des amines primaires sont répartis en deux principales classes de molécules : les isothiocyanates et les succinimidyl esters. Les composés isothiocyanates réagissent principalement avec les amines primaires pour former un produit dérivé de la thiourée. Les composés contenant des esters succinimidyl réagissent eux aussi avec les amines primaires pour former une liaison covalente aussi stable qu'une liaison peptidique (Figure 30).

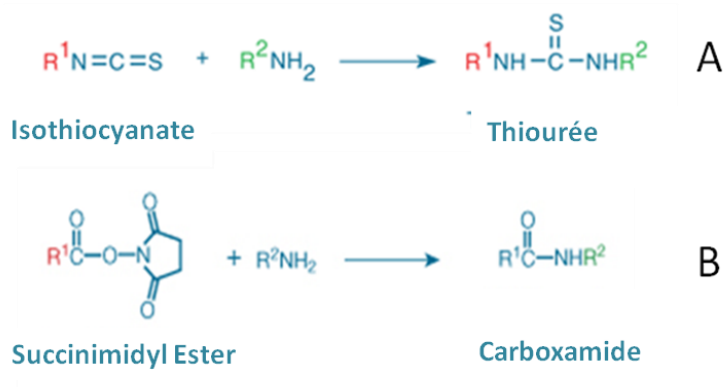


Figure 30 : Réactions de marquage entre une amine primaire et un composé de la famille des isothiocyanates (A) ou un composé de la famille des succinimidyl esters (B). R^1 correspond à la chaîne latérale des agents fluorescents et R^2 à la chaîne latérale des protéines.

Les protéines et peptides contenant un acide aminé cystéine sont des candidats directs au marquage spécifique par l'intermédiaire d'un agent réactif aux fonctions thiols. Il existe trois grandes familles d'agents de dérivation de ce type : les iodoacétamides, les maléimides et les alcanéthiosulfonates. Pour le cas des protéines contenant de multiples cystéines formant des ponts disulfures, un agent réducteur comme le dithiothréitol (DTT) ou le mercaptoéthanol (β -

mercaptoéthanol) (Gorman J. *et al.*, 1987) peut être utilisé pour obtenir des cystéines libres. Cependant, ces agents doivent être retirés par dialyse ou filtration sur gel avant la réaction de marquage, car ils contiennent des fonctions thiols susceptibles de rentrer en compétition avec la réaction de marquage (Hansen R.E., *et al.*, 2009).

Les iodoacétamides, de la famille des haloacétamides, réagissent rapidement avec les groupements sulfhydriles libres en formant une liaison thioéther (**Figure 31**), tout comme les composés fluorescents de la famille des maléimides. Cette liaison est très stable. Ces composés sont cependant très instables à la lumière et ceci particulièrement en solution. Les maléimides sont plus spécifiques que les iodoacétamides, même si à des pH supérieurs à 8,5 une réaction avec les amines est possible. Les alcanéthiosulfonates, en particulier les dérivés méthanéthiosulfonate (MTS) réagissent spécifiquement avec les groupements sulfhydriles pour former des ponts disulfures très stables (**Figure 31**). Ces composés sont extrêmement solubles en solution aqueuse et réagissent rapidement avec les groupements thiols libres. De plus, contrairement aux maléimides et aux iodoacétamides, la liaison formée (pont disulfure) est réversible. En effet, le fluorophore peut être retiré de la protéine ou du peptide par l'ajout d'un agent réducteur comme le DTT ou le TCEP en laissant la biomolécule inchangée.

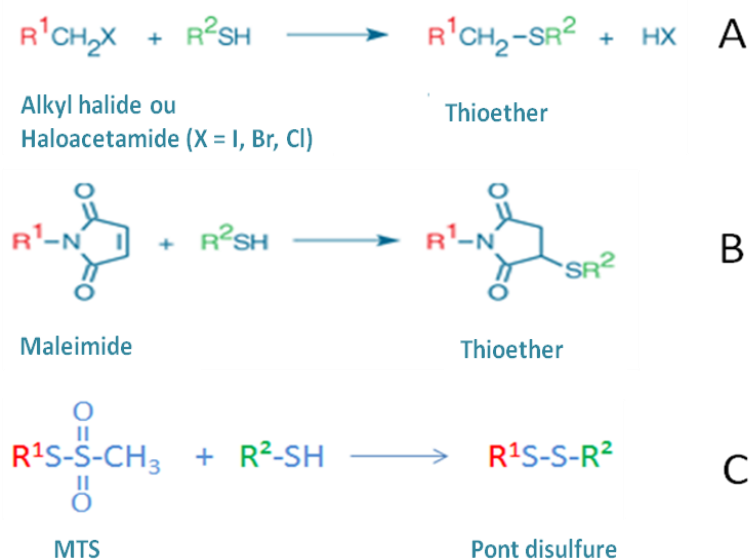


Figure 31 : Réactions de marquage entre un groupement sulfhydrile et des composés de la famille des haloacétamides (A), des maléimides (B) et des réactifs MTS (C).

Il existe de nombreux agents fluorescents commerciaux pour le marquage fluorescent des protéines et des peptides *via* les amines ou les cystéines. Le manuel produit par Molecular Probes, régulièrement mis à jour, est une bonne source d'information quant aux différentes familles de réactifs et leurs conditions d'utilisation (Haugland R.P., 2010).

2.2.1.2. Les modes de marquage compatible avec l'EC

Les stratégies de marquage en vue d'une séparation électrocinétique de protéines et peptides fluorescents se basent sur trois principales approches (Lin Y.W. *et al.*, 2003) :

- Le marquage précapillaire (off-line). Quand la réaction de marquage est plutôt lente, ce marquage est communément utilisé afin de garantir un rendement de réaction suffisant.
- Le marquage intra-capillaire (on-line). Dans le cas des agents à réaction très rapide, la méthode du marquage en ligne, où la réaction se déroule pendant la séparation, offre des avantages de rapidité, d'automatisation, de simplicité, et donc une répétabilité supérieure. Dans ce cas, l'agent fluorescent est injecté avant ou après l'échantillon, en fonction des vitesses relatives des deux espèces, permettant ainsi le croisement des zones et la réaction.
- Le marquage post-capillaire. Celui-ci est utilisé pour maintenir la résolution lors de la séparation. Il permet en outre de s'affranchir de la multiplicité des espèces marquées.

En théorie, il existe donc trois stratégies de marquage. Cependant, l'emploi d'une stratégie plutôt qu'une autre est conditionné par des problématiques spécifiques à la réaction de marquage. Dans l'optique d'une miniaturisation et de l'automatisation de toutes les étapes au sein d'un microsystème, le marquage intra-capillaire ou on-line présente des avantages certains quant à l'intégration du processus dans la puce mais aussi du fait de la rapidité de la méthode que ne procure pas le marquage pré-capillaire. Le marquage post-capillaire présente quant à lui des difficultés d'intégration au sein du microsystème. En effet, dans ce mode, les analytes non dérivés sont séparés et marqués juste avant la fenêtre de détection par l'ajout d'une chambre de dérivation en contact avec l'intérieur du capillaire (Kaneta T. *et al.*, 2011). Le mélange en microfluidique reste cependant difficile compte tenu des flux laminaires étudiés. De ce fait, des connections spécifiques supplémentaires ou des modules permettant le mélange sont nécessaires, rendant l'automatisation et l'intégration au sein des microsystèmes plus complexes. La stratégie de dérivation on-line nous est apparue comme la plus adaptée à notre objectif de développer une

méthode d'analyse incorporant la dérivation, la séparation et la détection des biomarqueurs potentiels de la MA dans une puce.

2.2.2. Le multimarquage

Les agents fluorescents sont principalement utilisés pour augmenter la sensibilité de la détection des protéines et des peptides. Cependant, lors de la séparation électrocinétique et de la détection par fluorescence, on constate que de nombreux pics apparaissent. En effet, en plus des espèces interférentes issues des produits de dégradation du fluorophore lui-même ou des produits secondaires de la réaction, la dérivation d'une protéine conduit généralement à plusieurs dérivés qui diffèrent par le nombre et la position des marqueurs fluorescents sur la séquence peptidique (Fukushima T., *et al.*, 2003).

Cette distribution des marqueurs engendre des composés très proches d'un point de vue de la taille et de la charge, ce qui rend difficile une séparation résolutive en ECZ des différentes formes de la protéine. Il est difficile de prédire le nombre de dérivés de la protéine qui seront formés suite à la dérivation, en raison de la complexité des structures tridimensionnelles des protéines et des gênes stériques qui peuvent survenir à proximité de certains groupements fonctionnels. Le voisinage des acides aminés ciblés par la réaction de marquage peut également conduire à une diminution, voire à une inhibition de la réactivité de l'acide aminé de par des propriétés physicochimiques désavantageuses de ses voisins (Banks P. R., 1998).

Cette problématique est clairement illustrée par le marquage de la myoglobine par le FITC, un composé isothiocyanate couramment utilisé pour dériver les amines. La myoglobine est une protéine de petite taille (17 kDa) contenant 19 lysines et 1 amine en N-terminal, ce qui procure 20 sites de réaction possibles. L'ajout d'une molécule de FITC ne change que très faiblement la masse de la protéine conjuguée, qui n'augmente que de 2%. Cependant, la charge de la protéine après dérivation est modifiée par l'ajout de deux charges négatives issues du FITC en remplacement de la charge positive présente sur les amines au pH de marquage compris entre 9 et 9,5 (Klonis N. *et al.* 1996). Cette faible différence du rapport charge/masse a permis une séparation des différentes formes marquées de la protéine par ECZ mais avec une faible résolution cependant (**Figure 32**).

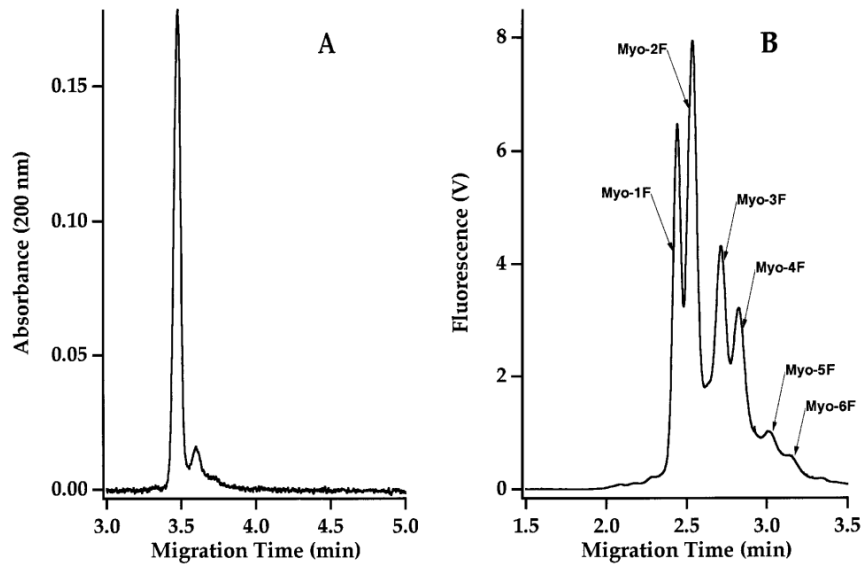


Figure 32 : Electrophérogrammes de la séparation en ECZ de la myoglobine native (A) et de myoglobine marquée par le FITC (B) illustrant la multiplicité des formes marquées. Myo-nF représentent les formes marquées avec n molécules de FITC liées de façon covalente à la séquence peptidique (Banks P.R. *et al.*, 1995).

2.2.3. Réactions de marquage dans les matrices complexes

L'analyse de biomarqueurs protéiques et peptidiques à partir d'échantillons biologiques présente de nombreuses difficultés tant par la complexité de la matrice que par les faibles concentrations des analytes ciblés. En effet, dans les matrices biologiques, le nombre de protéines et peptides susceptibles d'être dérivés est très important et en général, les biomarqueurs ciblés par l'analyse sont comparativement présents en très faible quantité. L'abondance de biomolécules dans ces matrices peut avoir un double effet néfaste :

- Le rendement de la réaction attendu par rapport à des solutions standards de la protéine étudiée est potentiellement amoindri par la compétition de la réaction vis-à-vis des autres molécules dérivables.
- La détection ou l'analyse par fluorescence des molécules dérivées cibles peut être perturbée par la présence d'une multitude d'espèces fluorescentes résultant soit de la dérivatisation soit de leur fluorescence native.

La multiplicité des espèces fluorescentes à séparer engendre de plus des difficultés sur le plan de la séparation électrocinétique. D'ailleurs, ceci est souvent aggravé par la présence de sels dans la

matrice, qui de par les conductivités élevées qu'ils engendrent dans la zone d'échantillon génèrent souvent des dégradations de résolution et d'efficacité des séparations. Le développement d'une méthode d'analyse de matrices biologiques par fluorescence doit donc particulièrement prendre en compte la nécessité d'atteindre des résolutions élevées entre la multitude de composés qui interfèrent. Par ailleurs, la sensibilité des méthodes d'analyse de fluides biologiques est en général fortement réduite par rapport à celles des méthodes similaires réalisées à partir de solutions standards (Szökő É. *et al.*, 2010). Ceci est principalement lié au bruit de fond particulièrement élevé et masquant les composés de très faible concentration.

De nombreuses stratégies ont été développées pour contourner cette réelle problématique, tant le besoin de méthodes robustes de quantification de biomarqueurs dans des liquides biologiques par des techniques alternatives aux tests immunochimiques est grand. Dans ce contexte, la préparation de l'échantillon est une étape importante qui permet de contourner la complexité de la matrice. Les traitements d'échantillons biologiques permettent non seulement de se débarrasser des sels présents, mais aussi de préconcentrer sélectivement les composés recherchés. Parmi les techniques les plus répandues pour préparer les échantillons biologiques à une analyse de protéines et peptides marqués par fluorescence, on retrouve la microdialyse (Doan T.K.O. *et al.*, 2011), les extractions sur phase solide (Ramautar R. *et al.*, 2012), les précipitations par solvant organique (Benavente F. *et al.*, 2010) et l'ultrafiltration (Lin C.Y. *et al.*, 2008).

Dans un contexte de miniaturisation, de nombreux travaux ont proposé des solutions pour intégrer des modules de traitement de l'échantillon au sein de microsystème permettant un processus automatisé et couplé à l'analyse. Un grand nombre de ces travaux ont porté sur le développement de méthodes de prétraitements physiques utilisant les supports monolithiques, les membranes d'extraction ou des gels. Leur application aux protéines reste cependant à ce jour assez peu décrite.

A titre d'exemple, une technique combinant l'enrichissement, le marquage et la purification en ligne d'échantillon contenant des protéines a été récemment développée dans un microsystème en COC. Une section de la puce est composée d'un monolithe polymérique à phase inversée permettant une extraction sur phase solide (**Figure 33**). Les protéines retenues sur le support par des interactions hydrophobes sont ensuite marquées par un agent fluorescent puis rincées pour enlever le surplus d'agent fluorescent n'ayant pas réagi. Enfin, les protéines retenues sont éluées

vers la zone d'injection pour être séparées et détectées le long du canal de séparation. La méthode affiche une limite de détection proche de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Nge P.N. *et al.*, 2012).

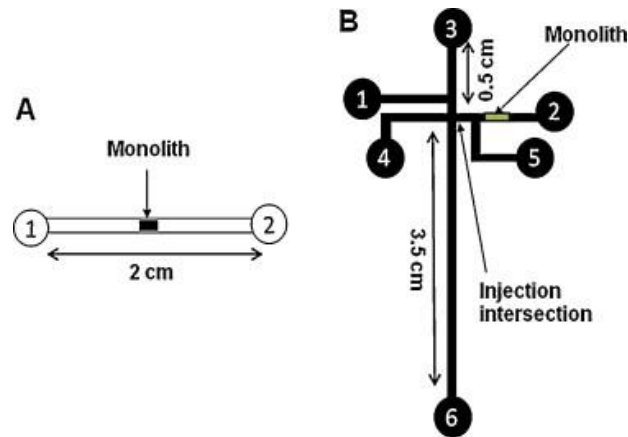


Figure 33 : Représentation schématique d'une puce intégrant une section de monolithe (Nge P.N. *et al.*, 2012).

L'apport des hydrogels pour l'enrichissement de protéines a été démontré par Chun *et al.* (2010). Pour cela, un polymère hydrophile, le poly-AMPS (2-acrylamido-2-méthyl-1-propane sulfonic acid), a été photopolymérisé au sein d'une puce en verre (Figure 34). Un facteur d'enrichissement de l'ordre de 1000 a été obtenu après 20 minutes de préconcentration en ligne pour une solution d'albumine marquée au TRIC.

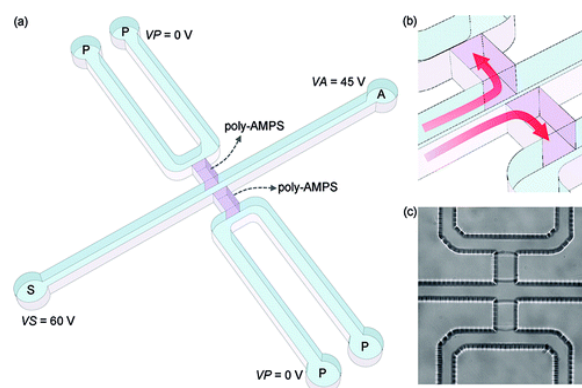


Figure 34 : Représentation schématique d'une puce incorporant une zone contenant un hydrogel pour l'enrichissement sélectif d'une protéine (Chun H. *et al.*, 2010).

2.3. Résultats

Les biomarqueurs potentiels de maladies neurodégénératives ne sont pas spécifiques à eux seuls de la MA, de la maladie de Parkinson avec démence (MPD), de la dégénérescence lobaire fronto-temporale (DLFT), ou encore de la maladie de Creutzfeld Jakob (MCJ). Les diagnostics biochimiques actuels souffrent d'un manque de spécificité et de sensibilité. Dans un but de discrimination des processus pathologiques neurodégénératifs, ces biomarqueurs potentiels pourraient être utilisés au sein d'une combinaison de biomarqueurs pour aboutir à un diagnostic différentiel et éventuellement plus précoce en augmentant la spécificité et/ou la sensibilité du test. Ces biomarqueurs potentiels ont été proposés par Otto, à partir d'études montrant leur implication dans certains processus neurodégénératifs.

Le **Tableau VI** présente différents biomarqueurs potentiels ou validés des maladies neurodégénératives. Il décrit notamment la fiabilité des tests immunochimiques existants pour le dosage des différents biomarqueurs dans le LCR et dans le sang, ainsi que la disponibilité des anticorps hors kits pour chaque biomarqueur. Une estimation du rapport prix/performance est également donnée à titre indicatif.

	Existence et fiabilité du test immunochimique pour dosage dans le LCR	Existence et fiabilité du test immunochimique pour dosage dans le sang	Disponibilité des anticorps prix /performance
GFAP	+	(+)	Non disponible
S100B	+++	+++	Non disponible
H-FABP	++	++	Non disponible
Neurofilaments light chain	++	Non disponible	Non disponible
Progranuline	+	+	Non disponible
Erk 1/2	++	Non disponible	-/+
Clusterine (ApoJ)	++	Non disponible	Non disponible
ApoE	++	Non disponible	Non disponible

Ubiquitine	Non disponible	Non disponible	-/-
pErk 1/2	(+)	Non disponible	-/-
pTDP43	Non disponible	Non disponible	-/-
pErk	(+)	Non disponible	-/-
α-synucléine	(+)	(+)	Non disponible
FUS	Non disponible	Non disponible	-/-
Optineurine	Non disponible	Non disponible	-/-
T-tau	+++	(+)	-/+
Aβ 1-42	+++	(+)	-/+
Aβ 1-40	+++	(+)	-/+
Aβ 1-38	+++	Non disponible	-/+

Tableau VI : Liste de biomarqueurs des maladies neurodégénératives et renseignements sur la disponibilité et la fiabilité des tests immunochimiques pour leur dosage dans le LCR et dans le sang ainsi que sur le prix et les performances des anticorps disponibles. + : les performances des anticorps sont bonnes et leur prix est accessible. - : les performances des anticorps sont mauvaises et leur prix est excessif. Echelle de fiabilité des tests : +++ > ++ > + > (+).

La GFAP et la S100B sont des marqueurs astrogliaux. Une augmentation de la concentration de ces deux protéines a été constatée chez les patients atteints de troubles neurodégénératifs et non

chez des patients sains. De plus, une différence significative de cette augmentation a été observée entre des patients atteints de la MA et ceux atteints de MCJ. Ceci peut s'expliquer par des implications différentes dans les deux processus physiopathologiques. De ce fait, ces deux protéines pourraient être utilisées pour être combinées avec d'autres biomarqueurs combinés afin d'améliorer la discrimination entre ces deux pathologies (Jesse S. *et al.*, 2009). Ainsi, en combinant la concentration de la GFAP et de la S100B aux taux des marqueurs validés tau et Aβ 1-42 pour discriminer des patients atteints de la MA et des patients sains, la sensibilité du test diagnostique est passée de 91,4% à 97,1%. La spécificité du test n'a en revanche pas été modifiée. Cela justifie le

choix de ces deux protéines en tant que biomarqueurs additionnels afin d'aider à la discrimination de la MA (Andreasen N. *et al.*, 2001).

Pour la H-FABP, des concentrations élevées dans le sang ont été décrites dans tous les cas de démence (Steinacker P. *et al.*, 2005). De plus, une étude a montré que les concentrations dans le LCR et dans le sang de cette protéine étaient supérieures dans le cas de patients atteints de la MA et de la MCJ par rapport à des patients non déments. Dans le LCR, les concentrations de H-FABP sont même significativement supérieures chez les patients avec MCJ que chez les patients avec la MA (Steinacker P. *et al.* 2004). Une étude récente a démontré que les concentrations de la H-FABP dans le LCR augmente avec la progression de la MA. De plus, les variations de concentration de la H-FABP semblent débiter très tôt dans le processus de cette maladie (Harari O. *et al.*, 2014).

L'ubiquitine est une protéine de grand intérêt pour la compréhension des mécanismes biochimiques impliquant les protéines, parce que son rôle est primordial dans le processus de dégradation des protéines et qu'on la retrouve au sein de toutes les cellules de l'organisme. Le choix de l'ubiquitine comme cible privilégiée pour un diagnostic basé sur son dosage dans le LCR a été justifié par son implication dans de nombreux processus neurodégénératifs. En effet, des taux élevés chez les patients atteints de la MA et de MCJ ont été observés. De plus, aucune méthode fiable n'existe pour la quantification de ce composé. En effet, les anticorps anti-ubiquitine disponibles sont chers et ne sont pas spécifiques de l'ubiquitine libre, ce qui nuit à la fiabilité des tests utilisés à l'heure actuelle en laboratoire. Les résultats portant sur les concentrations d'ubiquitine dans le LCR sont ainsi très variables d'un laboratoire à un autre, selon les tests immunochimiques utilisés (Abdi F. *et al.* 2006). Ceci s'explique entre autre par le manque de spécificité des anticorps vis-à-vis de l'ubiquitine libre et par l'existence de formes polymériques d'ubiquitine ou de complexes ubiquitine-protéine divers.

2.3.1. Structure et propriétés des protéines étudiées

La stratégie de dérivation et le choix du fluorophore ont été soigneusement réfléchis en fonction des caractéristiques des protéines et en privilégiant une réaction de marquage, soit par les groupements thiols, soit par les amines primaires pour lesquels il existe des marqueurs fluorescents de grande performance en matière de réactivité, de spécificité et d'intensité de fluorescence. Pour cela, les séquences peptidiques de la GFAP, de la S100B, de la H-FABP et de

l'ubiquitine ont été dans un premier temps étudiées en fonction des sites disponibles pour ces deux types de marquages, à savoir les lysines et les cystéines. Les caractéristiques de ces protéines liées à leur taille, leur nombre d'acides aminés, et leur point isoélectrique ont également été étudiées (**Tableau VII**).

	Ubiquitine	GFAP	S100B	H-FABP
Masse moléculaire (Da)	8565	49880	10713	14858
Nombre d'acides aminés	76	432	92	133
Point isoélectrique	6,56	5,42	4,57	6,29
Nombre de lysines	7	21	8	14
Nombre de cystéines	0	1	2	1
Isoformes	0	3 à 8	Non décrit	Non décrit
Hétérogénéité liée aux modifications post-traductionnelles	-	5 sites de citrullination, 5 sites de phosphorylation	Acétylation sur Ser 2	Phosphorylation sur Tyr 20, Acétylation sur Val 2

Tableau VII : Propriétés de différents biomarqueurs potentiels de discrimination de la MA.

Dans le cas de l'ubiquitine, la stratégie de marquage par les groupements amines a été la seule envisageable de par l'absence de cystéines dans sa séquence peptidique. Le choix s'est alors porté sur l'utilisation de l'agent fluorescent Fluorobes 488 NHS-ester car de précédents travaux réalisés au laboratoire sur la dérivation de peptides amyloïdes ont démontré l'intérêt de ce marqueur comparé au FITC et à l'Alexa Fluor 488. (Verpillot R. *et al.*, 2011). Le Fluorobes 488 NHS-ester a un coefficient d'extinction molaire, un rendement quantique et une photostabilité supérieurs.

Concernant les protéines GFAP, S100B et H-FABP, le grand nombre de lysines disponibles au sein de leur séquence peptidique (respectivement 21, 8 et 14) nous a orientés vers le marquage des groupements thiols des cystéines pour contourner la problématique du multimarquage. La position spatiale des cystéines au sein des structures tridimensionnelles a été étudiée afin de prédire leur disponibilité pour une réaction avec l'agent fluorescent. Dans cette optique, une simulation des structures tertiaires des quatre protéines a été réalisée à l'aide du logiciel en ligne Phyre 2 développé par le service de bioinformatique de l'Impérial College of London (Kelley L.A. *et al.*, 2009). Les résultats sont présentés sur la **Figure 35**.

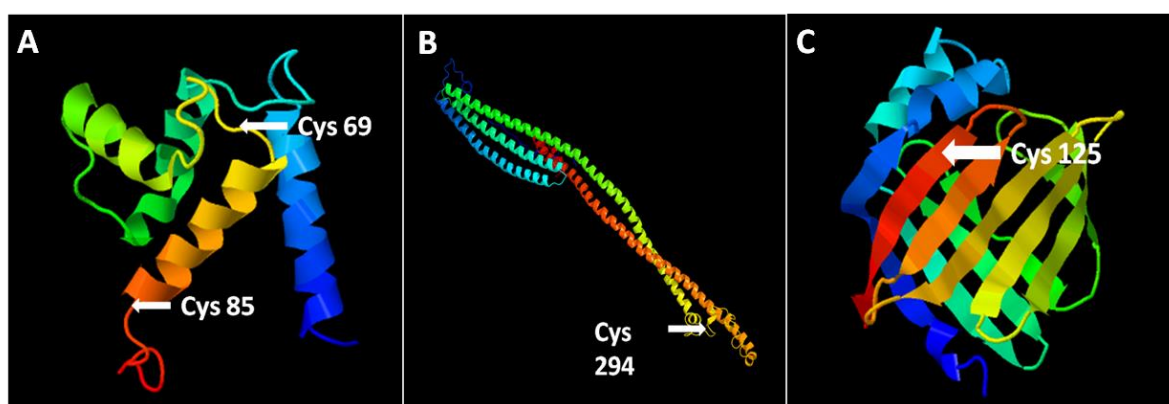


Figure 35 : Modélisation 3D de la structure tertiaire de la séquence peptidique des protéines S100B (A), GFAP (B) et H-FABP (C).

La GFAP, la plus grande des protéines étudiées (432 acides aminés), possède la conformation la moins compacte. De ce fait, la cystéine en position 294 semble accessible pour un marquage. La S100B possède deux cystéines en position 69 et 85 qui ne génèrent en théorie aucun pont disulfure intramoléculaire, leur position au niveau d'une même hélice alpha de la protéine les empêchant d'être suffisamment proches dans l'espace. En revanche, des ponts disulfures ont été mis en évidence au sein de dimères de S100B (Winningham-Major F. *et al.*, 1989). De plus, la région entre les acides aminés 62 et 73, incluant l'une des cystéines, est l'une des deux zones de haute affinité pour les ions Ca^{2+} et Zn^{2+} , ce qui suppose l'absence de pont disulfure intra-chaine à ce niveau (Fritz G. *et al.*, 2011). En outre, la conformation 3D prédite suggère une bonne disponibilité de la cystéine en position 85. La structure tridimensionnelle de la H-FABP est plus complexe car, contrairement à la GFAP et à la S100B, elle inclut des feuillets beta en plus des hélices alpha. La seule cystéine 125 est positionnée au sein d'un feuillet beta et il n'est donc pas possible de prédire son orientation dans l'espace et donc sa disponibilité vis-à-vis d'un marquage fluorescent.

2.3.2. Dérivation off-line des protéines par les groupements sulfhydriles

2.3.2.1. Choix des fluorophores

Afin de marquer la GFAP, la S100B et la H-FABP, différents fluorophores réactifs envers les fonctions thiols ont été sélectionnés. Ces fluorophores appelés 5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluorésceine (5-DTAF), 5-iodoacétamidofluorésceine (5-IAF), MTS-carboxyrhodamine 110 (CR110-MTS) et maléimide-C5-fluorésceine (MF-C5), sont tous hautement réactifs vis-à-vis des cystéines et présentent des caractéristiques de fluorescence intéressantes : haute intensité, haut coefficient d'extinction d'environ $80\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, haute photostabilité... La **Figure 36** montre les structures moléculaires de ces quatre fluorophores.

La performance des quatre agents fluorescents pour le marquage de la GFAP, de la S100B et de la H-FABP ont été évalués lors d'essais préliminaires de marquage off-line. Le paramètre principal influençant l'efficacité de la réaction est le pH de la solution d'incubation. Un rendement maximal de dérivation des groupements thiols est attendu entre pH 7,0 et pH 7,5. Nous avons donc fixé le pH de toutes les réactions testées à 7,5. Sachant que le 5-DATF est très réactif vis-à-vis des groupements thiols mais aussi dans une moindre mesure envers les amines et les groupements alcools à des pH supérieurs à 9,0, l'utilisation d'un pH neutre est d'autant plus justifiée. Cependant, même dans ces conditions, la complexité des profils obtenus en EC-LIF après dérivation de 20 mM des différentes protéines nous a rapidement incité à mettre ce réactif de côté et à nous concentrer sur les autres agents fluorescents.

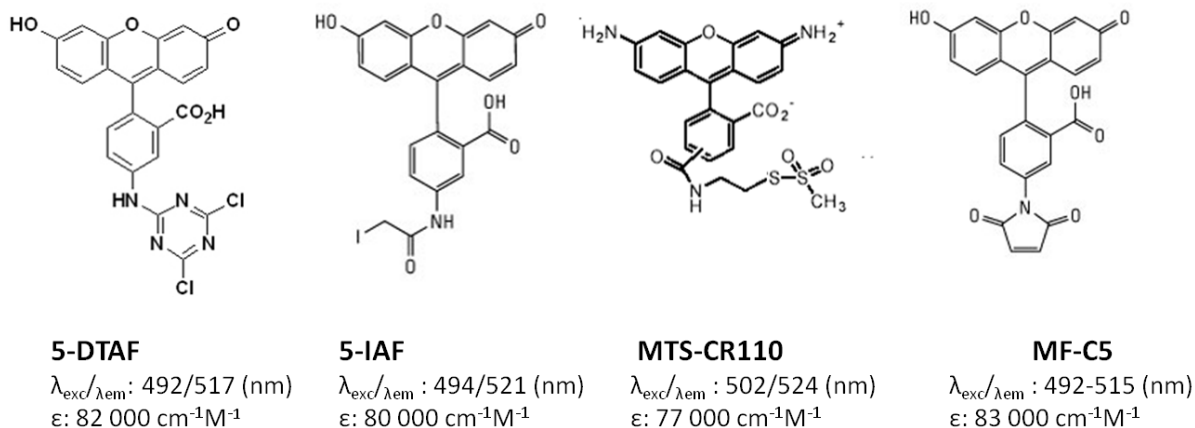


Figure 36 : Structure moléculaire des différents agents fluorescents réactifs aux thiols utilisés ainsi que les longueurs d'onde d'émission et d'excitation maximales et les coefficients d'extinction molaire correspondants.

2.3.2.2. Essais préliminaires de dérivation off-line

2.3.2.2.1. La S100B

Pour la dérivation de la S100B, nous avons testé trois fluorophores, le MF-C5, le 5-IAF et le MTS-CR110. Le seul paramètre fixé dans les trois cas a été la composition et le pH de la solution d'incubation de la protéine avec l'agent fluorescent. Il s'agit d'une solution tampon HEPES à pH 7,5 avec une force ionique de 25 mM. En effet, un milieu à pH neutre favorise ce type de marquage. Pour le marquage à l'aide du MF-C5, le temps d'incubation a tout d'abord été fixé à 2 heures comme indiqué sur la fiche commerciale. Le pH du tampon de séparation utilisé pour analyser par EC-LIF les produits de la réaction a été optimisé. Nous avons pour cela testé différents pH (7,6, 8,5, 9,2 et 10,0) avec une force ionique fixe de 33 mM.

La **Figure 37** illustre le profil électrophorétique obtenu après le marquage de la S100B à pH 7,5 dans un tampon HEPES et l'analyse par ECZ à pH 8,5 (tampon Tris-HCl) ou à pH 9,2 (tampon borate de sodium). Nous avons constaté que la multitude d'espèces correspondant à l'agent fluorescent ne permet pas d'identifier les pics correspondant à la protéine marquée. De plus, une séparation suffisamment résolutive est nécessaire pour permettre une quantification de la protéine.

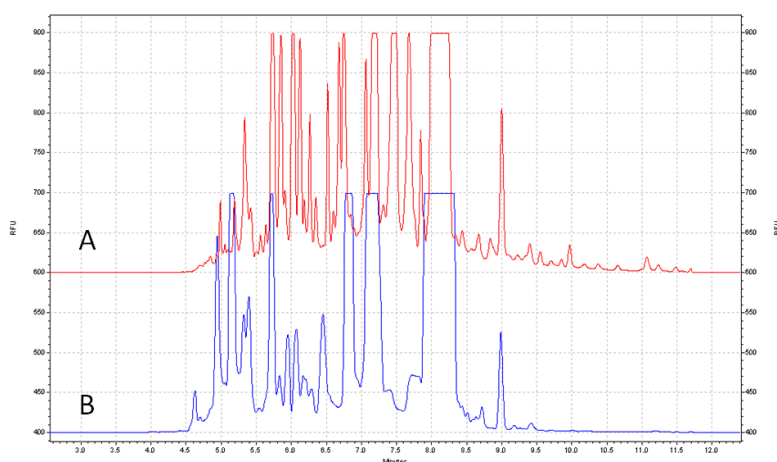


Figure 37 : Profils électrophorétiques obtenus par ECZ d'un échantillon de S100B (3,5 μ M) marqué avec le MF-C5 (2 heures d'incubation). Conditions de séparation : Capillaire de silice fondue vierge, diamètre interne 50 μ m, longueur effective 43 cm. BGE : (A) Tris-HCl, pH 8,5, 33 mM ; (B) borate de sodium, pH 9,2, 33 mM, 20 kV, S100B à 3,5 μ M dans un tampon HEPES, pH 7,5, 25 mM. Détection LIF (laser Argon) : λ_{exc} 488 nm et λ_{em} 521 nm.

La Figure 38 présente le profil électrophorétique obtenu après le marquage de la S100B dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment mais la séparation en ECZ est réalisée à l'aide d'un tampon HEPES à pH 7,6 et de force ionique 33 mM.

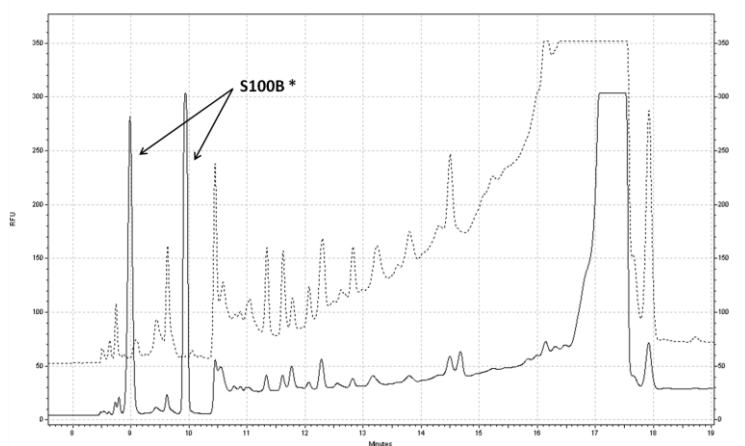


Figure 38 : Profils électrophorétiques obtenus par ECZ d'un échantillon de S100 B (3,5 μ M) marqué avec le MF-C5 (trait plein) et d'une solution contrôle de dérivation (pointillés). Conditions de séparation : Capillaire de silice fondue vierge, diamètre interne 50 μ m, longueur effective 43 cm. BGE : tampon HEPES, pH 7,6, 33 mM, 20 kV, S100B à 3,5 μ M dans un tampon HEPES, pH 7,5, 25 mM. Détection LIF (laser Argon) : λ_{exc} 488 nm et λ_{em} 521 nm.

Contrairement aux analyses effectuées à pH plus basique, la résolution est meilleure. En comparant avec le blanc de dérivation, on remarque l'apparition de deux pics majeurs, migrant à 9,8 minutes et à 10,7 minutes, correspondants à deux ou plusieurs dérivés de la S100B. Malgré la complexité du profil obtenu, une résolution suffisante est obtenue pour ces deux pics, permettant d'envisager un dosage de la protéine. La protéine S100B contient deux cystéines et la réaction de marquage peut donc en théorie générer trois espèces monomériques marquées. De ce fait, les

deux pics majoritaires peuvent correspondre à deux formes monomarquées ayant la même vitesse apparente et à une forme dimarquée.

Le principal inconvénient de ce marquage est le temps d'incubation : plusieurs heures sont nécessaires pour marquer la S100B. De ce fait, ces conditions de marquage se sont révélées incompatibles avec une intégration de cette étape de marquage dans un microsystème. Pour confirmer ce point, une réduction du temps d'incubation a été testée. La **Figure 39** représente une comparaison des profils obtenus après 2 heures et 15 minutes d'incubation.

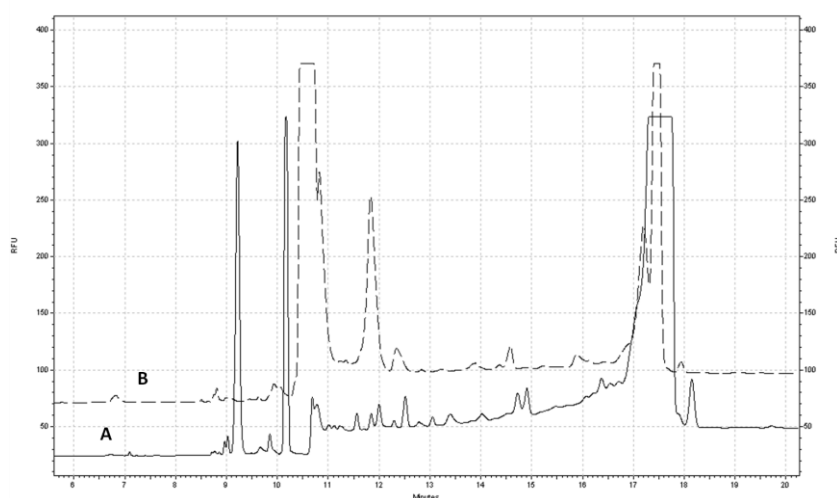


Figure 39 : Profils électrophorétiques obtenus par ECZ d'un échantillon de S100B (3,5 μ M) marqué avec le MF-C5 après 2 h d'incubation (A) et 15 min d'incubation (B). Conditions de séparation identiques à la Figure 38.

On remarque clairement que pour une incubation de 15 minutes, le rendement de la réaction n'est pas suffisant et les pics correspondant aux différentes formes de S100B marquées ne sont pas vraiment visibles. Malgré des conditions de séparation offrant une résolution suffisante pour une analyse de la S100B marquée par le MF-C5, le long temps d'incubation nécessaire à l'obtention d'un rendement de réaction suffisant pour une analyse sensible de la protéine n'est pas compatible avec un marquage en ligne au sein d'un microsystème. Cependant, du fait des grandes intensités de fluorescence obtenues avec ce composé pour une concentration relativement basse de 3,5 μ M de S100B et du fait que les résolutions obtenues sont satisfaisantes, une méthode sensible de quantification de la S100B est envisageable.

Le marquage de la S100B par le MTS-CR110 a également été testé. Ce marqueur est plus réactif que le MF-C5 et ne nécessite que 15 minutes d'incubation. Après une incubation de 15 minutes dans un tampon HEPES à pH 7,5 et force ionique 25 mM, l'échantillon est analysé en ECZ avec le tampon de séparation HEPES à pH 7,6 et force ionique 33 mM, qui a permis l'obtention des meilleurs résultats d'analyse pour l'échantillon de la S100B marqué par le MF-C5. La **Figure 40** présente le profil électrophorétique du marquage précapillaire de la S100B avec le MTS-CR110.

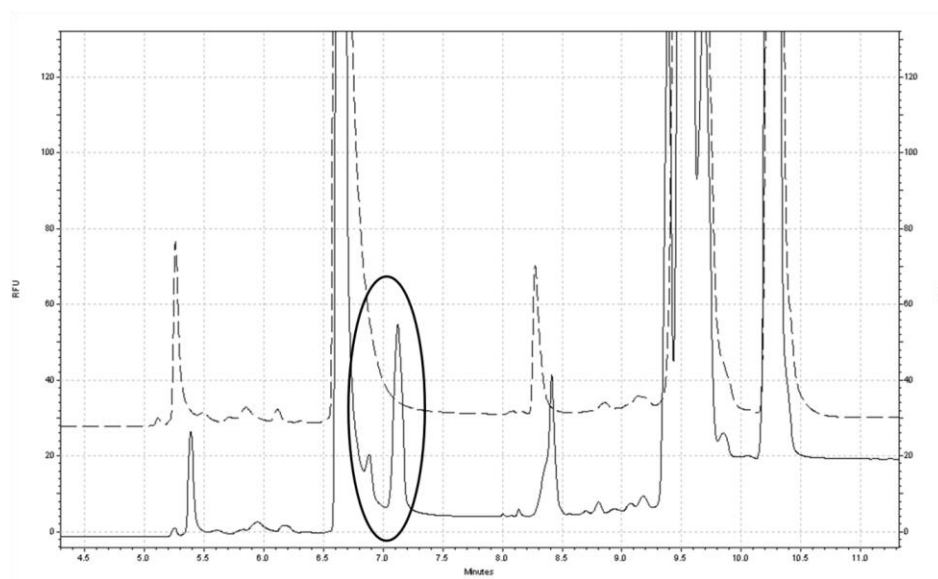


Figure 40 : Profils électrophorétiques obtenus par ECZ d'un échantillon de S100B (3,5µM) marqué avec le MTS-CR100 (trait plein) et d'une solution contrôle de dérivation (pointillés). Conditions de séparation identiques à la Figure 38.

Tout comme le profil obtenu précédemment avec le MF-C5, on observe sur le profil de la solution de protéines marquées (trait plein) l'apparition de deux pics, dont l'un est plus intense que l'autre et entièrement résolu. Il est intéressant de constater que le pic montrant la plus grande intensité, migrant à 11,15 minutes, est anormalement large. Il semble en effet qu'il s'agisse d'une comigration de plusieurs espèces proches marquées par le MTS-CR110. Le MTS-CR110 permet d'obtenir un profil peu contaminé par les interférences de la réaction comparé au MF-C5. Cependant, contrairement aux autres agents fluorescents utilisés, le maximum d'excitation et d'émission est de 502/524 pour le MTS-CR100, ce qui explique les plus faibles intensités de fluorescence obtenues, le laser utilisé ici excitant à 488 nm. Cette stratégie de marquage n'a pas été utilisée par la suite malgré le faible bruit de fond obtenu et une résolution suffisante car les intensités obtenues avec ce marqueur se sont avérées être six fois inférieures à celles obtenues avec le MF-C5 pour le marquage.

2.3.2.2.2. La H-FABP

Les tests menés sur la dérivation de la H-FABP n'ont pas été concluants. En effet, aucun des réactifs cités n'a permis de mettre en évidence l'apparition d'un pic correspondant à une forme marquée de la protéine en comparaison avec le blanc de dérivation. Ces résultats indiquent que, comme supposé à partir de la modélisation 3D de la protéine, la cystéine en position 125 est probablement orientée vers le cœur de la structure tertiaire et donc inaccessible pour une réaction de marquage. Des solutions à cette problématique existent mais n'ont pas été explorées. Une dénaturation douce de la protéine afin d'obtenir une structure plus ouverte pourrait par exemple constituer un moyen d'accéder à la cystéine. L'utilisation d'autres réactifs, spécifiques à d'autres fonctions potentiellement moins encombrées stériquement est également à envisager dans l'optique d'un marquage fluorescent de cette protéine.

2.3.2.2.3. La GFAP

Pour le marquage de la GFAP, le premier réactif utilisé a été le 5-IAF, un dérivé de la fluorescéine, de la famille des haloalkyles. Cependant, certaines études ont démontré que les iodoacétamides peuvent également réagir avec les méthionines (Lang S. *et al.* 2005), les histidines ou les tyrosines lorsque les cystéines sont bloquées, inaccessibles ou absentes (Jullien M. *et al.*, 1981). Pour contourner ce manque de spécificité, un pH inférieur à 8 a été choisi, afin que les amines primaires soient protonées et donc non réactives envers le 5-IAF. Le profil ECZ obtenu pour la dérivation de la GFAP avec le 5-IAF est présenté sur la **Figure 41**. Comme avec le MF-C5, le nombre de pics correspondant à l'agent fluorescent et à ses produits secondaires ou d'hydrolyse est très important.

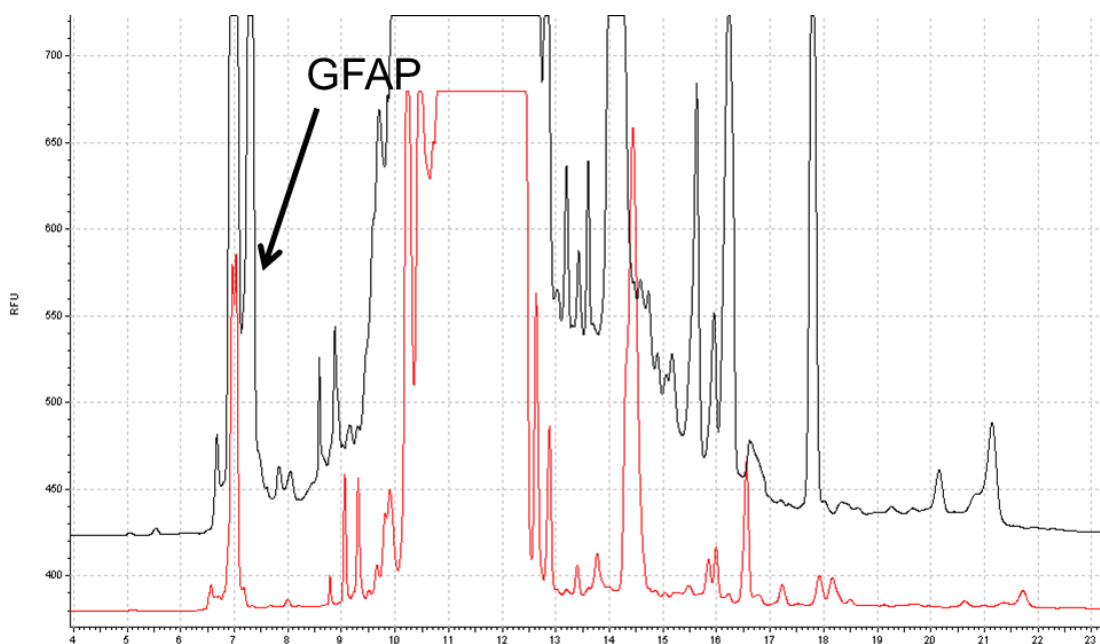


Figure 41 : Profils électrophorétiques obtenus par ECZ d'un échantillon de GFAP (1,5 μ M) marqué avec le 5-IAF et d'une solution contrôle de dérivation. Conditions de séparation : Capillaire de silice vierge fondue, diamètre interne 50 μ m, longueur effective 43 cm. BGE : tampon borate de sodium, pH 9,4, 33 mM, 20 kV, GFAP à 1,5 μ M dans un tampon HEPES, pH 7,5, 25 mM, incubation 15 minutes. Détection LIF (laser Argon) : λ_{exc} 488 nm et λ_{em} 521 nm.

Dans ces conditions, en comparant le profil de l'analyse du blanc de dérivation et le profil correspondant à l'analyse de la GFAP dérivée par le 5-IAF, on observe l'apparition d'un pic majoritaire potentiellement issu de la migration de la GFAP marquée. Malheureusement, même si le pic que l'on pourrait attribuer à la GFAP marquée est très intense pour la concentration de la protéine en solution (1,5 μ M), le manque de résolution et la multitude de pics présents dans la région d'intérêt empêchent son exploitation. Ces résultats nous ont conduit à optimiser la composition et le pH du tampon de séparation mais aucun résultat concluant n'a été obtenu.

A l'image des résultats obtenus avec les différents agents fluorescents, on remarque que les hauts rendements de réaction et les intensités de fluorescence améliorées offertes par ces fluorophores s'accompagnent pratiquement toujours d'une résolution insuffisante lors de l'ECZ et de profils électrophorétiques très complexes. En effet, sans instrumentation supplémentaire capable d'identifier la nature des pics obtenus en ECZ, par spectrométrie de masse par exemple, une erreur d'identification n'est pas à écarter.

2.3.3. Dérivation et analyse de l'ubiquitine

2.3.3.1. Introduction

L'ubiquitine est une protéine ayant montré une implication dans de nombreux processus physiopathologiques liés aux maladies neurodégénératives. En particulier, des concentrations élevées d'ubiquitine dans le LCR ont été mesurées chez les patients atteints de la MA par rapport aux patients sains contrôles (Blennow K. *et al.*, 1994 ; Davidsson P. *et al.*, 2002 ; Iqbal K. *et al.*, 1997). Cette élévation a de plus été observée chez des patients atteints de TCL qui ont évolué par la suite vers la MA contrairement à ceux présentant une TCL constante (Simonsen A.H. *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été démontré que les différences de concentration de l'ubiquitine dans le LCR de patients atteints de la MA et de ceux atteints de MCJ étaient significativement différentes et permettaient une discrimination des deux pathologies (Steinacker P. *et al.*, 2010).

Une stratégie de marquage en ligne compatible avec l'analyse de l'ubiquitine en microsystème a donc été imaginée. Pour ce faire, la méthode a été développée en EC pour permettre une transposition plus aisée dans l'avenir. Un marquage des groupements amines a été choisi car l'ubiquitine ne présente pas de cystéines. De par sa relative petite taille par rapport aux autres protéines de l'étude, elle comporte uniquement sept lysines, ce qui permet d'obtenir un nombre raisonnable d'espèces marquées à l'issue de la réaction. Nous avons opté pour un marquage par le Fluoprobes 488 NHS au regard de ses propriétés élevées de fluorescence.

Dans un premier temps, l'ubiquitine seule a été analysée en EC-UV afin de nous assurer de la qualité et de la pureté de notre échantillon d'ubiquitine humaine. Des estimations de la symétrie des pics et de la répétabilité des aires de pics nous ont permis d'évaluer la tendance de l'ubiquitine à s'adsorber sur les parois de silice vierge. Des essais préliminaires de marquage précapillaire nous ont permis, par l'analyse de spectres MALDI-TOF, de confirmer le nombre d'espèces formées à l'issue de la réaction. Des analyses en ECZ-LIF ont également confirmés la présence de pics correspondant à ces espèces. Nous avons par la suite optimisé les paramètres du marquage en ligne, comme le pH et la composition du tampon de séparation, les volumes injectés d'échantillon et de marqueur fluorescent, le milieu de dilution de l'échantillon, la tension appliquée et la température, afin de garantir le meilleur rendement de la réaction intra-capillaire. Enfin, une optimisation du traitement de l'échantillon a permis d'analyser l'ubiquitine dans le LCR.

2.3.3.2. Etudes préliminaires

2.3.3.2.1. Séparation de l'ubiquitine en EC-UV

L'analyse de l'ubiquitine humaine a tout d'abord été réalisée en ECZ-UV afin de vérifier la qualité et la pureté de l'échantillon, la stabilité de la protéine à des pH basiques mais aussi les possibles interactions de la protéine avec les parois de silice vierge. Pour cela, plusieurs tampons de séparation à différents pH basiques compatibles avec un marquage fluorescent de la biomolécule avec le Fluoprobes 488 NHS ont été employés pour la séparation.

Les profils sur la **Figure 42** représentent le pic correspondant à l'ubiquitine à des pH basiques. Quel que soit le pH du tampon de séparation, nous observons un pic dominant correspondant à la forme libre de l'ubiquitine humaine assurant la pureté de l'échantillon et la stabilité de la protéine.

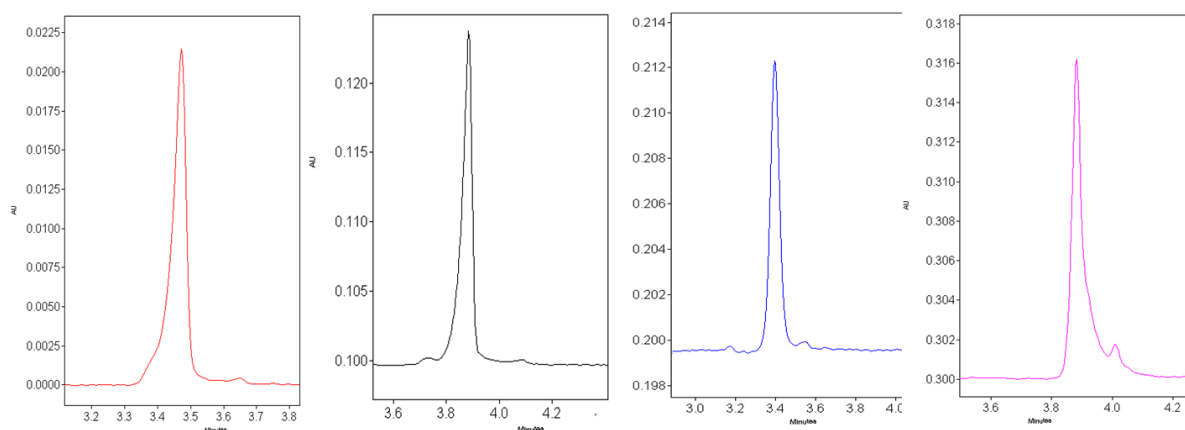


Figure 42 : Profils électrophorétiques de la séparation de l'ubiquitine dans différentes conditions de pH basiques : 8,3 (en rouge), 8,7 (en noir), 9,5 (en bleu) et 10,5 (en rose). BGE : tampon borate, 40 mM. Conditions de séparation : Capillaire de silice vierge, longueur effective 40 cm, diamètre interne 50 μ m, 20 kV. Détection EC-UV 190 nm.

Le **Tableau VIII** résume les valeurs d'asymétrie obtenues pour les différents pH testés. Les conditions d'analyse à pH 9,5 et force ionique 40 mM confèrent le meilleur facteur de symétrie au niveau du pic de l'ubiquitine avec une valeur de 1,03. Une répétabilité de l'analyse de l'ubiquitine ($n=4$) avec un tampon borate à pH 9,5 et force ionique 40mM a été effectuée et le coefficient de

variation des aires du pic a été estimé à 9%. Le processus d'adsorption à ce pH n'est donc pas négligeable et une optimisation des étapes de rinçage du capillaire a été effectuée afin d'améliorer la répétabilité. Cette optimisation est détaillée dans l'**Article 1** à la fin de ce chapitre.

pH du BGE	8,3	8,7	9,5	10,5
Facteur de symétrie	0,79	0,90	1,03	0,75

Tableau VIII : Facteur de symétrie obtenu lors de l'analyse par ECZ de l'ubiquitine pour des tampons de séparation à pH basique.

2.3.3.2.2. Dérivation Off-line et séparation en EC-LIF

L'ubiquitine comporte 8 sites de dérivation possibles ; 7 lysines et une amine en N-terminal. Tous les sites ne sont cependant pas forcément accessibles et il est difficile de prédire théoriquement le nombre d'espèces résultantes de la réaction de marquage. D'un point de vue expérimental, la spectrométrie de masse permet néanmoins d'obtenir les différentes masses des espèces composant un mélange. Ainsi, une solution d'ubiquitine marquée dans un tampon borate à pH 9,5 et force ionique 40 mM a été analysée en MALDI-TOF. La **Figure 43** montre les deux spectres obtenus et indique la masse de l'ubiquitine non dérivée ainsi que celle des espèces marquées.

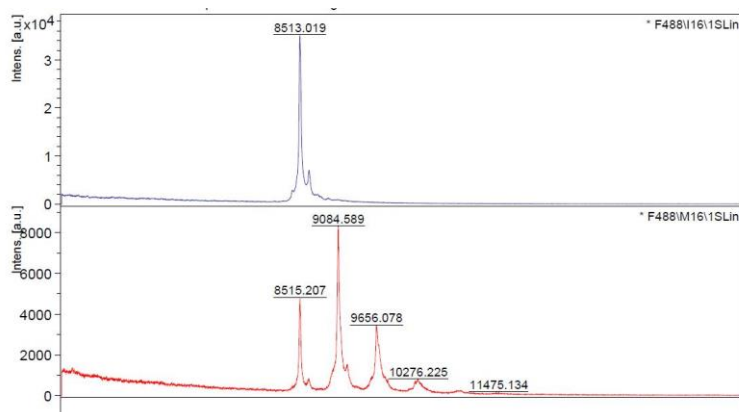


Figure 43 : Spectres MALDI de l'ubiquitine native (en bleu) et de l'ubiquitine marquée avec le FP 488 NHS dans un tampon borate à pH 9,5 (en rouge). Conditions de dérivation : 1 μ L d'une solution d'ubiquitine à 5 μ g/ μ L dans de l'eau + 2 μ L d'une solution à 10 mg/ml de FP 488 dans du DMSO + 2 μ L de tampon borate à pH 9,5, 40 mM, 5 minutes d'incubation. La solution est ensuite fortement diluée avec de l'eau pour réduire la concentration en acide borique peu compatible avec une analyse en MALDI.

La lecture de cette figure suggère que la protéine lie jusqu'à cinq composés fluorescents. Cependant, même si la technique de MALDI-TOF est difficilement quantitative, il semble bien que les deux espèces principales soient les formes mono- (9084 Da) et di-marquées (9656 Da). Le spectre démontre la présence de formes tri- (10276 Da) et penta- marquées (11475 Da) en proportion bien plus faible.

L'ubiquitine marquée dans ces conditions (tampon borate pH 9,5, 40 mM) a été ensuite analysée en ECZ-LIF avec un tampon de séparation similaire à la solution de dérivation car, lors du futur marquage intra-capillaire, la dérivation se fera au sein du tampon de séparation. La Figure 44 montre que deux séries de pics principaux apparaissent pour la solution contenant l'ubiquitine marquée par rapport au blanc de dérivation : une première série entre 7,5 et 8 minutes et une seconde entre 9,7 et 11 minutes.

L'ubiquitine à pH 9,5 est chargée négativement. Même si la structure du Fluoroprobes 488 n'est pas connue car protégée, on sait de par sa mobilité électrophorétique qu'elle est chargée négativement à ce pH. Il est difficile dans ces conditions de conclure sur le changement du ratio charge/rayon hydrodynamique lors de l'ajout d'une molécule de marqueur sur la protéine et ainsi, de comparer les mobilités des différentes espèces de l'ubiquitine dérivée. Cependant, on peut supposer que les formes monomarquées de l'ubiquitine vont migrer plus rapidement que les formes dimarquées, en se basant sur le spectre MALDI-TOF où les espèces monomarquées apparaissent comme les plus abondantes. Nous avons ainsi déduit que ces formes correspondent probablement au pic intense migrant à 7,8 minutes.

On observe par ailleurs que les pics des espèces mono- et di-marquées sont séparés par des pics de grande intensité correspondant aux différents produits de la réaction issus de l'agent fluorescent car également présents sur le profil du blanc. De par les plus grandes intensités obtenues pour les espèces monomarquées et l'absence de pics interférents dans leur zone de

migration, l'optimisation de la dérivation s'est par la suite focalisée sur ces formes monomarquées.

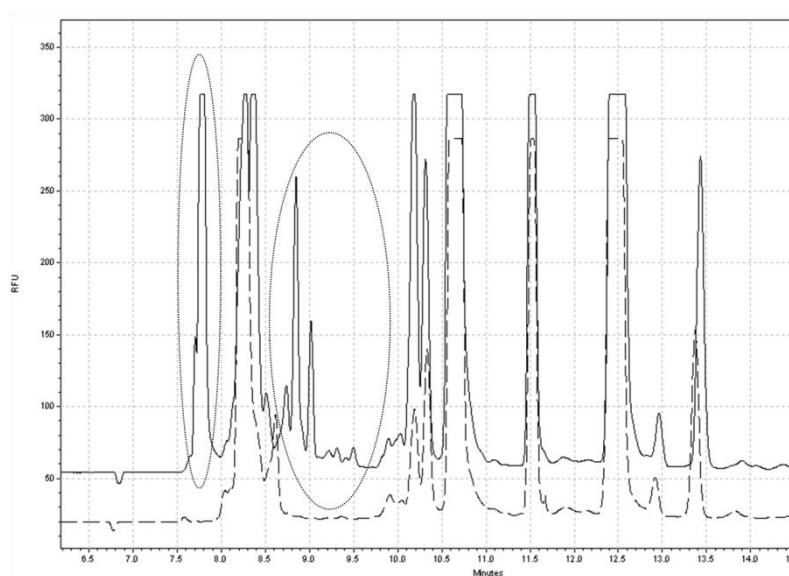


Figure 44 : Profils électrophorétiques de la séparation en ECZ-LIF d'un échantillon d'ubiquitine (15 μM) conjuguée avec le FP 488 (trait plein) et d'un blanc de dérivation (pointillés). Conditions de séparation : Capillaire de silice vierge, diamètre interne 50 μm , longueur effective 43 cm, tampon borate, pH 9,5, 40 mM, tension appliquée 20 kV. Dérivation : 98 μL d'ubiquitine à 15 μM dans un tampon borate, pH 9,5, 40 mM ajouté à 2 μL de FP 488 à 10 mg/ml, 5 minutes d'incubation. Détection LIF (laser Argon) : λ_{exc} 488 nm et λ_{em} 521 nm.

Les résultats prometteurs obtenus par la dérivation off-line de l'ubiquitine nous ont confortés dans le choix de ce réactif pour développer une méthode de dérivation en ligne. En effet, la forte réactivité du Fluoroprobes 488 et la résolution suffisante permettant la détection et la quantification de l'ubiquitine sont des critères nécessaires à une stratégie de marquage en ligne. Dans la suite une optimisation du marquage en ligne a été effectuée. Le marquage intra-capillaire a pour principaux avantages de réduire la formation des espèces interférentes de par les faibles temps de contact entre l'agent fluorescent et la solution tampon et de proposer des cinétiques de réaction accélérées. De plus, une méthode de marquage en ligne nous permettra un transfert simplifié de la méthode au sein d'un microsysteme dans une optique d'automatisation et d'intégration des étapes d'analyses.

2.3.3.2.3. Optimisation de la dérivation en ligne

Le marquage en ligne a pour principe l'introduction des composés dans l'ordre inverse de leur mobilité apparente, afin de permettre le dépassement des zones d'injection dès l'application d'un champ électrique. Cette technique basée sur la différence de mobilité de la protéine et du réactif permet une réaction quasi-instantanée pendant la phase de contact. A la fin de la réaction, le produit, ici l'ubiquitine dérivée, est séparé puis détecté au niveau de la fenêtre de détection du capillaire (**Figure 45**).

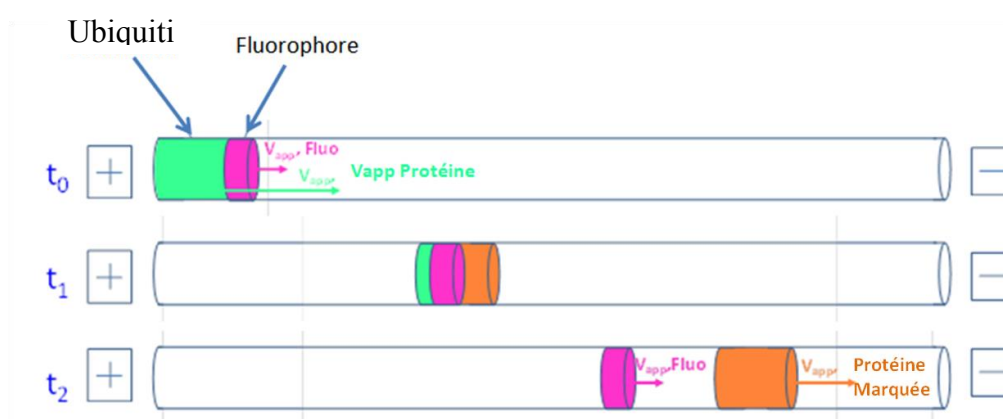


Figure 45 : Illustration des étapes d'un processus de dérivation en ligne.

Nous avons ainsi optimisé la composition et le pH du tampon de séparation, les volumes et la composition des solutions d'ubiquitine et de l'agent fluorescent, la tension appliquée lors de l'analyse et la température au sein du capillaire. L'ajustement du pH du BGE a un double impact. Il confère une charge adéquate à la protéine, et module donc sa mobilité électrophorétique, mais augmente aussi le rendement de la réaction. Le rapport entre le volume de la solution de l'agent fluorescent et de la solution contenant la protéine doit être également optimisé afin de garantir un rendement suffisant pour atteindre des sensibilités compatibles avec les concentrations de l'ubiquitine dans le LCR, tout en limitant la production d'espèces interférentes issues de la dégradation du marqueur fluorescent. Le choix de la composition de la solution d'ubiquitine peut également permettre de favoriser la réaction.

Nous nous sommes en premier lieu intéressés à l'optimisation du pH de la solution d'électrolyte, qui est un paramètre primordial de la dérivation en ligne. En effet, dans le cas d'un marquage

intra-capillaire, la réaction se déroule au sein du capillaire et l'électrolyte tient à la fois le rôle de solution d'incubation et de tampon de séparation.

La **Figure 46** représente les intensités de fluorescence obtenues pour les pics correspondant à l'ubiquitine mono-marquée. Elle confirme que les intensités sont faibles lorsque le pH du tampon de séparation est acide à neutre, c'est-à-dire compris entre 5,0 et 7,8. Les conditions optimales de marquage ont été obtenues avec un tampon borate à pH 9,5. Cependant, comparativement aux autres tampons étudiés, la force ionique de ce tampon a dû être abaissée à 40 mM afin d'obtenir une résolution suffisante entre l'ubiquitine et les pics de l'agent fluorescent. Ce tampon de séparation a donc été retenu pour la suite de l'étude.

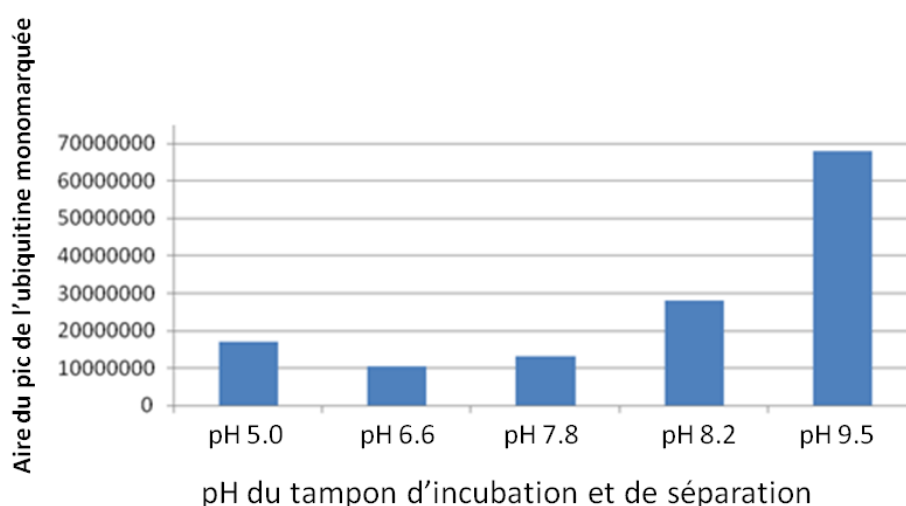


Figure 46 : Impact du pH du tampon de séparation sur l'aire des pics de l'ubiquitine monomarquée. Composition des solutions électrolytes tampons : acétate de sodium, pH 5,0, 50 mM ; phosphate de sodium, pH 6,6, 50mM ; phosphate de sodium, pH 7,8, 50mM ; borate de sodium, pH 8,2, 50mM ; borate de sodium, pH 9,5, 40mM. Injection hydrodynamique à 0,1 psi de la solution de FP 488 à 10 mg/ml dans le DMSO pendant 5 secondes, puis injection hydrodynamique à 0,5 psi de la solution d'ubiquitine à 10 μ M dans l'eau pendant 10 secondes. 20 kV. Capillaire de silice vierge, diamètre 50 μ m, longueur effective 53 cm. Détection LIF (laser Argon) : λ_{exc} 488 nm et λ_{em} 521 nm.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact du volume de la solution d'ubiquitine injecté sur le rendement de la réaction. En effet, la longueur des créneaux respectifs de l'ubiquitine et du FP 488 conditionne le temps de contact entre les deux composés et donc le rendement de la

réaction. L'injection d'un plus grand volume de la solution d'ubiquitine permet d'obtenir une limite de détection plus basse. Nous avons donc fait varier les durées d'injection de la solution d'ubiquitine de 10 à 100 secondes, à pression fixe (0,2 psi) avec un volume de solution de fluorophore fixe (5 secondes à 0,1 psi). Les aires du pic correspondant à la forme monomarquée de l'ubiquitine ont été calculées et reportées en fonction des durées d'injection (Figure 47).

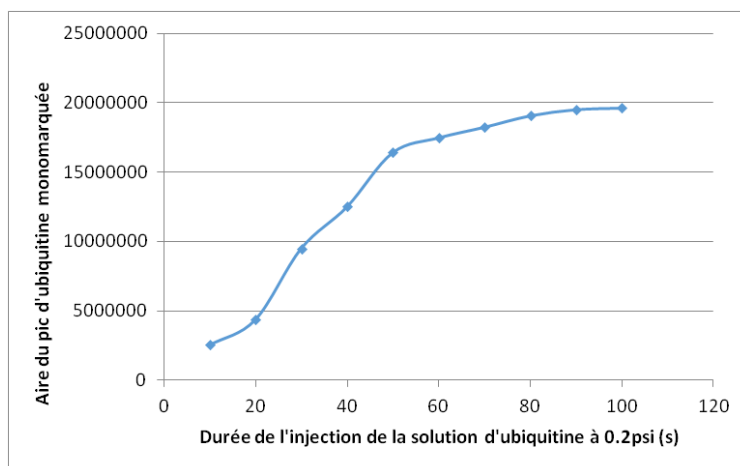


Figure 47 : Aire du pic relatif à l'ubiquitine monomarquée en fonction de la durée d'injection de la solution d'ubiquitine à 10 μ M dans l'eau pour une injection fixe de la solution de FP 488 à 10 mg/ml dans du DMSO (0,1 psi, 5 secondes). Conditions d'EC identiques à la Figure 46.

Le rendement de la réaction augmente quand la quantité d'ubiquitine augmente. Cependant, on constate la formation d'un plateau à partir de 60 secondes d'injection, limite au-delà de laquelle l'impact du volume d'ubiquitine injecté devient négligeable sur le rendement de la réaction.

Nous avons ensuite fait varier le volume injecté de la solution de marqueur fluorescent de 1 à 10 secondes à pression fixe (0,1 psi). La Figure 48 présente les aires des pics de l'ubiquitine monomarquée en fonction de la durée d'injection du FP 488.

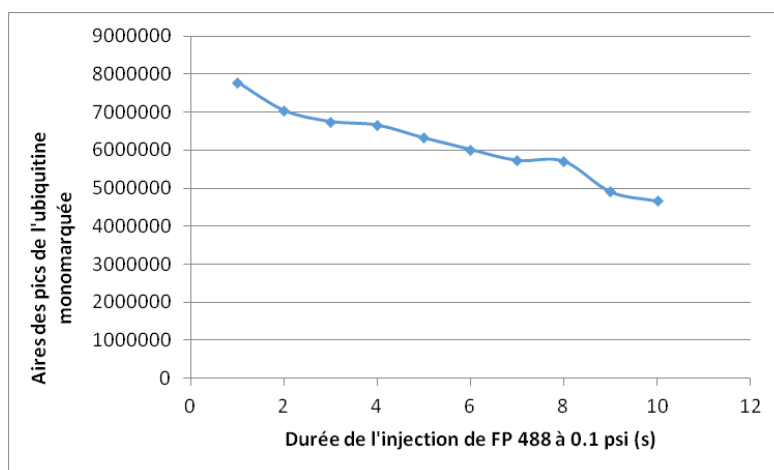


Figure 48 : Aire du pic relatif à l'ubiquitine monomérique en fonction de la durée d'injection de la solution de FP 488 à 10 mg/ml dans le DMSO pour une injection fixe de la solution d'ubiquitine (0,2 psi, 30 secondes). Conditions d'EC identiques à la Figure 46.

On remarque clairement que plus on injecte de la solution de FP 488, plus le rendement de la réaction diminue et plus l'aire du pic de l'ubiquitine monomérique diminue. Une augmentation de la quantité de FP 488 semble logiquement favoriser l'apparition des formes multimerisées. Cependant, nous voulons favoriser les formes monomériques car les pics correspondants sont bien moins perturbés par les espèces interférentes, ce qui permet une quantification simplifiée de l'ubiquitine à des plus faibles concentrations. Une injection minimale à 0,1 psi pendant 1 seconde a donc été retenue pour la suite de l'étude.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'impact du milieu de dilution de la solution de FP 488 sur le rendement de la réaction. Différents solvants organiques, ayant des propriétés de viscosité, des propriétés de polarité ou des constantes diélectriques différentes, ont été évalués en tant que milieu de dissolution du marqueur fluorescent (**Figure 49**). La dérivation en ligne a été effectuée en fixant les conditions d'injection des deux créneaux : 1 seconde à 0,1 psi pour la solution mère de FP 488 diluée par deux dans les différents solvants et 10 secondes à 0,5 psi pour la solution d'ubiquitine à 10 μ M dans l'eau.

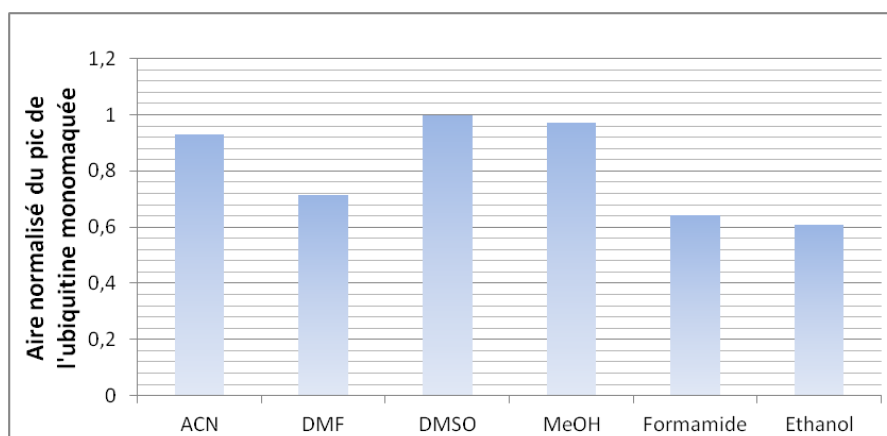


Figure 49 : Impact de la solution de dilution du FP 488 sur la réaction de marquage en ligne de l'ubiquitine. L'aire des pics correspond à la forme mono-marquée de l'ubiquitine en fonction du milieu de FP 488. Injection hydrodynamique à 0,1 psi de la solution de FP 488 à 5 mg/ml pendant 1 seconde, puis injection hydrodynamique à 0,5 psi de la solution d'ubiquitine à 10 μ M dans l'eau pendant 10 secondes. Autres conditions identiques à la Figure 46.

Dans cette étude, le volume injecté a été calculé grâce à la loi de Poiseuille pour prendre en compte la différence de viscosité des différents solvants. A des fins de comparaison, les aires obtenues ont été normalisées en fonction du volume injecté avec l'aire du pic correspondant à la dilution du FP 488 dans le DMSO comme référence. On remarque donc que le DMSO est le milieu permettant d'obtenir les meilleurs rendements de réaction. Aucune relation n'a pu être dégagée entre les rendements obtenus et les propriétés spécifiques de chaque solvant. On peut supposer que les vitesses électrophorétiques locales générées par le DMSO ainsi que ses propriétés en tant que solvant polaire et aprotique sont des éléments favorisant la réaction. De plus, selon le fabricant, la stabilité du fluorophore dans le DMSO est optimale. Ces résultats confirment le choix du DMSO comme milieu de dilution du FP 488 pour la suite des optimisations.

Le rôle de la température a également été évalué de par l'influence générale des températures sur la réactivité chimique mais aussi sur la viscosité des milieux et donc sur les mobilités électrophorétique et électroosmotique. Nous avons ainsi fait varier la température du capillaire de 20°C à 35°C. Malheureusement, une légère amélioration de la sensibilité s'est accompagnée d'une baisse importante de la résolution et ce, au détriment de l'intégration précise de l'aire du pic de l'ubiquitine dérivée. De ce fait, c'est une température de 25°C qui a été retenue.

Enfin, une optimisation de la tension de séparation appliquée a été effectuée. En effet, en fonction du champ électrique appliqué, les vitesses peuvent être modifiées et la durée de contact des deux bandes de protéine et d'agent fluorescent peut varier. Une tension électrique optimale de 210 V/cm a été retenue.

2.3.3.2.4. Traitement de l'échantillon pour l'analyse dans le LCR

Dans le but d'appliquer la méthode de dosage de l'ubiquitine à l'analyse d'un fluide biologique, le LCR, l'un des aspects importants de mon travail a porté sur l'évaluation de méthodes de traitement de l'échantillon en vue de dessaler le LCR avant son analyse et son marquage. En effet, les fortes concentrations de sels présents dans ce fluide diminuent le rendement de la réaction et

dégradent fortement la résolution entre les pics d'intérêt et les interférents. Il est possible de dessaler un échantillon avec des méthodes de précipitation des protéines, de dialyse et d'ultrafiltration qui ont été comparées. La précipitation des protéines est permise par l'ajout d'une fraction de solvant organique spécifique dans le milieu, couplé à un abaissement de la température. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant retiré afin de permettre une redilution des protéines dans le milieu approprié. La précipitation des protéines peut être réalisée avec de l'éthanol, de l'acétone à froid ou de l'acétone acidifiée par l'acide chlorhydrique (HCl) et le méthanol. L'ultrafiltration permet par centrifugation de garder dans le milieu les composés ayant un poids moléculaire supérieur au seuil de rétention moléculaire de la membrane composant le filtre. Un seuil de 3kDa a été choisi pour retenir l'ubiquitine (6,5 kDa) en se débarrassant des sels et d'autres composés de faible poids moléculaire. La dialyse permet également de diminuer les concentrations en sels par un phénomène d'équilibration de la concentration des composés de part et d'autre d'une membrane perméable à des molécules de taille spécifique (ici 3,5 kDa). Les différents profils obtenus pour chacun des protocoles de dessalage ci-dessus sont présentés sur la **Figure 50**.

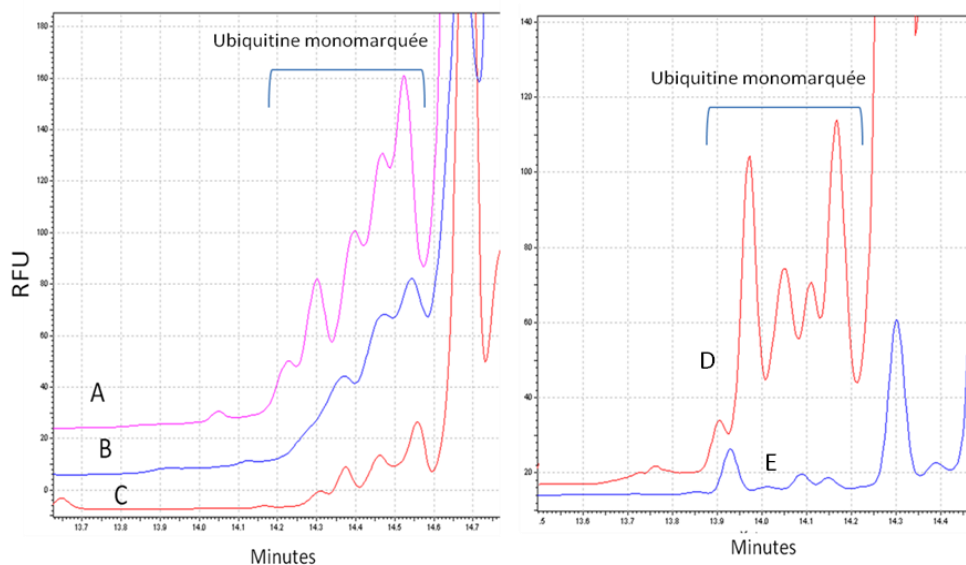


Figure 50 : Apport de différentes méthodes de dessalage du LCR synthétique pour l'analyse par marquage en ligne de l'ubiquitine présente dans l'échantillon : (A) éthanol, (B) acétone HCl/méthanol, (C) acétone à froid, (D) ultrafiltration (3kDa) et (E) dialyse (3,5 kDa). Tous les échantillons contiennent la même concentration initiale d'ubiquitine (10 μ M). Conditions d'analyse : capillaire de silice vierge, longueur effective 110 cm, diamètre interne 100 μ m, injection hydrodynamique à 0,1 psi de la solution de FP 488 à 2,5 mg/ml pendant 1 seconde, puis injection hydrodynamique à 0,1 psi de la solution d'ubiquitine à 10 μ M dans l'eau pendant 18 secondes, 24 kV. Autres conditions identiques à la Figure 46.

La comparaison de ces profils permet d'évaluer la performance des différentes techniques de dessalage de l'ubiquitine. Comme confirmé précédemment par le spectre MALDI, cinq lysines de la protéine sont accessibles au FP 488, ce qui entraîne la production de cinq espèces monomarquées, partiellement résolues dans ces conditions. On remarque que les protocoles de précipitation à éthanol, à l'acétone HCl/méthanol et à l'acétone à froid affichent des efficacités très variées. En effet, deux critères nous permettent d'évaluer leurs performances : la résolution entre les différentes espèces d'ubiquitine monomarqueée mais aussi l'intensité des pics qui reflète le pourcentage de récupération de l'ubiquitine. La procédure incluant une précipitation par l'acétone à froid permet de se débarrasser d'une quantité suffisante de sels au vu de la résolution entre les pics, mais la faible intensité des pics obtenue indique un taux de récupération insuffisant. Au contraire, la précipitation à l'aide du couple acétone acidifiée/méthanol et à l'aide de l'éthanol affiche des rendements d'extraction bien supérieurs au vu de l'intensité des pics correspondant à

l'ubiquitine. Cependant, la mauvaise résolution obtenue après l'application de ces deux protocoles laisse penser que l'élimination des sels n'a pas été totale. Une dialyse, pendant 4 heures, est certainement la méthode de dessalage la plus efficace au vue de l'excellente résolution obtenue. Cependant, l'ubiquitine a pratiquement disparu de l'échantillon après l'étape de dialyse. Le profil correspondant à un traitement du LCR artificiel par ultrafiltration sur une membrane de 3 kDa conduit finalement au meilleur compromis entre la résolution et la quantité d'ubiquitine récupérée. Ce procédé a donc été retenu lors de l'application de la méthode optimisée de marquage en ligne de l'ubiquitine dans le LCR.

2.3.3.3. Application à l'analyse de l'ubiquitine dans le LCR

2.3.3.3.1. Introduction

L'ubiquitine est une molécule d'intérêt biologique incontestable qui joue un rôle dans la plupart des mécanismes biochimiques liés au processus normal d'élimination des protéines dans l'organisme. Son implication dans de nombreuses pathologies neurodégénératives, telles la maladie de Parkinson avec démence (Mondello S. *et al.*, 2014), la maladie de Creutzfeld-Jakob (Steinacker P. *et al.*, 2010) ou la MA (Chalbot S. *et al.*, 2011), a été démontrée au travers de nombreux travaux. A l'heure actuelle, le test immunochimique disponible pour le dosage de l'ubiquitine dans le LCR utilise des anticorps de faible affinité et qui ne sont pas spécifiques de la forme libre de l'ubiquitine. Récemment, des résultats contradictoires quant aux mesures ont été rapportés dans la littérature sur les concentrations d'ubiquitine dans le LCR des différents profils de patients étudiés (Steinacker P. *et al.*, 2010). En effet, la quantification de l'ubiquitine dans le LCR par les tests immunochimiques classiques semble être un défi analytique. Lors du processus d'ubiquitination, une molécule d'ubiquitine ou une chaîne polyubiquitine se fixe à la protéine pour signaler la nécessité de son élimination. De ce fait, au sein des fluides biologiques, on retrouve aussi bien de l'ubiquitine libre, que des protéines ubiquitinylées ou des chaînes de polyubiquitine libres. Toutes ces formes contenant une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sont susceptibles d'être reconnues par les tests ELISA.

Dans ce contexte, le développement d'une approche permettant de doser exclusivement l'ubiquitine libre et non basée sur l'emploi d'anticorps a été recherché. Une telle méthode pourrait permettre de mesurer ces formes d'ubiquitine dans le LCR et conforter son utilisation en tant que biomarqueur additionnel de discrimination pour le diagnostic de la MA. Cette étude préliminaire

du marquage de l'ubiquitine, effectuée dans un premier temps en mode précapillaire puis dans un second temps en mode intra-capillaire, a permis de déterminer les conditions optimales de pH, d'injection des deux créneaux, de composition du milieu de dissolution de l'agent fluorescent, de température et de tension appliquée. Par la suite nous avons poursuivi un travail d'optimisation de la méthode de dérivation, pour la séparation et la détection de l'ubiquitine dans le LCR humain. Une étude des étapes de rinçage nécessaires à l'obtention de profils répétables a été effectuée. De plus, nous avons optimisé la concentration de l'agent fluorescent et la composition du milieu de dissolution de l'ubiquitine afin d'augmenter le rendement de la réaction et la sensibilité de la méthode. Les conditions optimales obtenues ont ensuite été transposées à l'utilisation d'un capillaire de diamètre et de longueur supérieurs permettant d'accroître la sensibilité de la méthode en injectant un plus large volume de solution contenant l'ubiquitine. La linéarité de la méthode sur une large gamme de concentration a ensuite été calculée. Puis, un protocole de prétraitement du LCR par ultrafiltration a été optimisé afin de garantir sa répétabilité. Finalement, la méthode a été appliquée avec succès à la quantification de l'ubiquitine dans un échantillon de LCR humain.

2.3.3.3.2. Article 1 : On-line capillary electrophoresis derivatization method for high sensitivity analysis of ubiquitin in filtered cerebrospinal fluid

Electrophoresis, Volume 34, Issue 18, 2013, pp 2733-2739.

On line capillary electrophoresis derivatization method for high sensitivity analysis of ubiquitin in filtered cerebrospinal fluid.

Kiarach Mesbah^{1, 2}, Farid Oukacine^{1, 2}, Stefan Lehnert³, Markus Otto³ and Myriam Taverna^{1, 2}

¹ Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives, 92296 Chatenay-Malabry, France

² CNRS UMR 8612, Institut Galien de Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

³ Department of Neurology, University of Ulm, Ulm, Germany

Correspondence: Professor Myriam Taverna, Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives, Université Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

E-mail: myriam.taverna@u-psud.fr

Fax: +33-1-46-83-54-62

List of abbreviations used:

AD, Alzheimer's disease; A β , amyloid beta peptide; NFTs, neurofibrillary tangles; CSF, cerebrospinal fluid; UBI, ubiquitin; MCJ, Creutzfeldt-Jakob disease; c-ELISA, competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FP-488, FluoProbes[®]488-NHS; μ_{ep} , effective electrophoretic mobility; μ_{app} , apparent electrophoretic mobility; HDI, Hydrodynamic injection; artificial cerebrospinal fluid (aCSF).

Keywords:

Alzheimer's disease / Capillary zone electrophoresis / Cerebrospinal Fluid / Derivatization / Ubiquitin

Total number of words including figure and table legends: 5463 words, 1 table, 4 figures

Electrophoretically mediated microanalysis was implemented for on-line fluorescence derivatization of ubiquitin, a potential biomarker of Alzheimer disease. Ubiquitin was labeled on its amino groups by the Fluoprobes® 488 N-hydroxysuccinimide. The pH of the background electrolyte, the applied electric field and the washing process of the capillary were optimized. The best derivatization yield was obtained at pH 9,5 under an electric field of $\sim 210 \text{ V cm}^{-1}$. The concentration and volume of the fluorescent dye as well as the sample medium and volume of injected ubiquitin were also optimized. In order to improve further the limit of detection of ubiquitin, electrophoretically mediated microanalysis was performed in a wider (100 μm id) and longer (110 cm) capillary. As expected, these capillary dimensions improved the analytical sensitivity of ubiquitin when compared to the 50 μm id capillary. Under the optimized conditions, this analytical methodology allowed the analysis of free ubiquitin in standard solution with a limit of detection of $\sim 15 \text{ nM}$. Finally, the on-line fluorescent derivatization of ubiquitin was applied to the detection and the quantification of ubiquitin in cerebrospinal fluid samples. Due to the high salt concentration of biological samples, desalting of cerebrospinal fluid was required prior to the CE analysis. Quantification of ubiquitin in cerebrospinal fluid either by a direct evaluation of peak areas or using the standard addition method was achieved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease and the most common cause of dementia in the elderly population [1]. It is estimated that in 2050, approximately 80 million people will suffer from AD worldwide [2]. The neuropathological hallmarks of AD are amyloid plaques, mainly composed of amyloid beta-peptide 1-42 ($\text{A}\beta 1\text{-}42$) [3] and neurofibrillary tangles (NFTs) containing hyper phosphorylated Tau [4].

Considerable efforts have been directed toward the identification of disease-specific biomarkers in the cerebrospinal fluid (CSF), blood plasma and blood cells [5, 6]. To date, only the analysis of $\text{A}\beta 1\text{-}42$, total tau and phospho-tau-181 in CSF is routinely used for the diagnosis [2]. Although these three biomarkers have been well-established and validated internationally, the assays alone are not sufficient to diagnose with certainty this disease. Moreover, neurodegeneration in AD is estimated to start 20 to 30 years before the first clinical symptoms become apparent [7, 8]. Treatment strategies might be most effective before pathological changes spread throughout the brain and an early diagnosis with reliable biomarkers is essential. Thus, there is an urgent need for additional biomarkers to improve the diagnosis power at an early stage of the neurodegenerative disease.

Among them, ubiquitin (UBI) has attracted the attention of several research groups worldwide [2, 8-10]. UBI is a small protein (8565 Da) [11] which is present in all eukaryotic cells and is one of the most highly conserved proteins known [12]. It is produced by cells as part of the cell stress response [13, 14, 15]. In AD, paired helical filaments of NFTs are ubiquitinated and increased levels of UBI have been correlated with total tangle formation in the brain [10, 16]. Elevated concentrations of free and conjugated UBI in CSF have been detected in AD cases [2, 8, 9, 17, 18]. However, the increase of UBI levels in the CSF was also reported for patients having other dementive diseases such as Creutzfeldt-Jakob disease (MCJ) [19, 20], vascular dementia [21]. Increase of UBI levels after traumatic brain injury was also reported

[22]. Conflicting results concerning the value of UBI as laboratory marker were published because it seems that UBI unspecifically refers to neurodegenerative processes. The partly conflicting results are also caused by the fact that the measurement of UBI is a real challenge [19]. The UBI levels, in the CSF, are usually measured by competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (c-ELISA) [9, 21] and radioimmunoassay [20]. However, the high homology between UBI species [19] such as multi-UBI chains and ubiquitinated proteins leads to a low specificity of antibodies against free UBI. Therefore, no relevant ELISA which can be used for routine measurement exists [19]. Depending on the assays, even baseline levels reported vary by at least by a 10 fold magnitude. For instance the concentration of UBI in CSF, in healthy patients was found around 13 ng/ml [23] while it reached 110 ng/ml for the same kind of patients in another study [24].

The development of new analytical methodologies, independent of antibodies, appears to be very important for the quantification of UBI levels in biological samples.

Capillary Electrophoresis (CE) can provide fast analysis with high efficiency and resolution for various proteins [25-27]. Among the commercial detection modes developed for CE, LIF detection is one of the most sensitive [28]. Because only proteins containing aromatic amino acids (tryptophan, tyrosine and phenylalanine) exhibit native fluorescence, labeling dyes are required to confer fluorescent properties on proteins [28-31]. The fluorescent labels are normally chemically- attached to the protein through amines or other reactive groups. However, the covalent labeling of proteins leads to the production of multiple fluorescent derivatives that may prevent quantification of proteins by CE and makes the separation more complex. In addition, the fluorophore can undergo some hydrolysis during the derivatization step, leading to many fluorescent by-products which may interfere in the CE profile.

In an attempt to reduce this analytical problem, EMMA mode was explored as a possible way to perform the fluorescence derivatization of UBI. In this approach, the capillary is not used only as a separation channel, but also as a microreactor in which reactants and products are moved into and out of contact with each other based on differences in electrophoretic mobilities [32]. This technique is well suited for very fast reaction that can be achieved in seconds [33]. Moreover, it is ideal for labile reagents that undergo rapid hydrolysis or side-product formation because reaction is fast and excess of labeling agent is electrophoretically removed from the sample due to differential mobility of analyte and reagent zones [34]. Bao and Regnier [35] were the first to introduce EMMA to perform microreactions directly within the capillary. Subsequently, the EMMA methodology has been successfully used for in-capillary derivatization reactions [33, 36-40]. Lee *et al.* reported picomolar analysis of proteins using EMMA with LIF detection [41].

In the present study, EMMA for in-capillary fluorescent derivatization of UBI was developed using a fluorophore dye. The rinsing procedure of the capillary, the pH and the composition of the background electrolyte (BGE) were optimized. In order to improve the reaction yields and the separation of UBI from interfering compounds, the separation voltage and the injected sample length of UBI were adjusted. The concentration of the fluorescent dye and UBI sample were also investigated in details. The optimized conditions were finally applied to the detection and the quantification of UBI in CSF at the physiological concentrations.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and materials

Boric acid 99% (H_3BO_3), dimethyl sulfoxide 99,9% (DMSO), sodium chloride (NaCl) and acetonitrile (ACN) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Sodium hydroxide 1 M (NaOH) was from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). FluoProbes[®]488-NHS (N-hydroxysuccinimide) was purchased from Interchim (Montluçon,

France). Ubiquitin was purchased from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). Deionized water was purified with a Direct-Q®3 Water Purification System from Millipore (Milford, USA). Stock solution of boric acid, NaOH and NaCl were prepared with purified water.

2,2 Cerebrospinal fluid sample collection

All CSF samples analyzed in this work were taken from patients attending the department of Neurology in Ulm (University of Ulm, Department of Neurology), who obtained a lumbar puncture to exclude a meningitis or bleeding. Basic CSF parameters (albumin ratio, cell count, oligoclonal band) were normal [42]. Collection and analysis of CSF samples was approved by the Ethics Committee in Ulm. CSF was aliquoted within 2 h and stored at -80°C .

2,3 Filtration of the cerebrospinal fluid

Filtration of the CSF was required to remove salts present in the sample. For this purpose, CSF and CSF spiked with UBI were filtered using Amicon ultra 0,5 centrifugal filters with a 3000 Da Molecular Mass Cutoff (Millipore SAS, Molsheim, France). Briefly, 150 μL of CSF was spiked with 2,5 μL of UBI to a final concentration of added UBI of 16 nM. 350 μL of deionized water was added to the sample then the solution was transferred into a filter cartridge and was centrifuged (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Germany) at 14000 g for 10 min. Next, 350 μL of deionized water was added to the sample. The sample was centrifuged again at 14000 g for 10 min. This process was repeated twice. The last centrifugation step was carried out during 30 min. For a maximal recovery of the CSF, the filter cartridge was placed upside down in a clean microcentrifuge tube. The reverse spin was performed immediately at 14000 g for 2 min. The ultrafiltrate was weighed and stored at 4°C . Before injection in the capillary, spiked CSF was diluted in DMSO (2/1 v/v).

2,4 CE equipment

CE experiments were carried out with a PA800 ProteomeLab instrument (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The instrument was coupled with Laser Induced Fluorescence (LIF) detection equipped with a 3,5 mW argon-ion laser. Excitation and emission wavelengths were 488 and 520 nm, respectively. Bare fused silica capillaries (50 and 100 μm inner diameter) \times 365 μm outer diameter were purchased from Phymep (Paris, France). The optimized composition of the background electrolyte (BGE) was 59,0 mM boric acid + 40,5 mM NaOH leading to a pH 9,5. BGE was renewed after every run. New fused silica capillaries were conditioned by performing the following rinsing procedure: 1 M NaOH for 20 min, 0,1 M NaOH for 15 min and water for 10 min. The washing procedure between runs was performed under negative pressure (-483 kPa) with DMSO/H₂O (1/1 v/v) during 2 min and under positive pressure (483 kPa) with 30 mM SDS (3 min), 1 M NaOH (3 min), H₂O (2 min) and BGE (5 min). The temperature of the capillary was maintained at 25°C and the samples at 15°C by the storage sample module of the PA800. Samples were injected hydrodynamically.

2,5 Determination of UBI concentration in CSF

Prior to the injection in the capillary, the desalted CSF sample was diluted 3-times in DMSO. The free UBI concentration in CSF was therefore estimated by Equation 1:

$$[UBI] = \frac{3 \times A \times V_{RE}}{\alpha \times V_{sample}} \quad (1)$$

where A is the peak area (RFU s), V_{RE} is the volume of recovery from the filter device (mL), V_{sample} is the sample volume of ultra-filtered CSF (mL), α is the slope of the calibration curve

obtained for the standard solution of UBI and 3 is the dilution factor of the CSF sample with a binary mixture of DMSO/H₂O). For example, for the CSF analyzed in this work the filtered sample volume is 150 μL and the recovered volume was 29 μL (as obtained by weighing the filtrate after the filtration step).

3. Results and discussion

3.1 Implementation of the methodology used for the on-line derivatization of ubiquitin

UBI itself contains seven lysine residues, four arginines and one N-terminal group [11]. The theoretical pI of UBI is 6,56 [11]. In preliminary experiments, off-line fluorescent derivatization of UBI was performed with three different fluorophores (FluoProbes[®]488-NHS, 5-fluorescein isothiocyanate and Alexa Fluor[®]488-NHS). FP-488-NHS was found superior in term of reaction kinetic. In addition, it was observed that the FluoProbes[®]488-NHS lead to fewer by-products comparatively to other reagents. The by-products can be detrimental to the separation and quantification of tagged-UBI (UBI)*. UBI was, therefore tagged with FluoProbes[®]488-NHS (FP-488) using EMMA (Fig. 1) and then separated from the reagent by CE. The chemical group N-hydroxysuccinimydyl (NHS) of the probe, reacts on primary (-NH₂) and secondary amines (-NH-) and to a lower extent on NH₂ located in terminal peptidic chains. In EMMA, differential transport velocities are used as a mixing technique [34]. Spatially distinct zones of chemical reagents of different electrophoretic mobility are made to interpenetrate under the influence of an applied electric field.

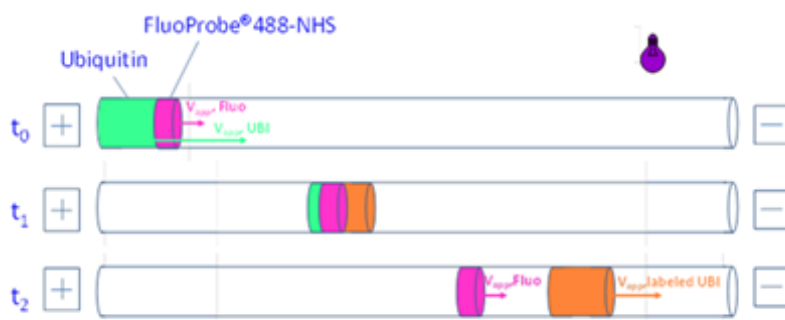


Figure 1: Schematic representation of the methodology used for online labeling of ubiquitin by capillary electrophoresis.

Due to the very low effective electrophoretic mobility of UBI ($\mu_{ep} = -6,7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 9,5), EMMA was performed in fused silica capillary. The use of coated capillary could be an option, to avoid the adsorption of UBI at the inner capillary wall but the migration time of UBI would have been extremely high. In order to implement efficient and reproducible on-line derivatization of UBI, the rinsing process of the uncoated capillary was therefore optimized. Several rinsing processes were tested by flushing the capillary either with SDS, NaOH solutions or both successively. As shown in Table 1, the rinsing procedure combining DMSO/H₂O, SDS, NaOH and BGE leads to the best repeatability of UBI* signal. RSDs less than 0,5% for migration times and 2% for peak areas were obtained under these conditions.

Fig. 1 gives a schematic outline of the methodology used in this work. UBI and FP-488 are injected from the same end of the capillary in a sequential way. The EMMA-CE analysis is performed in alkaline conditions (pH ~ 9,5) under cathodic electroosmotic flow. Because the

apparent electrophoretic mobility (μ_{app}) of UBI is higher than that of FP-488, UBI passes through the FP-488 zone; the derivatization is carried out and the product is properly detected by LIF detection.

Table 1: Effect of the rinsing procedures on the repeatability of the analysis of tagged-UBI

Washing processes	RSD (%)	
	Migration Time	Peak area
SDS (31 mM), 5 min; H ₂ O, 2 min; BGE, 5 min	13,59	20,20
NaOH (1 M), 5 min; H ₂ O, 2 min; BGE, 5 min	0,59	7,71
DMSO/H ₂ O (1/1 v/v) under -483 kPa, 2 min; SDS (31 mM), 3 min; NaOH (1 M), 5 min; H ₂ O, 2 min; BGE, 5 min	0,41	1,90

BGE: boric acid 59 mM + NaOH 40 mM (pH 9,5). The applied pressure is 483 kPa except where indicated otherwise.

3,2 Optimisation of the electrophoretically mediated microanalysis of ubiquitin

On-line labeling in CE is dependent on many parameters, among which the BGE composition, the molar ratio between the protein and the labeling agent, the injected volume of both plugs and the applied voltage. These parameters may impact not only on the labeling efficiency, but also on the number of different labeled species produced for a given protein. Indeed, UBI exhibits seven lysine and four arginine residues which are the main target for the labeling by the FP-488.

As already reported, the amount of product formed during the on-capillary reaction is directly related to the electric field applied [35]. Indeed, at high electric field, UBI is transported to the detector faster and this can result in incomplete derivatization reaction. In this work, an electric field of $\sim 210 \text{ V cm}^{-1}$ was selected as the best compromise. The derivatization and the electrophoretic separation were performed under the same electric field and did not require any pre-incubation of UBI with FP-488 in the capillary. Derivatization reaction between UBI and FP-488 is pH-sensitive and competes with hydrolysis of the fluorescent agent which is also pH-dependant. Thus, by keeping constant the ionic strength ($I \sim 40 \text{ mM}$) of the BGEs, on-column derivatization of UBI was carried out at different pH: pH 7,2 (phosphate buffer), pH 8,1 (HEPES buffer) and pH 9,5 (borate buffer). The best derivatization yield was obtained at pH 9,5. These conditions were used throughout the following study.

The molar ratio between fluorescent dye and protein is also a critical parameter for an efficient derivatization and to label as much as possible the different sites of the protein. This can be achieved only if the concentration of the probe is in excess comparatively to the protein one. The minimum molar ratio of dye to protein, for an efficient derivatization of UBI, was evaluated at $\sim 5,2$. In order to extend the range of linearity of UBI*, concentration of 2,5 mM of fluorophore was used. Higher probe concentration or injection volumes lead to a loss of resolution between UBI* and FP-488/by-products. Thus, the volume of labeling agent has also been optimized in order to avoid a resolution loss while maintaining high sensitivity for the detection of UBI*. The injected volume of FP-488 was maintained as low as possible (hydrodynamic injection (HDI) at 690 Pa during 1 s).

3,3 Effect of the sample matrix on ubiquitin derivatization efficiency

To reach sufficient sensitivity, a large volume of UBI sample must be injected; the composition of the sample medium is however expected to impact the performance of the separation and derivatization. Indeed, the sample zone conductivity can affect, in several ways, plug-plug mixing in EMMA [32] as well as stacking phenomena.

Thus, in order to improve the sensitivity, UBI was dissolved in different matrices: BGE, pure water, saline solution (NaCl) and mixture of DMSO/water. Fig. 2 compares the on-column derivatization of UBI with FP-488 obtained with these different sample media.

The peak area obtained for UBI* diluted in BGE (456 RFU s) is slightly higher to that obtained with UBI diluted in water (378 RFU s). Indeed, when UBI is diluted in H₂O, the resistivity of the sample increases compared to the resistivity of the BGE and the electric field in UBI zone is amplified. Consequently, a rapid migration of the ionic FP-488, across this zone, results in a decrease in reaction efficiency. This behavior was also reported by Stahl *et al.* [44]. They suggested that low sample conductivity can be detrimental for on-line reactions involving a neutral reactant. In our case, the electrophoretic mobility of UBI is very low and its behavior is close to that of a neutral molecule.

Because, the concentration of inorganic ions in CSF is high, EMMA was performed with sample of UBI diluted in 150 mM of NaCl. As depicted in Fig. 2(c), the signal of UBI* was improved two fold (peak area of 808 RFU s). The NaCl in the UBI zone creates a high conductivity zone with low local electric field [43]. Therefore, FP-488 slows down upon entering the UBI zone, yielding better spatial overlap and better reaction yield. However, the presence of NaCl in UBI zone leads to a deterioration of the resolution between UBI* and FP-488. It should be noted that NaCl can have a significant impact on the peak width, through destacking phenomena, for instance by local ITP-CZE mechanisms.

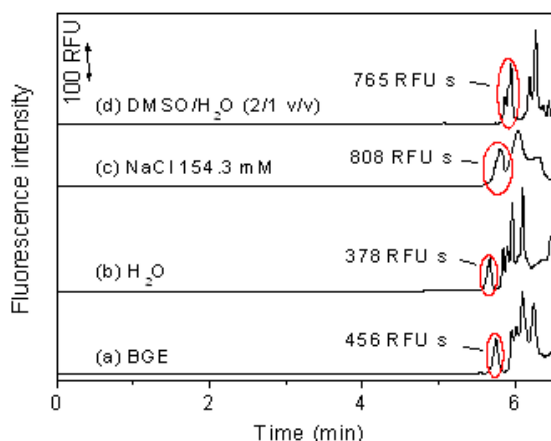


Figure 2: Online covalent labeling of ubiquitin using different dilution mediums of the sample. Fused silica capillary: 47 cm × 50 μm id. Applied voltage: + 10 kV. Sample: UBI at 11,54 μM (0,1 g/L). Labeling agent: UBI samples are diluted in (a) BGE, (b) H₂O, (c) NaCl 154,30 mM and (d) DMSO/H₂O 2/1 (v/v).

In order to optimize both the reaction yield and the separation, UBI was then diluted in a mixture of DMSO/H₂O (2/1 v/v). Due to the high viscosity of the mixtures of DMSO/H₂O (2/1 v/v) ($\eta = 3,66 \cdot 10^{-3}$ Pa s) [45] and according to the poiseuille's law [35], the injected sample length of UBI is much lower when UBI is diluted in DMSO/H₂O. Despite this, both peak area of UBI* and resolution between UBI* and FP-488 were improved (Fig. 2(d)). Indeed, the electrophoretic mobility of UBI, at pH 9,5, is very low and the motion of UBI in the capillary is mainly due to the EOF. Thus, when an electric field is applied, DMSO and UBI move in the same direction and, approximately, at the same velocity. FP-488 enters in the zone that contains both DMSO and UBI. We assumed that the improvement of the reaction yield, when UBI is diluted in a mixture of DMSO/H₂O, was mainly due to the high

solubility of FP-488 in DMSO and to the decrease of its hydrolysis. Moreover, organic solvents can also denature proteins. The resulting unfolding may contribute to the increase of the labeling efficiency. It should be noted that a split peak of UBI is observed with DMSO whereas in the other cases (NaCl and H₂O), peak shoulders are rather present. As UBI bears several amino groups, the derivatization leads, as expected, to several labelled species, differing by the number and position of the attached FP-488. This is observed on Fig. 2 by a group of partly resolved peaks that have been integrated all together for quantification.

In order to evaluate the optimal sample volume, EMMA of UBI diluted in a mixture of DMSO/H₂O (2/1 v/v) was performed for different sample volumes corresponding from 0,03% to 0,33% of capillary volume. The peak area of UBI* increased linearly with the injection time until it reached a plateau after an injection time of 25 s. Thus, the optimal injection volume of UBI corresponded to ~0,33% of the total volume of the capillary. Higher injection volume lead to a band broadening of UBI* resulting in a loss of resolution between UBI* and FP-488/by-products (results not shown).

3.4 Improvement of sensitivity and application to cerebrospinal fluid

Considering the limited sample volume (~0,3% of the total capillary length) that can be introduced in the capillary to keep separation efficiency and in order to improve further the LOD of UBI, EMMA was performed in a longer and wider bore capillary.

Capillary of 100 μm of id with 110 cm of total length was used. The longer capillary allowed a larger sample plug to be injected while the increased diameter was expected to provide a 2-fold improvement of the LOD over the classical 50 μm id capillaries. Under these conditions, the LOD, defined as 3 times the background noise was ~15 nM. The linearity of the response was also demonstrated from 30,0 nM to 480,0 nM (Fig. 3).

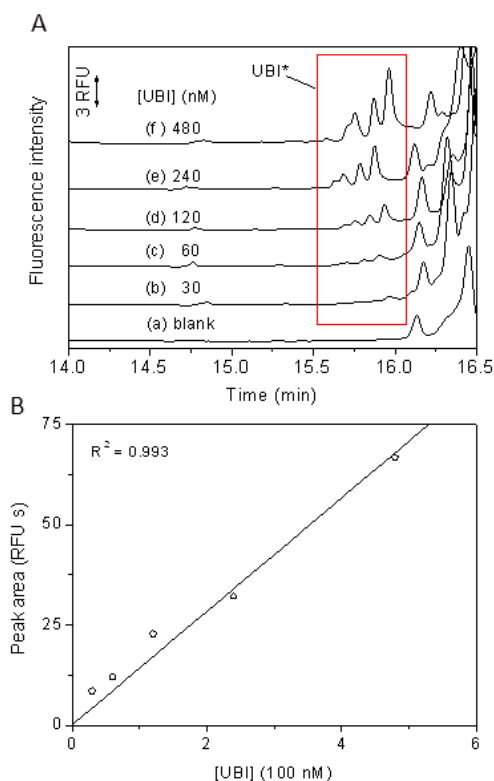


Figure 3: (A) CE profiles of ubiquitin, labeled in a long and wider bore capillary and for increasing concentrations (B) Calibration curve for the quantification of tagged ubiquitin. Fused silica capillary: 110 × 100 μm id Applied voltage: + 24 kV. Sample: UBI diluted in DMSO/H₂O 2/1 (v/v). Labeling agent: FP-488 at 2,54 mM diluted in DMSO (UBI concentrations are shown on the Figures). HDI of FP-488 at 690 Pa during 1 s followed by the HDI of UBI at 690 Pa during 18 s. For other experimental conditions see experimental part.

The slope of the calibration curve was $141,84 \times 10^6 \text{ RFU s M}^{-1}$ with a correlation coefficient of $R^2 = 0,993$. This methodology was successfully applied for the on-line derivatization of free

UBI in filtered CSF. Because the high salt concentration of biological samples decreased resolution between UBI* and FP-488, sample desalting by filtration was systematically performed. In the case lower level of ubiquitin are expected, the filtration step could also be used as a preconcentration step. Fig. 4 displays the electrophoregrams obtained for one sample obtained from three pooled CSF and for the same sample spiked with 16 nM of UBI. As a comparison, electrophoregrams obtained from standard aqueous solution of 60 nM and 120 nM of UBI, are also depicted. A slight loss of resolution between UBI* and FP-488 is observed in the case of the CSF samples.

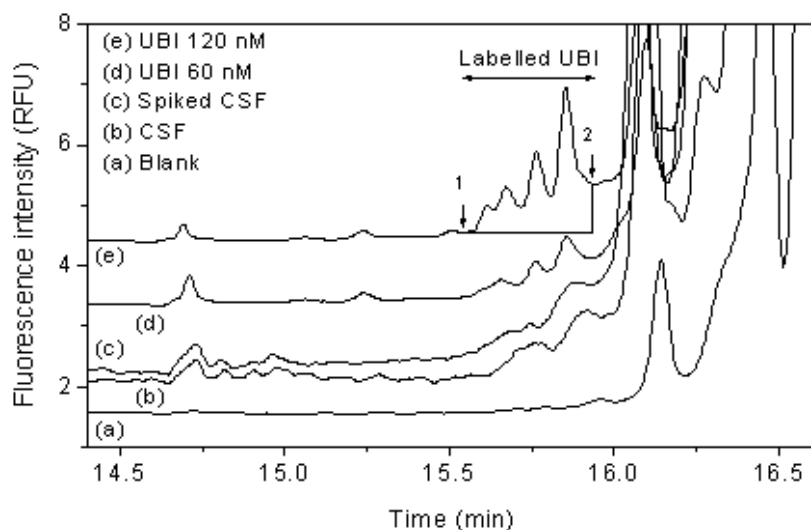


Figure 4: Quantification of UBI in desalted CSF using electrophoretically mediated microanalysis. Samples: (a) Derivatization blank, (b) CSF, (c) CSF spiked with 16 nM of UBI, (d) standard solution of UBI at 60 nM, (e) standard solution of UBI at 120 nM. Before injection, samples are diluted in DMSO (2/1 v/v). As shown on trace (e), drop method integration was employed. This method is performed using a vertical line drawn between the start point 1 and stop point 2 of the peak's group. The total peak area included in this zone was integrated. For other experimental conditions see Fig. 3

The desalting process of the CSF, probably did not remove completely the salts from the samples. Although the presence of other compounds in the CSF, leads to a quite noisy baseline, it does not prevent quantification of UBI from the CSF. Due to the fact that a complete resolution is not achieved, drop method integration was employed [46, 47]. The drop integration method is indeed the most convenient integration method and also the one that was expected to produce the smallest error in our case. As described in trace (e) of Figure 4, the drop method is performed using a vertical line drawn between the start point 1 and stop point 2 of the peak's group. Assuming a total recovery of UBI following the desalting step and taking into account the initial dilution factor of the sample (3-times in DMSO) and the sample volume reduction resulting from the filtration process, Equation 1 (see section 2,4) allows the estimation of UBI concentration in CSF. Thus, the concentration of free UBI in the pooled CSF sample and in the same sample spiked with 16 nM are 57 nM (488,2 ng/mL) and 70 nM (599,55 ng/mL), respectively. The difference being 13nM is quite close to the theoretical concentration of UBI added to the spiked sample. The intra-day repeatability of the method was also evaluated. Peak area and the migration time of the tagged-UBI were measured with six artificial cerebrospinal fluid (aCSF) samples. Each aCSFs was spiked with the same concentration of UBI. Before injection in the capillary, aCSFs were filtered according to the protocol described in section 2,3. Samples were analyzed the same day by EMMA. The RSDs (%) obtained for the peak areas and for the migration times were 5,90 and 4,65%, respectively. This result indicates that the overall method which included, filtration, EMMA derivatization, and the drop integration was fully repeatable. The overall results demonstrated that it is possible to quantify UBI in CSF samples either by a direct evaluation of peak areas or using the standard addition method.

4. Concluding remarks

Electrophoretically mediated microanalysis (EMMA) was developed for on-line fluorescence derivatization of UBI. Derivatization reaction between protein and fluorophore is pH-sensitive, and the best derivatization yield was obtained at pH 9,5 under an electric field of $\sim 210 \text{ V cm}^{-1}$. The rinsing procedure combining both SDS and NaOH led to the best repeatability of tagged-UBI (UBI*) signal. Moreover, the derivatization reaction was greatly improved when UBI was diluted in a mixture of DMSO/H₂O. This was attributed to the decrease of the hydrolysis reaction and to the high solubility of the probe in this binary mixture. Longer and wider bore capillaries allowed the analysis of free UBI in standard solution with a limit of detection of $\sim 15 \text{ nM}$. Finally, the on-line fluorescent derivatization of UBI was applied to the detection and the quantification of UBI in real CSF samples. It was found possible to quantify UBI in CSF samples either by a direct evaluation of peak areas or using the standard addition method. Coupling electrokinetic preconcentration methods to EMMA is under investigation for improving further the LODs of UBI in biological samples.

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (NaDiNe FP7/2010-2015) under grant agreement n° 246513. MO was supported by the FTLDC, SOPHIA and BiomarkAPD

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Bu, G., *Nat. Rev. Neurosci.* 2009, 10, 333-344.
- [2] Humpel, C., *Trends Biotechnol.* 2011, 29, 26–32.
- [3] Masters, C. L., Simm, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., Beyreuther, K., *PNAS*, 1985, 82, 4245-4249
- [4] Lee, V. M. Y., Balin, B. J., Otvos, L., Trojanowski, J. Q., *Science* 1991, 251: 675-678.
- [5] Hochstrasser, T., Marksteiner, J., Humpel, C., *Exp. Gerontol.* 2012, 47, 160-163.
- [6] Goedert, M., *Science* 2006, 314, 777-781.
- [7] Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L.S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., Marcus, D. S., Cairns, N. J., Xie, X., Blazey, T. M., Holtzman, D. M., Santacruz, A., Buckles, V., Oliver, A., Moulder, K., Aisen, P. S., Ghetti, B., Klunk, W. E., McDade, E., Martins, R. N., Masters, C. L., Mayeux, R., Ringman, J. M., Rossor, M. N., Schofield, P. R., Sperling, R. A., Salloway, S., Morris, J. C., *N. Engl. J. Med.* 2012, 367, 795-804.
- [8] Iqbal, K., Flory, M., Khatoon, S., Soininen, H., Pirttila, T., Lehtovirta, M., Alafuzoff, I., Blennow, K., Andreasen, N., Vanmechelen, E., Grundke-Iqbal, I., *Ann. Neurol.* 2005, 58, 748-757.
- [9] Kudo, T., Iqbal, K., Ravid, R., Swaab, D. F., Grundke-Iqbal, I., *Brain Res.* 1994, 639, 1-7.
- [10] Wang, G. P., Khatoon, S., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., *Brain Res.* 1991, 566, 146-151.)
- [11] Shaw, B. F., Schneider, G. F., Arthanari, H., Narovlyansky, M., Moustakas, D., Durazo, A., Wagner, G., Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 17681-17695.
- [12] Jentsch, S., McGrath, J. P., Varshvsky, A. V., *Nature* 197, 329, 131-134.

- [13] Bond, U., Schlesinger, M. J., *Mol. Cell. Biol.* 1985, 5, 949-956.
- [14] Bond, U., Schlesinger, M. J., *Mol. Cell. Biol.* 1986, 6, 4602-4610.
- [15] Parag, H. A., Raboy, B., Kulka, R. G., *EMBO J.* 1987, 6, 55-61.
- [16] Perry, G., Friedman, R., Shaw, G., Chau, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 3033-3036.
- [17] Blennow, K., *J. Intern. Med.* 2004, 256, 224-234.
- [18] Leigh, P. N., Probst, A., Dale, G. E., Power, D. P., Brion, J. P., Dodson, A., Anderton, B. H., *Acta Neuropathol.* 1989, 79, 61-72.
- [19] Steinacker, P., Rist, W., Swiatek-de-lange, M., Lehnert, S., Jesse, S., Pabst, A., Tumani, H., Von Arnim, C. A. F., Mitrova, E., Kretzschmar, H. A., Lenter, M., Wiltfang, J., Otto, M., *Proteomics* 2010, 10, 81-89
- [20] Manaka, H., Kato, T., Kurita, K., Katagiri, T., Shikama, Y., Kujirai, K., Kawanami, T., Suzuki, Y., Nihei, K., Sasaki, H., Yamada, S., Hirota, K., Kusaka, H., Imai, T., 1992. *Neurosci. Lett.* 1992, 139, 47-49.
- [21] Blennow, K., Davidsson, P., Wallin, A., Gottfries, C. G., Svennerholm, L., *Int. Psychogeriatr.* 1994, 13-22.
- [22] Majetschak, M., King, D. R., Krehmeier, U., Busby, L. T., Thome, C., Vajkoczy, S., Proctor, K. G., *Crit. Care Med.* 2005, 33, 1589-1594.
- [23] Kandimalla RJ, S P, Bk B, Wani WY, Sharma DR, Grover VK, Bhardwaj N, Jain K, Gill KD, *Neurosci Lett.* 2011, 487(2):134-8
- [24] Blennow, K., Davidsson, P., Wallin, A., Gottfries, C. G., Svennerholm, L., *Int. Psychogeriatr.* 1994, 6, 13-22. Discussion 59-60
- [25] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, 31, 174-191.
- [26] Kasicka, V., *Electrophoresis* 2012, 33, 48-73.
- [27] Righetti, P. G., Sebastiano, R., Citterio, A., *Proteomics* 2013, 13, 325-340.
- [28] García-Camapaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* 2007, 28, 208-232.
- [29] de Kort, B. J., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Anal. Chim. Acta* 2013, 766, 13-33.
- [30] Rodat-Boutonnet, A., Naccache, P., Morin, A., Fabre, J., Feurer, B., Couderc, F., *Electrophoresis* 2012, 33, 1709-1714.
- [31] Rodat, A., Couderc, B., Feurer, B., Couderc, F., *Electrophoresis* 2010, 31, 396-402.
- [32] Zhang, J., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 56-65.
- [33] Miller, K. J., Leesong, I., Bao, J., Regnier, F. E., Lytle, F. E., *Anal. Chem.* 1993, 65, 3267-3270.
- [34] Hai, X., Yang, B. F., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2012, 33, 211-227.
- [35] Bao, J., Regnier, F. E., *J. Chromatogr.* 1992, 608, 217-224.
- [36] Zhang, J., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 65-73.
- [37] Zhang, H., Le Potier, I., Smadja, C., Zhang, J., Taverna, M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1387-1394.
- [38] Le Potier, I., Franck, G., Smadja, C., Valet, S., Taverna, M., *J. Chromatogr. A* 2004, 271-276.
- [39] Zeisbergerova, M., Reminek, R., Madr, A., Glatz, Z., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 3256-3262.
- [40] Koval, D., Jiraskova, J., Strisovsky, K., Konvalinka, J., Kasicka, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 2558-2566.

- [41] Lee, I. H., Pinto, D., Arriaga, E. A., Zhang, Z., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4546-4548.
- [42] Jesse, S., Brettschneider, J., Süßmuth, S. D., Landwehrmeyer, B. G., von Arnim, C. A. F., Ludolph, A. C., Tumani, H., Otto, M., *J. Neurol.* 2011, 258, 1034–1041.
- [43] Kwak, A. S., Esquivel, S., Gomez, F. A., *Anal. Chim. Acta* 1999, 397, 183-190.
- [44] Stahl, J. W., Catherman, A. D., Sampath, R. K., Seneviratne, C. A., Strein, T. G., *Electrophoresis* 2011, 32, 1492-1499.
- [45] Flick, E. W., *Industrial solvents Handbook*; Noyes Data Corporation, New Jersey, USA, 1998.
- [46] Bicking, M. K. L., *LCGC North America* 2006, 24, 402-414.
- [47] Beesley, T. E., Buglio, B., Scott, R. P. W., *Quantitative chromatographic analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 2001, pp 352.

2.4. Discussion

Les travaux présentés dans ci-dessus ont permis d'estimer non seulement l'apport d'une méthode de séparation électrocinétique couplée à la détection par fluorescence pour l'analyse qualitative et quantitative de biomarqueurs potentiels, mais aussi d'identifier les problématiques liées à son application pour une quantification dans le LCR. Théoriquement, les séparations en ECZ offrent des résolutions intéressantes pour l'analyse d'échantillons contenant des analytes multiples et permettent d'atteindre de hautes sensibilités avec l'aide de la détection par fluorescence et l'appui de méthodes de préconcentration. Cependant, les matrices biologiques comme le LCR comportent d'innombrables composés biologiques. Un certain nombre d'entre eux sont potentiellement liés à des processus neurochimiques pathologiques et les évolutions combinées de leur concentration pourraient servir d'outil diagnostique. En pratique, la complexité du LCR, de par ses fortes concentrations en sels, est peu compatible avec les hautes résolutions en ECZ. De plus, la forte présence de composés protéiques ou peptidiques est un frein à l'obtention d'une résolution suffisante lors de la dérivation du fluide biologique. En effet, l'utilisation de la fluorescence pour le marquage et la détection de biomarqueurs dans le LCR conduit à des profils électrophorétiques complexes difficilement exploitables et ce, même à partir de solutions standards de force ionique faible. Ces constatations font des méthodes de séparation électrophorétique un outil marginal pour le diagnostic des maladies neurodégénératives par rapport à certains tests immunochimiques multimarqueurs proposant de hautes spécificités et sensibilités.

Dans ce contexte défavorable, l'utilisation de l'EC a pourtant permis de surmonter une problématique rencontrée pour la détection et la quantification de l'ubiquitine libre dans le LCR à l'aide de tests de type ELISA. En effet, un manque de fiabilité des tests utilisés à l'heure actuelle en laboratoire a été démontré. Les résultats portant sur les concentrations d'ubiquitine libre dans le LCR sont notamment très variables d'un laboratoire à un autre, selon les tests immunochimiques utilisés (Abdi F. *et al.*, 2006). Ceci s'explique entre autres par le manque de spécificité des anticorps vis-à-vis de l'ubiquitine libre et l'existence de formes polymériques d'ubiquitine ou de complexes ubiquitine-protéine divers. Dans ce contexte, où l'ubiquitine apparaît comme un marqueur général du processus neurodégénératif, le développement d'une méthode permettant sa quantification en EC, en s'affranchissant de l'utilisation d'anticorps apparaît comme une réelle avancée.

La méthode développée a permis la détection et la quantification de l'ubiquitine dans la gamme de concentration attendue dans le LCR. Un moyen d'exploiter les avantages de cette technique et d'en justifier son utilité serait d'effectuer des analyses comparatives sur des échantillons de LCR provenant de patients sains et de patients atteints de différentes pathologies neurodégénératives, afin de tester le pouvoir diagnostique de l'ubiquitine seule ou en association à d'autres biomarqueurs. Cela permettrait potentiellement de définir un nouveau cadre de discrimination entre pathologies et de confirmer la valeur de l'ubiquitine en tant que biomarqueur de processus neurodégénératif. Il serait également intéressant de comparer les valeurs obtenues à celles obtenues par les tests immunochimiques de type ELISA sur une même population d'échantillons.

3. Analyses de peptides amyloïdes en microsystème en verre

3.1. Introduction, problématique et contexte

3.1.1. Objectifs et contexte de l'étude

Le travail réalisé et décrit dans ce chapitre concerne la mise au point d'un module de séparation hautement résolutif des différentes formes de peptides A β , biomarqueurs potentiels de la MA. Afin de proposer une solution analytique compatible avec son intégration au sein du laboratoire sur puce final, nous avons opté pour le développement d'une méthode séparative électrocinétique en microsystème. Nous nous sommes d'abord intéressés aux puces en verre pour la séparation des différentes formes de peptides β -amyloïdes. En effet, ces puces disponibles dans le commerce ne nécessitent pas le développement d'un processus de microfabrication et sont facilement accessibles. De plus, la similitude des parois en borosilicate de ces puces avec celles des capillaires en silice facilite la transposition des protocoles de modifications de surface disponibles en EC.

Les peptides de la famille des β -amyloïdes sont intimement liés aux processus neuropathologiques de la MA et en particulier à la formation des plaques séniles. En plus du peptide A β 1-42 validé comme biomarqueur de la MA, de nombreuses formes tronquées en N- ou en C-terminal ont fait l'objet d'études démontrant leur pouvoir diagnostic et/ou de discrimination plus élevé lorsqu'ils sont associés. En effet, la combinaison des formes majoritairement présentes dans le LCR, à savoir les A β 1-40, A β 1-38 et A β 1-42, semble augmenter la précision du diagnostic par rapport au A β 1-42 seul (Welge V. *et al.*, 2009). D'autres formes comme le A β 2-42 et le A β 2-40 ont montré une diminution spécifique de leur concentration dans le LCR de patients atteints de la MA par rapport à celui des patients souffrant de démence fronto-temporale (Bibl M. *et al.*, 2011).

Ces peptides ont une séquence très proche, des tailles similaires et des points isoélectriques identiques pour la plupart, notamment A β 1-40, A β 1-38 et A β 1-42, ce qui rend leur séparation *a priori* difficile par les différents modes disponibles en EC ou en μ EC. Cependant, le mode ECZ a permis d'obtenir, lors de travaux précédents, une séparation complète de plusieurs formes en EC-UV grâce à l'ajout de diaminobutane dans le tampon de séparation (Verpillot R. *et al.*, 2008). Le mode ECZ a donc été choisi dans la présente étude pour analyser ces peptides sur puce en verre. L'analyse des peptides en capillaire en silice ou dans un canal en verre borosilicate présente cependant certaines difficultés. Les peptides, et plus généralement les protéines, ont tendance à s'adsorber sur les surfaces hydrophiles, conduisant à des performances analytiques dégradées. Par ailleurs les peptides amyloïdes ont une tendance importante à s'agréger *in vitro*, surtout le peptide A β 1-42 qui est le plus hydrophobe de la famille. Pour contrer la problématique de l'adsorption et tenter d'atteindre de hautes résolutions, des traitements de surface ont été testés pour revêtir

les microcanaux en verre, afin de permettre non seulement de maximiser les différences de mobilité apparente entre les différents peptides en modulant la μ_{eo} , mais aussi de limiter l'adsorption des biomolécules. En ce qui concerne la tendance des peptides à s'agréger relativement rapidement en solution, cette difficulté a été résolue par une optimisation du traitement d'échantillon qui permet de conserver les peptides dans un état monomérique majoritaire.

Ce chapitre se consacre d'abord à la description des problématiques liées à la séparation électrocinétique de ces peptides et des voies que nous avons envisagées pour les contourner. Il décrit ensuite une étude préliminaire réalisée en EC, qui a eu pour but d'évaluer deux nouveaux copolymères, le DMA-NAS-MAPS et le DMA-GMA-MAPS, compatibles avec le recouvrement des canaux des puces en verre, en matière de stabilité et de diminution de la μ_{eo} . Pour la transposition des protocoles de revêtement de l'EC vers la puce, deux polymères largement décrits, le PEO et l'EpDMA (ou PDMA-AGE) ont été ajoutés à l'étude. Au total, trois polymères ont été étudiés et utilisés pour revêtir les microcanaux des puces en verre. Finalement, seuls le PEO et l'EpDMA ont démontré une compatibilité avec l'analyse de solutions de peptides A β dérivés au FP 488. Après une étape d'optimisation des protocoles de revêtement, les performances séparatives dans les deux systèmes ont été évaluées et comparées selon différents critères : la stabilité du revêtement, la répétabilité des analyses, la résolution entre les peptides, ou les pourcentages de récupération des analytes.

Les résultats obtenus ont permis d'aboutir au développement d'une méthode de séparation hautement résolutive, répétable et quantitative des différentes formes de peptides amyloïdes sur puce en verre dont les surfaces ont été traitées par l'EpDMA.

Les travaux réalisés sur puce en verre ont fait l'objet d'un article soumis à *Journal of Chromatography A* (en cours de révision) sous le titre *Physically adsorbed neutral polymers as coatings for the high resolution electrophoretic separation of A β peptides on glass microchip* (**Article 2**).

3.1.2. Problématiques liées au développement analytique

3.1.2.1. Adsorption des peptides

L'une des problématiques majeures liées à l'analyse des peptides amyloïdes est leur tendance plus ou moins forte à s'adsorber sur les parois des capillaires de silice vierge et donc potentiellement

sur les microcanaux des microsystèmes en verre nu. Comme il l'a été vu précédemment, les protéines et les peptides peuvent s'adsorber sur les parois des capillaires de silice vierge, par des interactions hydrogènes ou électrostatiques, mais aussi par des liaisons de van der Waals, entre les groupements SiOH et certains acides aminés de la séquence peptidique des biomolécules. De plus, une fois qu'un peptide est adsorbé par ce type d'interaction, d'autres peptides amyloïdes peuvent se lier par des interactions hydrophobes à ces derniers.

La mise en place de stratégies de recouvrement des fonctions silanols est alors nécessaire pour éviter ces phénomènes d'adsorption. En effet, l'adsorption des peptides a un effet néfaste sur la répétabilité à la fois des temps de migration, en modifiant la μ_{eo} , mais aussi des aires de pics correspondant aux peptides analysés. Lors d'études précédentes réalisées au sein du laboratoire et concernant l'analyse de ces peptides par ECZ, l'ajout de diaminobutane (DAB) dans l'électrolyte de séparation a été préconisé afin de former un revêtement dynamique du capillaire. Ceci a permis de développer une méthode répétable, diminuant l'adsorption et affichant des taux de récupération des peptides de minimum 94,5% (Verpillot R. *et al.*, 2008). L'ajout de DAB au sein de la puce en verre vue de la séparation des peptides amyloïdes a cependant été abandonné assez rapidement par manque de répétabilité des analyses. De plus, l'ajout d'additifs chargés comme le DAB dans l'électrolyte peut conduire à une augmentation des conductivités, favorisant l'effet Joule difficile à maîtriser dans les microsystèmes car ceux-ci ne sont pas thermostatés. Ainsi, dans le cadre de cette thèse, l'utilisation de revêtements polymériques semi-permanents ou covalents a donc été privilégiée afin de garantir une plus grande stabilité du revêtement dans le temps, mais aussi afin de s'affranchir des difficultés liées à l'ajout de composés de modification de surface dans le tampon de séparation comme vu précédemment. Nous nous sommes intéressés à plusieurs polymères neutres en vue de revêtir les microcanaux des puces en verre. Certains ont déjà été décrits dans la littérature pour le revêtement de puces en verre, comme l'EpDMA pour la séparation de protéines en CIEF (Poitevin M. *et al.*, 2009), ou le PEO ajouté à l'électrolyte de séparation (Xu F. *et al.*, 2005). Deux nouveaux copolymères ont été synthétisés par le laboratoire de Chiari à l'ICRM de Milan et n'ont jamais été explorés pour ce genre d'application.

3.1.2.2. Agrégation des peptides amyloïdes

Une autre problématique majeure liée à l'analyse des peptides amyloïdes est leur tendance à s'agréger *in vitro*, surtout le peptide A β 1-42 qui est particulièrement hydrophobe. En effet, afin de permettre le développement d'une méthode de séparation hautement résolutive mais surtout répétable, la présence de peptides dans leur forme monomérique est indispensable. Or, nous

avons constaté assez rapidement que les lots commerciaux pouvaient varier en qualité, non seulement en ce qui concerne leur pureté mais aussi leur état d'agrégation. Une attention particulière a donc été portée sur la mise au point des conditions de dissolution et de conservation de ces peptides dès leur réception. En effet, il a été démontré lors d'études précédentes qu'une conservation du peptide A β 1-42 dans une solution d'hydroxyde d'ammonium à 0,16% (m/v) permettait une solubilité maximale de ce peptide et réduisait l'agrégation de celui-ci. Dans cette même étude, il a été également démontré que les peptides provenant de différents fournisseurs ne présentaient pas la même pureté et que certains lots contenaient une proportion non négligeable du peptide A β 1-42 agrégé. Ceci est illustré sur la **Figure 51** qui présente les électrophérogrammes obtenus lors de l'analyse en ECZ-UV d'un mélange des deux peptides A β 1-40 et A β 1-42 provenant de chez trois fournisseurs différents (Verpillot R. *et al.*, 2008).

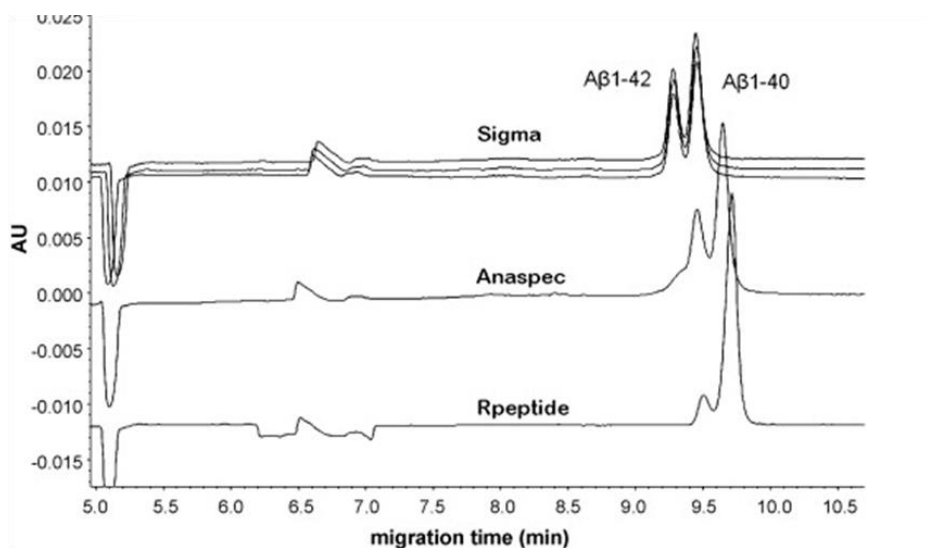


Figure 51 : Analyse en ECZ-UV de peptides A β 1-42 et A β 1-40 provenant de chez trois fournisseurs différents. Conditions de séparation : tampon de borate de sodium, 100 mM, pH 10,0, avec 3 mM de DAB. Détection UV à 214 nm. Concentration des peptides A β : 0,033 mg/ml.

On remarque que les aires de pics relatives aux deux peptides ne sont pas équivalentes malgré un protocole de dilution et une concentration identiques des deux peptides dans tous les échantillons. L'analyse des peptides a été répétée trois fois et a montré une grande répétabilité, ce qui permet de conclure que les différences observées ne sont pas liées à la méthode d'analyse mais à la qualité de l'échantillon.

Afin de confirmer la présence du peptide A β sous ses formes agrégées dans les différents lots neufs, une analyse en ECZ-UV a été effectuée à partir de deux échantillons, en utilisant des conditions d'analyse qui ont été décrites pour la séparation des formes monomériques et agrégées du peptide A β 1-42 (Brambilla D. *et al.*, 2010). La **Figure 52** compare les électrophérogrammes obtenus lors de l'analyse en ECZ-UV du peptide A β 1-42 provenant de deux lots différents.

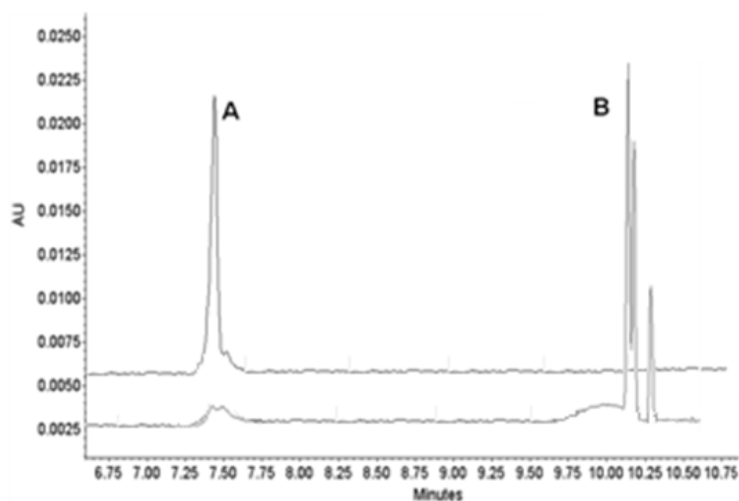


Figure 52 : Analyse en ECZ-UV du peptide A β 1-42 issu de deux lots différents de chez Anaspec (A) et chez American peptide (B). Conditions d'analyse : tampon de phosphate de sodium, 80 mM, pH 7,4, peptide A β dilué à 100 μ M dans du phosphate de sodium 20 mM, pH 7,4. Capillaire de silice vierge, longueur effective 10 cm, diamètre interne 50 μ m. Détection UV : 190 nm,

Dans l'échantillon A, le peptide est présent uniquement sous sa forme monomérique qui migre vers 7,5 minutes tandis que pour l'échantillon B, on voit apparaître vers 10,0 minutes un pic plat et très large accompagné de pics fins correspondant aux formes agrégées du peptide.

De par l'importance de la préparation des échantillons de peptides A β , surtout pour la forme A β 1-42, une série de protocoles a été comparée afin de déterminer celui permettant de limiter cette agrégation. Pour cela, nous avons utilisé un marqueur, la thioflavine T (ThT), qui se lie de manière non covalente par des interactions hydrophobes aux agrégats. La ThT interagissant ainsi avec les feuillet β des formes oligomériques ou agrégées devient alors fluorescente (Khurana R. *et al.*, 2005). Nous avons donc suivi l'évolution de la fluorescence émise par les échantillons par spectroscopie de fluorescence afin de détecter la présence éventuelle de ces formes.

Des solutions contenant des peptides A β 1-42 (2,0 μ M) ayant été soumis à des protocoles de préparation de l'échantillon différents ont été évaluées. Une mesure de la fluorescence des différents échantillons a été effectuée toutes les 10 minutes. Un contrôle positif composé du peptide A β 1-42 dans un état d'agrégation très avancé a été analysé. Un contrôle négatif composé uniquement de ThT à 40 μ M a également été analysé.

Quatre protocoles ont ensuite été comparés. Le premier a consisté à incuber la solution de peptides dans une solution d'hydroxyde d'ammonium à 0,16% (m/v) pendant 30 minutes, puis à lyophiliser l'échantillon. Le produit de la lyophilisation a ensuite été repris dans un tampon Tris-HCl de pH 7,4 et de force ionique 10 mM contenant 100 mM de NaCl ainsi que 40 μ M de ThT afin de l'analyser. Le second protocole est similaire au premier sauf que la solution de peptide n'est pas lyophilisée. Le troisième protocole est également similaire au premier sauf que la concentration d'hydroxyde d'ammonium utilisée pour l'incubation de l'échantillon est augmentée à 10% comme proposé par Ryan *et al.* (2013). Enfin un dernier protocole se base sur une méthode largement décrite dans la littérature (Broersen K. *et al.*, 2011). Le peptide lyophilisé est incubé pendant 30 minutes dans un mélange équivalent en volume de DMSO et de hexafluoroisopropanol (HFIP) à 0,1 mM. Le solvant est ensuite évaporé à l'aide d'un flux d'azote puis dilué dans le tampon Tris-HCl de pH 7,4 et de force ionique 10 mM contenant 100 mM de NaCl ainsi que 40 μ M de ThT pour être analysé.

Les intensités de fluorescence moyenne (I_m) résultant d'une excitation de la ThT à 440 nm et d'une émission de fluorescence mesurée à 480 nm ont été calculées à partir des mesures effectuées toutes les 10 minutes pendant 24 heures.

Il a été constaté une nette différence d'intensité de fluorescence pour la solution composée d'agrégats de peptides A β 1-42 ($I_m = 56,45$) et pour celle contenant uniquement la ThT à la même concentration ($I_m = 10,31$). Ces résultats sont illustrés sur la **Figure 53** représentant le suivi de la fluorescence en fonction du temps pour ces deux échantillons contrôles.

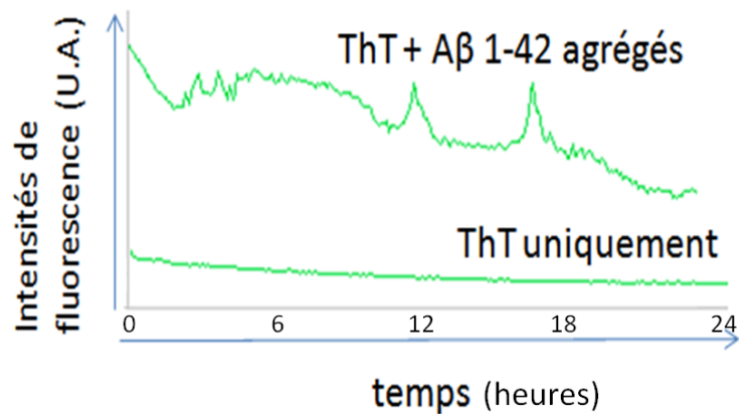


Figure 53 : Comparaison de l'évolution de fluorescence pour un échantillon composé du peptide A β 1-42 agrégé (20 μ M) et d'un échantillon contrôle composé de tampon Tris-HCl de pH 7,4 et de force ionique 10 mM contenant 100 mM de NaCl ainsi que 40 μ M de ThT. Suivi sur 24 heures de l'émission de fluorescence de la ThT par spectrofluorimétrie avec λ_{ex} : 440nm et λ_{em} : 480nm.

Les intensités moyennes, résumées dans le **Tableau IX**, montrent que les traitements à l'HFIP ou au NH₄OH à 0,16% (m/v) sans lyophilisation n'ont pas l'effet escompté de diminution de la fluorescence. En effet, les fortes intensités I_m obtenues, respectivement 64,2 et 51,3, indiquent la présence d'une quantité non négligeable de formes agrégées du peptide dans ces échantillons. En revanche, une incubation dans le NH₄OH à 0,16% et à 10% suivie d'une lyophilisation semble limiter ce processus d'agrégation, sans pour autant l'anéantir. On peut cependant noter que la forte concentration de NH₄OH à 10% semble favoriser davantage l'inhibition de l'agrégation qu'une concentration à 0,16%.

Echantillon	Description des protocoles de préparation des échantillons	I_m (U.A.)
A β 1-42 agrégé	Sans prétraitement / Dilution dans la solution d'analyse	56,4
ThT seule	Sans prétraitement / Analyse directe de la solution d'analyse	10,3

A β 1-42	Incubation dans du NH ₄ OH à 0,16 % (30 minutes)	51,3
	Reconstitution dans la solution d'analyse	
A β 1-42	Incubation dans du NH ₄ OH à 0,16 % (30 min)	46,5
	Lyophilisation	
	Reconstitution dans la solution d'analyse	
A β 1-42	Incubation dans du NH ₄ OH à 10 % (30 minutes)	38,1
	Lyophilisation	
	Reconstitution dans la solution d'analyse	
A β 1-42 (20 μ M)	Lyophilisation	64,2
	Traitement au HFIP/DMSO	
	Reconstitution dans la solution d'analyse	

Tableau IX : Comparaison des différents protocoles de traitement de l'échantillon du peptide A β 1-42 sur l'inhibition de son agrégation grâce au suivi de la fluorescence de la ThT par une méthode spectrofluorométrique (λ_{ex} : 440nm, λ_{em} : 480nm). Solution d'analyse : tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 contenant 100 mM de NaCl et 40 μ M de ThT. Tous les échantillons de peptide ont la même concentration finale, 20 μ M.

Le protocole d'incubation du peptide A β 1-42 dans une solution de NH₄OH à 10% suivi d'une lyophilisation a donc été utilisé pour la préparation de tous les échantillons de peptides amyloïdes destinés à être analysés au cours de ce travail de thèse.

3.1.2.3. Maintien de la résolution entre les peptides amyloïdes

La séparation résolutive des différentes formes de peptides A β est en soi un défi analytique en microsysteme. En effet, la méthode développée préalablement au laboratoire par EC-UV a nécessité un capillaire d'une longueur effective de 47 centimètres (Verpillot R. *et al.*, 2008), tandis que la longueur du canal de séparation en puce en verre ne dépasse généralement pas 8 centimètres. De plus, toutes les formes dont les séquences débutent par l'acide aspartique en position 1, comme les A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42 tronquées en C-terminal, ont le même point isoélectrique (pI = 5,31). De ce fait, les différences de mobilité électrophorétique entre ces

formes ne dépendent que de leur différence de volume hydrodynamique. Celui-ci est très faible car ces peptides ne diffèrent que par un ou plusieurs acides aminés. Les différentes séquences des peptides que nous avons choisi d'étudier sont indiquées dans le **Tableau X**.

Peptides	Séquences	Mw	pI
1-38	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG	4131,6	5,31
1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4329,9	5,31
1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	4514,1	5,31
2-40	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4214,8	6,25
2-42	AEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	4399,0	6,25
3-40	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4143,7	6,25
3-42	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	4327,9	6,25
3-40P	Pyr-FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	4125,7	6,62
3-42P	Pyr-FRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA	4309,9	6,62

Tableau X : Listes des différents peptides β -amyloïdes étudiés ainsi que la masse moléculaire et leur point isoélectrique.

On remarque que les formes tronquées uniquement en N-terminal comme les A β 2-42 ou A β 3-42 présentent également le même pI de 6,25. Les formes pyroglutamates notés A β 3-40P et A β 3-42P sont issues de la cyclisation de l'acide glutamique en position 3 pour former un acide aminé non standard, l'acide pyroglutamique.

La séparation électrophorétique en microsystème des formes les plus abondamment rencontrées dans le LCR, à savoir les A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42, n'a fait l'objet que d'une publication à ce jour, réalisée dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire et l'UMR 168 de l'institut Curie (Mohamadi M.R. *et al.*, 2010). Dans cette approche, la séparation a été réalisée en mode ECG au sein d'une puce en PDMS, dont les parois ont été traitées avec de l'EpDMA puis avec un mélange de méthylcellulose et de Tween-20. Une séparation incomplète des différents

peptides a été obtenue (Figure 54). Cependant, les résolutions obtenues dans cette étude n'ont pas permis une quantification simultanée des différentes formes.

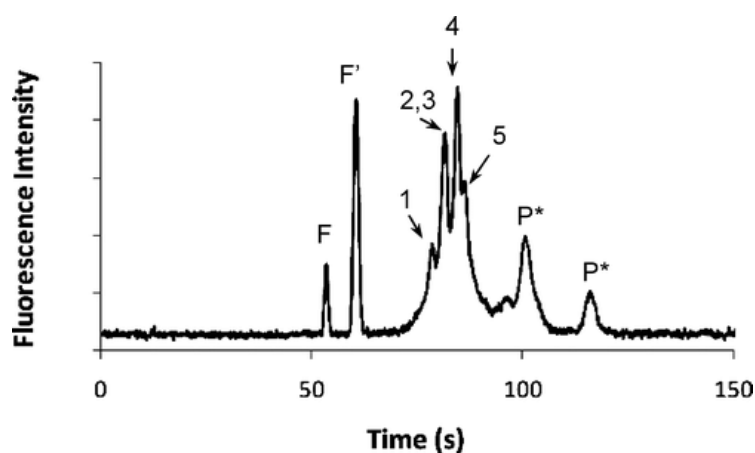


Figure 54 : Analyse d'un mélange de cinq peptides A β dérivés avec le FP 488 (A β 1-37 (1), A β 1-38 (2), A β 1-39 (3), A β 1-40 (4) et A β 1-42 (5)) au sein d'une puce en PDMS revêtue par une double couche d'EpDMA et de méthylcellulose-Tween 20. Tampon de séparation : borate de sodium, 40 mM, pH 9,5, 2% de méthylcellulose (Mohamadi M.R. *et al.*, 2010).

3.2. Etude de différents revêtements polymériques, de l'EC aux microsystèmes

Des polymères, ainsi que différents protocoles de recouvrement pour certains d'entre eux, ont été testés afin de modifier la surface des microcanaux formant les puces en verre. Ces revêtements polymériques vont ainsi permettre de masquer les charges de surface, entraînant une diminution de la μeo de par leur caractère neutre, mais aussi d'inhiber les interactions de surface avec les peptides amyloïdes de par leur grande hydrophilie. Une première étude a été menée sur des capillaires de silice afin de mieux cerner les performances des polymères et les polymères les plus prometteurs. Puis, quelques-uns des polymères testés ont ensuite été retenus et étudiés pour le revêtement des puces en verre. La composition des polymères a été optimisée pour assurer une combinaison optimale des propriétés suivantes : couverture complète et uniforme des surfaces composées de silice par une couche fine de polymère ; formation d'une surface hydrophile minimisant les interactions non spécifiques avec les biomolécules ; maximisation de la stabilité dans le temps de la couche polymérique en minimisant les étapes de rinçage ; facilité et reproductibilité du protocole de revêtement.

3.2.1. Nature, structure et propriétés des différents polymères

Quatre polymères neutres (**Figure 55**) ont été choisis afin de revêtir les parois des puces en verre. Un premier copolymère DMA-NAS-MAPS a été obtenu par copolymérisation radicalaire de N,N-diméthylacrylamide (DMA), de N-acryloyloxysuccinimide (NAS) et de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (MAPS). Ce polymère a été développé et synthétisé par l'équipe de Chiari à l'IRCRM de Milan afin de combiner les propriétés d'adsorption du DMA sur les surfaces en verre par liaison hydrogène à la capacité du MAPS à réagir de façon covalente avec les fonctions silanols *via* son groupement électrophile Si(OMe)₃. Un groupement NAS a été initialement introduit pour conférer à ce copolymère la possibilité d'attacher spécifiquement des brins d'ADN ou des protéines dans le cadre de la conception de puces à ADN ou à protéines. De ce fait, un agent bloquant, l'éthanolamine, a été utilisé pour bloquer cette fonctionnalité que nous ne voulons pas exploiter. Un second copolymère, le DMA-GMA-MAPS, a été obtenu par copolymérisation radicalaire de N,N-diméthylacrylamide (DMA), de glycidyl méthacrylate (GMA), et de 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate (MAPS). Le NAS très réactif a donc été remplacé par un monomère GMA présentant un groupement époxy, permettant théoriquement une stabilisation du copolymère à la surface des capillaires en silice par une liaison covalente avec les groupements SiOH et nous affranchissant de l'étape de blocage. L'EpDMA quant à lui a été obtenu par polymérisation radicalaire du DMA et d'allyl glycidil ether (AGE) et nous a été fourni par Chiari. Il présente des caractéristiques communes avec le DMA-GMA-MAPS. Enfin, un polyéthylène oxyde commercial (200 000 g.mol⁻¹) a également été sélectionné pour l'étude comparative de par son caractère neutre et hydrophile.

L'adsorption des trois copolymères sur le verre doit normalement faire intervenir des interactions faibles avec la surface mais également, dans une moindre mesure, des liaisons covalentes avec les SiOH stabilisant l'attachement de la couche polymérique. En effet, avec plus de 95% de DMA sur les trois copolymères, les interactions de Van der Waals ou les liaisons hydrogènes seront favorisées. Les groupements triméthoxysilanes des MAPS et les groupements époxy du GMA et de l'AGE sont quant à eux susceptibles de générer des liaisons covalentes avec les groupements silanols des surfaces. Le PEO, lui, ne se fixe que par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes.

Pour le DMA-NAS-MAPS et le DMA-GMA-MAPS, le protocole de revêtement utilisé a été proposé par Chiari et sont décrit dans la section Matériel et méthodes. Pour le PEO, des travaux antérieurs réalisés au laboratoire sur silice vierge (Tran N.T. *et al.*, 2005 ; Alahmad Y. *et al.*, 2011)

ont permis d'optimiser davantage encore le protocole proposé initialement par Iki *et al.* en 1996. Par la suite, une transposition du protocole à des canaux de puces en borosilicate a été étudiée. Les protocoles de revêtement de canaux en borosilicate par le PEO et l'EpDMA ont bénéficié d'une optimisation détaillée dans l'[Article 2](#).

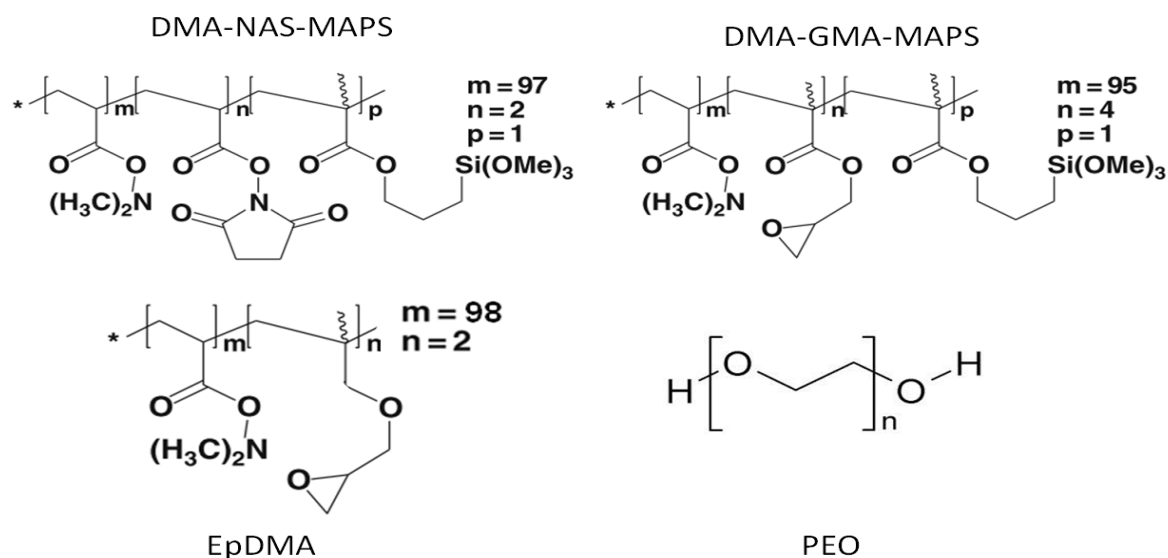


Figure 55 : Structure chimique des différents polymères utilisés ainsi que les rapports des différents monomères présents au sein des copolymères.

Les polymères ont été évalués en vue de leur application sur les parois des microcanaux de puce en verre borosilicate pour la séparation de peptides $\text{A}\beta$. Tout d'abord, des expériences préliminaires en EC pour le traitement de capillaires de silice vierge ont été nécessaires à l'évaluation de la couche polymérique résultant de l'utilisation des copolymères DMA-NAS-MAPS et DMA-GMA-MAPS et ont permis la comparaison de leur comportement. A l'époque où ces travaux ont été menés, aucune donnée sur l'utilisation de ces deux copolymères pour le recouvrement des capillaires en silice ou des puces en verre n'était disponible dans la littérature. Une évaluation des capacités de réduction de la μeo a été menée sur une large gamme de pH, ainsi qu'une étude de stabilité des polymères. Le PEO et l'EpDMA ayant déjà été décrits pour le revêtement de microcanaux de puces en borosilicate, leur évaluation pour le recouvrement de capillaires de silice n'a pas été effectuée.

3.2.2. Etude des copolymères DMA-NAS-MAPS et DMA-GMA-MAPS pour le revêtement de capillaires en silice

3.2.2.1. Evolution de la μ_{eo} en fonction du pH

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux domaines de pH compatibles avec ces copolymères. Les propriétés d'agrégation des peptides sont fortement dépendantes de la charge des peptides. Ces phénomènes sont diminués à des pH basiques, par des répulsions électrostatiques augmentées, alors qu'il a été montré que des conditions acides les favorisent. Ainsi, pour éviter l'agrégation, nous avons opté pour des séparations à pH basique. Toutefois, une étude de stabilité sur toute la gamme de pH a été effectuée car aucune donnée n'était disponible à ce niveau pour ces copolymères. L'attachement de ces deux copolymères aux parois de silice nécessite un prétraitement acide du capillaire avant une incubation de 30 minutes d'une solution de copolymères dissous dans l'eau. Le capillaire est rincé à l'eau puis chauffé à 80°C pour finalement être conditionné par l'électrolyte tampon juste avant les analyses. Ainsi, nous avons mesuré la μ_{eo} résultante en fonction du pH de la solution d'électrolyte. Différents tampons couvrant une large gamme de pH, de pH 3,0 à 9,5, ont été employés. Les forces ioniques de chaque solution d'électrolyte ont été gardées constantes afin de comparer uniquement l'effet du pH. Chaque mesure a été répétée trois fois et les coefficients de variation ont été calculés afin de donner une première indication de la stabilité des revêtements. Ces données sont présentées dans la **Figure 56**.

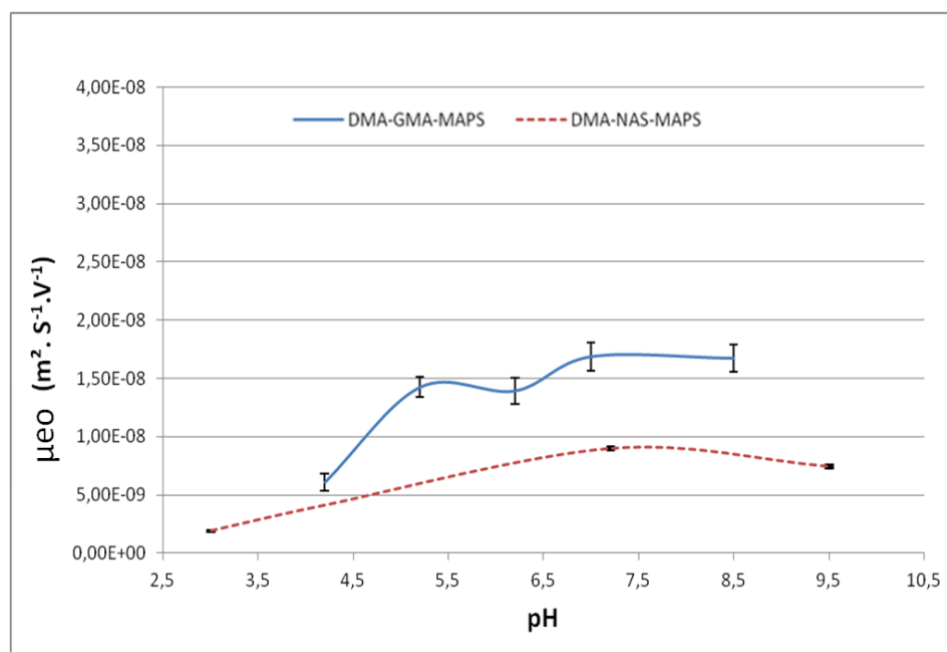


Figure 56 : Valeur des μ_{eo} en fonction du pH de la solution tampon. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types des mesures ($n = 3$). Conditions : Echantillon de thiourée

(0,1 g.L), capillaire de silice revêtu, diamètre interne 50 μm , longueur effective 31,5 cm, 20 kV, détection UV à 190 nm. Tampons utilisés (50 mM) : pour DMA-NAS-MAPS, pH 3,0 et pH 7,2 (phosphate de sodium) ; pH 4,2 (acide aminocaproïque/acide acétique) ; pH 9,5 (borate de sodium) ; pour DMA-GMA-MAPS, pH 4,0 (acide aminocaproïque/acide acétique) ; pH 5,2 (acétate de sodium) ; pH 6,2 et pH 7,2 (phosphate de sodium) ; pH 8,5 (borate de sodium).

Pour les deux revêtements, on constate que les μ_{eo} obtenues augmentent légèrement avec le pH, ce qui peut indiquer que l'augmentation des charges de surface liée à la déprotonation progressive des groupements silanols n'est pas totalement compensée par l'écrantage de la couche polymérique neutre. Cependant, les valeurs de μ_{eo} pour les deux copolymères sont nettement différentes. En effet, avec le DMA-NAS-MAPS, les valeurs de μ_{eo} sont sensiblement inférieures, comprises entre $2,2 \text{ E-}09 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 3,0 et $9,1 \text{ E-}09 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7,2. De plus, les coefficients de variation obtenus pour les mesures de la μ_{eo} sont extrêmement faibles pour les pH allant de 4,2 à 9,5 ($\text{CV} > 1,5\%$).

L'ensemble des résultats indique une grande stabilité du copolymère et ce, sur une vaste gamme de pH, permettant une diminution significative des μ_{eo} surtout aux pH alcalins. Au contraire, le copolymère DMA-GMA-MAPS, n'est pas stable aux pH extrêmes. En effet, une dégradation complète du polymère a été constatée à pH 3,0 et à pH 9,5 provoquant un décrochage et l'obstruction du capillaire par le copolymère. De plus, aux pH compris entre 4,0 et 8,5, la μ_{eo} mesurée au sein du capillaire revêtu est au moins deux fois supérieure à celle obtenue avec le DMA-NAS-MPAS. Enfin, le capillaire modifié avec le DMA-GMA-MAPS souffre de stabilité. Les coefficients de variation obtenus sont assez élevés (entre 5,8% et 9%) pour les pH compris entre 5,2 et 8,5. Pour le pH 4,2, le coefficient de variation est voisin de 12%.

Les deux copolymères ne diffèrent que par l'un de leurs composants : le GMA ou le NAS. Il est intéressant de constater que le copolymère comportant le NAS, un groupement qui n'interagit aucunement avec la surface, mène à des interactions plus stables. Le remplacement du monomère NAS par le GMA pour augmenter la stabilité a eu l'effet inverse de celui escompté. Composé d'un groupement époxy, il est capable de créer des liaisons covalentes avec les silanols en surface, ce qui théoriquement aurait dû augmenter sa stabilité à la surface. Dans ces conditions, il est possible de penser que le groupement époxy présent sur le GMA interagit plutôt avec le triméthoxysilane du MAPS. En effet, les époxy, très peu stables en milieu aqueux, peuvent être attaqués à la fois en milieu acide et en milieu basique par un nucléophile (Clayden J.

et al., 2002). Dans ce cas, la fonction alcool résultant de l'hydrolyse des triméthoxysilanes présents sur la MAPS serait en compétition avec les groupements silanols de surface. Il peut s'ensuivre une polymérisation verticale, diminuant les capacités d'interaction du copolymère avec la surface et diminuant ainsi drastiquement leur pouvoir de recouvrement, ainsi que la stabilité de la couche en surface.

Le copolymère DMA-GMA-MAPS semble donc être peu adapté à notre objectif, de par sa faible stabilité à des pH intermédiaires et à son absence de stabilité à des pH alcalins, nécessaires à la séparation optimale des peptides A β . De plus, sa capacité à diminuer la μ_{eo} est très réduite. Au regard de ces résultats prometteurs pour le DMA-NAS-MAPS, une étude plus approfondie a été menée afin d'évaluer la compatibilité de ce revêtement pour la séparation de biomarqueurs au sein de microsystèmes en verre.

3.2.2.2. Etude du phénomène d'hystérèse

Afin d'étudier la stabilité du système vis-à-vis d'une variation du pH, nous avons effectué un cycle d'hystérèse au sein d'un capillaire de silice modifié par le DMA-MAPS-NAS. Pour cela, nous avons mesuré la μ_{eo} sur une gamme de pH croissant de pH 3,0 à pH 9,5, puis décroissant de pH 9,5 à pH 3,0. La **Figure 57** représente les valeurs de la μ_{eo} en fonction du pH de l'électrolyte au cours de ces variations. Chaque mesure a été répétée trois fois et les barres d'erreur correspondant aux écarts types sont indiquées sur la courbe.

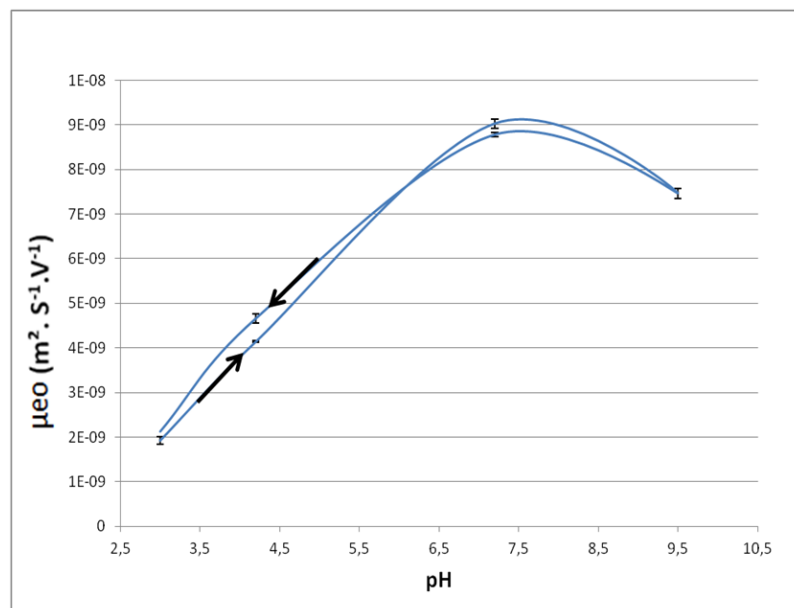


Figure 57 : Valeur de la μ_{eo} en fonction du pH pour des mesures successives de pH 3,0 à pH 9,5 puis de pH 9,5 à pH 3,0. Toutes les mesures ont été répétées trois fois et les barres d'erreurs indiquent les coefficients de variation. Conditions : échantillon de thiourée (0,1 g.L), capillaire de silice revêtu par le DMA-NAS-MAPS, longueur effective 31,5 cm, diamètre interne 50 μm , 20 kV, détection UV à 190 nm. Tampons utilisés (5 0mM) : pH 3,0 et pH 7,2 (phosphate de sodium) ; pH 4,2 (acide aminocaproïque/acide acétique) ; pH 9,5 (borate de sodium), 20kV.

Les résultats montrent que l'hystérèse est négligeable car il n'y a pas de décalage significatif des valeurs de la μ_{eo} quand le système revient à son état initial. Par conséquent, on peut considérer le revêtement très stable sur les variations les pH étudiés.

3.2.2.3. Mise au point des étapes de rinçage

La deuxième étape a été d'évaluer la stabilité de ce revêtement à l'égard de différentes solutions de rinçage dans le but d'assurer un lavage du capillaire entre chaque analyse et éventuellement de désorber les protéines fluorescentes ou l'agent fluorescent adsorbés sur les parois. Nous avons rincé le capillaire avec des solutions de DMSO, de HCl 0,1 M, de NaOH 0,1 M et 0,01 M et de SDS à 50 mM, en effectuant des mesures de la μ_{eo} avant et après l'étape de rinçage. Des temps de rinçage croissants ont été employés afin de suivre l'évolution de la stabilité au cours du temps. De plus, toutes les mesures de μ_{eo} ont été réalisées trois fois successivement. Pour le rinçage par la soude, quelle que soit la concentration employée, une μ_{eo} comparable à celui d'un capillaire vierge a été mesurée, nous indiquant que le revêtement est certainement détaché des parois du capillaire. En ce qui concerne le rinçage avec une solution de SDS à 50 mM, la μ_{eo} a été mesurée avant le rinçage puis après 2, 4 et 6 minutes de rinçage. Les μ_{eo} obtenues ainsi que les écarts types associés sont illustrés sur la **Figure 58**. On constate une très bonne répétabilité pour chaque série de rinçage avec des coefficients de variation de moins de 2%. Sur l'ensemble des trois séries de rinçage, la variation de la μ_{eo} est également négligeable puisque le coefficient de variation total est inférieur à 4%. Nous pouvons donc conclure à une bonne stabilité de ce copolymère sous l'action prolongée d'une solution de SDS.

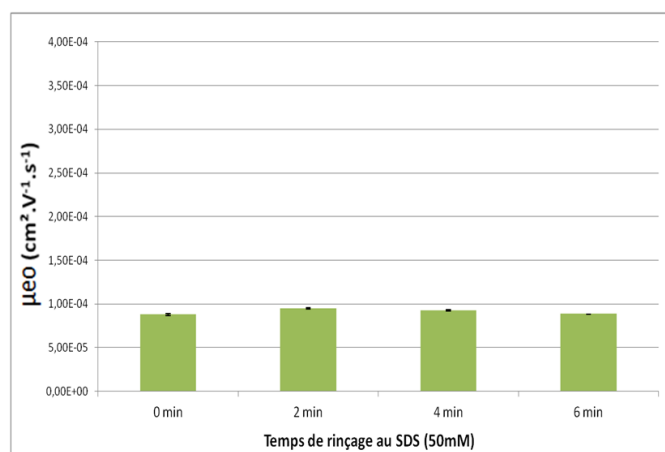


Figure 58 : Valeur des μ_{eo} mesurées dans un capillaire modifié par le DMA-NAS-MAPS avant et après différentes durées de rinçage avec une solution de SDS 50 mM. Conditions : tampon phosphate de sodium, pH 7,2, 50 mM, longueur effective du capillaire 31,5 cm, diamètre interne 50 μm , 20 kV, détection en UV : 190 nm.

Afin de mesurer l'impact du rinçage du capillaire revêtu par une solution de DMSO/eau (1:1), milieu de solubilisation préconisé pour de nombreux agents fluorescents, différents temps de rinçage, de 2 minutes à 16 minutes, ont été employés (Figure 59). On constate qu'après trois séries de 2 minutes de rinçage avec cette solution, le μ_{eo} reste constante et stable avec des coefficients de variation de moins de 1%. Cependant, à partir de 4 minutes de rinçage, la μ_{eo} diminue de manière monotone pour se stabiliser par la suite. Ce rinçage n'est donc pas à exclure mais un pré-rinçage d'au moins 12 minutes semble nécessaire pour conditionner correctement le capillaire et permettre une stabilisation des μ_{eo} .

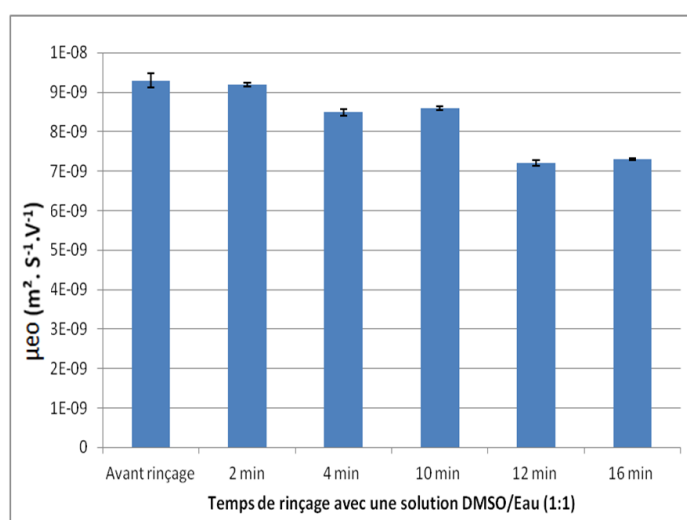


Figure 59 : Valeur des μ_{eo} mesurées dans un capillaire modifié avec le DMA-NAS-MAPS avant et après différentes durées de rinçage avec une solution de DMSO/eau (1 :1). Conditions : tampon de phosphate de sodium, pH 7,2, 50 mM. Autre conditions identiques à la Figure 58.

Enfin, une solution de HCl à 0,1 M a été utilisée pour le rinçage du capillaire. Les résultats obtenus pour les μ_{eo} mesurées après des temps variant de 2 minutes à 10 minutes sont indiqués sur la Figure 60. On constate que la μ_{eo} diminue fortement dès 2 minutes de rinçage, mais semble se stabiliser ensuite et ce, jusqu'à 10 minutes de rinçage. Une restructuration de la couche polymérique semble donc s'opérer à pH acide. Un contrôle de la μ_{eo} a été effectué sans étape de rinçage en toute fin de l'étude, confirmant la stabilisation du flux. Cependant, les grandes variabilités des μ_{eo} mesurées à chaque série de rinçage rendent son emploi délicat comme méthode de rinçage si l'on veut une méthode d'analyse répétable.

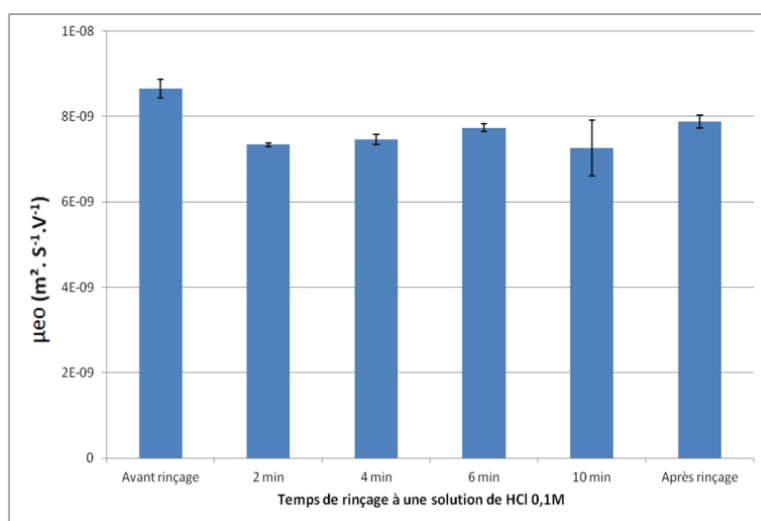


Figure 60 : Valeur des μ_{eo} mesurées dans un capillaire modifié avec le DMA-NAS-MAPS avant et après différentes durées de rinçage avec une solution de HCl 0,1 M. Conditions : tampon de phosphate de sodium, pH 7,2, 50 mM. Autre conditions identiques à la Figure 58.

En conclusion, nous avons constaté que plusieurs conditions de rinçage peuvent être utilisées pour le lavage du capillaire revêtu ou pour désorber d'éventuelles protéines ou marqueurs fluorescents adsorbés, sans modifier de manière significative le revêtement des capillaires ni les μ_{eo} . Ces conditions correspondent à 2 minutes de rinçage avec un mélange DMSO/eau et 6 minutes avec une solution de SDS à 50 mM. L'ensemble de ces résultats sont plutôt satisfaisants

et indiquent globalement que la couche de polymères adsorbés en surface du capillaire est bien attachée et assez stable.

3.2.2.4. Répétabilité intercapillaire du protocole de revêtement

Afin de compléter l'étude de la stabilité de la couche polymérique sur les parois du capillaire, la μ_{eo} a été évaluée dans quatre capillaires revêtus séparément selon le même protocole. Les données obtenues sur 17 mesures ($n = 4$ pour trois capillaires et $n = 5$ pour le dernier) sont résumées dans le **Tableau XI**.

Toutes les mesures ont été effectuées avec le même tampon de phosphate de sodium à pH 7,2 et force ionique 50 mM. On remarque que le flux moyen obtenu, $8,75 \text{ E-}09 \text{ m}^2 \cdot \text{S}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$, est en adéquation avec les flux obtenus lors des deux études précédentes. Lors de cette étude intercapillaire, le coefficient de variation des μ_{eo} est de 4,07%. Ceci indique que la procédure de revêtement présente une bonne répétabilité d'un capillaire à l'autre.

pH	Tension appliquée	$\mu_{eo} (\text{m}^2 \cdot \text{S}^{-1} \cdot \text{V}^{-1})$	n	CV (%)	Tampon (50 mM de FI)
7,2	20 kV	8,75 E-09	17	4,07	Phosphate de sodium

Tableau XI : Valeurs des μ_{eo} et coefficients de variation (CV) associés obtenues sur des capillaires revêtus de manière indépendante suivant le même protocole. Autre conditions identiques à la Figure 58.

3.2.3. Etude de l'EpDMA, du PEO et du DMA-NAS-MAPS comme revêtements des canaux de puces en verre

3.2.3.1. Evolution de la μ_{eo} en fonction du pH

La procédure de revêtement par le DMA-NAS-MPAS utilisée précédemment pour des capillaires de silice a été appliquée de manière similaire à une puce en verre de type simple croix dont les canaux ont un diamètre interne de $50 \mu\text{m}$ (**Figure 61**). Pour le revêtement des puces par l'EpDMA ou le PEO, différents prétraitements des canaux ont été évalués afin de maximiser la stabilité du revêtement sur des surfaces en borosilicate. Ces optimisations sont explicitement

détaillées dans l'Article 2. Dans cette partie, les protocoles utilisés pour le revêtement des puces en verre sont ceux ayant montré les meilleurs résultats.

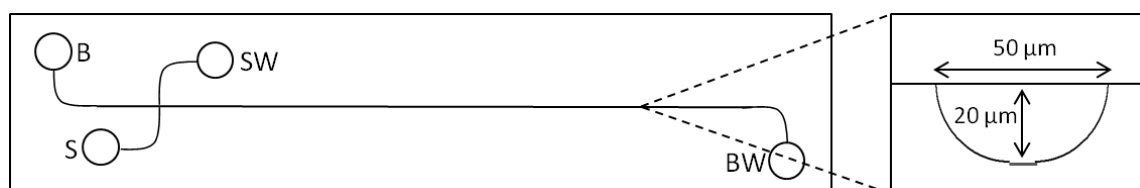


Figure 61 : Représentation schématique des puces en verre simple croix utilisées ainsi que d'une section du canal de séparation La puce est munie de 4 réservoirs identifiés par les lettres suivantes : S, réservoir d'échantillon ; SW, réservoir du rejet d'échantillon ; B, réservoir du tampon ; BW, réservoir de rejet du tampon.

Nous avons étudié la variation de la μ_{eo} en fonction du pH en effectuant des mesures successives sur une large gamme de pH au sein de puces en borosilicate revêtues par chacun des trois revêtements en utilisant la méthode dite de la constance des mobilités effectives des analytes (Wang W. *et al.*, 2007). Cette méthode se base sur la constance des μ_{ep} d'un fluorophe chargé au sein d'un même électrolyte dans deux systèmes différents. La μ_{ep} de ce composé est calculée en EC classique dans un électrolyte pour lequel on connaît la μ_{eo} . Le même électrolyte est utilisé au sein d'une puce en verre pour mesurer la μ_{app} de ce même composé, permettant ainsi de calculer la μ_{eo} de la puce pour le tampon spécifique utilisé. Chaque mesure a été répétée trois fois. Afin de comparer l'apport des revêtements, une mesure de la μ_{eo} , répétée trois fois, a également été effectuée à chaque pH sur une puce en verre vierge. La Figure 62 présente les résultats obtenus. Les tampons utilisés pour cette étude sont de force ionique équivalente et égale à 50mM.

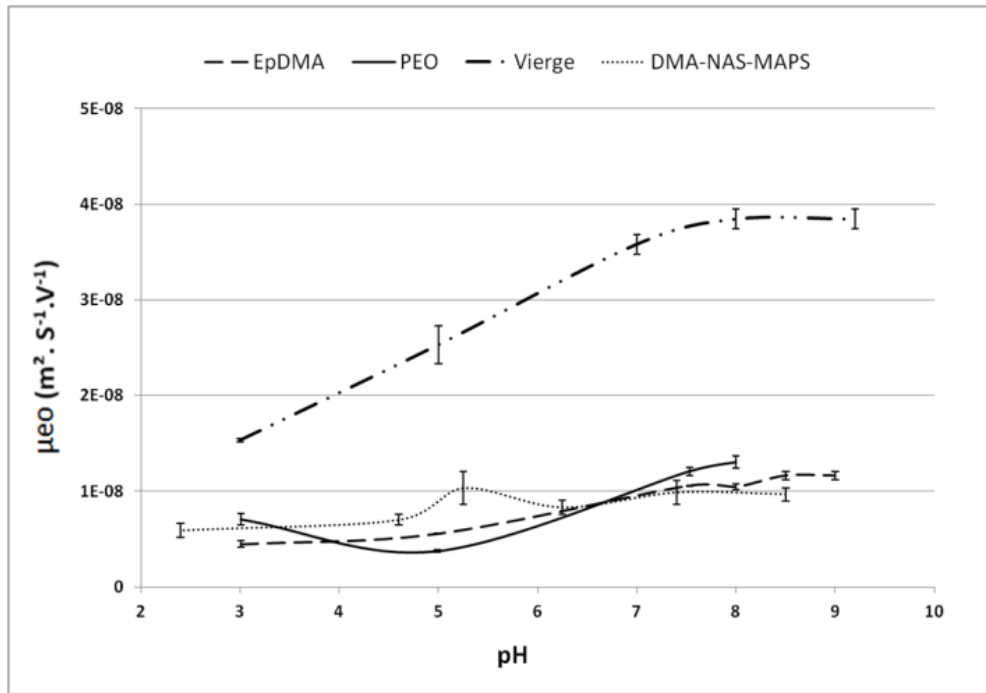


Figure 62 : Valeur des μ_{eo} mesurées au sein d'une puce simple croix en verre vierge revêtu avec le DMA-NAS-MAPS, l'EpDMA et le PEO par la méthode de la constance des mobilités effectives (Wang W. *et al.*, 2007).

Tout d'abord, on constate une diminution des μ_{eo} obtenues en puce vierge par rapport à celles obtenues classiquement en capillaire de silice vierge. En effet, la composition des puces en verre borosilicate diffère de celle des capillaires qui sont composés à 99,9% de SiO_2 . Les puces en verre utilisées dans cette étude ne sont composées que de 81% de SiO_2 . Une diminution de près de 20% des groupements SiO_2 entraîne automatiquement une baisse équivalente de la densité de charge en surface et ainsi du potentiel zêta. Ceci explique donc la diminution des μ_{eo} obtenus dans les systèmes en verre vierge. Cependant, la diminution de la densité des groupements silanols en surface de ces puces par rapport au capillaire de silice engendre un moindre recouvrement des polymères sur les parois des puces en verre. Les valeurs de μ_{eo} sont donc supérieures en microsystème borosilicate revêtu par rapport aux capillaires modifiés par le même polymère.

Sur le graphique ci-dessus, on constate une diminution générale et marquée de la μ_{eo} au sein des puces en verre modifiées par le DMA-NAS-MAPS et l'EpDMA par rapport à la puce non revêtu et ce, même à des pH plutôt alcalins. La stabilité du PEO est légèrement moins bonne à pH basique. Il n'est plus stable au-dessus de pH 8,0, pH à partir duquel la couche de polymère se

dégrade, ce qui entraîne une augmentation croissante au fur et à mesure de la désorption du polymère et entraîne donc des coefficients de variation très élevés. Ceci s'explique par le fait que les intensités des liaisons hydrogènes permettant son adsorption aux parois sont de plus en plus faibles à mesure que le pH augmente et que les groupements silanols se déprotonnent. Les coefficients de variations obtenus sont dans l'ensemble assez bas pour les trois revêtements. Ces résultats confirment cependant la très bonne stabilité des polymères sur une large gamme de pH. Néanmoins, on remarque une légère augmentation de la μ_{eo} avec le pH au sein des canaux modifiés et ceci quel que soit le polymère utilisé. La gamme de pH compatible avec la stabilité varie légèrement en fonction des polymères. Le PEO semble être stable de pH 2,3 à 8,0, tandis que le DMA-NAS-MAPS affiche une stabilité sur la gamme de pH 3,0 à 8,5. L'EpDMA lui, semble fournir une stabilité des μ_{eo} sur une gamme plus étendue allant de pH 3,0 à 9,0.

Les trois revêtements testés sont donc *a priori* compatibles en matière de diminution de la μ_{eo} et de stabilité à un pH légèrement alcalin. Ils peuvent donc être retenus pour la mise au point de la méthode de séparation des peptides A β .

3.2.3.2. Revêtement DMA-NAS-MAPS pour l'analyse des peptides amyloïdes

Cette partie de l'étude a été réalisée afin d'estimer la compatibilité des microsystèmes en verre revêtus par le DMA-NAS-MAPS pour la séparation des peptides amyloïdes marqués par un agent fluorescent, le Fluoprobes 488 NHS, selon un protocole récemment publié par notre équipe et indiqué dans la section **Matériels et méthodes** (Verpillot R. *et al.* 2011). L'analyse se décompose en trois étapes : l'injection, la séparation et la détection. Ces étapes sont illustrées par la **Figure 63**. Tout d'abord, une méthode d'injection pincée est utilisée pour incorporer l'échantillon au niveau de la croix. Puis, le volume d'échantillon se situant au niveau de la croix est injecté dans le canal de séparation tandis que l'excédent migre vers le réservoir d'échantillon et vers le réservoir de rejet d'échantillon. Enfin, les composés sont séparés et détectés à une distance choisie au cours de leur séparation.

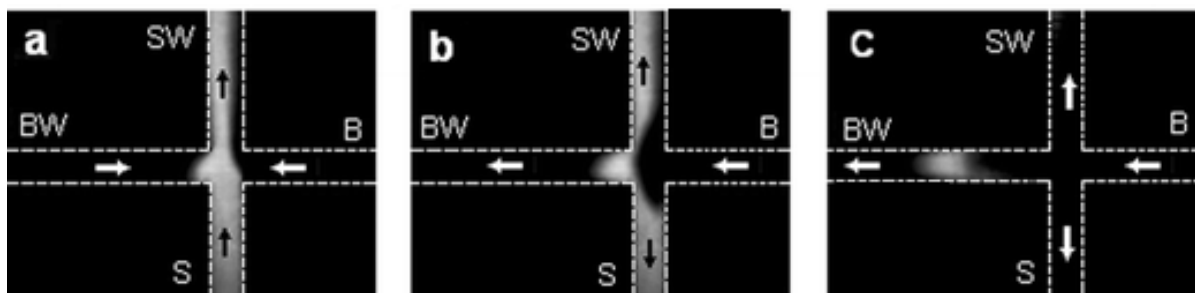


Figure 63 : Images obtenues par fluorescence représentant une vue de la simple croix d'une puce en verre lors des étapes de chargement (a), d'injection (b), de séparation et de détection (c) d'un échantillon contenant des composés fluorescents (Zhang L. *et al.*, 2006).

Toutes les séparations ont été réalisées dans des conditions préalablement optimisées au sein du laboratoire, à savoir en utilisant un tampon de séparation HEPES à pH 8,0. Ce pH est compatible avec la stabilité des trois couches polymériques retenues. De plus, à ce pH, les peptides A β sont tous chargés négativement, ce qui favorise la répulsion électrostatique entre les espèces, diminuant ainsi leur tendance à s'agréger. Dans ces conditions, la mobilité électrophorétique des différents peptides est supérieure aux valeurs des μ_{eo} générées dans les trois systèmes. La migration des peptides est donc possible dans le sens opposé à l' e_o . L'un des atouts de ces conditions pour la séparation de peptides ayant des mobilités électrophorétiques proches, est la similarité, en valeur absolue, de la μ_{eo} et des μ_{ep} à ce pH, ce qui permet d'augmenter les résolutions.

Le premier microsystème testé pour l'analyse d'un échantillon de peptide A β 1-38 est celui revêtu du DMA-NAS-MAPS. Le NAS est bloqué par un rinçage de 10 minutes d'une solution d'éthanolamine à 50 mM puis par une incubation de 50 minutes à 50°C. Dès la première injection de l'échantillon au sein des microcanaux, une adsorption massive de molécules fluorescentes apparaît (Figure 64). On constate en effet une fluorescence importante sur toute la surface des canaux revêtus par le copolymère. Cette adsorption entraîne une hétérogénéité des charges de surface et un changement de la μ_{eo} au sein des différents canaux, perturbant les étapes d'injection et de séparation. Dans ces conditions, aucune séparation et donc aucune détection des peptides n'a pu être obtenue.

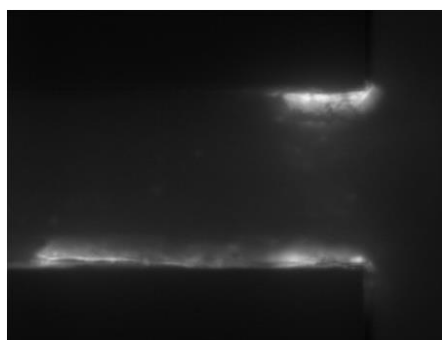


Figure 64 : Photo du canal d'injection de la puce en verre modifié par le DMA-NAS-MAAPS puis bloqué par l'éthanolamine, montrant l'adsorption de composés fluorescents le long de la paroi et ce, dès la première analyse. Conditions d'analyse : tampon de séparation HEPES, pH 8,0 à 100 mM. Echantillon : tampon borate pH 9,0, 40 mM, contenant le peptide A β 1-38 marqué par le FP 488 NHS (20 μ M).

D'après ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que le polymère NAS était responsable de cette adsorption. La fluorescence visualisée sur les parois provient soit de l'adsorption du peptide A β 1-38 marqué, soit de l'excès de FP 488 présent dans l'échantillon, soit des deux. En effet, à un pH supérieur à pH 7,0, le groupement NAS est fortement réactif vis-à-vis des amines primaires (Figure 65). Nous avons tenté d'inhiber cette réactivité en bloquant ce groupement par un traitement par l'éthanolamine.

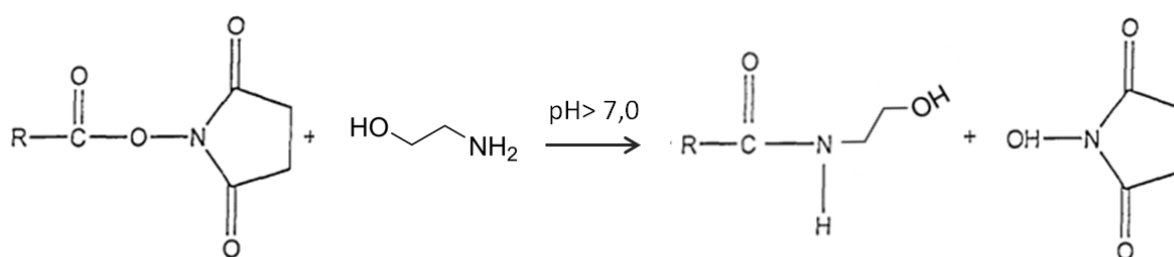


Figure 65 : Réaction à pH > 7,0 du groupement succinimide du NAS avec une amine primaire. Le R représente la chaîne polymérique (Clayden J. *et al.*, 2002).

Malgré le blocage de cette fonction réactive, une adsorption massive a été observée. Deux hypothèses ont donc été émises. Premièrement, nous avons supposé que tous les groupements NAS n'avaient pas été convenablement bloqués par l'éthanolamine et donc que certains de ces groupements étaient susceptibles de réagir avec les amines primaires, présentes du côté N-terminal des séquences peptidiques, ou les lysines du peptide A β 1-38. La deuxième hypothèse

supposée se base sur la formation d'une amine secondaire au niveau du groupement NAS lorsqu'il est modifié par l'éthanolamine (**Figure 65**). En effet, la fiche technique du fournisseur indique qu'une réaction avec les amines primaires est favorisée mais que la réaction avec les amines secondaires est également possible à ce pH. Il est donc possible que le fluorophore présent en excès dans l'échantillon soit réactif vis-à-vis de cette amine secondaire. De plus, l'incorporation d'une chaîne C_2H_5O , issue de la réaction de l'éthanolamine et du NAS, à l'extrémité de la liaison amide formée en surface des parois n'entraîne *a priori* que peu de gêne stérique et permettrait l'accès à des groupements réactifs fluorescents.

En conclusion, malgré une bonne capacité à diminuer la μ_{eo} , une bonne stabilité et une bonne répétabilité sur une large gamme de pH, ce revêtement n'est pas adapté pour la séparation des peptides amyloïdes dérivés en raison d'une forte tendance à adsorber le fluorophore ou le peptide marqué sur la couche polymérique.

3.2.3.3. Comparaison du PEO et de l'EpDMA comme revêtement pour l'analyse des peptides amyloïdes en puces en verre

3.2.3.3.1. Introduction

Les peptides $A\beta$ sont une famille de peptides issus du clivage enzymatique de l'APP que l'on retrouve dans le LCR, essentiellement sous la forme $A\beta$ 1-40, $A\beta$ 1-38 et $A\beta$ 1-42. Ils sont fortement impliqués dans le processus physiopathologique de la MA, en particulier le peptide $A\beta$ 1-42 reconnu comme biomarqueur validé, qui par sa plus grande hydrophobie, a une forte tendance à s'agréger et à former des fibrilles insolubles à l'origine de la formation des plaques séniles. Cependant la mesure exclusive du peptide $A\beta$ 1-42, en tant que biomarqueur diagnostic, ne permet qu'une spécificité et une sensibilité réduites du diagnostic et affiche un pouvoir de discrimination faible entre les différentes pathologies neurodégénératives. Sa combinaison avec deux autres biomarqueurs validés, la protéine tau et la p-tau, permet un diagnostic plus puissant. Cependant, plusieurs groupes de recherche ont démontré l'apport de différentes formes de cette famille de peptides, pour augmenter le pouvoir discriminant du diagnostic. Entre autres, la mesure dans le LCR d'un rapport des formes $A\beta$ 1-38, $A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42 (Volker W. *et al.*, 2009 ; Verpillot R. *et al.*, 2011), mais aussi des formes $A\beta$ 2-40 et $A\beta$ 2-42 (Esselmann H. *et al.*, 2011), a démontré une augmentation de la sensibilité et de la spécificité du test diagnostic.

Dans le travail présenté ici, nous nous sommes focalisés sur le développement d'une méthode ECZ, simple et répétable, pour la séparation hautement résolutive en puce en verre de la plupart des peptides A β tronqués en C-terminal et des formes tronquées en N-terminal. Le traitement de surface des puces en verre est essentiel afin de parvenir à ce but, à la fois par la réduction de l'adsorption des composés sur la paroi mais également par la modulation de la μ eo permettant d'atteindre des résolutions élevées. Par conséquent, nous avons comparé les performances de deux polymères décrits pour le revêtement de capillaires en silice mais peu appliqués aux puces en verre, le PEO et l'EpDMA, pour le recouvrement des surfaces de borosilicate. Les peptides A β sont dérivés avec le FP 488 selon un protocole développé au laboratoire (Tran N.T. *et al.*, 2005).

Nous avons dans un premier temps comparé les performances des deux polymères, dont les protocoles de revêtement ont été soigneusement optimisés, en matière de stabilité et de répétabilité des μ eo, des temps de migration et des aires de pics des peptides. Nous avons ensuite évalué l'apport de chaque polymère pour la séparation résolutive des trois formes principales de peptides et présentant des mobilités très similaires, les peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42. Ensuite, une étude de récupération a été effectuée pour mesurer l'adsorption potentielle des peptides sur les parois au cours de l'analyse. Enfin, le polymère ayant affiché les meilleurs résultats, l'EpDMA, a été utilisé pour la séparation de différents mélanges de peptides A β proposés dans la littérature comme des combinaisons pertinentes pour un test diagnostique. Pour finir, l'analyse d'échantillon de LCR humain enrichi en peptides A β a été effectuée pour vérifier la compatibilité de la méthode avec un échantillon réel. Cette étude est résumée dans l'**Article 2** ci-dessous, qui a été soumis à *Journal of Chromatography A* mais qui est encore actuellement en cours de révision.

3.2.3.3.2. *Article 2 : Physically adsorbed neutral polymers as coatings for the high resolution electrophoretic separation of A β peptides on glass microchip*

Physically adsorbed neutral polymers as coatings for the high resolution electrophoretic separation of A β peptides on glass microchip.

Kiarach Mesbah^{1,2}, **Romain Verpillot**^{1,2}, **Marcella Chiari**³, **Antoine Pallandre and Myriam Taverna**^{1,2}

¹ Univ Paris-Sud, Faculté de pharmacie, « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives », 92296 Chatenay-Malabry, France

² CNRS UMR 8612, Institut Galien de Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

³ Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM) - C.N.R., Via Mario Bianco, 9, 20131 Milano, Italy

Correspondence: Professor Myriam Taverna, Institut Galien Paris Sud, Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives, Université Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

E-mail: myriam.taverna@u-psud.fr

Fax: +33-1-46-83-54-62

List of abbreviations used:

AD, Alzheimer's disease; A β , amyloid beta peptide; FP-488, FluoProbes[®]488-NHS; μ_{ep} , effective electrophoretic mobility; μ_{app} , apparent electrophoretic mobility; PEO, poly ethylene oxide; EpDMA, poly(dimethylacrylamide-co-allyl glycidyl ether); CSF, cerebrospinal fluid.

Keywords:

Alzheimer's disease / microchip capillary electrophoresis / biomarker / polymeric coating / A β peptides

This study reports a comparison of the performances of two physically adsorbed neutral polymers, PEO and EpDMA, in glass microchips to achieve CZE separation of several truncated forms of A β peptides. The peptides were derivatized to allow their fluorescence detection. Several coating protocols were investigated. Two protocols based either on PEO or EpDMA led to good pH stability in addition to a significant reduction of the EOF. These two polymer coatings allowed repeatable analyses and high resolution for the simultaneous analysis of three A β peptides, A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42, considered as potential biomarkers of AD. A recovery study showed that EpDMA was more efficient to reduce the adsorption of the A β peptides on the coated inner wall. Finally the separation method relying on the EpDMA-coated microchips was validated as linear using a calibration curve and the LOD was estimated to be close to 200nM. Mixtures of different N-term or C-term truncated A β peptides corresponding to promising biomarker combinations for future diagnostic were successfully separated under the optimized conditions. The method was successfully applied to detect these peptides in a spiked CSF.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly population [1] and is becoming a paramount societal issue with the aging of the population. Today, AD affects about 35,6 million people worldwide, and recent projections estimate this number to increase to 115,4 million by 2050 [2]. The neuropathological hallmarks of AD are amyloid plaques, mainly composed of beta-amyloid 1-42 (A β 1-42) [3] and neurofibrillary tangles (NFTs) containing hyperphosphorylated Tau [4]. To date cognitive tests such as MMSE and brain imaging are mainly used for the diagnosis while the determination of A β 1-42, total tau and phospho-tau-181 levels in CSF are often used to help the diagnosis [5]. However, these assays alone are not sufficient to diagnose with certainty this disease. Furthermore, the major challenge is to diagnose the disease at its earliest stages, before irreversible brain damages or mental decline have occurred. Consequently, research on new strategies to allow either more efficient biochemical diagnosis or earlier diagnosis is among the most active areas in Alzheimer's science.

Amyloid beta-peptides represent a family of peptides produced by the enzymatic cleavage of APP and which are found in both plasma and cerebrospinal fluid (CSF) [6] [7]. They consist in 43 amino acids (untruncated form) or less (truncated at the N or C-terminal amino acid sequence). In CSF mainly A β 1-40, A β 1-38 and A β 1-42 forms appear [8]. The 1-42 which has a high tendency to polymerize and form insoluble fibrils in the brain plays a pivotal role in the pathogenesis of AD and is considered as a core biomarker of this disease. However, its measurements in CSF led to limited specificity and poor discrimination of AD toward normal aging and other neurologic disorders [9]. Only its combination to other biomarkers, such as Tau and p-Tau, produces as a more specific diagnosis [10]. Several groups have investigated the diagnostic power of the simultaneous quantification of A β 1-38, A β 1-40, and A β 1-42. Some authors demonstrated that the combination of A β 1-42 with A β 1-38 and A β 1-40 could enhance the accuracy of A β 1-42 determination in CSF alone [11]. In particular, the A β 1-42/A β 1-38 ratio was found to allow a slightly better discrimination between AD patients and nD controls than A β 1-42/A β 1-40 ratio [11]. A promising ratio combination, A β 1-42/(A β 1-42 + A β 1-40 + A β 1-38) producing a high discrimination between AD and non-demented patients has been also reported [12].

Besides these conventional A β peptides, N-truncated ones have recently attracted the attention of several research groups (see ref. [13] for a review) [13]. In 2012, Wilftang's group reported an AD-specific decrease of A β 2-42 in comparison to frontotemporal dementia, and proposed A β 2-42 as a candidate biomarker. Indeed, CSF levels of A β 2-42 and 1-42 have been shown to be similarly decreased in AD [14]. In addition, Hesselmann *et al.* have filed a patent on the use of quantitative ratio of A β peptide (1-42, 2-40 and 2-42) to diagnose patients suffering from an early stage of Alzheimer's disease [15].

From the analytical point of view, different methods have been developed to analyze simultaneously several A β peptides from CSF such as CE-LIF [12], SPE UPLC-MS/MS [19] or ultrafiltration/LC-MALDI MS [20]. ELISA assays, based on specific antibodies commercially available are frequently used but cannot determine individual level of each of the amyloid peptides. Very Recently, Hausmann *et al.* [21] developed a novel capillary isoelectric focusing (CIEF) immunoassay for the detection and discrimination of amino-terminal A β variants. The sensitivity of the method was sufficient to detect total A β peptides starting with Asp(1) in human CSF after desalting/buffer exchange and without prior enrichment. Nevertheless, CIEF based assays do not allow to separate C truncated A β peptides such as A β 1-38, A β 1-40, and A β 1-42 which exhibit the same isoelectric point. That is why alternative separation techniques are still required to evaluate the CSF level of each form composing the main promising biomarker combination. Microchip capillary electrophoresis (MCE) is emerging as a reliable analytical technique for proteins and peptides analysis [22] showing significant advantages compared to conventional CE such as speed and low sample consumption, providing also a strong potential for automation and integration [23]. To date, the only reported application of MCE for the analysis of A β peptides relies on a gel based MCE method to separate Fluoprobes 488 labeled A β peptides in a PDMS microchip. In this previous work, we reported for the first time a reproducible analysis in MCE of C-truncated A β peptides [24]. However, only three of the C-truncated variants were separated. In addition, due to the poor resolution obtained, quantification was not possible at this stage. Nevertheless, the MCE method combined to a sample pretreatment and an immunocapture step, adapted from a previous study [25], led to the detection of the most abundant A β peptide in human CSF, the A β 1-40.

In the present work, we focused on the development of a simple, repeatable and high resolution MCE method to achieve the full CZE separation of the C and N truncated variants of A β peptides. Surface treatment was essential to achieve this goal, first to limit the adsorption of peptides to the glass wall of the microchip, and second to tune the EOF in order to obtain the highest resolution. Therefore, we compared, two polymers as coatings for the glass microchannel: poly ethylene-oxide (PEO) and poly(dimethylacrylamide-*co*-allyl glycidyl ether) (EpDMA). A non-permanent coating based on PEO can be easily obtained but need to be regenerated between runs [26]. PEO has been widely used in glass microchip, but mostly as a sieving matrix for the separation of proteins [27] and DNA fragments [28]. More recently it was added to a triblock copolymer, Pluronic F127 (PEO-PPO-PEO), to coat a highly hydrophobic PDMS microchip channel, and showed to highly reduce the non-specific adsorption of proteins [29]. Despite its potential to reduce adsorption, no work focusing on the CZE separation of protein or peptide on a glass microchip coated with physically adsorbed PEO has been yet reported.

Besides this polymer, Chiari's group reported EpDMA as an efficient co-polymeric coating showing high ability to reduce non-specific adsorption of both acidic and alkaline proteins, while reducing the EOF on a wide pH range. It has been first reported in conventional capillary electrophoresis demonstrating a high chemical stability [30]. Later EpDMA has been used as coating for the separation of DNA fragments [31] and more recently for the analysis of milk protein by CIEF on glass and PDMS microchips [32]. EpDMA has also been used as part of a two layer coating for PDMS microchannel for the analysis of A β peptides heretofore mentioned [24].

We report here an alternative method to separate most of the C-truncated A β peptides, but also some N-truncated forms of these peptides, using CZE in a glass microchip. Peptides were derivatized with Fluoprobes 488 as described previously [12]. We first compared the performance of the two coatings, PEO and EpDMA in terms of pH stability, repeatability of EOF, migration times and peak areas of A β peptide. We evaluated the performance of each polymer coating based on the resolution attained between A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42, three species with very close mobilities. A "Recovery" method was also used to measure the possible adsorption of peptides on the walls of coated channels during the separation. Finally EpDMA which provided the best performances was applied to the separation of different relevant mixtures of A β peptides and to CSF samples spiked with these peptides.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Amyloid peptides (A β 1-38, A β 1-40, A β 2-40, A β 2-42) were purchased from Anaspec (Fremont, CA, USA) with the exception of A β 1-42 which was from American peptide (Sunnyvale, CA, USA). PEO (MW 200 000), HEPES sodium salt, Boric Acid, Sodium hydroxide, chloride hydroxide and DMSO were obtained from SIGMA (St. Louis, MO, United States). The Fluoprobe 488 NHS was obtained from Interchim (Montluçon, France). EpDMA was synthesized in ICRM, Milano, Italy, according to the procedure previously described [33].

2.2. Material and Apparatus

Simple cross glass microchips (PS-SC) were obtained from Micralyne (Edmonton, Canada). Reservoirs, adhesive rings and gaskets were purchased from Upchurch (Oak Harbor, WA, USA). The microchip design used in these experiments consisted of a simple cross channel with a separation channel (50 μm wide and 20 μm deep) of 8,1 cm from the injection cross to buffer waste (BW). The distance from sample (S) and sample waste (SW) reservoir to the injection cross was 0,48 cm. The length from buffer reservoir (B) to the injection cross was 0,94 cm. Platinum electrodes were inserted into the reservoirs, providing electrical contact from the power supply to the electrolyte solutions. A HVS448 6000 D power supply from Labsmith (Livermore, CA, USA) controlled by a workstation was used for the microchip capillary electrophoresis. An inverted fluorescence microscope Axio Observer A1 from Carl Zeiss (Marly le Roy, France), equipped with a 20X objective lens (Carl Zeiss) was used to detect in real time fluorescently labeled peptides. Illumination was done by a HXP 120 C mercury arc lamp from Carl Zeiss. A CCD camera Orca-03G02 from Hamamatsu (Hamamatsu, Japan) was used to capture images of the detection zone located at 70 mm from the injection cross. HImage software (Hamamatsu, Japan) was used to optimize the framerate, light sensitivity and to define the region of interest. Azur software (DATALYS, France) was used to convert the mean grey scale from CCD as a function of time into electropherograms.

2.3. Buffers and solutions

The 100mM (concentration) HEPES buffer was prepared by dissolving appropriate amounts of HEPES sodium salt in deionised water. A solution of HCl (1M) was then added to reach pH 8,0. The Borate buffer (pH 10,5, 40 mM ionic strength) was prepared by mixing appropriate volumes of sodium hydroxide (1 M) and boric acid (0,5M). The 40% saturated ammonium sulfate solution was prepared by adding 0,242g of ammonium sulfate to 1mL of water. The labeling stock solution (10 mg/ml) was prepared by dissolving 1 mg of Fluoprobes 488 NHS ester in 100 μL of DMSO. This solution was stored at -20°C and in the dark until used. Two different EpDMA polymer formulations were used for the experiments on glass chip coating. EpDMA was first dissolved in deionised water at 1,2% w/v. Once completely dissolved, the solution was diluted two fold by adding either deionised water or a solution of ammonium sulfate (40% sat.). The PEO polymer solution was prepared by first dissolving PEO powder in deionised water at 0,22% w/v prior to the coating step; HCl was added to the solution in order to obtain a PEO solution at 0,20 % w/v in 0,1M HCl. PEO and EpDMA polymer solutions were prepared freshly before each coating process. All buffers and solutions were stored at 4°C . HEPES and labeled peptides samples were protected from light.

2.4. Peptide dissolution and storage, CSF samples

Upon reception, standard A β 1-42 was dissolved in 0,16% (m/V) ammonium hydroxide aqueous solution at a concentration of 2mg/ml and then divided into several aliquots which were individually stored at -20°C . All other amyloid peptides were dissolved in 0,10% (m/V) ammonium hydroxide and at the same concentration. The CSF aliquots analyzed in this work was taken from one patient attending the department of Neurology in Ulm (Department of Neurology, University of Ulm, Pr Markus Otto), who obtained a lumbar puncture to exclude a meningitis or bleeding. Basic CSF parameters (albumin ratio, cell count, oligoclonal band) were normal. Collection and analysis of the CSF sample was approved by the Ethics Committee in Ulm. CSF was aliquoted within 2 h and stored at -80°C .

2.5. Methods

2.5.1. Fluorescence Derivatization of standard Peptides and spiked CSF samples

Aliquots of peptide solution were defrosted, eventually mixed with others and then diluted 2-fold in borate buffer (pH 10,5, 40 mM IS). Then the mixtures were lyophilized to remove the ammonium hydroxide. The resulting powder was dissolved in borate buffer (pH 10,5, IS 40 mM) to reach the desired concentration of the peptide. 2 μ L of Fluoprobes 488 NHS stock solution were added to 98 μ L of the peptide solution. The sample was then gently mixed with a pipette and incubated at room temperature for 5 minutes.

Three different CSF samples were prepared using the same original CSF aliquot. One sample was filtered on a 3kDa centrifugal unit. This filtrated sample and another non filtrated one were diluted 2-fold in a borate buffer (pH 10,5, 40 mM IS) containing a mixture of the three A β peptides (1-38, 1-40 and 1-42) at 1 μ M concentration while the third one was just diluted 2-fold in a borate buffer. Then we added 2 μ L of sodium hydroxide 0,1 M to 96 μ L to each sample to reach pH 10,5. Finally, 2 μ L of Fluoprobes 488 NHS stock solution were added to 98 μ L of each CSF sample. The samples were then gently mixed with a pipette and incubated at room temperature for 5 minutes before analysis.

2.5.2. Coating of the microchip channels

Before the first use, new microchips were systematically flushed with 1 M NaOH for 10 min, 0,1 M NaOH for 10 min and deionised water for 10 min by applying vacuum.

To perform the PEO coating (PEO-1), the microchip was first rinsed with 0,1M NaOH for 3 min, deionised water for 3 min and HCL 1M for 3 min. Then, three reservoirs (B, SW and BW) were filled with PEO solution (0,2% in HCL 0,1M) and vacuum (30 mbar) was applied for 5 min to the S reservoir in order to fill all the microchannels. The microchip was then rinsed with the BGE. Another PEO coating protocol (PEO-2) was tested using the same protocol except that the rinsing with HCL 1M was omitted.

For EpDMA coating, three protocols were tested. The first protocol (EpDMA-1) was performed by rinsing the microchannels with NaOH 1M for 5 min, then with deionised water for 5 min, followed by a 10 min rinsing with HCl 0,1 M and finally 5 min of deionised water. The polymer solution in ammonium sulfate was then hydrodynamically flushed (2mL/hr) in the channel for 30 min using a syringe pump fixed at the BW reservoir filled by the polymer solution. The microchip was then rinsed extensively with water and was dried at room temperature for a few hours. Two alternative protocols adapted from Rech *et al.* [34] were also tested. For EpDMA-2 protocol, the microchip was rinsed for 10 min with NaOH before the introduction of the polymer solution as in protocol EpDMA 1. The EpDMA 3 protocol was the same than EpDMA 2 except that the polymer was dissolved in plain water.

2.5.3. Microchip capillary electrophoresis

Before each analysis, the coated microchip was rinsed for 5 min with the BGE. To load the peptide samples and to separate the analytes, a set of electrical voltages was applied to the four reservoirs. The set of voltage depended on the kind of polymer coating employed to modify the glass channel surface (PEO or EpDMA). In both cases, the pinched mode was performed for the injection. For PEO coated microchips, the sample was loaded by applying -200 V to S, -100 V to B, +300 V to SW and -700 V to BW. After 2 minutes, the set was switched to separation step by applying +600 V to S, 0 V to B, +650 V to SW and 2000 V to BW. PEO coating protocol was repeated after four successive analyses performed in the same microchip. For EpDMA coated microchips, the sample was loaded by applying 0 V to S, -100 V to B, +350 V to SW and -1200 V to BW. After 90 seconds, the set was switched to separation step by applying +350 V to S, -500 V to B, +400 V to SW and 2000 V to BW. For

EpDMA, no coating regeneration was needed. After four successive analysis, the microchannels were just rinsed with water (5min) and then with BGE (5 min) before a new analysis series.

2.5.4. Measurement of the electroosmotic mobility

As very low electroosmosis flow was generated in the coated microchips, we applied the constant effective mobility method as described by Wang *et al.* [35] to estimate the residual EOF mobility (μ_{EOF}) inside the channels. The apparent mobility (μ_{app}) of the fast migrating and negatively charged Fluoroprobes 488 NHS, was measured in the coated glass microchip. In a separate experiment, the effective mobility of this compound (μ_{eff}) was determined by CE using a capillary in which the EOF was already known, thanks to the analysis of a neutral marker (thiourea). The μ_{EOF} in the coated microchip was then calculated by subtracting the μ_{eff} , obtained from the CE experiments from the μ_{app} of the Fluoroprobe experimentally measured in microchip.

2.6. Validation of the methods

The repeatability of the methods was estimated on both PEO-1 and EpDMA-2 coated glass microchip by measuring RSD of migration times and peak areas obtained for A β 1-38 at a concentration of 10 μ M. Four successive analyses of the peptide were performed without any rinsing step between runs. The separation performance has been evaluated on both PEO-1 and EpDMA-2 coated glass microchip. A mixture of A β 1-38, 1-40 and 1-42 amyloid peptides (20 μ M each) was analyzed using the two methods and the R_s between A β 1-38 and A β 1-40 and between A β 1-40 and A β 1-42 were calculated.

2.7. Recovery, calibration curve and LOD

Standard solutions containing the A β peptide 1-38 at concentrations ranging from 0,484 μ M to 96,8 μ M were employed to evaluate the linearity of the response. The samples were analyzed in triplicate for each concentration level, 96,8 μ M, 48,4 μ M, 12,1 μ M, 2,42 μ M, 1,21, 0,605 μ M and 0,484 μ M. T-test and Anova were performed to confirm the linear regression. Possible adsorption of the peptides to the channel wall was estimated by recovery studies according to a method adapted from Yeung *et al.* [36] and described in detail by Tran *et al.* [37]. This equation is in accordance with the more general one proposed by Espinal *et al.* for any kind of distances employed [38]. The recovery of A β 1-38, 1-40 and 1-42 amyloid peptides was determined by analyzing them individually at a concentration of 20 μ M and by comparing the peak areas obtained during the same analysis at two detection points (35 mm and 70mm). The recovery percentage (X) was then deduced from the equation (1): $X \% = 100 \times (A_L/A_S)^{L/(L-S)}$ Eq (1) where L is the longest effective length (70mm), S is the shortest effective length (35mm), A_L and A_S are the peak area of peptides detected at 70 mm and 35 mm, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the coating protocol

In order to select the most efficient coating polymer and protocol to achieve a reproducible and high resolution separation of the amyloid peptides in glass microchip we have compared several procedures relying on two neutral polymers: PEO and EpDMA. They have already been described for reducing EOF and protein adsorption during electrokinetic separation in

CE and MCE for EpDMA [38] but only in conventional CE for PEO [39]. Critical parameters such as microchip pretreatment, polymer solution composition and nature, coating rinsing steps were investigated.

Polymer protocols were evaluated by measuring the electroosmotic mobility (μ EOF) in the resulting coated microchannels. RSDs of the μ EOF were also compared to estimate the stability of the coatings after 5 and 10 successive analyses. Using EpDMA, three protocols (EpDMA 1, EpDMA 2 and EpDMA 3) were evaluated. The EpDMA 1 procedure integrates a protonation step, by rinsing the microchip channels with HCL 1M, before flushing it with the polymer solution, while EpDMA 2 and 3 protocols entail a deprotonation step, by rinsing the glass surface with NaOH 0,1 M, before filling the channel with the polymer solution. EpDMA 2 and EpDMA 3 are equivalent except that the medium of the polymer solution is ammonium sulfate in EpDMA 2 and water in EpDMA 3.

With PEO, it is possible to coat silica capillaries with or without acidic pretreatment for high performance as shown by Iki *et al.* in 1996 [26]. So far, only the coating protocol with acidic pretreatment has been adapted to glass microchip, but only for μ EOF reduction purposes [40]. The two procedures have been therefore tested. Table 1 summarizes the μ EOF obtained with different protocols and the resulting RSD for μ EOF measured at pH 8,5 in HEPES buffer. We first noticed that all the protocols led to a 3 or 4 fold decrease of μ EOF compared to uncoated glass microchip, at pH 8. By comparing the μ EOF, we deduced that the best protocols for efficient shielding of surface charges were EpDMA2 and 3 ones. Indeed EpDMA 2 and 3 led to approximately 4-fold reduction of μ EOF while other procedures led to slightly higher μ EOF, about 3-fold lower than that of uncoated microchannels. The results show clearly that the EpDMA 1 coating protocol produced high RSDs for μ EOF (8,7%, n=5) which were even amplified after 10 analyses (15%). The coating is less stable in this case. Probably the protonation of the silanol groups before the polymer adsorption obstacles the formation of covalent bonds between the epoxy groups of the polymer and the surface silanols by nucleophilic addition. In the absence or with a reduced number of covalent bonds, the stability of the coating could be seriously compromised at extreme pH values.

Table 1: electroosmotic mobilities and their corresponding RSD after 5 (n=5) and 10 (n=10) consecutive analyses for uncoated or coated glass microchip using EpDMA or PEO and different coating protocols (see materials and methods section for more details). The measurements are obtained in 50 mM HEPES at pH 8,0 (Not determined since coating regeneration was required every 5 runs).

Protocol	μ EOF		
	intensity ($\text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) E-08	% RSD (n= 5)	% RSD (n=10)
Uncoated	3,84	2,7	-
EpDMA 1	1,26	8,7	15,1
EpDMA 2	1,06	1,3	3,5
EpDMA 3	1,03	0,9	18,4
PEO 1	1,33	1,8	-
PEO 2	1,30	5,2	-

On the contrary, EpDMA 2 and 3 protocols, performed with a polymer solution dissolved in ammonium sulfate or water but after a deprotonating rinsing step gave very good RSDs, upon 5 successive measurements of μ EOF (1,3 % and 0,95%. respectively). However, after 10 successive analyses, the RSD of μ EOF increased to 3% using protocol EpDMA 2 while it reached 18% with EpDMA3 protocol (table 1). These results are in accordance with those of Chiari 's group which demonstrated that ten runs were sufficient to deteriorate an EPDMA coating when polymer is dissolved in water and that the use of anti-chaotropic salts in the coating solution generated a more stable coating overtime [41]. For PEO, as the coating was not stable, a regeneration of the coating was required after 4 successive analyses. The μ EOF values obtained were equivalent with both protocols and were in comparison to those obtained using EpDMA 2 and 3, less decreased. The successive measurements (n=5) led to much lower RSD using the PEO 1 protocol (1,8%) than PEO 2 one (5%). We concluded that the protonation of the silanols before the adsorption of the polymer ensure a higher number of hydrogen bound with PEO and then a better stability of the coating. The overall results indicated that EpDMA-2 and PEO-1 procedures provided the best coating stability and efficiency, and further studies were carried out using these two surface treatment protocols.

3.2. μ EOF as a function of buffer pH

During electrokinetic separations, μ EOF is greatly dependent on the efficiency and stability of the coating. Extreme pHs may, in particular, be responsible for partial coating removal, with possible consequence on peptide adsorption and analysis reproducibility. The μ EOF values in EpDMA 2, PEO 1 coated and uncoated channels were evaluated at different pHs ranging from pH 3 to 8,5. RSDs for μ EOF were also estimated at each pH by measuring μ EOF from 5 successive analyses. As expected, the μ EOF in native glass chip increased from pH 3 to pH 10 due to ionization of silanols. This result is similar to that previously published for uncoated glass microchips [42]. Figure 1 illustrates the μ EOF variation in the three conditions. Using both polymer coatings, the μ EOF was markedly decreased over the entire range of investigated pHs. The μ EOF slightly increased with pH for EpDMA 2 and PEO 1 with a maximum intensity, at pH 8 for PEO 1 and 8,5 for EpDMA 2. PEO 1 and EpDMA 2 were not stable above pH 8 and pH 8,5 respectively. Nevertheless, both EpDMA 2 and PEO 1 coatings demonstrated a good stability, respectively between pH 3 and 8,5 or 8,0. Indeed, both coating protocols showed very low RSD for μ EOF (less than 2,5 %) for most pHs excepted at the most acidic and alkaline ones with RSD reaching 5,0% .

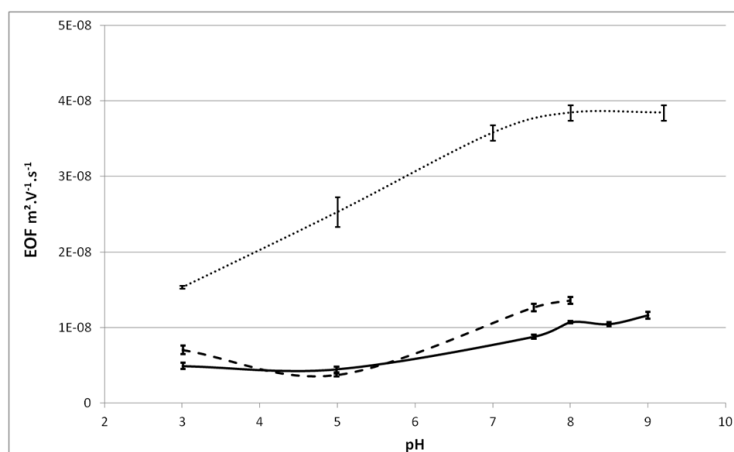


Figure 1: Evolution of EOF mobilities in PEO (dash line), EpDMA (solid line) coated and uncoated glass microchip (dotted line) as a function of pH. Bars indicate RSD of the μ EOF calculated from 5 successive measurements.

For PEO, the polymer molecules are held to the microchannel walls only by weak interactions, such as Van der Waals forces and hydrogen bonds. EpDMA has a strong adhesive character with formation of hydrogen bonds between silanol groups of PDMA backbone. Even though oxiranes stabilize the coating by covalently reacting with silanols, still the pH of the BGE may be a critical parameter to ensure polymer adhesion through hydrogen bonds. Although not completely suppressed, the EOF was significantly lower than that of the uncoated capillary in both cases. This is an interesting feature as residual EOF can in principle, help in reaching high resolution. From this preliminary study, we concluded that the two coating procedures give stable and efficient coatings and could be used with high repeatability using BGE from pH 3 to 8 for PEO 1 and from pH 3 to 8,5 for EpDMA 2.

3.3 Analysis Repeatability and Resolution performance

In order to better compare the performance of the two methods, we have performed a repeatability study for the analysis of the Fluoprobes 488 NHS labeled A β 1-38 peptide, and evaluated also the resolution obtained for the separation of three peptides 1-38, 1-40 and 1-42. Figure 2 shows the corresponding electropherograms obtained from 4 successive analyses of A β 1-38. Repeatability data obtained for PEO-1 and EpDMA-2 coated glass microchips under the same separation conditions revealed good repeatability of migration times (RSD <1%) and peak areas (RSD < 3,1%) with both polymers. Slightly better results were obtained using EpDMA-2 with RSD of 0,5 % and 2,1 % for migration times and peak areas respectively.

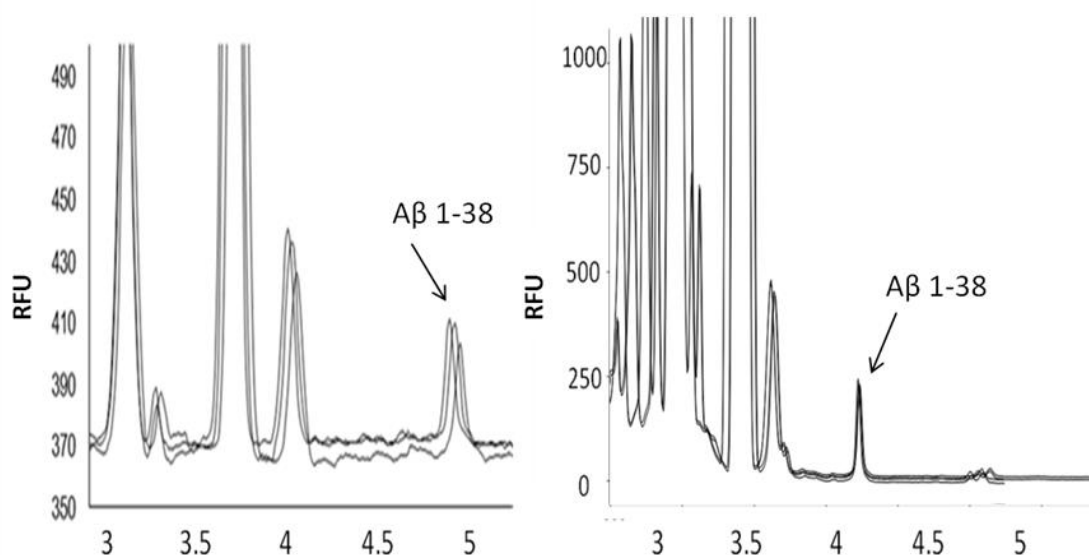


Figure 2: Microchip electropherograms obtained from 4 successive analyses of labeled A β 1-38 using PEO 1 or EpDMA 2 procedures to coat the glass microchip. BGE: HEPES/HCl Buffer, pH 8,0, 100 mM. Sample: A β 1-38 (10 μ M) diluted in Borate buffer pH 10,5, 40 mM. Fluorescence Detection (488nm) at 70 mm from the injection cross.

Three A β peptides, 1-38, 1-40 and 1-42, have been selected to evaluate the resolving capacity of the capillaries coated by the two methods. These peptides exhibit the same charge at pH 8 (theoretical pI of 5,41 for the three peptides), and differ only by their length (from one or two

amino acids). Their separation was already achieved by CZE with a separation distance of 47 cm [43]. However obtaining a good resolution was quite challenging using separation microchannels of only a few centimeters. Figure 3 presents the electropherograms obtained from the analysis of a mixture containing A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 both with PEO-1 and EpDMA-2 coated glass microchip and using an optimized separation buffer. The two methods allowed a good resolution of the three peptides. However, the resolution was slightly better with EpDMA-2 based method with Rs of 1,7 and 1,1 between 1-38 and 1-40 and 1-40 and 1-42 respectively while PEO-1 led to a RS of 1,5 and 1 respectively.

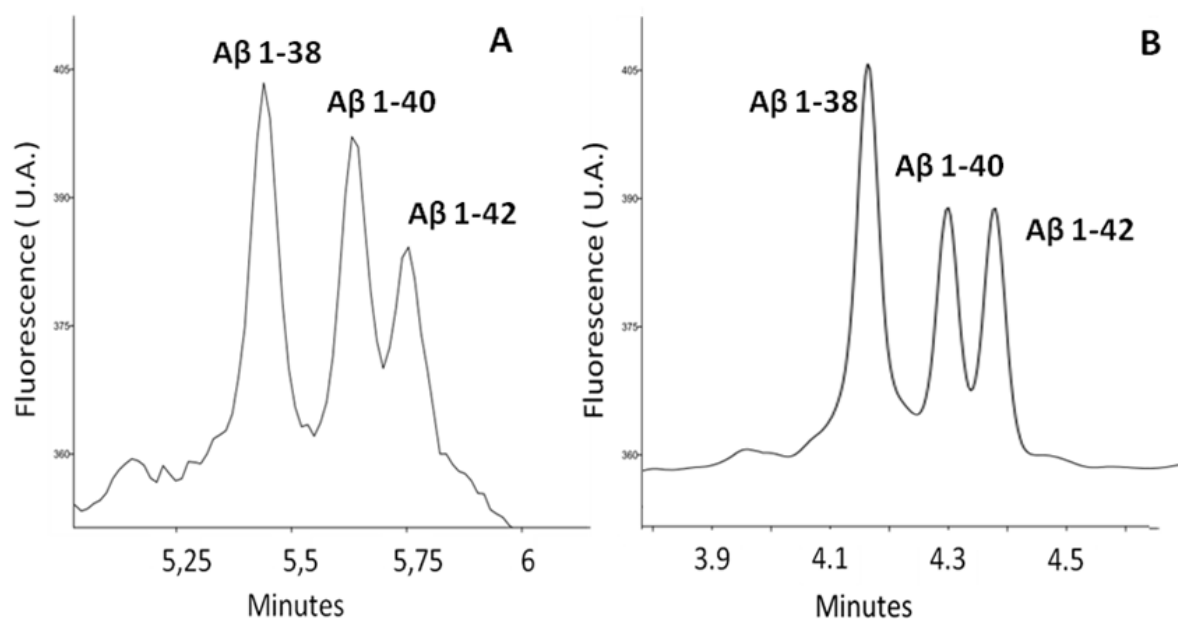


Figure 3: Separation of three A β peptides at 20 μ M (A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42) using PEO coated (A) or EpDMA coated (B) glass microchip. Conditions as in Figure 2

3.4 Recovery, calibration curve and limit of detection:

One critical point for clinical analysis is to quantify with precision and accuracy the target analyte from biological fluids. It is therefore mandatory to ensure that negligible adsorption of the peptides occurred on the coated channels walls during the injection and separation processes. Moreover, we checked that the peak areas were proportional to the concentration of the injected samples. A recovery study has been performed in order to estimate the possible loss of analyte after adsorption to the inner wall during the separation step.

The recovery percentage of different peptides was determined by comparing the peak areas obtained for each peptide at two distances from their injection point. Using the equation described in experimental section, we evaluated a recovery percentage for A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 and in the two coated microchips. Very good recoveries for A β 1-38 and A β 1-40 with values close to 100% were observed with both methods (Table2). The recovery for A β 1-42 was lower especially when the PEO coating was employed. This lower recovery for A β 1-42 compared to the other peptides can be explained by its higher hydrophobicity and ability to self-aggregate at micromolar concentration as recently described [44]. The recovery value for this peptide increased to an acceptable value of 93% with the EpDMA 2 coating. This increase of the recovery with EpDMA may be explained by its structure. EpDMA has a polydimethyl acrylamide backbone with oxirane groups attached to the skeleton. The oxirane groups enhance the hydrophilicity of the copolymer while at the same time maintaining the

excellent adsorptive properties of the EpDMA on glass even at pH 8,0. This specific polymeric structure allows an excellent limitation of proteins or peptides adsorption on the coated microchannel wall.

Table 2: Recovery % of A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 on a EpDMA 2- and a PEO 1 -coated glass microchips. Detection performed at 35 mm and 70 mm from the injection cross. BGE: HEPES/HCl, 100 mM, pH8,0.

Peptides	PEO	EpDMA
A β 1-42	84	93
A β 1-40	101	98
A β 1-38	97	98

Finally considering the excellent performance of the method based on EpDMA coating in terms of reproducibility, recovery and resolution, the EpDMA coated glass microchip method was validated in terms of linearity and limit of detection for the A β 1-38. The linearity of the detection was assessed by performing triplicate analyses of A β 1-38 solutions at concentrations ranging from 0,480 to 100 μ M. For each of the seven concentrations investigated, the absolute areas were plotted against the concentration. The determination coefficient R² was equal to 0,991. On a significance level of 0,05, all observed values (obtained with the t- test) were lower than the critical value demonstrating the variance homogeneity at each concentration. Then, ANOVA test on the adjusted and residual variances was performed, and results demonstrated that the linear regression fits the experimental data for concentrations ranging from 0,480 to 10 μ M. The detection limit, considered as the minimum analyte concentration yielding a signal-to-noise equal to three, was found around 200nM.

3.5 Application to amyloid peptides mixture and to spiked CSF

Finally, we applied the validated EpDMA coated MCE method to the separation of different mixtures containing truncated amyloid peptides of relevance for the diagnosis of AD [11, 12]. As shown in Figure 4A, full separation of A β 1-38, A β 1-40, A β 1-42 is achieved for the first time in microchip capillary zone electrophoresis. In addition a successful separation of three different N and C truncated variants of A β 1-42 (A β 1-42, A β 2-40 and A β 2-42), recently patented for their diagnosis value in AD [15], is also presented in Figure 4B.

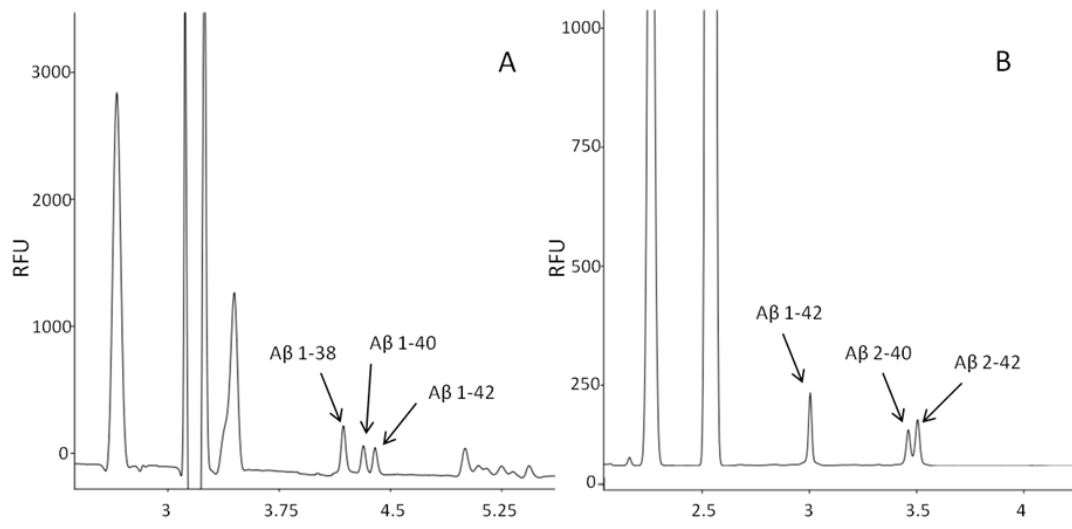


Figure 4: ElectrokINETIC separation of two mixtures of A β amyloid peptides performed on a EpDMA – coated glass microchip. MCE separation conditions: as in Figure 2 for (A) and (B) with the exception in (B) of the BGE pH which was changed to pH 7,5 and applied voltages applied for the separation step: B (-1000V) and BW (3000V). Detection at 75 mm from injection cross.

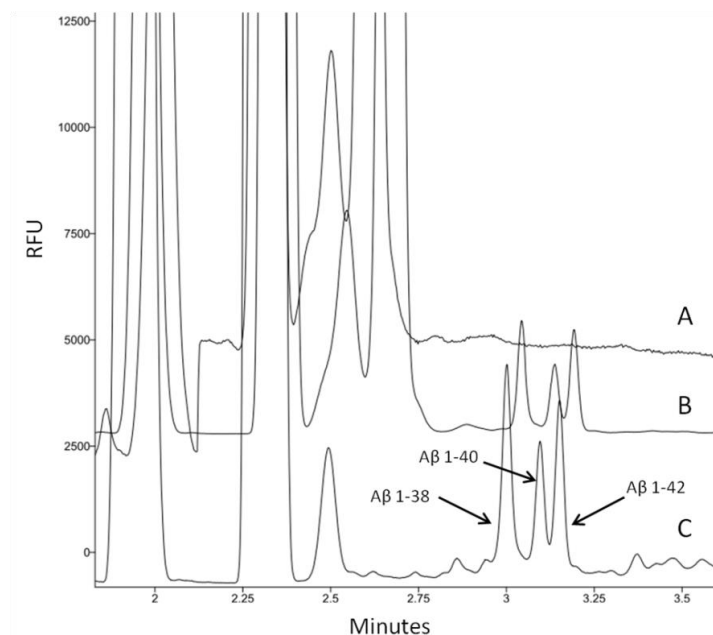


Figure 5: CE analysis of human CSF sample, derivatized with Fluoprobes 488 NHS (A), the same human CSF spiked with 1 μ M of A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 (B), CSF filtered on a 3kda membrane and then spiked with 1 μ M of A β 1-38, A β 1-40 and A β 1-42 (C). CE conditions are the same as in Figure 4 B

Finally, the method was applied to a real sample of CSF. In order to point out the impact of the high salt concentration of CSF on the method performance, the CSF was analyzed before and after a desalting step performed by a filtration on with a 3kDa centrifugal unit. Both CSF samples were spiked with the same concentration (1 μ M) of a mixture of three A β peptides (A β 1-38, A β 1-40, A β 1-42). In addition, a non-spiked labeled CSF sample was also analyzed to check for potential interferences in the migration region of the peptides. The resulting profiles are compared in Figure 5. It clearly indicates that the presence of salts in the sample impacts on the amount of peptides injected in the separation channel as the peak areas

were lower for the non-filtered CSF. The most important result is that the presence of salts do not seem to affect the resolution. The non-spiked CSF pointed out that no interfering species were migrating in the relevant region.

Conclusion

We have developed for the first time a microchip capillary zone electrophoresis method able to achieve high resolution separation of closely migrating A β peptides in a coated glass microchip. This simple method, has been validated in terms of linearity and repeatability and was applied successfully to two mixtures of A β peptides described as relevant combinations for discriminating AD from nD patients. The fully validated method was applied then to spiked CSF samples with no loss of resolution between the three A β peptides (A β 1-38, A β 1-40, A β 1-42). The sensitivity of detection in this method is not yet sufficient for the direct detection of A β peptides in CSF but efforts are currently directed toward integrating a preconcentration step before this separation.

Acknowledgment

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (NaDiNe FP7/2010-2015) under grant agreement n^o 246513. We are indebted to Markus Otto for generously providing real human CSF samples. The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Bu, Guojun, *Nature Reviews Neuroscience* 10,5 (2009) 333-344.
2. Aggarwal, Neelum T., et al., *International journal of Alzheimer's disease* 2012 (2012).
3. Masters, CL, Simm, G. et al., *PNAS*, 82 (1985) 4245-4249.
4. Lee, V, et al., *Science* 251 (1991) 675-678.
5. Humpel, C., *Trends Biochemol.*, 29 (2011) 26-32.
6. Bibl M. et al., *Proteomics Clin Appl*, 6(3-4) (2010) 163-9.
7. P. Seubert, C. et al., *Nature*, 359 (1992) 325-327.
8. Wiltfang et al., *Journal of Neurochemistry*, 81 (2002) 481-496.
9. Hulstaert F. et al., *Neurology*, 52 (1999) 1555-1562.
10. Blennow K, Hampel H., *Lancet Neurology*, 2 (2003) 605-613.
11. Volker Welge et al., *Journal of Neural Transmission*, 116(2) (2009) 203-212.
12. R. Verpillot et al., *Analytical Chemistry*, 83 (5) (2011) 1696-1703.
13. Bibl M. et al., *J. Alzheimers Dis.* 29(4) (2012) 809-16.
14. Mirko Bibl et al., *Journal of Neural Transmission*, 119(7) (2012) 805-813.
15. Esselmann, H. et al., *New formulations for diagnosis of Alzheimer's disease. Patent WO2011124376 A1, Application No. PCT/EP2011/001724, October 13, 2011*
16. Wittnam JL. et al., *J. Biol. Chem.*, 287(11) (2012) 8154-62.
17. Moore et al., *Alzheimer's Research & Therapy*, (2012) 4:18.
18. Piccini et al., *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 34186-34192.
19. Lame, M. E. et al., *Anal. Biochem.*, 419 (2011) 133-139.
20. Hölttä, M. et al., *PloS one*, 7(8) (2012) 42555.
21. Haussman U. et al., *Analytical Chemistry*, 85 (17) (2013) 8142-8149.
22. Ohno, Ken-ichi et al., *Electrophoresis*, 29 (22) (2008) 4443-4453.

23. Jakeway, S. C. et al., *Analytical Chemistry*, 366 (2000) 525– 539.
24. Mohamadi et al., *Analytical Chemistry*, 82 (18) (2010) 7611–7617.
25. Slovakova M. et al., *Lab Chip*, 5 (2005) 935–942.
26. Iki J et al., *J. chromatogr A*, 731 (1–2) (1996) 273–282.
27. Xu F. Et al., *Electrophoresis*, 26(15) (2005) 3013-20.
28. Kang SH et al., *Electrophoresis*, 26(16) (2005) 3179-84.
29. Wu Z. et al., *Lab Chip*, 9(11) (2009) 1500-3.
30. Chiari et al., *electrophoresis*, 21 (2000) 1521.
31. Rech, Ivan, et al., *Electrophoresis*, 27(19) (2006) 3797-3804.
32. Poitevin et al., *Electrophoresis*, 30 (2009) 4256–4263.
33. Chiari, M. Et al., *Electrophoresis*, 21 (2000) 909–916.
34. Rech I et al., *Electrophoresis*, 27 (2006) 3797–3804.
35. W. Wang et al., *Electrophoresis*, 28 (2007) 2893.
36. Preisler, Jan et al., *Analytical chemistry*, 68(17) (1996) 2885-2889.
37. Tran, Nguyet Thuy, et al., *Electrophoresis*, 26(16) (2005) 3105-3112.
38. Poitevin M. et al., *Electrophoresis*, 30 (2009) 4256–4263.
39. Bohoyo et al., *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 1090–1098.
40. Bryan R. Fonslow et al., *Analytical Chemistry*, 78 (24) (2006) 8236–8244.
41. M. Cretich et al., *Electrophoresis*, 27 (2006) 3797–3804.
42. Xiaojia Huang et al., *Talanta*, 69 (2006) 463–468.
43. Verpillot, Romain et al., *J. Chromatogr. A*, 1214 (1-2) (2008) 157-164.
44. Haussman U. et al., *Analytical Chemistry*, 85 (17) (2013) 8142–8149.

3.3. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre ont démontré la nécessité de choisir judicieusement le revêtement de surface des puces en verre borosilicate, afin non seulement de limiter efficacement l'adsorption des peptides et des agents fluorescents utilisés pour le marquage sur les parois des microcanaux, mais aussi de diminuer la μeo . Dans ce chapitre, une attention particulière a été portée sur la modification des surfaces en verre borosilicate. En effet, nous avons observé un comportement significativement différent de la μeo au sein des puces en verre vierge par rapport au capillaire de silice vierge de par la différence de la densité de charges provenant des groupements silanols présents sur les parois des deux systèmes. Dans ce contexte, une transposition identique des protocoles de revêtement de surface obtenus dans la littérature ne garantit nullement la répétabilité des performances décrites. Une optimisation des protocoles adaptée à la surface du verre borosilicate est donc nécessaire à l'obtention de couches polymériques de grande stabilité et permettant d'atteindre de hautes performances analytiques.

Ainsi, nous avons constaté que parmi les quatre polymères neutres que nous avons étudiés, DMA-NAS-MAPS, DMA-GMA-MAPS, PEO et EpDMA, seul l'EpDMA permet une inhibition quasi-totale des interactions entre les analytes et les parois des microsystèmes en verre, tout en offrant une modulation intéressante et stable de la μeo . L'EpDMA a ainsi permis l'analyse hautement résolutive de différentes formes de peptide A β dérivés par un agent fluorescent, le FP 488. Enfin, les grandes résolutions obtenues avec la méthode sont maintenues lors de l'injection directe d'un échantillon de LCR contenant des peptides amyloïdes à des concentrations compatibles avec la limite de détection de la méthode.

La méthode de séparation électrocinétique couplée à la détection par fluorescence développée ici permet donc l'analyse qualitative et quantitative de biomarqueurs potentiels de la MA issus de la famille des peptides amyloïdes. En effet, la séparation des peptides dans les combinaisons les plus prometteuses en matière de diagnostic comme A β 1-38, A β 1-40 ou A β 1-42 ; A β 1-42, A β 2-40 et A β 2-42, a été réalisé avec succès par μECZ . Ce mode présente donc un avantage certain comparé au mode ECG utilisé par Mohamadi *et al.* (2010) qui ne permet pas d'obtenir des résolutions suffisantes. D'autres méthodes existantes, comme le couple d'une capture immunochimique des peptides A β et d'une séparation par CIEF proposé par Haußmann *et al.* (2013), permet la quantification de certains peptides amyloïdes dans le LCR sans préconcentration. Mais ce mode ne permet cependant pas la séparation des trois formes d'intérêt que sont les peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42 du fait de leur point isoélectrique identique.

Dans notre méthode, les limites de détection atteintes sont de l'ordre de 200 nM, ce qui n'est pas compatible avec une détection directe de ces peptides dans le LCR, présents à une concentration voisine de 1 nM. Cependant, ce module de séparation électrocinétique est parfaitement intégrable au sein d'un laboratoire sur puce, qui serait composé en amont d'un module de préconcentration en ligne de ces peptides. En effet, de nombreuses techniques d'enrichissement des peptides amyloïdes sont disponibles pour une application comme l'immunocapture. Celle-ci a déjà été utilisée pour la détection de ces peptides dans le LCR, mais pour un enrichissement off-line en amont d'une séparation par EC (Verpillot R. *et al.*, 2011). Le développement de méthodes intégrées pour la préconcentration de ces biomarqueurs est actuellement en cours, au sein de notre laboratoire à l'aide de la technique de préconcentration par isotachophorèse, ou au sein de l'institut Curie par des méthodes d'immunoextraction sélective en ligne. Le développement de ce module est donc une étape nécessaire dans l'optique de concevoir un instrument analytique

miniaturisé basé sur la séparation électrocinétique des biomarqueurs et en vue de l'utiliser comme outil de diagnostic.

4. Etude de matériaux alternatifs au verre pour la μ EC

4.1. Introduction

Au cours de cette thèse, j'ai consacré une partie de mes travaux à l'étude de l'apport de nouveaux matériaux pour la fabrication de microsystèmes et à l'étude de l'intérêt de leur utilisation pour la séparation électrocinétique de protéines. L'objectif du projet européen dans lequel se sont inscrits mes travaux est de développer un système d'analyse total, incorporant de multiples modules analytiques, comme outil de diagnostic de la MA. Dans ce contexte, l'emploi de matériaux modulables et modelables, permettant l'intégration aisée des différentes composantes du microsystème, aurait un réel avantage. Depuis le développement du premier système miniaturisé destiné à la chromatographie en phase gazeuse en 1979 (Terry S.C. *et al.*, 1979), le domaine de la miniaturisation n'a cessé de croître et ce, particulièrement depuis les années 1990 (Reyes D.R. *et al.*, 2002). Le silicium et le verre ont été les premiers matériaux utilisés pour la microfabrication de ces systèmes, y compris pour la réalisation d'analyses par électrophorèse capillaire en puce. En effet, les premières puces utilisées pour la séparation électrocinétique de deux agents fluorescents étaient des puces en silicium (Manz A *et al.*, 1992) ou en verre (Harrison D.J. *et al.*, 1992). Par la suite, de nombreuses équipes de recherche se sont tournées vers l'utilisation de matériaux alternatifs, principalement polymériques (Iliescu C. *et al.* 2012), et en particulier le polydiméthylsiloxane (PDMS). En effet, les matériaux à base de polymères présentent de nombreux avantages de par leur coût relativement faible, la simplicité et la rapidité des processus de microfabrication, la possibilité de moduler la composition chimique du matériau et de moduler la structure et la géométrie du microsystème (Nge P.N. *et al.*, 2013).

La technologie et le savoir faire en matière de microfabrication disponible au sein des laboratoires partenaires du projet, notamment l'Institut Curie et le DTU, nous ont permis de réaliser des puces en cyclin olefin copolymer (COC) et en thiolène. Le choix de ces deux matériaux à base de polymères comme outil de séparation électrocinétique a été justifié par leurs nombreux atouts tels que le bas coût de fabrication, la rapidité et la simplicité de fabrication ou des propriétés optiques compatibles avec la détection de protéines par fluorescence. Cependant, l'inconvénient principal des matériaux polymériques dans un contexte de séparation électrocinétique de biomolécules est leur hydrophobie relativement élevée, qui favorise leur interaction avec les composés et donc leur adsorption sur les parois des microcanaux. De ce fait, un traitement de la surface de ces systèmes est indispensable pour limiter ce phénomène mais également pour moduler la μeo nécessaire à l'obtention de hautes résolutions entre les analytes séparés. Comme vu précédemment, les revêtements de surface disponibles et performants sont nombreux pour les parois des capillaires de silice ou pour le verre de borosilicate. En ce qui concerne les matériaux polymères, la nature des groupements chimiques présents en surface

empêche la transposition des protocoles décrits dans la littérature pour le recouvrement des surfaces de silice par des polymères ou autres additifs. De plus, certains matériaux présentent une faible réactivité de surface. Cependant, une activation de la surface de ces matériaux est parfois possible en employant des technologies basées sur l'utilisation de sources de haute énergie, capables de modifier la composition chimique des surfaces et donc d'augmenter de manière plus ou moins efficace leur réactivité (Garbassi F. *et al.*, 1998). Les procédés d'activation disponibles sont les irradiations UV, les traitements par plasma, la lithographie à faisceau d'électrons ou les traitements chimiques par sondes ioniques focalisées (Goddard J.M. *et al.*, 2007).

Ce chapitre décrit d'abord les caractéristiques souhaitées pour un matériau destiné à une utilisation en micro-électrophorèse (μ EC). Il détaille ensuite les propriétés et caractéristiques des principaux matériaux alternatifs au verre, puis expose une synthèse rapide de l'état de l'art des différents matériaux actuellement utilisés pour la séparation de protéines. Les deux matériaux étudiés dans le cadre de nos travaux, le COC et le thiolène, sont alors décrits, ainsi que leur procédé de microfabrication. Les stratégies de revêtements de surface de chaque type de puce sont également explicitées. Enfin, une étude approfondie de l'apport des puces en thiolène pour la séparation électrocinétique de protéines est décrite pour la première fois. L'impact de la composition en groupements thiols de ces puces sur l'hydrophobie et la mouillabilité de la surface a été en particulier évalué par des mesures d'angles de contact au sein des microcanaux. Des traitements de surface reposant sur l'emploi de deux nouveaux copolymères, le DMA-PMA et le DMA-PMA-MAPS, synthétisés par le groupe de Chiari à l'ICRM de Milan ont été étudiés afin d'hydrophiliser les parois des canaux et limiter ainsi l'adsorption des protéines. Puis, une étude comparative des μ eo en fonction du pH de l'électrolyte de séparation a été réalisée afin de déterminer la stabilité des différents revêtements et leur capacité à diminuer la μ eo. Par la suite, la capacité de ces polymères à limiter l'adsorption de protéines et à les séparer a été évaluée. Les résultats obtenus ont permis aboutir, pour la première fois, à la séparation électrocinétique de protéines au sein d'une puce en thiolène. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude sur puce en thiolène ont fait l'objet d'une publication, *Thiolene as a new material for on-chip electrophoretic separations of proteins* (**Article 3**), qui est actuellement en cours de soumission à *Lab on a Chip*.

4.2. Caractéristiques et propriétés des matériaux pour la μ EC

4.2.1. Caractéristiques requises d'un matériau pour son utilisation en μ EC

Pour être un bon candidat à une application en μ EC, un matériau doit satisfaire à quelques conditions (Shadpour H. *et al.*, 2006) :

- Une certaine homogénéité de la surface pour avoir un μ eo stable. Pour garantir le développement de méthodes d'analyse répétables et reproductibles, la μ eo doit être stable dans tous les canaux du système. Une hétérogénéité de la surface conduit à des densités de charges non uniformes le long des microcanaux de séparation et affecte également l'efficacité de la séparation (Rathore A.S. *et al.*, 2002).
- De bonnes propriétés optiques. Le plus souvent, la détection des analytes en μ EC est réalisée par une détection de fluorescence. Le matériau ne doit donc pas produire de bruit de fond ou d'auto-fluorescence d'intensité élevée.
- Une simplicité et une qualité de microfabrication. Les puces à EC nécessitent la microfabrication de canaux de diamètre micrométrique. Les matériaux utilisés doivent être compatibles avec des technologies de microfabrication permettant d'assurer la qualité et la reproductibilité des microstructures.
- Une possibilité de modification des surfaces. Pour la plupart des matériaux, un revêtement des surfaces est nécessaire pour limiter l'adsorption des analytes mais aussi pour réguler la μ eo. De ce fait, la réactivité des substrats vis-à-vis des traitements de surface disponibles doit être assurée.
- Une compatibilité du matériau avec les électrolytes. Le substrat des puces doit posséder des propriétés naturelles de mouillabilité favorables à l'emploi d'électrolytes de séparation et dans le cas contraire, il doit être compatible avec l'utilisation de techniques d'hydrophilisation de sa surface. Le matériau doit également être totalement insoluble aux diverses solutions d'électrolyte nécessaires à la séparation électrocinétique des composés ou à certaines solutions de rinçage. Le matériau doit rester inerte vis-à-vis de ces milieux sous peine de se dégrader ou de gonfler.
- De bonnes propriétés thermiques et électriques. Ceci permet de réduire l'effet Joule et d'éviter les claquages électriques lors de l'application des champs électriques indispensables aux séparations électrocinétiques. Le matériau doit posséder des valeurs de conductivité thermique faibles et être un bon isolant électrique.

4.2.2. Propriétés et caractéristiques des matériaux alternatifs au verre

Les matériaux à base de polymère sont les plus utilisés en alternative au verre. Ils sont divisés en deux grandes familles : les élastomères et les thermoplastiques. La principale différence entre les

deux est leur différence de température de transition vitreuse (T_g), les thermoplastiques ayant en règle générale une plus haute T_g qui les rend plus durs et cassants à température ambiante.

Le **Tableau XII** résume les principales propriétés des matériaux décrits dans la littérature comme substrats des microsystèmes utilisés pour la μ EC ou comme candidats potentiels. Pour chaque matériau, les propriétés optiques, la charge de surface, les μ eo mesurées et les groupements chimiques présents en surface sont renseignés lorsque ces données sont disponibles. De plus, il est indiqué si le matériau a été utilisé pour la séparation de composés.

Matériau	Transmittance	Transparence aux UV	μ eo (E-04 cm ² . V ⁻¹ . s ⁻¹)	Séparation de biomolécules	Groupements chimiques (charge de surface)
Verre	+++	> 280 nm	3 (pH 7,0) ; 4,21 ± 0,18 (pH 9,2)	Oui	Silanol (négative)
			Shadpour H. <i>et al.</i> , 2006		
PDMS (natif)	+++	> 220 nm	2,5 ± 0,5 (pH 6,0) ; 4,9 ± 0,9 (pH 9,0)	Oui	Silanol (négative)
			Aura S. <i>et al.</i> , 2008		
PDMS (oxydé)	+++	> 220 nm	8,2 (pH 9,0)	Oui	Silanol (négative)
			Fiorini G.S. <i>et al.</i> , 2003		
PFPE	++	> 350 nm	NC	Non	Fluorocarbon e)
			Rolland J.P. <i>et al.</i> , 2004		

Polystyrène	+++	> 300 nm	1,54 ± 0,03 (pH 9,2)	Oui	Phényle (négative si oxydation)
			Shadpour H. <i>et al.</i> , 2006		
Polycarbonate	+++	> 360 nm	2,22 ± 0,09 (pH 9,2)	Oui	Phényle / Carbonate (négative si oxydation)
			Shadpour H. <i>et al.</i> , 2006		
PMMA	+++	> 340 nm	2,07 ± 0,07 (pH 9,2)	Oui	Acrylate (négative)
			Shadpour H. <i>et al.</i> , 2006		
PEGDA	+++	> 300 nm	NC	Oui	Acrylate / PEG (négative)
			Rogers C.I. <i>et al.</i> , 2011		
PEGDA / PMMA	+++	> 300 nm	0,63 ± 0,02 (pH 8,7)	Oui	Acrylate / PEG (négative)
			Sun X. <i>et al.</i> , 2009		
PDMS-co- PEO (5%)	+++	> 440 nm	2,5 ± 0,7 (pH 6,0) ; 5,7 ± 0,8 (pH 9,0)	Oui	Silanol (négative)
			Klasner S.A. <i>et al.</i> , 2009		
PDMS-co- PEO (10%)	++	> 440 nm	1,2 ± 0,3 (pH 6,0) ; 2,5 ± 0,3 (pH 9,0)	Oui	Silanol (négative)

COC	+++	> 360 nm	Klasner S.A. <i>et al.</i> , 2009			Cyclic olefin (négative si oxydation)
			3,08 ± 0,28 (TBE buffer)	Oui		
Thiolène	++	NC	Zhang J. <i>et al.</i> , 2008			Thiol / Allyl (NC)
			NC	Non		
SU-8	++	> 360 nm	Carlborg C.F. <i>et al.</i> , 2011			Epoxy / Phényle (négative)
			NC	Oui		
			Aura S. <i>et al.</i> , 2008			

Tableau XII : Liste des principaux matériaux polymères utilisés comme substrat pour les puces à μ EC (Nge P.N. *et al.*, 2013).

Une multitude de matériaux est ainsi disponible avec des chimies de surface différentes. Pour la plupart des matériaux, on constate que les charges de surface sont négatives ainsi qu'une grande disparité des μ eo engendrées dans les différents systèmes. Dans l'ensemble, les propriétés optiques de ces matériaux sont bonnes. Pour le thiolène, un des matériaux choisis dans cette étude pour la fabrication de puce à μ EC, seules des caractéristiques optiques ont été trouvées dans la littérature. En effet, aucune étude n'a déjà abordé le comportement de ces puces en thiolène en matière des μ eo et de stabilité ou fait part de leur utilisation pour l'analyse de molécules d'intérêt biologique comme l'ADN, les protéines ou les peptides.

4.2.3. Rappel des différents matériaux polymériques utilisés pour l'analyse de protéines en μ EC

Le développement des microsystèmes pour la séparation électrocinétique est en pleine expansion car ces systèmes cumulent les avantages inhérents à l'EC et les avantages liés à la miniaturisation,

comme la rapidité des analyses, la possibilité infinie de design de puces et des canaux, ou encore la facilité d'intégration de modules analytiques en ligne. Le PDMS est encore le matériau le plus couramment utilisé pour ces applications, mais de nouveaux matériaux aux propriétés intéressantes sont de plus en plus étudiés. L'analyse de composés biologiques, dont les protéines et les peptides est l'une des principales applications de ce type de microsystème et de nombreux matériaux ont été explorés dans cette optique. Quelques exemples sont détaillés ci-dessous.

Le COC a été utilisé pour l'analyse de la BSA après un revêtement dynamique de la surface avec de l'hydroxyéthyl cellulose (HEC). La HEC a permis une réduction de près de 72% de la μeo , passant de 3,08 à 0,85 E-08 $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 8,3. Le revêtement a permis en outre une hydrophilisation correcte de la surface avec des angles de contact de 90° pour le COC natif à 56,5° pour le COC modifié. Ces valeurs restent tout de même élevées et aucune expérience approfondie sur la réduction de l'adsorption de la BSA sur la surface n'a été réalisée (Zhang J. *et al.*, 2008). D'autres travaux portant sur le revêtement du COC ont été reportés à l'aide de polymères greffés en surface (Rohr T. *et al.*, 2003 ; Lin R. *et al.*, 2005 ; Roy S. *et al.*, 2013 ; Pu Q. *et al.*, 2007). Ces procédés assurent une hydrophilisation des surfaces compatible avec l'analyse de biomolécules. Cependant, ils nécessitent souvent des traitements d'activation des surfaces par plasma ou oxydation UV/ozone avant l'étape de collage des deux plaques de COC formant la puce (Tsao C.W. *et al.*, 2007) Ces protocoles sont donc longs et complexes et n'assurent pas la simplicité d'une application de ces matériaux pour la μEC . De nouvelles alternatives ont été proposées par Perez-Toralla *et al.* (2013) pour des revêtements de surface simplifiés et performants et seront plus détaillés par la suite.

Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) a été utilisé pour la fabrication d'un système microfluidique d'analyse en μEC capable de quantifier quatre biomarqueurs diagnostics ou pronostics de différents cancers à partir d'un échantillon de plasma sanguin humain. Le PMMA étant inerte vis-à-vis de la plupart des réactions chimiques, la surface a tout d'abord été recouverte par trois polymères à des proportions différentes à l'aide d'une irradiation UV : environ 60% de glycidyl méthacrylate (GMA), 40% de poly(éthylène glycol) diacrylate (PEGDA) et 0,5% de 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA). Ce revêtement permet ensuite le greffage d'anticorps spécifiques aux biomarqueurs sur les parois des canaux en COC. Une étape d'enrichissement permet ensuite de détecter en LIF les biomarqueurs dans le plasma sanguin après une séparation électrocinétique (Yang W. *et al.*, 2010).

Le PEGDA a démontré des propriétés optiques intéressantes similaires au PDMS, comme une faible auto-fluorescence du matériau. En faisant varier la composition du monomère et la concentration du photo-initiateur, on obtient un matériau présentant une hydrophilie intéressante pour une application à l'analyse de biomolécules. Ce matériau non revêtu a été utilisé pour séparer deux protéines modèles, la thyroglobuline et la β -lactoglobuline A, préalablement marquées par un agent fluorescent. Avec une puce en PEGDA, une diminution d'un facteur 6 de l'adsorption non spécifique des protéines a été observée par rapport à l'utilisation du PDMS (Rogers C.I. *et al.*, 2011).

4.3. Résultats

4.3.1. Etude du COC

Le COC est un thermoplastique qui peut donc facilement être produit en masse. Depuis peu, il est de plus en plus utilisé pour la microfabrication de systèmes microfluidiques, comme la μ EC ou les plateformes d'immunoaffinité sur surface plane, pour l'analyse de protéines (Nunes P. *et al.*, 2010 ; Ferrari A. *et al.*, 2011 ; Miserere S. *et al.*, 2012). Le COC présente de nombreux avantages tels que des propriétés optiques favorables (transparence vis-à-vis d'une large gamme de longueurs d'ondes, faible intensité d'auto-fluorescence), une résistance aux solutions aqueuses, ainsi qu'une stabilité chimique et thermique (Perez-Toralla K. *et al.*, 2010). Cependant, ce matériau à l'état natif est particulièrement hydrophobe et susceptible de favoriser l'adsorption non spécifique de biomolécules telles que les protéines ou les peptides. De plus, ce matériau est relativement inerte, ce qui rend la mise en place de revêtements de surface délicate, et nécessite généralement une activation préalable de la surface par traitement plasma ou irradiation UV. Peu de publications font état de protocoles efficaces pour lutter contre ces propriétés de surface désavantageuses afin d'employer le COC en μ EC (Lin R. *et al.*, 2005 ; Pu Q. *et al.*, 2007).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de ce matériau pour la séparation de protéines et peptides en μ EC. Une partie de l'étude a consisté à développer des protocoles de revêtements de surface efficaces, permettant de réduire l'hydrophobie des parois internes des microcanaux, et de limiter l'adsorption des biomolécules, tout en permettant de réduire efficacement la μ eo. Pour cela, deux polymères ont été utilisés, le Pluronic F 127 (PEO-PPO-PEO) et un monomère DMA auquel a été greffé des longues chaînes carbonées à deux pourcentages différents (0,35% de C22 ou 0,175% de C22). Cette partie du travail a été effectuée

par l'équipe de Jean-Louis Viovy à l'institut Curie. Afin d'exploiter le potentiel de ces microsystèmes, j'ai été amené à me former à l'Institut Curie aux techniques de microfabrication nécessaires à la fabrication de ces puces. Le protocole de microfabrication développé par cette équipe, et détaillé dans la partie **Matériels et méthodes**, m'a permis de réaliser mes propres systèmes qui ont été ensuite utilisés pour la μ EC.

Des puces simple croix, illustrées par la **Figure 66**, ont été obtenues par collage assisté par solvant d'une plaque de COC 8007 et d'un film fin de COC. Les canaux ont été préalablement imprimés en surface de la plaque de COC par pression du master à une température supérieure à la T_g du matériau.

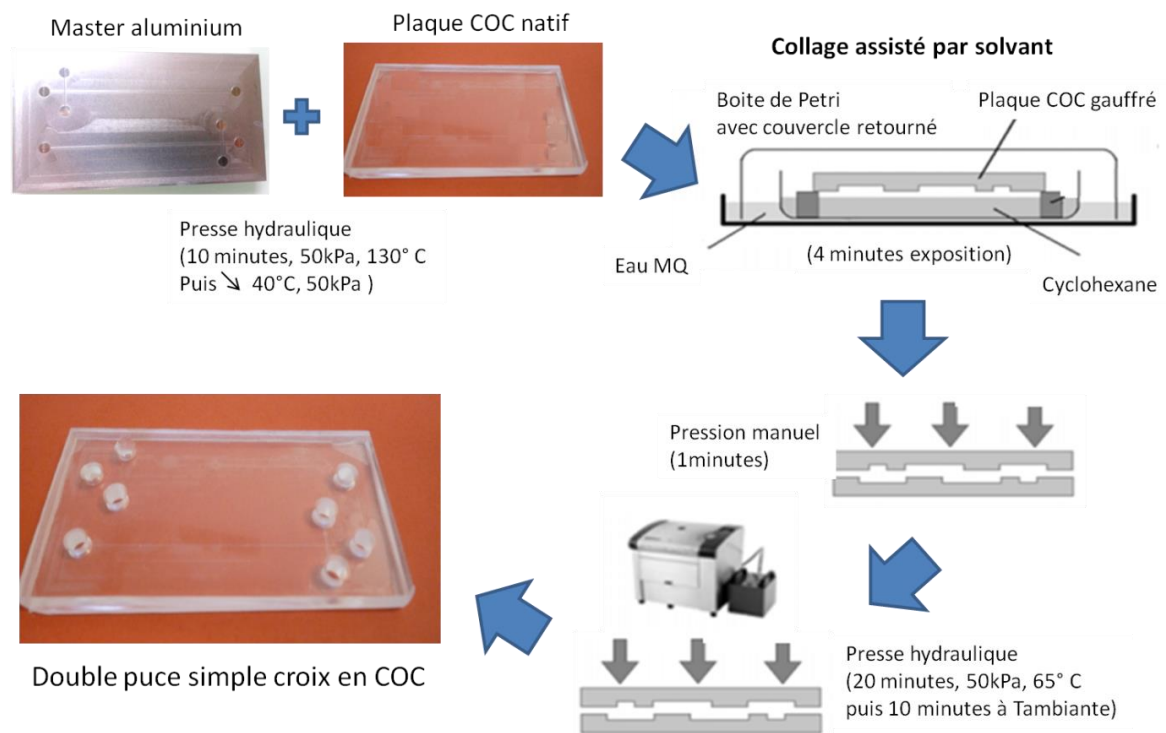


Figure 66 : Représentation schématique du processus de microfabrication d'une double puce en croix en COC avec des canaux de 100 μ m de diamètre réalisée grâce au support technologique de l'Institut Curie.

Dans un premier temps, nous avons choisi de reproduire des puces en COC ayant des dimensions de canaux comparables à celles des puces en verre. Cependant, la fabrication d'un master en aluminium produisant des canaux de 50 μ m de diamètre a été un échec car les fraises utilisées étaient trop fragiles et ne permettaient pas de finir l'usinage. Le choix s'est donc porté sur des canaux de 100 μ m de diamètre avec une longueur du canal de séparation de 5 cm.

Cependant, lors de l'utilisation de ces puces en tant que support de μ EC, de nombreux problèmes techniques liés à la microfabrication sont apparus. En effet, lors des essais préliminaires et quelle que soit la puce utilisée, nous avons rapidement remarqué des fuites de l'échantillon entre les deux couches de COC. Cette observation nous a menés à mettre en cause l'efficacité du collage lors de la préparation des puces. Ce défaut de stabilité du collage au niveau des canaux peut être lié à la technique de microfabrication du moule par micro-usinage, qui ne permet pas l'obtention d'un motif de canal aux angles parfaitement droits, empêchant ainsi un collage uniforme et créant des espaces potentiels de diffusion le long des microcanaux. De plus, même si le procédé de collage a été optimisé, son application sur des surfaces aussi larges entraîne des difficultés liées aux contraintes mécaniques mais aussi à la planéité des surfaces lors du collage de la couche supérieure de la puce par pression. Au vu de ces difficultés rencontrées pour l'obtention de puces en COC applicables à des tests préliminaires de séparation en μ EC, et en raison d'un manque de temps pour optimiser davantage les étapes de microfabrication des puces en COC, notre attention s'est par la suite tournée vers l'utilisation de puces en thiolène.

L'équipe de Jean Louis Viovy à l'Institut Curie a néanmoins continué en parallèle à améliorer ces conditions expérimentales sur des puces similaires afin de caractériser les comportements de celles-ci pour une application en μ EC. Les données issues de l'étude de cette équipe ont fait l'objet d'une publication (Perez-Toralla K. *et al.* 2013). Les résultats obtenus sont brièvement présentés ici afin de servir de base à une comparaison avec l'étude réalisée sur les puces en thiolène et décrite dans la section suivante. Pour le revêtement des canaux en COC par les deux polymères Pluronic F127 et DMA-C22, deux milieux de solubilisation ont été évalués, le PBS et l'éthanol, afin de définir les conditions favorables à l'adhésion des polymères en surface.

Le **Tableau XIII** résume les valeurs des μ_{eo} obtenues pour chaque solution de polymère et les coefficients de variation correspondants, qui ont été évalués à partir d'un minimum de 3 mesures. De plus, les angles de contact résultant de la modification de surface ont été mesurés afin de déterminer l'apport des différents polymères en matière d'hydrophilisation des surfaces.

Solution de polymère	Polymère	Concentration du polymère en % (m/v)	Angle de contact ($^{\circ}$) $\pm \sigma$	μ_{eo} (PBS pH 7,4) ($E-08 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	CV des μ_{eo} (%)
-	COC natif	-	$89,4 \pm 2,7$	2,76	5,07

PBS	Pluronic® F127	0,1	83,2 ± 1,3	0,68	8,82
	DMA-M (0,35% C22)	0,01	72,7 ± 1,2	0,85	16,47
	DMA-S (0,175% C22)	0,01	72,1 ± 1,1	1,43	13,29
EtOH	Pluronic® F127	0,1	85,2 ± 1,9	1,82	9,89
	DMA-M (0,35% C22)	0,1	74,8 ± 1,3	1,23	3,25
	DMA-S (0,175% C22)	0,1	77,7 ± 1,8	0,75	20,00

Tableau XIII : Valeur des μ_{eo} et des angles de contact après différents protocoles de revêtements des puces en COC (Perez-Toralla K. *et al.* 2013).

Les trois polymères utilisés ont démontré une capacité à augmenter la mouillabilité et l'hydrophilie des surfaces au regard des baisses des valeurs d'angle de contact de 5% à 20% selon les cas. Ces valeurs sont en adéquation avec les valeurs obtenues par d'autres auteurs après le traitement de surfaces hydrophobes comme le PMMA par des polymères physisorbés (Yasui T. *et al.*, 2011). L'hydrophilisation de la surface avec ces polymères est cependant nettement moins bonne que lorsque le COC est activé par un traitement de surface UV/ozone au préalable. Dans ce cas, la valeur d'angle de contact chute à moins de 50° et ce de manière stable pour une période minimale de 15 jours (Tsao C.W. *et al.*, 2007). L'un des avantages de ces nouveaux protocoles de recouvrement réside dans leur simplicité de mise en œuvre et sur la possibilité de les régénérer quel que soit le temps écoulé après la fabrication de la puce.

En ce qui concerne les diminutions de μ_{eo} mesurées avec les différentes solutions polymériques, on constate globalement un net abaissement des valeurs mesurées à pH 7,4 avec un tampon PBS. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le Pluronic dissous dans du PBS et le DMA-S dissous dans de l'éthanol. Cependant, on remarque que dans les deux cas, les μ_{eo} mesurées ne semblent pas stables avec des coefficients de variation de près de 9% pour le Pluronic et 20 % pour le DMA-S. Cette instabilité de la μ_{ep} au sein des capillaires revêtus par ces différents polymères est

pour le moment un frein majeur au développement de méthodes de séparation électrocinétique répétables. Cependant, cette nouvelle approche de modification des surfaces du COC sans traitement chimique lourd ni activation par des sources UV, plasma ou gaz, est une réelle avancée vers une utilisation simplifiée et performante de ce matériau en μ EC.

4.3.2. Etude du thiolène

Le thiolène est un matériau polymère composé classiquement de deux monomères, l'un ayant des groupements fonctionnels thiols et l'autre des groupements fonctionnels allyls. Les trois monomères les plus couramment utilisés sont des dérivés du triallyl, du tétrathiol et du trithiol. Lors de la polymérisation, l'emploi de rapports non stœchiométriques des deux monomères génère un excès de l'un des monomères qui se caractérise par la présence en surface du matériau d'un excès du groupement fonctionnel correspondant au monomère le plus abondant. Les voies de polymérisation du thiolène et la structure des monomères sont illustrées sur la **Figure 67**.

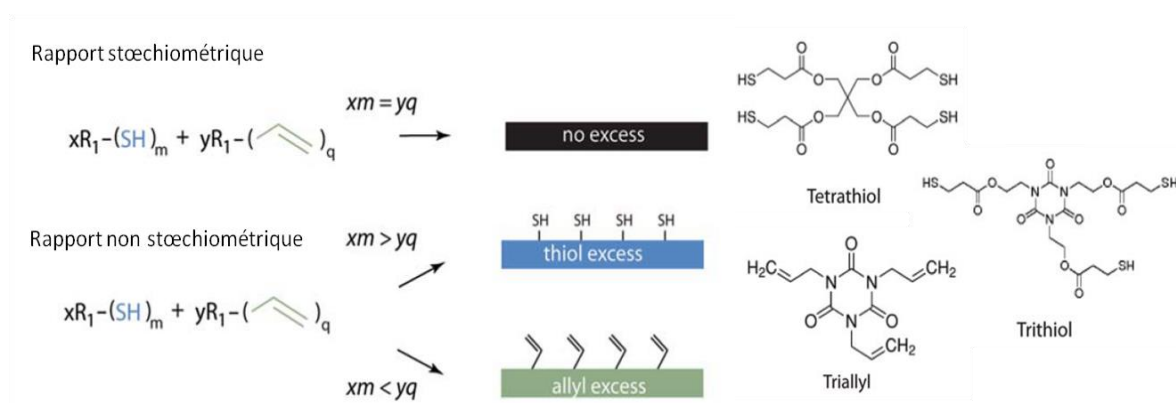


Figure 67 : Représentation schématique de la chimie de surface du thiolène lors du mélange d'un rapport stœchiométrique ou non stœchiométrique d'un monomère de type allyl et d'un monomère de type thiol, et représentation des structures chimiques des principaux monomères (Carlborg C. *et al.*, 2011).

En plus de sa simplicité de fabrication à grande échelle, de son faible coût et des propriétés optiques satisfaisantes du matériau, la présence d'un excès de groupement thiols, très réactifs et d'une grande spécificité de réaction à la surface du matériau permet d'envisager le développement de stratégies de recouvrement basées sur la chimie click du thiolène (Hoyle C.E. *et al.*, 2010).

Nous avons étudié le comportement des puces en thiolène, fabriquées dans un laboratoire partenaire appartenant au Danmarks Tekniske Universitet (Danemark), pour une application en μ EC. Dans un premier temps, nous avons mesuré sur une large gamme de pH les μ eo obtenues au sein de puces en thiolène natives et nous les avons comparées aux μ eo obtenues sur puce en verre vierge. Une stratégie de recouvrement de ces surfaces en thiolène a ensuite été envisagée. Dans cette perspective, une collaboration avec le groupe de Chiari a été établie. Cette équipe a synthétisé deux nouveaux polymères, le DMA-PMA et le DMA-PMA-MAPS, qui s'appuient sur la chimie click du thiolène pour se lier de manière covalente aux surfaces présentant des groupements thiols. L'influence du pourcentage de thiols présents à la surface a été évaluée en comparant les comportements des puces composées d'un excès de 20% ou de 40% du monomère tétrathiol. Les performances de ces différents polymères pour le recouvrement des différentes puces en thiolène ont été estimées en mesurant sur une large gamme de pH, les μ eo respectifs ainsi que la stabilité des revêtements. Le pouvoir d'hydrophilisation de ces deux polymères a ensuite été évalué en comparant les angles de contact avant et après les différents traitements de surface. Les résultats obtenus ont permis d'aboutir, pour la première fois, à la séparation électrocinétique de protéines au sein d'une puce en thiolène. Les travaux réalisés dans le cadre de cette étude sur puce en thiolène sont explicités dans l'**Article 3** en cours de soumission au journal *Lab on a Chip*.

4.3.2.1. *Article 3 : Thiolenes as a new material for on-chip electrophoretic separations of proteins*

Thiolene as a new material method for on-chip electrophoretic separation of proteins

Kiarach Mesbah^{1,2}, **Laura Sola**³, **Marcella Chiari**³, **Thomas Glasdam Jensen**⁴, **Joerg Kutter**⁴ and **Myriam Taverna**^{1,2}

¹ Univ Paris-Sud, Faculté de pharmacie, « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives », 92296 Chatenay-Malabry, France

² CNRS UMR 8612, Institut Galien de Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

³ Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM) - C.N.R., Via Mario Bianco, 9, 20131 Milano, Italy

⁴ Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, DTU, 2800 Kgs Lyngby Denmark

Correspondence: Pr. Myriam Taverna, Institut Galien Paris Sud, Laboratoire des Protéines et Nanotechnologies en Sciences Séparatives, Université Paris-Sud, 92296 Chatenay-Malabry, France

E-mail: myriam.taverna@u-psud.fr

Fax: +33-1-46-83-54-62

List of abbreviations used: μ CE, microchip capillary electrophoresis; PDMS, polydimethylsiloxane; PEGDA, Poly(*ethylene glycol dimethacrylate*); PC, Polycarbonate; PMMA, Polymethyl Methacrylate; EOF, electroosmotic mobility

Keywords: Thiolene microsystem, electrokinetic separation, proteins, polymeric coating, microchip electrophoresis

Introduction

Electrokinetic separation which affords high efficiencies, low sample consumption and fast analyses are easily implemented in microdevices. Electrokinetic separation in microdevices (μ CE) has received increasing attention in last two decades due to its wide range of application from environment (Chen G *et al.*, 2006) or food (Kubáň P. *et al.*, 2005) to clinical diagnosis

At the beginning of microfluidic device development, silicon and glass were the first materials used to microfabricate planar chip for μ CE. The first successful separation of two fluorescent dyes appeared in 1992 (Manz A *et al.*, 1992). Few years later, polydimethylsiloxane (PDMS) was introduced as a microfluidic substrate and was employed to the μ CE separation of DNA fragments (Effenhauser C.S. *et al.*, 1997). Until now PDMS is still the most common microdevice substrate used in academic laboratories (Nge P.N. *et al.*, 2013). Nevertheless, numerous alternative polymers have attracted researcher's attention in the past 15 years due to their interesting properties for μ CE. Indeed, polymers are advantageous for microfluidic device fabrication because they are relatively inexpensive, compatible with various microfabrication processes (micromachining, photolithography, replica molding, embossing, and injection molding etc.), their ease of implementation for μ CE (Fiorini G.S. *et al.*, 2005) and the possibility to tune and adapt their properties through formulation changes or chemical modification. Polymeric microdevices showing adequate properties have then been applied successfully to protein separation in MCE (Tran N.T. *et al.*, 2010; Shadpour H. *et al.*, 2006) (Nge P.N. *et al.*, 2013) such as COC (Zhang J. *et al.*, 2008), PC (Shadpour H. *et al.*, 2007), PMMA (Yang W. *et al.*, 2009), PEGDA (Rogers C.I. *et al.*, 2011), or PEG-functionalized acrylic copolymer (Sun X. *et al.*, 2009).

More recently Thiol-ene polymers were introduced as a material for Lab-on-chip devices. Initially, thiol-ene polymers were used in the form of the commercially available NOA adhesives (Norland Optical Adhesives, Norland Products, USA). In 2004, Harrison *et al.*, (Harrison C. *et al.*, 2004) showed for the first time, that the NOA formulations could be used for prototyping solvent resistant devices. Later, the use of NOA was expanded to a number of microfluidic applications, including various emulsions schemes (Wägli P. *et al.*, 2011; Hung L.H. *et al.*, 2008; Levaché B. *et al.*, 2012) as well as cell culturing (Levaché B. *et al.*, 2012). Simultaneously, as the interest for the thiol-ene based NOA adhesives increased, several groups started experimenting with custom made thiol-ene formulations. By customizing the stoichiometry of the reactants, the bulk and surface properties can be tuned as reported by Good *et al.*, (2007), Hagberg *et al.*, (2007), and Carlborg *et al.*, (2011). When the thiol-ene formulation is prepared with a high excess of the monomer containing the thiol groups, Pentaerythritol tetrakis-(3-mercaptopropionate) ('tetrathiol') not all those thiol groups are consumed in the crosslinking process and hence some of the excess groups are available on the surface of the device. It was recently shown that substrates made from a mixture containing 90 % excess of thiol groups, would feature more than 100 thiol moieties per square nanometer (Lafleur J.P. *et al.*, 2013). It was demonstrated that these excess groups can be exploited to create covalent bonds to organic dyes (Carlborg *et al.*, 2011), enzyme-protein conjugates (Lafleur J.P. *et al.*, 2013), but also to alter the hydrophilicity (Carlborg C.F. *et al.*,

2012) and bonding properties (Saharil F. *et al.*, 2012) of the chip material. Custom made thiolene mixtures have been used for nanoimprinting (Hagberg E.C. *et al.*, 2007), fabricating waveguides (Baylor M.E. *et al.*, 2011; Zhuang C. *et al.*, 2014; Kwapiszewski R. *et al.*, 2013; Feidenhans L. *et al.*, 2014), and also modified to form epoxy groups [(Haraldsson T. *et al.*, 2014). In general, the surface chemistry of thiol-ene materials, in particular with excess thiol moieties, makes them readily available for a number of modification approaches such as polymeric wall coating, not least the wide variety of click chemistry reactions (Thirumurugan P. *et al.*, 2013). Very recently, Sikanen *et al.* (2013) demonstrated for the first time that custom made thiolene chips could be used for the separation of two fluorophores by microcapillary electrophoresis. However, nothing else is known about thiolene behavior and performance in μ CE analysis.

However, polymeric materials used for microdevice fabrication present some limitations for direct application to biomolecules or biological fluid analysis due to their high hydrophobicity and their tendency to adsorb analytes such as proteins. Indeed strong adsorptions of proteins, in particular on the PDMS surface, have been frequently reported (Anderson, J. R. *et al.*, 2000). To overcome this problem, numbers of polymeric substrate surface treatments have been developed depending on the surface chemistry and the application (Zhou J *et al.*, 2010) (Wu D *et al.*, 2008)(Liu J *et al.*, 2006). For widely used polymeric microdevice such as PMMA, PDMS or COC, most of the surface modification methods leading to an increase of wettability and hydrophilicity have been obtained with the help of covalently grafted polymer layer using UV illumination (Rohr, T., Ogletree, D. F., Svec, F., & Fréchet, J. M. (2003). *Advanced functional materials*, 13(4), 264-270.) or with surface activation step via oxygen plasma or UV/O₃ oxidation Tsao, C. W., Hromada, L., Liu, J., Kumar, P., & DeVoe, D. L. (2007). *Lab on a Chip*, 7(4), 499-505). Those approaches are quite time consuming and difficult to implement. The need of simple method to coat polymeric microdevice is great for the analysis of biomolecules in the clinical field.

For instance, no surface modification method for μ EC analysis using thiolene microchip has been reported. In order to coat thiolene surface in our work we have synthesized two copolymers based on the 3-trimethylsilyl-prop-2-yn methacrylate (PMA) and the N,N-dimethylacrylamide (DMA). The PMA can covalently bind to the thiol groups present on the surface and then make strong and stable polymeric layer. The (DMA) is well known to reduce analyte adsorption by hydrophilizing the silica surface (Chiari *et al.* Electrophoresis 2000 ; Cretich M. *et al.*, 2005). In addition, one copolymer contains a monomer of 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MAPS) to estimate its supply in polymeric layer stabilization. The entire process is quite fast and very easy to implement as only few minutes UV illumination is required.

Here we propose for the first time a comprehensive study on thiolene planar microchip devoted to μ CE separation of proteins. Different percentages of excess thiol groups (20% and 40%) as substrate formulation were used to produce the microchip microfabrication using different proportion of Pentaerythritol tetrakis-(3-mercaptopropionate) ('tetrathiol') and 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione ('triene'). Then two new copolymers able to form a coating on thiolene by a UV thiol-yne assisted reaction were investigated. The copolymer backbone is made of dimethylacrylamide bearing both silanols and -yne groups in one case (DMA-PMA-MAPS) or just an -yne group in another configuration (DMA-PMA). Contact angles inside native and modified microchannels have then been measured to estimate the ability of the DMA-PMA-MAPS and DMA-PMA, to improve the wettability and the hydrophilicity of the surface. EOF mobility (μ_{eo}) measurements have also been performed on a wide range of pH for both coated and uncoated microchip to evaluate their coating properties, the surface charge shielding and their stability. The ability of these two polymeric coating to prevent the adsorption of fluorescently labeled proteins was also

evaluated. Finally, the electrophoretic separations of two model proteins (BSA-FITC and Trypsin inhibitor labelled by Alexa488) were performed for the first time in these new thiolene chips using DMA-PMA-MAPS as surface coating.

Experimental

1. Reagents and materials

Pentaerythritol tetrakis-(3-mercapto-propionate) ('tetrathiol') and 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione('triene') were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis,MO, USA). Poly(dimethyl siloxane) (PDMS) was prepared at a 1:10 w/w ratio from Sylgard 184 base elastomer and curing agent (Dow Corning, USA). Trimethylsilylpropyn-1-ol, triethylamine (TEA), diethyl ether (Et₂O), methacryloyl chloride (CH₂CCH₃COCl), tetrahydrofuran (THF), α,α' -azoisobutyronitrile (AIBN), petroleum ether (EtP) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis,MO, USA). Fluorescein conjugate albumin from bovine serum (BSA-FITC), soybean trypsin inhibitor Alexa Fluor® 488 conjugate and Phosphate Buffered Saline (PBS, pH = 7,4) were purchased from Life Technologies. Sodium hydroxide, citric acid, and hydrochloric acid were purchased from VWR. Acetic acid glacial (>99,85%), Hepes (titration, >99,5%), sodium phosphate dibasic (BioXtra, >99%), sodium phosphate monobasic (BioXtra, >99%) and boric acid were purchased from Sigma-Aldrich. Lysozyme-FITC and Fluoprobes® 488 NHS ester were purchased from Interchim (France). Ortho-Phosphoric acid (85%) was purchased from Merck. Fused silica capillaries (50µm id, 375 µm ed) were purchased from Phymed (France). Simple cross glass microchip was purchased from Micralyne (Edmonton, Canada)

2. Instrumentation

A HVS448 6000 D power supply from Labsmith (Livermore, CA, USA) controlled by a workstation was employed to provide high voltages for the microchip capillary electrophoresis. Platinum electrodes were inserted into the reservoirs, providing electrical contact from the power supply to the electrolyte solutions. An inverted fluorescence microscope Axio Observer A1 from Carl Zeiss (Marly le Roy, France), equipped with a 20X objective lens (Carl Zeiss) was used to detect in real time the selected detection zone inside the microchannel. For fluorescence detection, the illumination was done by a HXP 120 C mercury arc lamp from Carl Zeiss. A CCD camera Orca-03G02 from Hamamatsu (Hamamatsu, Japan) was used to capture images of the detection zone. HCImage software (Hamamatsu, Japan) was used to optimize the framerate, light sensitivity and to define the region of interest. Azur software (DATALYS, France) was used to convert the mean grey scale from CCD as a function of time into electropherograms.

3. Microfluidic device fabrication

The thiolene chips were fabricated following the procedure reported in (Sikanen T.M. *et al.*, 2013) with the exception that a cleanroom fabricated silicon wafer was used as part of the master mould to ensure well defined channel dimensions. Prior to filling the PDMS moulds the thiolene monomers 'tetrathiol' and 'triene' was mixed in two different ratios, hence the chips were made from parts with either 20% or 40% excess of thiol groups. Each thiolene part was exposed for one minute on each side(Dymax 5000-EC Series UV curing flood lamp, Dymax Corp., Torrington, CT, USA, ~40 mW cm⁻² at 365 nm). The cured chip parts were then placed in conformal contact and heated to 70°C for 10 minutes to increase the softness.

The parts were then gently pressed together and exposed to UV light for 2 minutes. The single cross thiolene chips design and its dimensions are illustrated by the Figure 1.

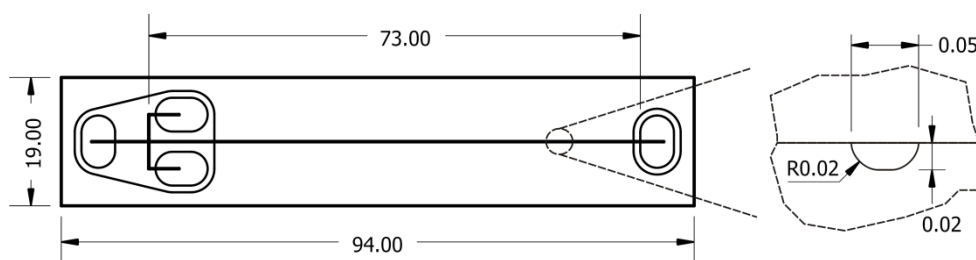


Figure 1: dimensions (mm) and shape of the single cross thiolene chip (left) and of its microchannel section (right).used in this study

4. Copolymer synthesis

4.1. Polymer synthesis

Synthesis of 3-trimethylsilanyl-prop-2-yn methacrylate (PMA)

According to Ladmiral et al (V. Ladmiral, G. Mantovani, G. J. Clarkson, S. Cauet, J. L. Irwin, and D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4823-4830) trimethylsilylpropyn-1-ol (2,31 ml, 15,6 mmol) and triethylamine (2,83 ml, 20,27 mmol) were dissolved in Et₂O (20 ml) and cooled to -20°C. A solution of methacryloyl chloride (1,81 ml, 18,56 mmol) in Et₂O (10 ml) was added drop wise over 1 hour. The mixture was stirred at -20°C for 30 minutes and then overnight at room temperature. Ammonium salts were removed by filtration and the volatiles were removed under reduced pressure. The yellow oil residue was purified by flash chromatography (EtP:Et₂O=50:1, R_f= 0,39) (2,48 g, 12,64 mmol, Yield 81%).

Synthesis of copoly(N,N-dimethylacrylamide (DMA)- 3-trimethylsilanyl-prop-2-yn methacrylate (PMA)- 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate (MAPS), copoly(DMA-PMA-MAPS).

The polymer was synthesized via random radical polymerization in anhydrous tetrahydrofuran with a 20% w/v total monomer concentration. The DMA was filtered on aluminium oxide to remove the inhibitor. The molar fractions of the monomers DMA, PMA and MAPS were 97:2:1. The DMA and PMA monomers were dissolved in dried tetrahydrofuran (THF) in a round-bottom flask equipped with condenser, magnetic stirring, and nitrogen connection. The solution was degassed by alternating an argon purge with a vacuum connection, over a 10-min period. MAPS and α,α' -Azoisobutyronitrile (this latter at 2mM of final concentration) were added to the solution, which was then warmed to 65°C and maintained at this temperature under a slightly positive pressure of argon for 2 h. After the polymerization was completed the solution was first diluted to 10% w/v with dry THF and the polymer precipitated by adding petroleum ether (10 times the reaction volume). The product, a white powder, was filtered on Buckner funnel and dried under vacuum at room temperature. The protective trimethylsilyl groups were removed in water under basic condition, using K₂CO₃ (9mM) at pH 9. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1h, then the polymer was dialyzed, lyophilized and the white powder obtained was stored at -20°C.

Synthesis of copoly(N,N-dimethylacrylamide (DMA)- 3-trimethylsilanyl-prop-2-yn methacrylate (PMA), copoly(DMA-PMA).

The synthesis procedure is identical to that used for Copoly(DMA-PMA-NAS) the only difference is in the molar fraction of the DMA and PMA which was 97:3 in this case.

4.2. $^1\text{H-NMR}$ characterisation of copolymer chemical structure

PMA:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 0,18$ (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); 1,97 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}_2$); 4,76 (s, 2H, OCH_2); 5,62 (m, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$); 6,17 (m, 1H, $\text{C}=\text{CHH}$).

copoly(DMA-PMA-MAPS):

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) *protected*: $\delta = 0$ ($\text{Si}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 33-38 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ chain); 45,31 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}\equiv$); 50 ($\text{Si}(\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$); 52,08 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); 76-77 ($-\underline{\text{C}}\equiv\underline{\text{C}}$); 172-174 ($\text{C}=\text{O}$).

copoly(DMA-PMA):

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) *deprotected*: $\delta = 33-38$ ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ chain); 45,31 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}\equiv$); 52,08 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$); 76-77 ($-\underline{\text{C}}\equiv\underline{\text{C}}$); 172-174 ($\text{C}=\text{O}$).

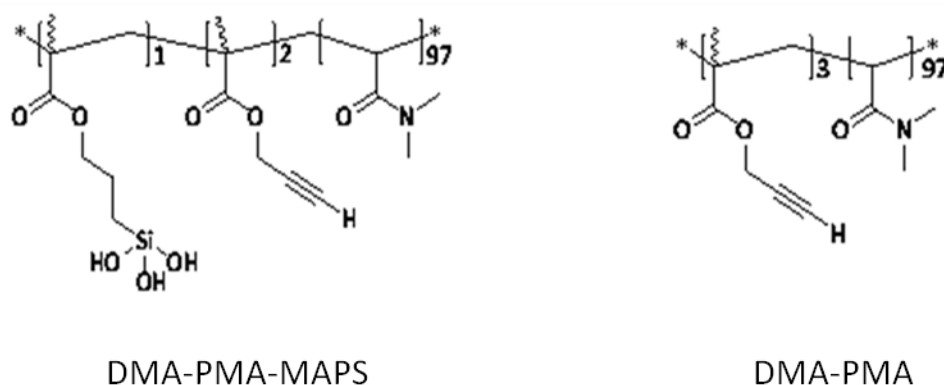


Figure 2: Structure of the copolymers used for the surface treatment of the thiolene microchips.

5. Surface modification of thiolene

Two percentages of thiol excess were used for microfabricating the chips: 20 % and 40% excess of thiols. For each percentage, three kinds of chips were used: Uncoated, coated with the DMA-PMA-MAPS and coated with DMA-PMA. The channels in the thiolene chip were filled by adding the polymer solution to the inlet reservoirs and applying vacuum to the outlet and exposing them to UV ($\sim 40 \text{ mW cm}^{-2}$ at 365 nm) for 6 x 1 minute, with a minimum of 1 minute pauses between each cycle to prevent the solution from overheating. The channels were subsequently flushed with MQ water. The structures of DMA-PMA-MAPS and DMA-PMA copolymers are detailed in Figure 2.

6. Contact angle measurements

Contact angles were measured inside the microchannel of different microchips using a procedure adapted by (Zhuang C. *et al.*, 2014) and illustrated by Figure 3. Briefly, for each chip, the buffer waste reservoir was filled with MQ water and the water was allowed to penetrate into approx 2cm of the channel by capillarity. The reservoir was then emptied to suppress the gravity effect. After 2 min, a picture of the interface water/air was taken. This was repeated 4 times at different location to ensure a representative mean value. The contact angles were then estimated with ImageJ software and the standard deviation calculated for each kind of chip.

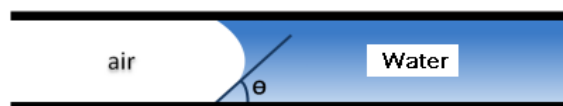


Figure 3: Interface water/air in a microchannel and resulting contact angle θ .

7. EOF mobility measurements

The electroosmotic mobility in uncoated and coated microchips microchannels was determined according to the constant effective mobility method as described by Wang *et al.*, (2007). As the EOF was expected to be low in the coated microchips, a charged fluorescent dye, the Fluorobes® 488 NHS ester, was analysed to evaluate the EO mobility (μ_{eo}) in each buffer. The μ_{ep} of the 488 NHS was estimated in each condition using capillary electrophoresis measurements (nom de l'appareil, Beckman). The μ_{eo} was then estimated for each investigated buffer by subtracting the μ_{ep} obtained by CE under the same conditions from the μ_{app} determined from microchip experiments. The μ_{EOF} values in uncoated and coated channels were evaluated at different pHs ranging from pH 3,5 to 9,0. RSDs for μ_{EOF} were also estimated at each pH by measuring μ_{EOF} from 5 successive analyses.

8. Protein non-specific adsorption measurements

In order to measure the amount of protein eventually adsorbed on the microchip wall, we used a fluorescently labeled protein (FITC-BSA). All rinsing steps were performed by applying vacuum (30mbar) at the buffer waste reservoir using a vacuum pump. The channels were first filled entirely with $1\times$ PBS and a picture of the channel was taken as a blank. Then, the protein solution (0,1% wt BSA-FITC in $1\times$ PBS buffer) was introduced into the channel by applying vacuum for 5 min and was then incubated for 10 minutes at room temperature without flow. The channels were then rinsed with $1\times$ PBS for 10 min to remove all unbound proteins. Three consecutive cycles of adsorption of fluorescently labeled proteins followed by a washing step with buffer were performed. Pictures of the channel were taken before the experiment and after each incubation/rinsing cycle. The fluorescence intensities were then quantified using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) inside and outside the channels. The excitation light intensity, the frame per seconds (5 fps) and the exposure times were kept constant (200 ms) for all measurements.. The fluorescence values estimated inside the channel were corrected by subtracting from the intensity measured, both the dark noise of the camera and the measured intensity outside the channel, (corresponding to the autofluorescence of the thiolene material). The resulting fluorescence signals reflect the amount of proteins that adsorbed to coated or uncoated Thiolene chips.

9. Protein electrophoresis in thiolene chip

The thiolene single cross microchip coated with the copolymer DMA-PMA-MAPS has been used to perform a separation of two acidic proteins labeled with fluorescent dye: BSA-FITC ($pI=4,7$, 66kDa without the labeling agent) and Trypsin inhibitor-Alexa Fluor 488 ($pI=4,5$, 20kDa without the labeling agent). The electrophoretic buffer was PBS (50 mM, pH 7,4). The sample was a mixture containing Soybean Trypsin inhibitor Alexa Fluor® 488 conjugate at $12,5\mu\text{M}$ and BSA-FITC at $20\mu\text{M}$ in a PBS buffer, pH 7,4, 5mM. The pinched injection step was performed by applying the following voltages: S: -100V, B: -50V, SW: 100, BW: -500V. The separation step was thus performed by applying: S: 100V, B: -50V, SW: 100,

BW: 3000V. The fluorescence was monitored with a CCD camera as described in the previous section. For the repeatability study, 5 successive separations were performed without no inter-run rinsing step. The detection of the fluorescently labelled proteins was performed at 2mm from the injection point (cross intersection).

Results and discussion

1. Modification of the thiolene microfluidic channels

In microchip electrophoresis (CE) performed on plastic material it is often necessary to coat the channel wall, not only to suppress or tune the electroosmotic flow but also to avoid analyte adsorption. In some cases, for instance at high pHs, the EOF may be too fast resulting in some difficulty to separate the analytes based on their electrophoretic mobility difference. In addition, the negatively charged wall can cause adsorption of cationic solutes through coulombic interactions. An effective modification of surface properties is generally achieved by coating the wall with polymers. Neutral polymers physisorbed or chemisorbed on the capillary wall strongly decrease EOF by shielding surface charge and by increasing local viscosity.

Two neutral copolymers devoted to the thiolene channel coating: the DMA-PMA-MAPS and the DMA-PMA. They are currently under development by Chiari's group to produce unreactive to protein surfaces for microarray (Unpublished results). The NMR proved the chemical structures of the polymer synthesized. We have modified the dimethylacrylamide polymer backbone we reported previously (Chiari M. *et al.*, 2000) (Cretich M. *et al.*, 2005) with yne-groups to promote a covalent reaction between thiols on the surface of the material and yne groups on the polymer. This addition reaction is typically facilitated by a radical initiator or UV irradiation and proceeds through sulfanyl radical species. Besides covalent reaction of the polymer with the surface, we also exploited the condensation of silanols belonging to different chains to further stabilize the coating. The results of the investigation on the characteristics of the coating formed by polymers with or without silanols proved that, a combination of physisorption, chemisorption and polymer condensation allowed a dramatic increase coating adhesion strength on thiolene leading to coatings of longer lifetime stability. The channel walls were coated by simple filling the polymeric solution into the reservoir and by applying the vacuum to let the solution come into the channels. A simple and fast UV illumination led to the covalent bounding of the copolymer on the thiol surface.

2. Coating Characterization

Contact angles of the uncoated and coated channels were measured to evaluate the adsorption efficiency of the polymer layer on the thiolene surface. The chip composed of 20% or a 40% excess thiols. As shown in Table 1, the contact angles measured for native thiolene surfaces composed of 20% ($60,0 \pm 2,7$) and 40% excess of thiols ($56,2 \pm 1,7$) are quite high when compared to other polymeric materials widely used in microchip fabrication such as COC (Perez-Toralla, Karla, *et al.*, 2013), PMMA (Yasui, Takao, *et al.*, 2011) or PDMS (Poitevin M. *Et al.*, 2009). This demonstrates the hydrophilic character of the thiol groups present in the native material. In the case of coated chips, we observed a marked decrease of this angle showing that both coatings led to more hydrophilic surfaces, whatever the thiol percentage of the material. Quite similar values were observed for the DMA-PMA-MAPS and the DMA-PMA coatings. However, DMA-PMA-MPAS showed the highest reduction in contact angle for the 20% excess thiol material ($34,2^\circ \pm 1,9$) while the DMA-PMA showed the lower value of contact angle for the 40% excess thiol chip ($31,0^\circ \pm 2,6$). The higher thiol

group density on the surface of the 40% excess thiol material probably favors the attachment of copoly(DMA-PMA) but reduces that of the silane polymer. The reason for this observed behaviour could be the electrostatic repulsion between silanols and thiols that are both negatively charged. With a neutral polymer such as copoly(DMA-PMA) a higher thiol density provides a higher number of thiols facilitating the covalent reaction with the -ynes on the polymer.

Table 1: Water contact angles measured in uncoated and coated thiolene microchannels made of different percentage of thiol excess.

Thiolene composition	Contact angle (°)	
	20 % excess thiol	40 % excess thiol
Uncoated	60,0 ± 2,7	56,2 ± 1,7
DMA-PMA-MAPS	34,2 ± 1,9	41,6 ± 3,3
DMA-PMA	40,4 ± 2,9	31,0 ± 2,6

3. EOF mobility measurements

The μ EO has been measured in the 40% excess native thiolene microchip and on uncoated glass microchip. All the measurements have been repeated three times. The figure 4 summarizes the EO mobility as a function of the pH of the BGE.

3.1. Native thiolene chip

The μ EOF in native thiolene chip (40% excess of thiolene) increased from pH 3,5 to pH 9,5 in a very similar manner to what is observed in glass microchips. However, we observed a significantly higher EO mobility at pH 3,0 in thiolene chip compared to the glass one (Figure 4). For both uncoated glass chips and 40 % excess thiol chips, the RSD of meo were very low at acidic or alkaline pHs (less than 3 % at pH 3,0 and pH 9,2) whereas higher RSDs (from 3- to 8%) are observed for uncoated chips at pH closer to the neutral one (pH 5,0 and 7,4).

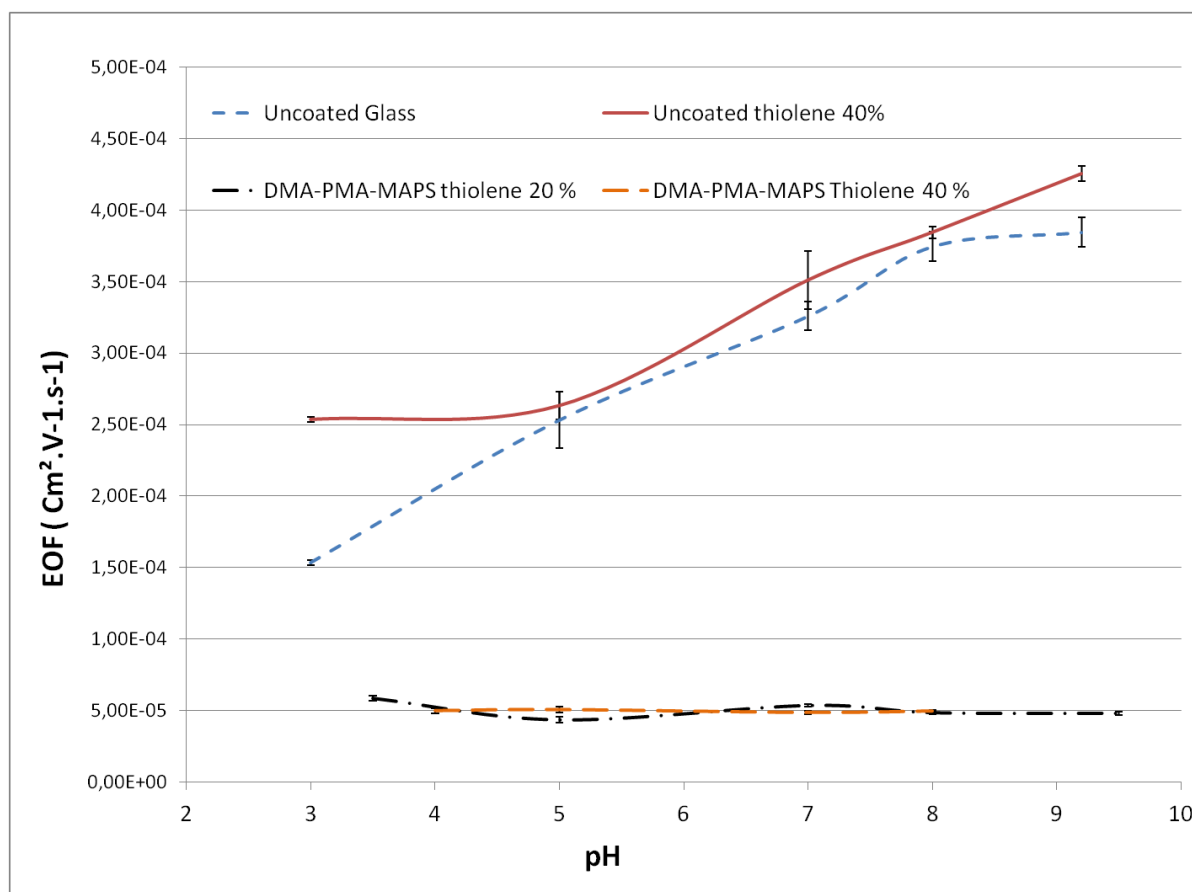


Figure 4: EO mobility vs pH for uncoated glass chip (blue), uncoated thiolene 40 %excess (red), 40 % excess thiolene chip with DMA-PMA-MAPS coating (orange), 20 % excess thiolene chip with DMA-PMA-MAPS coating (black). All buffers were prepared at an ionic strength of 50 mM. BGE: pH 3,0 (citric Acid/NaHPO₄); pH 3,5 (Phosphoric Acid/NaH₂PO₄); pH 5,0 (acetic Acid/NaOH); pH 7,4 (Phosphoric Acid/NaOH); pH 8,0 (Hepes/HCl); pH 9,2 (Boric Acid/NaOH); pH 9,5 (Boric Acid/ NaOH)

3.2. Thiolene chip coated with DMA-PMA-MAPS

In contrast to the native thiolene, the EOF estimated using the DMA-PMA-MAPS coating for the 20 % excess and the 40 %excess thiol chips was markedly decreased. No significant differences were observed for the two chip compositions from pH4,0 to 8,0. However we observed a better stability of the 20 % excess thiolene chips with this coating as it was possible to extend the range of pH investigated from pH 3,5 to pH 9,5, keeping the EOF decrease at the same level. Another important feature is the very low RSDs observed with this coating, and this whatever the buffer pH employed, indicating a very good stability of this DMA-PMA-MAPS coating. These results are in accordance with the lower contact angle observed on the DMA-PMA-MAPS coated 20 % excess thiolene chips compared to the 40 % excess coated with the same polymer.

3.3. Thiolene chip coated with DMA-PMA

The results concerning both chips coated with the DMA-PMA polymer were not so positive (Table 2). For the coated 20 % excess thiol chip, μ EO values were still high and similar to the one measured in an uncoated thiolene chip. In addition, the RSD were extremely high, superior to 17%. This indicates that the polymer did not efficiently cover the charges of the

thiolene surface even if it was able to increase the hydrophilicity of the surface. One can hypothesize some degradation or removal of the adsorbed polymeric layer once the electric field is applied.

Table 2: EO mobilities and corresponding RSD obtained in 40 % and 20 % excess thiol chips coated with the new polymer.

Buffer pH	DMA-PMA coating			
	pH 7,4		pH 8,0	
	EOF (Cm ² .V-1.s-1)	RSD	EOF (Cm ² .V-1.s-1)	RSD
20%	2,96 E-04	17%	-	
40%	1,00 E-04	0,80%	1,11 E-04	2,30%

For the 40 % excess of thiol chips, the μ EO measured at pH 7,4 and pH 8,0 was significantly decreased compared to uncoated thiolene chips and the RSD were also very satisfactory (less than 2,3%). However the EOF values are 2-fold increased compared with those obtained with the DMA-PMA-MAPS coating. The attachment efficiency of the DMA-PMA appears to be correlated to the thiol density on the surface. In conclusion, the stability of the coating with the polymer composed of silane is very good compared to the coating without silane. This is probably due to the stabilization provided by the condensation of silanols belonging to different polymer chains leading to a better stability of the DMA-PMA-MAPS coating layer, especially in the 20 % excess thiol chip.

4. Non specific protein adsorption

We then evaluated the ability of the different surface treatments to reduce protein adsorption to the channel walls. Figures 5 A and 5B shows the normalized adsorption percentage of BSA-FITC on the channel wall after 10 min incubation and 10 min rinsing step with PBS x1, pH 7,4 for the 40% excess and the 20% excess thiolene chips respectively. This cycle has been repeated 3 successive times (annotated cycle 1, 2 and 3 in the Figures). As expected, we observed with both chips (20% and 40% excess) that the adsorption of BSA is higher with the uncoated chips. We observed also that the adsorption on the uncoated 20 % excess chip is increasing with each incubation/rinsing cycle (from 20% up to 36%) while with the 40 % thiol excess chip, the adsorption is quite stable, showing only a slight decrease from the first to the third cycle (from 24 to 20%). After 3 repetitions, the adsorption is approx. 2-fold higher using 20 % excess uncoated thiolene chip compared to 40 % excess uncoated chip. These results are in accordance with the higher contact angle, measured in 20 % excess uncoated chip compared to 40 % excess uncoated chip, as higher the hydrophobicity is higher is the adsorption

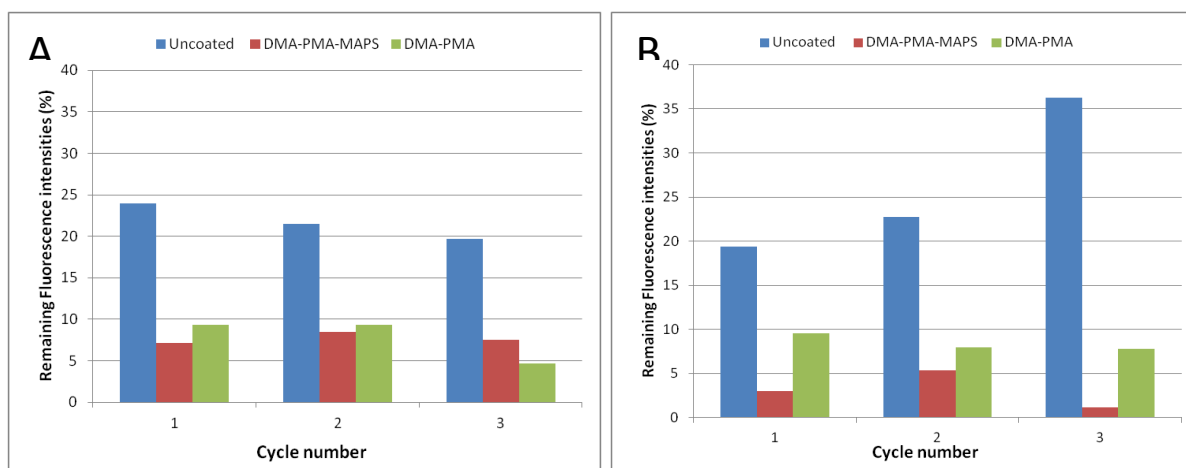


Figure 5: Non specific adsorption percentages estimated by the remaining fluorescence intensities inside the channels for (A) 40% excess thiol chips and for (B) 20% excess thiol chips: uncoated, coated with DMA-PMA-MAPS and coated with DMA-PMA.

The DMA-PMA-MAPS coating showed quite different results when present on the surface of 20 % excess and 40% excess thiol chips. The adsorption percentages, between 7% and 8,5%, are generally higher using the 40 % excess chip. Indeed, with the 20 % excess chips, the percentage of BSA adsorbed ranged from 1,2 to 5,3 %. Using both chips with DMA-PMA-MAPS coating, we observed the same adsorption behavior, the adsorption increased after the first cycle and either decreased or remained stable after the second one. This is probably due to the removal of the non strongly and reversibly attached proteins to the surface after the first incubation/rinsing cycles.

Regarding the DMA-PMA coating, the adsorption behavior is quite similar for the 20 % excess and 40 % excess chips, with adsorption percentages ranging from 7,8 % to 9,5 % and 4,8% to 9,3 % respectively. The adsorption percentages are quite stable for the DMA-PMA coated 20% excess thiol chip for the three cycles. The adsorption prevention of the DMA-PMA polymer seems to be more efficient when it is coated on the 40 % thiol chips, as we observed a marked decrease of the adsorption percentage after the third cycle. Finally the interest of both coatings is evidenced by a significant reduction with both coatings of the protein adsorption. All the results are in accordance with the contact angles measurements. The DMA-PMA-MAPS coating exhibits a better prevention toward protein adsorption on 20 % excess thiol chip and also displays the lowest contact angle. The DMA-PMA coating which has a low contact angle too when deposited on the 40 % excess thiol chip also prevents efficiently protein adsorption but to a lesser extent. In conclusion, and considering that two initial analyses are performed first to prepare a stable surface in the coated channel, the best performance for protein/surface interaction prevention is obtained with the 20 % excess thiol chip coated with the DMA-PMA-MAPS polymer yielding less than 1,5% of protein adsorption.

5. Standard protein separations:

The thiolene single cross microchip coated with the copolymer DMA-PMA-MAPS has been used to perform a separation of two acidic proteins labeled with two different fluorescent dyes: BSA-FITC (pI=4,7, 66kDa without the labeling agent) and Trypsin inhibitor-Alexa Fluor 488 (pI=4,5, 20kDa without the labeling agent). Several buffer with increasing pH from

pH 6,0 to pH 9,2 (IS constant: 40mM) have been tested in order to get the highest performance for the separation. The buffer containing the sample has also been optimized, by varying the pH and the ionic strength. A fast and high resolution separation of these acidic proteins was obtained with a BGE composed of PBS buffer pH 7,4 with 50 mM and a sample diluted in PBS buffer pH 7,4 with 5mM IS (figure 6). The difference of IS allowed a favorable conductivity zone difference which lead to a stacking effect.

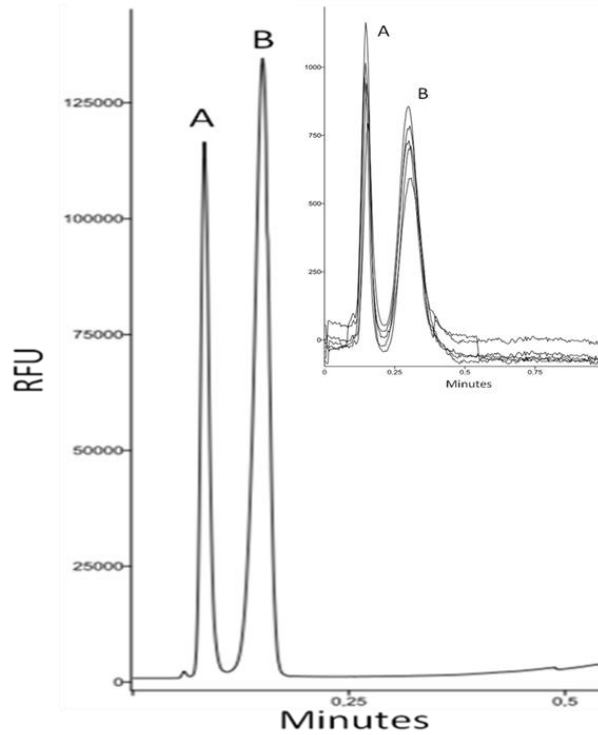


Figure 6 left: Separation of a mixture containing Trypsin inhibitor-Alexa Fluor 488 at 12,5 μ M (A) and BSA-FITC at 20 μ M (B) in a PBS buffer, pH 7,4, 5mM. BGE: PBS buffer, pH 7,4, 50mM. Detection point: 2mm from the injection cross. Migration time: (A) 4,8 sec, (B) 9,6 sec

Figure 6 right (as an insert of fig 6) Separation of a mixture containing Trypsin inhibitor-Alexa Fluor 488 at 1,5 μ M (A) and BSA-FITC at 3 μ M (B) in a PBS buffer, pH 7,4, 5mM. BGE: PBS buffer, pH 7,4, 50mM. Detection point: 4mm from the injection cross. Migration time: (A) 9 sec, (B) 19,2 sec

The method developed for the separation of these two proteins led to a very fast analysis, less than 10s with a satisfactory resolution between the two peaks. The shape of the peaks was also quite symmetric. In order to estimate the repeatability of the method, 5 successive analyses were performed in the conditions described in Figure 6. No between run rinsing steps were employed. The insert of the figure 6 shows the 5 superimposed profiles corresponding to the separation of Trypsin inhibitor-Alexa Fluor 488 at 1,5 μ M and BSA-FITC at 3 μ M. The RSD for migration time and peak area were respectively equal to 2,8 % and 3,2%. These values indicate a very good repeatability of the migration process and also of the coating upon repeated analyses. The RSD for the peak areas were quite higher (7,5% and 10% respectively). The higher values of peak area observed are probably due to a progressive depletion of sample on the successive electrokinetic pinched injection performed with the same sample.

Conclusion

This study is an in depth investigation of the properties and performances of different composition of thiolene microchannel for μ CE analysis of protein. A new strategy for thiolene surface coating based on two synthesized neutral copolymers is presented. Both polymeric coating showed ability to increase the hydrophilicity and the wettability of thiolene surfaces demonstrated by the decrease of contact angles values by more than 35 %. In addition, the EO mobilities over a wide range of pH 3,5 to pH 9,5 were markedly decreased compared to the native thiolene. DMA-PMA-MAPS led to very stable EO values upon pH variation. Both copolymers allowed considerable reduction of adsorption of proteins as compared to native thiolene chips. Finally, a chip composed by an excess of 20 % of thiol groups coated with DMA-PMA-MAPS was successfully applied for the very first time to the separation of two model proteins fluorescently labeled in less than 10 secondes. Good repeatability values were obtained in both migration time and peak area as well as nice peak shape and high resolution. In light of this study, we believe that thiolene material associated with these newly developed surface treatments could become a new and promising material for biomolecules analysis in microfluidic.

Aknowledgment

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (NaDiNe FP7/2010-2015) under grant agreement n° 246513.

We are indebted to Markus Otto for generously providing real human CSF samples. The authors have declared no conflict of interest.

References

- Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J., & Whitesides, G. M. (2000) *Electrophoresis*, 21, 27-40
- Baylor, Martha-Elizabeth, Robert W. Boyne, Neil B. Cramer, Christopher N. Bowman, and Robert R. McLeod. 80970P, 2011. doi:10,1117/12,899719.
- Carlborg, C. F., Francesca Moraga, Farizah Saharil, Wouter van der Wijngaart, and Tommy Haraldsson. In *Proc. microTAS*, 2012. <http://www.rsc.org/images/loc/2012/pdf/M,5,137.pdf>.
- Carlborg, Carl Fredrik, Tommy Haraldsson, Kim Öberg, Michael Malkoch, and Wouter van der Wijngaart. *Lab on a Chip* 11, no. 18 (2011): 3136. doi:10,1039/c1lc20388f.
- Chen, G., Lin, Y., & Wang, J. (2006). *Talanta*, 68(3), 497-503.

Chiari, M., Cretich, M., & Horvath, J. (2000). *Electrophoresis*, 21(8), 1521-1526.

Cretich, M., Chiari, M., Pirri, G., & Crippa, A. (2005). *Electrophoresis*, 26(10), 1913-1919.

Effenhauser, C. S.; Bruin, G. J. M.; Paulus, A.; Ehrat, M. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3451

Feidenhans'l, Nikolaj A., Josiane P. Lafleur, Thomas G. Jensen, and Jörg P. Kutter. *ELECTROPHORESIS* 35, no. 2–3 (February 2014): 282–88. doi:10.1002/elps.201300271.

Fiorini, G. S., & Chiu, D. T. (2005). *BioTechniques*, 38(3), 429-446

Good, Brian T., Sirish Reddy, Robert H. Davis, and Christopher N. Bowman. *Sensors and Actuators B: Chemical* 120, no. 2 (January 2007): 473–80. doi:10.1016/j.snb.2006.02.040.

Hagberg, Erik C., Michael Malkoch, Yibo Ling, Craig J. Hawker, and Kenneth R. Carter. *Nano Letters* 7, no. 2 (February 2007): 233–37. doi:10.1021/nl061217f.

Haraldsson, Tommy, Carl Fredrik Carlborg, and Wouter van der Wijngaart. In *Proc. SPIE 8976, Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XII*, 897608, 2014. doi:10.1117/12.2041918.

Harrison, Christopher, Joao T. Cabral, Christopher M. Stafford, Alamgir Karim, and Eric J. Amis. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 14, no. 1 (2004): 153.

Hung, Lung-Hsin, Robert Lin, and Abraham Phillip Lee. *Lab on a Chip* 8, no. 6 (2008): 983. doi:10.1039/b717710k.

Ilescu, C., Taylor, H., Avram, M., Miao, J., & Franssila, S. (2012). *Biomicrofluidics*, 6(1), 016505.

Kubáň, P., & Hauser, P. C. (2005). *Electrophoresis*, 26(16), 3169-3178.

Kwapiszewski, Radoslaw, Thomas G. Jensen, Klaus B. Mogensen, Zbigniew Brzozka, and Jörg P. Kutter. In *International Conference of Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*. Accessed April 8, 2013. <http://www.rsc.org/images/loc/2012/pdf/W,7,162.pdf>.

Lafleur, Josiane P., Radoslaw Kwapiszewski, Thomas G. Jensen, and Jörg P. Kutter. *The Analyst* 138, no. 3 (2013): 845. doi:10.1039/c2an36424g.

Levaché, Bertrand, Ammar Azioune, Maurice Bourrel, Vincent Studer, and Denis Bartolo. *Lab on a Chip* 12, no. 17 (2012): 3028. doi:10.1039/c2lc40284j.

Li, S. F., & Kricka, L. J. (2006). *Clinical chemistry*, 52(1), 37-45.

Liu J, Lee ML. *Electrophoresis*. 2006 Sep; 27(18):3533-46

Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M., Fettingner, J. C., Paulus, A., Lüdi, H., & Widmer, H. M. (1992). *Journal of Chromatography A*, 593(1), 253-258.

Nge, Pamela N., Chad I. Rogers, and Adam T. Woolley. *Chemical reviews* 113,4 (2013): 2550-2583.

Nordman, N., Sikanen, T., Moilanen, M. E., Aura, S., Kotiaho, T., Franssila, S., & Kostianen, R. (2011). *Journal of Chromatography A*, 1218(5), 739-745.

Perez-Toralla, K., Champ, J., Mohamadi, M. R., Braun, O., Malaquin, L., Viovy, J. L., & Descroix, S. (2013). *Lab on a Chip*, 13(22), 4409-4418.

Poitevin, M., Shakalisava, Y., Miserere, S., Peltre, G., Viovy, J. L., & Descroix, S. (2009). *Electrophoresis*, 30(24), 4256-4263.

Pumera, M. (2006). *Electrophoresis*, 27(1), 244-256.

Rogers, C. I.; Pagaduan, J. V.; Nordin, G. P.; Woolley, A. T. *Anal. Chem.* 2011, 83, 6418.

Saharil, Farizah, Carl Fredrik Carlborg, Tommy Haraldsson, and Wouter van der Wijngaart. *Lab on a Chip* 12, no. 17 (2012): 3032. doi:10.1039/c2lc21098c.

Shadpour, H., Hupert, M. L., Patterson, D., Liu, C., Galloway, M., Stryjewski W., Soper, S. A. (2007). *Analytical chemistry*, 79(3), 870-878.

Shadpour, H., Musyimi, H., Chen, J., & Soper, S. A. (2006). *Journal of Chromatography A*, 1111(2), 238-251

Sikanen, Tiina M., Josiane P. Lafleur, Maria-Elisa Moilanen, Guisheng Zhuang, Thomas G. Jensen, and Jörg P. Kutter. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 23, no. 3 (March 1, 2013): 037002. doi:10.1088/0960-1317/23/3/037002.

Sun, X.; Li, D.; Lee, M. L. *Anal. Chem.* 2009, 81, 6278

T. Yasui, M. R. Mohamadi, N. Kaji, Y. Okamoto, M. Tokeshi and Y. Baba, *Biomicrofluidics*, 2011, 5, 44114.

Thirumurugan, Prakasam; Matosiuk, Dariusz; and Jozwiak, Krzysztof. *Chemical Reviews* 113(7), 2013, 4905-4979

Tran, N. T., Ayed, I., Pallandre, A., & Taverna, M. (2010). *Electrophoresis*, 31(1), 147-173.

Wägli, Ph., A. Homsy, and N.F. de Rooij. *Sensors and Actuators B: Chemical* 156, no. 2 (August 2011): 994–1001. doi:10.1016/j.snb.2011.02.005.

Wu D, Qin J, Lin B. *J Chromatogr A*. 2008 Mar 14; 1184(1-2):542-59

Yang, W.; Sun, X.; Wang, H.-Y.; Woolley, A. T. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8230.

Zhang, Jiyou, Champak Das, and Z. Hugh Fan. *Microfluidics and Nanofluidics* 5,3 (2008): 327-335.

Zhou J, Ellis AV, Voelcker NH. *Electrophoresis*. 2010 Jan; 31(1):2-16

Zhuang, Guisheng, Thomas Glasdam Jensen, and Jörg Peter Kutter. In *15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 1989–91. Accessed March 28, 2014. http://www.rsc.org/images/LOC/2011/PDFs/Papers/663_0136.pdf.

Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J. R., & Zhu, J. J. (2007). *Journal of Chromatography A*, 1170(1), 1-8.

4.4. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre ont démontré la compatibilité du COC et du thiolène pour la fabrication de puces permettant des applications en μ EC.

Pour le COC, qui est relativement hydrophobe à l'état natif, de nouveaux traitements de surfaces à base de polymères ont permis une réduction marquée des μ eo, de l'hydrophobie des surfaces et de la capacité d'adsorption des protéines sur les matériaux modifiés. L'avantage majeur des protocoles de revêtements proposés par Perez-Toralla *et al.*, (2013) réside dans leur simplicité de mise en œuvre et dans le fait qu'ils ne nécessitent pas d'activation préalable de la surface comme couramment décrit dans la littérature. Cette nouvelle stratégie ouvre la voie au développement de nouveaux revêtements polymériques permettant une diminution encore plus marquée de l'hydrophobie de la surface du COC et l'obtention de μ eo plus stables.

Le thiolène est légèrement plus hydrophile que le COC à l'état natif. Aucune information quant aux μ eo générées au sein de puce en thiolène n'était disponible dans la littérature. De plus, aucune stratégie de modification de sa surface par des polymères en vue d'une utilisation en μ EC n'avait encore été décrite. Cette étude a donc permis de confirmer la compatibilité de ce matériau pour la séparation électrocinétique de composés fluorescents en microsystème. Les résultats de l'étude indiquent que les μ eo obtenues au sein des puces en thiolène étaient assez similaires à celles obtenues avec des puces en verre, d'un point de vue des valeurs et de la stabilité, avec une augmentation des valeurs de μ eo avec le pH. Il est intéressant de noter que dans des conditions acides, les μ eo sont cependant supérieures à celle obtenues en puce en verre vierge.

Pour les revêtements de la surface des puces en thiolène, les deux polymères proposés, le DMA-PMA-MAPS et le DMA-PMA, ont montré une excellente capacité d'hydrophilisation des deux compositions de thiolène étudiées. Ceci s'est traduit par une baisse des valeurs d'angle de contact de 35% à 45% en fonction de la surface du matériau. Ces résultats sont très prometteurs en vue d'une application de ces puces à l'analyse de biomolécules en μ EC. De plus, il est apparu que le DMA-PMA-MAPS recouvrant une surface composée d'un excès de 20% de thiol était le plus efficace afin de réduire les μ eo. Cette diminution s'est révélée stable sur une large gamme de pH allant de 3,5 à 9,5. Ce système a de plus démontré sa capacité à inhiber efficacement l'adsorption de protéines à la surface des parois de la puce modifiée par le DMA-PMA-MAPS. Ceci a été confirmé par des pourcentages d'adsorption de la BSA-FTTC de moins de 1,5%.

Ce système a finalement permis la séparation de deux protéines modèles, la trypsin inhibitor (TI) et la BSA, toutes deux marquées par un agent fluorescent. Les temps d'analyse nécessaires à leur séparation complète sont extrêmement courts (< 10 secondes) et les coefficients de variation des temps de migration sont très satisfaisants ($< 3,2\%$). Les coefficients de variation des aires de pics sont en revanche légèrement supérieurs avec 7,5% et 10% pour la TI et la BSA respectivement. Ces relativement hautes valeurs sont probablement liées à l'injection électrocinétique successive des protéines à partir du même échantillon. Une optimisation des conditions d'injection des composés pourrait permettre de diminuer ces variations.

Le thiolène se présente donc comme un candidat très prometteur pour la fabrication de microsystèmes destinés à l'analyse de biomarqueurs protéiques en μ EC. Ceci est justifié par des propriétés optiques favorables à l'utilisation de techniques de détection par fluorescence, à la compatibilité de la chimie de surface du matériau avec de nombreux revêtements polymériques utilisant la chimie click pour se lier de manière covalente et stable à la surface du thiolène, mais aussi aux performances analytiques très satisfaisantes du matériau revêtu par le DMA-PMA-MAPS pour l'analyse de protéines.

5. Références de la partie expérimentale

- Abdi F., Quinn J.F., Jankovic J., McIntosh M., Leverenz J.B., Peskind E., & Zhang J. (2006). *Journal of Alzheimer's Disease*, 9(3), 293-348.
- Alahmad Y., Tran N.T., Le Potier I., Forest E., Jorieux S., & Taverna M. (2011). *Electrophoresis*, 32(2), 292-299.
- Andreasen N., Gottfries J., Vanmechelen E., Vanderstichele H., Davidsson P., Blennow K., & Rosengren L. (2001). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 71(4), 557-558.
- Aura S., Sikanen T., Kotiaho T., & Franssila S. (2008). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132(2), 397-403.
- Ban E., & Song E.J. (2013). *Journal of Chromatography B*, 929, 180-186.
- Banks P.R., & Paquette D.M. (1995). *Journal of Chromatography A*, 693(1), 145-154.
- Banks, P. R. (1998). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17(10), 612-622.
- Benavente F., Medina-Casanellas S., Barbosa J., & Sanz-Nebot V. (2010). *Journal of Separation Science*, 33(9), 1294-1304.
- Bibl M., Mollenhauer B., Lewczuk P., Esselmann H., Wolf S., Otto M., & Wiltfang J. (2010). *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 31(1), 37-44.
- Blennow K., Davidsson P., Wallin A., Gottfries C.G., & Svennerholm L. (1994). *International Psychogeriatrics*, 6(01), 13-22.
- Brambilla D., Verpillot R., Le Droumaguet B., Nicolas J., Taverna M., Kóna J., & Andrieux K. (2012). *ACS Nano*, 6(7), 5897-5908.
- Broersen K., Jonckheere W., Rozenski J., Vandersteen A., Pauwels K., Pastore A., & Schymkowitz J. (2011). *Protein Engineering Design and Selection*, 24(9), 743-750.
- Carlborg C.F., Haraldsson T., Öberg K., Malkoch M., & van der Wijngaart W. (2011). *Lab on a Chip*, 11(18), 3136-3147.
- Chalbot S., Zetterberg H., Blennow K., Fladby T., Andreasen N., Grundke-Iqbal I., & Iqbal K. (2011). *Journal of Alzheimer's Disease*, 25(3), 505-515.
- Chun H., Chung T.D., & Ramsey J.M. (2010). *Analytical Chemistry*, 82(14), 6287-6292.
- Clayden J., Warren S., & Greeves N. (2002). *Chimie organique*. De Boeck Supérieur.
- Davidsson P., Westman-Brinkmalm A., Nilsson C.L., Lindbjær M., Paulson L., Andreasen N., & Blennow K. (2002). *Neuroreport*, 13(5), 611-615.
- Doan T.K.O., Kubáň P., Kubáň P., Kiplagat I.K., & Boček P. (2011). *Electrophoresis*, 32(3-4), 464-471.
- Esselmann H., Groemer T.W., Kornhuber J., Lewczuk P., Maler J.M., & Wiltfang J. (2011). *U.S. Patent Application 13/639,866*.

- Ferrari A., Cecchini M., Dhawan A., Micera S., Tonazzini I., Stabile R. & Beltram F. (2011). *Nano Letters*, 11(2), 505-511.
- Fiorini G.S., Jeffries G.D., Lim D.S., Kuyper C.L., & Chiu D.T. (2003). *Lab on a Chip*, 3(3), 158-163.
- Fritz G., & Heizmann C. W. (2011). *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
- Fukushima T., Usui N., Santa T., & Imai K. (2003). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(6), 1655-1687.
- Garbassi F., Balducci L., & Ungarelli R. (1998). *Journal of Non-Crystalline Solids*, 223(3), 190-199.
- Goddard J. M., & Hotchkiss J. H. (2007). *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725.
- Gorman J.J., Corino G.L., & Mitchell S.J. (1987). *European Journal of Biochemistry*, 168(1), 169-179.
- Hansen R.E., & Winther J.R. (2009). *Analytical Biochemistry*, 394(2), 147-158.
- Harari O., Cruchaga C., Kauwe J.S., Ainscough B.J., Bales K., Pickering E.H., & Goate A.M. (2014). *Biological Psychiatry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.11.032>
- Harrison D.J., Manz A., Fan Z., Luedi H., & Widmer H. M. (1992). *Analytical Chemistry*, 64(17), 1926-1932.
- Haugland R.P. (2002). *Handbook of fluorescent probes and research products*. Molecular Probes.
- Haußmann U., Jahn O., Linning P., Janßen C., Liepold T., Portelius E., & Wiltfang J. (2013). *Analytical chemistry*, 85(17), 8142-8149.
- Hermanson G.T. (2013). *Bioconjugate techniques*. Academic press.
- Hoyle C.E., Lowe A.B., & Bowman C. N. (2010). *Chemical Society Reviews*, 39(4), 1355-1387.
- Iki N., & Yeung E.S. (1996). *Journal of Chromatography A*, 731(1), 273-282.
- Iliescu C., Taylor H., Avram M., Miao J., & Franssila S. (2012). *Biomicrofluidics*, 6(1), 016505.
- Iqbal K., & Grundke-Iqbal I. (1997). *International Psychogeriatrics*, 9(S1), 289-296.
- Jesse S., Steinacker P., Cepek L., Arnim C.V., Tumani H., Lehnert S., & Otto M. (2009). *Journal of Alzheimer's Disease*, 17(3), 541-551.
- Jullien, M., & Garel, J. R. (1981). *Biochemistry*, 20(24), 7021-7026.
- Kaneta T., Ogura T., & Imasaka T. (2011). *Electrophoresis*, 32(9), 1061-1067.
- Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. (2009). *Nature Protocols*, 4(3), 363-371.
- Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., & Singh S. (2005). *Journal of Structural Biology*, 151(3), 229-238.
- Klasner S.A., Metto E.C., Roman G.T., & Culbertson C.T. (2009). *Langmuir*, 25(17), 10390-10396.
- Klonis N., & Sawyer W.H. (1996). *Journal of Fluorescence*, 6(3), 147-157.
- Lang, S., Spratt, D. E., Guillemette, J. G., & Palmer, M. (2005). *Analytical Biochemistry*, 342(2), 271-279.
- Lee T.T., & Yeung E.S. (1992). *Analytical Chemistry*, 64(23), 3045-3051.
- Lin C.Y., Liu C.H., Chang H.C., & Tseng W.L. (2008). *Electrophoresis*, 29(14), 3024-3031.

- Lin R., & Burns M.A. (2005). *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 15(11), 2156.
- Lin Y.W., Chiu T.C., & Chang H.T. (2003). *Journal of Chromatography B*, 793(1), 37-48.
- Majetschak M., King D.R., Krehmeier U., Busby L.T., Thome C., Vajkoczy S., & Proctor K.G. (2005). *Critical care Medicine*, 33(7), 1589-1594.
- Manz A., Harrison D.J., Verpoorte E.M., Fetting J.C., Paulus A., Lüdi H., & Widmer H.M. (1992). *Journal of Chromatography A*, 593(1), 253-258.
- Miserere S., Mottet G., Taniga V., Descroix S., Viovy J.L., & Malaquin L. (2012). *Lab on a Chip*, 12(10), 1849-1856.
- Mohamadi M.R., Svobodova Z., Verpillot R., Esselmann H., Wiltfang J., Otto M., & Viovy J.L. (2010). *Analytical Chemistry*, 82(18), 7611-7617.
- Moini M. (2013). In *Capillary Electrophoresis of Biomolecules* (pp. 79-119). Humana Press.
- Mondello S., Constantinescu R., Zetterberg H., Andreasson U., Holmberg B., & Jeromin A. (2014). *Parkinsonism & Related Disorders*.
- Nge P.N., Pagaduan J.V., Yu M., & Woolley A.T. (2012). *Journal of Chromatography A*, 1261, 129-135.
- Nge P.N., Rogers C.I., & Woolley A.T. (2013). *Chemical Reviews*, 113(4), 2550-2583.
- Nunes P.S., Ohlsson P.D., Ordeig O., & Kutter J.P. (2010). *Microfluidics and Nanofluidics*, 9(2-3), 145-161.
- Perez-Toralla K., Champ J., Mohamadi M.R., Braun O., Malaquin L., Viovy J.L., & Descroix, S. (2013). *Lab on a Chip*, 13(22), 4409-4418.
- Poitevin M., Shakalisava Y., Miserere S., Peltre G., Viovy J.L., & Descroix S. (2009). *Electrophoresis*, 30(24), 4256-4263.
- Pu Q., Oyesanya O., Thompson B., Liu S., & Alvarez J.C. (2007). *Langmuir*, 23(3), 1577-1583.
- Ramautar R., de Jong G.J., & Somsen G.W. (2012). *Electrophoresis*, 33(1), 243-250.
- Rathore A.S., & Horváth C. (2002). *Electrophoresis*, 23(9), 1211-1216.
- Reyes D.R., Iossifidis D., Auroux P.A., & Manz A. (2002). *Analytical chemistry*, 74(12), 2623-2636.
- Righetti P.G., Sebastiano R., & Citterio A. (2013). *Proteomics*, 13(2), 325-340.
- Rogers C.I., Pagaduan J.V., Nordin G.P., & Woolley A.T. (2011). *Analytical Chemistry*, 83(16), 6418-6425.
- Rohr T., Ogletree D.F., Svec F., & Fréchet J.M. (2003). *Advanced Functional Materials*, 13(4), 264-270.
- Rolland J.P., Van Dam R.M., Schorzman D.A., Quake S.R., & DeSimone J.M. (2004). *Journal of the American Chemical Society*, 126(8), 2322-2323.
- Roy S., Das T., & Yue C.Y. (2013). *ACS applied materials & interfaces*, 5(12), 5683-5689.
- Ryan T.M., Caine J., Mertens H.D., Kirby N., Nigro J., Breheney K., & Roberts B.R. (2013). *PeerJ*, 1, e73.

- Salas-Solano O., Tomlinson B., Du S., Parker M., Strahan A., & Ma S. (2006). *Analytical Chemistry*, 78(18), 6583-6594.
- Shadpour H., Musyimi H., Chen J., & Soper S.A. (2006). *Journal of Chromatography A*, 1111(2), 238-251.
- Simonsen A.H., McGuire J., Hansson O., Zetterberg H., Podust V.N., Davies H.A., & Blennow K. (2007). *Archives of Neurology*, 64(3), 366-370.
- Steinacker P., Mollenhauer B., Bibl M., Cepek L., Esselmann H., Brechlin P., & Otto M. (2004). *Neuroscience Letters*, 370(1), 36-39.
- Steinacker P., Rist W., Swiatek-de-Lange M., Lehnert S., Jesse S., Pabst A., & Otto M. (2010). *Proteomics*, 10(1), 81-89.
- Sun X., Li D., & Lee, M.L. (2009). *Analytical Chemistry*, 81(15), 6278-6284.
- Szökő É., & Tábi T. (2010). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1180-1192.
- Terry S.C., Jerman J.H., & Angell J.B. (1979). *Electron Devices, IEEE Transactions On*, 26(12), 1880-1886.
- Tran N.T., Taverna M., Miccoli L., & Angulo J.F. (2005). *Electrophoresis*, 26(16), 3105-3112.
- Tsao C.W., & DeVoe D.L. (2009). *Microfluidics and Nanofluidics*, 6(1), 1-16.
- Tsao C.W., Hromada L., Liu J., Kumar P., & DeVoe D.L. (2007). *Lab on a Chip*, 7(4), 499-505.
- Tursen J., Wang A., & Qin W. (2011). *Microchimica Acta*, 174(1-2), 63-71.
- Veledo M.T., de Frutos M., & Díez-Masa J.C. (2005). *Journal of Chromatography A*, 1079(1), 335-343.
- Veledo M.T., Lara-Quintanar P., de Frutos M., & Díez-Masa J.C. (2005). *Comprehensive Analytical Chemistry*, 45, 305-374.
- Verpillot R., Esselmann H., Mohamadi M.R., Klafki H., Poirier F., Lehnert S., & Taverna M. (2011). *Analytical Chemistry*, 83(5), 1696-1703.
- Verpillot R., Otto M., Klafki H., & Taverna M. (2008). *Journal of Chromatography A*, 1214(1), 157-164.
- Verpillot R., Otto M., Klafki H., & Taverna M. (2008). *Journal of Chromatography A*, 1214(1), 157-164.
- Wang W., Zhou F., Zhao L., Zhang J.R., & Zhu J.J. (2007). *Journal of Chromatography A*, 1170(1), 1-8.
- Welge V., Fiege O., Lewczuk P., Mollenhauer B., Esselmann H., Klafki H. W., & Bibl M. (2009). *Journal of Neural Transmission*, 116(2), 203-212.
- Winningham-Major F., Staecker J.L., Barger S.W., Coats S., & Van Eldik L.J. (1989). *The Journal of Cell Biology*, 109(6), 3063-3071.
- Xu F., Jabasini M., & Baba Y. (2005). *Electrophoresis*, 26(15), 3013-3020.
- Yan W., Sloat A.L., Yagi S., Nakazumi H., & Colyer C.L. (2006). *Electrophoresis*, 27(7), 1347-1354.
- Yang W., Yu M., Sun X., & Woolley A.T. (2010). *Lab on a Chip*, 10(19), 2527-2533.

- Yasui T., Kaji N., Mohamadi M.R., Okamoto Y., Tokeshi M., Horiike Y., & Baba Y. (2011). *ACS nano*, 5(10), 7775-7780.
- Zhang J., Das C., & Fan Z.H. (2008). *Microfluidics and Nanofluidics*, 5(3), 327-335.
- Zhang S., Cao W., Li J., & Su M. (2009). *Electrophoresis*, 30(19), 3427-3435.
- Zhang, L., Yin, X., & Fang, Z. (2006). *Lab on a Chip*, 6(2), 258-264.

Conclusion générale

L'objectif du projet européen NADINE dans lequel se sont inscrits mes travaux de thèse a pour but de développer différents modules analytiques pour aboutir à un unique système de diagnostic miniaturisé hautement spécifique et hautement sensible aux maladies neurodégénératives et en particulier à la MA. Mes travaux au sein du projet ont contribué au développement de deux de ces modules, le premier étant dédié au marquage fluorescent des biomarqueurs et le second à leur séparation électrocinétique.

Dans un premier temps, une étude préliminaire nous a permis de comparer deux voies de marquage des protéines, l'une permettant un couplage covalent du fluorophore sur les groupements aminés et l'autre sur les groupements sulfhydriles. Pour cela, différents agents fluorophores ont été comparés en matière de performance, de rendement de la réaction de

marquage, mais aussi de cinétique de réaction associée. Si tous les fluorophores étudiés permettent d'améliorer à des degrés variables la sensibilité de détection des biomarqueurs protéiques par rapport à une détection UV, deux problématiques majeures sont apparues. Les cinétiques de réaction de la plupart des marqueurs fluorescents disponibles dans le commerce sont relativement longues, d'autant plus si l'on veut effectuer ensuite une mesure quantitative et donc avoir un rendement de marquage élevé et répétable. Ceci les rend donc peu compatibles avec une dérivation intra-capillaire au sein d'un microsystème. Par ailleurs, la multitude de sous-produits issus de la réaction de dérivation, en plus de créer un bruit de fond élevé, génère des espèces comigrant parfois avec les biomarqueurs eux-mêmes lors de la séparation. Cependant, l'un des agents fluorescents étudiés, le FP 488 NHS a démontré sa compatibilité avec une stratégie de dérivation en ligne de l'ubiquitine, protéine impliquée dans de nombreux processus neuropathologiques qui pourrait aider à la discrimination des différentes pathologies neurodégénératives et surtout à la différenciation de la MA de celle de MCJ. En effet, la concentration d'ubiquitine libre est significativement augmentée dans le LCR des patients atteints de MCJ par rapport au LCR des patients atteints d'autres pathologies neurodégénératives dont la MA (Steinacker P. *et al.*, 2010).

Une méthode en EC reposant sur le principe de marquage intra-capillaire et souvent appelée Electrophoretically Mediated Microanalysis a été mise au point. Cette méthode de marquage en ligne conduit à la quantification ultrasensible de l'ubiquitine libre dans un échantillon de LCR humain préalablement dessalé. Il s'agit de la première méthode capable de discriminer l'ubiquitine libre des protéines ubiquitinées ou des chaînes de polyubiquitine et ceci grâce à une technique de séparation électrocinétique ne faisant pas intervenir d'anticorps. Cette technique de quantification, rapide et répétable, se positionne en tant qu'outil complémentaire et comparatif des tests immunochimiques. En effet, les tentatives de dosage de l'ubiquitine à l'aide de ces méthodes ont souvent mené à des résultats contradictoires.

La détection par fluorescence permet d'atteindre des limites de détection compatibles avec les concentrations de certains biomarqueurs attendues dans le LCR. Cependant, le gain de sensibilité observé grâce à la détection par fluorescence n'est pas aussi élevé comparé à une détection UV. Ceci peut s'expliquer en partie par le phénomène de multimarquage des protéines et des peptides. L'application directe de la dérivation par des fluorophores réagissant avec certains groupements présents sur les séquences peptidiques des protéines reste donc complexe dans les fluides biologiques. En effet, le LCR et les liquides biologiques contiennent en général des milliers de protéines, peptides et amines biogéniques différents susceptibles de réagir simultanément avec le fluorophore utilisé, ce qui complexifie encore davantage le profil électrophorétique de la séparation d'un tel échantillon. De plus, dans ces conditions la mise au point d'une méthode de

dérivation répétable et à rendement constant est un vrai défi. C'est pourquoi une capture spécifique des biomarqueurs ciblés pour l'analyse, au sein d'un module dédié dans le microsystème, permettrait à la fois de se débarrasser de l'excès de fluorophore mais aussi des espèces marquées non ciblées, permettant ainsi une séparation électrocinétique en ECZ de haute résolution, compatible avec la quantification de ces différents biomarqueurs. L'équipe de Jean Louis Viovy à l'Institut Curie a développé un microsystème intégrant un lit fluidisé où le mouvement constant de billes magnétiques revêtues d'anticorps anti-immunoglobuline G assure un enrichissement continu de l'immunoglobuline G marquée par un agent fluorescent permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre du picomolaire (Tabnaoui S., 2012). La possible adaptation de ce lit fluidisé à la capture des peptides A β , entre autres biomarqueurs, pourrait permettre un couplage avec notre module de séparation au sein d'un microsystème et potentiellement, une quantification ultrasensible et spécifique à chaque forme de ces peptides.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes penchés sur le développement d'une méthode hautement résolutive de séparation électrocinétique en puce d'une famille de biomarqueurs, les peptides β -amyloïdes. Au début de ce projet, aucun travail réalisé avec un système miniaturisé ne décrivait la séparation complète et la détection simultanée des peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42. Cette combinaison est pourtant prometteuse pour une approche multibiomarqueurs du diagnostic de la MA. D'ailleurs, un brevet proposant une combinaison des formes A β 2-40, A β 2-42 et A β 1-42 comme biomarqueur hautement sensible et spécifique de la MA a récemment été publié par Esselman *et al.* (2010). Nous avons d'abord utilisé des puces en verre borosilicate, qui présente une grande similitude avec la silice vierge utilisée en EC et dont la surface peut être traitée par de nombreuses stratégies différentes. Les peptides ayant une forte tendance à s'adsorber sur les parois des canaux en silice ou en matériau polymère, différents polymères comme le DMA-NAS-MAPS, le DMA-GMA-MPAS, le PEO et l'EpDMA, ont été comparés pour le recouvrement des canaux, notamment en ce qui concerne leur capacité à inhiber l'adsorption de protéines en surface et à diminuer la μeo de manière stable, condition nécessaire à l'obtention de résolutions suffisantes entre les différents peptides. Finalement, seuls le PEO et l'EpDMA ont démontré de bonnes performances compatibles avec l'analyse de peptides marqués par le FP 488. En effet, ces polymères ont non seulement permis une diminution marquée de la μeo mais aussi une stabilité à des pH basiques favorables à l'analyse de ces peptides. L'EpDMA a cependant montré une meilleure stabilité à des pH basiques allant jusqu'à 9,0, tandis que la stabilité du PEO au-dessus de pH 8,0 n'est plus assurée. Les résolutions obtenues dans les deux microsystèmes modifiés se sont révélées très satisfaisantes et compatibles avec une quantification simultanée des biomarqueurs. L'étude des estimations de la récupération des analytes en fin du processus de séparation a cependant démontré de meilleurs résultats pour l'EpDMA. De plus, ce revêtement présente une bien meilleure stabilité, permettant plusieurs dizaines d'analyses sans

effectuer de régénération du revêtement, ce qui est un avantage pour une utilisation répétée en microsysteme à usage diagnostic. Le systeme verre/EpDMA a conduit pour la première fois à la séparation électrocinétique hautement résolutive de différents mélanges contenant différentes combinaisons de peptides tronqués en N-terminal ou C-terminal ne disposant pas d'anticorps de haute spécificité, comme les peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42, ou encore A β 2-40, A β 2-42 et A β 1-42.

Il serait intéressant de se pencher sur les raisons de l'échec de l'utilisation du copolymère DMA-NAS-MAPS en microsysteme pour l'analyse de ces peptides marqués. En effet, ce copolymère a démontré une plus grande stabilité des μeo que tous les autres polymères étudiés, sur une plus large gamme de pH et ce, même après des étapes de rinçage au DMSO ou au SDS (50 mM). Cependant, l'adsorption massive de composés fluorescents issus, soit des peptides marqués, soit de l'agent fluorescent lui-même, sur les parois de puces en verre revêtues par ce copolymère a empêché son utilisation pour notre application. Dans nos travaux, une solution d'éthanolamine (50 mM) a été utilisée pour inactiver le groupement NAS, connu pour fixer de manière covalente les protéines ou les brins d'ADN. Ce protocole, réalisé par simple incubation pendant 30 minutes à 50°C, avait cependant été développé pour une application en EC. Il apparait clairement au vu des résultats de nos études qu'une transposition directe des protocoles de revêtements de surface développés pour l'EC vers les microsystemes n'est pas toujours réussie. Une optimisation de ce protocole de blocage par l'éthanolamine, ou par une amine présentant une chaîne latérale plus longue serait alors utile pour l'obtention d'un revêtement polymérique de haute performance sur puces en verre.

Enfin, dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de matériaux alternatifs au verre et à base de polymères pour la séparation électrocinétique de biomarqueurs de la MA. Ces matériaux permettent une microfabrication et des intégrations de modules analytiques simplifiées. Deux substrats ont été explorés, le COC et le thiolène. Si le COC a déjà été appliqué à l'analyse de protéines en μEC , le thiolène a été très peu étudié quant à son comportement en μEC . A ce jour, la seule analyse en μEC décrite a été réalisée à partir d'un échantillon de deux agents fluorescents, la fluorescéine et la rhodamine 123. L'un des objectifs importants atteints lors de cette étude a été de développer une stratégie de modification des surfaces du thiolène. En particulier, deux nouveaux copolymères, le DMA-PMA-MAPS et le DMA-PMA, ont été utilisés comme revêtements des surfaces en thiolène, permettant la diminution efficace et stable des μeo et l'inhibition de l'adsorption non spécifique des protéines à la surface des microcanaux. Finalement, le revêtement des canaux avec le DMA-PMA-MPAS a permis la séparation ultrarapide et hautement résolutive de protéines modèles au sein d'un microsysteme en thiolène. C'est la première fois qu'une séparation de protéines dans une puce en thiolène est reportée.

Cette étude démontre donc l'intérêt de ce matériau pour des séparations électrocinétiques et propose un traitement de surface adapté et performant, ce qui va certainement ouvrir la voie à une utilisation grandissante de ce matériau, tant par la simplicité de sa microfabrication, que par son faible coût et ses propriétés optiques compatibles avec la détection par fluorescence. Ce travail pourrait être poursuivi en appliquant ce système à l'analyse de biomarqueurs tels que les peptides A β . De plus, l'intégration d'un module d'enrichissement par immunocapture serait facilitée dans un matériau modulable comme le thiolène par rapport aux systèmes en verre très peu flexibles.

Le microsystème imaginé dans le cadre du projet NADINE devait permettre la quantification de multiples biomarqueurs à partir d'un échantillon de LCR, voire de sang (sérum ou plasma). Cependant, le sang est peu utilisé pour le diagnostic des maladies neurodégénératives car soit il ne reflète pas vraiment les désordres biochimiques liés à ces pathologies, soit les concentrations des biomarqueurs validés (A β 1-42, t-tau et p-tau) sont trop faibles pour être quantifiées au sein de cette matrice. De ce fait, peu de données sont disponibles dans la littérature sur des approches diagnostiques à partir du sang. De plus, il n'y a pas de consensus au sein de la communauté scientifique sur la réelle valeur diagnostique d'un test basé sur ce fluide biologique. Le LCR est obtenu après ponction lombaire sur le patient et présente donc un caractère invasif. Néanmoins, il reste encore la matrice la plus adaptée à un test diagnostics de haute sensibilité et spécificité des différentes maladies neurodégénératives. Cependant, les protocoles d'utilisation, de conservation et de manipulation du LCR doivent encore être perfectionnés et surtout harmonisés pour que les mesures des biomarqueurs obtenues reflètent effectivement et précisément une maladie et pas une autre. En effet, de nombreuses études ont fait état de l'impact de mauvaises conditions de conservation sur les résultats des dosages de biomarqueurs, comme la température, les délais entre le prélèvement et la congélation ou la nature des matériaux plastiques utilisés pour l'échantillonnage

En conclusion, ces travaux de thèse ont démontré l'apport d'une étape de dérivation en ligne et de séparation électrocinétique intégrables au sein de modules dédiés pour l'analyse hautement sensible et résolutive de biomarqueurs des maladies neurodégénératives, en vue du développement d'un outil de diagnostic miniaturisé.

Matériels et méthodes

Les protocoles qui ne sont pas détaillés dans cette section sont disponibles dans les sections Matériels et Méthodes des publications respectives.

Marquage des biomarqueurs protéiques par des agents fluorescents

Instrumentation

Toutes les expériences de ce chapitre ont été réalisées avec un système d'électrophorèse capillaire Beckman Coulter PA 800. Cet appareil est couplé à une détection UV, à une barrette de diodes ou à la détection LIF (fluorescence induite par laser). Les données sont retraitées par le logiciel karat 7,0. Les capillaires utilisés sont composés de silice fondue de chez PHYMEP et présentent un diamètre interne de 50 μm ou 100 μm . Les longueurs utilisées sont explicitées dans la légende de chaque figure. Tout nouveau capillaire est conditionné par des rinçages hydrodynamiques successifs de 10 minutes à 40 psi avec de la soude à 1 M, de la soude à 0,1 M puis de l'eau ultra-pure.

Réactifs

Une fois reçues, les protéines sont dissoutes dans une solution aqueuse, selon les indications du fournisseur à une concentration donnée. Les solutions sont ensuite aliquotées et conservées à -20°C . Les solutions et les concentrations des différentes protéines utilisées dans le chapitre 1 sont listées ci-après : GFAP (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans de l'eau ultrapure, 19,23 μM), H-FABP (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans de l'eau ultrapure, 67,3 μM), S100 B (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans une solution de Tris-HCl pH 8,0, contenant 50% de glycérol, 18,67 μM) et ubiquitine (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dans l'eau ultra pure 583,7 μM). Les fluorophores (FP 488 NHS, 5-DTAF, 5-IAF, MTS-CR 110 et MF-C5) sont dilués dans du

DMSO à 99,9% de pureté à une concentration de 10 mg/ml puis aliquotés et conservés à -20°C à l'abri de la lumière.

Dérivation off-line des protéines par les groupements sulfhydriles

S100B : Avant la réaction de marquage, une solution de S100B a été préparée en diluant la solution mère dans une solution tampon HEPES/HCl de pH 7,5 à 25 mM de force ionique afin d'obtenir une concentration finale de la S100B de 3,5 µM. Pour le marquage de la S100B avec le MF-C5, 98 µL de la solution de protéine à 3,5 µM sont mélangés avec 2 µL de la solution mère du MF-C5 à 10 mg/ml. La solution est ensuite incubée pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite analysée avec les tampons de séparation (33 mM en FI) suivants : Tampon Hepes/HCl à pH 7,6 ; Tampon Tris-HCl à pH 8,5 ; Tampon Borate de sodium à pH 9,2 ; Tampon Borate de sodium à pH 10,0.

Marquage de la S100B avec le MTS-CR110 : 98 µL de la solution de protéine à 3,5 µM sont mélangés avec 2 µL de la solution mère du MTS-CR110 à 10 mg/ml. La solution est ensuite incubée pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite analysée avec le même tampon de séparation que précédemment, à savoir un tampon HEPES/HCl à pH 7,6 avec une force ionique de 33 mM.

GFAP : Avant la réaction de marquage, une solution de GFAP a été préparée en diluant la solution mère dans une solution tampon HEPES/HCl de pH 7,5 à 25 mM de force ionique afin d'obtenir une concentration finale de la GFAP de 1,5 µM. Pour le marquage de la GFAP avec le 5-IAF, 98 µL de la solution de protéine à 3,5 µM sont mélangés avec 2 µL de la solution mère du MF-C5 à 10 mg/ml. La solution est ensuite incubée pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite analysée avec le tampon de séparation (33 mM de force ionique) suivant : Tampon Borate de sodium pH 9,4.

Dérivation et analyse de l'ubiquitine :

Séparation de l'ubiquitine en EC-UV : Une solution d'ubiquitine à 50 µM dans l'eau est analysée en EC-UV (190 nm) à l'aide des tampons de séparation suivants (40 mM en force ionique) : Tampon borate de sodium pH 8,3 ; Tampon borate de sodium pH 8,7 ; Tampon borate de sodium pH 9,5 ; Tampon borate de sodium pH 10,5.

Dérivation off-line et séparation en EC-LIF : La solution mère d'ubiquitine dans l'eau à 5 µg/µL est diluée par un tampon borate pH 9,5, 40 mM de force ionique pour atteindre une

concentration de 15 μL . Ensuite 98 μL de cette solution sont mélangés avec 2 μL de FP 488 à 10 mg/ml. La solution est ensuite incubée 5 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite analysée en EC-LIF.

Optimisation de la dérivation en ligne : Pour l'étude sur l'impact de la solution de dilution du FP 488, la solution mère de FP 488 NHS est diluée par 2 à l'aide d'un des solvants présentés en **Figure 49** pour atteindre une concentration de 5 mg/mL.

Traitement de l'échantillon pour l'analyse dans le LCR :

Préparation du LCR synthétique : Composition ; 147 mM NaCl ; 3,5 mM KCl ; 1,2 mM MgCl_2 ; 1,26 mM CaCl_2 ; 25 mM NaHCO_3 ; 1 mM NaH_2PO_4 . 4,295g de NaCl sont pesés et versés dans une fiole jaugée de 500 mL. 0,1305 g de KCl sont pesés et ajoutés dans la fiole. 0,1219g de MgCl_2 sont pesés et ajoutés dans la fiole. 0,0925 g de CaCl_2 sont pesés et ajoutés dans la fiole. 1,05g de NaHCO_3 sont pesés et ajoutés dans la fiole. 0,078g de NaH_2PO_4 sont pesés et ajoutés dans la fiole. Un barreau aimanté est placé dans la fiole jaugée de 500 mL et suffisamment d'eau ultrapure est ajoutée pour atteindre le trait de jauge. La solution est agitée pendant 10 minutes à vitesse moyenne. Le contenu de la fiole est ensuite filtré sur filtre HATF 0,45 μM .

Méthodes de précipitation par l'éthanol : 10 μL d'une solution d'ubiquitine à 10 μM dans le LCR synthétique sont dilués dans 90 μL d'éthanol préalablement refroidi à -20°C pendant 1 heure. La solution résultante est mélangée au vortex puis refroidie à -20°C pendant 1 heure. La solution est ensuite centrifugée à 4°C pendant 15 minutes à 15 000 tours/minutes. Le surnageant est délicatement retiré et le culot est gardé. Le culot est rincé à l'aide d'une solution à 90% d'éthanol préalablement refroidi à 20°C pendant 1 heure. La solution est mélangée au vortex et ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 15 000 tours/minutes. La solution est ensuite placée dans un concentrateur sous vide, pour faire évaporer l'éthanol. Le culot est ensuite dilué dans 10 μL d'eau pour atteindre 10 μL d'ubiquitine. La solution est ensuite analysée.

Méthodes de précipitation par l'acétone TFA/méthanol : Une solution d'acétone acidifiée est préparée en mélangeant 9,99 mL d'acétone avec 10 μL de HCl à 1M. 10 μL d'une solution d'ubiquitine à 10 μM dans le LCR synthétique sont dilués dans 40 μL de la solution d'acétone acidifiée, préalablement refroidie à -20°C pendant 1 heure. La solution résultante est mélangée au vortex puis refroidie à -20°C pendant 1 heure. La solution est ensuite centrifugée à 4°C pendant 15 minutes à 15 000 tours/minutes. Le surnageant est délicatement retiré et le culot est gardé. La solution est ensuite placée dans un concentrateur sous vide, pour faire évaporer l'acétone acidifiée

résiduelle. Le culot est ensuite dilué dans 10 μL d'eau pour atteindre 10 μL d'ubiquitine. La solution est ensuite analysée.

Méthodes de précipitation par l'acétone à froid : 10 μL d'une solution d'ubiquitine à 10 μM dans le LCR synthétique sont dilués dans 40 μL de la solution d'acétone, préalablement refroidie à -20°C pendant 1 heure. La solution résultante est mélangée au vortex puis refroidie à -20°C pendant 1 heure. La solution est ensuite centrifugée à 4°C pendant 10 minutes à 15 000 tours/minutes. Le surnageant est délicatement retiré et le culot est gardé. L'opération est répétée une fois, puis le culot est ensuite placé à l'abri à température ambiante pendant 30 minutes pour faire évaporer l'acétone résiduelle. Le culot contenant les protéines précipitées est dilué dans 10 μL d'eau pour atteindre 10 μM d'ubiquitine. La solution est ensuite analysée.

Ultrafiltration : 10 μL d'une solution d'ubiquitine à 30 μM dans l'eau sont ajoutés à 100 μL de LCR synthétique. La solution est placée dans un filtre à centrifugation possédant un seuil de rétention moléculaire de 3,5 kDa. 400 μL d'eau ultrapure sont ajoutés à la solution. Le tout est centrifugé pendant 30 minutes à 6 000 tours/minutes. Puis 400 μL d'eau sont encore ajoutés, puis le tout est à nouveau centrifugé pendant 30 minutes à 6 000 tours/minutes. La solution récupérée est ensuite diluée dans l'eau pour atteindre une concentration de 10 μM avant d'être analysée.

Dialyse : 500 μL de LCR synthétique sont préparés avec 10 μM d'ubiquitine. La solution est placée dans une cartouche de dialyse possédant un seuil de rétention moléculaire de 3,5 kDa. La cartouche est immergée dans un b cher contenant 500 mL d'eau ultrapure. Le volume d'eau est légèrement agit  à l'aide d'un barreau magnétique. Le processus de dialyse dure 4 heures. La solution récupérée est ensuite directement analysée.

Analyse de peptides amyloides en microsysteme en verre

Instrumentation

Les analyses sur puces en verre ont été effectuées sur un poste à puce. Le système est composé d'un microscope à fluorescence Axio Observer A1 de Carl Zeiss (Marly le Roy, France), équipé d'un objectif X 20 (Carl Zeiss) et d'une lampe à vapeur de mercure (HXP 120 C, Carl Zeiss), muni d'une caméra CCD Orca-03G02 Hamamatsu (Hamamatsu, Japan) pour la détection des composés fluorescents lors de leur migration. Un générateur de tension multivoies de type HVS 448 600 D (labsmith, USA) a été utilisé pour l'application des tensions nécessaires aux étapes d'injection et de séparations de l'échantillon. Ce générateur est relié à 8 électrodes délivrant une tension variant entre -3000 V et 3000 V . Le logiciel HCImage (Hamamatsu, Japan) a été utilisé pour régler le nombre d'images par seconde et l'intensité lumineuse et pour enregistrer la

fluorescence de la zone de détection. Le logiciel Azur (Datalys, France) a été utilisé pour convertir les données en électrophérogramme. Ici, les puces en verre borosilicate utilisées sont de type simple croix. Les réservoirs, les anneaux adhésifs et les joints ont été obtenus chez Upchurch (Oak Harbor, WA, USA). Le schéma de la puce est illustré sur la **Figure 61** qui donne les dimensions internes du canal. Les longueurs des canaux entre la croix et les différents réservoirs sont les suivantes : S, 4,82 mm ; B, 9,39 mm ; SW, 4,82 mm ; BW, 80,89 mm.

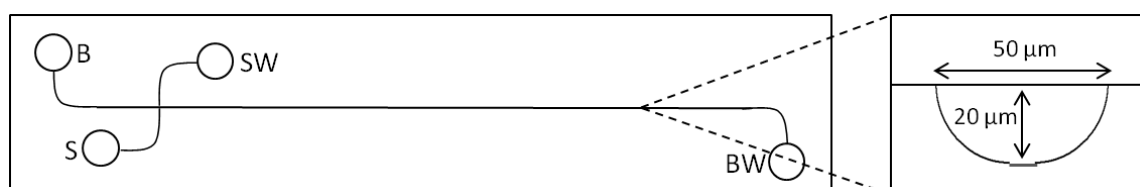


Figure 61 : Représentation schématique des puces en verre simple croix utilisées ainsi que d'une section du canal de séparation. La puce est munie de 4 réservoirs identifiés par les lettres suivantes : S, réservoir d'échantillon ; SW, réservoir du rejet d'échantillon ; B, réservoir du tampon ; BW, réservoir de rejet du tampon.

Echantillons et réactifs

Tous les peptides amyloïdes ont été obtenus chez Anaspec (Anaspec, France) sauf le peptide A β 1-42 obtenu chez American Peptide (USA). Tous les peptides sont d'abord repris dès leur réception dans une solution aqueuse d'ammonium hydroxyde à 0,16% puis stockés individuellement à -20°C et à une concentration de 2 mg/ml. Lors de leur utilisation, ils sont incubés dans une solution aqueuse d'ammonium hydroxyde à 10% pendant 30 minutes, puis lyophilisés de manière à supprimer l'ammonium hydroxyde.

Réaction de marquage des peptides

Les conditions de marquage ont été reproduites suivant le protocole décrit par Verpillot *et al.*, (2011). Pour cela, 2 µl de l'agent de dérivation FP 488 NHS à 10 mg/ml sont ajoutés à 98 µL d'une solution de peptides, quelles que soient les concentrations en peptides, et dilués préalablement dans un tampon borate à pH 10,5 et force ionique 40 mM. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes à température ambiante avant l'analyse.

Protocole de revêtement par le DMA-NAS-MAPS

- Prétraitement des canaux : Rinçage à l'éthanol (30 min) ; Rinçage au NaOH 1M (30 min) ; Rinçage à l'eau ultrapure (5 min) ; Rinçage au HCL 0,1M (60 min) ; Rinçage à l'eau ultrapure (5 min).
- Rinçage des canaux par une solution du polymère à 1% (m/m) dans de l'ammonium sulfate à 1,8 M pendant 10 min ;
- Incubation pendant 15 minutes puis rinçage à l'eau pendant 10 minutes ;
- Flux d'azote pour sécher les canaux puis chauffage à 80°C pendant 30 minutes
- Incubation de la solution bloquante (50 mM d'éthanolamine dans du TRIS/HCL 0,1 M pH 9) ;
- Chauffage du capillaire 15 minutes à 50°C ;
- Rinçage à l'eau puis séchage à température ambiante.

Protocole de revêtement par le DMA-GMA-MAPS

- Prétraitement des canaux : Rinçage à l'éthanol (30 min) ; Rinçage au NaOH 1M (30 min) ; Rinçage à l'eau ultrapure (5 min) ; Rinçage au HCL 0,1M (60 min) ; Rinçage à l'eau ultrapure (5 min).
- Rinçage des canaux par une solution du polymère à 1% (m/m) dans de l'ammonium sulfate à 1,8 M pendant 10 min ;
- Incubation pendant 15 minutes puis rinçage à l'eau pendant 10 minutes ;
- Flux d'azote pour sécher les canaux puis chauffage à 80°C pendant 30 minutes ;
- Rinçage à l'eau puis séchage à température ambiante.

Etude de matériaux alternatifs au verre pour la μ EC

Protocole de microfabrication des puces en COC

Un master en aluminium a été fabriqué par l'atelier de micro-usinage de l'Institut Curie à l'aide de fraises de 100 μ m de diamètre sur un appareil de micro-fraisage (Milling Machinery Corporation) avec les dimensions suivantes : diamètre des canaux 100 μ m, longueur du canal de séparation 6 cm et longueur des canaux latéraux 1cm. Une plaque en COC natif (Topas 8007, Tg 80°C, 5 mm d'épaisseur) et un film de COC (Topas 8007, Tg 80°C, 254 μ m d'épaisseur) sont découpés selon les dimensions du master et de la puce à microfabriquer. Le gaufrage à chaud de la plaque en COC est effectué en plaçant la plaque en COC sur le master en aluminium, tous deux préalablement nettoyés à l'aide d'isopropanol puis séchés. Le tout est placé dans une presse hydraulique sous une pression de 50 kPa à 130°C pendant 10 minutes. Ensuite, la pression et

maintenue tout en diminuant la température à 40°C. Une fois cette température atteinte, le master est délicatement décollé de la plaque imprimée. Les bords de la plaque sont ensuite découpés pour permettre l'obtention d'une surface plane et des trous sont perforés à l'aide d'une perceuse pour créer les réservoirs. Les plaques sont ensuite placées dans un bain à ultrason dans de l'isopropanol pendant 10 minutes et séchées ensuite à l'air comprimé. Pour le collage du film en COC permettant de refermer le système de canaux, un procédé de collage assisté par solvant illustré par la **Figure 66** est employé. Pour cela, une boîte de Petri est inversée et remplie de cyclohexane. Cette boîte est déposée dans un récipient plus grand contenant de l'eau. La plaque en COC est placée en équilibre au dessus de la solution de cyclohexane à l'aide de deux pièces de matériaux inertes au cyclohexane. La face imprimée par les canaux est donc en contact avec les vapeurs du solvant. Pour finir, un couvercle est placé sur le système entier pour hermétiser le tout et permettre le dépôt des vapeurs de cyclohexane sur la face imprimée de la plaque. Le procédé de collage est maintenu pour une durée de 4 minutes. Ensuite, la plaque est sortie délicatement et le film de COC est déposé sur la surface imprimée. Une pression manuelle est appliquée pendant une minute. Ensuite, la puce est placée dans la presse hydraulique et une pression de 50 kPa est appliquée pendant 20 minutes à 65°C. La pression est ensuite maintenue pendant 10 minutes à température ambiante. Finalement, la puce est sortie et les bords sont découpés et polis pour obtenir la puce finale.