



HAL
open science

Surface functionalization strategies for the design of a lab-on-a-chip integrating an aptamer-based molecular capture for the analysis of emerging water contaminants

Camille Perréard

► **To cite this version:**

Camille Perréard. Surface functionalization strategies for the design of a lab-on-a-chip integrating an aptamer-based molecular capture for the analysis of emerging water contaminants. Analytical chemistry. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. English. NNT : 2015PA066352 . tel-01266081

HAL Id: tel-01266081

<https://theses.hal.science/tel-01266081>

Submitted on 2 Feb 2016

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 Pierre et Marie Curie

École doctorale de Chimie Moléculaire de Paris Centre (ED 406)

Unité de technologies chimiques et biologiques pour la santé

Equipe Synthèse, électrochimie, imagerie et systèmes analytiques pour le diagnostic

Surface functionalization strategies for the design of a lab-on-a-chip integrating an aptamer-based molecular capture for the analysis of emerging water contaminants

Par Camille Perréard

Thèse de doctorat de Chimie analytique

Dirigée par Anne Varenne et Fethi Bedioui

Soutenue le 25 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Ciara O'Sullivan, Université de Tarragone (Espagne)	Rapporteur
Pr. Franck Le Derf, Université de Rouen	Rapporteur
Pr. Didier Devilliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Président du jury
Dr. Aurélien Bancaud, LAAS, Toulouse	Examineur
Dr. Yoann Ladner, IBMM, Montpellier	Examineur
Pr. Anne Varenne	Directrice de thèse
Dr. Sophie Griveau	Encadrante
Dr. Fanny d'Orlyé	Encadrante

Remerciements

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Madame Ciara O'Sullivan et Monsieur Franck Le Derf pour avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également Messieurs Didier Devilliers, Aurélien Bancaud et Yoann Ladner d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier Monsieur Daniel Scherman, pour m'avoir permis d'effectuer mes recherches au sein de l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé.

Mes remerciements s'adressent également à l'Institut Pierre-Gilles De Gennes pour la Microfluidique, qui a financé ma bourse de thèse et a fourni un environnement scientifique stimulant, propice aux collaborations et aux rencontres.

Je remercie le labex MiChem, qui m'a permis d'obtenir un financement pour partir quelques mois en mobilité dans un laboratoire du Département de Chimie de l'Université de Fudan, à Shanghai, en Chine. Je tiens à remercier chaleureusement Madame Baohong Liu, qui m'a accueillie dans son laboratoire, ainsi que ses étudiants, qui m'ont guidée, m'ont permis de m'intégrer et ont rendu cette expérience encore plus enrichissante.

J'adresse un grand merci à tout le personnel du laboratoire, pour leur aide et pour leur bonne humeur, qui ont contribué à rendre agréables ces trois ans de thèse. Mes plus sincères remerciements s'adressent à Anne Varenne et Fethi Bedioui, mes directeurs de thèse, pour m'avoir guidée tout au long de ces travaux, pour leurs précieux conseils et leur soutien. Je remercie également très chaleureusement mes encadrantes Fanny d'Orlyé et Sophie Griveau, pour leur présence au quotidien, leur aide précieuse pour les manipulations et leur gentillesse.

Un grand merci à mes collègues et amis doctorants du laboratoire, Abed, Gonzalo, FX et Ludovic, de partager les galères et les joies de la thèse au quotidien. Je tiens à remercier tout particulièrement ma voisine de bureau Caroline, dont la bonne humeur et le grain de folie ont été précieux lors de la rédaction de ce manuscrit. Enfin, un immense merci à Amandine, sans qui ces trois années auraient été beaucoup moins ensoleillées !

Je dédie également ces travaux à ma famille et à mes amis. Enfin, un grand merci à Clément d'avoir été là et de m'avoir supportée et soutenue au quotidien.

N.B. : *This manuscript is written in French and English. The first chapter concerning the bibliographic study and the state of the art is written in French, and the chapters presenting the experimental results are written in English. It also includes a French summary of all the thesis work.*

Ce manuscrit est rédigé en anglais et en français. Le premier chapitre concernant la bibliographie générale et l'état de l'art est rédigé en français. Les chapitres suivants présentant les résultats expérimentaux sont rédigés en anglais. Ce manuscrit comporte également un résumé en français du travail de thèse.

Glossaire / Glossary

μTAS	Microsystème d'analyse totale / Micro total analysis system
ACN	Acétonitrile / Acetonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique / Deoxyribonucleic acid
AFB1	Aflatoxine B1 / Aflatoxin B1
AIBN	Azobisisobutyronitrile
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique / Atmospheric pressure chemical ionization
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane / 3-Aminopropyltriethoxysilane
ARN	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ATP	Adénosine triphosphate / Adenosine triphosphate
ATR	Réflexion totale atténuée / Attenuated total reflection
AuNP	Nanoparticule d'or / Gold nanoparticle
BME	Méthyl éther de benzoïne / Benzoin methyl ether
BPA	Bisphénol A / Bisphenol A
BSTFA	N,O - bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide / N,O - Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CE	Électrophorèse capillaire / Capillary electrophoresis
COC	Copolymère d'oléfine cyclique / Cyclic olefin copolymer
CuAAC	Cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre(I) / Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition
CVD	Dépôt chimique en phase vapeur / Chemical vapor deposition
CZE	Électrophorèse capillaire de zone / Capillary zone electrophoresis
DCF	Diclofénac / Diclofenac

Glossaire

E2	17 β -estradiol
EE2	17 α -éthynylestradiol / 17 α -ethinyl estradiol
ESI	Ionisation par électronébulisation / Electrospray ionization
FAM	Carboxyfluorescéine / Carboxyfluorescein
FASI	Préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique / Field amplified sample injection
FASS	Préconcentration par amplification du champ électrique / Field-amplified sample stacking
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier / Fourier transform infrared spectroscopy
GC	Chromatographie gazeuse / Gas chromatography
GMPTS	Glycidoxypropylméthyldiéthoxysilane / Glycidoxypropylmethyldiethoxysilane
GO	Oxyde de graphène / Graphene oxide
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance / High performance liquide chromatography
HRP	Peroxydase de raifort / Horseradish peroxidase
ITO	Oxyde d'indium dopé à l'étain / Indium tin oxide
ITP	Isotachophorèse / Isotachopheresis
K _{app}	Constante apparente de transfert de charge / Apparent charge-transfer constant
LLE	Extraction liquide-liquide / Liquid-liquid extraction
MC-LR	Microcystine LR / Microcystin LR
MEKC	Chromatographie électrocinétique micellaire / Micellar electrokinetic chromatography
MIP	Polymère à empreinte moléculaire / Molecularly imprinted polymer
MS	Spectrométrie de masse / Mass spectrometry

Glossaire

MSTFA	N- Méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide / N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
MTBSTFA	N-Méthyl-N-tert-butyldiméthylsilyltrifluoroacétamide / N-Methyl-N-tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide
NSAID	Anti-inflammatoire non stéroïdien / Nonsteroidal anti-inflammatory drug
PA	Polyacrylate / Polyacrylate
PAA	Acide polyacrylique / Polyacrylic acid
PC	Polycarbonate / Polycarbonate
PCR	Réaction en chaîne par polymérase / Polymerase chain reaction
PDDA	Poly(diallyldiméthylammonium) / Poly(diallyldimethylammonium)
PDMS	Polydiméthylsiloxane / Polydimethylsiloxane
PE	Perturbateur endocrinien / Endocrine disruptor
PECVD	Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma / Plasma-enhanced chemical vapor deposition
PEGMA	Méthacrylate de polyéthylène glycol / Polyethylene glycol methacrylate
PET	Polytéréphtalate d'éthylène / Polyethylene terephthalate
PMMA	Polyméthacrylate de méthyle / Poly(methyl methacrylate)
PVD	Dépôt physique en phase vapeur / Physical vapor deposition
RLS	Spectroscopie de diffusion de la lumière de résonance / Resonance light scattering
SB	Sulforhodamine B / Sulforhodamine B
SBSE	Extraction par sorption sur barreau / Stir-bar sorptive extraction
SECM	Microscopie électrochimique à balayage / Scanning electrochemical microscopy
SELEX	Évolution de ligands par enrichissement exponentiel / Systematic evolution of ligands by exponential enrichment

Glossaire

SERS	Diffusion Raman exaltée par effet de surface / Surface-enhanced Raman scattering
SPE	Extraction sur phase solide / Solid phase extraction
SPME	Microextraction en phase solide / Solid phase microextraction
SWV	Voltampérométrie à vague carrée / Square-wave voltammetry
TEOS	Orthosilicate de tétraéthyle / Tetraethyl orthosilicate
THV	Polymère composé de tétrafluoroéthylène, d'hexafluoropropylène et de fluorure de vinylidène / Polymer composed of tetrafluoroethylene, hexafluoropropylene and vinylidene fluoride
TIRF	Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne / Total internal reflection fluorescence microscopy
UME	Ultramicroélectrode / Ultramicroelectrode
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra Performance / Ultra Performance Liquid Chromatography
XPS	Spectroscopie de photoélectron X / X-ray photoelectron spectroscopy

Table of contents

Glossaire / Glossary.....	5
Table of contents.....	9
Résumé des travaux de thèse	15
1 Introduction.....	15
2 Etat de l'art.....	16
2.1 Analyse de traces de produits pharmaceutiques en milieux aqueux.....	16
2.2 Intérêt pour les aptamères en chimie analytique	17
2.3 Les systèmes microfluidiques et leur application à l'analyse environnementale .	18
3 Stratégie	19
4 Résultats.....	22
4.1 Fonctionnalisation du COC et du THV par voie plasma (Chapitre II).....	22
4.2 Fonctionnalisation par voie électrochimique (Chapitre III).....	28
4.3 Encapsulation d'aptamères par méthode sol-gel (Chapitre IV)	33
5 Conclusion	37
6 Références bibliographiques.....	39
General introduction	43
Introduction générale.....	47
Chapitre I Bibliographie générale.....	53
1 Analyse de traces de produits pharmaceutiques en milieux aqueux	55
1.1 Les composés pharmaceutiques, polluants émergents des eaux	55
1.2 Méthodologies analytiques utilisées	56
1.2.1 Extraction et préconcentration	56
1.2.2 Méthodes de séparation	64
1.2.3 Méthodes de détection	72

Table of contents

1.2.4	Autres méthodes (immunoassays, biosensors).....	73
1.3	Conclusion.....	76
2	Les aptamères et leurs applications analytiques	79
2.1	Structure des aptamères.....	80
2.2	Propriétés des aptamères.....	82
2.3	Processus de sélection	83
2.3.1	Composition de la banque d'oligonucléotides.....	85
2.3.2	Méthodes de tri.....	85
2.4	Utilisation des aptamères dans l'analyse environnementale.....	86
2.4.1	Méthodes colorimétriques.....	87
2.4.2	Méthodes de fluorescence.....	90
2.4.3	Méthodes de chimiluminescence.....	95
2.4.4	Méthodes électrochimiques.....	97
2.4.5	Autres méthodes de spectroscopie.....	99
2.4.6	Tableau comparatif	102
2.5	Conclusion.....	105
3	Systèmes microfluidiques principes généraux et application à l'analyse environnementale.....	107
3.1	Mise en mouvement des fluides en microsystemes	108
3.1.1	Injection sous champ électrique	108
3.1.2	Injection hydrodynamique	109
3.1.3	Injection par centrifugation.....	110
3.2	Intégration des différentes étapes d'analyse	111
3.2.1	Prétraitement de l'échantillon	111
3.2.2	Mélange des réactifs	117
3.2.3	Electrophorèse sur puce.....	120
3.2.4	Immunocapteurs sur puce.....	123
3.2.5	Méthodes de détection en microcanal	125
3.2.6	Systèmes autonomes	129
3.3	Conclusion.....	131

Table of contents

4	Matériaux pour la microfluidique et traitements des microcanaux.....	133
4.1	Matériaux utilisés.....	133
4.1.1	Le silicium	133
4.1.2	Le verre.....	134
4.1.3	Les polymères.....	135
4.2	Fonctionnalisation du COC.....	139
4.2.1	Modification par dépôt en phase vapeur.....	140
4.2.2	Modification de la surface du COC par photochimie	142
4.2.3	Modification par plasma.....	147
4.3	Conclusion.....	152
5	Références.....	153
6	Strategy for the microsystem development	165
6.1	Proposed strategy.....	165
6.2	Functionalization methods developed	166
Chapter II Surface functionalization of polymeric microfluidic materials by plasma and click chemistry processes.....		
1	Introduction.....	173
2	Materials and Methods.....	175
2.1	Materials	175
2.2	Plasma polymer deposition	175
2.3	Procedure for azide functionalization of Br-modified substrates	176
2.4	Procedure for CuAAC reactions of N ₃ -modified COC substrates with a fluorescent dye	176
2.5	Characterization techniques	177
2.5.1	Br-modified surfaces	177
2.5.2	N ₃ - and Acetylene-Fluor 488 (AF) - modified surfaces	178
3	Modification of COC surfaces.....	179
3.1	Evaluation of the precursor fragmentation under argon plasma.....	179

Table of contents

3.2	Effect of the plasma power on the brominated polymer deposition on COC surfaces	182
3.3	Effect of deposition time	186
3.4	Modification of the brominated-COC surface by click chemistry.....	188
3.5	Conclusion.....	192
4	Modification of THV surfaces	194
4.1	Enhancement of the hydrophilicity of the THV surface by pre-treatment with argon plasma	194
4.2	Bromination of THV surface.....	198
4.3	Chemical grafting through click reaction	199
4.4	Conclusion	201
5	Conclusion and perspectives.....	201
6	References.....	202
Chapter III Electrochemically assisted micro localized grafting of aptamer in a micro channel engraved in fluorinated thermoplastic polymer Dyneon THV		205
1	Introduction.....	207
2	Materials and methods	210
2.1	Materials	210
2.2	General procedure for carbonization of THV substrate surfaces.....	210
2.3	General procedure for fluorescent dye immobilization and aptamer immobilization on N3-modified THV substrate surfaces through CuAAC reaction.....	211
2.4	Characterization of Acetylene-Fluor 488–modified and aptamer-modified THV substrate surfaces	211
3	Results	212
3.1	Carbonization on THV plates and immobilization of a model dye	212
3.2	Carbonization in THV microchannel	214

Table of contents

3.3	Grafting of aptamer	216
4	Conclusion	217
5	References.....	219
Chapter IV	Aptamer entrapment in silica sol-gel in microchannel	221
1	Introduction.....	223
2	Materials and methods	227
2.1	Aptamers.....	227
2.2	Microchip fabrication.....	228
2.3	Sol-gel encapsulation of aptamers.....	229
2.4	Fluorescence measurement.....	230
2.5	Evaluation of aptamer leaching	230
2.6	Activity of encapsulated aptamers	230
3	Results and discussion.....	231
3.1	Aptamer encapsulation in silica sol-gel in a microchannel.....	231
3.2	Aptamer retention	234
3.3	Conservation of aptamer activity	235
4	Conclusion	237
5	References.....	238
General conclusion.....		239

Résumé des travaux de thèse

1 Introduction

Développés pour améliorer la santé humaine et le bien-être, les composés pharmaceutiques ne sont pas totalement éliminés des eaux usées par les stations d'épurations et retournent dans l'eau environnementale. Ils sont désormais considérés comme des polluants émergents des eaux, avec un risque méconnu sur l'environnement et la santé humaine [1].

Ces composés peuvent avoir une activité biologique à des concentrations de l'ordre du ng/L [2], il faut donc des méthodes analytiques suffisamment sensibles pour les détecter à l'état de traces. Actuellement, les méthodes analytiques utilisées permettent d'atteindre des limites de détection de l'ordre du ng/L voire inférieures mais comprennent plusieurs étapes dissociées et des équipements lourds. L'apparition de biocapteurs ou de méthodes utilisant des ligands sélectifs des cibles à analyser permet de simplifier l'analyse, sans pour autant atteindre des limites de détection comparables à celles des méthodes analytiques classiques.

La miniaturisation de ces chaînes analytiques est un enjeu essentiel pour développer des systèmes transportables pour l'analyse sur site. L'intégration des différentes étapes analytiques, du prétraitement à la détection, au sein de systèmes microfluidiques est une voie prometteuse pour obtenir des systèmes sensibles, permettant une détection rapide à moindre coût, avec une consommation d'échantillon et de solvant réduites. Cependant, plusieurs problématiques apparaissent avec le format microfluidique. Entre autres, des traitements de la surface des microcanaux sont nécessaires pour éviter l'adsorption de composés sur les parois et contrôler les écoulements, et la sensibilité de détection est souvent limitée.

Après un état de l'art des méthodes utilisées dans l'analyse environnementale pour la quantification de traces ainsi que de l'intérêt des aptamères, ligands sélectifs potentiels pour ces analyses, et de la microfluidique pour développer de nouvelles méthodes, nous présenterons la stratégie envisagée pour la conception d'un microsystème analytique permettant de détecter et quantifier des composés pharmaceutiques à l'état de traces, ainsi que les différentes voies de fonctionnalisation développées pour répondre aux différentes problématiques.

2 Etat de l'art

L'état de l'art est présenté dans le premier chapitre. Il est constitué de 3 parties, traitant des méthodes analytiques pour la détection et la quantification des composés pharmaceutiques à l'état de traces, d'une présentation des aptamères, ligands sélectifs potentiels, et de leurs applications dans le domaine de l'analyse environnementale, et de l'intérêt des systèmes microfluidiques pour développer des laboratoires sur puce pour analyse de traces (Chapitre I).

2.1 Analyse de traces de produits pharmaceutiques en milieux aqueux

La majorité des méthodes utilisées pour l'analyse de traces de composés pharmaceutiques nécessite des chaînes analytiques lourdes avec des appareils coûteux pour atteindre une sensibilité nécessaire à l'analyse d'échantillons réels. Ces méthodes intègrent généralement plusieurs étapes successives : une étape de prétraitement, une étape de séparation par chromatographie (liquide ou gazeuse) ou électrophorèse capillaire, et enfin une étape de détection.

La méthode de prétraitement la plus répandue est l'extraction sur phase solide (SPE pour *solid phase extraction*) [3]. En SPE, l'échantillon est passé à travers une cartouche contenant une phase solide sur laquelle vont s'adsorber les composés d'intérêt, ce qui permet de les concentrer et de les extraire des autres composés de la matrice. Les composés adsorbés sont élués de la colonne à l'aide de solvants et récupérés pour la suite de l'analyse.

Une étape de séparation par chromatographie ou électrophorèse est ensuite appliquée. La chromatographie liquide est la plus répandue et permet d'analyser plusieurs dizaines de composés simultanément [4-6]. La chromatographie gazeuse est également utilisée, mais nécessite une étape de dérivation pour les composés non volatils, compliquant la procédure analytique [7-9]. Enfin, l'électrophorèse a été appliquée à l'analyse de traces. Elle ne permet pas l'analyse simultanée d'autant de composés que les méthodes chromatographiques, mais elle offre en général une analyse plus rapide, et des méthodes de préconcentration électrophorétiques *in situ* peuvent être mises en place et améliorer la sensibilité [10-13].

Enfin, les composés sont détectés à l'aide de différentes techniques couplables avec les méthodes séparatives. La détection la plus simple à mettre en place est la détection par

spectroscopie UV-visible, les appareils de chromatographie ou d'électrophorèse intégrant le plus souvent ce type de détecteur. Cependant, elle n'offre pas en général une sensibilité suffisante pour l'analyse de composés à l'état de traces, et le recours à la spectrométrie de masse est nécessaire pour atteindre des limites de détection de l'ordre du ng/L, ce qui demande un appareillage nettement plus coûteux.

La dissociation des différentes étapes analytiques nécessite une manipulation des échantillons entre les étapes et entraîne un risque d'erreur, dû à une contamination ou à une perte de matière. De plus, les systèmes de détection utilisés tels que les spectromètres de masse sont difficilement transportables, et ne sont donc pas adaptés à l'analyse sur site.

Pour pallier ces problèmes, des biocapteurs ont été développés, utilisant notamment des anticorps pour capter les cibles d'intérêt, la reconnaissance de la cible par l'anticorps induisant un signal mesurable permettant de détecter et quantifier la cible [14]. Cependant, ces biocapteurs offrent des limites de détection allant généralement du µg/L au mg/L et nécessitent encore des développements pour atteindre des sensibilités de l'ordre du ng/L comparables aux chaînes analytiques classiques. De plus, les anticorps présentent certains inconvénients notamment en termes de stabilité thermique, ce qui pose problème dans le développement de biocapteurs transportables sur le terrain.

2.2 Intérêt pour les aptamères en chimie analytique

Les aptamères apparaissent comme une alternative intéressante aux anticorps pour le développement de biocapteurs [15]. Ces oligonucléotides de plusieurs dizaines de bases, sélectionnés pour leur affinité envers une cible à partir d'une banque d'oligonucléotides synthétiques, présentent en effet de nombreux avantages par rapport aux anticorps, résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des propriétés des anticorps et des aptamères [15, 16]

Paramètre	Anticorps	Aptamères
Production	Production in vivo (animaux ou lignées cellulaires) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Long, coûteux ▪ Purification difficile ▪ Cibles immunogènes ▪ Variation de l'affinité d'un lot à l'autre 	Sélection in vitro puis production par synthèse chimique <ul style="list-style-type: none"> ▪ Rapide, faible coût ▪ Pureté élevée (conditions dénaturantes) ▪ Tout type de cibles ▪ Reproductibilité d'un lot à l'autre
Stabilité	Sensibilité à la température (dénaturation irréversible)	Stabilité à long terme : transport à température ambiante, régénération facile et rapide
Modifications chimiques	Diminution ou perte d'affinité possible lors du marquage	Conservation de l'affinité (contrôle de la position de la modification)
Paramètres cinétiques	Non modifiables	Modifiables en fonction du procédé SELEX employé

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées en utilisant des aptamères pour détecter des cibles environnementales variées (de l'ion à la bactérie), et ont été validées dans des matrices environnementales. Ces méthodes permettent une analyse rapide (quelques dizaines de minutes) et suffisamment sensible pour permettre la détection de composés en dessous des normes environnementales qui sont de l'ordre du µg/L [16, 17].

Pour obtenir des méthodes plus sensibles, les stratégies utilisées pour les biocapteurs peuvent être couplées avec des étapes de prétraitement/préconcentration et de séparation à l'intérieur de systèmes miniaturisés d'analyse totale à l'aide de la microfluidique.

2.3 Les systèmes microfluidiques et leur application à l'analyse environnementale

La microfluidique apparaît comme un outil puissant pour développer des systèmes miniaturisés permettant une analyse sur site rapide, sensible et à coût réduit, de façon portable, avec des volumes d'échantillon et de solvant réduits [18]. Les systèmes microfluidiques permettent d'intégrer les différentes étapes d'analyse au sein d'un système miniaturisé facilement transportable et utilisable. Plusieurs systèmes microfluidiques ont été

utilisés pour la détection de polluants et notamment de composés pharmaceutiques dans des matrices environnementales (eaux de surface), en intégrant des immunocapteurs [19-21] ou des méthodes de séparations électrophorétiques [22-24] couplées à des techniques de détection optiques ou électrochimiques.

Les premiers systèmes microfluidiques ont été fabriqués en verre ou en silicium [25], mais ils sont peu à peu remplacés par des matériaux polymères, offrant des méthodes de microfabrication plus simples et à moindre coût.

Malgré de nombreux avantages, il faut prendre en compte les problématiques inhérentes au format microfluidique. Tout d'abord, la sélectivité et la sensibilité de l'analyse doivent être conservées pour atteindre des performances rivalisant avec les chaînes analytiques classiques. De plus, les analytes cibles ainsi que d'autres entités présentes dans l'échantillon peuvent s'adsorber sur les parois du microcanal. Enfin, les flux à l'intérieur du microcanal doivent être contrôlés. Des traitements de surface sont nécessaires pour répondre à ces problématiques et garantir une analyse fiable. Les méthodes de fonctionnalisation doivent être adaptées au matériau utilisé pour la fabrication du microsystème, notamment à sa réactivité de surface.

Ces différentes problématiques expliquent en partie que malgré le développement de différents systèmes analytiques miniaturisés, peu de microsystèmes d'analyse totale permettant l'étude directe d'échantillons réels ont été réalisés. Généralement, l'utilisation de microsystèmes pour l'analyse d'échantillons complexes requiert une étape de prétraitement et de préconcentration externe pour obtenir une sensibilité suffisante.

3 Stratégie

Notre stratégie consiste à développer un microsystème intégrant la totalité d'une chaîne analytique tout en conservant un design assez simple pour faciliter la microfabrication et l'utilisation, dont le schéma est présenté en Figure 1. Un des verrous le plus important au développement de microsystèmes d'analyse totale est la préconcentration des composés cibles, particulièrement dans le cas de l'analyse de traces, dans laquelle un volume d'échantillon important doit être analysé pour atteindre des quantités de composés cibles mesurables.

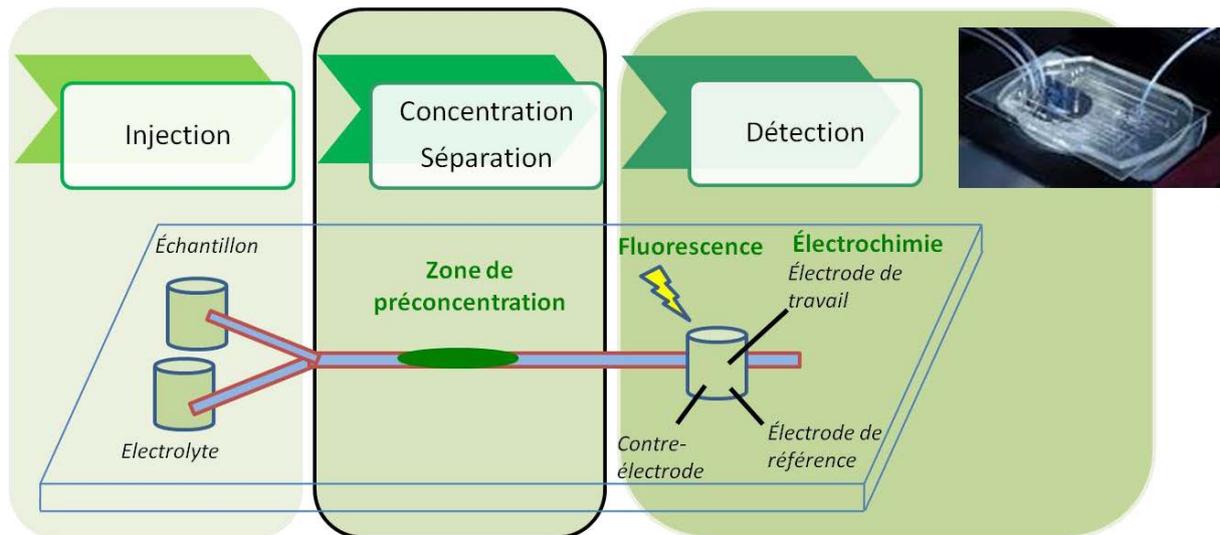


Figure 1 : Schéma du microsystème d'analyse totale envisagé, intégrant une zone de préconcentration contenant des ligands sélectifs.

Un des points clés de notre système est l'intégration d'une zone de préconcentration à l'intérieur du microcanal dans laquelle sont immobilisés des ligands sélectifs à la cible. Cette zone permet d'extraire le composé cible du reste de l'échantillon et de le préconcentrer. La cible sera ensuite éluée de la zone de préconcentration et entraînée sous flux maîtrisé dans le canal jusqu'à la zone de détection, pour une quantification par une méthode sensible, telle la détection par fluorescence ou l'électrochimie. La région de préconcentration doit être bien définie et les composés cibles doivent être libérés rapidement pour limiter la diffusion et garder les analytes cibles dans une bande bien définie pour la détection.

Un autre aspect original de ce microsystème est l'utilisation d'aptamères comme ligands sélectifs dans la zone de préconcentration. Malgré de nombreux avantages tels qu'une grande stabilité, une spécificité importante et une forte affinité pour leur cible, peu de véritables applications dans des systèmes miniaturisés pour l'analyse sur site ont été rapportées.

Afin de répondre aux différentes problématiques, deux voies ont été étudiées dans ce travail, (1) une fonctionnalisation de la zone de préconcentration par immobilisation d'un ligand à la surface du matériau, (2) l'intégration du ligand dans une phase sol-gel.

Concernant la première voie, deux types de fonctionnalisation de surfaces doivent être effectués dans le microcanal :

- Une fonctionnalisation locale pour greffer les aptamères dans la zone de préconcentration
- Un traitement global du reste des parois du canal pour éviter l'adsorption et contrôler les écoulements.

Les méthodes de fonctionnalisation utilisées doivent être compatibles avec la réactivité de surface des matériaux utilisés pour la fabrication du microsysteme. Le copolymère d'oléfine cyclique (COC pour *cyclic olefin copolymer*) et un polymère fluoré composé de tétrafluoroéthylène, d'hexafluoropropylène et de fluorure de vinylidène (THV) ont été sélectionnés pour leur excellente inertie chimique et leurs propriétés optiques intéressantes. Ils présentent en effet une transparence proche du verre, résistent à la plupart des solvants et aux pH extrêmes et peuvent être produits à faibles coûts. Leur faible réactivité de surface est un avantage en termes de résistance chimique, mais c'est un inconvénient pour la fonctionnalisation car ils ne présentent pas de groupements fonctionnels facilement dérivables à leur surface, ce qui rend leur modification par réaction chimique très difficile. De nouvelles méthodes ont donc été développées durant ce travail pour fonctionnaliser ces matériaux, basées sur une combinaison de procédés plasma ou électrochimique avec une réaction de chimie « click », la cycloaddition de Huisgen entre un alcyne et un azoture catalysée par le cuivre (CuAAC) [26]. Ces méthodes sont présentées dans la Figure 2.

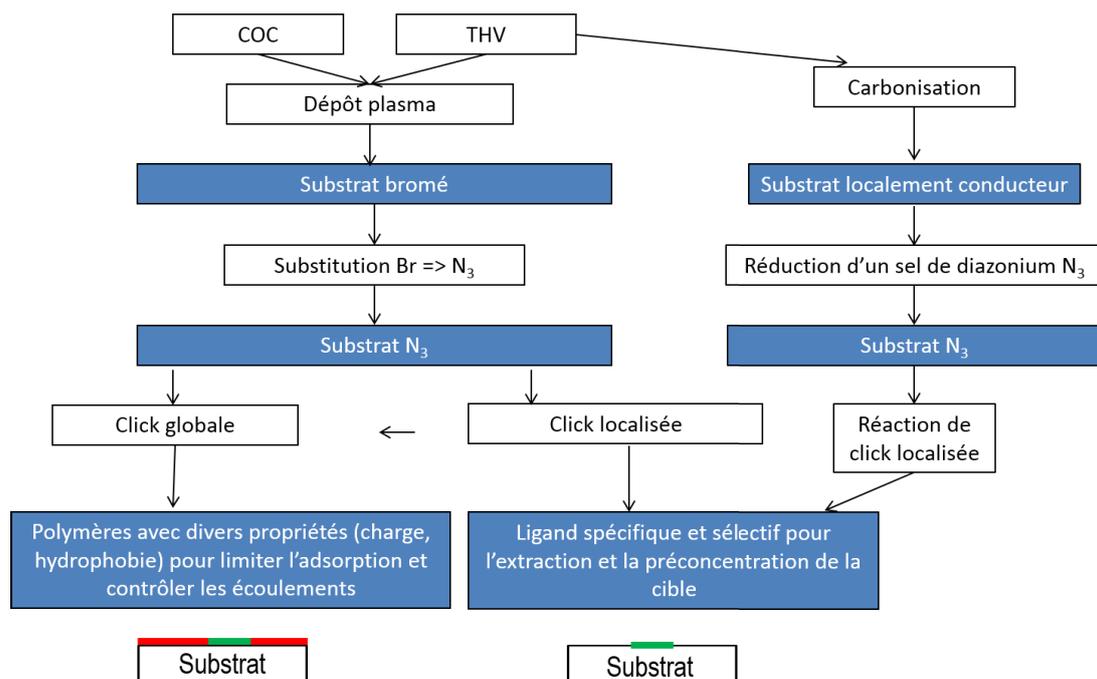


Figure 2 : Schéma des différentes voies de fonctionnalisation développées

Dans un premier temps, un procédé plasma a été utilisé pour introduire des groupements bromés sur la totalité de la surface du matériau, qui vont servir de point d'ancrage pour l'immobilisation du ligand. Les groupements bromés sont ensuite substitués par des groupements azoture, et la réaction de CuAAC est effectuée, permettant de fonctionnaliser la surface du COC ou du THV avec un ligand contenant un alcyne terminal (Chapitre II).

Dans une seconde étude, une méthode électrochimique a été développée pour « carboniser » localement le matériau, afin de générer le greffage local d'aptamère sur le matériau. La carbonisation confère localement des propriétés de conducteur, permettant le greffage d'un sel de diazonium contenant un groupe azoture sur lequel est effectuée la réaction de chimie click pour greffer le ligand sélectif (Chapitre III).

Concernant la deuxième voie, la possibilité d'encapsuler les aptamères dans une phase de silice par une méthode sol-gel, permettant ainsi d'augmenter la densité de ligands dans la zone de préconcentration et d'améliorer son rendement, a été étudiée. Les résultats préliminaires seront présentés.

4 Résultats

4.1 Fonctionnalisation du COC et du THV par voie plasma (Chapitre II)

Dans une première étude, nous avons utilisé un dépôt plasma afin de greffer des ligands sur toute la surface de plaques de COC ou de THV. Cette méthode comporte 4 étapes, décrites dans la Figure 3.

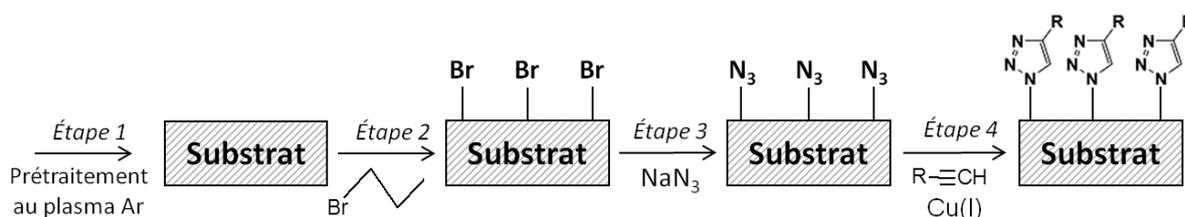


Figure 3 : représentation schématique des étapes du procédé de traitement des matériaux COC et THV par plasma et chimie « click ».

La première étape consiste à prétraiter le COC ou le THV par un plasma d'argon pour le nettoyer des contaminants présents à leur surface [27, 28]. La pièce de COC ou de THV est placée dans un réacteur sous vide dans lequel est introduit de l'argon. Une décharge est ensuite appliquée, pour ioniser le gaz dans l'enceinte, créant un plasma. Les électrons présents dans le plasma bombardent la surface du matériau et enlèvent les contaminants à sa surface. La Figure 4 présente des mesures d'angles de contact effectuées en déposant une goutte d'eau sur la surface du COC avant et après prétraitement. L'angle de contact de 90° avant prétraitement chute à 35° après prétraitement. Le prétraitement rend donc le COC plus hydrophile, grâce à l'incorporation de groupes fonctionnels contenant de l'oxygène à sa surface [29, 30]. La présence d'oxygène peut être due à de l'air résiduel présent dans le réacteur ou à des réactions avec l'oxygène de l'air lorsqu'on sort le matériau prétraité de l'enceinte sous vide [30, 31].

La deuxième étape consiste à incorporer des fonctions bromées à la surface du matériau en utilisant un dépôt plasma. À la fin du prétraitement, un précurseur contenant du brome (1-bromopropane) est introduit dans le réacteur, avec de l'argon. La décharge plasma conduit à la fragmentation du précurseur et crée des radicaux qui réagissent avec ceux créés à la surface du matériau par plasma et permet de greffer des dérivés bromés à la surface du COC et du THV. Le temps de dépôt et la puissance plasma lors de cette seconde étape ont été optimisés pour obtenir des dépôts homogènes et stables.

La présence de ce dépôt bromé à la surface des matériaux a été validée par différentes méthodes. Tout d'abord, la présence d'un dépôt a été confirmée par angle de contact, en déposant une goutte d'eau à la surface. Les résultats sont présentés en Figure 4 dans le cas du COC, pour différentes puissances de décharge plasma et un temps de traitement fixe (10 minutes). On observe que l'angle de contact du COC, qui a diminué de 90 à 35° lors du prétraitement, augmente jusqu'à près de 90° ($88,5 \pm 1.7^\circ$ pour 60 W), indiquant qu'un dépôt hydrophobe se forme lors du traitement par plasma bromé. L'angle de contact maximum observé pour une décharge de 60 W montre que le dépôt est moins important lorsqu'une puissance inférieure est utilisée, et que les puissances supérieures modifient les propriétés du dépôt à cause d'un effet abrasif du plasma [30, 31]. La stabilité du dépôt après rinçage a été évaluée, ainsi que la stabilité lors du stockage à l'air ambiant. Aucun changement significatif de l'angle de contact n'a été mesuré, indiquant que le dépôt bromé adhère de

manière stable sur la surface du matériau. Des résultats similaires ont été obtenus pour le traitement du THV.

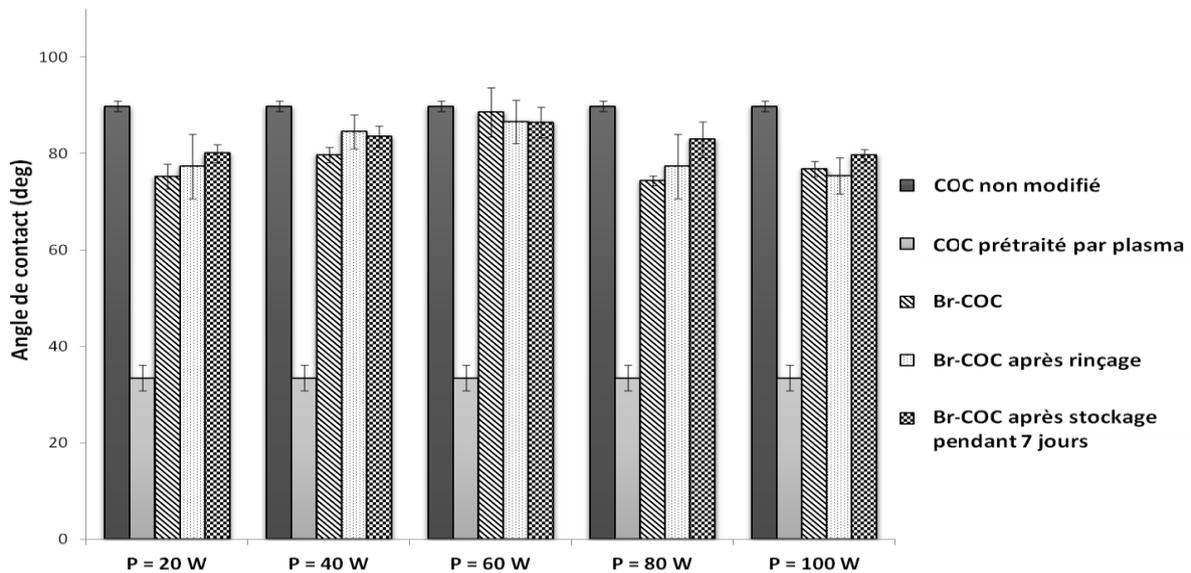


Figure 4 : Effet de la puissance de décharge plasma lors du dépôt bromé sur l'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface du COC (n =3). Les paramètres de prétraitements à l'argon sont fixes (20 W, 5 min, débit d'argon de 75 sccm et pression initiale de 0,3 mbar). Pour le traitement par plasma bromé, la puissance varie de 20 W à 100 W, les autres paramètres étant constants (10 min, débit d'argon de 75 sccm et pression initiale de 0,3 mbar)

L'étude de l'angle de contact prouve qu'un dépôt a été effectué sur la surface du matériau, cependant il est nécessaire de vérifier que ce dépôt contient bien des fonctions bromées. Pour cela, des expériences de spectroscopie de photoélectrons X (XPS pour *X-ray photoelectron spectroscopy*) ont été menées. Le Tableau 2 montre les pourcentages d'atomes de brome, de carbone et d'oxygène obtenus pour des conditions de dépôt optimisée sur le COC (60 W, 10 min).

Après traitement par le plasma contenant le précurseur bromé, la concentration moyenne de brome à la surface du COC est de 8,7 %, et la concentration moyenne de brome par rapport à celle de carbone est de 11,4 %. Ces résultats montrent qu'une proportion significative d'atomes de brome est présente dans le dépôt à la surface du matériau. De plus,

la diminution de la concentration en atomes de carbone en surface confirme la présence d'un dépôt à la surface du COC. Quant à l'augmentation de la concentration d'oxygène, elle peut provenir d'oxygène résiduel présent dans le réacteur plasma ou d'une incorporation lors du stockage à l'air après le dépôt plasma, à cause d'une réaction de l'oxygène de l'air avec des radicaux encore présents à la surface du matériau. Des résultats similaires ont été observés sur le THV.

Tableau 2 : Composition élémentaire de la surface du COC déterminée par XPS, avant et après dépôt de dérivés bromés par plasma. Paramètres plasma : puissance de la décharge plasma = 60 W, temps de dépôt = 10 min, débit d'argon = 75 sccm, pression initiale = 0.3 mbar.

Échantillon	C (%)	O (%)	Br (%)
COC non modifié	86,7	11,4	-
COC modifié par dépôt bromé	75,4	15,4	8,7

La troisième étape consiste à substituer les groupements bromés par des groupements azoture en faisant réagir les groupements bromés avec de l'azoture de sodium, pour pouvoir ensuite mettre en œuvre une réaction de chimie « click ». Le remplacement des fonctions brome par des fonctions azotures peut être évalué par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en utilisant la technique de réflexion totale atténuée (FTIR-ATR pour *Fourier transform infrared spectroscopy – Attenuated total reflection*). La Figure 5 présente le spectre FTIR-ATR du COC traité par plasma bromé puis substitué par des groupements azotures (ligne en pointillés) après soustraction du spectre mesuré sur le matériau avant traitement. On observe l'apparition d'une bande caractéristique des groupes azotures à 2100 cm^{-1} , ce qui prouve que les groupements bromés ont été substitués par des azotures.

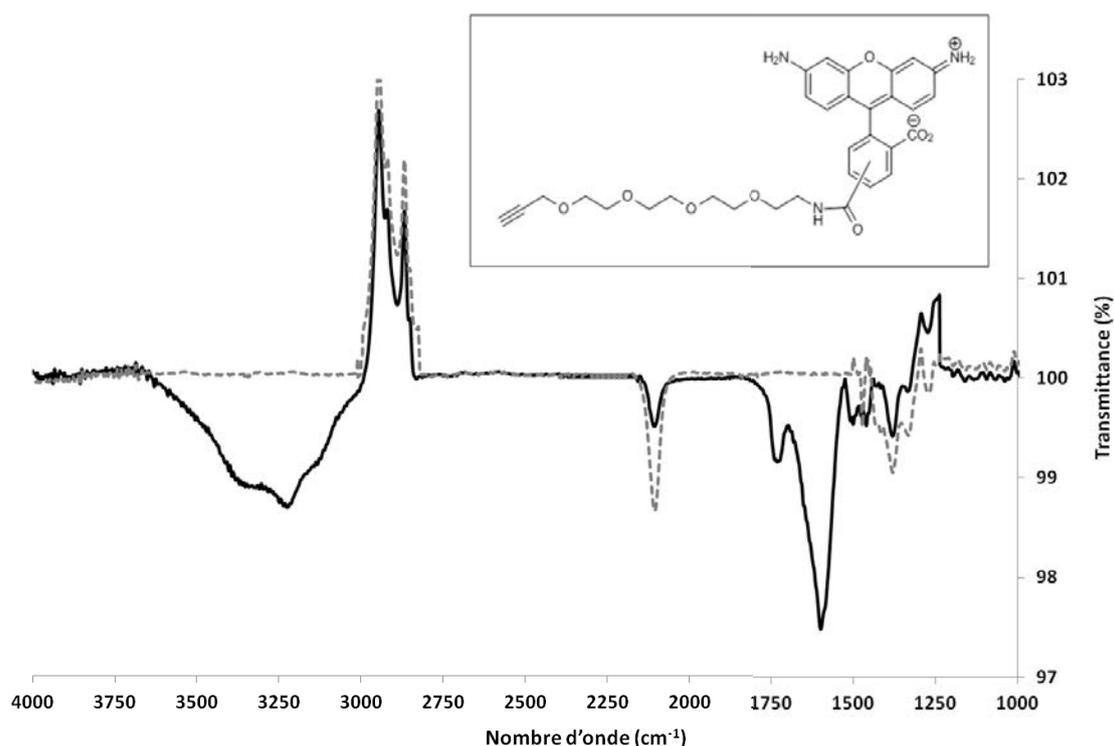


Figure 5 : Spectre FTIR—ATR de la surface du COC après modification avec les groupements azotures (ligne pointillée) et réaction de CuAAC avec le fluorophore modèle (ligne continue). Fluorophore utilisé : acétylène-fluor 488 (insert). Le spectre de la surface du COC non modifié a été soustrait.

La preuve de concept de la dernière étape consiste à faire réagir des groupements azotures de la surface avec un fluorophore portant un groupement alcyne terminal, en utilisant la réaction de cycloaddition de Huisgen catalysée par le cuivre [26]. Afin de valider notre approche, un fluorophore modèle contenant un groupement alcyne a été choisi, l'Acétylène-fluor 488 (Figure 5, insert). Le greffage du fluorophore peut être caractérisé par FTIR-ATR (Figure 5, ligne continue) et par microscopie de fluorescence. Le spectre FTIR-ATR montre une diminution de 70% de la bande azoture (2100 cm^{-1}) indiquant la conversion d'une part importante des azotures en cycle triazole suite à l'immobilisation du fluorophore par la réaction de CuAAC. Le spectre montre également la présence de plusieurs bandes caractéristiques de la présence d'amines primaire et/ou secondaires (3300 cm^{-1}), de groupements carbonyles (1744 cm^{-1}), amines et amides ($1680\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$), concordants avec l'immobilisation du fluorophore sur la surface du COC.

La microscopie de fluorescence a également été utilisée pour caractériser la surface et prouver le greffage du fluorophore. La Figure 6 présente les images obtenues en

fluorescence avant (Figure 6.a) et après l'étape de greffage du fluorophore sur le COC (Figure 6.b). Ces images montrent une fluorescence homogène et plus importante après le greffage du fluorophore, confirmant la fonctionnalisation de la surface du matériau. Lorsque l'étape de CuAAC est réalisée sur un matériau non traité ou en l'absence de Cu(I), aucune augmentation de l'intensité de fluorescence n'est observée, démontrant l'absence d'adsorption non spécifique sur la surface du COC.

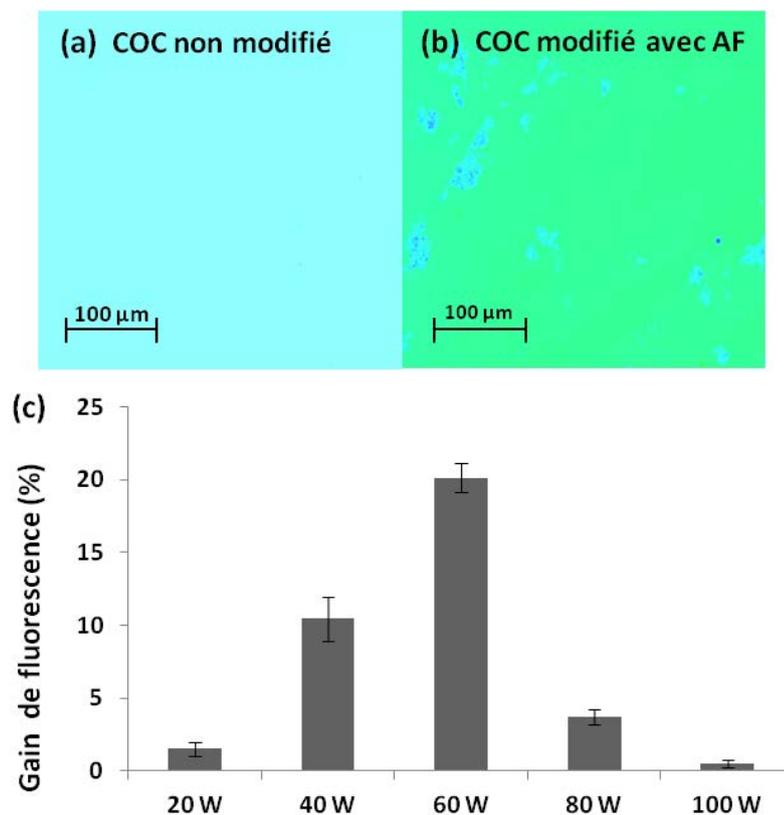


Figure 6 : Images de microscopie de fluorescence en fausses couleurs montrant (a) la surface du COC non modifiée et (b) la surface du COC ayant subi toutes les étapes de modification (plasma, substitution par des fonctions azotures et réaction de chimie click avec le fluorophore modèle). (c) Gain de fluorescence après la réaction de CuAAC pour différentes puissances de décharge plasma.

La Figure 6.c montre le gain de fluorescence, c'est-à-dire la proportion d'augmentation de la fluorescence après greffage, pour différentes puissances de plasma allant de 20 W à 100 W (étape de dépôt de brome). On observe un gain variant de 3 % à 20 % en fonction de la puissance, avec un maximum à 60 W. Ce résultat confirme qu'une puissance de 60 W est optimale pour le dépôt bromé et pour sa réactivité.

Ces résultats démontrent la possibilité de greffer un fluorophore sur les surfaces de COC et de THV de façon robuste et homogène à l'aide d'un dépôt de dérivés bromés par voie plasma. Ce procédé peut être appliqué pour introduire des groupements fonctionnels variés à la surface de ces matériaux, comme par exemple des groupements polyéthylène glycol permettant de limiter l'adsorption à leur surface. Cette nouvelle approche offre un moyen de fonctionnalisation simple et de nouvelles perspectives dans le développement de microsystèmes analytiques en COC et THV.

4.2 Fonctionnalisation par voie électrochimique (Chapitre III)

La méthode de dépôt par plasma permet de fonctionnaliser la surface entière d'une plaque de THV, cependant elle n'est pas adaptée au greffage localisé de ligands sélectifs, essentiel pour le développement du microsystème analytique souhaité. Un second procédé a donc été développé, basé sur une réduction électrochimique suivie d'une réaction de chimie click. La réduction électrochimique est effectuée à l'aide d'un microscope électrochimique à balayage (SECM pour *Scanning electrochemical microscope*) permettant d'appliquer un potentiel à la pointe d'une ultramicroélectrode (UME) déplacée le long de la surface d'un substrat, tout en contrôlant la distance UME/substrat. Le SECM est particulièrement adapté à la fonctionnalisation locale car il permet de générer des espèces réactives à la pointe de l'UME, qui réagissent avec le matériau sous-jacent uniquement au voisinage de l'UME [32-36]. Par exemple, il a été démontré que le SECM permet la réduction localisée de fluoropolymères tels que le Téflon en générant un radical anion à partir d'un médiateur redox. La zone réduite a ensuite été décorée avec des métaux [37], des molécules organiques [38] ou des polymères [39].

Nous avons appliqué une méthode similaire de réduction au matériau THV pour greffer dans un premier temps un fluorophore modèle sur une plaque de THV, puis dans un deuxième temps un aptamère sélectif au diclofénac, polluant émergent des eaux, dans un microcanal de THV. Les différentes étapes sont schématisées dans la Figure 7. Le déplacement de la pointe au cours de la réduction locale du matériau permet la création de motifs sur la surface.

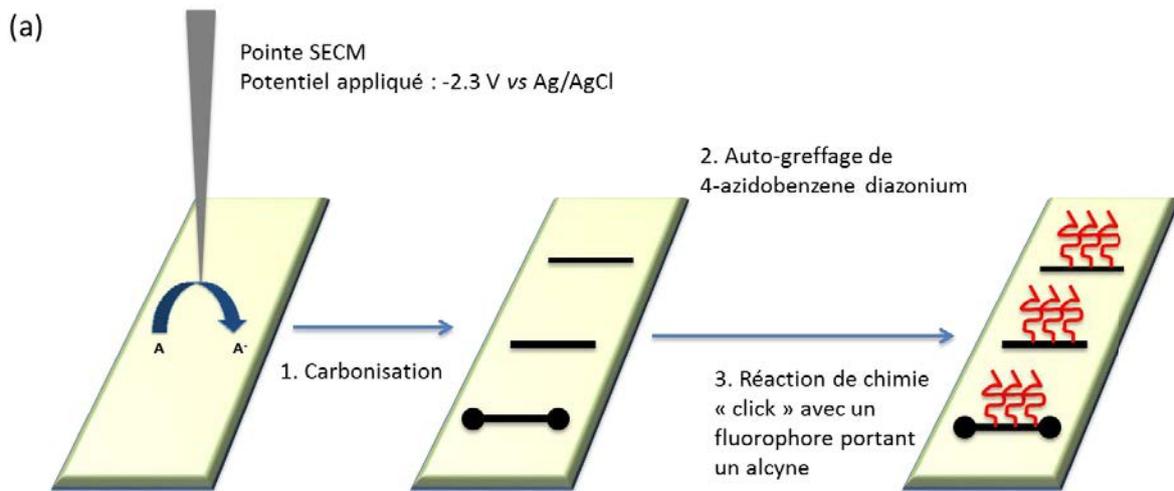


Figure 7 : Stratégie utilisée pour la modification locale de Dyneon THV en trois étapes.

La réduction locale de la surface du THV arrache les groupements fluorés du matériau, entraînant sa carbonisation, visible à l'œil nu et au microscope, comme pour les autres fluoropolymères. Les paramètres de carbonisation ont été optimisés, en termes de distance UME/substrat, et de vitesse de déplacement de la pointe, en utilisant comme médiateur le 2,2'-bipyridyl et une UME en platine de $25\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. La Figure 8.A présente les traits résultants de la carbonisation de plaques de THV, obtenus en déplaçant l'UME le long de la surface à différentes vitesses, de $1\text{ à }3\text{ }\mu\text{m/s}$. On observe que la largeur des lignes diminue lorsque la vitesse augmente pour une distance UME/substrat constante. Cette diminution est due au fait que lorsque l'électrode est déplacée plus lentement, une plus grande quantité de radicaux anions est créée à la pointe de l'UME, résultant en une surface carbonisée plus importante. Il est à noter que la carbonisation peut perdurer environ 1 à 2 jours, mais au-delà une oxydation de la surface carbonisée se produit.

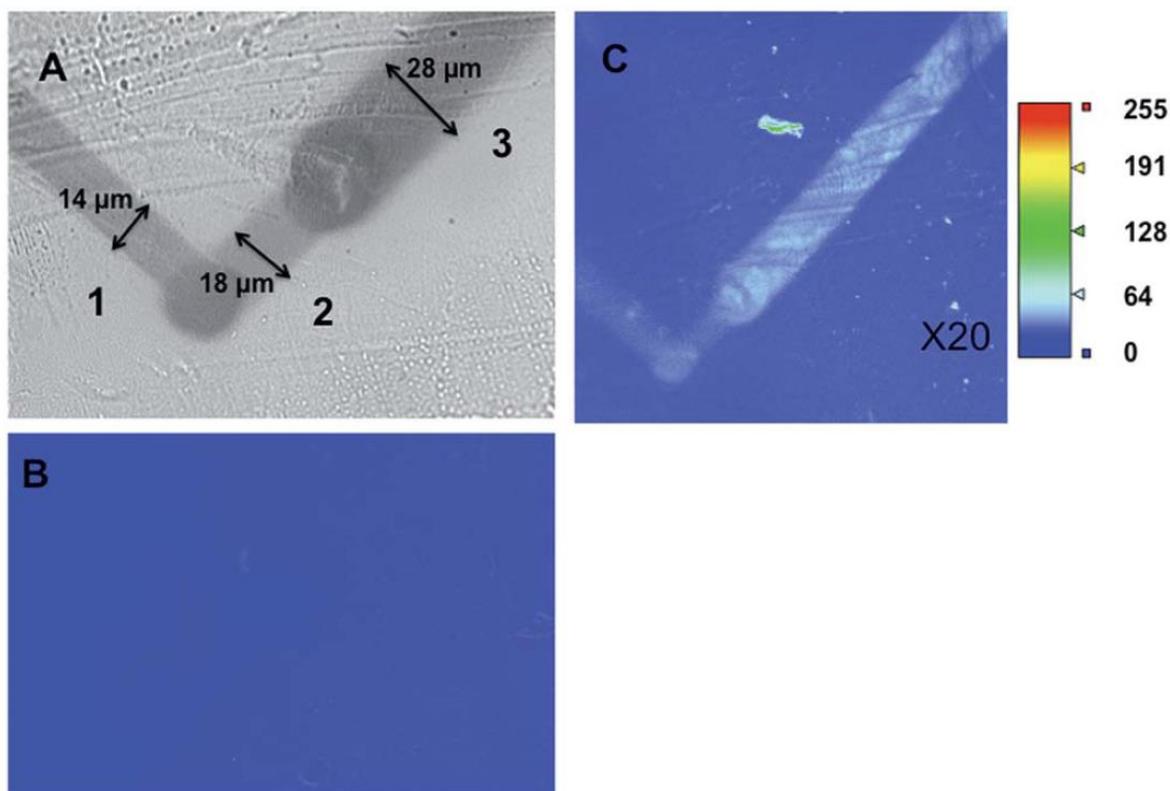


Figure 8 : (A) Image en lumière blanche des traits carbonisés par réduction du THV avec une solution de 2,2'-bipyridine dans du DMF. L'UME est déplacée à une vitesse 3, 2 et 1 $\mu\text{m/s}$ et à une distance correspondant à $i_T/i_{T,\infty} = 0,5$ (lignes 1, 2 et 3 respectivement). (B) Image de fluorescence après immersion de la surface carbonisée sans une solution de 4-azidobenzène diazonium à 5mM. (C) Image de fluorescence après la réaction de CuAAC avec le fluorophore contenant un alcyne.

La surface carbonisée est ensuite immergée dans une solution de 4-azidobenzènediazonium (pendant 1h), pour permettre son greffage spontané, permettant l'incorporation de fonctions aryl-azoture sur les zones carbonisées [38, 40]. La dernière étape consiste à faire réagir les azotures présents à la surface avec l'acétylène fluor 488, un fluorophore comportant un alcyne terminal *via* la réaction de CuAAC (durée de la réaction : 15h). Le greffage du fluorophore nous permet de caractériser la surface par microscopie de fluorescence. La Figure 8.B montre une image de microscopie de fluorescence après la carbonisation (étape 1) et le greffage des fonctions azoture (étape 2) et la Figure 8.C une image de la même zone après la réaction de chimie click (étape 3). On observe après l'étape 3 une augmentation de la fluorescence de 45%, uniquement sur les traits carbonisés. Ce résultat valide la procédure d'immobilisation localisée du fluorophore sur les zones carbonisées. La stabilité de la modification a été évaluée en rinçant la plaque dans un

mélange d'eau et d'éthanol aux ultrasons, aucun changement significatif de la fluorescence n'a été observé.

La même procédure a été appliquée à la modification d'un canal de THV. La Figure 9 présente les images de fluorescence d'un canal carbonisé avant (Figure 9.A) et après avoir réalisé l'étape de chimie click (Figure 9.B). On observe, comme dans le cas des plaques, que le fluorophore se greffe uniquement le long des traits carbonisés. La carbonisation a été réalisée à deux vitesses de balayage et à deux distances UME/substrat différentes. Comme dans le cas de la carbonisation de plaques, pour une distance donnée, l'augmentation de la vitesse donne des traits plus fins. La diminution de la distance électrode/substrat résulte également en des traits plus fins car lorsque l'électrode s'approche de la surface, le cône de diffusion des radicaux anions couvre une surface plus étroite.

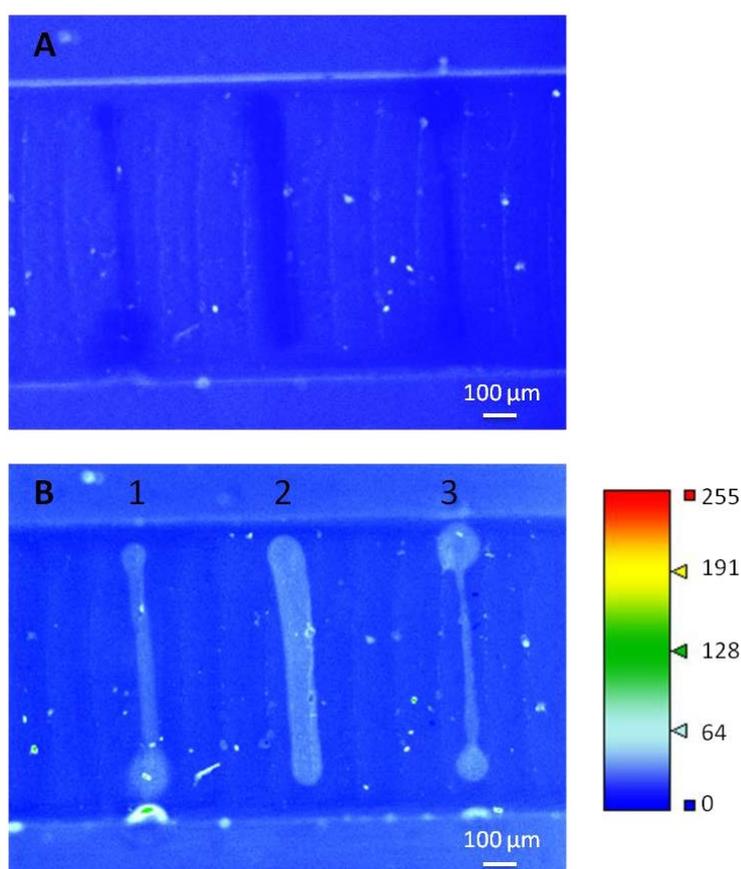


Figure 9 : (A) Image de fluorescence du canal après carbonisation et greffage du 4-azidobenzène diazonium. (B) Image de fluorescence après la réaction de chimie click avec un fluorophore portant un alcyne. Le motif 1 a été obtenu en déplaçant l'électrode à une vitesse de 3 μm/s à une distance correspondant à $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$, le motif 2 à une vitesse de 1 μm/s et une distance de $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$ et le motif 3 à une vitesse de 3 μm/s et une distance de $i_T/i_{T,\infty} = 0.25$

Enfin, la possibilité de greffer des biomolécules dans un canal en THV en utilisant cette méthode a été démontrée à l'aide d'un aptamère de 75 bases sélectif au diclofénac. La Figure 10 montre que comme dans le cas du fluorophore, l'aptamère se greffe uniquement sur les traits carbonisés. Le greffage est stable, résistant aux rinçages multiples et aux ultrasons.

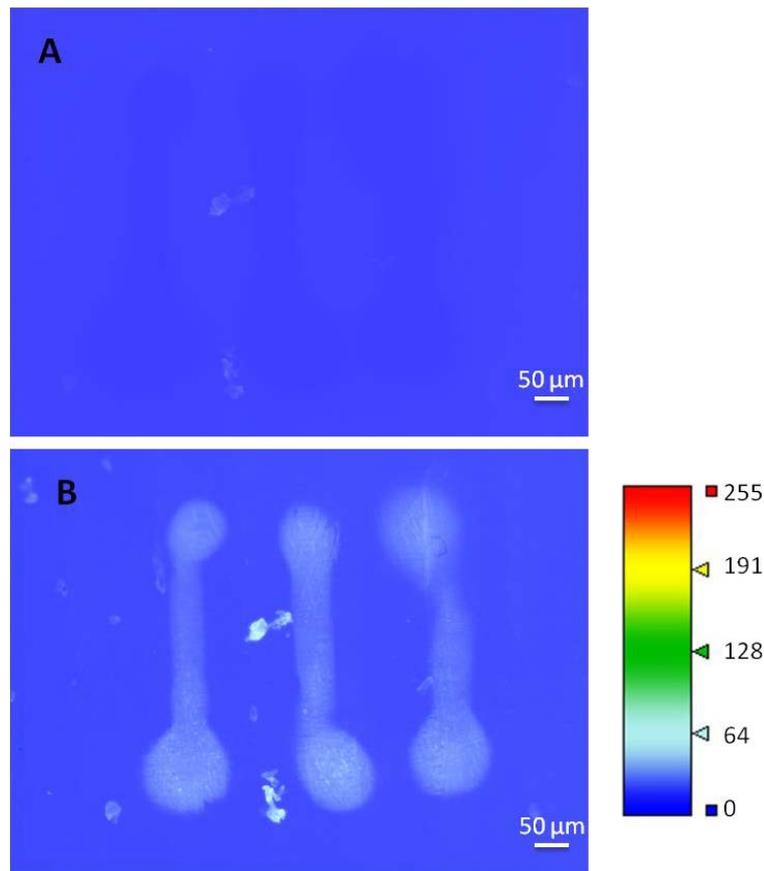


Figure 10 : (A) Image de fluorescence du microcanal après carbonisation et greffage du 4-azidobenzène diazonium. (B) Image de fluorescence après la réaction de CuAAC avec un aptamère contenant un groupement alcyne et un fluorophore. Les trois motifs carbonisés ont été obtenu en déplaçant l'électrode à une vitesse de 1 μm/s et à une distance correspondant à $i_T/i_{T,\infty} = 0.4$.

Ces résultats démontrent la possibilité de greffer des biomolécules ainsi que d'autres composés de façon localisée à la surface de canaux en THV à l'aide du SECM. Les dimensions des zones modifiées peuvent être contrôlées en ajustant la distance électrode/substrat, la vitesse de déplacement de l'électrode et également la taille de l'électrode. Cette méthodologie de modification, qui peut être appliquée à d'autres polymères fluorés, peut

permettre d'intégrer dans un microcanal une zone localisée de quelques dizaines de μm contenant des aptamères pour la préconcentration d'une cible et son extraction du reste de l'échantillon, une étape de prétraitement essentielle dans le développement de microsystèmes d'analyse totale.

4.3 Encapsulation d'aptamères par méthode sol-gel (Chapitre IV)

Une dernière méthode a été développée pour l'encapsulation d'aptamères dans un gel de silice au sein d'un microcanal, à l'aide d'un procédé sol-gel. Le procédé sol-gel permet la formation d'une phase solide (le « gel ») à partir d'une solution colloïdale (le « sol ») [41], grâce à une succession de réactions d'hydrolyse et de polymérisation entre les molécules présentes dans le « sol », comme décrit dans la Figure 11 dans le cas de l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS).

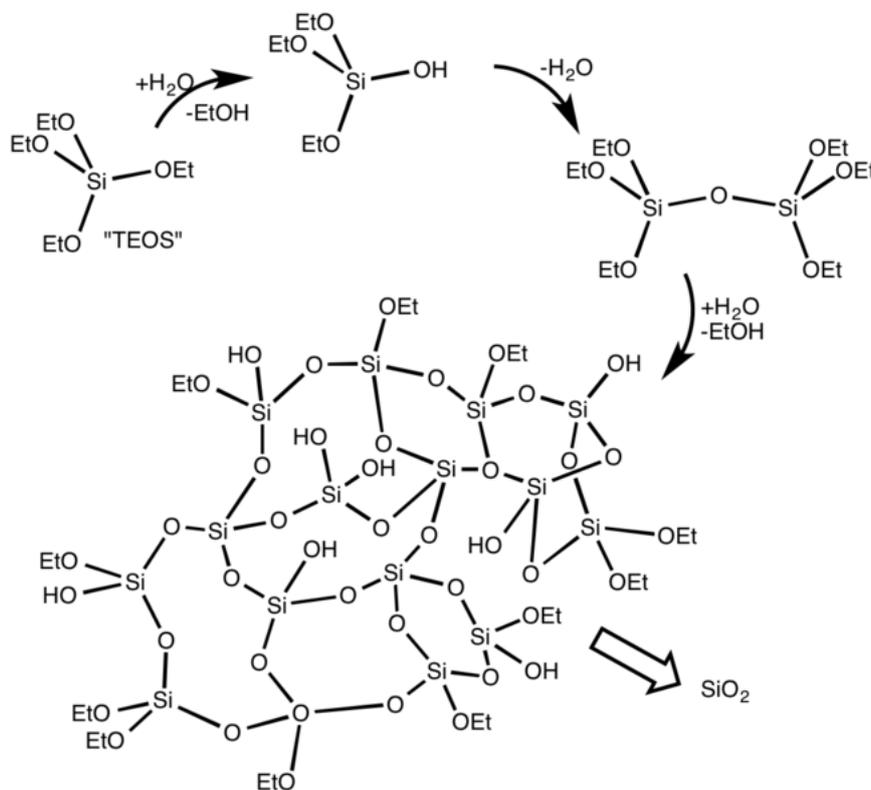


Figure 11 : Principe de polymérisation du TEOS

Ce procédé a été largement utilisé ces dernières années pour l'encapsulation de biomolécules, essentiellement des protéines, grâce aux conditions de polymérisation douces qui ne les dégradent pas [42]. Le gel crée un réseau 3D qui piège les biomolécules et augmente leur densité pour un volume donné. De plus, l'encapsulation permet également de les protéger de la dénaturation en limitant la diffusion de contaminants externes qui pourraient les dégrader et en limitant leurs mouvements ce qui évite des déformations structurelles irréversibles. Enfin, l'activité des biomolécules encapsulée est généralement préservée : les enzymes conservent leur réactivité pour leur cible et les anticorps gardent leur affinité pour leur antigène [43].

Le procédé sol-gel a été utilisé dans des applications microfluidiques. L'encapsulation d'enzymes à l'intérieur de microcanaux permet de créer des microréacteurs, notamment pour la digestion trypsique de protéine, une méthode très utilisée pour la protéomique [44].

Plusieurs études ont montré la possibilité d'immobiliser des aptamères dans une phase sol-gel [45-47]. Dans cette étude, nous avons développé un procédé d'encapsulation des aptamères dans un microsystème hybride verre/PDMS contenant un microcanal de 0,2 μ L.

Afin de réaliser cette opération d'encapsulation, les aptamères sont ajoutés à la solution de précurseur sol-gel avant polymérisation. Le mélange est ensuite introduit dans le microcanal et polymérise pour former le gel poreux qui piège les aptamères. La Figure 12 montre une image de microscopie d'une partie du canal dans laquelle sont encapsulés des aptamères modifiés avec un fluorophore, en lumière blanche (Figure 12.A) et en fluorescence (Figure 12.B). L'aptamère utilisé contient 29 bases et est sélectif de la sulforhodamine B, un fluorophore [48]. On observe que le gel est présent dans la totalité du canal d'un bord à l'autre, avec une présence homogène des aptamères fluorescents. Les zones plus ou moins fluorescentes reflètent une concentration variable d'aptamère.

La proportion d'aptamères qui restent intégrés dans le sol-gel lors de rinçages successifs a été évaluée ainsi que l'activité de l'aptamère encapsulé.

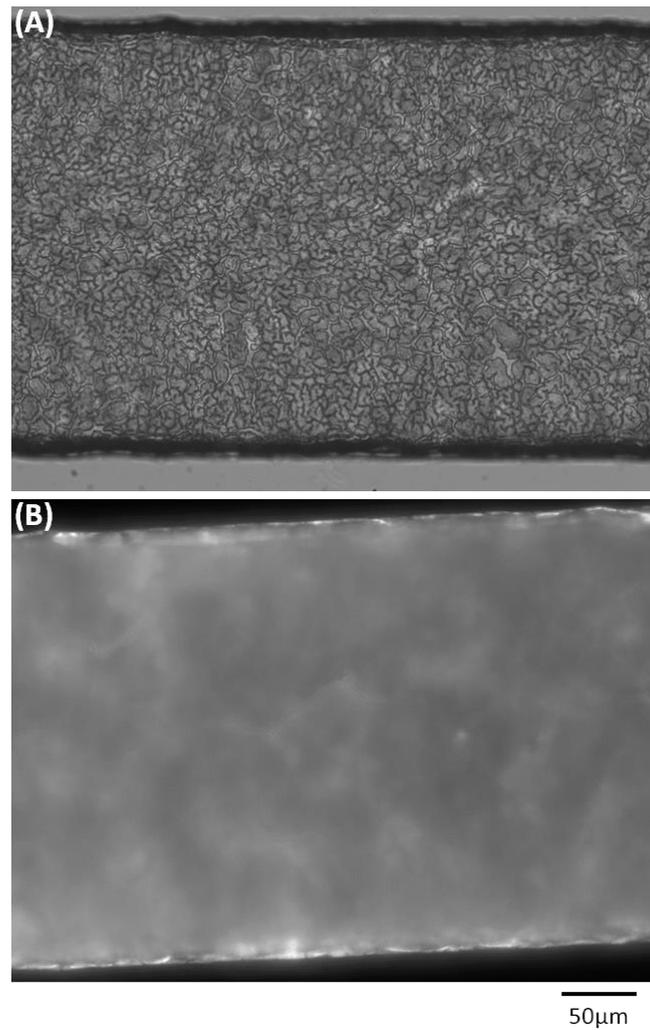


Figure 12 : Images du gel encapsulant des aptamères fluorescents dans un microcanal en PDMS. (A) Image en lumière blanche et (B) image en fluorescence de la même region. Grossissement x20.

Afin d'évaluer la perte d'aptamère au rinçage, le canal a été rincé à 3 reprises avec 2 μL (10 fois son volume) de tampon phosphate, et des mesures de fluorescence ont été effectuées avant et après rinçage. Afin de pouvoir comparer la perte d'aptamère pour les différentes micropuces étudiées, les valeurs de fluorescence après rinçage sont normalisées à l'aide des valeurs avant rinçage. Sur la Figure 13, qui présente les valeurs de fluorescence normalisées avant et après rinçage, on observe une perte relative de fluorescence et donc une perte relative d'aptamères de 30 à 40 %. Cette perte peut être due en partie à des aptamères qui ne sont pas totalement encapsulés dans le gel, mais également à des aptamères simplement adsorbés à la surface du gel, et non encapsulés. Ce résultat montre que même si une partie non négligeable des aptamères s'échappe du gel, la majorité (jusqu'à 70%) reste encapsulée.

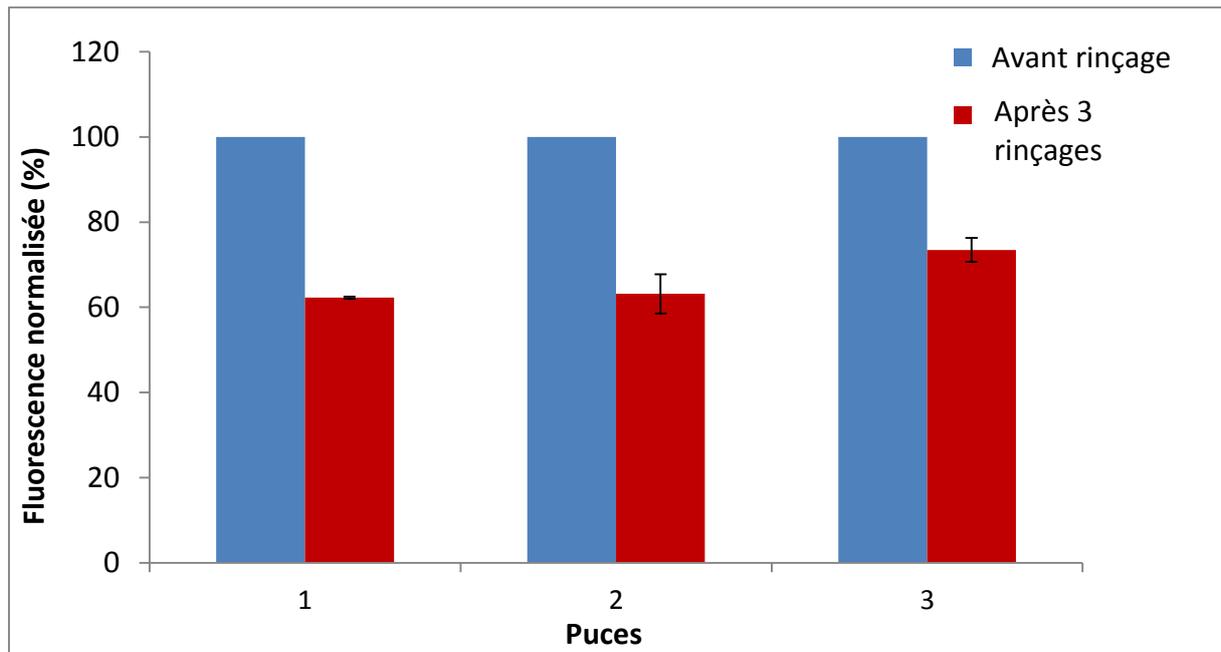


Figure 13 : Fluorescence normalisée de 3 puces encapsulant de aptamères fluorescents. Pour chaque puce, l'intensité de fluorescence après rinçage a été normalisée par rapport à la fluorescence avant rinçage.

La conservation de l'interaction des aptamères pour leur cible a également été étudiée. Pour cela, un aptamère non fluorescent sélectif de la sulforhodamine B a été encapsulé dans le canal. Pour montrer que la cible interagit bien avec l'aptamère et non pas seulement avec le gel, des canaux contenant le gel uniquement sans aptamères ont été utilisés comme blancs. Ces deux types de puces ont été incubés avec la même concentration de cible, puis des rinçages ont été effectués pour éliminer les cibles non liées. La comparaison de la fluorescence avant et après rinçage a démontré que les cibles sont mieux retenues dans les canaux contenant les aptamères, prouvant que ces derniers conservent au moins une partie de leur activité lorsqu'ils sont encapsulés. Pour s'assurer que l'interaction aptamère/cible est spécifique, il serait nécessaire de compléter ces résultats par un contrôle avec des puces contenant d'autres aptamères, non-sélectifs de la sulforhodamine B.

Ces résultats préliminaires démontrent la possibilité d'utiliser le procédé sol-gel pour créer une phase solide contenant des aptamères à l'intérieur d'un microcanal. Cette phase pourrait être utilisée dans une étape de prétraitement en ligne des échantillons afin de préconcentrer les cibles et les extraire du reste de l'échantillon. Cette méthode permet d'encapsuler une plus grande densité de molécules dans la zone de préconcentration

comparé aux méthodes modifiant uniquement les parois du canal, et pourrait donc permettre d'atteindre un meilleur rendement de préconcentration.

5 Conclusion

Dans ces travaux, nous proposons une stratégie originale pour le développement de microsystèmes analytiques, reposant sur l'intégration à l'intérieur du microcanal d'une zone de préconcentration contenant des aptamères comme ligands sélectifs permettant de concentrer le composé d'intérêt et de l'extraire de l'échantillon.

Afin de créer cette zone de préconcentration et de répondre aux différentes problématiques posées par la microfluidique, différentes méthodes de fonctionnalisation de surface ont été développées et validées.

Tout d'abord, un procédé de modification globale de la surface des matériaux COC et THV utilisant un dépôt plasma couplé à une réaction de chimie « click » a permis de greffer un fluorophore modèle sur ces matériaux prometteurs pour les applications microfluidiques. Le greffage de molécules aux propriétés variées permettrait de contrôler l'état de surface de ces matériaux ainsi que les écoulements dans un microcanal, des paramètres essentiels pour le développement de systèmes analytiques microfluidiques.

Dans une deuxième étude, un procédé de modification de surface localisé a été développé pour le greffage d'un fluorophore modèle ainsi que d'aptamères au sein d'un microcanal de THV en couplant une étape de réduction électrochimique à une réaction de chimie click. Cette méthode peut permettre d'intégrer une zone de préconcentration à l'intérieur d'un microcanal, une étape essentielle pour pouvoir développer des microsystèmes pour l'analyse d'échantillons complexes tels que les matrices environnementales sans avoir recours à une étape de prétraitement externe.

Enfin, un procédé sol-gel a été utilisé pour encapsuler des aptamères dans un gel de silice à l'intérieur d'un microcanal en PDMS. Le gel permet de créer un réseau 3D, augmentant la densité d'aptamères pour un volume donné par rapport aux méthodes modifiant uniquement les parois du canal. Les aptamères conservant leur activité une fois encapsulés, ces résultats montrent la possibilité d'intégrer une phase solide contenant des ligands

Résumé des travaux de thèse

sélectifs à l'intérieur d'un microcanal, une alternative prometteuse pour l'intégration d'une zone de préconcentration des analytes cible dans le canal.

Ces différentes voies de fonctionnalisation, permettant d'une part le contrôle de l'état de surface de la totalité d'un canal et d'autre part le greffage de ligands sélectifs à l'intérieur du microcanal pour créer une zone de préconcentration, ouvrent la voie au développement de nouveaux microsystèmes analytiques dans des domaines variés tels que l'analyse environnementale ou le diagnostic clinique. En effet, les preuves de concept ont été réalisées avec un fluorophore ou un aptamère modèle, mais ces méthodes versatiles permettent de greffer de nombreuses autres molécules.

6 Références bibliographiques

1. Woodruff, T.J., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. **100**(4), p. 1241-1244.
2. Thorpe, K.L., T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, M. Scholze, J.P. Sumpter, and C.R. Tyler, *Environmental Science & Technology*, 2001. **35**(12), p. 2476-2481.
3. Farré, M., L. Kantiani, M. Petrovic, S. Perez, and D. Barcelo, *Journal of Chromatography A*, 2012. **1259**, p. 86-99.
4. Trenholm, R.A., B.J. Vanderford, J.C. Holady, D.J. Rexing, and S.A. Snyder, *Chemosphere*, 2006. **65**(11), p. 1990-1998.
5. Idder, S., L. Ley, P. Mazellier, and H. Budzinski, *Analytica Chimica Acta*, 2013. **805**, p. 107-115.
6. Jelic, A., F. Fatone, S. Di Fabio, M. Petrovic, F. Cecchi, and D. Barcelo, *Science of the Total Environment*, 2012. **433**, p. 352-361.
7. Pintado-Herrera, M.G., E. Gonzalez-Mazo, and P.A. Lara-Martin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(1), p. 401-411.
8. Zhao, J.L., G.G. Ying, L. Wang, J.F. Yang, X.B. Yang, L.H. Yang, and X. Li, *Science of the Total Environment*, 2009. **407**(2), p. 962-974.
9. Reddersen, K. and T. Heberer, *Journal of Separation Science*, 2003. **26**(15-16), p. 1443-1450.
10. Ahrer, W., E. Scherwenk, and W. Buchberger, *Journal of Chromatography A*, 2001. **910**(1), p. 69-78.
11. Macià, A., F. Borrull, C. Aguilar, and M. Calull, *Electrophoresis*, 2003. **24**(16), p. 2779-2787.
12. Macià, A., F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1117**(2), p. 234-245.
13. Macià, A., F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, and C. Aguilar, *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(5), p. 872-880.
14. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz, *Talanta*, 2005. **65**(2), p. 313-323.
15. Mairal, T., V.C. Ozalp, P.L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, and C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4), p. 989-1007.
16. Directive 2013/39/UE, J.O.U.E, 24.8.2013 L 226, 1-17
17. WHO, *Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth edition*, 2011.
18. Jokerst, J.C., J.M. Emory, and C.S. Henry, *Analyst*, 2012. **137**(1), p. 24-34.
19. Lin, C.-C., J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2010. **15**(3), p. 253-274.
20. Yakovleva, J., R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell, and J. Emneus, *Biosensors & Bioelectronics*, 2003. **19**(1), p. 21-34.
21. Martinez, N.A., R.J. Schneider, G.A. Messina, and J. Raba, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **25**(6), p. 1376-1381.
22. Ding, Y.S. and C.D. Garcia, *Analyst*, 2006. **131**(2), p. 208-214.
23. Prest, J.E., S.J. Baldock, P.R. Fielden, N.J. Goddard, and B.J.T. Brown, *Analyst*, 2005. **130**(10), p. 1375-1382.
24. Wakida, S., K. Fujimoto, H. Nagai, T. Miyado, Y. Shibutani, and S. Takeda, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1109**(2), p. 179-182.
25. Terry, S.C., J.H. Jerman, and J.B. Angell, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1979. **26**(12), p. 1880-1886.

26. Rostovtsev, V.V., L.G. Green, V.V. Fokin, and K.B. Sharpless, *Angewandte Chemie*, 2002. **114**(14), p. 2708-2711.
27. Massey, S., A. Duboin, D. Mantovani, P. Tabeling, and M. Tatoulian, *Surface and Coatings Technology*, 2012. **206**(19), p. 4303-4309.
28. Barbier, V., M. Tatoulian, H. Li, F. Arefi-Khonsari, A. Ajdari, and P. Tabeling, *Langmuir*, 2006. **22**(12), p. 5230-5232.
29. Cortese, B., M.C. Mowlem, and H. Morgan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **160**(1).
30. Roy, S., C.Y. Yue, Y.C. Lam, Z.Y. Wang, and H. Hu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **150**(2), p. 537-549.
31. Roy, S. and C.Y. Yue, *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**(5), p. 432-443.
32. Meiners, F., I. Plettenberg, J. Witt, B. Vaske, A. Lesch, I. Brand, and G. Wittstock, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(11), p. 3673-3691.
33. Ktari, N., S. Nunige, A. Azioune, M. Piel, C. Connan, F. Kanoufi, and C. Combellas, *Chemistry of Materials*, 2010. **22**(20), p. 5725-5731.
34. Wittstock, G., M. Burchardt, S.E. Pust, Y. Shen, and C. Zhao, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(10), p. 1584-1617.
35. Combellas, C., J. Ghilane, F. Kanoufi, and D. Mazouzi, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(20), p. 6391-6397.
36. Tae, G., R.G.H. Lammertink, J.A. Kornfield, and J.A. Hubbell, *Advanced Materials*, 2003. **15**(1), p. 66-69.
37. Combellas, C., F. Kanoufi, D. Mazouzi, and A. Thiébault, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2003. **556**, p. 43-52.
38. Combellas, C., F. Kanoufi, D. Mazouzi, A. Thiébault, P. Bertrand, and N. Médard, *Polymer*, 2003. **44**(1), p. 19-24.
39. Combellas, C., F. Kanoufi, and S. Nunige, *Chemistry of Materials*, 2007. **19**(15), p. 3830-3839.
40. Garrett, D.J., J. Lehr, G.M. Miskelly, and A.J. Downard, *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(50), p. 15456-15457.
41. Brinker, C.J. and G.W. Scherer, *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. 1989: Academic press. pp 2-10.
42. Avnir, D., S. Braun, O. Lev, and M. Ottolenghi, *Chemistry of Materials*, 1994. **6**(10), p. 1605-1614.
43. Braun, S., S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, and M. Ottolenghi, *Materials Letters*, 1990. **10**(1), p. 1-5.
44. Liu, Y., H. Qu, Y. Xue, Z. Wu, P. Yang, and B. Liu, *Proteomics*, 2007. **7**(9), p. 1373-1378.
45. Hui, C.Y., Y. Li, and J.D. Brennan, *Chemistry of Materials*, 2014. **26**(5), p. 1896-1904.
46. Rupcich, N., R. Nutiu, Y. Li, and J.D. Brennan, *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(14), p. 4300-4307.
47. Carrasquilla, C., Y. Xiao, C.Q. Xu, Y. Li, and J.D. Brennan, *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(20), p. 7984-7991.
48. Wilson, C. and J.W. Szostak, *Chemistry & Biology*, 1998. **5**(11), p. 609-617.

General introduction

Developed to promote human health and well-being, pharmaceutical compounds and their degradation products are now considered as emergent contaminants of water, as well as industrial chemicals or pesticides. Indeed, some products rejected in wastewater are not fully treated by water treatment plant and eventually return to environment with unknown effect on aquatic life and human health [1]. These new pollutants and their consequences became an important concern for politics and institutions. As an example, in July 2013 the European Union created a watching list containing the products that have to be monitored along the Union. 3 pharmaceutical compounds are present in this list: diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory compound present in drugs like Voltaren®, and two hormones, the 17 β -estradiol and the 17 α -ethynilestradiol [2].

As these compounds can present a biological activity at concentration in the ng/L range [3], analytical methods employed to characterize these pollutants need to be sensitive enough to detect them at trace level in complex samples like wastewater, surface water (rivers, lakes...) or drinkable water. Analytical chains used currently are composed of multiple dissociated steps for pretreatment, separation and detection, and require heavy and expensive equipments like mass spectrometers. These systems are hardly miniaturisable and/or portable, and then not compatible for on-field analysis, which implies that samples collected in the environment are analysed directly on site, and necessitates transportable systems allowing a rapid analysis.

The apparition of biosensors leads to the development of many rapid and potentially miniaturisable analytical methods, promising for on-field analysis. However, an important part of these biosensors rests on the use of antibodies to detect the target compound. These biomolecules have to be produced using biological systems, which is an expensive and time-consuming process, and they are sensitive to temperature. Replacement of these antibodies by aptamers, single stranded DNA or RNA molecules selected for their affinity towards a target from a synthetic oligonucleotide database, represents a promising alternative for the development of more stable biosensors with reduced costs. These aptamers can be selected for all type of targets, from ions to cells, and can thus be used for the analysis of an important variety of pollutants [4]. Several analytical methods based on aptamers have been

General introduction

developed, and allow the selective detection and quantification of targets in less than one hour with a sensitivity responding to environmental recommendations.

The necessity to create miniaturized portable analytical systems has contributed to the emergence of microfluidics, allowing the development of complete lab-on-a-chips using micrometric channel networks to integrate the different steps of an analysis, from pretreatment of the sample to detection of the target compound, in a system measuring a few cm^2 [5]. Several materials have been used for microsystem fabrication, like silicon, glass or more recently polymeric materials. These materials are the most promising as their costs are reduced and their microfabrication is easier as compared to glass. Some polymers, like cyclic olefin copolymer (COC) or the THV from the Dyneon company, composed of tetrafluoroethylene, hexafluoropropylene and vinylidene fluoride, combine the advantages of glass (transparence in UV-visible domain and resistance to solvents) with reduced costs and ease of fabrication of polymers. The microfluidic format presents numerous advantages but also brings some problematics : the sensitivity of the analysis has to be preserved, adsorption of compounds on channel walls have to be limited and flows have to be controlled at the nanoliter scale. Functionalization of materials is an essential step in microsystem development to respond to these different problematics.

This work concerns the first steps of the development of a microfluidic system for trace analysis of pharmaceutical compounds, like diclofenac, in environmental samples. The developed microsystem proposes an original approach lying on the integration of a preconcentration area in which aptamers with an affinity for the target compound are immobilized at the inlet end of the microchannel. These selective ligands will bind the target, extract it from the matrix and concentrate it in a confined region of the channel. The compounds of interest will then be released in order to be detected at the outlet end of the channel, after a separation step. The materials choosen for microfabrication are COC and THV. These materials present a limited chemical reactivity and new methods have to be developed for their functionalization in order to locally graft aptamers in the preconcentration area and to limit adsorption on channel walls or control flows.

In a first chapter, we present the state of the art of the different analytical methods used in environmental analysis for detection and quantification of traces of pharmaceutical contaminants in real samples. Aptamer properties as well as their applications in

General introduction

environmental analysis are presented in a second part. Finally, the two last parts of this chapter concern the microfluidic techniques and their application in environmental domain on one hand as well as processes used for microsystems fabrication and thermoplastics surface functionalization on the other hand. This bibliographic chapter is written in French

The following chapters are dedicated to the multiple functionalization strategies developed for the conception of analytical microsystems. These chapters concerning results are written in English.

The second chapter present a method for global functionalization of COC and THV surfaces, by coupling the deposition of a brominated layer using a plasma-based process followed by a surface click reaction. The parameters influencing the plasma deposition have been studied and optimized, and the overall procedure was validated by the grafting of a model fluorophore.

The third chapter is dedicated to a strategy for the local modification of THV using an electrochemical surface modification process coupled to a surface click reaction. This method was applied to the modification of THV plates and microchannels, and allowed to graft locally a model fluorophore and an aptamer selective for diclofenac.

Finally, the last chapter describes a method to encapsulate aptamers in a silica gel inside a microchannel in polydimethylsiloxane (PDMS) using a sol-gel process. This process creates a 3D network entrapping the biomolecules, thus increasing their density for a given volume. Stability of the encapsulation upon several rinsings as well as activity of aptamers once encapsulated were evaluated.

1. Woodruff, T.J., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. **100**(4), p. 1241-1244.
2. Directive 2013/39/UE, J.O.U.E, 24.8.2013 L 226, 1-17
3. Thorpe, K.L., T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, M. Scholze, J.P. Sumpter, and C.R. Tyler, *Environmental Science & Technology*, 2001. **35**(12), p. 2476-2481.
4. Mairal, T., V.C. Ozalp, P.L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, and C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4), p. 989-1007.
5. Whitesides, G.M., *Nature*, 2006. **442**(7101), p. 368-373.

Introduction générale

Développés pour améliorer la santé humaine et le bien-être, les composés pharmaceutiques et leurs produits de dégradation sont désormais considérés comme des polluants émergents de l'environnement, au même titre que les pesticides et les produits chimiques industriels. En effet, certains composés rejetés par l'homme ne sont pas totalement éliminés des eaux usées par les stations d'épuration et retournent dans l'environnement, avec un impact encore méconnu sur la vie aquatique et la santé humaine [1]. Ces nouveaux polluants inquiètent la classe politique et les institutions. Ainsi en juillet 2013 l'Union Européenne a créé une liste de vigilance contenant les produits à surveiller, qui contient 3 produits pharmaceutiques : le diclofénac, présent dans les anti-inflammatoires comme le Voltaren®, et deux hormones synthétiques, le 17 β -estradiol et le 17 α -éthynilestradiol [2].

Ces composés pouvant avoir une activité biologique à des concentrations de l'ordre du ng/L [3], les méthodes analytiques utilisées pour caractériser ces polluants doivent être suffisamment sensibles pour les détecter à l'état de traces dans des échantillons complexes tels que les eaux usées, les eaux de surface (lacs, rivières...) ou l'eau potable. Les chaînes analytiques utilisées actuellement comprennent plusieurs étapes dissociées de prétraitement, de séparation et de détection, et nécessitent des équipements lourds et coûteux comme des spectromètres de masse. Ces appareillages sont difficilement miniaturisables et/ou transportables, et donc peu compatibles pour l'analyse sur site, qui implique d'analyser sur place les échantillons prélevés sur le terrain ce qui nécessite donc des systèmes portatifs et permettant une analyse rapide des composés d'intérêt.

L'apparition de biocapteurs a entraîné le développement de plusieurs méthodes analytiques rapides et éventuellement miniaturisables, prometteuses pour l'analyse sur site. Cependant, de nombreux biocapteurs reposent sur l'utilisation d'anticorps pour détecter le composé cible. Ces derniers doivent être produits dans des systèmes biologiques (processus long et coûteux) et sont sensibles à la température. L'utilisation d'aptamères, molécules d'ADN ou d'ARN simple brin sélectionnées pour leur affinité envers une cible à partir d'une banque d'oligonucléotides synthétiques, représente une alternative prometteuse au développement de biocapteurs plus stables et à moindre coût contre tous types de cibles, de l'ion à la cellule [4]. Plusieurs méthodes d'analyse utilisant des aptamères pour la détection et la

Introduction générale

quantification de polluants ont été développées, et permettent une analyse en quelques dizaines de minutes avec une sensibilité et des limites de détection répondant aux normes ou aux recommandations environnementales.

La nécessité de créer des systèmes d'analyse miniaturisés et portatifs a contribué à l'essor de la microfluidique, permettant de développer de véritables laboratoires sur puces à l'aide de réseaux de canaux micrométriques et d'intégrer dans des systèmes de quelques cm² les différentes étapes d'une chaîne analytique, du prétraitement de l'échantillon à la détection du composé d'intérêt [5]. Différents matériaux comme le silicium, le verre et plus récemment les matériaux polymériques ont été utilisés pour la fabrication de microsystèmes. Ces derniers matériaux sont les plus intéressants car leurs coûts sont plus faibles et leur microfabrication plus aisée que dans le cas du verre. Certains polymères, comme le copolymère d'oléfine cyclique (COC), ou le THV de la société Dyneon, composé de tétrafluoroéthylène, d'hexafluoropropylène et de fluorure de vinylidène, combinent les avantages du verre (transparence dans l'UV-visible et résistance aux solvants) avec les coûts réduits et la fabrication plus aisée des polymères. Le format microfluidique présente de nombreux avantages mais apporte également certaines problématiques : la sensibilité de l'analyse doit être conservée, l'adsorption de composés sur les parois du canal doit être évitée et les écoulements doivent être contrôlés à l'échelle du nanolitre. La fonctionnalisation des matériaux est une étape essentielle dans le développement de microsystèmes et permet de répondre aux différentes problématiques

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur les premières étapes du développement d'un système microfluidique pour l'analyse de traces de composés pharmaceutiques comme le diclofénac dans des échantillons environnementaux. Le microsystème envisagé propose une approche originale reposant sur l'intégration d'une zone de préconcentration au sein du microcanal où sont immobilisés des aptamères sélectifs des composés d'intérêt. Ces ligands sélectifs permettront d'extraire la cible du reste de l'échantillon et de la concentrer dans une zone confinée du canal. Cette cible pourra ensuite être relarguée pour être détectée en fin de canal, après une éventuelle étape de séparation. Les matériaux envisagés pour la fabrication du microsystème sont le COC et le THV. Ces matériaux présentant une faible réactivité chimique, de nouvelles méthodes de

Introduction générale

fonctionnalisation ont été développées pour d'une part greffer les aptamères de façon locale dans le canal et d'autre part limiter l'adsorption ainsi que contrôler les écoulements.

Dans un premier chapitre, nous présentons l'état de l'art des méthodes utilisées dans l'analyse environnementale pour la détection et la quantification de composés à l'état de traces dans des échantillons réels. Les propriétés des aptamères ainsi que leurs applications dans l'analyse environnementale sont présentées dans un deuxième temps. Les dernières parties de ce chapitre bibliographique portent sur la microfluidique, ses applications dans le domaine de l'environnement et les techniques employées pour d'une part fabriquer des microsystèmes dans divers matériaux et d'autre part pour fonctionnaliser les polymères à faible réactivité de surface tels que le COC. Ce chapitre bibliographique est rédigé en français.

Les chapitres suivants sont dédiés aux différentes voies de fonctionnalisation développées pour la création de microsystèmes analytiques. Ces chapitres sont rédigés en anglais.

Ainsi, le deuxième chapitre présente une méthode de fonctionnalisation globale de la surface des matériaux COC et THV couplant un dépôt de brome réalisé à l'aide d'un procédé plasma à une étape de chimie click. Les différents paramètres influençant le dépôt plasma ont été étudiés et optimisés, et la méthode a été validée grâce au greffage d'un fluorophore modèle.

Le troisième chapitre est dédié à une stratégie de fonctionnalisation locale du THV qui utilise une étape d'électrochimie couplée à la chimie click. Cette méthode est appliquée à la modification de plaques puis de microcanaux en THV, et permet de greffer localement un fluorophore modèle ainsi qu'un aptamère sélectif du diclofénac.

Enfin, le dernier chapitre décrit une méthode d'encapsulation des aptamères dans un microcanal en polydiméthylsiloxane (PDMS) par un procédé sol-gel, permettant d'immobiliser les biomolécules dans un réseau 3D et de contrôler leur densité volumique. La stabilité de l'encapsulation lors de rinçages successifs ainsi que l'activité de l'aptamère après encapsulation ont été évaluées.

Introduction générale

1. Woodruff, T.J., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. **100**(4), p. 1241-1244.
2. Directive 2013/39/UE, J.O.U.E, 24.8.2013 L 226, 1-17
3. Thorpe, K.L., T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, M. Scholze, J.P. Sumpter, and C.R. Tyler, *Environmental Science & Technology*, 2001. **35**(12), p. 2476-2481.
4. Mairal, T., V.C. Ozalp, P.L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, and C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4), p. 989-1007.
5. Whitesides, G.M., *Nature*, 2006. **442**(7101), p. 368-373.

Chapitre I

Bibliographie générale

1 Analyse de traces de produits pharmaceutiques en milieux aqueux

1.1 Les composés pharmaceutiques, polluants émergents des eaux

Depuis plusieurs années, les composés pharmaceutiques, développés pour promouvoir la santé et le bien-être, sont considérés comme des polluants émergents des eaux, au même titre que les pesticides ou les produits chimiques industriels. En effet, certains de ces composés rejetés par l'homme ne sont pas entièrement traités par les stations d'épuration qui les rejettent dans les eaux de surface (rivières, lacs...), entraînant des conséquences avérées sur l'environnement dont l'impact sur la santé humaine est encore méconnu [1, 2]. Cette problématique récente est apparue à la fin des années 90 et est en pleine expansion, avec plus de 1400 articles référencés dans *Web of Science*.

Le problème de la pollution des eaux par les composés pharmaceutiques inquiète également la classe politique. En 2000, l'Union Européenne a voté une directive-cadre pour établir une politique communautaire dans le domaine de l'eau et de sa protection [3]. Les composés pharmaceutiques sont évoqués comme composés potentiels à surveiller dans cette directive-cadre. En 2013, une modification de cette directive crée une liste de vigilance contenant les produits «qui, au vu des informations disponibles, sont susceptibles de présenter un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique au niveau de l'Union et pour lesquelles les données de surveillance sont insuffisantes» [4]. Cette liste est composée entre autres de 3 substances pharmaceutiques : le diclofénac (DCF), le 17 β -estradiol (E2) et le 17 α -éthinyloestradiol (EE2), dont les structures et les propriétés physico-chimiques sont présentées Figure 14. Dans cette partie seront présentées les méthodes développées pour l'analyse des deux familles de composés pharmaceutiques dont font partie ces produits : les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (NSAID pour *non-steroidal anti-inflammatory drug*) et les hormones stéroïdiennes.

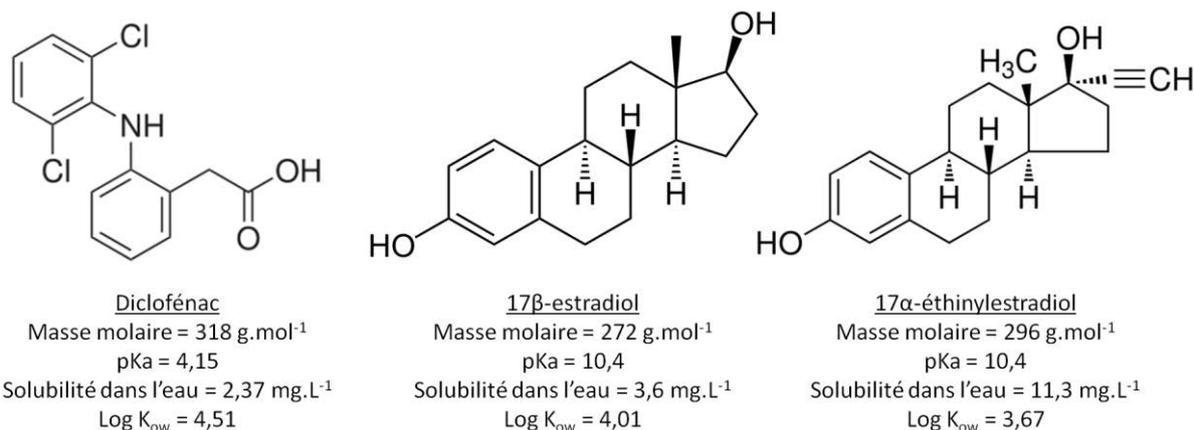


Figure 14 : Structure des composés pharmaceutiques ajoutées à la liste de vigilance de l'Union Européenne en 2013, ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. Log K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau. Adapté de [5].

Ces composés ont une activité biologique à très basse concentration, à partir du ng/L [6]. Les outils analytiques utilisés pour analyser leur présence doivent donc être capables de les détecter et les quantifier à l'état de traces, dans des échantillons complexes comme les eaux usées ou les eaux de surfaces, contenant de nombreuses autres molécules comme des protéines ou de petites molécules organiques, ainsi que des particules ou des bactéries...

1.2 Méthodologies analytiques utilisées

Les principales méthodes analytiques utilisées pour détecter et quantifier ces polluants émergents sont composées de plusieurs étapes dissociées (*off-line*) : une étape d'extraction des composés cibles, une étape de séparation et une étape de détection. Ce sont le plus souvent des techniques chromatographiques, ou assimilées, couplées à une détection par spectrométrie.

1.2.1 Extraction et préconcentration

Afin de pouvoir analyser des composés cible à l'état de traces dans une matrice complexe une étape d'extraction est nécessaire. Cette étape permet de séparer certains types de composés du reste de la matrice en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de les préconcentrer. Plusieurs techniques d'extraction sont utilisées pour l'analyse de traces de

composés pharmaceutiques dans l'eau : l'extraction en phase solide, la microextraction en phase solide et l'extraction liquide-liquide.

1.2.1.1 L'extraction en phase solide

L'extraction en phase solide, ou SPE (pour *solid phase extraction*), est la technique la plus répandue de prétraitement pour l'analyse de traces de composés pharmaceutiques en échantillons liquides [7]. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une phase solide poreuse, à travers laquelle l'échantillon est percolé. L'affinité des composés d'intérêt pour la phase solide, supérieure à leur affinité pour la matrice, entraîne leur rétention sur la phase solide et la matrice (solvant et composés non retenus) va être éliminée. Les composés d'intérêt peuvent ensuite être élués de la phase solide à l'aide d'une phase mobile pour laquelle ils présentent une affinité supérieure à leur affinité pour la phase stationnaire, afin d'être séparés puis détectés. Le couple phase solide/phase mobile doit donc être sélectionné en fonction des propriétés physico-chimiques des produits que l'on souhaite extraire.

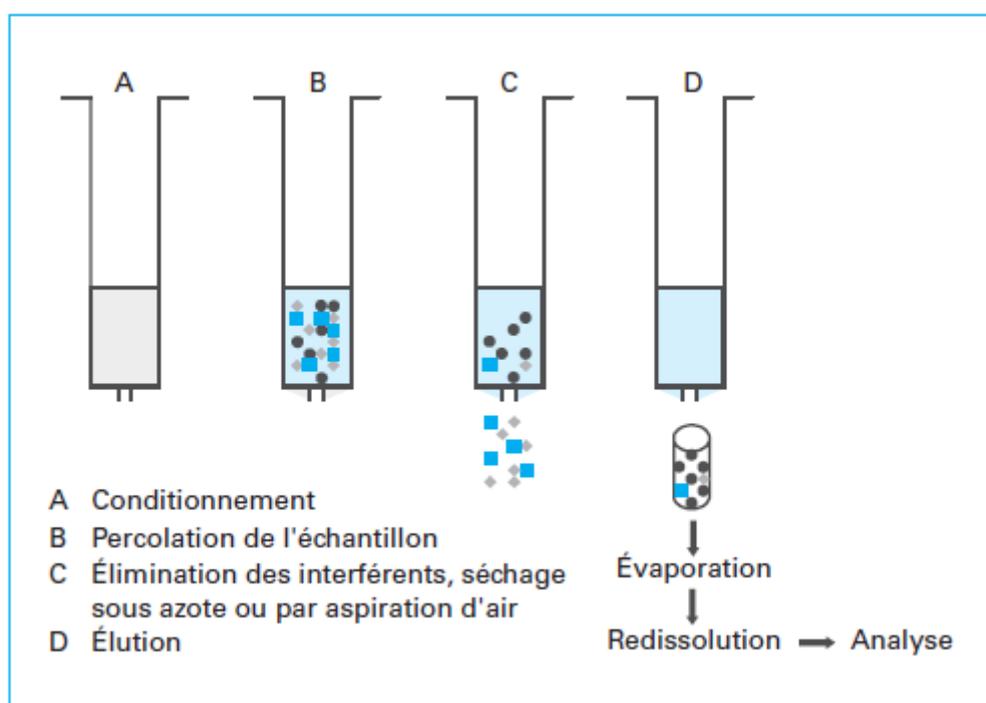


Figure 15 : Schéma des étapes d'une procédure d'extraction par SPE [8]

Le mécanisme le plus utilisé pour piéger les cibles en SPE est l'interaction hydrophobe [9] et les matériaux les plus répandus pour l'analyse de traces de polluants sont la silice modifiée par greffage de groupements alkyles (C18 en général), les copolymères de polystyrène et de divinylbenzène et les copolymères de divinylbenzène et de vinylpyrrolidone. Ces derniers contiennent des fonctions ionisables, permettant de retenir les composés par des interactions électrostatiques en plus des interactions hydrophobes [10]. Dans les méthodes étudiées, ces adsorbants à interactions mixtes sont les plus utilisés pour l'extraction de composés pharmaceutiques dans l'eau, qui sont en général de petites molécules organiques peu polaires. Cependant ces différentes phases solides ont une sélectivité limitée, et de nombreux constituants de la matrice peuvent être extraits en même temps que les composés d'intérêt et perturber la séparation chromatographique ainsi que la détection [11].

Pour une extraction plus sélective, des procédés basés sur la reconnaissance moléculaire peuvent être développés pour extraire un composé d'intérêt à partir d'une matrice très complexe. Des polymères à empreinte moléculaire (MIP, pour *molecularly imprinted polymers*) sont synthétisés de sorte à interagir de façon sélective avec un composé ou une famille de composés. Pour ce faire, une molécule empreinte (la molécule cible ou un analogue) est ajoutée au mélange de polymérisation contenant les monomères choisis pour leur affinité avec cette molécule empreinte, un agent réticulant et un initiateur de polymérisation. Après initiation de la polymérisation (généralement thermique ou photochimique), les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte, créant des cavités spécifiques. La polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymérique à l'aide de solvants organiques, laissant place à des macropores pouvant interagir spécifiquement avec la molécule cible et la retenir dans le polymère. La rétention est basée sur une reconnaissance structurale de la cible, grâce à un mélange d'interactions hydrophobes et/ou électroniques, et de liaisons hydrogène [8, 12].

Plusieurs MIP ont été synthétisés pour capter des produits pharmaceutiques, notamment des NSAIDs. Sun *et al.* ont synthétisé un MIP sélectif du diclofénac composé de 2-vinylpyridine et de diméthacrylate d'éthylène glycol et l'ont placé dans une cartouche de SPE [13]. Ils ont utilisé cette extraction par MIP suivie d'une analyse par chromatographie liquide couplée à une détection par spectroscopie UV pour analyser des échantillons d'eau

provenant d'affluents et d'effluents d'une station d'épuration, et ont comparé les performances de la cartouche MIP à celles d'une cartouche de SPE classique (C18, diamètres des particules = 55 μ m). Cette cartouche permet de retenir sélectivement le diclofénac et de le séparer des autres composés de l'échantillon, conduisant à sa quantification par chromatographie liquide à haute performance couplée à une détection par spectroscopie UV (HPLC-UV), alors que dans le cas d'une cartouche classique deux autres composés de l'échantillon ne sont pas séparables du diclofénac, rendant sa quantification impossible (Figure 16).

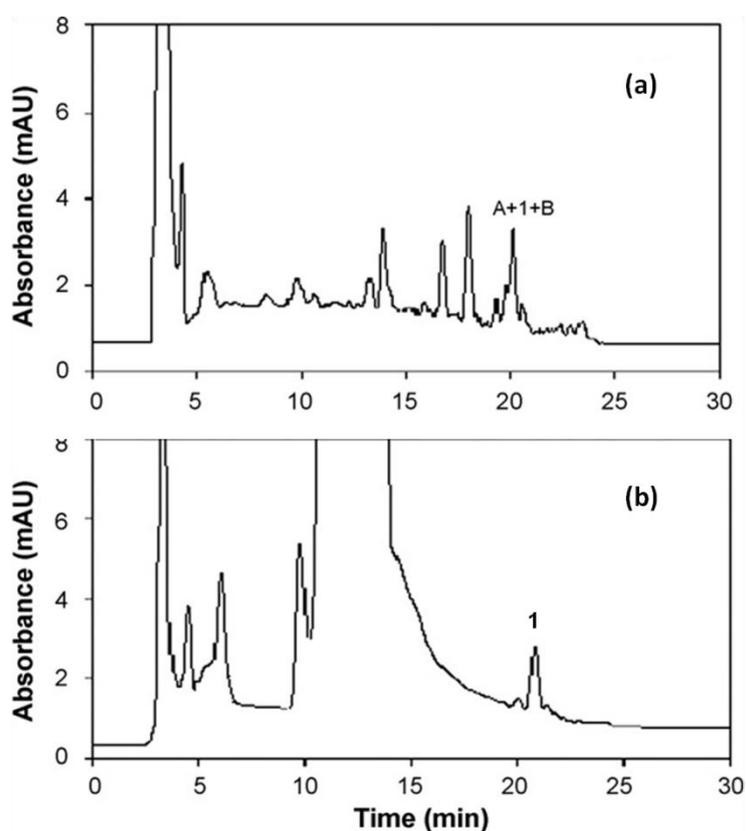


Figure 16 : Chromatogrammes HPLC-UV d'un échantillon d'eau de surface après une étape d'extraction par SPE utilisant (a) une cartouche C18 ou (b) une cartouche contenant un MIP sélectif du diclofénac. A et B : composés inconnus, 1 : diclofénac. [13]

Même si leur sélectivité n'est pas adaptée à l'extraction d'un grand nombre de composés, les MIP ont été utilisés pour l'extraction simultanée de plusieurs composés d'une même famille. Duan *et al.* ont synthétisé un MIP à base de diméthacrylate d'éthylène glycol, d'azobisisobutyronitrile et de 2-vinylpyridine sélectif à 4 anti-inflammatoires non-stéroïdiens

(NSAIDs) en utilisant plusieurs molécules empreintes. Ils ont utilisé ce MIP pour l'extraction et la préconcentration des 4 cibles (ibuprofène, naproxène, kétoprofène et diclofénac) à partir d'échantillons d'eau pure, d'eau de surface et d'eau usée et ont comparé les rendements de récupération obtenus avec leur MIP à ceux obtenus avec une phase C18 pour chaque type d'échantillons. Les rendements de récupération obtenus avec le MIP sont autour de 95 % pour tous les types d'échantillon, alors qu'avec une phase C18 ils diminuent lorsque la complexité de la matrice augmente, chutant de 95 % pour l'eau pure à 75 % pour l'eau usée. Ce résultat démontre qu'une extraction spécifique de quelques composés n'est pas ou peu influencée par les matrices complexes. Cette étape d'extraction par MIP a été couplée à une analyse par HPLC suivie d'une détection par spectrométrie de masse tandem (HPLC-MS/MS), les limites de détection obtenues allant de 2 à 12 ng/L sur l'ensemble de la chaîne analytique en fonction des composés [14, 15].

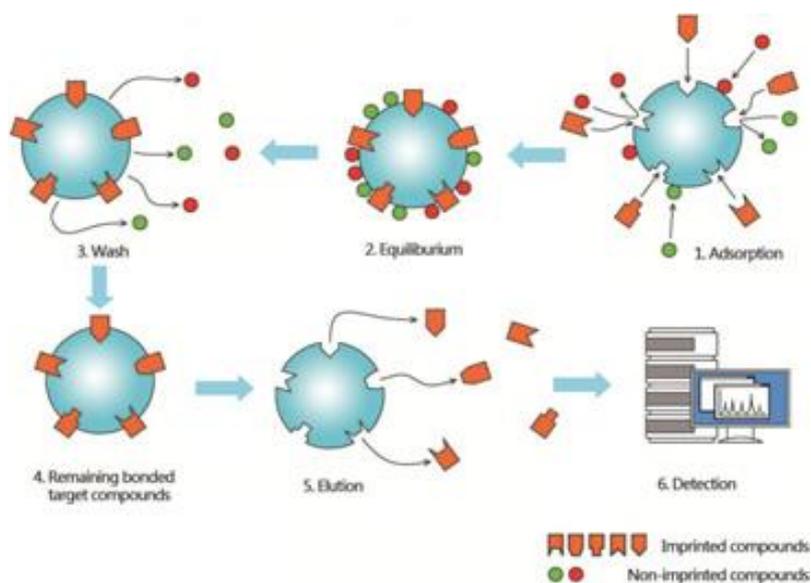


Figure 17 : Schéma des étapes d'extraction par SPE utilisant des MIP [15]

1.2.1.2 La microextraction en phase solide

Développée à la fin des années 80 par Pawliszyn [16], la microextraction en phase solide (SPME pour *solide phase micro extraction*) est une technique d'extraction dans laquelle une phase solide est déposée sur une fibre de carbone puis immergée dans l'échantillon à analyser. Différents matériaux sont disponibles commercialement, les plus utilisés étant les

polymères polydiméthylsiloxane (PDMS) et polyacrylate (PA), les copolymères de divinylbenzène et les revêtements en carbone poreux (Carbowax® et Carboxen®).

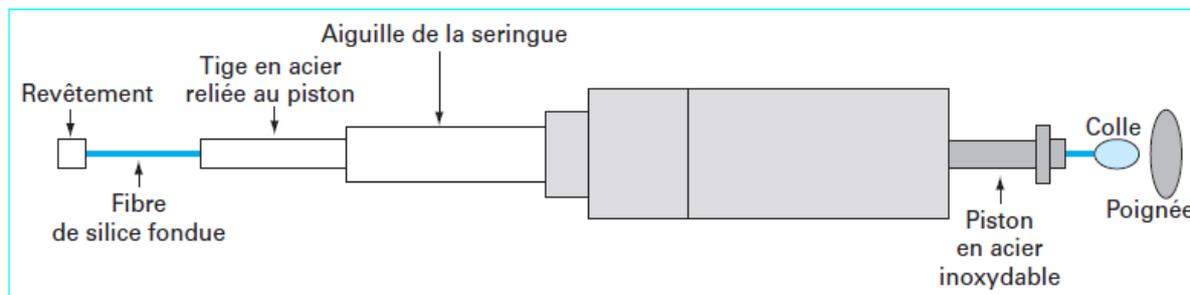


Figure 18 : Schéma d'un système de SPME [17]

La SPME offre la possibilité de travailler sans solvant, ce qui présente un intérêt pour l'environnement et pour le gain de préconcentration, avec un volume d'échantillon réduit. Elle permet également d'extraire moins d'impuretés qu'en SPE, et les fibres sont réutilisables, contrairement aux cartouches de SPE à usage unique. Cependant, les fibres commercialisées sont fragiles. De plus, des composés de haute masse moléculaire (des protéines par exemple) peuvent s'adsorber sur la fibre de façon irréversible et l'endommager, ce qui est un inconvénient non négligeable pour l'utilisation dans des matrices complexes sans prétraitement. [17]

Cette technique d'extraction peut être facilement couplée à la chromatographie gazeuse, en introduisant directement la fibre dans le système d'injection d'échantillon : le système d'injection est chauffé, et les composés cibles volatils sont alors désorbés de la fibre par désorption thermique. Lorsque les composés sont peu volatils, une étape de dérivation peut être mise en place (voir 1.2.2.2), qui peut être effectuée avant l'extraction pour permettre d'améliorer le rendement d'extraction.

L'utilisation de la SPME pour l'analyse environnementale a fait l'objet d'une revue en 2006 par Ouyang et Pawliszyn [18], cependant elle reste encore peu utilisée pour l'analyse de composés pharmaceutiques, étant dominée par la SPE. En 2000, Moeder *et al.* ont développé un procédé SPME couplé à la chromatographie gazeuse avec une détection par spectrométrie de masse (GC-MS) pour l'analyse de 14 composés pharmaceutiques [19].

Après avoir optimisé le matériau de la phase solide et opté pour le polyacrylate, ils ont obtenu des performances similaires à la SPE (cartouche C18) avec des limites de détection de 0,1 à 10 µg/L sur l'ensemble de la chaîne analytique.

L'extraction par sorption sur barreau (SBSE, pour *stir-bar sorptive extraction*) est une variante de la SPME, dans laquelle la phase solide est déposée sur un barreau d'agitation magnétique au lieu d'une fibre de silice, résultant en un volume de phase solide plus important, permettant d'obtenir une meilleure extraction. Cependant le seul matériau disponible commercialement pour la SBSE est le PDMS, limitant l'utilisation de cette technique à l'extraction de composés hydrophobes [10]. Plusieurs équipes ont utilisé cette technique d'extraction couplée à la GC-MS pour l'analyse d'hormones synthétiques et d'autres perturbateurs endocriniens [20-22]. Des rendements de récupération variant de 20 à 100 % ont été obtenus, en fonction des composés extraits, les meilleurs rendements étant obtenus pour les composés les plus hydrophobes ($\log K_{ow} > 5$).

1.2.1.3 Extraction liquide-liquide (LLE)

Cette technique d'extraction permet de séparer différents composés d'un mélange en utilisant leur distribution entre deux liquides non-miscibles [23]. Bien que largement utilisée à l'échelle industrielle, elle reste assez peu utilisée dans les méthodes d'analyse de composés pharmaceutiques. En général elle est utilisée avant une étape de SPE comme premier prétraitement pour nettoyer l'échantillon, et ainsi préconcentrer les composés d'intérêt sans concentrer les interférents lors de la SPE [24]. Ahrer *et al.* [24] ont ainsi utilisé une étape d'extraction par LLE (en utilisant de l'hexane et du méthyl tert-butyl éther comme solvants d'extraction) suivie d'une étape de SPE pour prétraiter des échantillons avant une analyse par électrophorèse capillaire couplée à une détection par spectrométrie de masse (CE-MS). La LLE couplée à la SPE ont permis d'enrichir 10 000 fois l'échantillon tout en limitant l'enrichissement de composés de la matrice en partie éliminés lors de la LLE.

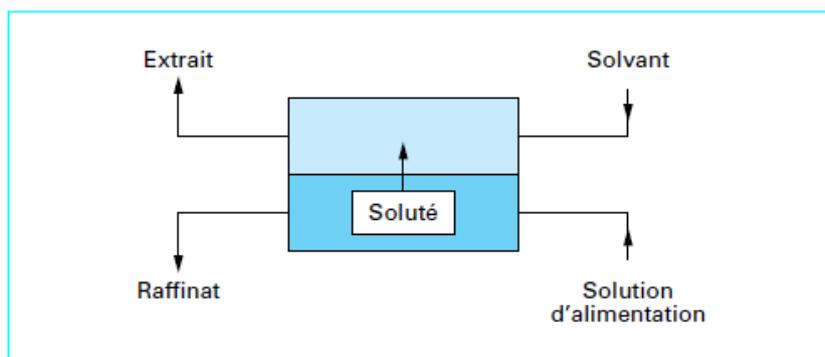


Figure 19 : Schéma du principe de l'extraction liquide-liquide [23]

1.2.1.4 Extraction en ligne

Cette étape d'extraction est le plus souvent dissociée de l'étape d'analyse, mais de plus en plus de méthodes l'intègrent dans le système chromatographique (extraction en ligne, en anglais *on-line extraction*) [25]. Le couplage de la SPE en ligne et de l'analyse permet de développer des méthodes plus rapides tout en réduisant la manipulation des échantillons entre les différentes étapes, limitant le risque de contamination et de perte de matière, et rendant la méthode d'analyse complètement automatisable. Les différents types de matériaux utilisés en SPE hors ligne peuvent être utilisés en SPE en ligne. Plusieurs systèmes d'analyse intégrant la SPE en ligne sont disponibles commercialement, tous basés sur un fonctionnement similaire : l'échantillon est injecté dans la cartouche SPE qui retient les molécules cibles, les composés non retenus étant éliminés. Les composés retenus et préconcentrés dans la cartouche SPE sont ensuite élués directement vers la colonne chromatographique [26]. Certains systèmes permettent d'extraire et d'analyser en parallèle (un échantillon est analysé pendant que le suivant passe dans la cartouche SPE), réduisant ainsi les temps d'analyse [9]. Cependant ces systèmes coûtent cher et la plupart des cartouches sont à usage unique.

Ces systèmes d'extraction en ligne sont très utilisés pour la détection et la quantification de produits pharmaceutiques dans des échantillons biologiques mais sont encore peu développés pour l'analyse environnementale. Quelques méthodes ont été développées, notamment pour l'analyse d'hormones [27-30] (voir Tableau 3).

Quintana *et al.* [31] ont développé une configuration originale pour le prétraitement en ligne couplé à l'HPLC. Le système automatisé permet d'immobiliser une petite quantité d'adsorbant (<5mg) dans un micro-conduit connecté au reste du réseau fluidique. Cet adsorbant est renouvelé à chaque analyse. Ce système a été utilisé pour l'analyse de 6 résidus médicamenteux (5 NSAIDs dont le diclofénac et un régulateur de lipide, le bézafibrate) dans de l'eau de surface avec une détection par spectroscopie UV et les résultats ont montré une meilleure reproductibilité comparée aux méthodes utilisant le même adsorbant dans une extraction hors ligne, avec un rendement de récupération de 88%. D'après les auteurs, ce système d'extraction en ligne permet de réduire de 25 fois les coûts opérationnels comparé aux autres systèmes d'extraction en ligne.

1.2.2 Méthodes de séparation

Une fois les échantillons prétraités, les composés d'intérêt doivent être analysés. Pour cela, des techniques séparatives sont le plus souvent utilisées pour séparer les différents composés extraits en vue de leur détection. La chromatographie liquide ou gazeuse, qui sépare les composés selon leur affinité pour une phase stationnaire, est la technique standard pour l'analyse de traces, notamment de composés pharmaceutiques. L'électrophorèse capillaire a aussi montré son intérêt pour ces analyses.

1.2.2.1 Chromatographie liquide

En chromatographie liquide, l'échantillon injecté est entraîné par une phase mobile dans une colonne contenant la phase stationnaire. Comme pour la SPE, sa rétention dépendra de ses interactions avec la phase stationnaire et avec la phase mobile. Les phases stationnaires les plus répandues sont composées de particules de silice greffées avec des chaînes alkyles (le plus souvent C18), permettant de séparer les composés selon leur polarité. Apparue à la fin des années 60, les systèmes permettant de travailler à haute pression (HPLC, pour *high performance liquid chromatography*) ont permis d'améliorer l'efficacité et la résolution des analyses tout en réduisant les temps d'analyse. Depuis les années 2000, la commercialisation de nouveaux types de colonnes, notamment des colonnes avec des particules de diamètre réduit, a permis d'améliorer les performances des systèmes HPLC et de réduire les temps d'analyse, faisant de cette technique (le plus souvent couplée à la spectrométrie de masse) le standard pour l'analyse de traces.

Chapitre I – Bibliographie générale

Récemment, plusieurs équipes [32, 33] ont développé des méthodes utilisant des colonnes avec des particules de diamètre inférieur à 2 μm (appelées UPLC, pour *ultra performance liquid chromatography*), permettant d'augmenter le débit en conservant une pression inférieure à la limite du système, réduisant ainsi les temps d'analyse. Ces méthodes montrent une très bonne sensibilité, avec des limites de détection allant jusqu'à 0,01 ng/L avec une détection par spectromètre de masse pour l'analyse de stéroïdes [33].

Le Tableau 3 présente une liste non exhaustive de séparation de composés pharmaceutiques par HPLC.

Chapitre I – Bibliographie générale

Tableau 3 : Liste non exhaustive d'applications de la chromatographie liquide pour l'analyse de traces de produits pharmaceutiques dans l'eau. DCF : Diclofénac, E2 : 17 β -estradiol, EE2 : 17 α -éthinyloestradiol. n.p. : non précisé

Cibles	Matrice	Prétraitement	Méthode	Temps d'analyse	LOD	Ref
27 produits pharmaceutiques, pesticides et <i>personal care products</i>	Eau usée, eau de surface et eau potable	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS ou HPLC-APCI-MS/MS	1h30	0,25-1ng/L DCF : 0.25 ng/L	[34]
58 perturbateurs endocriniens	Eau usée, eau traitée, eau de surface, eau souterraine et eau potable	SPE (interaction mixte)	HPLC – ESI – MS/MS ou HPLC–APCI–MS/MS	2h30	0,1 – 1,6 ng/L DCF : 0,1 ng/L E2 : 0,3 ng/L EE2 : 0,3 ng/L	[5]
6 composés pharmaceutiques	Eau de surface	SPE en ligne (interaction mixte)	HPLC–UV	55 min	0,02-0,36 μ g/L DCF : 0,12 μ g/L	[31]
9 produits pharmaceutiques	Eau traitée	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS	2h	7 – 10 ng/L DCF : 7 ng/L	[35]
Diclofénac	Eau usée et traitée	SPE (MIP)	HPLC- UV	1h30	n.p.	[13]
21 composés pharmaceutiques	Eau de surface, eau usée	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS	3h30	1-25 ng/L DCF : 10 ng/L	[36]
28 composés pharmaceutiques + 10 oestrogènes	Eau de surface	SPE (interaction mixte, produits pharmaceutiques) SPE en ligne (oestrogènes)	HPLC-ESI-MS/MS	2h (hors ligne) 1h (en ligne)	0,05-4,2 ng/L DCF : 0,4 ng/L	[37]
28 stéroïdes	Eau usée, traitée et eau de surface	SPE (interaction mixte)	UPLC-ESI-MS/MS	5h	0,01- 1,44 ng/L E2 : 0,24 ng/L EE2 : 0,19 ng/L	[33]
24 composés pharmaceutiques	Eau de surface et eau potable	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS	1h30	1-125 ng/L DCF : 1ng/L	[38]
42 produits pharmaceutiques	Eau usée et traitée	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS	2h45	0,6-55ng/L	[39]
14 produits pharmaceutiques	Eau de surface	SPE (interaction mixte)	UPLC-ESI-MS/MS	5h	0,1-0,5ng/L DCF : 0,1 ng/L E2/EE2 : 0,5 ng/L	[32]
40 produits pharmaceutiques	Eau de surface et eau potable	SPE en ligne (interaction mixte ou interaction hydrophobe)	HPLC-ESI-MS/MS	30 min	0,75-15 ng/L DCF : 2 ng/L	[40]
24 <i>personal care products</i> , perturbateurs endocriniens et edulcorants	Eau de surface, eau souterraine, eau usée	SPE (interaction hydrophobe)	HPLC-ESI-MS/MS	1h45	0,1 – 16 ng/L DCF : 0,3 – 1 ng/L	[41]
34 composés pharmaceutiques	Eau de surface	SPE (interaction mixte)	HPLC-ESI-MS/MS	n.p.	1,25 – 2,50 ng/L DCF : 2,50 ng/L	[42]

En observant le Tableau 3, il apparaît clairement que la chromatographie liquide est une technique d'analyse performante, permettant de séparer et de quantifier plusieurs dizaines de cibles à la fois à partir d'échantillons réels, avec une sensibilité allant du dixième de ng/L à quelques dizaines de ng/L.

On observe que toutes les méthodes ont recours à un prétraitement par SPE, hors ligne ou en ligne, les méthodes en ligne résultant en des temps d'analyse plus courts (<1h). La détection par spectrométrie de masse est la plus utilisée, car plus sensible : l'unique exemple de détection UV atteint une LOD de 0,12 µg/L dans le cas du diclofénac, contre 0,1 ng/L avec une détection par spectrométrie de masse. Cette dernière nécessite cependant un appareillage plus lourd et coûteux.

Bien que très utilisée et pouvant conduire à de très faibles limites de détection, La séparation des composés par HPLC selon leur polarité peut poser problème car certains composés peuvent avoir des polarités très proches et donc être difficilement séparables.

1.2.2.2 Chromatographie gazeuse (GC pour gas chromatography)

En chromatographie gazeuse, la séparation des composés repose également sur leur interaction avec une phase stationnaire, mais la phase mobile entraînant les analytes est un gaz porteur inerte. La rétention des analytes est donc influencée uniquement par la nature de la phase stationnaire. Les échantillons liquides sont chauffés dans la chambre d'injection, entraînant la volatilisation des analytes et leur passage dans la colonne contenant la phase stationnaire. La température de la colonne chromatographique gouverne la volatilité des différents composés du mélange et influence donc la qualité de la séparation. [43]

Le couplage GC/MS est plus facile à mettre en place et plus robuste que le couplage HPLC/MS (voir 1.2.3.1) car les composés sont déjà à l'état gazeux, et les limites de détection atteintes sont du même ordre de grandeur. Cependant la GC se limite à l'analyse de composés volatils et stables à haute température, de plus une étape de dérivation est bien souvent nécessaire à l'analyse de composés pharmaceutiques.

Le Tableau 4 présente une liste non exhaustive de séparation de composés pharmaceutiques par GC. Il est à noter que toutes ces méthodes utilisent une détection par spectrométrie de masse.

Chapitre I – Bibliographie générale

Tableau 4 : Liste non exhaustive d'applications de la chromatographie gazeuse pour l'analyse de traces de produits pharmaceutiques dans l'eau. BSTFA : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, MSTFA : N-Methyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide, MTBSTFA : N-Methyl-N-tert-butylidiméthylsilyltrifluoroacétamide.

Cibles	Matrice	Prétraitement	Agent de dérivation	Temps d'analyse	LOD	Ref.
14 composés pharmaceutiques (NSAID et PE)	Eau traitée	SPME (PA)	BSTFA	1h	0,1 – 10 µg/L	[19]
4 oestrogènes	Eau usée, eau traitée et eau de surface	SPE (interaction hydrophobe)	Anhydride pentafluoropropionique	1h30	0,02 – 0,24 µg/L E2 : 0,02 µg/L	[44]
19 composés pharmaceutiques	Eau usée, eau de surface, eau souterraine, eau potable	SPE (interaction hydrophobe))	Bromure de pentafluorobenzyle	16h	<1 – 10 ng/L DCF : <1 ng/L	[45]
3 oestrogènes	Eau de surface	SBSE (PDMS)	Anhydride acétique	2h30	1-5 ng/L E2 : 2 ng/L EE : 5 ng/L	[20]
4 NSAID	Eau potable et eau de surface	SPE (interaction mixte)	MSTFA	21h	1,96 – 5,55 ng/L DCF : 3,06 ng/L	[46]
11 composés pharmaceutiques	Eau traitée	SPE (interaction mixte)	BSTFA + triméthylchlorosilane	3h	LOD minimum : 0,01 µg/L	[47]
18 composés pharmaceutiques	Eau de mer, eau de surface, eau potable et eau usée	SPE (interaction mixte)	MSTFA	2h30	0,1 – 28,6 ng/L DCF : 0,7 ng/L	[48]
10 composés pharmaceutiques	Eau de surface	SPE (interaction mixte)	Générateur de diazométhane	2h	3 – 47 ng/L DCF : 3 ng/L	[49]
28 perturbateurs endocriniens et composés pharmaceutiques	Eau de surface	SPE (interaction mixte)	Chlorure de pentafluorobenzoylé	6h	0,2 – 2,2 ng/L DCF : 1,1 ng/L	[50]
18 perturbateurs endocriniens	Eau de surface	SBSE (PDMS)	Acide acétique, chloroformiate d'éthyle, tétraéthylborate, méthanol, BSTFA	2h	0,1-22 ng/L E2: 2,81 ng/L	[22]
31 composés pharmaceutiques et personal care products	Eau usée et eau de surface	SBSE (PDMS)	MTBSTFA, Anhydride acétique	8h	1-853 ng/L DCF : 37 ng/L	[21]

Comme dans le cas de la chromatographie liquide, la chromatographie gazeuse permet d'analyser quelques dizaines de composés simultanément, à partir d'échantillons réels. Cependant, la sensibilité atteinte est moins importante. Par exemple, dans le cas du diclofénac peu de méthodes atteignent une LOD inférieure au ng/L contrairement aux méthodes HPLC.

Les méthodes de prétraitement utilisées sont plus variées en GC qu'en LC. La SPE reste très présente, et donne la meilleure sensibilité pour le diclofénac (0,7 ng/L) mais les méthodes de SPME et de SBSE sont également utilisées, cette dernière donnant les meilleurs résultats pour le 17 β -oestradiol parmi les méthodes étudiées (2 ng/L).

Le Tableau 4 illustre également la nécessité d'une étape de dérivation, présente dans toutes les méthodes étudiées, compliquant et rallongeant la procédure analytique de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures.

1.2.2.3 Electrophorèse capillaire

Bien que moins utilisée que les méthodes chromatographiques pour l'analyse de traces, l'électrophorèse capillaire (CE pour *capillary electrophoresis*) peut être une alternative intéressante. Les composés migrent sous l'effet d'un champ électrique, à des vitesses différentes selon leur mobilité électrophorétique, régie par leur taille et leur charge, et la mobilité électroosmotique (mobilité de l'électrolyte de séparation) (Figure 20). La CE offre donc une méthode de séparation différente de l'HPLC, qui peut être plus adaptée pour la séparation de certains composés, par exemple des composés ayant une polarité similaire.

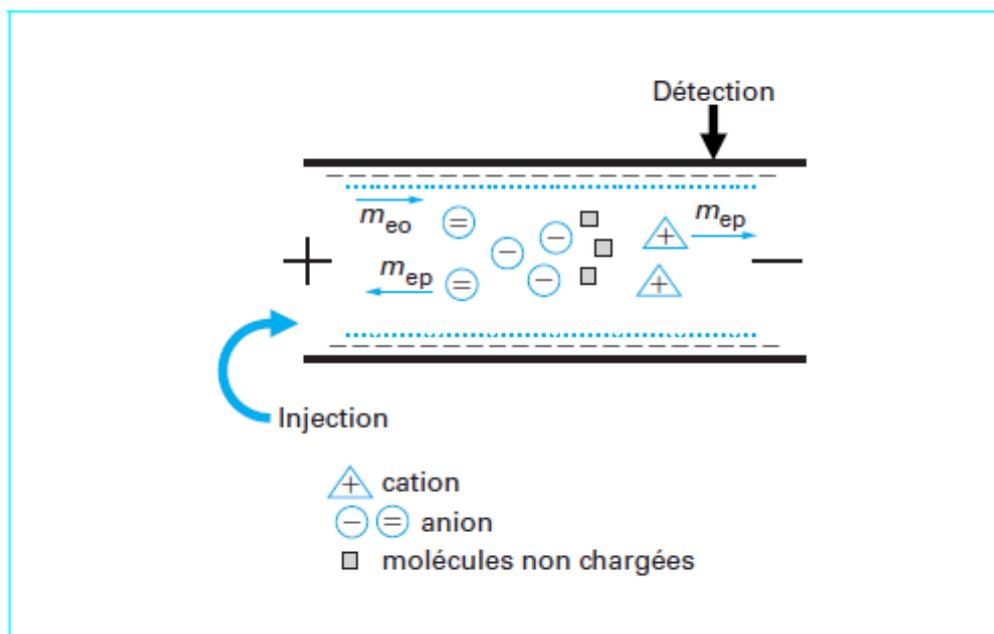


Figure 20 : Principe de l'électrophorèse capillaire. m_{eo} : mobilité électroosmotique, m_{ep} : mobilité électrophorétique. [51]

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'analyse de traces de composés pharmaceutiques en milieux aqueux en utilisant l'électrophorèse capillaire. Ahrer *et al.* [24, 52] ont été les premiers à utiliser cette technique avec une détection par spectrométrie de masse pour analyser différents composés pharmaceutiques dans de l'eau de rivière, en utilisant deux étapes de préconcentration hors ligne (SPE et LLE) pour obtenir des limites de détection assez faibles pour l'analyse de traces (voir Tableau 5).

Un des avantages de la CE est la possibilité d'implémenter des méthodes de préconcentration électrophorétiques en ligne. Ces techniques permettent de préconcentrer fortement les analytes dans de fines bandes, avant la séparation. Macià *et al.* ont développé et comparé plusieurs méthodes de préconcentration pour l'analyse de NSAIDs dans de l'eau du robinet ou de l'eau minérale [53-55]. Le même groupe a également utilisé une technique de SPE en ligne pour préconcentrer les composés, en insérant une micro-cartouche de SPE C18 à l'entrée du capillaire de séparation pour adsorber les composés d'intérêt, qui sont ensuite élués par l'électrolyte de séparation.

Le Tableau 5 présente une liste non exhaustive des séparations de composés pharmaceutiques par électrophorèse capillaire.

Tableau 5 : Liste non exhaustive d'applications de l'électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces de produits pharmaceutiques dans l'eau.

Cibles	Matrice	Prétraitement	Méthode	Temps d'analyse	LOD	Référence
9 composés pharmaceutiques	Eau de rivière	LLE+SPE (Bondesil ODS)	CE-ESI-MS	2h	4,8-19 ng/L	[24]
6 NSAIDs	Eau potable	SPE hors ligne (LiChrolut RP18) Préconcentration électrophorétique en ligne	CE-UV	2h	2-9 ng/L DCF : 2 ng/L	[53]
5 NSAIDs	Eau potable	SPE hors ligne (LiChrolut RP18) Préconcentration électrophorétique en ligne	CE-UV	2h	0,05-1,6 µg/L DCF : 0,10 µg/L	[56]
Naproxen (NSAID)	Eau potable	SPE (C18) hors ligne + en ligne	CE-UV	1h50	10 ng/L	[57]

L'électrophorèse capillaire est donc une technique qui présente certains avantages pour l'analyse de composés pharmaceutiques dans des échantillons aqueux, notamment grâce aux techniques de préconcentration électrophorétiques. En effet, si l'on étudie les limites de détection obtenues pour le diclofénac, on observe qu'en couplant la SPE à une méthode de détection électrocinétique on obtient une LOD de 2 ng/L en détection UV, bien inférieure à la limite obtenue en HPLC-UV pour le même composé (0,12 µg/L) et rivalisant avec certaines méthodes HPLC couplées à la spectrométrie de masse, pourtant plus sensible que la spectroscopie UV.

Comme en HPLC, certains paramètres nécessitent une optimisation, notamment le choix de l'électrolyte de séparation (nature, force ionique, pH), qui doit être optimisé pour une obtenir une bonne séparation des composés mais doit également être compatible avec le mode de détection couplé. Par exemple, certains électrolytes ne sont pas suffisamment volatils et ne peuvent pas être utilisés dans le cas d'un couplage avec la spectrométrie de masse car ils encrassent le détecteur.

1.2.3 Méthodes de détection

1.2.3.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse s'est imposée comme la méthode de détection standard en chimie analytique, car elle permet d'identifier et de quantifier des composés de manière très sensible à partir d'une quantité infime d'échantillon (jusqu'au picogramme) [58]. Cette technique analyse des ions en les séparant selon leur rapport masse/charge grâce à un champ électrique ou magnétique, et les détecte grâce au courant électrique créé, proportionnel à la quantité d'ions. Les composés à analyser doivent donc être ionisés avant leur introduction dans le spectromètre de masse et plusieurs techniques d'ionisation ont été développées pour coupler la spectrométrie de masse avec les techniques séparatives comme la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire.

Le couplage avec la GC est le plus simple à mettre en place, car les composés sont déjà sous forme gazeuse. On utilise alors l'ionisation par impact électronique ou l'ionisation chimique. Dans le premier cas, les molécules de l'échantillon sont bombardées par un faisceau d'électrons, ce qui conduit à la formation d'ions, soit par arrachement d'un électron à la molécule, soit par dissociation de la molécule. Dans le cas de l'ionisation chimique, on fait réagir un ion réactif (CH_5^+ ou ions halogénures par exemple) sur les molécules de l'échantillon, ce qui va produire des ions spécifiques à chaque molécule de l'échantillon.

Dans le cas où les composés sont en phase liquide (HPLC ou CE), les composés doivent être ionisés mais le solvant doit également être évaporé. L'ionisation par électrospray (ESI pour *electrospray ionization*) est la technique de couplage la plus fréquemment utilisée [59]. La solution à analyser est introduite dans un capillaire métallique. Une différence de potentiel de plusieurs milliers de volts est appliquée à la sortie de ce capillaire et crée un nuage de gouttelettes chargées. Le solvant est évaporé par collision avec un gaz inerte. Au fur et à mesure de cette évaporation, la taille des gouttelettes diminue ce qui augmente leur charge surfacique. Lorsque les répulsions électrostatiques entre charges de même signe deviennent plus importantes que les forces de tension superficielle, les gouttelettes se divisent en gouttelettes plus petites. Ce processus se répète jusqu'à l'obtention d'ions totalement désolvatés, introduits dans le spectromètre de masse. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI pour *atmospherical pressure chemical ionization*) est

également utilisée. Un jet d'air ou d'azote transforme le liquide en fin brouillard et des ions radicalaires sont produits par une décharge électrique. Ces ions radicalaires participent à des réactions chimiques donnant lieu à l'ionisation des molécules de l'échantillon.

L'apparition de la spectrométrie de masse tandem (MS/MS) a permis d'augmenter encore la sensibilité et la sélectivité de la technique. La MS/MS combine deux analyseurs : un ion à étudier est sélectionné par le premier analyseur, il est ensuite fragmenté par collision avec un gaz inerte et les fragments sont analysés par un deuxième analyseur en série. Cette technique permet une identification plus précise des composés analysés.

La grande majorité des protocoles d'analyse de traces utilisent la spectrométrie de masse pour la détection des composés d'intérêt, grâce à sa sensibilité élevée. Le développement d'interfaces pour le couplage à d'autres techniques d'analyse a facilité son utilisation. L'inconvénient majeur de la détection par spectrométrie de masse est le coût de l'appareillage, beaucoup plus élevé que pour d'autres techniques.

1.2.3.2 Détection UV

Le couplage de la détection par spectroscopie UV avec les techniques analytiques est beaucoup plus simple que le couplage avec la spectrométrie de masse puisqu'il suffit d'intégrer un détecteur UV à l'appareil chromatographique en sortie de colonne chromatographique, ou à la fin du capillaire pour la CE. Beaucoup de systèmes commerciaux HPLC ou CE intègrent d'ailleurs ce type de détecteurs. De plus, les détecteurs UV peuvent être miniaturisés contrairement aux spectromètres de masse, donc ce type de détection est souhaitable pour une analyse sur le terrain, très intéressante dans le contexte de détection de pollution. Dans le cas de l'analyse de traces, la détection par spectroscopie UV est parfois utilisée [13, 53, 56, 57], mais moins que la spectrométrie de masse à cause de sa sensibilité limitée.

1.2.4 Autres méthodes (immunoassays, biosensors)

Bien que robustes, sensibles et bien implantées, les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse demandent un appareillage coûteux et les temps d'analyse ainsi que la consommation de solvants, parfois toxiques, ne sont pas négligeables. Elles nécessitent le plus souvent une étape de préconcentration réalisée hors ligne, qui peut

entraîner une contamination de l'échantillon ou la perte de certains composés. Dans le cadre de l'analyse environnementale, les biocapteurs et autres systèmes miniaturisés semblent une alternative prometteuse. Ces systèmes sont peu chers, simples à utiliser, et permettent d'analyser des composés polluants d'intérêt dans des matrices complexes avec une préparation d'échantillon réduite. Leur format réduit et leur portabilité permettent une analyse sur site, très intéressante dans le cadre de l'analyse environnementale.

En 2005, Tschmelak *et al.* ont développé un immunocapteur (ou immunosenseur) automatisé pour la détection et la quantification d'estrone, dont le principe est décrit dans la Figure 21 [60]. Leur système repose sur la reconnaissance de la cible par des anticorps, et sur une détection par fluorescence par réflexion totale interne (*TIRF pour total internal reflection fluorescence microscopy*). La cible est immobilisée sur la surface du capteur, et des anticorps spécifiques à cette cible et marqués par un fluorophore sont incubés avec ces cibles liées. L'excitation par des lasers des fluorophores liés à la surface renvoie un signal de fluorescence. Lorsque l'échantillon passe dans le système, une compétition se met en place entre les cibles greffées à la surface et les cibles en solution : une certaine quantité d'anticorps va se décrocher de la surface pour se lier aux cibles en solution. Le signal de fluorescence va donc diminuer, proportionnellement à la concentration de cibles en solution. Après optimisation des différents paramètres, une limite de détection de 0,20 ng/L a été obtenue sans prétraitement de l'échantillon, comparable aux performances de techniques plus classiques. D'autres travaux utilisant le même système ont permis de détecter simultanément plusieurs composés d'une famille d'oestrogènes [61]. Les immunocapteurs sont une alternative intéressante pour l'analyse de traces, mais le manque de stabilité des anticorps limite leurs applications. De plus, le format compétitif n'est pas idéal car il augmente le risque de faux positifs : les anticorps marqués peuvent éventuellement se détacher de la surface en absence de cible, faussant ainsi le signal mesuré. Ce type de méthode nécessite donc une optimisation et une étude rigoureuse des paramètres expérimentaux.

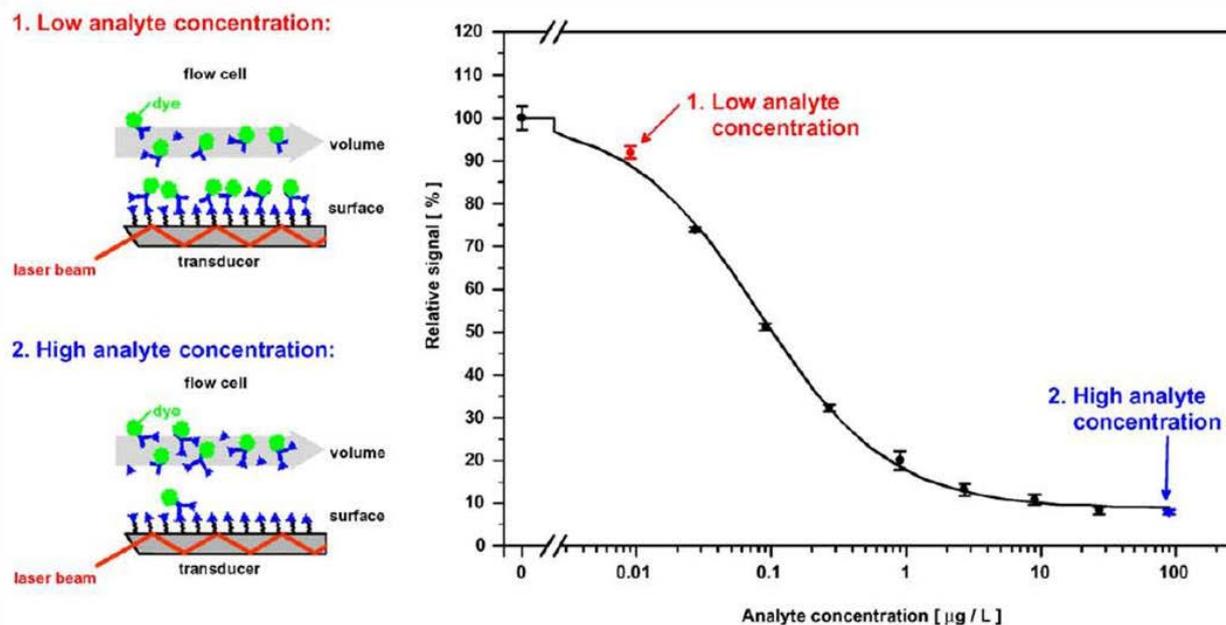


Figure 21 : Principe de fonctionnement de l'immunosenseur basé sur un format compétitif pour l'analyse d'estrone et signal de fluorescence relatif mesuré, pour une faible quantité de cible (1) ou une importante quantité de cible (2). 100 % correspond à la fluorescence mesurée en absence de cible. Lorsque des cibles sont présentes dans l'échantillon introduit dans le système, les anticorps fluorescents se détachent de la surface du capteur pour lier leur cible, résultant en une diminution du signal de fluorescence. [60]

Kibbey *et al.* [62] ont eu l'idée d'un système permettant l'extraction et l'analyse rapide et à bas coût de perturbateurs endocriniens (notamment des hormones) dans des échantillons aqueux. Un cylindre de PDMS est placé dans les échantillons, sur lequel s'adsorbent les composés cibles. La pièce de PDMS est ensuite scannée avec un détecteur UV, et les pics sont attribués aux différents composés en fonction de leur longueur d'onde d'absorbance. Les limites de détection atteintes (0,13 – 970 µg/L) ne permettent pas de détecter tous les composés cibles dans des échantillons réels, mais peuvent permettre de déterminer de façon rapide et peu coûteuse des sites pollués, sans identifier de façon précise la nature des polluants. Une analyse plus complète peut ensuite être effectuée sur ces sites. Enfin, les composés adsorbés sur le dispositif peuvent être désorbés et analysés par des méthodes plus classiques.

Les méthodes de détection électrochimiques sont également utilisées dans le développement de biocapteurs. Ambrosi *et al.* ont utilisé des techniques de voltampérométrie pour détecter différents composés pharmaceutiques [63]. Ils ont

notamment utilisé la voltampérométrie pulsée pour l'analyse de diclofénac à l'aide d'une électrode à base de nanotubes de carbone et ont obtenu une LOD de 0,8 μM (0,2 mg/L) (sur matrice réelle ou échantillon modèle ?), insuffisante pour détecter le composé dans des échantillons réels. La méthode a été validée avec un échantillon d'eau de rivière dopé avec le composé puis prétraité par SPE.

Si ces méthodes ne sont pas adaptées à l'analyse simultanée de dizaines de composés, elles permettent d'identifier et de quantifier de façon rapide et peu coûteuse certains composés indiquant une pollution médicamenteuse. Par exemple le diclofénac pourrait être un bon marqueur, car il est pratiquement toujours détecté en cas de pollution médicamenteuse.

1.3 Conclusion

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'analyse de traces de polluants émergents dans les eaux environnementales, notamment pour l'analyse de produits pharmaceutiques. Les méthodes de chromatographie ou d'électrophorèse capillaire couplées à la spectrométrie sont bien implantées et permettent de quantifier simultanément plusieurs espèces voire dizaines d'espèces tout en atteignant des limites de détection de quelques ng/L, compatibles avec les quantités présentes dans les échantillons environnementaux. Cependant, ces méthodes nécessitent un appareillage coûteux (surtout dans les cas de couplages avec la spectrométrie de masse), difficilement miniaturisable et donc peu souhaitable pour de l'analyse sur site. De plus, le prétraitement des échantillons et l'extraction des composés cibles sont généralement réalisés hors ligne alors qu'une extraction intégrée réduirait les manipulations d'échantillons et donc le risque d'erreur par contamination ou perte de matière.

Récemment, l'émergence des biocapteurs offre la possibilité d'effectuer des analyses sur site avec une préparation d'échantillon réduite, notamment en utilisant des anticorps se liant à une cible donnée et permettant de développer des capteurs très sélectifs. Cependant les limites de détection atteintes sont encore trop élevées pour l'analyse d'échantillons réels. L'utilisation de nouveaux agents sélectifs et stables tels que les aptamères (dont les propriétés sont décrites dans le chapitre suivant) dans ces biocapteurs permettrait d'améliorer la stabilité et la performance des systèmes. De plus, leur intégration dans des

systemes miniaturisés intégrant différentes étapes du schéma d'analyse totale dont une étape de préconcentration permettrait de développer des systemes simples, sensibles, peu coûteux et compatibles avec l'analyse sur site.

2 Les aptamères et leurs applications analytiques

Les acides nucléiques – acide désoxyribonucléique (ADN) et acide ribonucléique (ARN) – constituent le support de l'information génétique déterminant l'identité biologique des organismes. Ces molécules biologiques sont les seules à pouvoir être reproduites à l'identique grâce à un mécanisme enzymatique simple, la réaction en chaîne par polymérase ou PCR (pour *Polymerase Chain Reaction*). Cette propriété très intéressante du point de vue des biotechnologies permet une production en série des acides nucléiques, qui comptent parmi les macromolécules les plus utilisées en biologie (sondes, amorces d'amplification...) [64].

Leur utilisation en biotechnologie est essentiellement basée sur l'enchaînement des nucléotides, formant la séquence primaire, et sur l'interaction entre les bases complémentaires de deux molécules d'acides nucléiques distinctes. Pourtant les acides nucléiques présentent une richesse structurale remarquable (structures secondaire et tertiaire), dictée par la structure primaire. Ces structures tridimensionnelles peuvent présenter une activité catalytique ou des propriétés de reconnaissance d'autres molécules (telles que les protéines). De nombreux exemples de structures fonctionnelles d'ARN existent dans les organismes vivants, sélectionnées par l'évolution naturelle. Néanmoins, ces séquences représentent une infime partie des séquences possibles : il est donc légitime de supposer que des séquences autres que les séquences naturelles peuvent conduire à des structures fonctionnelles.

Dans les années 1990, plusieurs groupes ont développé simultanément un procédé permettant d'isoler une séquence possédant les propriétés voulues à partir d'une banque d'oligonucléotides synthétiques [65-68]. Ce procédé, appelé évolution moléculaire dirigée ou SELEX (pour *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), alterne des étapes de sélection et d'amplification. Les oligonucléotides sélectionnés par ce procédé sont appelés aptamères, néologisme provenant de la combinaison du mot latin *aptus* (apte, approprié à, qui se lie à) et du suffixe *mère* (unité de base composant un polymère), littéralement « polymère adapté à une fonction ». Le procédé de sélection permet d'obtenir des aptamères présentant une forte affinité et une forte spécificité vis-à-vis de la cible d'intérêt. Les cibles peuvent être de natures diverses, les aptamères pouvant être

sélectionnés contre tout type de cible : ions, petites molécules, protéines et même cellules entières. [69]

Après avoir décrit la structure et les propriétés des aptamères ainsi que leur processus de sélection, nous nous intéresserons aux applications analytiques des aptamères, plus précisément à leur utilisation dans des biocapteurs et bioessais pour l'analyse environnementale.

2.1 Structure des aptamères

Les oligonucléotides sont composés de 3 éléments formant un motif répétitif (voir Figure 22) : un sucre, désoxyribose dans le cas de l'ADN et ribose dans le cas de l'ARN, un groupement phosphate et un hétérocycle aromatique (appelé base azotée). Les groupements phosphates confèrent aux acides nucléiques une charge négative. Pour l'ADN, il existe 4 bases naturelles : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Dans le cas de l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). La séquence des bases le long du brin d'ADN est appelée structure primaire.

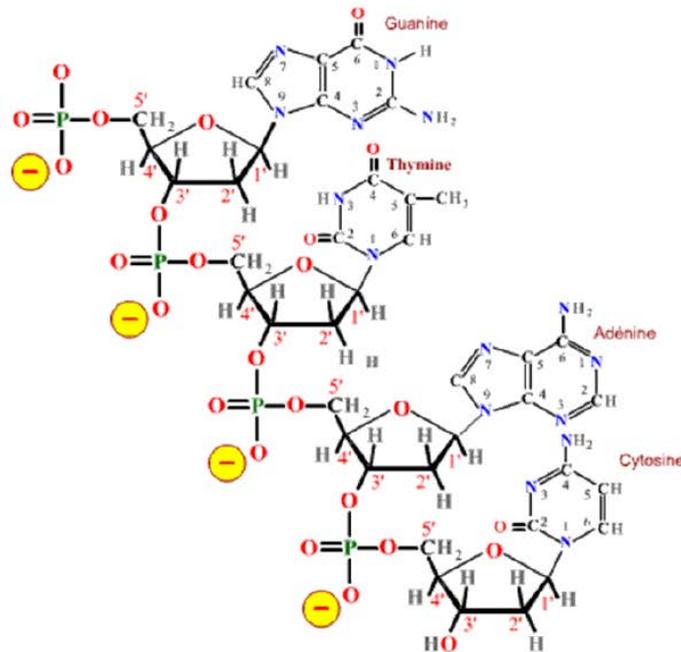


Figure 22 : Structure d'un oligonucléotide ADN. En rouge : sites donneurs de liaisons hydrogène (O) ; en bleu : sites accepteurs de liaison hydrogènes (N) [70]

Ces bases contiennent des groupements donneurs et accepteurs de ponts hydrogènes et peuvent s'apparier avec leur base complémentaire, formant des paires A-T (A-U dans le cas de l'ARN) ou G-C. Cet appariement entraîne le repliement du brin d'ADN et la formation d'une structure tridimensionnelle (structures secondaires et tertiaires) susceptible d'interagir avec la cible d'intérêt par des interactions non-covalentes (interactions électrostatiques, liaisons hydrogènes...). L'appariement entre les bases va dépendre de la structure primaire du brin d'ADN.

Un aptamère est un brin d'ADN ou d'ARN sélectionné pour son affinité envers une cible à partir d'une banque d'oligonucléotides synthétiques. Le procédé de sélection se résume à identifier la séquence de bases qui permettra d'obtenir la structure tridimensionnelle favorisant la formation d'un complexe stable avec la cible.

L'interaction entre un aptamère et sa cible peut être considérée comme un phénomène dynamique impliquant un réarrangement de la structure existante de l'aptamère, voire l'adoption d'une nouvelle structure intégrant la cible [71]. Cette interaction peut être hautement spécifique. Par exemple, l'interaction entre la théophylline et son aptamère repose sur la liaison hydrogène entre une cytosine non appariée et l'hydrogène en N7 de la cible, et présente une constante de dissociation (K_D) de 100 nM. Le remplacement de cet hydrogène par un groupement méthyle donne une molécule analogue, la caféine, qui interagit 10 000 fois plus faiblement avec le même aptamère [72].

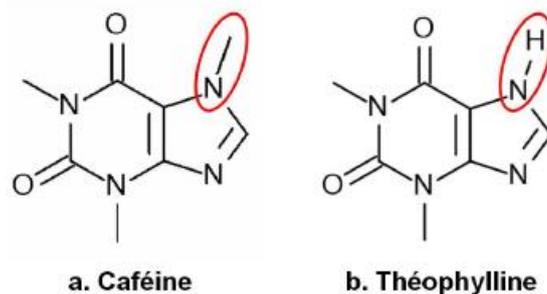


Figure 23 : Structure de la caféine (a) et de la théophylline (b) [70]

2.2 Propriétés des aptamères

Les aptamères possèdent des propriétés de reconnaissance moléculaire semblables aux anticorps, mais présentent également de nombreux avantages par rapport à ces derniers. [48, 69, 73, 74]

Tout d'abord, ils sont identifiés par un processus de sélection *in vitro*, ce qui permet d'éviter de recourir à l'utilisation d'animaux ou de cellules mais également de sélectionner des aptamères contre des molécules ne générant pas de réponse immunitaire, ce qui est difficile dans le cas des anticorps. De plus, leur synthèse chimique permet d'introduire des groupements fonctionnels (marqueurs, groupements permettant le greffage...) à des positions précises et bien identifiées. Le contrôle précis de la position d'introduction de ces groupements permet de choisir une position n'affectant pas l'affinité de l'aptamère pour sa cible. Ces modifications peuvent cependant entraîner une hausse des coûts de production. Enfin, leur synthèse chimique garantit leur reproductibilité d'un lot à l'autre, contrairement aux anticorps pour lesquels l'affinité peut varier en fonction des lots.

Les aptamères présentent une meilleure stabilité temporelle que les anticorps, et peuvent être transportés à température ambiante, un avantage non négligeable dans le cadre d'analyses sur le terrain. Les aptamères ont en outre la capacité de se régénérer : si la structure tridimensionnelle est dégradée par une exposition à de hautes températures ou à des agents dénaturants, la structure peut être rétablie en quelques minutes par le retour à des conditions propices à l'interaction. Les conditions de milieu telles que le pH, la nature des ions présents, la force ionique ou l'ajout de solvants influencent également l'interaction [75, 76].

Les aptamères reconnaissent une plus grande variété de cibles (de l'ion à la cellule), avec une spécificité plus élevée que les anticorps. Par exemple, dans le cas de la théophylline, l'aptamère se lie à sa cible avec une affinité 10 000 fois supérieure que lorsqu'il se lie à la caféine, alors que dans le cas des anticorps leur affinité pour la théophylline est seulement 1000 fois supérieure à celle pour la caféine [72].

Le Tableau 6 résume les différences entre les aptamères et les anticorps.

Tableau 6 : Comparaison des propriétés des anticorps et des aptamères [69, 74, 77]

Paramètre	Anticorps	Aptamères
Production	Production in vivo (animaux ou lignées cellulaires) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Long, coûteux ▪ Purification difficile ▪ Cibles immunogènes ▪ Variation de l'affinité d'un lot à l'autre 	Sélection in vitro puis production par synthèse chimique <ul style="list-style-type: none"> ▪ Rapide, faible coût ▪ Pureté élevée (conditions dénaturantes) ▪ Tout type de cibles ▪ Reproductibilité d'un lot à l'autre
Stabilité	Sensibilité à la température (dénaturation irréversible)	Stabilité à long terme : transport à température ambiante, régénération facile et rapide
Modifications chimiques	Diminution ou perte d'affinité possible lors du marquage	Conservation de l'affinité (contrôle de la position de la modification)
Paramètres cinétiques	Non modifiables	Modifiables en fonction du procédé SELEX employé

2.3 Processus de sélection

Le procédé SELEX, développé simultanément par deux groupes en 1990 [65, 66], consiste à identifier le composé aux propriétés recherchées au sein d'une banque aléatoire d'oligonucléotides, grâce à un processus de criblage. Le processus comporte plusieurs cycles, alternant la sélection de candidats potentiels (molécules correspondant aux critères de tri) et leur amplification par PCR.

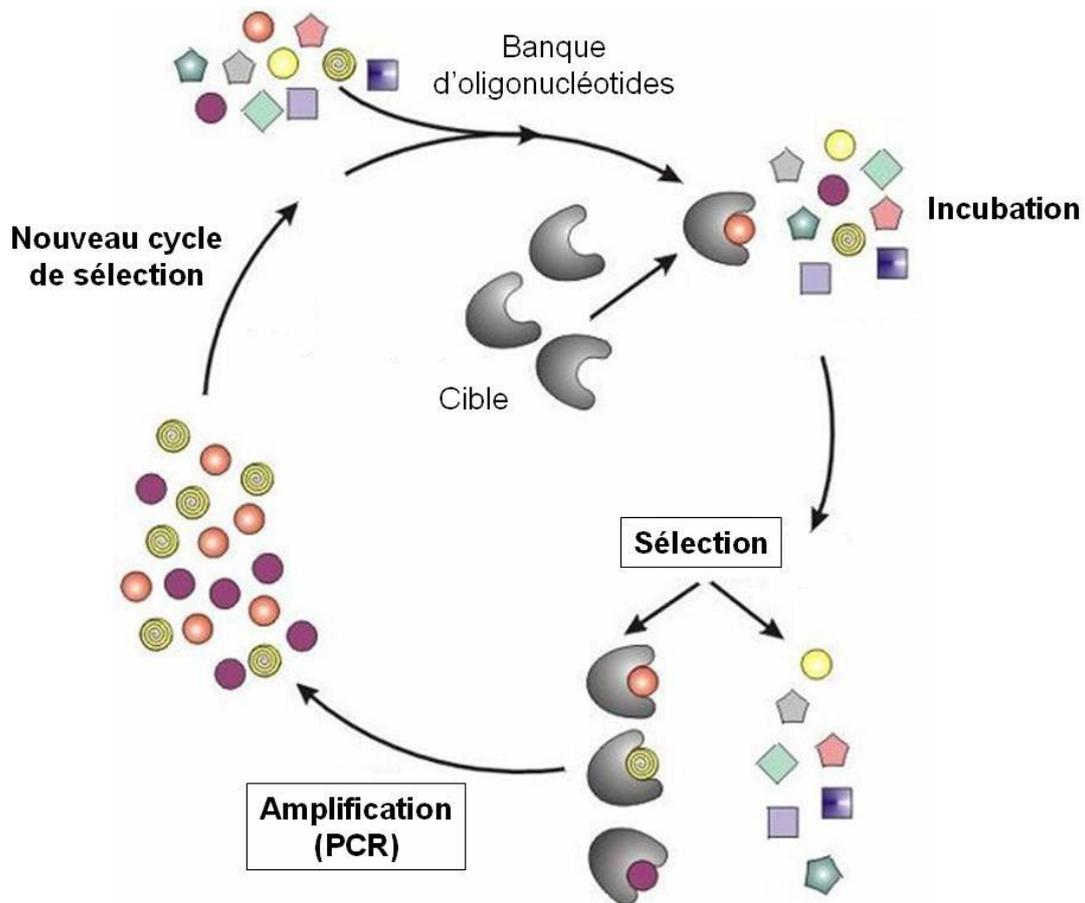


Figure 24 : principe du procédé SELEX (d'après [78])

Le principe du SELEX est décrit dans la Figure 24. Tout d'abord, une banque d'oligonucléotides (ADN ou ARN simple brin) est obtenue par synthèse automatisée. Les séquences sont constituées d'une région aléatoire entourée de deux séquences fixes (*primers*), permettant leur amplification par PCR. La population de la banque d'oligonucléotides est soumise à une pression de sélection reposant sur l'affinité avec la cible choisie. Les candidats potentiels sont isolés des autres par une méthode de séparation, puis amplifiés. Une nouvelle population, enrichie en candidats potentiels, est alors obtenue et subit un nouveau cycle de sélection/amplification.

Ces cycles sont réitérés une dizaine de fois, permettant ainsi l'enrichissement progressif de la population en séquences ayant une interaction avec la cible. La diversité de la population se réduit, jusqu'à quelques séquences d'aptamères, identifiables par des techniques classiques de génie génétique (clonage, séquençage...). Une fois identifiées, leurs séquences sont comparées afin de mettre en évidence la variation ou la conservation de certaines

régions et d'en déduire les motifs structuraux critiques pour l'interaction avec la cible. Une fois la séquence identifiée, les aptamères peuvent être produits en grande quantité.

La performance du SELEX est basée sur la diversité moléculaire de la banque, ainsi que sur l'efficacité des techniques de tri utilisées.

2.3.1 Composition de la banque d'oligonucléotides

Tout d'abord, il faut déterminer quel type d'acide nucléique (ADN ou ARN) sera utilisé pour créer la banque. Les oligonucléotides ARN ont été les premiers à être utilisés [65, 66]. Cependant l'ARN est très sensible à la dégradation par des nucléases, et présente une moins bonne stabilité temporelle que l'ADN [79]. Ce dernier est donc plus adapté pour une utilisation dans des biocapteurs ou des systèmes de diagnostic, car les échantillons contiennent des nucléases. La sélection d'aptamères de type ARN nécessite également l'ajout d'étapes de transcription lors du procédé SELEX, nécessaires à l'amplification de l'ARN. Néanmoins, les banques d'ARN conduisent généralement à des aptamères présentant des affinités plus élevées du fait de la capacité de l'ARN à adopter une plus large variété de conformations que l'ADN [78, 79].

Le choix de la taille de la région aléatoire des séquences détermine la diversité de la banque. La diversité théorique des séquences d'oligonucléotides est considérable. En effet, chaque position dans la chaîne peut être occupée de façon équiprobable par l'un des quatre nucléotides. Pour un oligonucléotide composé de 50 bases, on obtient alors 4^{50} séquences différentes (10^{30}), une valeur inaccessible en pratique puisqu'elle correspond à plus de 10^5 tonnes pour une banque dans laquelle chaque séquence est représentée une fois! Pour des raisons expérimentales, la diversité est donc limitée à 10^{15} séquences, ce qui correspond à une banque contenant des séquences avec 25 positions aléatoires dans laquelle tous les candidats sont représentés [64]. S'il y a davantage de bases dans la région aléatoire, la banque ne contiendra pas un exemplaire de chaque molécule possible.

2.3.2 Méthodes de tri

Lors de chaque cycle du processus SELEX, la sélection s'opère par la séparation entre les oligonucléotides liés à la molécule cible et les oligonucléotides libres. Différentes techniques peuvent être mises en œuvre : filtration sur membrane, chromatographie d'affinité,

centrifugation, électrophorèse sur gel, cytométrie de flux ou électrophorèse capillaire [80]. L'efficacité de la sélection dépendra des paramètres expérimentaux, permettant de moduler la pression de sélection. Plus la pression de sélection sera forte, plus les oligonucléotides sélectionnés auront d'affinité pour la cible. La pression de sélection est généralement augmentée au fur et à mesure des cycles, afin d'obtenir les candidats les plus affins.

Lors du processus de tri, certaines séquences peuvent interagir de façon non spécifique avec le support de séparation (filtre, phase stationnaire, billes...). Pour éviter la contamination de la population par des séquences associées de façon non spécifique au support de séparation, différents types de cycles de contre-sélection peuvent être mis en place : incubation avec le support sans cible, élution spécifique avec la cible, alternance de différentes méthodes de sélection...

2.4 Utilisation des aptamères dans l'analyse environnementale

Les aptamères peuvent être utilisés dans de nombreuses applications nécessitant un phénomène de reconnaissance moléculaire. Depuis plusieurs années, les aptamères ont été utilisés comme agents de thérapie ou de diagnostic [81] et plus récemment pour des applications analytiques notamment pour l'analyse environnementale [69]. Dans ce domaine les polluants peuvent être de natures et de tailles variées : métaux toxiques sous forme ionique, médicaments, toxines produites par des microorganismes, bactéries... La possibilité de sélectionner un aptamère contre chacune de ces cibles en fait donc un ligand de choix dans le développement de méthodes de détection de ces divers polluants. Leur stabilité thermique et temporelle est également un avantage pour des analyses de terrain, et leur haute spécificité permet de détecter les cibles même en présence d'autres molécules. Enfin, leur capacité de se régénérer permet d'obtenir des biocapteurs réutilisables.

Bien que de nombreuses séquences aient été sélectionnées pour diverses cibles, leur utilisation réelle reste limitée. En effet, beaucoup de laboratoires se sont concentrés pendant longtemps sur le développement de preuves de concept, à l'aide de séquences d'aptamères bien décrites et très utilisées (thrombine et ATP majoritairement) mais assez peu pertinentes pour des applications cliniques ou d'analyses environnementales [82]. Cependant ces dernières années sont apparues les premières utilisations concrètes des

aptamères, notamment en thérapeutique avec la mise sur le marché en 2006 d'un médicament (Macugen) à base d'aptamère pour traiter la dégénérescence maculaire [83] et plusieurs essais cliniques en cours [81], ainsi que dans le domaine de la sûreté alimentaire avec la commercialisation d'un kit de détection de l'ochratoxine A, une mycotoxine contaminant le blé, par la société Neoventure Biotechnology [84, 85]. Ces applications concrètes démontrent le potentiel thérapeutique ou analytique des aptamères.

Dans le contexte de l'analyse environnementale, il existe encore peu de méthodes analytiques ou de biocapteurs utilisant des aptamères pour la détection et la quantification de composés pharmaceutiques polluant les eaux. Dans la suite de cette section, nous allons donc nous intéresser également à d'autres cibles considérées comme toxiques et polluant les eaux, tels que des ions métalliques, les toxines ou le bisphénol A, un perturbateur endocrinien. Les différentes utilisations des aptamères en analyse environnementale peuvent être classées selon la méthode de détection utilisée, les mêmes méthodes pouvant s'appliquer à différents types de cible. Dans un premier temps, les méthodes employées seront décrites, puis leur performances seront quantifiées et comparées.

2.4.1 Méthodes colorimétriques

Les méthodes utilisant la colorimétrie reposent sur la détection d'un changement de couleur de la solution dans laquelle le test est effectué, en fonction de l'interaction entre l'aptamère et sa cible.

La plupart des tests colorimétriques utilisant des aptamères développés pour l'analyse environnementale reposent sur l'utilisation de nanoparticules d'or. En effet, une solution de nanoparticules d'or change de couleur en fonction de la taille des particules, il est donc possible de détecter la formation d'agrégats, qui induira un changement de couleur. De plus, les nanoparticules interagissent différemment avec des aptamères libres ou des aptamères liant leur cible. Elles peuvent donc être utilisées comme sondes colorimétriques dans des tests utilisant des aptamères non modifiés. Les différents tests sont tous basés sur le même principe : l'aptamère va créer ou empêcher l'agrégation des nanoparticules, ce qui entraîne un changement de couleur de la solution.

En 2013, Mei *et al.* [86] ont ainsi développé un test de ce type pour la détection de bisphénol A (BPA) dans des échantillons aqueux. Le principe du test est résumé dans la Figure 25.

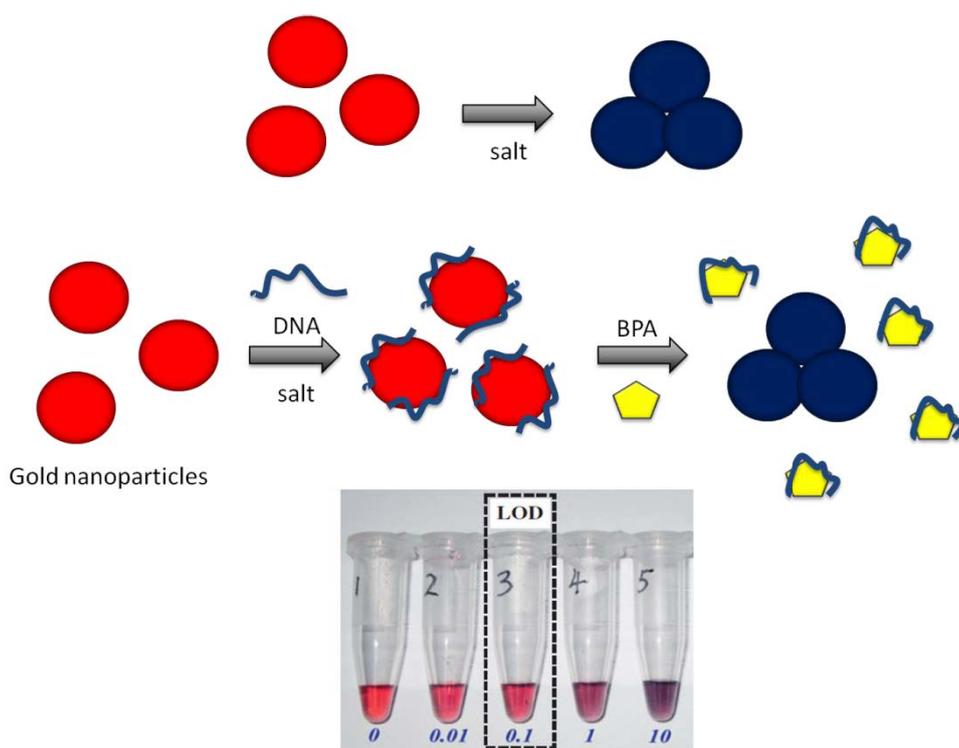


Figure 25 : Représentation schématique de la détection de bisphénol A (BPA) à l'aide d'un aptamère spécifique et de nanoparticules d'or. L'agrégation est visible à l'œil nu, à partir de 0,01 ng/mL. Adapté de [86].

En absence d'aptamère, les nanoparticules s'agrègent lors de l'ajout d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 15 mM. En présence d'aptamère, ces derniers se lient aux nanoparticules et empêchent leur agrégation lors de l'ajout du NaCl. Lorsque le BPA est ajouté à la solution contenant le mélange aptamère/nanoparticules, les aptamères vont se détacher des nanoparticules pour interagir avec leur cible, ce qui entraîne la formation d'agrégats et un changement de couleur de la solution, visible à l'œil nu (Figure 25) et quantifiable par spectroscopie UV-visible. La variation de couleur dépend de la quantité de nanoparticules agrégées, proportionnelle à la concentration en BPA de l'échantillon testé. La même technique a été utilisée pour la détection d'ions Hg^{2+} [87] et de l'ampicilline [88]

La possibilité de miniaturiser cette méthode et de l'intégrer à un dispositif de détection portatif a été démontrée avec le développement d'une plateforme utilisant une prise d'image par téléphone portable permettant de détecter les ions mercuriques Hg^{2+} , très toxiques [89]. Les ions Hg^{2+} interagissent avec les aptamères riches en thymine (T) en formant des complexes stables T-Hg-T, entraînant le repliement de l'aptamère, qui

n'interagit alors plus avec les nanoparticules. Ce dispositif, schématisé sur la Figure 26, est composé d'une chambre pouvant contenir 2 cuvettes (contrôle et échantillon) et de deux LED (rouge et verte) pour illuminer les cuvettes. L'appareil photo intégré au smartphone est utilisé pour prendre une photo des cuvettes, et une application spécifique permet de détecter et de quantifier le changement de couleur dû à l'agrégation des nanoparticules grâce au ratio entre les images vertes et rouges. Le couplage avec d'autres fonctions du smartphone tel que le GPS permet de relier les résultats du test aux coordonnées spatiales et au moment de prélèvement de l'échantillon, facilitant la cartographie spatiotemporelle de la zone polluée.

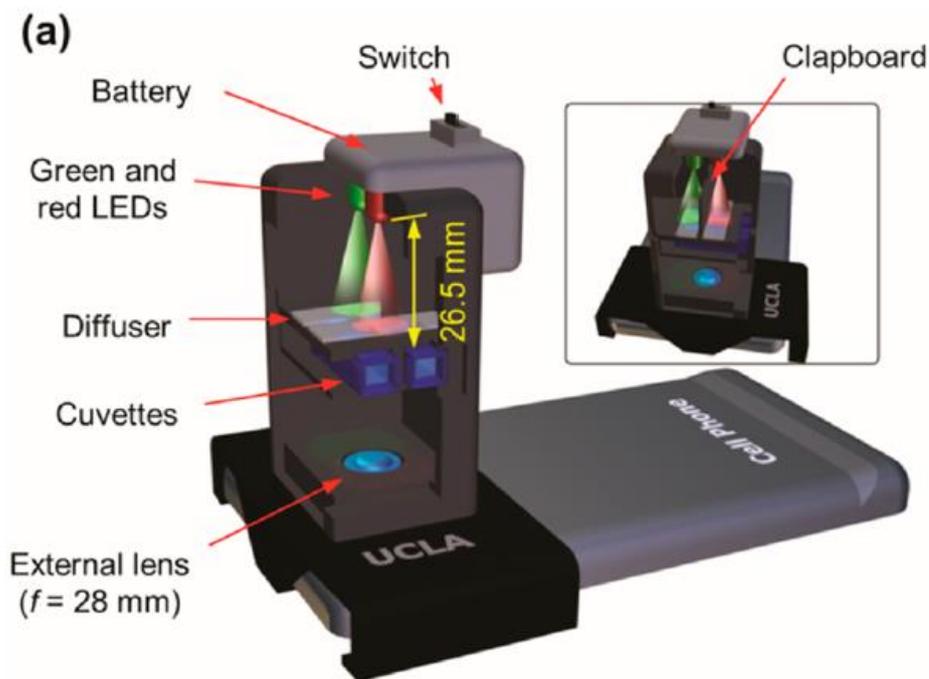


Figure 26 : Plateforme pour la détection du mercure par colorimétrie à l'aide d'un smartphone [89]

Wu *et al.* [90] ont développé un autre type de test pour la détection d'arsenic utilisant un tensioactif, le poly(diallyldiméthylammonium) (PDDA), qui peut complexer l'aptamère de l'arsenic en absence de ce dernier (Figure 27). En présence d'arsenic(III), l'aptamère se détache du PDDA pour interagir avec sa cible. Le PDDA se lie alors aux nanoparticules, qui forment des agrégats, entraînant un changement de couleur de la solution.

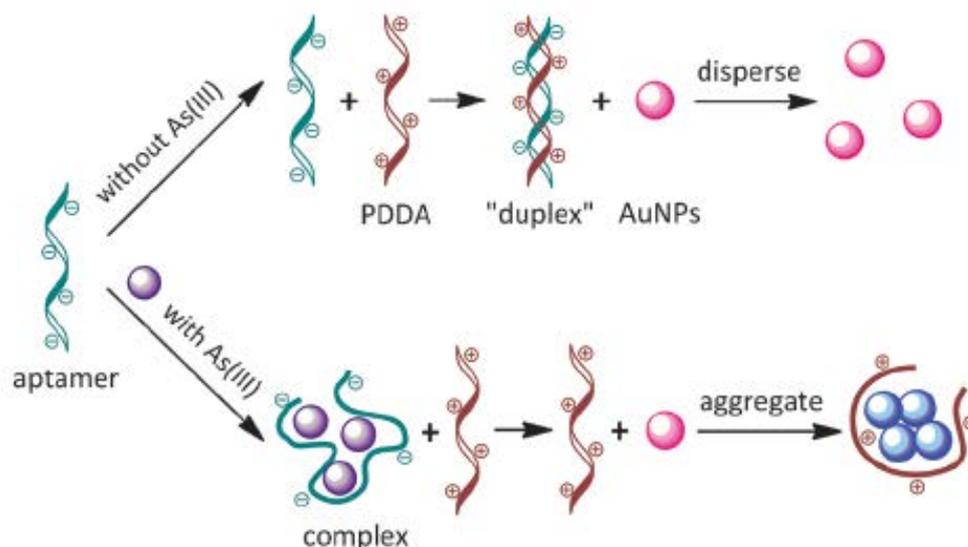


Figure 27 : Principe de détection de l'ion As³⁺ par colorimétrie [90]

La détection par colorimétrie permet de développer des tests simples, qui ne nécessitent pas de modification de l'aptamère, ce qui permet de réduire les coûts. De plus une première évaluation qualitative des résultats peut être faite à l'œil nu, avant une quantification plus précise par un spectromètre UV-visible. Cependant la sensibilité dépend du contrôle des paramètres expérimentaux, en particulier de l'optimisation de l'interaction entre les aptamères et les nanoparticules qui dépendra des tailles de ces derniers, ainsi que de la nature du tampon utilisé.

2.4.2 Méthodes de fluorescence

Les méthodes de détection par fluorescence utilisent généralement des aptamères marqués avec un fluorophore, c'est-à-dire une molécule capable d'émettre un signal de fluorescence après excitation. L'émission de ce signal va dépendre de l'interaction de l'aptamère avec sa cible.

Plusieurs stratégies sont basées sur le concept d'aptamère signal (*signaling aptamer*). Ce concept repose sur la capacité des aptamères à changer de conformation lors de l'interaction avec leur cible. Un signal est associé à ce changement conformationnel et permet la détection de la cible et sa quantification. Dans le cas d'une détection par fluorescence, le changement conformationnel peut induire l'émission de fluorescence ou au contraire l'inhiber.

Une première stratégie, représentée dans la Figure 28 dans le cas d'une détection de bisphénol A (BPA) [91], consiste à greffer un fluorophore à une extrémité de l'aptamère et un inhibiteur de fluorescence (*quencher*) à l'autre extrémité.

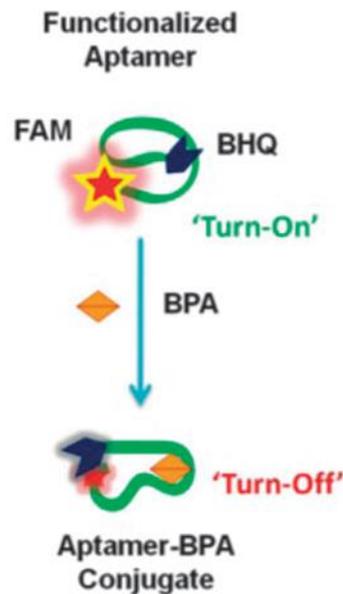


Figure 28 : Représentation schématique de la détection du bisphénol-A par fluorescence en utilisant un aptamère signal. FAM : carboxyfluorescéine, BHQ : inhibiteur de fluorescence, *Black Hole Quencher*® [91]

En absence de cible, le fluorophore est loin de son inhibiteur, on observe alors une émission de fluorescence. En présence de cible, l'aptamère change de conformation pour se lier à la cible, entraînant le rapprochement entre le fluorophore et l'inhibiteur et la diminution de l'émission de fluorescence à cause du transfert d'énergie entre le fluorophore et l'inhibiteur.

Une variante de cette méthode, consiste à utiliser des nanoparticules d'or, connues pour leurs propriétés d'inhibition de fluorescence. Les aptamères, modifiés par un fluorophore à une de leurs extrémités, interagissent avec les nanoparticules en absence de cible. La proximité entre le fluorophore et les nanoparticules permet un transfert d'énergie et empêche l'émission de fluorescence. En présence de cible, les aptamères se décrochent des nanoparticules pour interagir avec leur cible. Le fluorophore se retrouve alors éloigné des nanoparticules, et émet un signal de fluorescence. Cette approche a par exemple été utilisée pour la détection de résidus d'ampicilline (antibiotique) dans des échantillons de lait [88].

Une autre approche, présentée dans la Figure 29, a été utilisée pour la détection d'ions Hg^{2+} [92]. Elle consiste à greffer les aptamères à la surface de nanoparticules d'or grâce à la modification d'une de leurs extrémités par un groupement thiol. Un fluorophore est greffé à l'autre extrémité de l'aptamère qui a une structure dépliée en absence de cible. Le fluorophore est alors assez éloigné de la nanoparticule pour émettre de la fluorescence. En présence de cible, le repliement de l'aptamère rapproche le fluorophore de la nanoparticule, inhibant le signal de fluorescence.

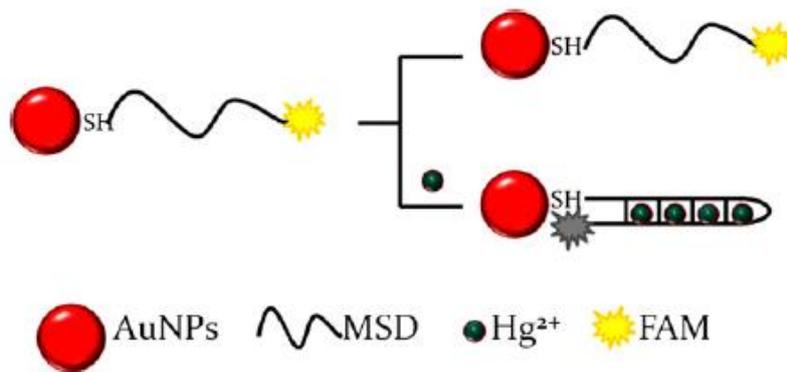


Figure 29 : Principe de détection du mercure par fluorescence en utilisant des nanoparticules d'or comme inhibiteur de fluorescence. MSD : aptamère spécifique à l'ion mercurique. [92]

D'autres méthodes utilisent la technique de fluorescence à onde évanescente (*evanescent wave*) qui permet de détecter la fluorescence uniquement au voisinage de la surface du capteur. Yildirim *et al.* ont par exemple développé une méthode d'analyse du 17β -estradiol basée sur cette technique de détection [93]. Dans ce test compétitif dont le principe est représenté dans la Figure 30, la cible est greffée de façon covalente à la surface du capteur. Une concentration donnée d'aptamères marqués par un fluorophore (cyanine 5,5) est ensuite incubée avec l'échantillon. Cette solution est introduite dans le système et mise en contact avec la surface du capteur : les aptamères non liés aux cibles en solution vont se lier aux molécules greffées à la surface du capteur et émettre un signal de fluorescence, inversement proportionnel à la concentration de cibles dans l'échantillon testé.

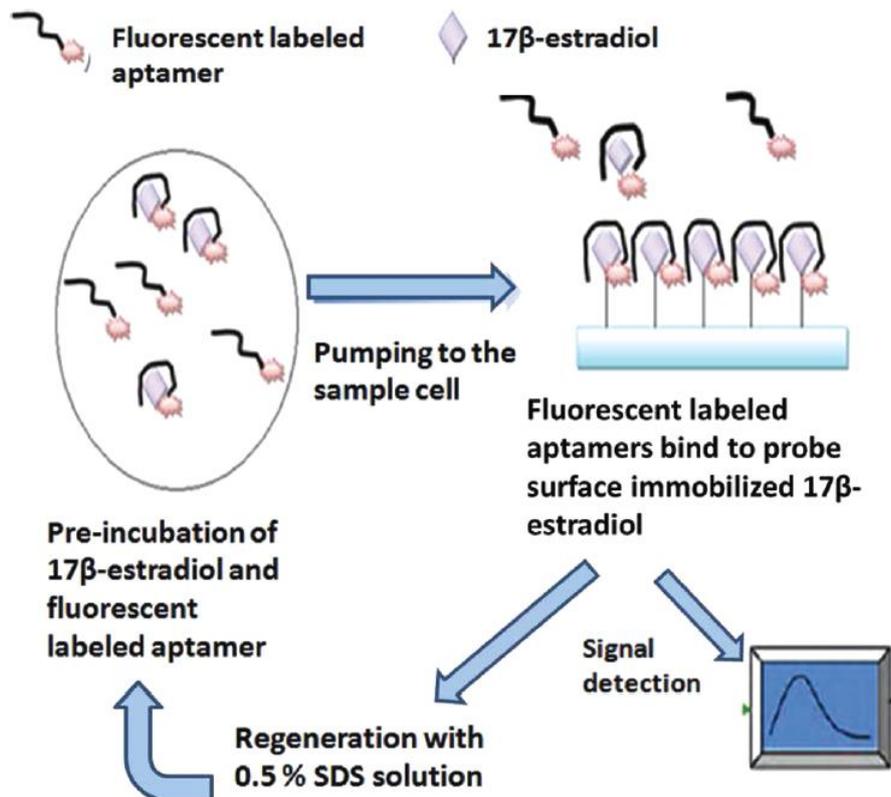


Figure 30 : Représentation schématique du mécanisme de détection du 17β-estradiol par fluorescence à onde évanescente à l'aide d'un aptamère spécifique, utilisant un format compétitif : la cible immobilisée à la surface du système de détection entre en compétition avec la cible présente dans l'échantillon pour l'interaction avec leur aptamère fluorescent. SDS : dodécyle sulfate de sodium, tensioactif permettant de régénérer le système en relarguant les cibles liées à leur aptamère. [93]

Une variante de cette méthode évite le greffage de la cible sur le capteur, qui peut entraîner une perte d'affinité de l'aptamère, particulièrement dans le cas des petites molécules. Cette méthode consiste à greffer à la surface du capteur un brin d'ADN complémentaire à l'aptamère [94]. Les aptamères libres après incubation avec la cible vont alors s'hybrider avec ces brins complémentaires, et émettre un signal de fluorescence. La difficulté réside dans le choix de la séquence complémentaire : l'interaction de l'aptamère avec celle-ci doit être plus faible qu'avec la cible.

Des fluorophores interagissant avec les aptamères, appelés rapporteurs de fluorescence, ont également été utilisés pour développer des méthodes ne nécessitant pas de marquage des

aptamères. Ces rapporteurs interagissent de façon différente avec les aptamères libres ou liés à leur cible.

Une méthode a été développée pour la détection en un seul test d'ions Hg^{2+} et Pb^{2+} en utilisant 2 rapporteurs de fluorescence différents, émettant à différentes longueurs d'ondes [95]. Le fluorophore TOTO-3 (dimère de carbocyanine) interagit avec la forme repliée que présente l'aptamère de l'ion Hg^{2+} lorsqu'il est lié à sa cible, ce qui résulte en une fluorescence plus importante que lorsque le TOTO-3 est libre en solution. Le deuxième rapporteur utilisé est l'ion terbium(III), qui forme un complexe avec l'aptamère de l'ion Pb^{2+} en absence de ce dernier. La fluorescence de l'ion Tb^{3+} est alors plus importante que lorsqu'il est libre en solution. En présence d'ion Pb^{2+} , une compétition se met en place avec l'ion Tb^{3+} pour l'interaction avec l'aptamère, résultant en une diminution de la fluorescence.

Comme les deux rapporteurs sont excités et émettent à des longueurs d'ondes différentes les ions Hg^{2+} et Pb^{2+} peuvent être quantifiés en un seul test, en faisant une première mesure de fluorescence en excitant d'abord la solution à 620 nm (longueur d'onde optimale pour TOTO-3) puis une deuxième mesure à 290 nm (longueur d'onde optimale pour l'ion Tb^{3+}), ce qui est une stratégie intéressante pour le développement de tests multi-cibles.

Li *et al.* ont utilisé des oxydes de graphène (GO) comme fluorophores, toujours pour la détection d'ions Hg^{2+} [96]. En effet, les feuilles d'oxyde de graphène ont la capacité de se lier à l'ADN simple brin sans modification *via* des interactions hydrophobes et de « stacking » et émettent une fluorescence importante. Lorsque les ions Hg^{2+} se lient à l'aptamère ils adoptent une configuration repliée et rigide. Les ions Hg^{2+} se retrouvent très proches de la surface des feuilles de GO et un transfert d'électrons se met en place, inhibant leur fluorescence.

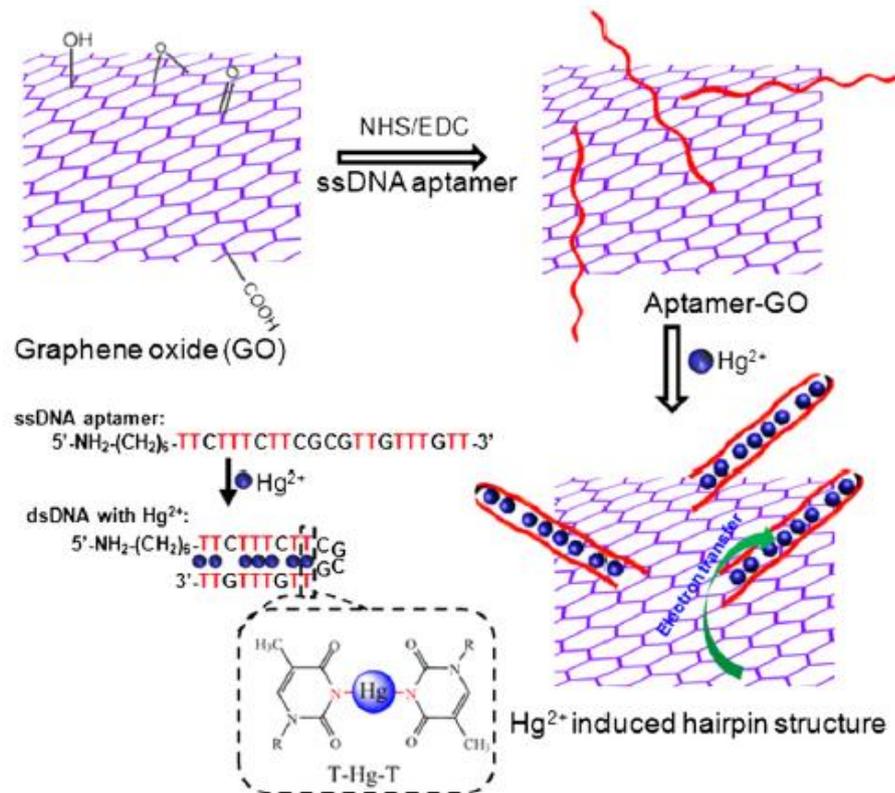


Figure 31 : Principe de la détection d'ions Hg²⁺ basée sur l'inhibition de la fluorescence de feuillets d'oxide de graphène [96]

Les méthodes de détection par fluorescence permettent de développer des tests en général plus rapides ou plus sensibles que la colorimétrie. Cependant la plupart des méthodes nécessite une voire deux modifications de l'aptamère (fluorophore, inhibiteur de fluorescence, groupement permettant le greffage...), ce qui augmente les coûts de production et nécessite une étude de l'impact de ces modifications sur l'interaction aptamère-cible [97]. Enfin, les fluorophores utilisés peuvent être sensibles à la température ou à l'exposition à la lumière, des contraintes à prendre en compte dans le cadre d'analyses sur le terrain pour ne pas affecter la sensibilité des biocapteurs.

2.4.3 Méthodes de chimiluminescence

Les méthodes utilisant une détection par chimiluminescence reposent sur l'utilisation d'une séquence ADN mimant la peroxydase de raifort (HRP : *horseradish peroxidase*), une enzyme qui catalyse l'oxydation du luminol par H₂O₂ entrainant l'émission d'un signal de luminescence. Cette séquence appelée DNAzyme est fusionnée avec l'aptamère d'intérêt, ce

qui permet de lier la réponse de chimiluminescence à l'interaction de l'aptamère avec sa cible.

Une première méthode utilisant un format compétitif a été développée pour la détection de l'aflatoxine B1, dont le principe est résumé sur la Figure 32 [98]. La cible est immobilisée au fond d'un puits et incubée avec la séquence aptamère-DNAzyme et l'échantillon à tester. Si la cible n'est pas présente dans l'échantillon, l'aptamère se lie à la cible immobilisée et reste dans le puits lors du rinçage. À l'ajout de luminol, la DNAzyme va catalyser son oxydation et faire apparaître la luminescence. Par contre, si la cible est présente dans l'échantillon, une compétition va se mettre en place entre les cibles immobilisées et celles présentes dans l'échantillon. Une partie des aptamères va se décrocher des cibles immobilisées pour se lier aux cibles de l'échantillon libres en solution, et va donc être enlevée du puits lors du rinçage avec un tampon phosphate. Après ajout de luminol, on aura une réponse de luminescence moins importante due à une quantité de DNAzyme plus faible.

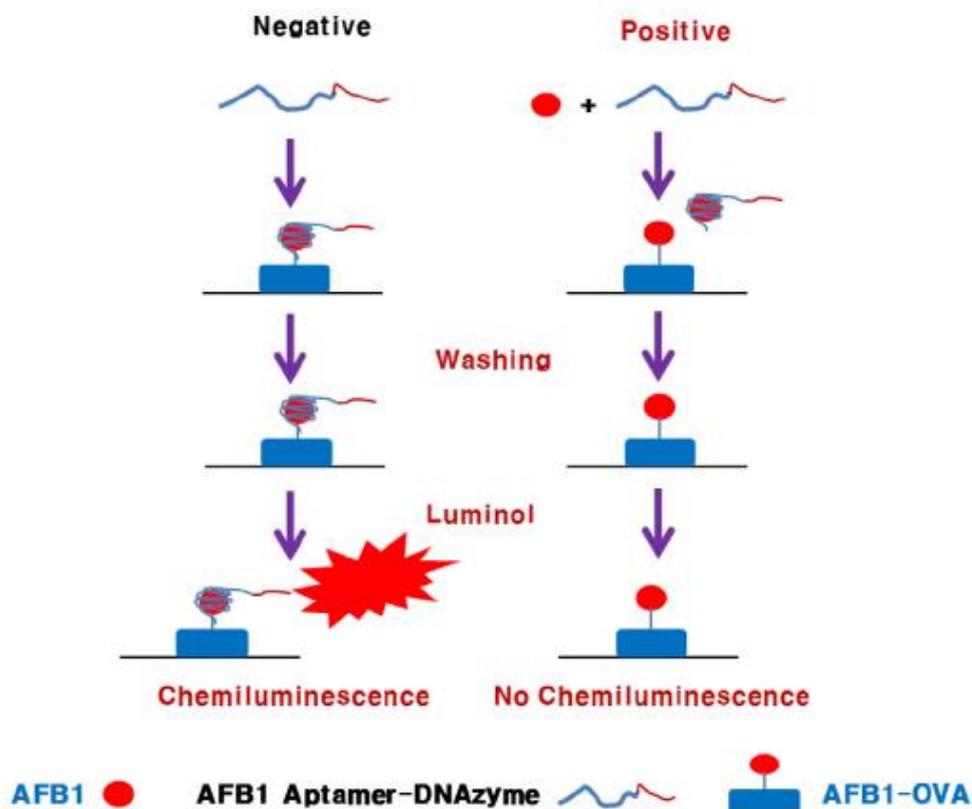


Figure 32 : Principe de la détection d'ochratoxine A par chimiluminescence. AFB1 : Aflatoxine B1, cible. OVA : ovalbumine, protéine permettant d'adsorber la cible aux parois du puits. [98]

Une autre méthode a été développée pour la détection de salmonelle, utilisant des nanotubes de carbone [99]. L'aptamère se lie aux nanotubes de carbone en absence de cible. La DNAzyme combinée à l'aptamère reste également accrochée sur les nanotubes et ne peut pas prendre la structure tridimensionnelle nécessaire pour catalyser l'oxydation du luminol, on n'observe pas de réponse de chimiluminescence. En présence de cible, l'aptamère se détache des nanotubes de carbone pour se lier à la bactérie, avec laquelle il a plus d'affinité. Cela entraîne également le détachement de la DNAzyme, qui peut alors catalyser l'oxydation du luminol, conduisant à une réponse de luminescence.

La chimiluminescence est une alternative intéressante à la colorimétrie et à la fluorescence mais la combinaison des séquences aptamères et DNAzyme doit être optimisée pour qu'elle n'affecte ni l'interaction aptamère/cible, ni l'efficacité du catalyseur.

2.4.4 Méthodes électrochimiques

Les capteurs électrochimiques présentent une sensibilité élevée, ont de faibles coûts de production et peuvent être miniaturisés assez facilement. De plus, différentes techniques de détection (techniques voltampérométriques, impédance...) peuvent être utilisées à partir d'un même appareillage, en fonction des contraintes imposées par chaque système [69]. Lors du développement de biocapteurs électrochimiques, la stratégie la plus répandue consiste à immobiliser les aptamères sur une électrode, de façon covalente ou par adsorption.

La première approche consiste à détecter directement l'interaction aptamère-cible grâce à un changement du signal électrochimique.

Kim *et al.* ont utilisé des électrodes d'or sur lesquelles sont immobilisés des aptamères par une interaction biotine-streptavidine pour l'analyse d'un antibiotique, la tétracycline, par voltampérométrie à vague carrée (SWV : *square wave voltammetry*) [100]. L'électrode est ensuite immergée dans une solution contenant des ions ferricyanure $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ comme médiateur redox. La couche d'aptamère greffée sur l'électrode bloque en partie la diffusion du médiateur redox vers l'électrode, diminuant le signal électrochimique. La liaison aptamère-cible entraîne un changement de conformation de la couche d'aptamères à la surface de l'électrode, entraînant une plus grande diffusion du médiateur à travers la couche et augmentant ainsi le signal électrochimique.

Une méthode similaire utilisant des électrodes de graphène a été développée pour la détection de microcystine LR, une toxine produite par les cyanobactéries présentes dans l'environnement [101] (Figure 33). Les aptamères sont adsorbés à la surface des électrodes, ce qui diminue le signal de SWV par rapport à l'électrode sans aptamères. Le changement de conformation des aptamères résulte à nouveau en une augmentation du signal de SWV, permettant de détecter la toxine. Une approche semblable utilisant des mesures d'impédance a également été utilisée pour la détection de microcystine LR [102].

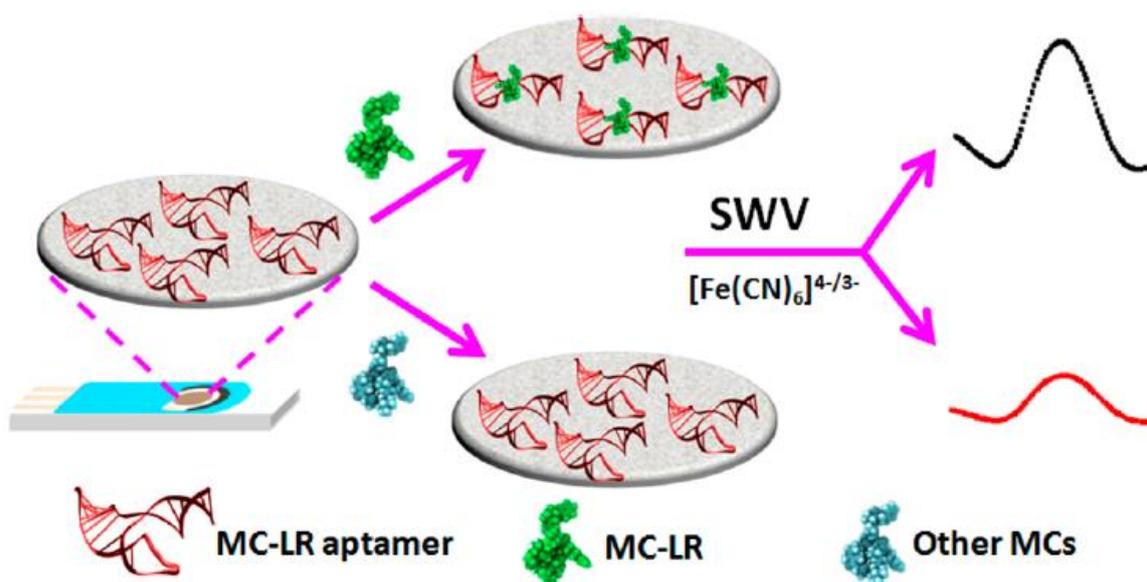


Figure 33 : Schéma de la détection de microcystine-LR par voltamétrie sur des électrodes de graphène greffées avec un aptamère spécifique [101]

Les capteurs électrochimiques peuvent également utiliser un format « sandwich » dont le principe est illustré sur la Figure 34 dans le cas d'un capteur pour la détection du diclofénac par impédance [103]. Les aptamères sont immobilisés sur une électrode en carbone vitreux et incubés avec l'échantillon contenant la cible. L'électrode sur laquelle est immobilisé le complexe aptamère-diclofénac est alors incubée dans une solution contenant le même aptamère, qui va se lier au diclofénac présent sur l'électrode, ce qui entraîne un changement dans le signal d'impédance quantifiable et proportionnel à la quantité de diclofénac présent dans l'échantillon analysé.

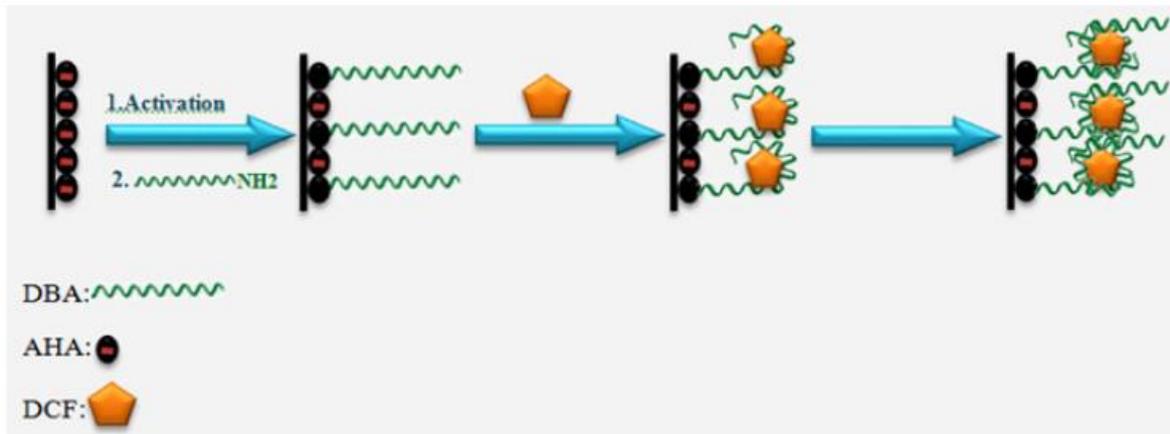


Figure 34 : Schéma du biocapteur pour la détection de diclofénac utilisant un format sandwich [103]

2.4.5 Autres méthodes de spectroscopie

Des techniques spectroscopiques comme la spectroscopie de diffusion de lumière ou la spectroscopie Raman ont également été utilisées.

La spectroscopie de diffusion de la lumière de résonance ou RLS (pour *Resonance Light Scattering*) permet de détecter un changement de la taille des particules d'une solution colloïdale ou leur agrégation [104].

Une première méthode, utilisée pour la détection d'arsenic(III) consiste à utiliser des nanoparticules d'or et un tensioactif, la détection étant basée sur l'agrégation des nanoparticules en présence ou non de cible [105]. En absence d'ions As^{3+} , le tensioactif se lie aux aptamères, et les nanoparticules ne s'agrègent pas. En présence de cible, l'aptamère interagit avec la cible plutôt qu'avec le tensioactif. Ce dernier se lie alors aux nanoparticules, entraînant leur agrégation et une augmentation du signal RLS, inversement proportionnelle à la concentration en As^{3+} dans l'échantillon.

Une autre méthode a été développée pour la détection d'ions mercure, toujours basée sur une détection par RLS, en utilisant du vert de malachite qui a la capacité de s'insérer entre 2 ions mercure uniquement lorsque ceux-ci sont liés par leur aptamère et d'augmenter le signal RLS [106] (Figure 35).

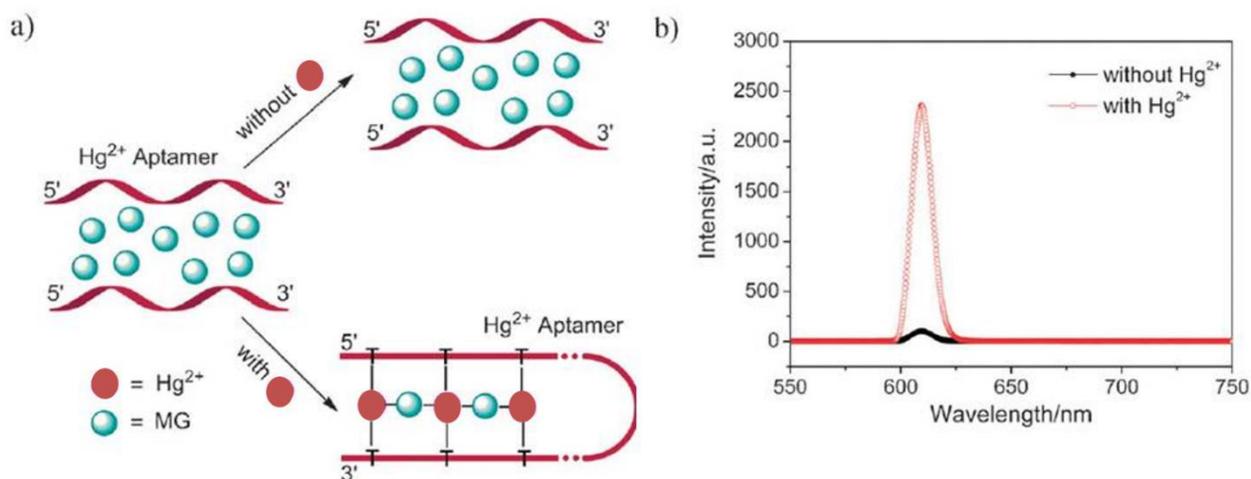


Figure 35 : (a) Principe de détection des ions Hg²⁺ par RLS à l'aide de vert de malachite (MG, *malaichite green*). (b) Spectre RLS avant et après incubation avec 50 μM d'ions Hg²⁺ pendant 10 minutes [106]

Enfin, le changement de conformation de l'aptamère peut à lui seul modifier le signal RLS. Une méthode a été développée pour la détection d'ions Pb²⁺, ne nécessitant ni marquage de l'aptamère ni utilisation d'un intermédiaire (nanoparticule, intercalant...) [107]. En présence de cible, l'aptamère prend une configuration en G-quadruplex entraînant une augmentation du signal RLS.

D'autres méthodes sont basées sur la technique de diffusion Raman exaltée par effet de surface ou SERS (pour *Surface-Enhanced Raman Scattering*), une variante de la spectroscopie Raman plus sensible grâce à l'utilisation de substrats exaltants. Ces substrats exaltants, souvent des structures métalliques nanométriques (nanoparticules, or nanoporeux...), permettent d'amplifier fortement le signal Raman des molécules qui les décorent [108].

Une première méthode utilise des nanoparticules cœur/coquille Au/Ag (Figure 36). Des brins d'ADN complémentaires à l'aptamère utilisé sont greffés à la surface des nanoparticules. L'aptamère est modifié avec un marqueur cyanine 3 (Cy3), qui sert de rapporteur Raman. En absence de cible l'aptamère s'hybride au brin complémentaire, le marqueur Cy3 est alors très proche de la surface des nanoparticules et augmente le signal SERS. En présence de cibles, les aptamères se détachent du brin complémentaire pour former des complexes avec leur cible. Le marqueur Cy3 se retrouve alors éloigné de la surface des nanoparticules, entraînant une diminution du signal SERS. Ce changement dans l'intensité du signal SERS est

inversement proportionnel à la concentration en cible de l'échantillon. Cette méthode a été utilisée pour la détection de bisphénol A et d'ions Hg^{2+} [109, 110].

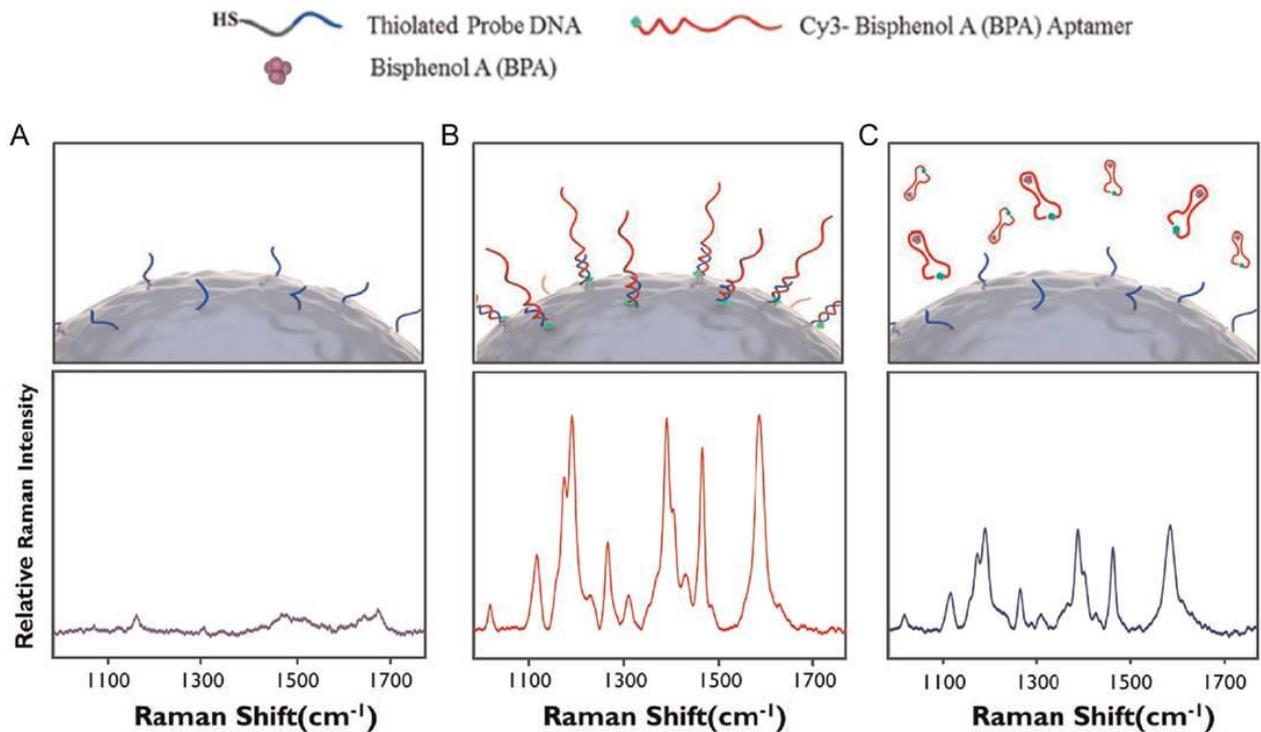


Figure 36 : Spectres SERS obtenus lors de la détection de bisphénol A. (A) Nanoparticules fonctionnalisées par l'ADN simple brin. (B) Hybridation de l'aptamère marqué Cy3 avec l'ADN simple brin. (C) Détachement de l'aptamère en présence de 100 nM de bisphénol A.

Une autre méthode a été développée pour la détection d'ions Hg^{2+} , en utilisant de l'or nanoporeux sur lequel sont greffés des aptamères marqués avec une cyanine 5 [111]. En absence de cible la structure de l'aptamère est flexible et les marqueurs Cy5 sont proches de la surface, donnant un signal SERS. Lorsque des ions Hg^{2+} sont présents ils s'intercalent entre les bases thymine de deux aptamères voisins en formant des complexes T-Hg-T ce qui rigidifie la structure des aptamères. Le marqueur Cy5 se retrouve alors loin de la surface de l'or nanoporeux et le signal SERS diminue.

Parmi les méthodes étudiées, la détection par SERS est celle qui offre la meilleure sensibilité. Elle nécessite cependant le greffage de l'aptamère sur le substrat exaltant, ainsi que le marquage de l'aptamère.

2.4.6 Tableau comparatif

Les caractéristiques des différentes méthodes présentées sont résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Liste (non exhaustive) des applications utilisant des aptamères pour l'analyse environnementale.
n.p. : valeur non précisée, cfu : colony forming unit

Méthode de détection	Cible	LOD	Temps d'analyse	Modification de l'aptamère	Tests sur échantillons réels	Ref
Détection optique						
Colorimétrie	Hg ²⁺	0,6 nM (0,1 µg/L)	10 min	Non	Eau de surface, eau potable	[87]
		200 nM (40 µg/L)	30 min	Non	Non	[112]
		17,3 nM (3,5 µg/L)	20 min	Non	Eau de surface, eau potable	[89]
	As ³⁺	71 nM (5,3 µg/L)	1h05	Non	Non	[90]
		8 nM (0,6 µg/L)	1h05	Non	Non	[105]
	BPA	0,2 nM (45 ng/L)	15 min	Non	Eau potable	[86]
	Ampicilline	29 nM (10 µg/L)	2h	Oui	Lait	[88]
Fluorescence	Hg ²⁺	0,92 nM (0,2 µg/L)	5 min	Non	Non	[96]
		16 nM (3,2 µg/L)	30 min	Oui	Eau de surface	[92]
		10 nM (2 µg/L)	45 min	Non	Eau de surface	[95]
	Pb ²⁺	1 nM (0,2 µg/L)	45 min	Non	Eau de surface	[95]

Chapitre I – Bibliographie générale

	17 β -estradiol	2,1 nM (0,6 μ g/L)	10 min	Oui	Eau usée	[93]
	Ampicilline	5,7 nM (2 μ g/L)	2h	Oui	Lait	[88]
	BPA	1,86 nM (0,4 ng/L)	10 min	Oui	Eau de surface	[94]
		1 pM (0,2 ng/L)	n.p.	Oui	Non	[113]
		0,4 pM (0,09 ng/L)	5 min	Oui	Urine	[91]
Chimiluminescence	Aflatoxine B1	44 nM (13,7 μ g/L)	15 min	Oui	Maïs	[98]
	Salmonelle	10 ⁴ cfu/mL	19h	Oui	Eau potable	[99]
Détection électrochimique						
Voltampérométrie	Tétracycline	10 nM (4,4 μ g/L)	30 min	Oui	Non	[100]
	MC-LR	1,9 pM (1,9 ng/L)	45 min	Non	Eau potable	[101]
Impédance	MC-LR	18 pM (17,9 ng/L)	4h	Oui	Eau de surface, eau potable	[102]
	Diclofénac	0,27 μ M (79 μ g/L)	2h	Oui	Sérum	[103]
Autres techniques spectroscopiques						
Resonance scattering	As ³⁺	10,2 nM (0,7 μ g/L)	1h05	Non	Non	[105]
	Hg ²⁺	0,17 nM (34 ng/L)	15 min	Oui	Eau usée	[114]
		1,7 nM (0,34 μ g/L)	5 min	Non	Non	[106]
	Pb ²⁺	0,9 nM (0,2 μ g/L)	40 min	Non	Non	[107]

SERS	Hg ²⁺	1 pM (0,2 ng/L)	30 min	Oui	Non	[111]
		10pM (2 ng/L)	40 min	Oui	Non	[109]
	BPA	10 fM (2 pg/L)	40 min	Oui	Eau potable	[110]

On observe que différentes méthodes d'analyse utilisant des aptamères ont été développées pour des cibles variées, de l'ion à la cellule (salmonelle). Ces méthodes permettent en général une analyse rapide, en quelque dizaines de minutes voire en quelques minutes pour les plus rapides, contre plusieurs heures pour les méthodes classiques.

Le Tableau 8 compare les sensibilités des méthodes étudiées avec les normes définissant la quantité à ne pas dépasser pour avoir une eau de qualité (NQE : normes de qualité environnementales) définies par l'UE ou avec les recommandations émises par l'OMS pour limiter les risques liés à ces composés. Dans pratiquement tous les cas, à l'exception de l'aflatoxine B1, au moins une des méthodes étudiées a une LOD inférieure aux exigences environnementales, démontrant l'intérêt des aptamères pour réaliser des biocapteurs pour l'analyse sur le terrain.

Tableau 8 : Comparaison des LOD des méthodes étudiées avec les normes ou recommandations environnementales émises par l'Union européenne ou l'OMS. ¹Il n'existe pas de norme pour ce composé, mais une concentration en-dessous de laquelle il n'est pas jugé toxique dans l'eau (PNEC, *predicted no-effect concentration*) a été définie.

Composé	LOD des méthodes analytiques étudiées utilisant des aptamères	Norme ou recommandation environnementale (µg/L) [référence]
Hg ²⁺	0,2 ng/L – 40 µg/L	0,07 [4]
Pb ²⁺	0,2 µg/L	1,3 [4]
As ³⁺	0,6 – 5,3 µg/L	10 [115]
Bisphénol A	2 pg/L – 45 ng/L	1,6 ¹ [116]
Aflatoxine B1	13 µg/L	2 [117]
Microcystine-LR	1,9 – 17,9 ng/L	1 [115]

De plus la compatibilité de ces méthodes avec une analyse dans des échantillons environnementaux réels a été vérifiée dans de nombreux cas avec diverses matrices comme de l'eau potable ou de l'eau usée sans prétraitement important : l'eau potable n'a subi aucun traitement et les eaux de surface ou les eaux usées ont simplement été filtrées pour enlever les particules présentes dans l'échantillon. La sélectivité et l'affinité des aptamères pour leur cible permettent donc de s'affranchir d'une étape de prétraitement importante comme une extraction sur phase solide, indispensable dans des méthodes d'analyses classiques pour atteindre une sensibilité satisfaisante.

En comparant les limites de détection obtenues par différentes méthodes pour une même cible, on peut comparer la sensibilité des différentes méthodes. Dans le cas de l'ion Hg^{2+} ou du BPA, pour lesquelles beaucoup de méthodes différentes ont été développées, on observe que les tests basés sur une détection par SERS présentent une meilleure sensibilité que les tests avec une détection par fluorescence ou colorimétrie. Cependant, peu de ces méthodes ont été validées en échantillons réels et elles nécessitent une modification de l'aptamère qui augmente les coûts et dont l'impact sur l'affinité doit être vérifié [97]. C'est également le cas des méthodes basées sur la fluorescence, dans lesquelles il est bien souvent nécessaire de marquer l'aptamère avec un fluorophore même si l'utilisation de rapporteurs de fluorescence (oxydes de graphène ou fluorophore) peut permettre d'éviter ce marquage. Les techniques de colorimétrie quant à elles ne nécessitent généralement pas de marquage, mais sont basées sur une interaction aptamère/nanoparticule qui doit être optimisée et qui a un impact sur la sensibilité. Par exemple, dans le cas de l'ion Hg^{2+} , on observe une variation de la sensibilité allant jusqu'à 3 ordres de grandeur pour des méthodes utilisant la même détection et les mêmes aptamères.

2.5 Conclusion

Les aptamères peuvent être utilisés pour le développement de différentes méthodes analytiques rapides et sensibles permettant la détection de polluants dans des échantillons réels sans étapes d'extraction ou de préconcentration, démontrant leur intérêt pour le développement de nouvelles méthodes d'analyse environnementale. Ils présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps, traditionnellement utilisés dans les biocapteurs : leur production est uniquement chimique et ils présentent une plus grande

stabilité thermique. Le développement de biocapteurs utilisant ces aptamères, ainsi que leur intégration dans des systèmes miniaturisés d'analyse totale (μ TAS), décrits dans le chapitre suivant, permettrait de développer des systèmes de détection et de quantification portables, utilisables sur site, stables et à coût réduits essentiels pour le contrôle des polluants dans l'environnement. Des aptamères ont été sélectionnés pour les composés pharmaceutiques considérés comme polluants émergents (diclofénac, 17β -estradiol), permettant le développement d'aptacapteurs miniaturisés pour l'analyse sur site de ces composés.

3 Systèmes microfluidiques : principes généraux et application à l'analyse environnementale

Depuis plusieurs années, l'analyse sur site représente un enjeu majeur de la chimie analytique. L'objectif est d'analyser directement sur place un échantillon recueilli sur le terrain et de pouvoir identifier (et idéalement quantifier) rapidement des composés issus d'un mélange complexe, comme par exemple des polluants dans l'eau [118]. Pour satisfaire cet objectif, les systèmes développés doivent être portables, simples d'utilisation, jetables ou réutilisables facilement, pour une utilisation optimale sur le terrain [119].

Les microsystèmes peuvent satisfaire ces critères. Un microsystème est une structure d'une dizaine de cm^2 comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont généralement de l'ordre de quelques micromètres ou dizaines de micromètres, au sein desquels ont lieu les différentes étapes de l'analyse, de l'injection à la détection.

Ces systèmes offrent la possibilité de réaliser des analyses dans des délais très courts, en consommant de faibles quantités d'échantillon. La diminution des quantités de réactif permet de mettre en œuvre des réactions spécifiques tout en maintenant des coûts d'analyse relativement bas. Les faibles volumes utilisés permettent également de réduire les déchets. Un des objectifs de ces systèmes analytiques miniaturisés est d'intégrer toutes les étapes de la chaîne analytique, du prétraitement de l'échantillon à la détection des analytes, dans un volume réduit, de manière entièrement automatisée. Avec ces « laboratoires sur puce » (en anglais *lab on a chip*) la manipulation humaine entre les différentes étapes de l'analyse est limitée ce qui permet d'éviter les erreurs. De plus, la possibilité d'utiliser des matériaux peu chers pour la fabrication des microsystèmes permet de réduire les coûts de fabrication et leur procure un caractère jetable.

La conservation de la sensibilité et de la fiabilité lors de la miniaturisation des étapes d'analyse sont des problématiques essentielles des systèmes microfluidiques. De plus, comme le but est de pouvoir analyser des échantillons réels sur site avec des étapes de prétraitements limitées, la sensibilité et la sélectivité des microsystèmes doivent être

évaluées sur des échantillons réels, ou du moins dans des conditions mimant des échantillons réels.

Dans cette partie, les stratégies utilisées pour le développement de microsystèmes dédiés à l'analyse environnementale sont présentées, en particulier les systèmes dont les performances analytiques ont été testées sur des échantillons réels. Ces stratégies sont basées sur des séparations électrocinétiques ou sur l'utilisation d'anticorps pour capter la cible d'intérêt après une éventuelle étape de prétraitement en ligne, couplées à une détection optique ou électrochimique. Bien que des techniques de chromatographie en microsystèmes existent [120-122], aucun système de ce type n'a été utilisé dans le contexte de l'analyse environnementale à notre connaissance, nous ne les développerons donc pas dans cette section.

3.1 Mise en mouvement des fluides en microsystèmes

La mise en mouvement des fluides dans les systèmes microfluidique nécessite des systèmes dédiés, pouvant générer des flux et les contrôler précisément à l'échelle du nanolitre. Trois modes de mise en mouvement des fluides à l'intérieur des microsystèmes sont utilisés :

- L'écoulement électroosmotique
- L'écoulement hydrodynamique généré par pression
- L'écoulement hydrodynamique généré par centrifugation

3.1.1 Injection sous champ électrique

L'utilisation d'un champ électrique appliqué aux extrémités des canaux des microsystèmes est actuellement le moyen le plus simple à mettre en œuvre pour miniaturiser toutes les étapes nécessaires à l'analyse. La mise en mouvement des espèces est alors due aux écoulements électroosmotique et électrocinétique qui se mettent en place dans les canaux. Le champ électrique est délivré par des électrodes immergées dans les puits à l'extrémité des canaux, reliées à un générateur de tension.

L'utilisation de cette méthode facilite la miniaturisation des systèmes, contrairement aux systèmes de pompes pour les écoulements hydrodynamiques. De plus, les écoulements électrocinétiques ont un profil de vitesse plat, ce qui limite la dispersion des solutés dans les

microcanaux (Figure 37.A). Enfin, il est possible de contrôler les écoulements par un simple changement des tensions ou de leur point d'application, ce qui permet d'éviter d'avoir recours à des systèmes de valves. Il faut néanmoins faire attention à assurer la sécurité du manipulateur, les tensions appliquées allant jusqu'à plusieurs milliers de volts. L'application d'un champ électrique aux bornes du système permet également de faire de l'électrophorèse sur puce (voir chapitre 3.2.3).

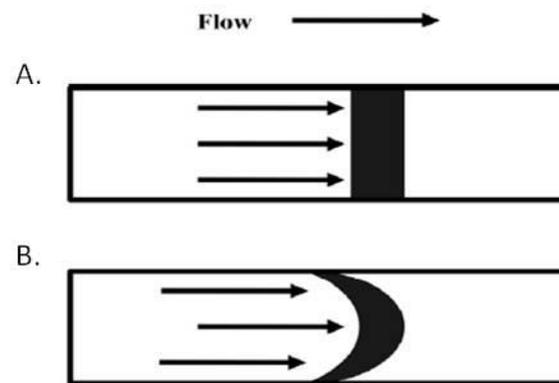


Figure 37 : Profils d'écoulement dans un canal. A : sous champ électrique, B : sous pression [123]

3.1.2 Injection hydrodynamique

La mise en mouvement des liquides par l'application d'une pression générée par des pompes mécaniques est très utilisée dans les applications microfluidiques. Le système de pompage constitue une composante instrumentale essentielle des microsystèmes à écoulement hydrodynamique. Dans de nombreux cas, il est composé d'un jeu de pompes classiques externes qui sont connectées à la puce microfluidique par l'intermédiaire d'un diviseur de débit [124-126], ce qui entraîne une consommation de solvants importante et est contradictoire avec le concept de microfluidique. Des systèmes de micropompes ont donc été développés, capables de délivrer des débits de l'ordre du nanolitre par minute, tout en conservant des gammes de pression de quelques centaines de bars, nécessaires dans des applications telles que la chromatographie liquide sur puce [127, 128].

La principale limitation de la mise en mouvement des fluides par pression réside dans l'appareillage nécessaire, difficilement miniaturisable et transportable. De plus, le profil de

vitesse parabolique de l'écoulement hydrodynamique favorise la dispersion des solutés dans les microcanaux (Figure 37.B).

3.1.3 Injection par centrifugation

La force centrifuge a été utilisée pour mettre en mouvement des liquides dès les années 60 [129]. Cette technique est très présente dans les systèmes macroscopiques de séparation sanguine, et est une option intéressante pour les systèmes microfluidiques. Des microsystemes sous forme de disques sont placés sur un rotor, et leur mise en rotation permet de distribuer les fluides dans les différents canaux du système. La vitesse des fluides dans le microsysteme dépend de la vitesse de rotation et de la résistance hydrodynamique. Des débits allant de quelques nL/s à quelques mL/s peuvent être générés par cette technique.

Ces systèmes sont très développés dans le domaine médical [130, 131] qui utilisait déjà des systèmes macroscopiques basés sur la centrifugation. Quelques exemples de microsystemes à centrifugation existent pour l'analyse environnementale. Par exemple, un système de ce type a été développé pour la détection de nitrite par la méthode de Griess et pour la détection de chrome à l'aide d'une réaction avec le diphénylcarbazide [132]. Les réactifs nécessaires sont introduits dans le système sous forme de poudre avant d'assembler les deux moitiés du disque (Figure 38), ce qui rend les systèmes non réutilisables. L'échantillon en solution est introduit dans le microsysteme et la force centrifuge permet de le faire passer dans les chambres contenant les réactifs. La présence des cibles est alors détectée et quantifiée par colorimétrie.

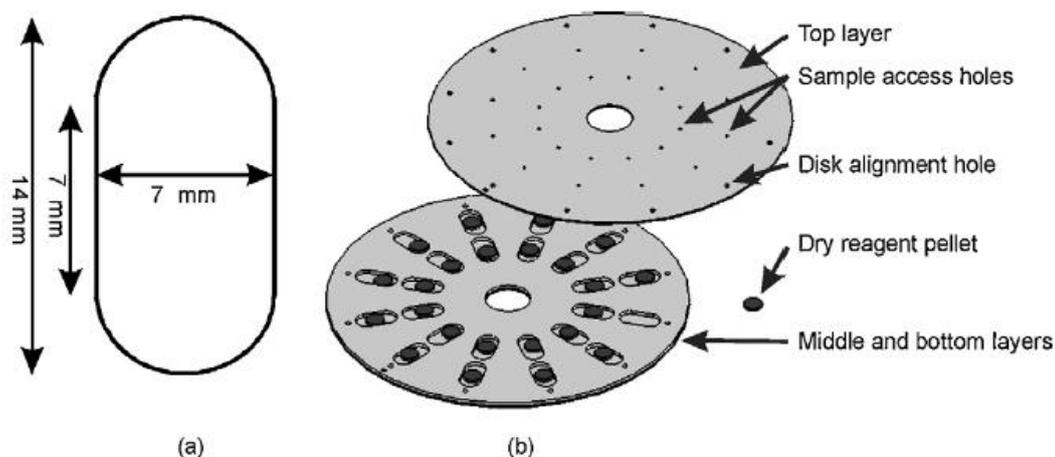


Figure 38 : Représentation schématique du système à injection par centrifugation pour la détection de nitrite par colorimétrie. (a) Compartiment dans lequel est introduit le réactif sous forme de poudre. (b) Schéma du microsystème complet. [132]

3.2 Intégration des différentes étapes d'analyse

Le système microfluidique idéal doit pouvoir intégrer toutes les étapes de l'analyse, de la préparation de l'échantillon à la détection. Il doit permettre de détecter des traces de composés dans des échantillons complexes tels que l'eau d'une rivière ou le sang d'un patient. En analyse environnementale, le système idéal devrait être autonome pour être installé sur le terrain pour une surveillance en continu, et faire des analyses sans intervention de l'expérimentateur.

3.2.1 Prétraitement de l'échantillon

Pour pouvoir analyser directement des polluants en faible quantité dans des échantillons réels complexes, tels que l'eau d'une rivière, des étapes d'extraction et de préconcentration du composé d'intérêt sont nécessaires. Plusieurs stratégies de préconcentrations hors ligne ont été développées pour les systèmes d'analyse classiques, qu'il faudrait pouvoir intégrer au sein du microsystème. Plusieurs méthodes ont été mises au point pour répondre à cette problématique, essentielle pour obtenir des systèmes miniaturisés assez sensibles pour être utilisés directement avec des échantillons réels. Les méthodes de préconcentration peuvent être classées en deux grandes catégories : les méthodes d'extraction et les méthodes électrocinétiques.

3.2.1.1 Méthodes d'extraction

L'extraction liquide/liquide (LLE) est très utilisée dans les techniques classiques de prétraitement d'échantillon. Les propriétés des flux en microcanaux permettent de transposer cette technique dans les microsystèmes. En effet les rapports surface/volume importants, les distances de diffusion courtes ainsi que les flux laminaires permettent de mettre en œuvre la LLE sans avoir besoin d'agiter ou de mélanger les phases.

L'équipe de Kitamori a développé plusieurs systèmes dans lesquels le solvant organique d'extraction et l'échantillon s'écoulent en parallèle au sein d'un même microcanal, grâce aux propriétés laminaires des flux à l'échelle micrométrique. L'extraction est réalisée plus rapidement et avec moins de solvant, mais l'efficacité d'extraction est plus faible qu'en utilisant une méthode conventionnelle (26 à 31% pour la LLE en microsystème contre 97 à 106% pour la méthode classique) [133]. De plus, la LLE est utilisable uniquement dans le cas où les flux sont mis en mouvement par pression, car il est très difficile d'induire un flux électroosmotique dans certains solvants organiques, essentiels à la LLE.

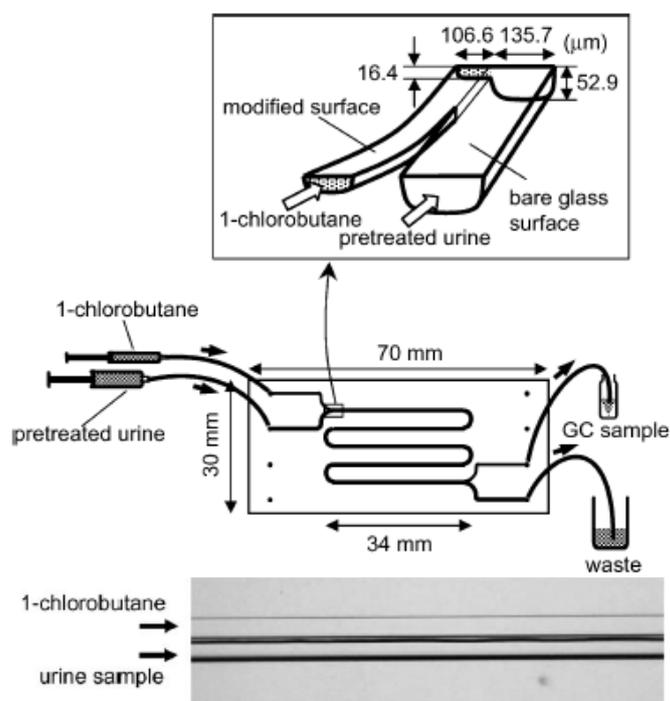


Figure 39 : (A) Schéma du système de LLE en microcanal comprenant deux entrées : une pour l'échantillon d'urine et une pour le solvant d'extraction (B) Photo du canal dans lequel on distingue les 2 flux laminaires de l'échantillon et du solvant. [133]

L'extraction sur phase solide (SPE) est également transposable en microsystèmes. Trois approches existent pour introduire une phase stationnaire en microsysteme : la fonctionnalisation des parois du canal, le remplissage du microcanal avec une phase particulaire, et la formation d'un monolithe *in situ*.

La première méthode a été envisagée comme un moyen de contourner la difficulté d'immobilisation des phases particulaires dans un microcanal. Un des premiers exemples de SPE dans un canal microfluidique reposait sur cette approche [134]. Les parois d'un canal en verre ont été fonctionnalisées par réaction avec l'octadécyltriméthoxysilane, créant une phase en C18 sur la paroi du canal. La preuve de concept a été effectuée avec la coumarine, un fluorophore neutre, qui a été enrichi plus de 80 fois en 4 minutes grâce au microcanal fonctionnalisé (Figure 40).

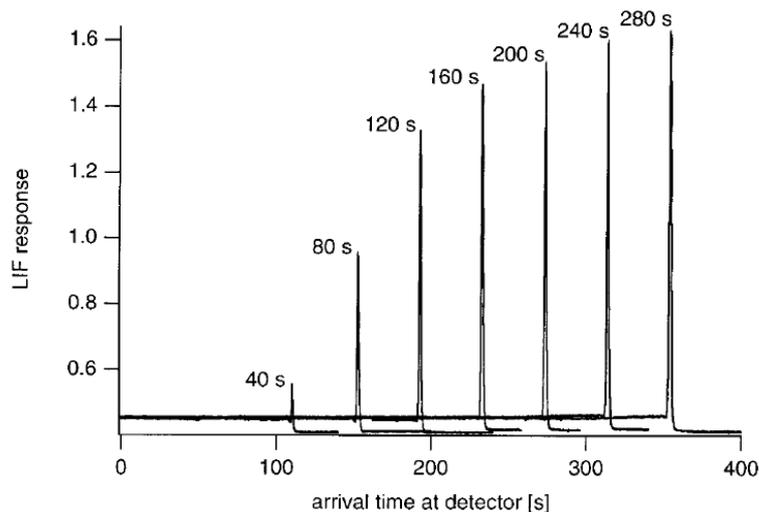


Figure 40 : Détection de coumarine par fluorescence après enrichissement dans un microcanal fonctionnalisé C18 pendant des périodes croissantes [134]

Le problème avec cette approche est que le rapport surface fonctionnalisée/volume est faible, ce qui peut limiter le rendement d'extraction et de préconcentration. Des structures au design spécifique, comme les structures COMOSS, peuvent être introduites dans le canal pour augmenter le rapport surface/volume [135], mais ces structures compliquent fortement la fabrication des microsystèmes (Figure 41).

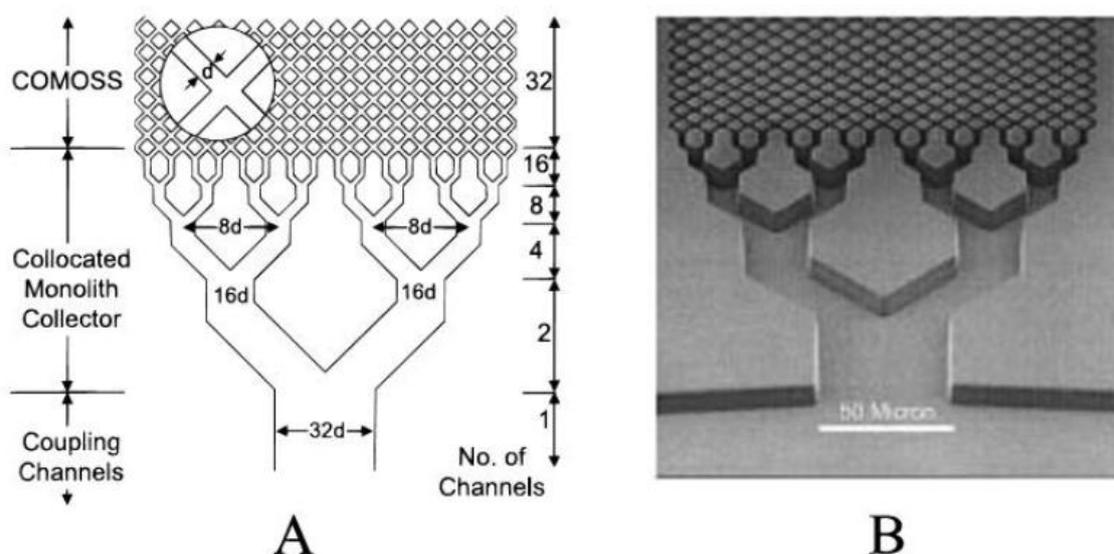


Figure 41 : Structures COMOSS dans un canal en quartz. (A) Schéma du réseau de microcanaux composant la structure COMOSS. d : la largeur du plus petit canal. (B) Image de la structure en microscopie électronique à balayage. [135]

Un autre moyen d'augmenter le rapport surface/volume est de remplir le microcanal avec une phase stationnaire particulière. La difficulté consiste à construire des frittés ou autres barrages physiques pour contenir la phase stationnaire [136].

Une méthode alternative consiste à utiliser une phase stationnaire constituée de particules magnétiques, piégées par un aimant [137]. Des nanoparticules d'oxyde de fer magnétiques ont été fonctionnalisées par des silanes d'octadécyle et piégées dans une zone d'extraction à l'intérieur d'un microcanal en PMMA. Les cibles sont piégées par la phase stationnaire, puis éluées, séparées par électrophorèse et enfin détectées par fluorescence, au sein du même canal. La preuve de concept a été effectuée avec la séparation de deux fluorophores, la rhodamine B et la sulforhodamine B. La même méthode a été utilisée en capillaire pour l'extraction d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) dans des échantillons aqueux, avec une efficacité d'extraction allant de 56 à 97%, similaire à la même méthode utilisée hors ligne, démontrant l'intérêt de cette stratégie d'extraction pour l'analyse environnementale. De plus, cette stratégie de préconcentration a été appliquée avec succès dans un microsystème pour le diagnostic d'allergies (facteur de préconcentration = 35 000), démontrant la possibilité de l'utiliser en microsystèmes pour différents types de cibles [138]. De plus, le développement de microaimants (quelques centaines de μm) intégrés dans les

micropuces peut permettre de créer des zones de préconcentration mieux définies qu'en utilisant des aimants externes [139].

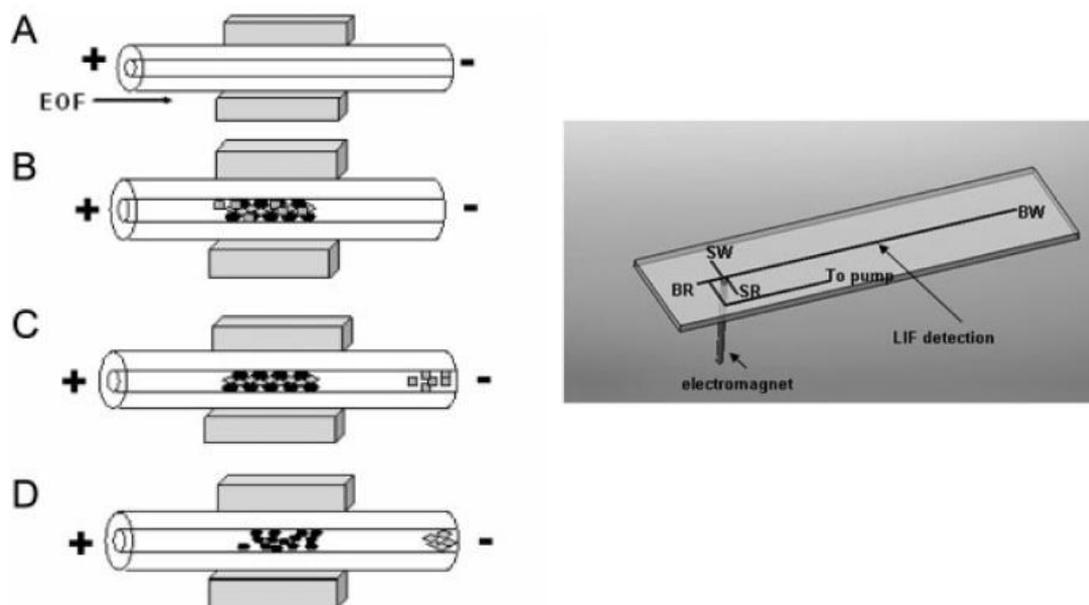


Figure 42 : Immobilisation de billes magnétiques pour la préconcentration de NSAIDs en canal et en microsysteme [137]

Une autre approche pour introduire une phase stationnaire dans un canal consiste à polymériser un monolithe *in situ*. Les monomères et les différents réactifs sont introduits dans le microcanal puis la polymérisation est initiée par irradiation UV le plus souvent. Au début des années 2000, l'équipe de Fréchet a synthétisé par photopolymérisation des monolithes à partir de différents monomères méthacrylates, dans des microsystemes en verre [140]. Les monolithes contenaient des fonctions ionisables et hydrophobes, permettant la rétention de différents types de composés. Le contrôle de la taille des pores permet de conserver des débits assez élevés (jusqu'à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Ces microsystemes ont permis de préconcentrer un térapeptide et la protéine fluorescente verte jusqu'à 1000 fois.

Cette technique a également été utilisée dans des canaux en polymères. La synthèse d'un monolithe de méthacrylate de butyle dans un canal en PDMS pour la préconcentration de prométhazine a permis de diminuer d'un ordre de grandeur la limite de détection de ce médicament [141]. D'autres monolithes ont été synthétisés dans des thermoplastiques [142, 143], notamment dans des canaux en COC pour réaliser de l'électrochromatographie en

canal [144], ce qui montre le grand intérêt actuel pour ce type de phase stationnaire, ainsi que sa compatibilité avec différents matériaux. Cependant, ces procédés restent assez peu reproductibles et les phases ainsi synthétisées ne sont pas toujours homogènes. De plus, l'ancrage du monolithe aux parois doit être maîtrisé pour garantir le rendement d'extraction.

3.2.1.2 Méthodes de préconcentration électrocinétiques

Des techniques de préconcentration électrocinétiques peuvent également être mises en œuvre. La préconcentration par amplification du champ électrique (FASS) [145, 146] consiste à introduire l'échantillon par injection électrocinétique dans un micro-canal rempli d'un électrolyte de séparation de plus forte conductivité que l'échantillon. Le champ électrique régnant dans une zone étant inversement proportionnel à sa conductivité, les analytes migrent donc rapidement dans la zone échantillon de haut champ électrique et sont ensuite fortement ralentis lorsqu'ils pénètrent dans l'électrolyte de séparation où règne un champ électrique plus faible. A la fin du processus, les analytes sont concentrés dans une zone étroite à la frontière entre la zone injectée et l'électrolyte. Cette technique est très utilisée en microsysteme pour les séparations par électrophorèse comme en atteste l'excellente revue de Giordano [147], permettant ainsi d'augmenter fortement la sensibilité.

Litchenberg *et al.* ont été parmi les premiers à étudier le FASS dans des microsystemes [148]. Ils ont testé plusieurs géométries de microsystemes pour déterminer la plus adaptée à la mise en œuvre d'une étape de FASS, permettant d'obtenir les meilleures limites de détection après séparation par électrophorèse. Avec le design optimisé, les auteurs ont amélioré la préconcentration de deux acides aminés (arginine et glycine) de 65 fois et ont atteint des LOD de l'ordre de la centaine de pM.

Plus récemment, Noh *et al.* ont combiné les techniques de préconcentration électrocinétique à un électrolyte support contenant des nanoparticules d'or [149]. Les analytes interagissent avec les nanoparticules, ce qui modifie leur mobilité électrophorétique ainsi que la mobilité électroosmotique. Le microsysteme optimisé a permis d'augmenter de 200 fois la sensibilité par rapport au même système sans préconcentration. Cette méthode a permis de détecter et quantifier 5 perturbateurs endocriniens dans de l'eau de rivière et l'eau potable, avec des limites de détection de l'ordre du fM (Figure 43).

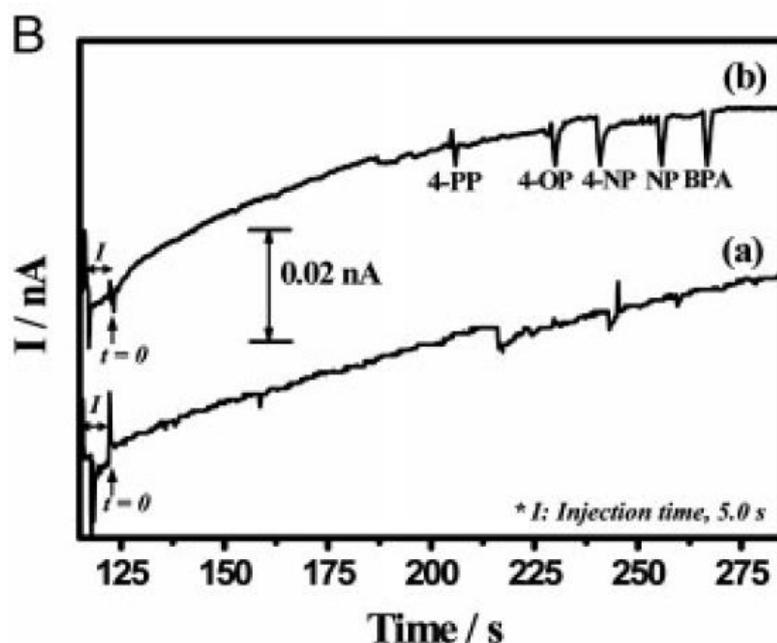


Figure 43 : Electrophérogramme montrant la séparation de 5 perturbateurs endocriniens par électrophorèse après une préconcentration électrocinétique (a) en absence ou (b) en présence de nanoparticules d'or dans l'électrolyte [149].

3.2.2 Mélange des réactifs

Plusieurs méthodes d'analyse sont basées sur le mélange de l'échantillon avec différents réactifs afin d'obtenir un signal mesurable (colorimétrie, fluorescence...). Si ces mélanges sont simples à mettre en œuvre à l'échelle macroscopique, ce n'est pas le cas en microfluidique. En effet, à l'échelle micrométrique, les phénomènes physiques ne sont pas les mêmes qu'à l'échelle macroscopique. Certains phénomènes négligeables à l'échelle macroscopique, comme la capillarité, deviennent prépondérants en microsystèmes. A l'inverse, des forces régissant les phénomènes macroscopiques, telles que la gravité, deviennent négligeables. Afin de mieux appréhender les phénomènes s'appliquant aux systèmes microfluidiques, plusieurs grandeurs sans dimension ont été introduites. Le nombre de Reynolds (Re), qui caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité, est la grandeur la plus répandue [150]. Il est défini par l'équation suivante :

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu}$$

Avec :

- ρ la masse volumique du fluide (kg.m^{-3}) ;
- L la taille caractéristique du système (m) ;
- V la vitesse du fluide (m.s^{-1}) ;
- μ la viscosité dynamique du fluide ($\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$) ;

En microfluidique, la faible dimension caractéristique et les vitesses relativement faibles entraînent une forte diminution du nombre de Reynolds. Les valeurs de Re faibles montrent que les forces de viscosité prennent le dessus sur les forces d'inertie, ce qui résulte en des flux laminaires.

Les caractéristiques des écoulements sont à prendre en compte lors du design des systèmes microfluidiques, notamment lorsque l'on souhaite mélanger des réactifs présents dans deux fluides différents. En effet, en régime d'écoulement laminaire, seule la diffusion assure le transport des espèces. Des conceptions spécifiques doivent donc être utilisées pour assurer un mélange suffisant des différents réactifs.

Une première approche pour assurer le mélange des réactifs consiste à utiliser un canal assez long pour que la diffusion suffise au mélange. Ces canaux sont en général en forme de serpent, pour avoir un canal d'une longueur suffisante sans trop augmenter la taille du microsystème.

Cette approche a par exemple été utilisée pour la détection de nitrite dans un microsystème en PMMA [151]. La méthode de Griess, « gold standard » pour la détection de nitrite a été transposée en microsystème. Cette méthode nécessite de faire réagir l'échantillon avec le réactif de Griess (acide sulfanilique et alpha-naphthylamine) ce qui donne un composé rouge. Le microsystème est composé de trois parties : une zone d'injection, un canal en serpent assurant le mélange des réactifs et une zone de détection par colorimétrie (Figure 44).

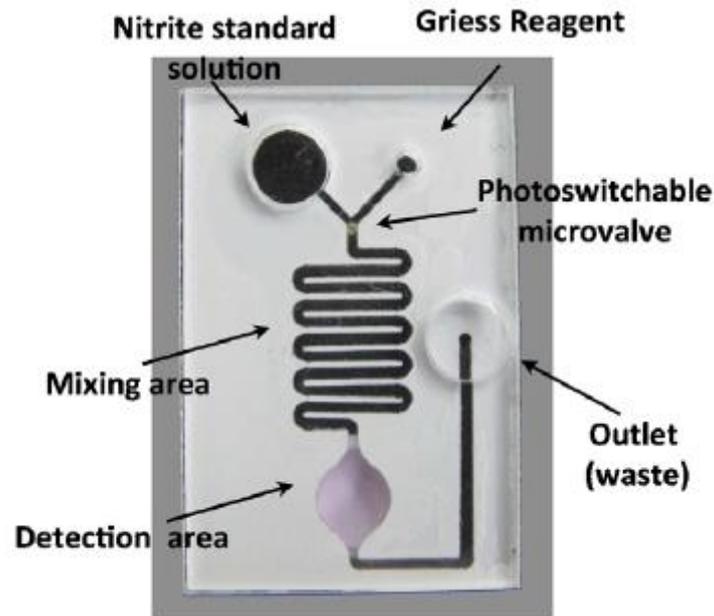


Figure 44 : Photo du microsystème pour la détection de nitrites utilisant un canal en serpentin pour optimiser le mélange des réactifs [151]

Une autre approche consiste à créer des structures spécifiques dans le microcanal pour créer des turbulences pour améliorer le mélange. Par exemple, des structures en « dents d'alligator » ont été créées dans un microcanal en PDMS pour la détection de cyanure par SERS [152]. D'autres types de structures en chevrons ont également été utilisées dans un canal en PDMS, pour la détection de cyanure par fluorescence [153] (Figure 45).

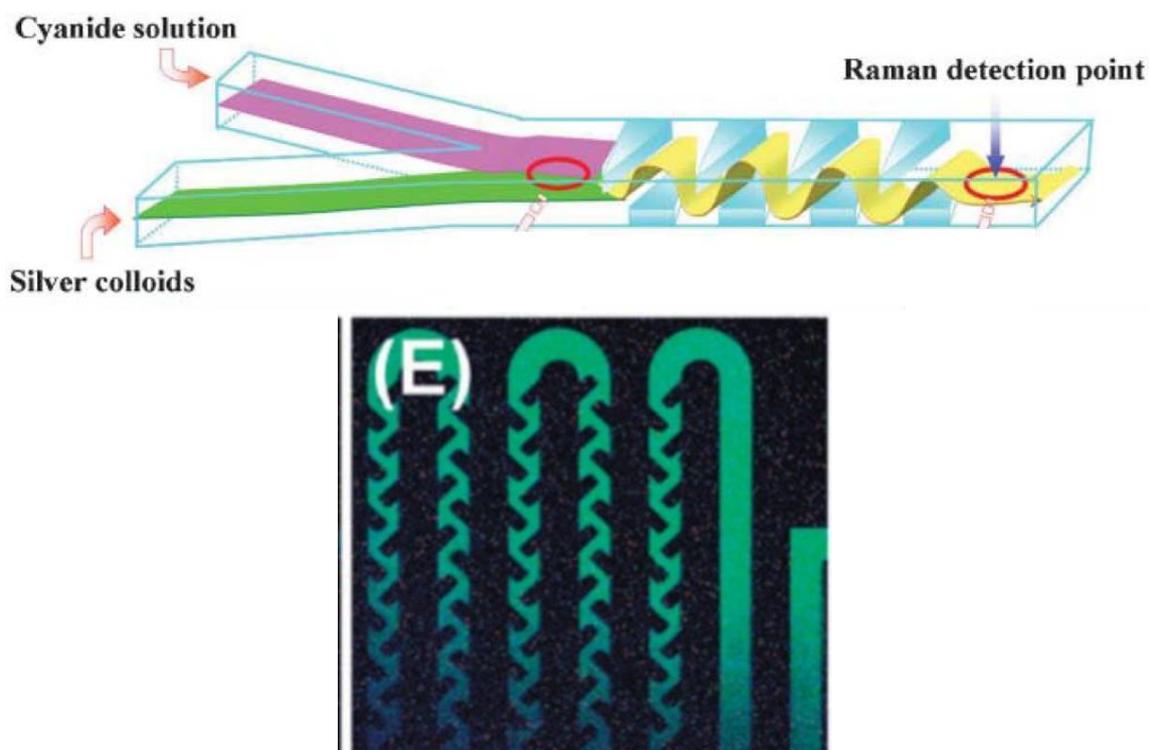


Figure 45 : Exemples de structures permettant d'optimiser le mélange des flux. Haut : structure en « dents d'alligator » [152]. Bas : structure intégrant des chevrons [153].

3.2.3 Electrophorèse sur puce

Les séparations électrocinétiques en microsystèmes ont été très développées, comme en témoignent plusieurs revues [154-157]. Dans le domaine de l'environnement et plus particulièrement pour l'analyse des eaux, des séparations ont été effectuées par électrophorèse de zone (CZE), chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) ou isotachophorèse (ITP).

L'électrophorèse de zone (CZE) est la technique la plus utilisée et la plus simple à transposer aux microsystèmes. Les espèces chargées sont séparées grâce à l'application d'un champ électrique aux bornes du microcanal. La vitesse apparente des espèces est alors la somme de la vitesse électrophorétique de l'espèce et de la vitesse électroosmotique du milieu.

Plusieurs équipes ont développé des microsystèmes électrocinétiques pour l'analyse environnementale. Par exemple, la séparation et la détection de 5 amines aromatiques, une classe importante de polluants toxiques et cancérigènes, a été effectuée dans un canal en

verre, avec une détection par ampérométrie (Figure 46) [158]. L'utilisation de l'électrophorèse sur puce a permis de détecter rapidement les composés (en 2 minutes) avec des limites de détection entre 0,46 et 1,44 μM . La compatibilité du système pour l'analyse d'échantillons réels a été démontrée avec l'analyse d'échantillons d'eau de rivière non prétraités et dopés avec les composés à détecter. La même méthode a été appliquée avec succès à la séparation de trois composés phénoliques dans de l'eau potable non prétraitée dans un microsystème en PDMS, avec des limites de détection entre 0,87 μM et 2,25 μM [159].

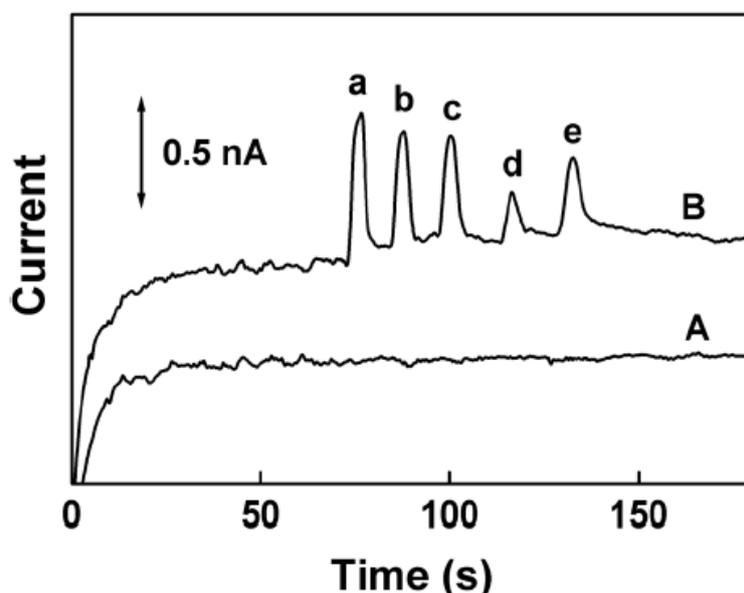


Figure 46 : Electrophérogramme d'un échantillon d'eau de rivière avant (A) et après (B) ajout de 5 μM de 1,4-phenyldiamine (a), aniline (b), 2-méthylaniline (c), 4-chloroaniline (d), et 1-naphtylamine (e). [158]

L'isotachophorèse (ITP) est également un moyen de séparer les analytes chargés en microsystèmes. Cette technique consiste à remplir le canal d'un électrolyte contenant un ion ayant une mobilité supérieure à tous les composés à séparer (électrolyte meneur), à injecter l'échantillon puis à remplir l'entrée du canal avec un électrolyte contenant un ion de mobilité inférieure à celle des composés à séparer (électrolyte terminal). A l'application du champ électrique de séparation, les composés vont s'organiser en bandes dans l'ordre de mobilité décroissante entre l'électrolyte meneur et l'électrolyte terminal. Cette technique a

été utilisée pour l'analyse des anions Br^- , I^- et Cl^- dans un microsystème en PMMA en moins de 10 minutes, avec une détection par conductivité (Figure 47). Le système a été appliqué avec succès à l'analyse de Cl^- dans de l'eau minérale sans prétraitement, les concentrations mesurées étant en accord avec les informations fournies par les fabricants [160].

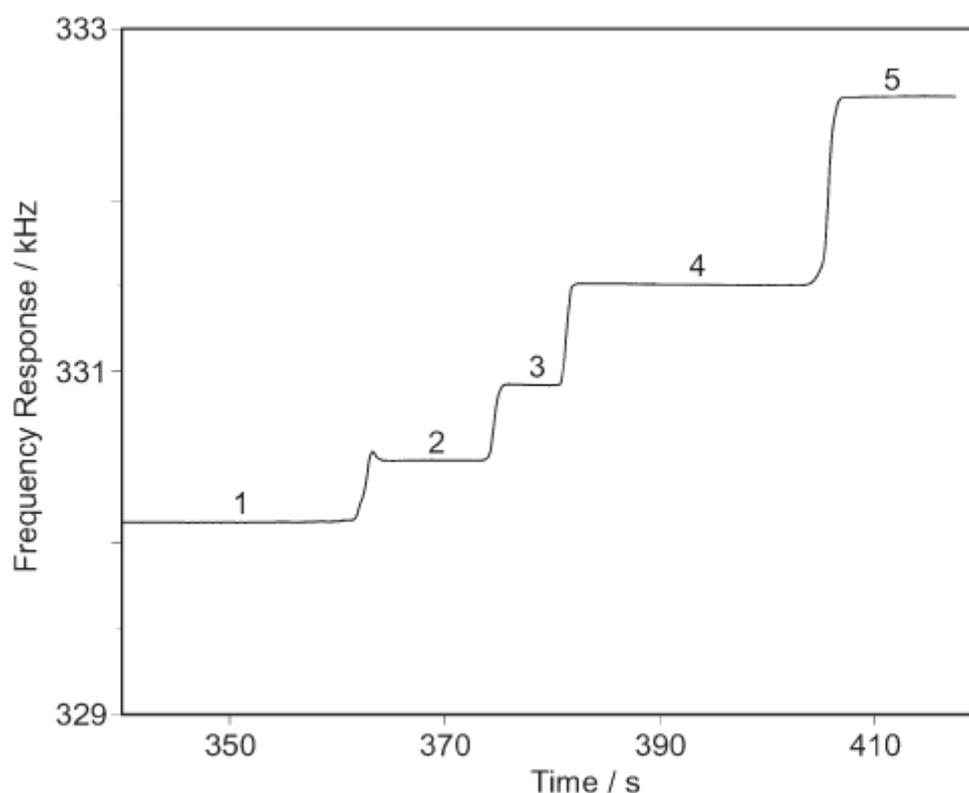


Figure 47 : Isotachophérogramme de la séparation de trois ions halogénure. 1 : électrolyte meneur (nitrate 12 mM, pH 3,0), 2 : iodure, 3 : bromure, 4 : chlorure, 5 : électrolyte terminal (cyanoacétate 20mM, pH 2,2). [160]

Pour séparer des composés neutres, il est nécessaire de faire varier la vitesse des espèces, il faut donc créer des interactions pendant la séparation. En chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) l'ajout de tensioactif formant des micelles dans l'électrolyte support permet de séparer des espèces neutres grâce à leur distribution différente entre les micelles et le milieu aqueux.

Cette technique de MEKC a été utilisée pour la séparation de différents perturbateurs endocriniens dans un canal en verre [161]. La détection par UV mise en œuvre permet d'atteindre des limites de détection de 5,6 à 20 mg/L, trop élevées pour des applications

dans des échantillons réels sans préconcentration préalable, les composés étant en général présents à des concentrations maximales de l'ordre du $\mu\text{g/L}$.

3.2.4 Immunocapteurs sur puce

Les immunocapteurs utilisent des anticorps pour détecter et quantifier des composés d'intérêt. Ils sont très utilisés pour les systèmes de diagnostic, dans des domaines variés comme la sécurité alimentaire, le domaine médical ou la surveillance de l'environnement. De nombreux efforts ont été faits ces dernières années pour transposer les immunocapteurs au format microfluidique [162].

Pour développer ces immunocapteurs microfluidiques, il est nécessaire d'immobiliser soit l'anticorps soit un dérivé de la cible à l'intérieur du microcanal. La détection se fait alors en format compétitif. Dans le cas où la cible est immobilisée à l'intérieur du microcanal, les anticorps (marqués par une molécule permettant la détection) sont incubés avec l'échantillon, puis l'échantillon contenant les anticorps est introduit dans le canal. Une compétition se met alors en place entre les cibles en solution et les cibles immobilisées. Les anticorps liés à la cible immobilisée sont ensuite détectés grâce à leur marquage, et le signal mesuré est inversement proportionnel à la concentration en cible dans l'échantillon. Dans le cas où l'anticorps est immobilisé, la compétition se met en place entre la cible et son dérivé marqué. Le signal détecté sera dû aux dérivés accrochés aux anticorps, et sera également inversement proportionnel à la concentration en cible dans l'échantillon testé.

Deux types de stratégies sont utilisées pour immobiliser les anticorps ou les dérivés des cibles dans les microcanaux : l'immobilisation sur les parois du canal ou l'immobilisation sur des microbilles.

Yakovleva *et al.* ont greffé des anticorps dans un microcanal en silicium pour effectuer la détection d'atrazine par chimiluminescence [163]. Les anticorps sont immobilisés grâce à des protéines adsorbées à la surface du silicium et l'utilisation d'un dérivé de l'atrazine marqué avec la peroxydase de raifort (HRP) permet d'obtenir un signal de luminescence lorsque du luminol est injecté dans le système (Figure 48). Cette méthode a été testée avec de l'eau de surface simplement filtrée, et permet d'obtenir une limite de détection de 6 ng/L, plus de 10 fois inférieure à la norme fixée par l'Union Européenne [4].

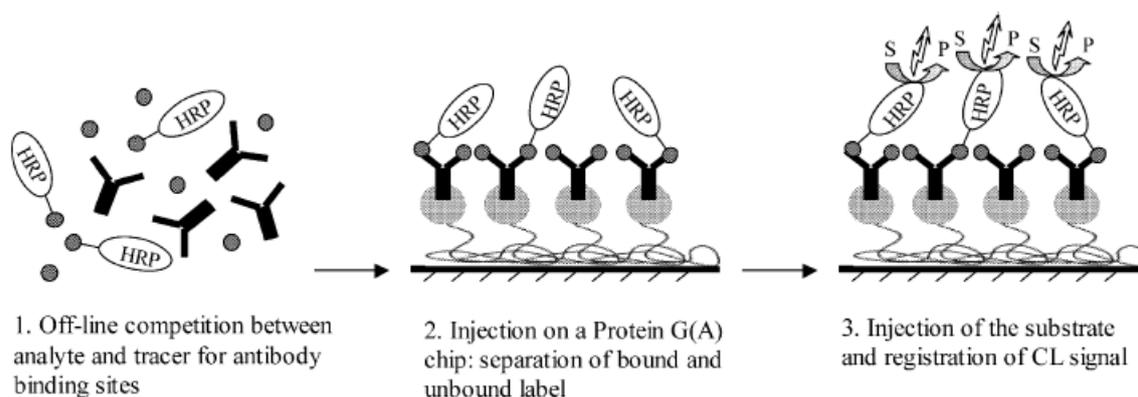


Figure 48 : Principe d'un immunocapteur en format compétitif, pour la détection d'atrazine par chimiluminescence [163].

D'autres groupes ont utilisé l'approche consistant à immobiliser un dérivé de la cible. Mauritz *et al.* ont modifié la surface d'un microcanal en verre avec une couche d'or, puis utilisé une mono couche auto-assemblée d'alcanethiols pour immobiliser des dérivés de 3 pesticides. La détection par résonance de plasmon de surface a permis l'analyse simultanée des 3 pesticides en 40 minutes avec des limites de détection allant de 18 à 5 ng/L, mais le système n'a pas été testé avec des échantillons réels [164]. Long *et al.* ont utilisé la microscopie de fluorescence à onde évanescente pour détecter et quantifier le bisphénol A (BPA) [165]. Le système est composé d'une puce en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) contenant une fibre optique sur laquelle sont immobilisés de façon covalente des dérivés du BPA, et les anticorps anti-BPA utilisés sont marqués avec un fluorophore permettant leur détection. Le système a permis de quantifier le BPA en 15 minutes (en incluant l'étape de régénération) dans de l'eau potable et du thé non prétraités, avec une limite de détection de 60 ng/L.

L'autre approche pour immobiliser des anticorps à l'intérieur d'un canal consiste à les immobiliser sur des billes magnétiques qui sont ensuite piégées par un aimant à l'intérieur du microcanal (Figure 49). Cette approche a été utilisée pour la détection de 17β -estradiol (E2) par électrochimie, en utilisant un microsystème en PMMA [166]. L'E2 présent dans l'échantillon entre en compétition avec une E2 marquée HRP pour les anticorps greffés à la surface des billes magnétiques. L'HRP catalyse l'oxydation du cathéchol, qui est ensuite réduit à l'électrode en sortie de canal. Les billes peuvent ensuite être éliminées du système pour le régénérer.

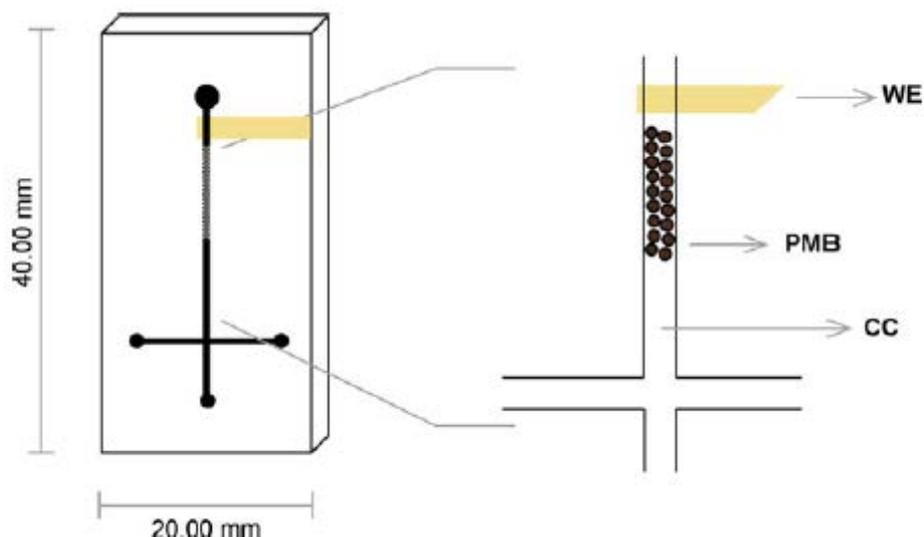


Figure 49 : Représentation schématique d'un immunocapteur microfluidique en PMMA utilisant des billes magnétiques pour immobiliser les anticorps. WE : électrode de travail en or, PMB : billes paramagnétiques, CC : canal central. [166]

3.2.5 Méthodes de détection en microcanal

Deux tendances dominent les méthodes de détection pour la microfluidique : le développement d'interface performante pour le couplage du système microfluidique à des instruments de détection classique et le développement de systèmes de détection intégrés à la puce microfluidique. C'est incontestablement la deuxième approche qui peut conduire à des systèmes plus compacts et aux coûts réduits. Cependant, ces systèmes de détection n'atteignent pas encore les performances de l'instrumentation classique. Deux types de détection dominent les systèmes pour l'analyse environnementale : la détection optique et la détection électrochimique.

3.2.5.1 Détection optique

La détection optique est très utilisée dans toutes les techniques analytiques. Cependant, les chemins optiques limités à cause des dimensions réduites des microcanaux (généralement entre 5 et 50 μm) impacte fortement la sensibilité. Malgré cet inconvénient, de nombreux groupes ont développé des méthodes pour la détection optique en microcanal [167].

Plusieurs systèmes utilisent une détection par colorimétrie. En général, la réaction du composé d'intérêt avec un réactif spécifique entraîne un changement de couleur de la

solution, qui peut être détecté à l'œil nu et quantifié par spectrométrie UV. Cette méthode de détection a par exemple été utilisée pour la détection de phosphore dans de l'eau de rivière, grâce à la formation d'un complexe de couleur jaune, avec une limite de détection de 0,2 ppm [168]. Le système, composé d'une couche de silicium entre deux couches de verre, contient une cuvette optique de 400 μm de profondeur traversant toute la couche de silicium, alors que le reste des canaux a une profondeur de 200 μm (Figure 50). Cette méthode de détection a également été utilisée pour l'analyse de nitrite par la réaction de Griess dans un microsystème en PMMA également doté d'une zone de détection plus profonde que le reste des canaux (1,8 mm au lieu de 50 μm) afin d'augmenter le chemin optique [151].

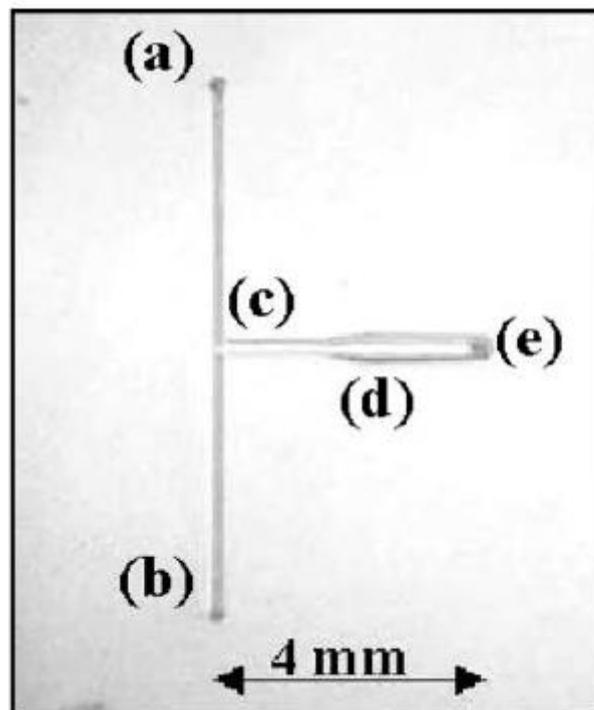


Figure 50 : Photographie d'une puce microfluidique contenant une cuvette pour la détection optique du phosphore. (a et b) puits d'entrée, (c) joint en T pour le mélange, (d) zone de détection de 400 μm , (e) sortie.[168]

La détection par fluorescence a également été utilisée en microsystèmes. Une première approche consiste à marquer les composés à analyser avec un fluorophore avant de les séparer et de les détecter. Cette approche a été utilisée pour la détection de carbones

organiques dissous qui sont des indicateurs de la pollution organique de l'eau [169]. Les auteurs ont marqué les molécules avec un fluorophore à l'aide d'une étape de dérivation hors ligne. Les composés sont ensuite séparés par électrophorèse sur puce avant d'être détectés par fluorescence.

La nécessité de marquer les cibles avec un fluorophore pour pouvoir les détecter directement est un des inconvénients majeurs des techniques de détection par fluorescence, particulièrement lorsque l'on veut développer des systèmes autonomes pour l'analyse sur site. Cependant, l'utilisation d'autres molécules fluorescentes comme intermédiaires pour la détection offre la possibilité de développer des méthodes de fluorescence sans marquage (*label free*). Par exemple, un microsystème a été développé pour la détection de cyanure utilisant un fluorophore et du cuivre [153]. Le cuivre a en effet des propriétés d'inhibition de fluorescence, ainsi que la capacité de complexer l'ion CN^- . En absence de cyanure, le cuivre inhibe la fluorescence du fluorophore. En présence de cyanure, un complexe $\text{Cu}(\text{CN})_2$ se forme, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence. Le microsystème en PDMS est composé d'un canal permettant de mélanger l'échantillon aux différents réactifs (voir partie 3.2.2) et la détection se fait à la fin du canal grâce à un microscope de fluorescence.

Chang *et al.* ont utilisé une enzyme ADN (DNAzyme) pour détecter l'ion Pb^{2+} dans un canal en PDMS [170]. La DNAzyme est composée d'un brin marqué d'un fluorophore d'un côté et d'un inhibiteur de fluorescence de l'autre, ainsi que d'un brin contenant le site enzymatique (Figure 51). En présence de Pb^{2+} , le brin marqué est coupé, ce qui éloigne le fluorophore de l'inhibiteur et augmente le signal de fluorescence. Cette approche a permis d'atteindre une limite de détection de 11 nM, du même ordre de grandeur que la norme européenne pour l'eau potable (6nM) [4].

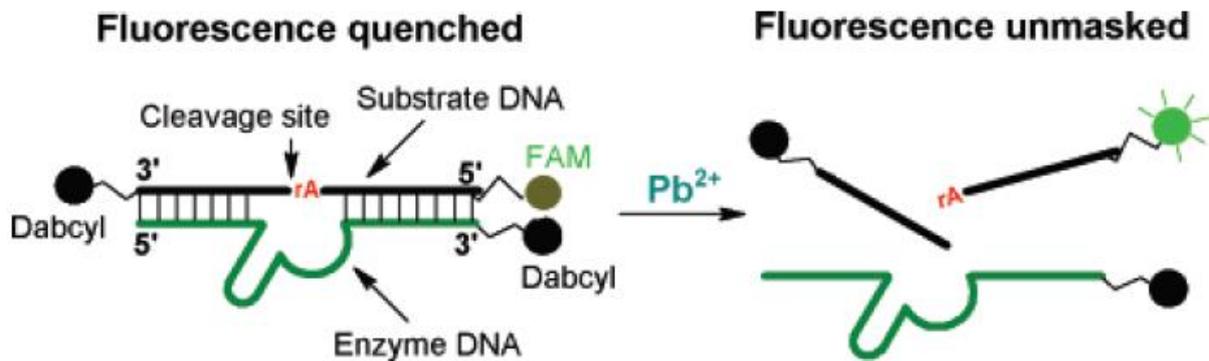


Figure 51 : DNAzyme utilisée pour la détection du plomb. Dabcyl : inhibiteur de fluorescence. [170]

Les anticorps marqués avec un fluorophore sont souvent utilisés pour la détection de fluorescence. C'est le cas dans de nombreux immunocapteurs microfluidiques. Ces méthodes utilisent généralement un format compétitif : la réponse de fluorescence est alors inversement proportionnelle à la concentration de cibles présentes dans l'échantillon. Plus de détails sur les immunocapteurs microfluidiques sont donnés dans la partie 3.2.4.

Bien que la détection par fluorescence soit très utilisée et permette d'obtenir des limites de détection satisfaisantes, ce n'est pas nécessairement la plus adaptée pour les systèmes miniaturisés. En effet, la taille des équipements requis pour la détection (microscope, source pour la fluorescence...) est importante et leur miniaturisation en vue de leur intégration dans des systèmes miniaturisés complets n'est pas aisée.

3.2.5.2 Détection électrochimique

Les méthodes de détection électrochimiques sont attractives pour la microfluidique car l'instrumentation nécessaire peut facilement être miniaturisée tout en minimisant la perte de performance. Des techniques de photolithographie ou de dépôt physique en phase vapeur (*sputtering*) sont utilisées pour déposer des électrodes sur différents matériaux. Différentes méthodes électrochimiques peuvent ensuite être utilisées en fonction du système étudié : conductimétrie, voltampérométrie ou ampérométrie [171]. Par exemple, la voltampérométrie différentielle pulsée a été utilisée pour la détection de mercure dans un canal en PDMS et en verre, à l'aide d'électrodes d'or et d'argent déposées sur la partie en verre (Figure 52) [172].

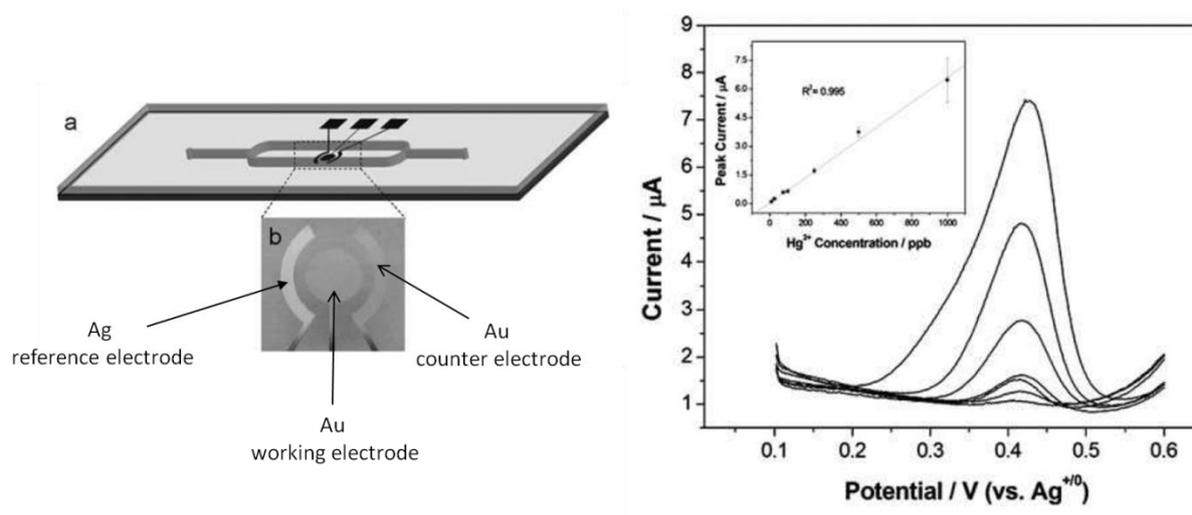


Figure 52 : Droite : Représentation schématique d'un microsysteme intégrant des électrodes d'argent et d'or pour la détection de mercure et photo des électrodes. Gauche : signal obtenu par voltampérométrie différentielle pulsée pour différentes concentration d'ions Hg^{2+} . [172].

L'électrochimie peut être employée en couplage avec l'électrophorèse, en intégrant des électrodes à la fin du canal de séparation. Par exemple, la détection ampérométrique pulsée a été utilisée pour détecter des composés phénoliques ou des amines aromatiques séparés par électrophorèse [158, 159].

La détection électrochimique peut également être utilisée dans des immunocapteurs microfluidiques. Par exemple, Martinez *et al.* [166] utilisent une détection par ampérométrie pour analyser le 17β -œstradiol à l'aide d'une électrode d'or déposée sur du PMMA par *sputtering*.

Lorsque la détection par électrochimie est utilisée dans un système où les flux sont contrôlés de manière électrocinétique, une attention particulière doit être portée à l'isolation du système. En effet, le contrôleur de tension délivrant les hauts voltages nécessaire pour faire migrer les solutions peut créer des interférences et perturber la détection des analytes ou diminuer la sensibilité du système en augmentant le bruit [173].

3.2.6 Systèmes autonomes

Une fois les différentes étapes d'analyse optimisées, il est possible de développer des systèmes complets autonomes, contenant des systèmes d'échantillonnage, d'analyse et de détection, ainsi que leur propre source d'énergie et capables d'effectuer des séries de

mesures automatisées sans intervention humaine. Ces systèmes sont particulièrement utiles dans l'analyse environnementale, pour suivre la pollution d'une rivière sur plusieurs jours par exemple, voire même sur plusieurs mois.

Bien que la quantité de microsystèmes développés pour l'analyse environnementale soit importante, peu ont atteint un tel stade d'intégration. Un des seuls exemples de système autonome a été développé pour l'analyse de nitrates et de nitrites par la méthode de Griess (détection par colorimétrie), comprenant tous les éléments nécessaires à l'analyse (Figure 53) [174]. Le système est capable de mesurer les taux de nitrites et de nitrates présents dans l'eau avec des limites de détection de $0,02 \mu\text{M}$ et $0,025 \mu\text{M}$ respectivement, bien inférieures aux limites recommandées par l'OMS pour l'eau potable ($65 \mu\text{M}$ et $0,8 \text{mM}$ respectivement [115]). Un cycle de mesures dure 5 minutes. Grâce à un système de valves, le système peut analyser un blanc, un échantillon ou une solution standard, et ainsi se recalibrer de façon autonome. Ce système de 10 cm de diamètre et 20 cm de hauteur a été déployé avec succès pendant 26 jours dans un estuaire, où il a effectué plus de 5500 mesures. Ces mesures ont permis de relier les taux de nitrates et de nitrites à des facteurs environnementaux, comme de fortes pluies. Ce système est la preuve que la microfluidique peut être un outil essentiel dans le suivi environnemental.

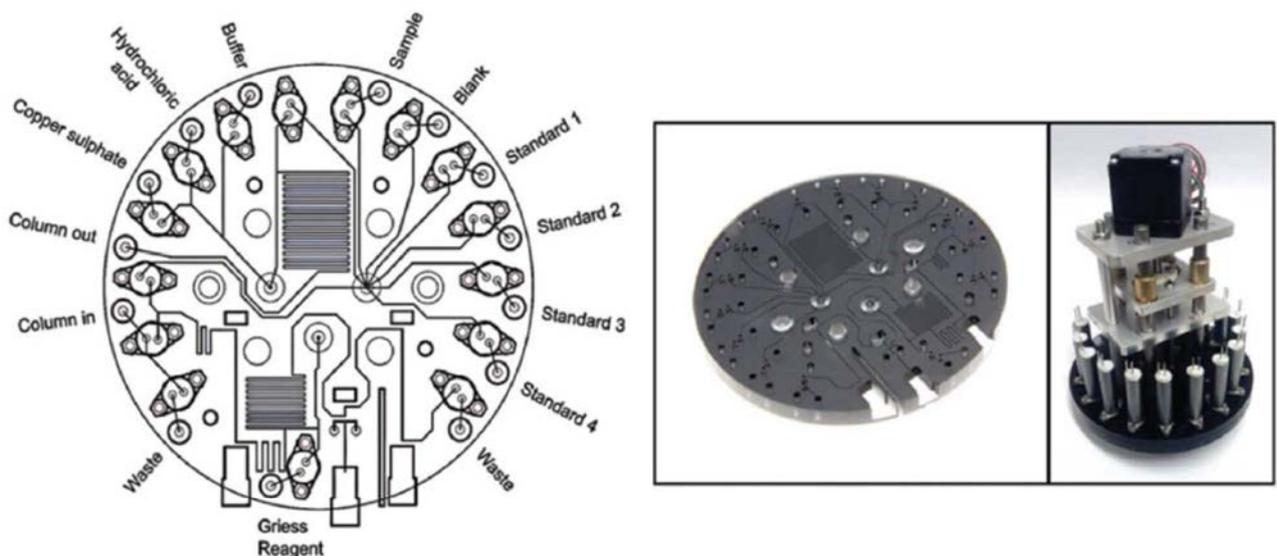


Figure 53 : Schéma du microsystème et photo du système complet pour l'analyse de nitrates et de nitrites. [174]

3.3 Conclusion

Différents microsystemes analytiques ont été développés avec succès pour l'analyse environnementale. Cependant, la plupart des systèmes développés n'intègrent pas encore toutes les étapes de l'analyse, et atteignent une sensibilité suffisante à l'analyse d'échantillons réels seulement en étant combinés à des étapes de prétraitement hors ligne. L'intégration de cette étape de prétraitement au sein du microsysteme est un enjeu majeur pour le développement de microsystemes analytiques suffisamment sensibles pour l'analyse d'échantillons réels. Le développement de tels microsystemes nécessite le plus souvent le recours à des traitements de surface pour greffer des groupements fonctionnels ou des ligands d'intérêt sur les parois des microcanaux, qui doivent être adaptés au matériau choisi pour la fabrication du laboratoire-sur-puce.

4 Matériaux pour la microfluidique et traitements des microcanaux

Le choix du matériau utilisé pour la fabrication des systèmes miniaturisés joue un rôle essentiel dans le développement des laboratoires sur puces : il doit être choisi en fonction de ses propriétés optiques (transparence pour la détection), physiques (rigidité, résistance mécanique...) ou chimiques (capacité à être fonctionnalisé, résistance aux solvants...) mais également de son coût et des méthodes de microfabrication qui peuvent lui être appliquées. Le matériau peut ensuite être traité pour modifier ses propriétés de surface et ainsi d'une part limiter l'adsorption de composés sur les parois du microcanal et d'autre part contrôler les écoulements à l'échelle du nanolitre. Les méthodes de fonctionnalisation utilisées dépendent du matériau choisi : certains présentent des groupements de surface facilement dérivables et peuvent être modifiés par simple réaction chimique, d'autres nécessitent le recours à des irradiations UV ou des traitements plasma.

Après avoir décrit les différents matériaux utilisés pour la conception de systèmes microfluidiques ainsi que les principaux procédés de microfabrication, nous nous intéresserons aux méthodes qui peuvent être employées pour fonctionnaliser un polymère thermoplastique très prometteur pour les applications microfluidiques mais avec une faible réactivité de surface, le copolymère d'oléfine cyclique (COC).

4.1 Matériaux utilisés

4.1.1 Le silicium

Les premiers microsystèmes ont été fabriqués en silicium [175, 176], car les techniques de gravure de ce matériau étaient maîtrisées et utilisées dans l'industrie de la microélectronique. Ce matériau présente l'avantage d'être inerte chimiquement et d'avoir une excellente stabilité thermique.

La fabrication de microsystèmes en silicium comporte deux étapes : la photolithographie et la gravure. Tout d'abord une couche de résine photosensible est déposée sur le substrat.

Cette résine est ensuite insolée à travers un masque ce qui permet de transférer le motif du masque vers la résine par photolithographie UV. Une étape de gravure est ensuite appliquée, qui permet de définir la forme et la profondeur des microcanaux, la gravure n'intervenant que sur les zones qui ne sont pas protégées par la résine. Les deux méthodes de gravures les plus utilisées sont la gravure humide et la gravure par plasma. La gravure humide utilise des solutions chimiques (HF, HNO₃, NH₃, H₃PO₄) pour dissoudre le silicium (ou le verre) par réaction d'oxydoréduction [177, 178]. La gravure ionique par plasma fait intervenir à la fois les effets d'un bombardement ionique et d'une réaction chimique. Un plasma d'électrons et de radicaux ionisés est généré dans le réacteur [179]. Les plasmas employés sont à base de fluor (SF₆, CF₄ ou CHF₃). Les différentes parties du microsystème sont ensuite collées, par fusion thermique, par collage anodique ou par collage par adhésion [121, 179, 180].

Cependant le silicium présente certains inconvénients pour le développement de microsystèmes analytiques. Son opacité à la lumière visible rend impossible l'utilisation de techniques de détection optiques comme l'absorption UV ou la fluorescence, très utilisées dans les méthodes analytiques classiques. De plus le silicium étant un semiconducteur il manque d'isolation électrique, ce qui empêche l'utilisation de techniques séparatives électrocinétiques. Enfin il présente une faible résistance aux solutions alcalines, on ne peut donc pas l'utiliser pour analyser des échantillons à pH élevé.

4.1.2 Le verre

Le silicium a progressivement été remplacé par le verre, qui peut être gravé en utilisant des techniques similaires à celles employées pour le silicium, l'avantage étant sa transparence permettant donc l'utilisation de méthodes de détection optique. C'est un conducteur ionique à très faible conductivité, ce qui autorise l'utilisation de techniques électrocinétiques. Enfin il est très résistant aux agressions chimiques ce qui permet d'utiliser tous types de solutions (solvants organiques, solutions à pH extrêmes...) dans les microsystèmes en verre, ce qui n'est pas le cas des microsystèmes en silicium.

Bien que les coûts des microsystèmes en verre soient inférieurs à ceux en silicium, les processus de fabrication restent longs et nécessitent des équipements lourds tels qu'une salle blanche et un savoir-faire adéquat. Plusieurs entreprises comme Micronit ou Dolomite

proposent des microsystèmes en verre de différentes géométries dont le prix unitaire minimal est de l'ordre de la centaine d'euros pour les produits de leur catalogue, mais augmente à plusieurs centaines d'euros pour une puce avec une géométrie personnalisée.

4.1.3 Les polymères

Ces dernières années, le développement de nouvelles techniques de microfabrication a entraîné l'émergence de microsystèmes en matériaux polymériques. Un polymère est un matériau dont la structure est formée par la répétition d'un ou plusieurs types de monomères. Ils sont caractérisés par leur température de transition vitreuse (T_g), au delà de laquelle le matériau entre dans un état caoutchouteux proche d'un liquide très visqueux, et par leur température de fusion (T_m), au-delà de laquelle ils entrent dans l'état liquide.

De nombreux polymères peuvent être utilisés, chacun présentant des propriétés physicochimiques, optiques ou mécaniques très intéressantes, alliées à des coûts de production faibles. Les techniques de microfabrication de ces polymères permettent d'obtenir des microsystèmes en quelques heures sans nécessiter de salle blanche.

4.1.3.1 Le PDMS

Le polydiméthylsiloxane (PDMS), dont la structure est présentée en Figure 54, est devenu le matériau le plus utilisé pour la fabrication de microsystèmes polymériques. Son utilisation dans le domaine de la microfluidique a été initiée par l'équipe de Whitesides [181] et a été généralisée grâce à ses nombreuses qualités. En effet le PDMS est sous forme de liquide visqueux avant réticulation ce qui le rend très simple à manipuler et permet de répliquer par moulage des motifs micrométriques, à partir d'un moule en silicium par exemple. La fabrication de microsystèmes en PDMS nécessite peu de matériel : une enceinte sous vide pour évacuer les bulles d'air présentes dans le polymère liquide, et un four pour déclencher la réticulation.

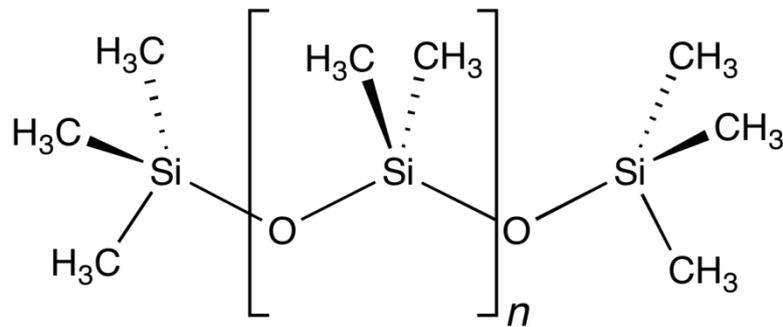


Figure 54 : Structure du PDMS [182]

En plus de sa simplicité de manipulation, le PDMS présente les propriétés suivantes :

- Il est élastique et peut subir des déformations sans se dégrader, ce qui facilite les connexions au niveau des puits d'entrée et de sortie et permet d'intégrer des vannes microfluidiques en utilisant la déformation des canaux
- Il est considéré comme biocompatible et peut donc être utilisé dans le domaine médical
- Il est naturellement hydrophobe, et peut être rendu hydrophile par certains traitements [183]
- Il est poreux aux gaz, mais pas aux liquides

Les systèmes les plus répandus sont des systèmes PDMS/verre dans lesquels les canaux sont moulés dans du PDMS, ce dernier étant ensuite collé sur une lame de verre. Un traitement par plasma d'oxygène des deux moitiés du microsystème permet en effet de former des groupements Si-OH à la surface des matériaux, ce qui conduit à des liaisons Si-O-Si lors de la mise en contact des deux parties, permettant leur collage de façon irréversible et étanche. Le même traitement peut également servir à coller deux couches de PDMS.

Malgré ses nombreux avantages, le PDMS tend à être remplacé par d'autres polymères, car il présente également un certain nombre d'inconvénients limitant son utilisation pour des applications concrètes :

- Ses propriétés mécaniques se dégradent au cours du temps
- Il est perméable à la vapeur d'eau ce qui rend difficile le contrôle des phénomènes d'évaporation

- Il est sensible à de nombreux produits chimiques, les microstructures se déformant au contact de ces produits
- Son caractère hydrophobe favorise l'adsorption de nombreuses molécules, notamment de protéines ou d'ADN

4.1.3.2 Les thermoplastiques

Les thermoplastiques sont des matériaux attractifs ces dernières années pour la fabrication de microsystèmes, tels que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le polycarbonate (PC) ou le copolymère d'oléfine cyclique (COC). Le COC est très intéressant car en plus de propriétés optiques proches de celles du verre, il présente une meilleure résistance chimique que les autres matériaux polymériques [184].

Il est résistant à l'hydrolyse, aux acides, aux bases et aux solvants polaires tels que le méthanol ou l'acétone. C'est également un très bon isolant, ce qui permet d'appliquer de forts champs électriques pour la mise en mouvement des fluides par électroosmose.

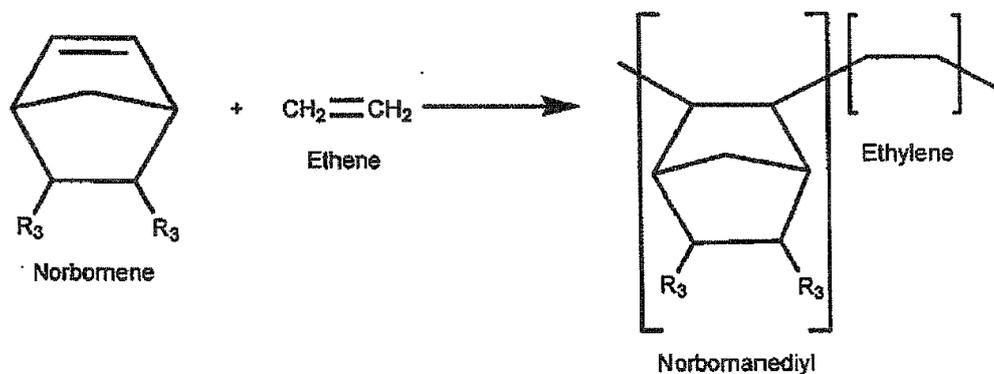


Figure 55 : Polymérisation du COC [185]

Le COC est synthétisé par copolymérisation d'un monomère cyclique (norbornène) avec l'éthylène. Le pourcentage de norbornène présent dans le mélange de polymérisation a un impact important sur les propriétés physiques du COC, notamment sa température de transition vitreuse. Différentes catégories de COC peuvent donc être obtenues en fonction du pourcentage de norbornène utilisé.

Récemment, un nouveau thermoplastique a été utilisé pour la fabrication de microsystèmes. Il s'agit d'un polymère fluoré disponible commercialement, le Dyneon THV [186]. Ce matériau combine les avantages des polymères fluorés (faible énergie de surface et grande résistance chimique) et une grande transparence ainsi qu'une microfabrication simple grâce à sa température de fusion faible (160°C). De plus, c'est un matériau légèrement élastique ce qui facilite les connectiques, comme pour le PDMS.

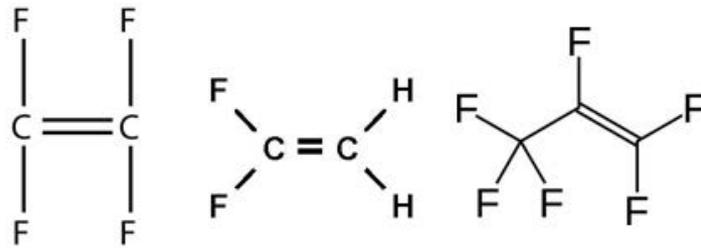


Figure 56 : Monomères composant le Dynéon THV : tétrafluoroéthylène, fluorure de vinylidène et hexafluoropropylène [187]

Deux techniques de fabrication sont majoritairement utilisées pour réaliser des microstructures sur les thermoplastiques : l'emboutissage à chaud et le moulage par injection.

L'emboutissage à chaud ou *hot embossing* permet de répliquer les structures d'un moule sur une plaque de thermoplastique. La surface du thermoplastique est chauffée à une température supérieure à sa température de transition vitreuse puis est pressée sur un moule possédant la géométrie des microcanaux souhaités [188] (Figure 57).

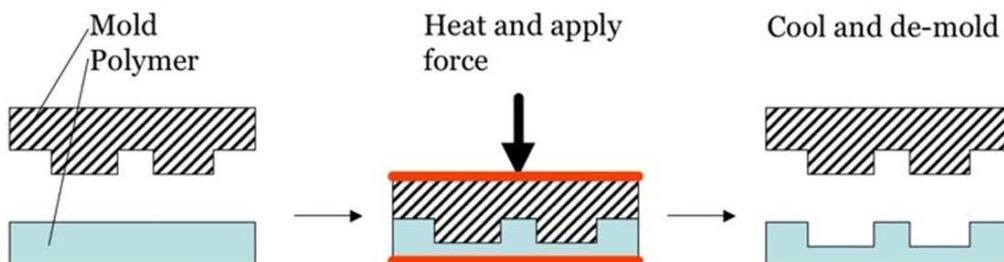


Figure 57 : Schéma de la technique de *hot embossing* [189]

Le moulage par injection ou *injection molding* consiste à introduire le polymère chauffé dans le moule grâce à une enceinte sous vide. Après refroidissement, la pièce est démoulée. Cette technique est la plus largement utilisée dans l'industrie car elle permet de réduire les temps de fabrication d'un facteur 10 par rapport au *hot embossing* [190, 191].

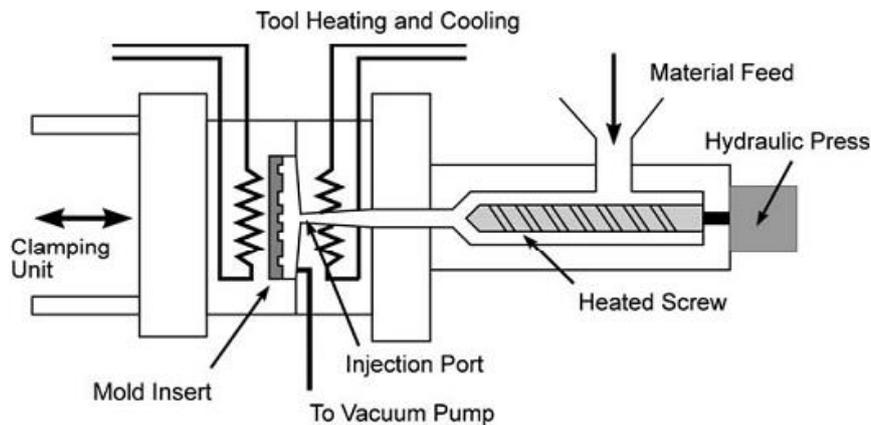


Figure 58 : Représentation schématique de la technique de moulage par injection [192]

D'autres techniques sont également utilisées, comme l'ablation laser [192] ou le micro-usinage [184]. L'avantage de ces techniques est qu'elles permettent de fabriquer facilement des prototypes de géométries variées sans avoir recours à un moule.

Les microsystèmes en thermoplastiques sont ensuite assemblés à l'aide de collage à base de solvants, de plasma UV, d'une élévation de la température ou d'une couche de polymère intermédiaire [121, 184, 193].

4.2 Fonctionnalisation du COC

La fonctionnalisation des matériaux polymériques est un enjeu essentiel dans la fabrication de microsystèmes. Elle est en effet nécessaire pour limiter l'adsorption de protéines sur les parois des canaux, pour contrôler les flux ou pour greffer des ligands nécessaires à l'analyse. Les parois des microcanaux peuvent être fonctionnalisées avant ou après le collage des deux moitiés du système. Les différents polymères utilisés dans la fabrication de microsystèmes

ont une réactivité de surface très variable qui dépend des groupements fonctionnels qu'ils contiennent. Les méthodes de fonctionnalisation utilisées doivent donc être adaptées à la réactivité de la surface du matériau utilisé.

Dans le cas du COC et du THV, la fonctionnalisation par réaction chimique est très difficile à mettre en place, car leurs structures sont composées uniquement de carbones aliphatiques pour le COC ou de liaisons C-F dans le cas du THV. Contrairement au verre ou au PDMS qui possèdent des fonctions carbonyles et hydroxyles, le COC et le THV ont une très faible réactivité chimique, des méthodes de fonctionnalisation adaptées à cette faible réactivité doivent donc être utilisées. Le THV étant un matériau utilisé depuis peu pour la fabrication de systèmes microfluidiques, aucune méthode de fonctionnalisation de sa surface n'a été développée à notre connaissance, bien que des méthodes pour fonctionnaliser d'autres fluoropolymères tels que le Téflon existent [194-200]. Dans cette partie, nous nous intéresserons donc uniquement aux méthodes utilisées pour la fonctionnalisation du COC.

Les principales voies de fonctionnalisation du COC sont :

- Le dépôt en phase vapeur
- L'utilisation d'un plasma
- La photochimie

4.2.1 Modification par dépôt en phase vapeur

Les dépôts chimiques ou physiques en phase vapeur (CVD pour *chemical vapor deposition* ou PVD pour *physical vapor deposition*) sont des techniques qui permettent de déposer une couche mince à la surface d'un matériau par simple adhésion, la couche déposée n'étant pas liée de façon covalente au substrat [201, 202].

D'une façon générale, cette technologie fait appel à trois composantes :

- une source : l'endroit où le produit à déposer (ou l'un de ses composants) est concentré. C'est là que se réalise la dispersion du produit sous forme d'atomes, d'ions et, plus généralement, de vapeur.
- un substrat : le matériau à traiter. La matière issue de la source vient s'y fixer jusqu'à conduire à la formation de la couche.

- un milieu : tout ce qui est compris entre la source et le substrat. C'est le siège du phénomène de transfert de matière et des réactions chimiques intervenant entre les atomes du matériau à déposer et un gaz (dépôts réactifs).

On différencie la CVD et la PVD par le moyen utilisé pour former la vapeur [202] :

- En PVD la vaporisation du matériau source (espèce à déposer) est réalisée soit par effet Joule, soit par induction, soit par bombardement ionique ou électronique, soit par faisceau laser. Les dépôts sont effectués sous vide poussé de façon à obtenir des couches d'une grande pureté. Plus la pression est basse, plus les trajectoires des particules vaporisées sont rectilignes. L'inconvénient majeur de cette technique est la faible adhésion de la couche déposée à la surface fonctionnalisée.
- En CVD, un composé volatil du matériau à déposer est mis en contact soit avec un autre gaz au voisinage de la surface à recouvrir, soit avec la surface elle-même. Une ou plusieurs réactions chimiques sont alors provoquées, donnant au moins un produit solide. Afin d'être éliminés hors du réacteur, les autres produits de réaction doivent être gazeux. Les dépôts sont réalisés à pression variable, mais il faut systématiquement un apport énergétique pour favoriser ces réactions. Cet apport énergétique peut être apporté par voie thermique, par réaction avec des précurseurs ou par un plasma.

La technique de PVD a été très utilisée pour déposer de la silice (SiO_2) sur du silicium pour la microfabrication de circuits intégrés [203]. Cette technique a également été utilisée pour modifier la surface du COC avec une fine couche de SiO_2 [204]. La couche déposée a été caractérisée par spectroscopie de photoélectron X (XPS) et par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Sur un substrat COC traité, l'apparition de deux bandes à 1196 cm^{-1} et 1071 cm^{-1} associées aux liaisons Si-O-Si suggère qu'une couche de SiO_2 a bien été déposée à la surface du matériau (Figure 59). Bien que la couche de SiO_2 ne soit pas liée de façon covalente au COC, des tests mécaniques ont démontré que la couche était fortement attachée au thermoplastique.

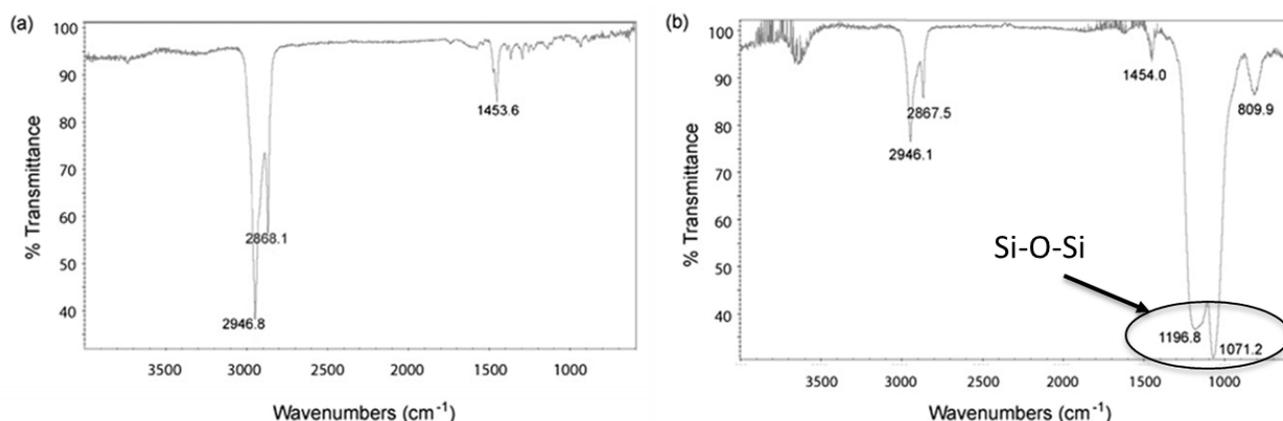


Figure 59 : Spectres infrarouge des échantillons de COC, (a) avant et (b) après dépôt de silanes par PVD, montrant l'apparition de bandes caractéristiques des liaisons Si-O-Si. [204]

De la même manière, des spots de SiO₂ ont été déposés sur la surface du COC afin de créer une puce à ADN en réalisant la synthèse d'ADN *in situ* [205]. La synthèse est confinée sur les spots de SiO₂ hydrophiles. Cette méthode peut être utilisée pour la fabrication de puces à ADN de qualité et peu chères grâce au substrat thermoplastique.

Bien que les techniques en phase vapeur soient rapides et simples à mettre en œuvre, elles sont rarement utilisées pour la fabrication de microsystèmes analytiques. Ces techniques nécessitent d'avoir la surface à fonctionnaliser accessible à l'espèce à déposer et doivent donc être mises en œuvre en milieu ouvert, avant l'assemblage du microsystème.

4.2.2 Modification de la surface du COC par photochimie

La fonctionnalisation du COC par voie photochimique offre l'avantage de pouvoir modifier des surfaces planes ainsi que les parois internes des microcanaux, grâce à la bonne transmission du COC pour les UV jusqu'à 250nm. De plus, cette technique permet de greffer des groupements à la surface du COC et permet d'obtenir une meilleure stabilité de la fonctionnalisation dans le temps, comparé aux méthodes où les molécules sont seulement adsorbées à la surface du matériau [206]. Enfin, les méthodes de greffage par photochimie sont rapides (quelques minutes) et peuvent être localisées dans des zones spécifiques du microcanal de quelques centaines de microns en utilisant des masques [207-210].

Mecomber *et al.* ont proposé la modification de la surface du polymère avec des groupements azotures aromatiques perfluorés [211]. Ces azides, contenant des

groupements fonctionnels amines ou aldéhydes, ont été greffés à la surface par une irradiation UV à 254 nm. La photolyse de l'azide aryle entraîne la formation de singulets nitrènes à cause de la perte d'une molécule N₂. Ces intermédiaires hautement réactifs peuvent s'insérer dans les liaisons C-H et C-C présentes à la surface du COC. Cette approche utilisant des azides aryles offre un moyen de modifier de façon covalente les matériaux inertes. Cependant, les nitrènes sont très toxiques et peuvent présenter un risque pour le manipulateur.

Brisset *et al.* ont développé une méthode pour modifier la surface du COC à l'aide d'aryldiazoniums. La réduction chimique des sels de diazonium crée des radicaux aryls, qui vont se greffer de façon covalente à la surface du COC sous irradiation UV [212]. La grande diversité des aryldiazoniums offre la possibilité de greffer de nombreux groupes fonctionnels différents à la surface du matériau.

D'autres méthodes ont été développées pour la modification du COC par photochimie, reposant sur l'utilisation de photoinitiateurs, et notamment de la benzophénone.

4.2.2.1 Photoinitiation à l'aide de benzophénone

La photopolymérisation initiée par des radicaux libres peut être directement utilisée à la surface des substrats. Dans ce procédé, des photoinitiateurs dits de « type II » comme la benzophénone sont utilisés [211, 213-219]. L'irradiation UV de ces photoinitiateurs leur permet d'abstraire un hydrogène et de générer des radicaux libres à la surface du COC, qui peuvent ensuite réagir avec des monomères et entraîner une polymérisation à la surface du matériau [219-221].

L'équipe de Ranby a été parmi les premières à utiliser la benzophénone pour fonctionnaliser le COC [219] et à comprendre que le mécanisme d'abstraction d'hydrogène reposait sur la longueur d'onde d'irradiation. Pour une irradiation à 254 nm, l'énergie de l'état triplet de la benzophénone (100 kcal.mol⁻¹) est supérieure ou égale aux énergies de liaison des hydrogènes primaires, secondaires et tertiaires présent à la surface du COC (respectivement 100, 96 et 93 kcal.mol⁻¹). Donc grâce à l'irradiation UV à cette longueur d'onde, la benzophénone peut abstraire ces hydrogènes de la surface du matériau. Par contre, pour une irradiation à 345 nm, l'énergie de l'état triplet est seulement de 69 kcal.mol⁻¹, ce qui est insuffisant pour abstraire des atomes d'hydrogène. Cependant, la capacité de la

benzophénone à abstraire des groupements hydrogènes dépend également de la nature du solvant. Par exemple, des monomères ont pu être greffés à la surface du COC en utilisant une irradiation à 365 nm et en diluant la benzophénone dans du méthanol [222].

L'abstraction d'hydrogène se fait préférentiellement dans l'ordre suivant : hydrogène tertiaire, hydrogène secondaire, hydrogène primaire. Le COC contient une proportion importante d'hydrogènes tertiaires, c'est donc un bon candidat pour l'abstraction d'hydrogène par les photoinitiateurs de type II.

La benzophénone a été très utilisée pour améliorer les propriétés optiques du COC, ainsi que pour rendre le matériau compatible avec les échantillons biologiques [221, 223-227].

Plusieurs groupes ont utilisé la benzophénone pour modifier les parois d'un microcanal en COC [228-230]. Des monomères hydrophiles tels que le méthacrylate de polyéthylène glycol (PEGMA) ont été photo-greffés sur la surface du COC pour obtenir une surface hydrophile et limiter l'adsorption de protéines. Cette modification contient deux étapes. Tout d'abord, la benzophénone abstrait des hydrogènes de la surface, créant des radicaux sur la surface ainsi que des radicaux cétyles de la benzophénone en solution. En l'absence de monomères, une recombinaison a lieu entre les deux types de radicaux, créant des groupes semi-pinacol à la surface du COC (Figure 60). Ensuite, la polymérisation du polymère hydrophile a lieu, toujours sous irradiation UV, grâce à la réaction entre les groupements semi-pinacol et les monomères hydrophiles présents dans le mélange de polymérisation.

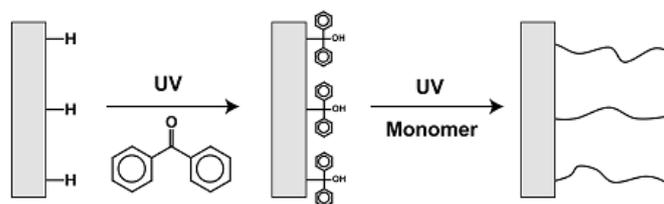


Figure 60 : Protocole de fonctionnalisation du COC par photochimie en deux étapes [228]

Il a été montré que ce procédé dépend fortement des concentrations de benzophénone et de PEGMA, mais également du temps d'irradiation à 260 nm [228]. Le changement de mouillabilité du COC a été caractérisé par mesures d'angle de contact avec une goutte d'eau (Figure 61). Le temps minimal d'irradiation minimal était de 15 minutes, indépendamment

des concentrations de benzophénone et de PEGMA utilisées. L'angle de contact a diminué de 75° à 45° avec une augmentation en benzophénone de 0 à 5%. Cependant une concentration plus importante de benzophénone (10%) a entraîné une augmentation de l'angle de contact à 55°. Ceci est dû au fait que la benzophénone absorbe fortement à 260 nm, ce qui diminue la transmission des UV vers la surface du COC, entraînant une diminution du nombre de réactions entre les monomères et les radicaux à la surface. IL y a donc une concentration optimale de benzophénone à utiliser pour obtenir la fonctionnalisation la plus importante. Des tests de fluorescence ont montré une diminution de 78% de l'adsorption de protéines sur la surface du COC modifié dans les conditions optimales. Cette méthode a également été utilisée pour synthétiser un monolithe à l'intérieur d'un microcanal, afin de faire des réactions de catalyse au palladium [222].

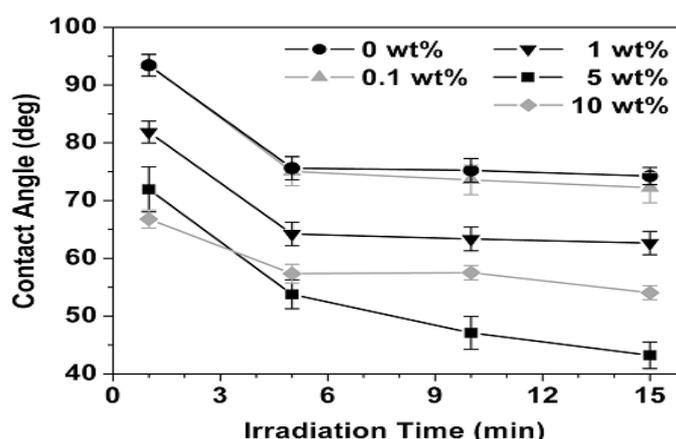


Figure 61 : Effet de la concentration de benzophénone et du temps d'irradiation sur la variation de l'angle de contact [228]

Rohr *et al.* ont également réalisé le greffage de plusieurs monomères avec différents groupes fonctionnels tels que des groupements perfluorés, hydrophobes, réactifs, acides, basiques ou zwitterioniques sur la surface du COC [231]. L'efficacité du greffage a été déterminée grâce à des mesures XPS. Ils ont observé que le taux de greffage dépendait de l'énergie d'irradiation, du temps de photopolymérisation et de l'intensité lumineuse [232, 233], ces trois paramètres doivent donc être contrôlés avec précision.

La benzophénone a fréquemment été utilisée pour ancrer des monolithes à l'intérieur de microcanaux en COC. Plusieurs groupes ont présenté des méthodes utilisant une première étape de prétraitement des parois à la benzophénone avant la synthèse *in situ* de monolithes initiée par irradiation UV [218, 229, 230]. Cette méthode a permis d'effectuer la séparation de protéines par chromatographie sur une micropuce en COC [234].

L'inconvénient majeur de l'utilisation de la benzophénone dans des canaux en COC est que la longueur d'onde optimale pour l'abstraction d'hydrogène par la benzophénone est 254nm, longueur d'onde à laquelle le COC absorbe beaucoup [184].

4.2.2.2 Autres photoinitiateurs

Les photoinitiateurs de type I tels que l'azobisisobutyronitrile (AIBN) ou le méthyl éther de benzoïne (BME), très utilisés pour la synthèse de monolithes initiée par UV [235-237], peuvent également être utilisés pour abstraire des atomes d'hydrogène [238, 239].

Le groupe de Faure a été parmi les premiers à utiliser l'AIBN et la BME pour fonctionnaliser le matériau COC [240]. Il a étudié le greffage de monomères PEGMA à l'aide de BME sur des plaques de COC, afin de les rendre hydrophiles. Lorsque les plaques de COC sont irradiées à une longueur d'onde de 365 nm en présence d'un mélange de BME et de PEGMA, deux mécanismes se mettent en œuvre. Premièrement, la BME génère de radicaux libres en solution, ce qui va initier la formation d'homopolymères poly(PEGMA) en solution. Deuxièmement, des hydrogènes vont être abstraits de la surface du COC, comme lors de l'utilisation d'un photoinitiateur de type II, ce qui va permettre le greffage de monomères PEGMA à la surface du thermoplastique. Des mesures d'angle de contact permettent de confirmer le greffage du PEGMA sur le COC. Comme lors de l'utilisation de benzophénone, la fonctionnalisation dépend du temps d'irradiation, ainsi que de la concentration en photoinitiateur (Figure 62).

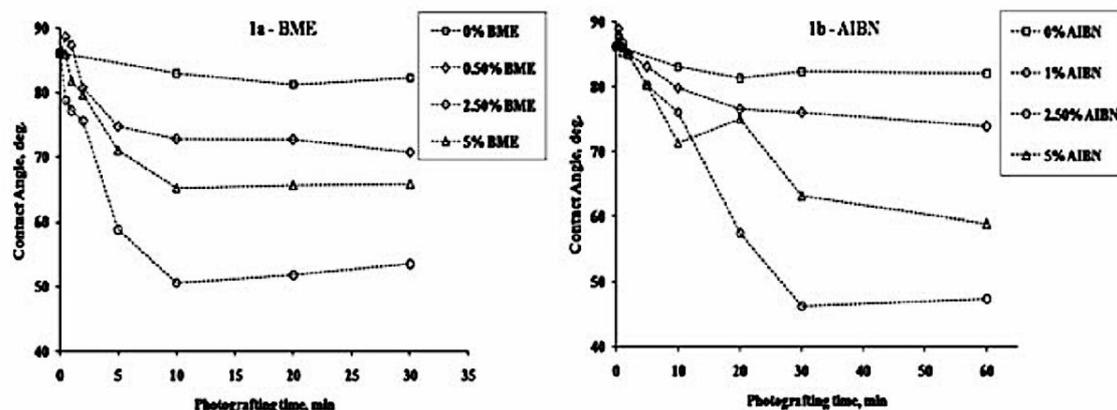


Figure 62 : Effet du temps d'irradiation et de la concentration en photoinitiateur sur la variation d'angle de contact. [240]

4.2.3 Modification par plasma

Le traitement par plasma, un gaz ionisé par une décharge électrique, est largement utilisé pour fonctionnaliser divers matériaux. L'oxydation par plasma est utilisée dans le domaine microfluidique pour coller les microsystèmes en PDMS [241]. Combinée à un dépôt de silanes, elle a également été utilisée pour coller des systèmes dans d'autres matériaux polymériques (PC, PMMA) [242].

Le traitement par plasma est un moyen efficace d'incorporer des groupes fonctionnels sur des polymères ayant une faible réactivité de surface. Divers polymères ont ainsi été fonctionnalisés avec des groupements fluorés [243] ou avec des groupements permettant de mettre en œuvre une réaction de chimie « click » [244]. Une réaction est dite de chimie « click » lorsqu'elle répond aux critères suivants : modularité, stéréosélectivité, insensibilité à l'eau, pas de recours à des groupements protecteurs ou à une purification chromatographique, et enfin pureté et rendement élevés [245, 246].

Plusieurs techniques de modifications par plasma ont été développées sur le substrat COC, afin de coller les microsystèmes, de contrôler les propriétés de surface ou de greffer des biomolécules.

4.2.3.1 Assemblage de microsystèmes en COC par plasma

Différentes techniques ont été utilisées pour assembler des systèmes mixtes COC/PDMS. La première consiste à exposer les deux parties du système à un plasma puis à les mettre en

contact et à les chauffer en appliquant une légère pression pour sceller la liaison. Des plasmas de différentes composition ont été utilisés : oxygène seul [247], oxygène et argon [248] ou oxygène et azote [249].

Une autre technique a été développée, combinant le traitement plasma à un dépôt de silanes, et permettant de coller des puces PDMS/COC à température ambiante [250]. Après une exposition à un plasma d'oxygène des deux moitiés de la puce, des liaisons hydrophiles sont créées à la surface du COC qui permettent de greffer des groupements 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) pour coller le COC au PDMS à température ambiante grâce à la formation de liaisons entre le PDMS et les APTES, après seulement 2 minutes de mise en contact.

Une autre méthode basée sur le dépôt de silanes a été utilisée pour coller des microsystèmes entièrement en COC [193]. Pour cela, les deux moitiés du système ont été traitées par un plasma d'oxygène puis immergées soit dans une solution de glycidoxypropylméthyl-diéthoxysilane (GMPTS) soit dans une solution d'APTES. Les puces sont ensuite mises en contact et chauffées à 80°C pendant 2h, donnant lieu à une réaction entre le groupement amine des APTES et le cycle époxy du GMPTS liant de façon irréversible des deux parties du système en COC (Figure 63).

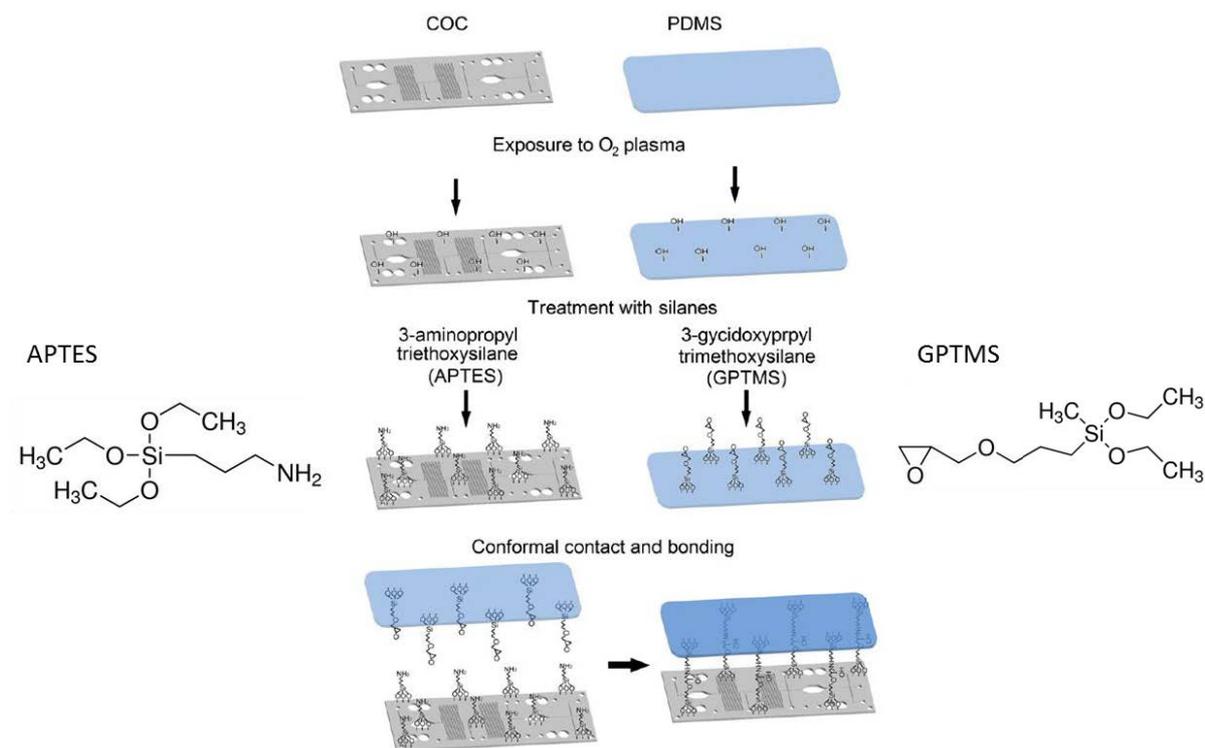


Figure 63 : Méthode de collage de microsystèmes en COC grâce à un traitement par plasma suivi d'une silanisation avec de deux types de silanes, APTES ou GPTMS. Adapté de [193].

4.2.3.2 Contrôle des propriétés de surface

Le traitement plasma peut être utilisé pour contrôler les propriétés du COC. Par exemple, Cortese *et al.* [251] ont montré que le traitement plasma était un moyen efficace pour contrôler la mouillabilité du COC. Ils ont utilisé des plasmas à base d'O₂, de CF₄ ou d'un mélange des deux et ont caractérisé les surfaces du COC traitées par angle de contact : le COC devient hydrophile après traitement au plasma O₂ ou O₂+CF₄ tandis que le plasma CF₄ augmente l'hydrophobie du COC.

Le groupe de Roy a également remarqué que la nature du plasma joue un rôle important dans la fonctionnalisation en observant la forme du ménisque à l'interface air/eau dans un microcanal en COC [252]. Ainsi, une bonne fonctionnalisation du COC est obtenue avec un plasma argon/O₂ où le ménisque est concave (étalement de l'eau sur les parois) traduisant l'apparition de groupements hydrophiles à la surface du COC traité. En revanche, aucune fonctionnalisation n'est réalisée avec un plasma argon/air car le ménisque convexe (aucun étalement de l'eau sur les parois) n'indique aucune modification du caractère hydrophobe du COC (Figure 64). Ce même groupe a étudié l'influence de la nature du plasma (oxygène,

azote et argon) sur la mobilité électroosmotique générée dans un canal en COC [253]. La modification par un plasma d'azote a donné les meilleures performances avec la plus grande hydrophilie et la mobilité électroosmotique la plus stable dans le temps.

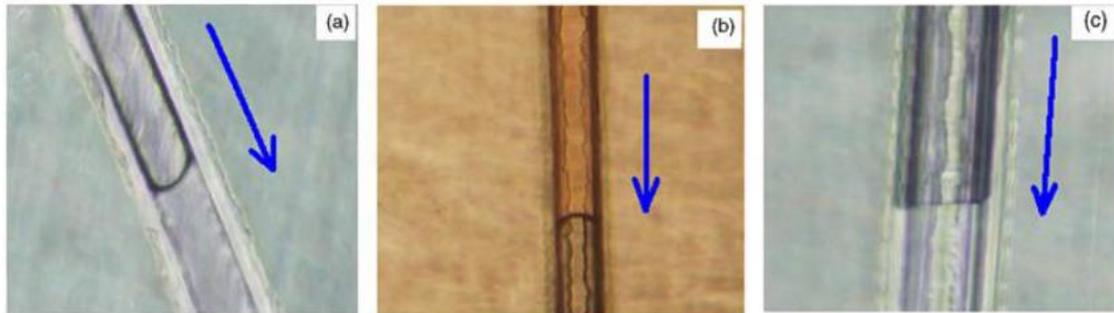


Figure 64 : Observation du ménisque dans (a) un canal en COC non traité, (b) un canal COC traité par plasma argon/O₂ et (c) un canal traité par plasma argon/air [252].

La biocompatibilité du COC peut également être améliorée, en utilisant un plasma d'air [254] ou des plasmas d'ammoniac ou de dioxyde de soufre permettant d'incorporer des fonctions amines ou acides sulfoniques, connues pour améliorer l'adhésion cellulaires sur des substrats plastiques, à la surface du matériau, [255]. Une fois traité, le matériau permet l'adhésion et la prolifération de différentes lignées cellulaires, et peut donc être utilisé dans des applications microfluidiques utilisant des cellules.

4.2.3.3 Exemples d'applications de la modification par voie plasma

Immobilisation de métaux sur le COC

Le traitement par plasma du COC permet d'améliorer le dépôt des métaux sur sa surface. L'adhésion d'aluminium et de cuivre à la surface du COC a été étudiée, après traitement du COC par différents plasmas (oxygène, argon ou un mélange des deux) [256]. La meilleure adhésion a été obtenue grâce au plasma d'oxygène, permettant l'incorporation de groupements C-O et C=O la plus importante, favorisant ainsi l'adhésion des métaux. La même technique a été utilisée pour déposer une couche d'oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO) [257]. Ce matériau transparent peut être utilisé pour rendre une surface conductrice.

La caractérisation de la surface par XPS après le traitement par un plasma d'oxygène confirme l'apparition de groupements hydrophiles C-O et C=O, qui permettent à la couche d'ITO d'adhérer au COC (Figure 65).

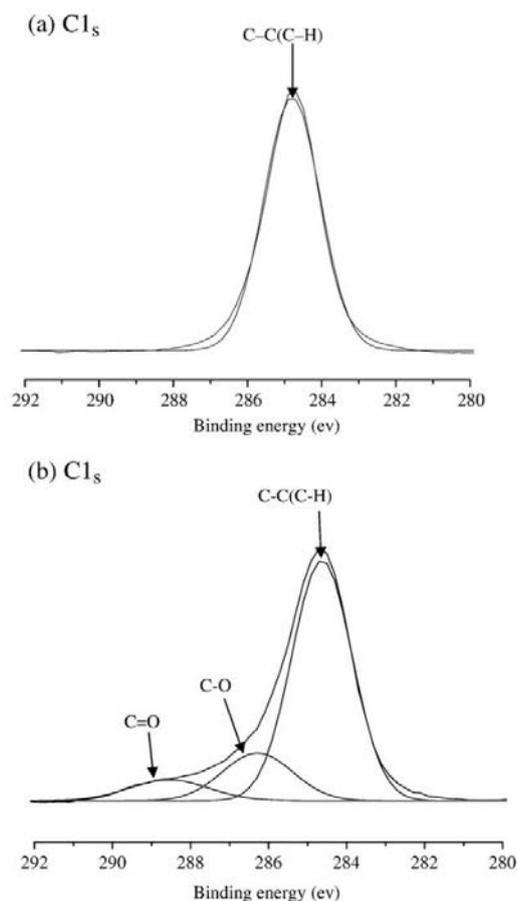


Figure 65 : Profils XPS du COC (a) avant et (b) après traitement avec un plasma d'oxygène pendant 120s à une puissance plasma de 100W. [257]

Immobilisation de biomolécules

Des biomolécules peuvent être immobilisées à la surface du COC grâce à un traitement plasma. Laib *et al.* [258] ont utilisé un plasma O₂ suivi d'un dépôt de polyelectrolyte, l'acide polyacrylique (PAA), pour immobiliser de l'ADN sur une surface de COC. Le plasma O₂ rend la surface du COC hydrophile ce qui permet l'adsorption du PAA. Des brins d'ADN avec une modification amine en 5' réagissent avec les groupements carboxyles du PAA et sont greffés de façon covalente à la couche de polyelectrolyte.

Des anticorps ont également été immobilisés grâce à un traitement par plasma O_2 suivi d'une silanisation [259]. Pour cela, le COC traité par plasma est immergé dans une solution d'APTES, ce qui permet ensuite le greffage d'anticorps grâce à une réaction de couplage entre la protéine et les silanes (Figure 66).

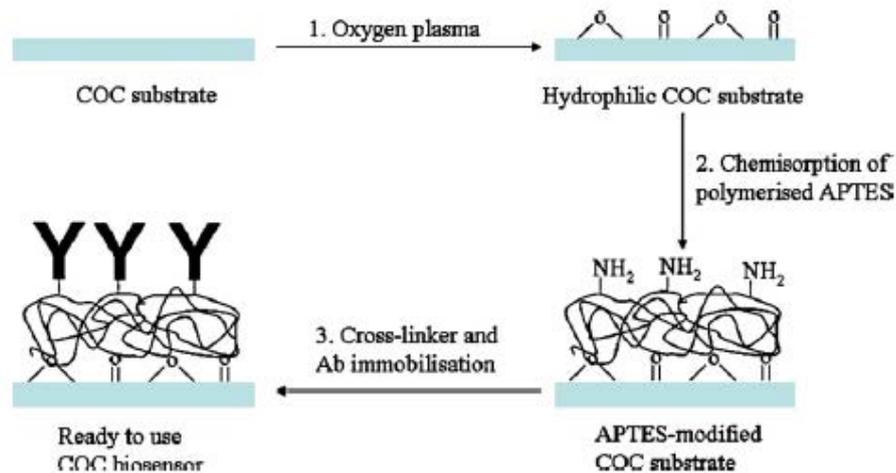


Figure 66 : Schéma de la procédure d'immobilisation d'anticorps par plasma [259]

Le plasma permet donc d'effectuer de nombreuses fonctionnalisations sur le COC, cependant la plupart doivent être effectuées avant le collage du microsystème et ne peuvent donc pas être utilisées en canal fermé.

4.3 Conclusion

Différents matériaux ont été utilisés pour la fabrication de systèmes microfluidiques, du silicium aux polymères. Les polymères présentent plusieurs avantages notamment en termes de coût de fabrication, moins élevés que pour le verre ou le silicium. Cependant ils présentent souvent une faible résistance chimique ou ne sont pas transparent, ce qui est un problème pour certaines applications. Le COC et le Dyneon THV combinent les avantages du verre et des polymères en offrant une très bonne résistance chimique et une grande transparence. Néanmoins, leur manque de réactivité de surface rend leur fonctionnalisation difficile par réaction chimique, et nécessite de recourir à des méthodes comme les dépôts en phase vapeur, la photochimie ou le plasma, demandant un appareillage spécialisé. Le développement de méthodes de fonctionnalisation simples à mettre en œuvre et versatiles est un enjeu essentiel pour l'utilisation de ces matériaux prometteurs en microfluidique.

5 Références

1. Kolpin, D.W., E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, and H.T. Buxton, *Environmental Science & Technology*, 2002. **36**(6), p. 1202-1211.
2. Woodruff, T.J., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015. **100**(4), p. 1241-1244.
3. Directive 2000/60/CE, J.O.U.E, L327 22.12.2000, 1-72
4. Directive 2013/39/UE, J.O.U.E, 24.8.2013 L 226, 1-17
5. Trenholm, R.A., B.J. Vanderford, J.C. Holady, D.J. Rexing, and S.A. Snyder, *Chemosphere*, 2006. **65**(11), p. 1990-1998.
6. Thorpe, K.L., T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, M. Scholze, J.P. Sumpter, and C.R. Tyler, *Environmental Science & Technology*, 2001. **35**(12), p. 2476-2481.
7. Farré, M., L. Kantiani, M. Petrovic, S. Perez, and D. Barcelo, *Journal of Chromatography A*, 2012. **1259**, p. 86-99.
8. Pichon, V., *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives*, 2006(ref article : p1420).
9. Schellen, A., B. Ooms, D. van de Lagemaat, R. Vreeken, and W.D. van Dongen, *Journal of Chromatography B*, 2003. **788**(2), p. 251-259.
10. Buchberger, W.W., *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(4), p. 603-618.
11. Ferrer, I. and D. Barcelo, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 1999. **18**(3), p. 180-192.
12. Chen, L.X., S.F. Xu, and J.H. Li, *Chemical Society Reviews*, 2011. **40**(5), p. 2922-2942.
13. Sun, Z., W. Schuessler, M. Sengl, R. Niessner, and D. Knopp, *Analytica Chimica Acta*, 2008. **620**(1-2), p. 73-81.
14. Zorita, S., B. Boyd, S. Jönsson, E. Yilmaz, C. Svensson, L. Mathiasson, and S. Bergström, *Analytica Chimica Acta*, 2008. **626**(2), p. 147-154.
15. Duan, Y.-P., C.-M. Dai, Y.-L. Zhang, and C. Ling, *Analytica Chimica Acta*, 2013. **758**(0), p. 93-100.
16. Arthur, C.L. and J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry*, 1990. **62**(19), p. 2145-2148.
17. Pellerin, F. and G. Burgot, *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives*, 2003(ref article : p1430).
18. Ouyang, G. and J. Pawliszyn, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. **386**(4), p. 1059-1073.
19. Moeder, M., S. Schrader, M. Winkler, and P. Popp, *Journal of Chromatography A*, 2000. **873**(1), p. 95-106.
20. Kawaguchi, M., Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, and H. Nakazawa, *Journal of Chromatography A*, 2004. **1049**(1-2), p. 1-8.
21. Pintado-Herrera, M.G., E. Gonzalez-Mazo, and P.A. Lara-Martin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(1), p. 401-411.
22. Van Hoeck, E., F. Canale, C. Cordero, S. Compernelle, C. Bicchi, and P. Sandra, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. **393**(3), p. 907-919.
23. Cote, G., *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires : extractions fluide/fluide et fluide/solide*, 1998(ref. article : j2760).
24. Ahrer, W., E. Scherwenk, and W. Buchberger, *Journal of Chromatography A*, 2001. **910**(1), p. 69-78.
25. Rodriguez-Mozaz, S., M.J. Lopez de Alda, and D. Barceló, *Journal of Chromatography A*, 2007. **1152**(1), p. 97-115.

26. Boos, K.S. and C.H. Grimm, *Trends in Analytical Chemistry*, 1999. **18**(3), p. 175-180.
27. de Alda, M.J.L. and D. Barcelo, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001. **371**(4), p. 437-447.
28. Rodriguez-Mozaz, S., M.J.L. de Alda, and D. Barcelo, *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(23), p. 6998-7006.
29. Watabe, Y., T. Kubo, T. Nishikawa, T. Fujita, K. Kaya, and K. Hosoya, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1120**(1-2), p. 252-259.
30. Ying, G.G., R.S. Kookana, and Z.L. Chen, *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2002. **37**(3), p. 225-234.
31. Quintana, J.B., M. Miro, J.M. Estela, and V. Cerda, *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(8), p. 2832-2840.
32. Aydin, E. and I. Talinli, *Chemosphere*, 2013. **90**(6), p. 2004-2012.
33. Liu, S., G.G. Ying, J.L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L.J. Zhou, and H.J. Lai, *Journal of Chromatography A*, 2011. **1218**(10), p. 1367-1378.
34. Vanderford, B.J. and S.A. Snyder, *Environmental Science & Technology*, 2006. **40**(23), p. 7312-7320.
35. Botitsi, E., C. Frosyni, and D. Tsiipi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(4), p. 1317-1327.
36. Lin, A.Y.-C. and Y.-T. Tsai, *Science of the Total Environment*, 2009. **407**(12), p. 3793-3802.
37. Lopez-Roldan, R., M. Lopez de Alda, M. Gros, M. Petrovic, J. Martin-Alonso, and D. Barcelo, *Chemosphere*, 2010. **80**(11), p. 1337-1344.
38. Valcarcel, Y., S. Gonzalez Alonso, J.L. Rodriguez-Gil, R. Romo Maroto, A. Gil, and M. Catala, *Chemosphere*, 2011. **82**(7), p. 1062-1071.
39. Jelic, A., F. Fatone, S. Di Fabio, M. Petrovic, F. Cecchi, and D. Barcelo, *Science of the Total Environment*, 2012. **433**, p. 352-361.
40. Idder, S., L. Ley, P. Mazellier, and H. Budzinski, *Analytica Chimica Acta*, 2013. **805**, p. 107-115.
41. Tran, N.H., J. Hu, and S.L. Ong, *Talanta*, 2013. **113**(0), p. 82-92.
42. El Marghani, A., A. Pradhan, A. Seyoum, H. Khalaf, T. Ros, L.-H. Forsberg, T. Nermark, L. Osterman, U. Wiklund, P. Ivarsson, J. Jass, and P.-E. Olsson, *Science of the Total Environment*, 2014. **488**, p. 228-235.
43. Tranchant, J., *Techniques de l'ingénieur Chromatographie et techniques séparatives*, 1996 (ref. article : p1485).
44. Moutassim-Souali, A., S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, and Y. Levi, *Journal of Separation Science*, 2003. **26**(1-2), p. 105-111.
45. Reddersen, K. and T. Heberer, *Journal of Separation Science*, 2003. **26**(15-16), p. 1443-1450.
46. Kosjek, T., E. Heath, and A. Krbavcic, *Environment International*, 2005. **31**(5), p. 679-685.
47. Al-Rifai, J.H., C.L. Gabefish, and A.I. Schaefer, *Chemosphere*, 2007. **69**(5), p. 803-815.
48. Togola, A. and H. Budzinski, *Journal of Chromatography A*, 2008. **1177**(1), p. 150-158.
49. Comeau, F., C. Surette, G.L. Brun, and R. Losier, *Science of the Total Environment*, 2008. **396**(2-3), p. 132-146.
50. Zhao, J.L., G.G. Ying, L. Wang, J.F. Yang, X.B. Yang, L.H. Yang, and X. Li, *Science of the Total Environment*, 2009. **407**(2), p. 962-974.

51. Morin, P., M. Taverna, and I.L. Potier, *Techniques de l'ingénieur, Analyse des macromolécules biologiques*, 2003 (ref. article : p3365).
52. Ahrer, W. and W. Buchberger, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 2001. **132**(3), p. 329-337.
53. Macià, A., F. Borrull, C. Aguilar, and M. Calull, *ELECTROPHORESIS*, 2003. **24**(16), p. 2779-2787.
54. Macià, A., F. Borrull, C. Aguilar, and M. Calull, *ELECTROPHORESIS*, 2004. **25**(3), p. 428-436.
55. Macià, A., F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, *Chromatographia*, 2006. **63**(3-4), p. 149-154.
56. Macià, A., F. Borrull, M. Calull, and C. Aguilar, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1117**(2), p. 234-245.
57. Macià, A., F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, and C. Aguilar, *Journal of Separation Science*, 2008. **31**(5), p. 872-880.
58. Sablier, M. and G. Bouchoux, *Techniques de l'ingénieur Spectrométries*, 2005(ref. article : p2646).
59. Whitehouse, C.M., R.N. Dreyer, M. Yamashita, and J.B. Fenn, *Analytical Chemistry*, 1985. **57**(3), p. 675-679.
60. Tschmelak, J., G. Proll, and G. Gauglitz, *Talanta*, 2005. **65**(2), p. 313-323.
61. Kröger, K., A. Jung, S. Reder, and G. Gauglitz, *Analytica Chimica Acta*, 2002. **469**(1), p. 37-48.
62. Kibbey, T.C.G., L. Chen, N. Singhaputtangkul, and D.A. Sabatini, *Chemosphere*, 2009. **76**(9), p. 1249-1257.
63. Ambrosi, A., R. Antiochia, L. Campanella, R. Dragone, and I. Lavagnini, *Journal of Hazardous Materials*, 2005. **122**(3), p. 219-225.
64. Toulmé, J.-J., S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, and S. Moreau, *Médecine Nucléaire*, 2007. **31**(9), p. 478-484.
65. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *Nature*, 1990. **346**(6287), p. 818-822.
66. Tuerk, C. and L. Gold, *Science*, 1990. **249**(4968), p. 505-510.
67. Robertson, D.L. and G.F. Joyce, *Nature*, 1990. **344**(6265), p. 467-468.
68. Thiesen, H.-j.r. and C. Bach, *Nucleic Acids Research*, 1990. **18**(11), p. 3203-3209.
69. Mairal, T., V.C. Ozalp, P.L. Sanchez, M. Mir, I. Katakis, and C.K. O'Sullivan, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(4), p. 989-1007.
70. Girardot, M., *Aptamers and Capillary Electrophoresis: physico-chemical characterization of free aptamers in solution or grafted on nanoparticles, and study of their affinity towards a proteic target in view of their use in sensitive diagnosis methods*. 2011, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
71. Eaton, B.E., L. Gold, and D.A. Zichi, *Chemistry & Biology*, 1995. **2**(10), p. 633-638.
72. Jenison, R.D., S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky, *Science*, 1994. **263**(5152), p. 1425-1429.
73. Jayasena, S.D., *Clinical Chemistry*, 1999. **45**(9), p. 1628-1650.
74. O'Sullivan, C.K., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002. **372**(1), p. 44-48.
75. Girardot, M., P. Gareil, and A. Varenne, *Electrophoresis*, 2010. **31**(3), p. 546-555.
76. Baldrich, E., A. Restrepo, and C.K. O'Sullivan, *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(23), p. 7053-7063.
77. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. **20**(12), p. 2424-2434.

78. Hamula, C.L.A., J.W. Guthrie, H. Zhang, X.-F. Li, and X.C. Le, *Trends in Analytical Chemistry*, 2006. **25**(7), p. 681-691.
79. Clark, S.L. and V.T. Remcho, *Electrophoresis*, 2002. **23**(9), p. 1335-1340.
80. Gopinath, S., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(1), p. 171-182.
81. Dausse, E., S.D.R. Gomes, and J.-J. Toulmé, *Current opinion in pharmacology*, 2009. **9**(5), p. 602-607.
82. Cho, E.J., J.W. Lee, and A.D. Ellington, *Applications of Aptamers as Sensors*, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2009, Annual Reviews: Palo Alto. p. 241-264.
83. Macugen Diabetic Retinopathy Study Group, *Ophthalmology*, 2005. **112**(10), p. 1747-1757.
84. Cruz-Aguado, J.A. and G. Penner, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(22), p. 10456-10461.
85. Neoventures Biotechnology. *Products*. 2010; Available from: <http://neoventures.ca/products/mycotoxin-testing/>.
86. Mei, Z., H. Chu, W. Chen, F. Xue, J. Liu, H. Xu, R. Zhang, and L. Zheng, *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. **39**(1), p. 26-30.
87. Li, L., B. Li, Y. Qi, and Y. Jin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. **393**(8), p. 2051-2057.
88. Song, K.M., E. Jeong, W. Jeon, M. Cho, and C. Ban, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **402**(6), p. 2153-2161.
89. Wei, Q.S., R. Nagi, K. Sadeghi, S. Feng, E. Yan, S.J. Ki, R. Caire, D. Tseng, and A. Ozcan, *Acs Nano*, 2014. **8**(2), p. 1121-1129.
90. Wu, Y., S. Zhan, F. Wang, L. He, W. Zhi, and P. Zhou, *Chemical Communications*, 2012. **48**(37), p. 4459-4461.
91. Ragavan, K.V., L.S. Selvakumar, and M.S. Thakur, *Chemical Communications*, 2013. **49**(53), p. 5960-5962.
92. Tan, D.D., Y. He, X.J. Xing, Y. Zhao, H.W. Tang, and D.W. Pang, *Talanta*, 2013. **113**, p. 26-30.
93. Yildirim, N., F. Long, C. Gao, M. He, H.-C. Shi, and A.Z. Gu, *Environmental Science & Technology*, 2012. **46**(6), p. 3288-3294.
94. Yildirim, N., F. Long, M. He, H.-C. Shi, and A.Z. Gu, *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2014. **16**(6), p. 1379-1386.
95. Lin, Y.-W., C.-W. Liu, and H.-T. Chang, *Talanta*, 2011. **84**(2), p. 324-329.
96. Li, M., X. Zhou, W. Ding, S. Guo, and N. Wu, *Biosensors & Bioelectronics*, 2013. **41**, p. 889-893.
97. Brut, M., A. Trapaidze, A. Estève, A. Bancaud, D. Estève, G. Landa, and M. Djafari-Rouhani, *Applied Physics Letters*, 2012. **100**(16), p. 163702.
98. Shim, W.B., H. Mun, H.A. Joung, J.A. Ofori, D.H. Chung, and M.G. Kim, *Food Control*, 2014. **36**(1), p. 30-35.
99. Yang, M., Z.H. Peng, Y. Ning, Y.Z. Chen, Q. Zhou, and L. Deng, *Sensors*, 2013. **13**(5), p. 6865-6881.
100. Kim, Y.-J., Y.S. Kim, J.H. Niazi, and M.B. Gu, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010. **33**(1), p. 31-37.
101. Eissa, S., A. Ng, M. Siaj, and M. Zourob, *Analytical Chemistry*, 2014. **86**(15), p. 7551-7557.
102. Lin, Z.Y., H.M. Huang, Y.X. Xu, X.Y. Gao, B. Qiu, X. Chen, and G.N. Chen, *Talanta*, 2013. **103**, p. 371-374.

103. Kashefi-Kheyrabadi, L. and M.A. Mehrgardi, *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. **33**(1), p. 184-189.
104. Pasternack, R.F. and P.J. Collings, *Science*, 1995. **269**(5226), p. 935-939.
105. Wu, Y., L. Liu, S. Zhan, F. Wang, and P. Zhou, *Analyst*, 2012. **137**(18), p. 4171-4178.
106. Wu, Y., S. Zhan, L. Xu, W. Shi, T. Xi, X. Zhan, and P. Zhou, *Chemical Communications*, 2011. **47**(21), p. 6027-6029.
107. Fu, X.B., F. Qu, N.B. Li, and H.Q. Luo, *Analyst*, 2012. **137**(5), p. 1097-1099.
108. Kneipp, K., Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, and M.S. Feld, *Physical Review Letters*, 1997. **78**(9), p. 1667-1670.
109. Chung, E., R. Gao, J. Ko, N. Choi, D.W. Lim, E.K. Lee, S.-I. Chang, and J. Choo, *Lab on a Chip*, 2013. **13**(2), p. 260-266.
110. Chung, E., J. Jeon, J. Yu, C. Lee, and J. Choo, *Biosensors & Bioelectronics*, 2015. **64**, p. 560-565.
111. Zhang, L., H. Chang, A. Hirata, H. Wu, Q.-K. Xue, and M. Chen, *Acs Nano*, 2013. **7**(5), p. 4595-4600.
112. Wang, Y., F. Yang, and X. Yang, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **25**(8), p. 1994-1998.
113. Jo, M., J.-Y. Ahn, J. Lee, S. Lee, S.W. Hong, J.-W. Yoo, J. Kang, P. Dua, D.-k. Lee, S. Hong, and S. Kim, *Oligonucleotides*, 2011. **21**(2), p. 85-91.
114. Jiang, Z., G. Wen, Y. Fan, C. Jiang, Q. Liu, Z. Huang, and A. Liang, *Talanta*, 2010. **80**(3), p. 1287-1291.
115. WHO, *Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth edition*, 2011.
116. European Union, *Risk assessment report*, 2003(EUR 20843 EN).
117. Directive 1881/2006/CE, J.O.U.E, 19.12.2006 L 364, 5-24
118. Boles, T.H. and M.J.M. Wells, *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(16), p. 2561-2568.
119. Jokerst, J.C., J.M. Emory, and C.S. Henry, *Analyst*, 2012. **137**(1), p. 24-34.
120. Wu, R., L.G. Hu, F.J. Wang, M.L. Ye, and H. Zou, *Journal of Chromatography A*, 2008. **1184**(1-2), p. 369-392.
121. Lazar, I.M., P. Trisiripisal, and H.A. Sarvaiya, *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(15), p. 5513-5524.
122. Ladner, Y., G. Cretier, and K. Faure, *Electrophoresis*, 2012. **33**(19-20), p. 3087-3094.
123. Ladner, Y.L., *Development of electrochromatography in cyclic olefin copolymer microsystems*. 2012, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard - Lyon I.
124. Yin, H. and K. Killeen, *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(10), p. 1427-1434.
125. Liu, J., C.-F. Chen, C.-W. Tsao, C.-C. Chang, C.-C. Chu, and D.L. DeVoe, *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(7), p. 2545-2554.
126. Bedair, M.F. and R.D. Oleschuk, *Analytical Chemistry*, 2006. **78**(4), p. 1130-1138.
127. Leondes, C., K.-S. Yun, and E. Yoon, *Micropumps for MEMS/NEMS and Microfluidic Systems*, in *MEMS/NEMS*. 2006, Springer US. p. 1112-1144.
128. Amirouche, F., Y. Zhou, and T. Johnson, *Microsystem Technologies*, 2009. **15**(5), p. 647-666.
129. Haeberle, S. and R. Zengerle, *Lab on a Chip*, 2007. **7**(9), p. 1094-1110.
130. Madou, M., J. Zoval, G.Y. Jia, H. Kido, J. Kim, and N. Kim, *Lab on a CD*, in *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2006, Annual Reviews: Palo Alto. p. 601-628.
131. Schembri, C.T., T.L. Burd, A.R. Kopf-Sill, L.R. Shea, and B. Braynin, *The Journal of Automatic Chemistry*, 1995. **17**(3), p. 99-104.

132. LaCroix-Fralish, A., J. Clare, C.D. Skinner, and E.D. Salin, *Talanta*, 2009. **80**(2), p. 670-675.
133. Miyaguchi, H., M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, H. Inoue, and T. Kitamori, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1129**(1), p. 105-110.
134. Kutter, J.P., S.C. Jacobson, and J.M. Ramsey, *Journal of Microcolumn Separations*, 2000. **12**(2), p. 93-97.
135. He, B. and F. Regnier, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998. **17**(6-7), p. 925-932.
136. Pyell, U., *Journal of Chromatography A*, 2000. **892**(1), p. 257-278.
137. Tennico, Y.H. and V.T. Remcho, *Electrophoresis*, 2010. **31**(15), p. 2548-2557.
138. Teste, B., F. Malloggi, J.-M. Siaugue, A. Varenne, F. Kanoufi, and S. Descroix, *Lab on a Chip*, 2011. **11**(24), p. 4207-4213.
139. Fulcrand, R., A. Bancaud, C. Escriba, Q. He, S. Charlot, A. Boukabache, and A.-M. Gué, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **160**(1), p. 1520-1528.
140. Yu, C., M.H. Davey, F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(21), p. 5088-5096.
141. Xu, Y., W.P. Zhang, P. Zeng, and Q. Cao, *Sensors*, 2009. **9**(5), p. 3437-3446.
142. Kang, Q.-S., Y. Li, J.-Q. Xu, L.-J. Su, Y.-T. Li, and W.-H. Huang, *Electrophoresis*, 2010. **31**(18), p. 3028-3034.
143. Yang, W., M. Yu, X. Sun, and A.T. Woolley, *Lab on a Chip*, 2010. **10**(19), p. 2527-2533.
144. Ladner, Y., G. Crétier, and K. Faure, *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(51), p. 8001-8008.
145. Lin, C.-C., J.-L. Hsu, and G.-B. Lee, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2011. **10**(3), p. 481-511.
146. Svec, F., *Journal of Chromatography B*, 2006. **841**(1-2), p. 52-64.
147. Giordano, B.C., D.S. Burgi, S.J. Hart, and A. Terray, *Analytica Chimica Acta*, 2012. **718**, p. 11-24.
148. Lichtenberg, J., E. Verpoorte, and N.F. de Rooij, *Electrophoresis*, 2001. **22**(2), p. 258-271.
149. Noh, H.-B., K.-S. Lee, B.S. Lim, S.-J. Kim, and Y.-B. Shim, *Electrophoresis*, 2010. **31**(18), p. 3053-3060.
150. Squires, T.M. and S.R. Quake, *Reviews of Modern Physics*, 2005. **77**(3), p. 977-1026.
151. Czugala, M., C. Fay, N.E. O'Connor, B. Corcoran, F. Benito-Lopez, and D. Diamond, *Talanta*, 2013. **116**(0), p. 997-1004.
152. Yea, K., S. Lee, J.B. Kyong, J. Choo, E.K. Lee, S.W. Joo, and S. Lee, *Analyst*, 2005. **130**(7), p. 1009-1011.
153. Chung, S.Y., S.W. Nam, J. Lim, S. Park, and J. Yoon, *Chemical Communications*, 2009(20), p. 2866-2868.
154. Wu, D., J. Qin, and B. Lin, *Journal of Chromatography A*, 2008. **1184**(1-2), p. 542-559.
155. Chen, G., Y. Lin, and J. Wang, *Talanta*, 2006. **68**(3), p. 497-503.
156. Lacher, N.A., K.E. Garrison, R.S. Martin, and S.M. Lunte, *Electrophoresis*, 2001. **22**(12), p. 2526-2536.
157. Dolnik, V., S.R. Liu, and S. Jovanovich, *Electrophoresis*, 2000. **21**(1), p. 41-54.
158. Chen, G., H.M. Bao, and P.Y. Yang, *Electrophoresis*, 2005. **26**(24), p. 4632-4640.
159. Ding, Y.S. and C.D. Garcia, *Analyst*, 2006. **131**(2), p. 208-214.
160. Prest, J.E., S.J. Baldock, P.R. Fielden, N.J. Goddard, and B.J.T. Brown, *Analyst*, 2005. **130**(10), p. 1375-1382.

161. Wakida, S., K. Fujimoto, H. Nagai, T. Miyado, Y. Shibutani, and S. Takeda, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1109**(2), p. 179-182.
162. Lin, C.-C., J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2010. **15**(3), p. 253-274.
163. Yakovleva, J., R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell, and J. Emneus, *Biosensors & Bioelectronics*, 2003. **19**(1), p. 21-34.
164. Mauriz, E., A. Calle, J.J. Manclus, A. Montoya, and L.M. Lechuga, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **387**(4), p. 1449-1458.
165. Long, F., A.N. Zhu, X.H. Zhou, H.C. Wang, Z. Zhao, L.H. Liu, and H.C. Shi, *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. **55**, p. 19-25.
166. Martinez, N.A., R.J. Schneider, G.A. Messina, and J. Raba, *Biosensors & Bioelectronics*, 2010. **25**(6), p. 1376-1381.
167. Kuswandi, B., Nuriman, J. Huskens, and W. Verboom, *Analytica Chimica Acta*, 2007. **601**(2), p. 141-155.
168. Bowden, M., M. Sequiera, J.P. Krog, P. Gravesen, and D. Diamond, *Journal of Environmental Monitoring*, 2002. **4**(5), p. 767-771.
169. Shen, S.L., Y. Li, and S. Wakida, *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010. **166**(1-4), p. 573-580.
170. Chang, I.H., J.J. Tulock, J.W. Liu, W.S. Kim, D.M. Cannon, Y. Lu, P.W. Bohn, J.V. Sweedler, and D.M. Crotek, *Environmental Science & Technology*, 2005. **39**(10), p. 3756-3761.
171. Wang, J., *Talanta*, 2002. **56**(2), p. 223-231.
172. Chen, C.G., J.C. Zhang, Y. Du, X.R. Yang, and E.K. Wang, *Analyst*, 2010. **135**(5), p. 1010-1014.
173. Noblitt, S.D. and C.S. Henry, *Analytical Chemistry*, 2008. **80**(19), p. 7624-7630.
174. Beaton, A.D., C.L. Cardwell, R.S. Thomas, V.J. Sieben, F.E. Legiret, E.M. Waugh, P.J. Statham, M.C. Mowlem, and H. Morgan, *Environmental Science & Technology*, 2012. **46**(17), p. 9548-9556.
175. Terry, S.C., J.H. Jerman, and J.B. Angell, *IEEE Transactions on Electron Devices*, 1979. **26**(12), p. 1880-1886.
176. van der Schoot, B. and P. Bergveld, *Sensors and Actuators*, 1985. **8**(1), p. 11-22.
177. Dutta, D. and J.M. Ramsey, *Lab on a Chip*, 2011. **11**(18), p. 3081-3088.
178. Culbertson, C.T., S.C. Jacobson, and J.M. Ramsey, *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(23), p. 5814-5819.
179. Xie, J., Y. Miao, J. Shih, Y.-C. Tai, and T.D. Lee, *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(21), p. 6947-6953.
180. Proczek, G., V. Augustin, S. Descroix, and M.-C. Hennion, *Electrophoresis*, 2009. **30**(3), p. 515-524.
181. Xia, Y.N. and G.M. Whitesides, *Annual Review of Materials Science*, 1998. **28**, p. 153-184.
182. Elveflow. *PDMS et la microfluidique*. Available from: <http://www.elveflow.com/microfluidic-tutorials/fr/pdms-poly-di-methyl-siloxane-et-la-microfluidique/>.
183. Makamba, H., J.H. Kim, K. Lim, N. Park, and J.H. Hahn, *Electrophoresis*, 2003. **24**(21), p. 3607-3619.
184. Nunes, P., P. Ohlsson, O. Ordeig, and J. Kutter, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2010. **9**(2-3), p. 145-161.

185. Hong, W., D. Bai, T.D. Flaim, and R. Puligadda, *Temporary wafer bonding method and cyclic olefin compositions for temporary wafer bonding*. 2013, Google Patents.
186. Begolo, S., G. Colas, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, *Lab on a Chip*. **11**(3), p. 508-512.
187. Cole-Palmer. *Chemical Resistance of Fluoropolymers*. 2006; Available from: <http://www.coleparmer.com/TechLibraryArticle/827>.
188. Rötting, O., W. Röpke, H. Becker, and C. Gärtner, *Microsystem Technologies*, 2002. **8**(1), p. 32-36.
189. MNX. *Hot Embossing*. Available from: <https://www.mems-exchange.org/capabilities/embossing>.
190. Mair, D.A., E. Geiger, A.P. Pisano, J.M.J. Fréchet, and F. Svec, *Lab on a Chip*, 2006. **6**(10), p. 1346-1354.
191. Guber, A.E., M. Heckeke, D. Herrmann, A. Muslija, V. Saile, L. Eichhorn, T. Gietzelt, W. Hoffmann, P.C. Hauser, J. Tanyanyiwa, A. Gerlach, N. Gottschlich, and G.n. Knebel, *Chemical Engineering Journal*, 2004. **101**(1-3), p. 447-453.
192. Becker, H. and C. Gärtner, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. **390**(1), p. 89-111.
193. Cortese, B., M.C. Mowlem, and H. Morgan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **160**(1).
194. Kang, E.T., K.L. Tan, K. Kato, Y. Uyama, and Y. Ikada, *Macromolecules*, 1996. **29**(21), p. 6872-6879.
195. Kim, S.R., *Journal of Applied Polymer Science*, 2000. **77**(9), p. 1913-1920.
196. Shoichet, M.S. and T.J. McCarthy, *Macromolecules*, 1991. **24**(5), p. 982-986.
197. König, U., M. Nitschke, A. Menning, G. Eberth, M. Pilz, C. Arnhold, F. Simon, G. Adam, and C. Werner, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2002. **24**(1), p. 63-71.
198. Lappan, U., H.M. Buchhammer, and K. Lunkwitz, *Polymer*, 1999. **40**(14), p. 4087-4091.
199. Vargo, T.G., P.M. Thompson, L.J. Gerenser, R.F. Valentini, P. Aebischer, D.J. Hook, and J.A. Gardella, *Langmuir*, 1992. **8**(1), p. 130-134.
200. Dargaville, T.R., G.A. George, D.J.T. Hill, and A.K. Whittaker, *Progress in Polymer Science*, 2003. **28**(9), p. 1355-1376.
201. Kumar, M. and Y. Ando, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. **10**(6), p. 3739-3758.
202. Mattox, D.M., *Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing*: William Andrew Pub 2010.
203. Buchanan, D.A., *IBM Journal of Research and Development*, 1999. **43**(3), p. 245-264.
204. Ma, K.-S., F. Reza, I. Saaem, and J. Tian, *Journal of Materials Chemistry*, 2009. **19**(42), p. 7914-7920.
205. Saaem, I., K.-S. Ma, A.N. Marchi, T.H. LaBean, and J. Tian, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010. **2**(2), p. 491-497.
206. Zhang, J., C. Das, and Z.H. Fan, *Microfluidics and Nanofluidics*, 2008. **5**(3), p. 327-335.
207. Deng, J., L. Wang, L. Liu, and W. Yang, *Progress in Polymer Science*, 2009. **34**(2), p. 156-193.
208. Zhou, J., D.A. Khodakov, A.V. Ellis, and N.H. Voelcker, *Electrophoresis*, 2012. **33**(1), p. 89-104.
209. Besson, E., A.-M. Gue, J. Sudor, H. Korri-Youssoufi, N. Jaffrezic, and J. Tardy, *Langmuir*, 2006. **22**(20), p. 8346-8352.

210. Schneider, M.H., H. Willaime, Y. Tran, F. Rezgui, and P. Tabeling, *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(21), p. 8848-8855.
211. Mecomber, J.S., R.S. Murthy, S. Rajam, P.N.D. Singh, A.D. Gudmundsdottir, and P.A. Limbach, *Langmuir*, 2008. **24**(7), p. 3645-3653.
212. Brisset, F., J. Vieillard, B. Berton, S. Morin-Grognet, C.c. Duclairoir-Poc, and F. Le Derf, *Applied Surface Science*, 2015. **329**, p. 337-346.
213. Yang, N.C. and C. Rivas, *Journal of the American Chemical Society*, 1961. **83**(9), p. 2213-2213.
214. Aydin, M. and N. Arsu, *Progress in organic coatings*, 2006. **56**(4), p. 338-342.
215. Ulbricht, M., H. Matuschewski, A. Oechel, and H.G. Hicke, *Journal of membrane Science*, 1996. **115**(1), p. 31-47.
216. Norman S, A., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1996. **100**(1-3), p. 101-107.
217. Braun, D. and K.H. Becker, *Product R&D*, 1971. **10**(4), p. 386-388.
218. Dankbar, D.M. and G. Gauglitz, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. **386**(7-8), p. 1967-1974.
219. Yang, W. and B. Ranby, *Macromolecules*, 1996. **29**(9), p. 3308-3310.
220. Pu, Q., O. Oyesanya, B. Thompson, S. Liu, and J.C. Alvarez, *Langmuir*, 2006. **23**(3), p. 1577-1583.
221. Rånby, B., W.T. Yang, and O. Tretinnikov, *Nucl. Instrum. Meth. B.*, 1999. **151**(1-4), p. 301-305.
222. Deverell, J.A., T. Rodemann, J.A. Smith, A.J. Canty, and R.M. Guijt, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **155**(1), p. 388-396.
223. Deng, J.-P., W.-T. Yang, and B. Rånby, *Macromol. Rapid. Comm.*, 2001. **22**(7), p. 535-538.
224. Wang, H. and H.R. Brown, *J. Polym. Sci. A1.*, 2004. **42**(2), p. 253-262.
225. Wang, H. and H.R. Brown, *Macromol. Rapid. Comm.*, 2004. **25**(11), p. 1095-1099.
226. Jiang, X., X. Luo, and J. Yin, *J. Photchem. Photobio. A.*, 2005. **174**(2), p. 165-170.
227. Bai, H., Z. Huang, and W. Yang, *J. Polym. Sci. A1.*, 2009. **47**(24), p. 6852-6862.
228. Stachowiak, T.B., D.A. Mair, T.G. Holden, L.J. Lee, F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(7), p. 1088-1093.
229. Li, C., Y. Yang, H.G. Craighead, and K.H. Lee, *Electrophoresis*, 2005. **26**(9), p. 1800-1806.
230. Stachowiak, T.B., T. Rohr, E.F. Hilder, D.S. Peterson, M. Yi, F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Electrophoresis*, 2003. **24**(21), p. 3689-3693.
231. Rohr, T., D.F. Ogletree, F. Svec, and J.M.J. Fréchet, *Adv. Funct. Mater.*, 2003. **13**(4), p. 264-270.
232. Decker, C., *Polymer International*, 1998. **45**(2), p. 133-141.
233. Ladner, Y., G. Crétier, and K. Faure, *Journal of Separation Science*, 2012. **35**(15), p. 1940-1944.
234. Ro, K.W., J. Liu, and D.R. Knapp, *Journal of Chromatography A*, 2006. **1111**(1), p. 40-47.
235. Zou, H., X. Huang, M. Ye, and Q. Luo, *Journal of Chromatography A*, 2002. **954**(1-2), p. 5-32.
236. Nischang, I. and O. Brüggemann, *Journal of Chromatography A*, 2010. **1217**(33), p. 5389-5397.

237. Szumski, M. and B. Buszewski, *Journal of Separation Science*, 2009. **32**(15-16), p. 2574-2581.
238. Lewis, F.D., R.T. Lauterbach, H.G. Heine, W. Hartmann, and H. Rudolph, *Journal of the American Chemical Society*, 1975. **97**(6), p. 1519-1525.
239. Ljubica, T., J. Ante, and J. Zvonimir, *Croatica Chemica Acta*, 2009. **82**(4), p. 825-832.
240. Ladner, Y., A. Bruchet, G. Cretier, V. Dugas, J. Randon, and K. Faure, *Lab on a Chip*, 2012. **12**(9), p. 1680-1685.
241. Duffy, D.C., J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides, *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(23), p. 4974-4984.
242. Tennico, Y.H., M.T. Koesdjojo, S. Kondo, D.T. Mandrell, and V.T. Remcho, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **143**(2), p. 799-804.
243. Wheale, S.H. and J.P.S. Badyal, *Polymer*, 2011. **52**(23), p. 5250-5254.
244. Chen, R.T., B.W. Muir, G.K. Such, A. Postma, R.A. Evans, S.M. Pereira, K.M. McLean, and F. Caruso, *Langmuir*, 2010. **26**(5), p. 3388-3393.
245. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001. **40**(11), p. 2004-2021.
246. Coudert, P., *Techniques de l'ingénieur Chimie pharmaceutique*, 2014 (ref. article : pha1005).
247. Liu, Y., N.C. Cady, and C.A. Batt, *Biomedical microdevices*, 2007. **9**(5), p. 769-776.
248. Mehta, G., J. Lee, W. Cha, Y.C. Tung, J.J. Linderman, and S. Takayama, *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(10), p. 3714-3722.
249. Xu, B.-Y., X.-N. Yan, J.-J. Xu, and H.-Y. Chen, *Biomicrofluidics*, 2012. **6**(1), p. 16507-165078.
250. Sunkara, V., D.K. Park, H. Hwang, R. Chantiwas, S.A. Soper, and Y.K. Cho, *Lab on a Chip*, 2011. **11**(5), p. 962-965.
251. Cortese, B. and H. Morgan, *Langmuir*, 2012. **28**(1), p. 896-904.
252. Roy, S., C.Y. Yue, Y.C. Lam, Z.Y. Wang, and H. Hu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **150**(2), p. 537-549.
253. Roy, S. and C.Y. Yue, *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**(5), p. 432-443.
254. Johansson, B.-L., A. Larsson, A. Ocklind, and Å. Öhrlund, *Journal of Applied Polymer Science*, 2002. **86**(10), p. 2618-2625.
255. Steffen, H., K. Schroder, B. Busse, A. Ohl, and K.D. Weltmann, *Plasma Processes and Polymers*, 2007. **4**, p. S392-S396.
256. Nikolova, D., E. Dayss, G. Leps, and A. Wutzler, *Surface and Interface Analysis*, 2004. **36**(8), p. 689-693.
257. Hwang, S.-J., M.-C. Tseng, J.-R. Shu, and H. Her Yu, *Surface and Coatings Technology*, 2008. **202**(15), p. 3669-3674.
258. Laib, S. and B.D. MacCraith, *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(16), p. 6264-6270.
259. Raj, J., G. Herzog, M. Manning, C. Volcke, B.D. MacCraith, S. Ballantyne, M. Thompson, and D.W.M. Arrigan, *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(8), p. 2654-2658.

6 Strategy for the microsystem development

As explained in the bibliographic chapter, environmental monitoring needs simple, sensitive and portable devices to perform fast and low-cost analysis of traces of pollutants like chemical or pharmaceutical compounds. Microfluidics is a useful tool to develop miniaturized system to achieve this goal by developing devices integrating all analysis steps. Despite many advantages, it has to be noticed that some problematics are inherent to the microfluidic format. First, the sensitivity and selectivity of the analysis have to be preserved compared to other analytical methods traditionally used (described in the first part of the bibliographic chapter). Moreover, analytes or other molecules present in the sample often adsorb on polymers used for the fabrication of microsystems. Finally, the flows inside the microchannel have to be controlled. To respond to these problematics and ensure a reliable analysis, suitable surface treatments have to be applied on the channel walls.

These different problematics explain that even though some miniaturized devices have been developed, only few micro-total analysis systems (μ TAS) have been reported and successfully used for analysis of real environmental samples. Usually, utilization of analytical microsystems for complex sample analysis requires an external pretreatment or preconcentration step to achieve a suitable limit of detection.

6.1 Proposed strategy

We want to develop a microsystem integrating the different analysis steps while maintaining a rather simple design to minimize costs and facilitate utilization (Figure 67). One challenging obstacle for the development of complete analytical microsystems is the target preconcentration, especially for trace analysis, where an important volume have to be concentrated in order to have a quantifiable amount of target compounds.

The key feature of our system is the integration of a small region in the channel containing selective ligands to preconcentrate the target. This region allows the extraction of the analyte from the rest of the sample and its continuous preconcentration. The target should then be released from the preconcentration region, and flows towards the detection zone, for detection by fluorescence or electrochemistry. The preconcentration region has to be well-defined and the target compounds have to be released rapidly and simultaneously from the preconcentration zone, in order to limit diffusion and keep the target analytes concentrated in a well-focalized band for detection.

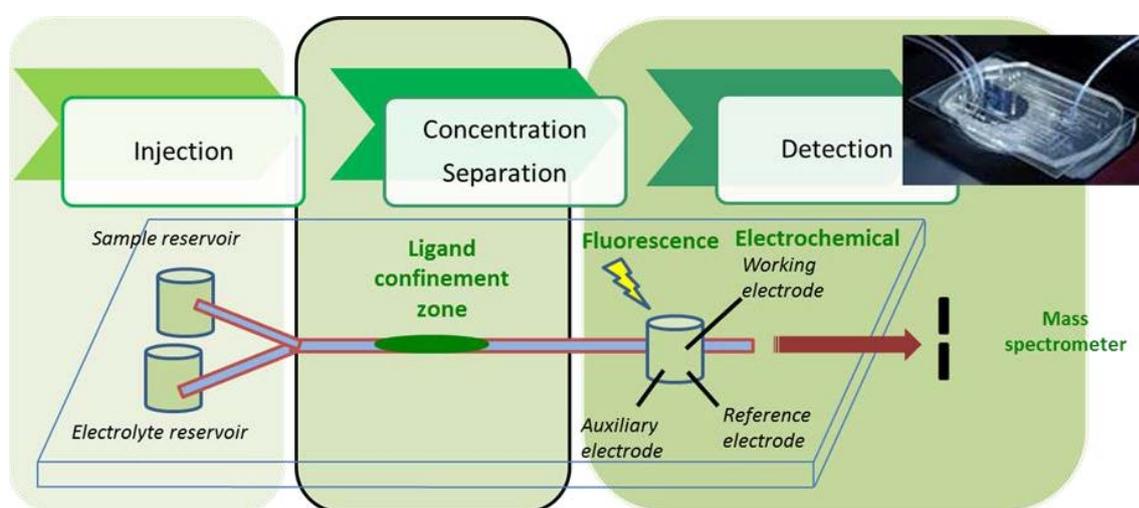


Figure 67 : Scheme of the microsystem integrating a region containing aptamers for preconcentration of the target

Another original aspect of this microdevice is the use of aptamers as selective ligands. Despite their many advantages like stability, high specificity and strong interaction (described in the second part of the bibliographic chapter), few effective applications in miniaturized systems for on-site analysis have been reported.

6.2 Functionalization methods developed

In order to answer to the different problematics, 2 functionalization types have to be performed in the channel:

- Local surface modification to graft selective ligand for preconcentration, essential to preserve sensitivity
- Global surface modification, to avoid adsorption and control flows

Functionalization methods used should be compatible with the surface reactivity of the microsystem material we want to use. COC and THV polymers were chosen for their excellent inertness and optical properties. They have a transparency comparable to glass, they resist to most solvents and extreme pH, and they can be mass-produced at low cost. However, whereas their poor surface reactivity is an advantage in terms of resistance to chemicals, it is a drawback for surface treatment, as no easily derivable functional groups are present at their surface. In order to functionalize these materials, new methods have been developed (Figure 68), based on a combination of plasma or electrochemistry processes with a “click” chemistry reaction, the copper-catalyzed Huisgen cycloaddition between an azide and an alkyne (CuAAC reaction).

In a first time, plasma processes have been used to incorporate bromine groups on the entire material surface, acting as anchoring groups for further functionalization. Bromine groups are then substituted by azide groups, and the CuAAC reaction is performed on the entire substrate surface (Chapter II).

In a second time, an electrochemical method was developed to locally carbonize the THV, leading to the local grafting of aptamers in microchannels. Carbonization gives local conductive properties to the material, allowing the grafting of a diazonium salt bearing an azide group, further derived using CuAAC reaction to locally graft the selective ligand (Chapter III).

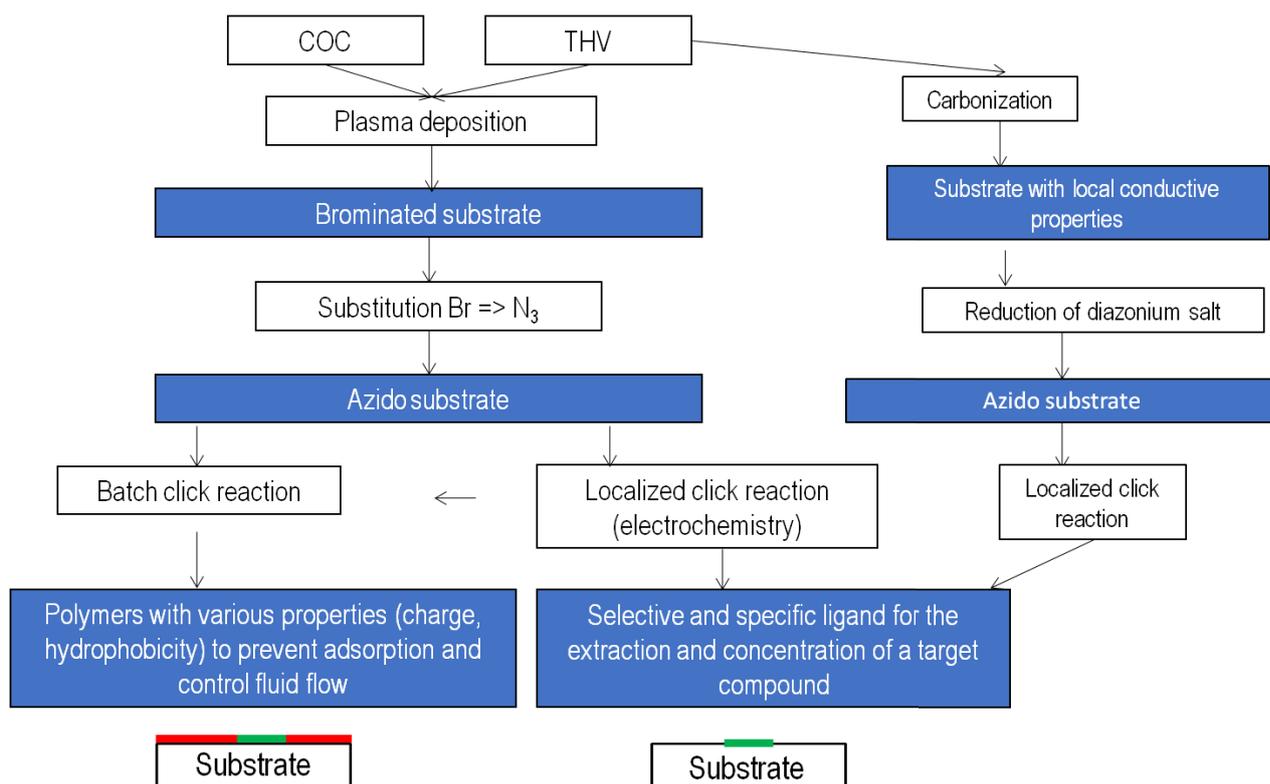


Figure 68 : Scheme of the different functionalization strategies developed for COC and THV materials

Finally, in order to have a preconcentration area with a more important density of ligands to increase the preconcentration efficiency, creation of a 3D network encapsulating aptamers inside a microchannel by sol-gel methods has also been explored (Chapter IV).

Chapter II

Surface functionalization of
polymeric microfluidic
materials by plasma and click
chemistry processes

1 Introduction

In this chapter, we report the development of a robust method based on plasma polymerization and “click chemistry” for the functionalization of two thermoplastic materials for microfluidic applications, the cyclic olefin copolymer (COC) and the fluoropolymer Dyneon THV.

Plasma polymerization refers to the formation of a thin film deposited over materials under the influence of a plasma, also termed as “Glow Discharge Polymerization”. This technique offers an attractive and highly versatile alternative for preparing robust and functional polymer coatings on almost any substrate [1-3]. Plasma polymerization allows using functional monomers which do not contain polymerizable groups such as vinyl groups [4]. Chen and Friedrich reported plasma bromination for the surface modification of polypropylene materials. This method is based on the introduction of bromoform or 1-bromopropane in an argon plasma to produce a brominated polypropylene surface monofunctionalized with C-Br groups [5-7]. In contrast to plasma modification processes based on other halogen precursors (fluorine, iodine, chlorine), the bromination is very selective and shows a high yield in the formation of C-Br groups [8].

Chen’s group used this brominated polypropylene surface for secondary reactions, leading to surfaces with specific chemical functionalities [7]. Firstly, the bromide groups undergo nucleophilic substitution with azide groups in the presence of NaN_3 . Secondly, alkynes were immobilized on polypropylene surface by the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) [9]. Azides and alkynes are convenient to introduce, are mutually reactive, and the reaction is not pH dependent [10-14]. Furthermore, the regioselective Cu(I) catalyst used in CuAAC reactions is resistant to solvent and pH changes, and the triazole products are formed irreversibly and often quantitatively. The only report of CuAAC reactions on COC surfaces have been realized by Faragher et al. via ozone plasma treatment [10], but the stability of the hydrophilic character was not satisfactory [15].

In this study, we build up on the work by Chen et al. [7] to demonstrate for the first time the activation of COC material by plasma polymerization process to create brominated functionalities. The plasma polymerization process was performed with 1-bromopropane as

the brominated precursor introduced in the vapor phase, and optimized in terms of discharge power and deposition time. Moreover, the analysis of vapor phase during plasma deposition by mass spectrometry was achieved to control the fragmentation of brominated precursor during the polymerization process. The brominated COC surface was further functionalized by surface “click” chemistry, so as to immobilize fluorescent dyes that could demonstrate the efficiency of the overall functionalization procedure. The different steps of the functionalization are presented in Figure 69.

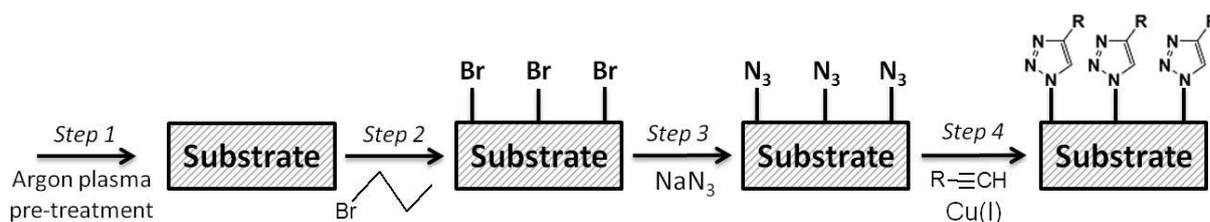


Figure 69 : Schematic representation of plasma polymer deposition process and « Click » chemistry undergone on COC and THV substrates surfaces

At each step of the functionalization process, the surface of the COC material was characterized in terms of hydrophilicity, stability, thickness, homogeneity and chemical composition of the deposit layer, by water contact angle measurement, ellipsometry, electrochemical microscopy (SECM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), infrared (IR) and fluorescence microscopy.

After the validation of the overall functionalization procedure on COC, we demonstrated that it can be used for the surface modification of an emerging fluoropolymer for microfluidic, Dyneon THV. As for COC, the modification was characterized by contact angle, IR, XPS and fluorescence microscopy.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Cyclic olefin copolymer (Topas[®] 6013) and Dyneon THV plates were graciously provided by Laboratoire des Macromolécules et Microsystèmes en Biologie et Médecine (Institut Curie, Paris, France). COC sheets of 20 cm X 20 mm X 350 μ m dimensions were obtained at 290°C from the COC pellets. THV pellets (Dyneon THV 500G) were first cleaned by sonication in water and ethanol for 30 min and then dried under a flow of purified argon. A few grams of the pellets were then moved onto a commercial silicone mold and melted at 210°C overnight in a vacuum oven to obtain flat sheets with a thickness of approximately 2 mm. The sheets were then cleaned with isopropanol and cut into the desired sizes for further use as polymer substrates for plasma treatments.

Glassy carbon plates 1 cm X 1 cm and 1 mm thick were used as substrates for scanning electrochemical microscopy (SECM) experiments. Polished stainless steel plates 1.5 cm X 1.5 cm and 1 mm thick were used as substrates for ellipsometry experiments.

2.2 Plasma polymer deposition

The argon plasma pretreatment and plasma bromination were done using the Flarion Series FLR300 (13.56 MHz – 300 W) apparatus provided by Plasmionique. This source was used for plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) which consists in depositing a solid material in the form of a thin layer (thickness of a few nanometers up to micrometers) onto a substrate, from chemical reactions implying gaseous precursors [16]. In PECVD, the precursors are usually dissociated by collisions with reactive species (electrons, ions, radicals, neutrals ...) such that the fragments can be transported and deposited on all surfaces exposed to the plasma, including the substrate. In this work, argon was used as the carrier gas and 1-bromopropane as the precursor.

Prior to plasma deposition, each substrate was thoroughly rinsed with EtOH and Milli-Q water (≥ 18.2 M Ω) and then dried under a stream of nitrogen gas. Then, surfaces were cleaned by argon pretreatment to remove low molecular weight fragments present on the surface [17, 18]. The parameters chosen for optimal pretreatment were a plasma power of

20 W, an argon flow rate of 75 standard cubic centimeters per minutes (sccm) and a base pressure of 0.3 mbar for 5 min. Before each pretreatment step, a sweep-through purging with Ar (5 min at a flow rate of 75 sccm) was used to decrease the level of concentration of air or contaminants in the reactor to avoid the presence of residual gases. Then, a flask containing 1-bromopropane monomer was connected to the reactor chamber via a stainless steel line heated to avoid eventual condensation of the precursor and the monomer flow was controlled via a manual valve. The parameters chosen for subsequent brominated film deposition onto pretreated COC and THV substrates were an argon flow rate of 75 sccm and a monomer pressure of 0.3 mbar. The plasma power and deposition time were further varied from 20 to 100 W and from 5 min to 30 min, respectively. After deposition, the reactor was immediately pumped down to atmospheric pressure before venting.

2.3 Procedure for azide functionalization of Br-modified substrates

Br-modified COC and THV substrates were previously washed with EtOH and H₂O and then immersed in a solution of EtOH/H₂O (1:1) containing NaN₃ (1M, pH 5, 5 % NaI) for 6h at 50°C [7]. The samples were removed and washed with EtOH and Milli-Q water (≥ 18.2 M Ω) and dried under an argon gas flow.

2.4 Procedure for CuAAC reactions of N₃-modified COC substrates with a fluorescent dye

A solution containing 5mM CuSO₄, 40mM sodium ascorbate and 1mM of Acetylene-Fluor 488 (AF) was prepared in EtOH/H₂O (1:1).

N₃-modified COC or THV substrates were immersed in the above mentioned solution and CuAAC reactions were proceeded at room temperature for 24h in the dark [7]. The resulting modified substrates were washed with copious amounts of EtOH and Milli-Q water, and then dried under a flow of purified argon.

2.5 Characterization techniques

2.5.1 Br-modified surfaces

The mass spectrometer used for the analysis of the chemical composition of plasma bromination was a Pfeiffer Vacuum Prisma Plus (QME 220) with a secondary ion accelerator. Static water contact angle measurements were done on Br-modified polymer surfaces with a GBX Instruments Digidrop contact angle meter at room temperature. A droplet of 3 μL was placed slowly on the surface using pendant drop technique and after 30 s, the contact angle was measured. The wettability was characterized by polynomial extrapolation of the drop shape on the analyzed surface. The reported contact angles are averages of at least three measurements at different locations. The standard deviation of the obtained data was used for uncertainties.

The thickness of the brominated coating on substrate surface was evaluated with an ellipsometer UVISSEL NIR (HORIBA JOBIN YVON) with the following parameters : spectral range = 270-2100 nm, polarization = 45°, angle of incidence = 70°. Ellipsometry is based on variation of light polarization, which is reflected by the sample [19]. As COC and THV substrates do not reflect light, stainless steel material was chosen as model substrate to determine the thickness of brominated deposits.

SECM experiments were carried out using Princeton Applied Research equipment (UNISCAN Model 370) and have been described previously [20, 21]. A platinum microelectrode (25 μm diameter) was chosen as the tip and was from Uniscan Instruments. SECM images were performed in the feedback mode and were obtained by maintaining the tip at a constant z position chosen by performing approach curves experiments, scanning in the x-y plane over the desired area (constant-height mode of SECM) and monitoring changes in the steady-state current of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ reduction at -0.5 V vs. Ag/AgCl as the tip travels. A RG value of 20 was evaluated before each experiment by optical microscopy ($\text{RG} = a_{\text{glass}}/a$ with a = platinum tip radius and a_{glass} = glass radius). SECM experiments, extensively described in the literature [21, 22], were used on glassy carbon substrates for the determination of the homogeneity of the deposit polymer. This method gives information about sample conductivity and topography.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis was done on COC and THV surfaces using a PHI 5600-ci spectrometer (Physical Electronics) with an Mg K α source (1253.6 eV) at 300 W and at an angle of 45° from the wafer normal. The analyzed surface was evaluated at 0.005 cm². For each sample, three spots with a dimension of 800 μ m X 800 μ m were analyzed.

2.5.2 N₃- and Acetylene-Fluor 488 (AF) - modified surfaces

FTIR-ATR spectra were recorded using a JASCO FT/IR-7000 Fourier Transform Infra-Red Spectrometer equipped with MCT detector. For each spectrum, 500 scans were accumulated with a spectral resolution of 4 cm⁻¹. A bare substrate was used to record the background reference.

Fluorescence microscopy images of COC and THV slides were recorded on an inverted fluorescence microscopic system (Axio Observer A1, Zeiss) equipped with a 100 W metal halide lamp, 488 nm excitation filter and 525 nm emission filter (filter set 76 HE, Zeiss). A CCD digital camera was combined with HIRIS software (RD Vision) for detection processing.

3 Modification of COC surfaces

In this study, plasma polymerization was used to activate COC surfaces with brominated functionalities in order to undergo “click” chemistry on COC surfaces. This process follows four steps (Figure 69), i.e. (step 1) argon plasma pretreatment (20 W, 5 min) to remove low-mass weight fragments present on the COC surface, (step 2) plasma bromination to get a brominated film on the substrate, (step 3) nucleophilic substitution of resulting bromine groups with azide groups in the presence of NaN_3 to form azide termination and (step 4) fluorescent dye immobilization onto COC surfaces *via* CuAAC reaction.

Particular attention was held on the study of the brominated deposit process (step 2) on pretreated COC surfaces (step 1) under plasma bromination. Water contact angle measurements, ellipsometry, SECM, and XPS analyses were used to determine the wettability, the stability, the thickness, the homogeneity and the chemical nature of the brominated deposit layer. Infrared and fluorescence microscopy analyses were further conducted to study the reactivity of azide-modified COC surfaces (step 3) toward CuAAC reaction (step 4).

3.1 Evaluation of the precursor fragmentation under argon plasma

Prior to study the surface functionalization of COC materials by plasma, the investigation of the behavior of the 1-bromopropane precursor under argon plasma at different discharge power values was achieved with a quadrupole mass analyzer in order to help for better understanding and optimizing the polymerization process. Generally, an increase in plasma discharge power results in an increase in the monomer fragmentation and deposition rate [1]. Indeed, all monomer molecules become extensively fragmented in high-power plasmas, frequently into single atoms [5]. These atoms and small fragments then recombine randomly in first-order processes, rearrange and again become activated, fragmented, and so on. The chemical composition of the resulting deposit depends strongly on the fragmentation degree of the precursor. So as to obtain a chemically reactive surface for a further interfacial immobilization, a less extensive fragmentation of the monomer is required [6, 8]. Based on this principle, a study of the decomposition of 1-bromopropane during plasma bromination for different plasma discharge power values ranging from 20 to 100 W was achieved with a

quadrupole mass analyzer. Mass spectra of the precursor were obtained *in situ* in different polymerization conditions. However, the mass spectrometer is also responsible for the precursor fragmentation during plasma deposition and has to be considered in the analysis of mass spectra.

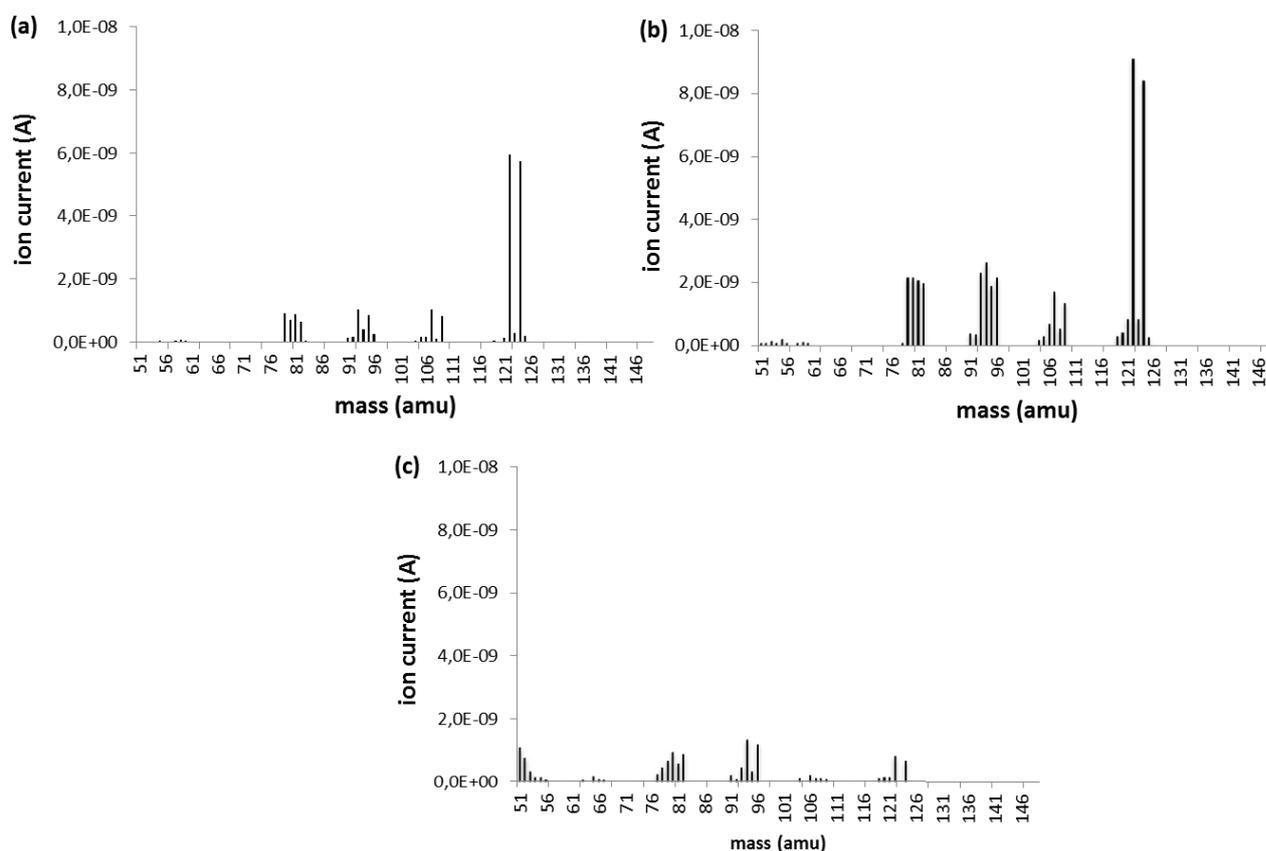


Figure 70 : Mass spectrum measured at a 0.3 mbar 1-bromopropane pressure with an argon plasma (a) off (fragmentation pattern of precursor) and (b) on with a power of 20 W and (c) 100 W.

Figure 70a shows the mass spectrum obtained before supplying power into the discharge tube. This corresponds to the so-called MS ‘fragmentation pattern’ of 1-bromopropane gas. The spectrum can be roughly decomposed in two distinct m/z regions. Relatively large fragments of 1-bromopropane molecules (region 1) are formed by the electron impact in the mass spectrometer : the peaks at $m/z = 122$ and 124 ($M+2$) are the molecular ion (M) containing bromine-79, and the one containing bromine-81, respectively, with about the same intensity as bromine’s two major isotopes have about equal abundance. The presence of peaks in a second region (region 2) at m/z ranging from 79 to 109 shows the characteristic

pattern of isotopes formed by the fragmentation of molecular ion into bromine ions ($m/z = 79$ to 81), CHBr^+ ($m/z = 92-94$) and $\text{C}_2\text{H}_4\text{Br}^+$ ($m/z = 107-109$).

When the argon plasma is on with an input power of 20 W, an increase of 30 % of the peak intensities of the fragmentation pattern (region 2) was observed indicating that the fragmentation of molecular ion is induced by the plasma discharge and cannot be neglected compared to the fragmentation that occurs in the mass spectrometer (Figure 70b). Furthermore, smaller fragments appear in the mass region (region 3) from 26 to 57 (results not shown). These peaks, measured with a 40-fold increase, can be attributed to C_2H_2 ($m/z = 26$), C_2H_3 ($m/z = 27$) and C_3H_3 ($m/z = 57$) indicating that the precursor is broken into smaller fragments. However, the fragments of 1-bromopropane molecules (region 1) are always observed indicating that 1-bromopropane molecules are present in high concentration in the argon plasma.

When the plasma power was varied from 40 to 60 W, the fragmentation pattern of the precursor was still observed with comparable intensity although the peak intensities of smaller fragments ($m/z < 40$) were increased by 10 %. These results suggest that increasing the plasma power from 0 to 60 W leads to an increase of the precursor fragmentation. However, 1-bromopropane molecules are still present at a significant concentration in the plasma. Therefore, plasma bromination produces monomer radicals, fragments radicals and radical-sites in vapor phase and at solid surfaces as it will be shown in the following part. These products may recombine to form a crosslinked copolymer in a non-classic way or initiate a classical chain-growth polymerization to form a polymer by continuous addition of precursor molecules [5].

When the plasma power was higher than or equal to 80 W, the intensity of all peaks located at $m/z \geq 75$ decreased drastically as shown in Figure 70c. Identical variations were observed for peaks attributed to C_2H_2 ($m/z = 26$), C_2H_3 ($m/z = 27$) and C_3H_3 ($m/z = 57$) indicating that these species are broken into even smaller fragments at high plasma power.

These observations show the strong effect of plasma power value on 1-bromopropane fragmentations during PECVD process. The brominated precursor becomes more and more fragmented when the plasma discharge power increases from 20 to 60 W. For an applied power higher than or equal to 80 W, the precursor is completely broken into small

fragments. However, mass spectra can't give any hypothesis about the chemical nature of what will be deposited on the COC surface.

3.2 Effect of the plasma power on the brominated polymer deposition on COC surfaces

For this study, the deposition time was fixed to 10 minutes and the plasma power was varied from 20 to 100 W. The thickness, stability, homogeneity and chemical composition of the deposited layer were evaluated by different characterization techniques.

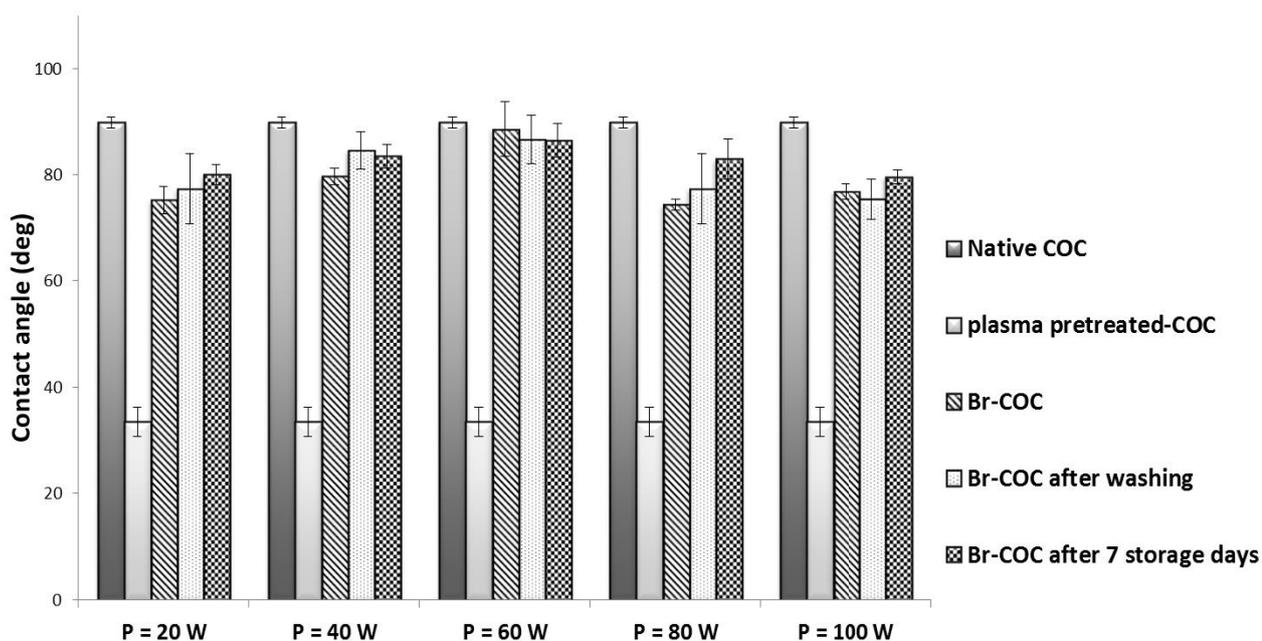


Figure 71 : Effect of plasma discharge power on water droplet contact angles (n = 3) for all steps of the brominated deposit process on COC surfaces (Plasma power from 20 – 100 W, 10 min deposition time, 75 sccm argon flow and 0.3 mbar precursor pressure).

The variation of the COC wettability was evaluated by water contact angle measurements. Figure 71 shows the water contact angles measured on native COC surfaces, on a cleaned COC surface after argon plasma treatment (step 1) and on a Br-modified COC surfaces after plasma bromination (step 2) followed by several washings. As expected, the argon plasma pretreatment reduced the contact angle from 90° to 35° as compared to native COC [23-26].

Indeed, COC surfaces become more hydrophilic due to the presence of high surface oxygen-containing functional groups on the polymer backbone after argon plasma pretreatment [15, 27]. It has to be noticed that the presence of oxygen moieties at the topmost surface layer can be due to excitation of residual air present in the reactor or to post-oxidative reactions after the release of the sample at atmospheric pressure. Stability of these surfaces was evaluated by re-measuring the contact angle after storage in air at 20°C for 7 days. An important variation was observed for plasma power ranging from 20 to 40 W ($\Delta\theta = 20^\circ$) whereas no measurable changes were observed with a plasma discharge power varying from 60 to 100 W. This indicates that a surface with stable hydrophilic properties is obtained only for high power (≥ 60 W). However, as this first pretreatment step is directly followed by the plasma bromination step, and as Roy *et al.* have also observed that plasma changes the COC surface roughness when a high power is applied [15, 28], an applied power of 20 W during the plasma pretreatment step was favored for the following experiments to minimize the effects of plasma on the roughness of COC surfaces.

Then, the hydrophilic properties of the Br-modified COC surfaces were estimated after different washing treatments and storage times. After plasma bromination, the contact angle increased (from $35.2^\circ \pm 2.9^\circ$ to $88.5^\circ \pm 1.7^\circ$ for 60 W), indicating the covering of COC surface by brominated deposit. When high plasma power was applied, contact angles decreased until 75° maybe due to an abrasive effect of plasma which changes the properties of the brominated deposit. The stability of the surfaces was evaluated by measuring the contact angle after extensive washing step with EtOH/H₂O (1/1 v/v) and storage at 20°C in air for 7 days. No measurable changes were observed, indicating the good stability of the adhesion of the brominated film to the polymeric material whatever the plasma power used.

The thickness of the resulting brominated deposit was evaluated by ellipsometry. Measurements were performed on polished stainless steel material as explained previously (part 2.6) to estimate the deposit thickness on COC materials. Indeed, plasma deposition process is supposed to be similar for all materials [1]. The deposit thickness varied from 2.2 ± 0.4 nm to 303.7 ± 8.8 nm for plasma discharge power ranging from 20 to 100 W, showing a maximum of 345.0 ± 8.7 nm at 60 W. This evolution is consistent with an abrasive effect of the brominated plasma at high power on the deposit layer as previously assessed by water contact angle measurements. Ellipsometry analysis also allowed determining the refractive

index of the deposit layer. Values of 1.678 and 1.728 were observed for plasma powers in the ranges of 20-60 W and 80-100 W, respectively, indicating some changes in the physico-chemical properties of the surface after plasma deposition at high plasma power.

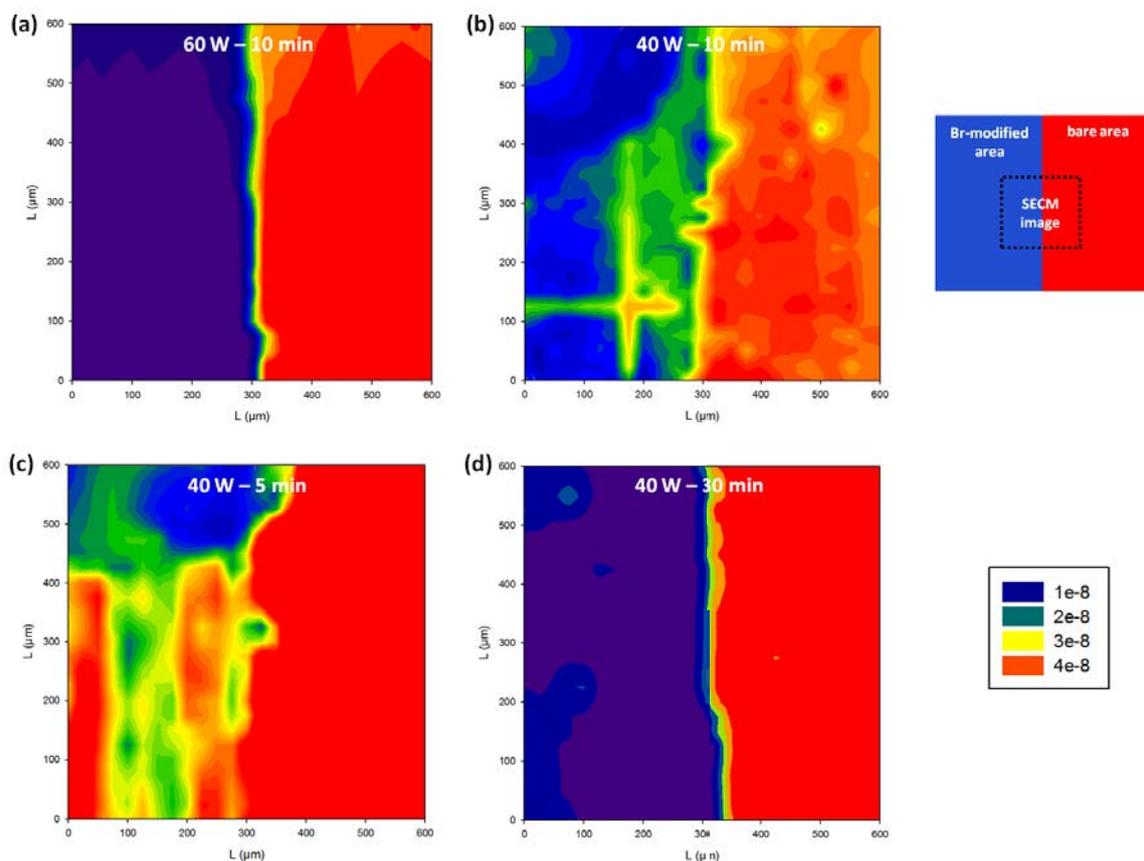


Figure 72 : SECM images of a half-modified glassy carbon surface by brominated deposit (a) for 60 W-10 minutes, (b) 40 W-10 minutes, (c) 40 W-5 minutes and (d) 40 W-30 minutes, obtained with a 25 μm radius tip ($i_{T,\infty} = 21 \text{ nA}$) in 5 mM $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ / 0.1 M KCl solution ($E_{\text{tip}} = -0.5 \text{ V/AgCl/Ag}$). The tip was scanned at 25 $\mu\text{m/s}$.

Further characterizations of the Br-modified surface were achieved by SECM imaging to evaluate the homogeneity of the plasma grafted layer. To this end, a half of the glassy carbon substrate was activated with brominated deposit, the other half of the substrate being protected from plasma deposition with a mask (bare surface). As previously, plasma deposition process is supposed to be similar for carbon and COC substrates. The SECM image shown in Figure 72a was obtained by scanning the tip over the glassy carbon substrate laterally along X and Y axis over the interface between bare and functionalized areas. The dimensions of the analyzed square region were 600 μm X 600 μm . Red color represents a tip

current higher than the steady-state current in solution (far from the surface) ($i_T > i_{T,\infty}$), i.e. the tip travels above a conductive area. On the other hand, blue color means $i_T < i_{T,\infty}$ indicating the tip current measured over a Br-modified glassy carbon surface at 60 W which is insulating. It can be shown that the activated layer is homogeneously formed on the area of substrate in contact with 1-bromopropane (resolution $\approx 25 \mu\text{m}$). Similar results were obtained for a plasma discharge power of 80 and 100 W, whereas the homogeneity of the Br-modified glassy carbon surface is not acceptable for 40 W (Figure 72b). Moreover, no deposit layer was observed for 20 W. These SECM images show that the use of plasma discharge power in the ranges of 60 - 100 W gives a homogeneous brominated deposit. However, a high power of 80 and 100 W modifies the physico-chemical properties of the deposited layer by abrasion effects as evidenced by ellipsometry. Thus, a discharge power of 60 W would seem to be the optimal power to get a homogeneous and robust brominated deposit on COC substrates and also to limit the abrasive effect of plasma.

Table 1 : Elemental atomic ratios by XPS on COC surfaces before and after the deposition of 1-bromopropane (Plasma polymer deposition : 60 W plasma discharge power, 10 min deposition time, 75 sccm argon flow rate and 0.3 mbar precursor pressure)

Sample	C (%)	O (%)	Br (%)
Bare COC surface	86.7	11.4	-
Br-modified COC surface	75.4	15.4	8.7

Finally, the chemical composition of the deposited layer on COC substrate was evaluated by XPS experiments in order to characterize the presence of bromine. Table 1 shows the percentage of bromine, carbon, and oxygen atoms obtained in the optimal deposition conditions (60 W, 10 min). The average atomic concentration of bromine was 8.7 % and the average atomic concentration of bromine relative to that of carbon (bromine to carbon atomic ratio Br/C) of the Br-modified COC surfaces was 11.4 %. Thus, the results show that a significant part of bromine was present in the deposited layer. However, according to the chemical structure of 1-bromopropane the expected theoretical bromine to carbon atomic

ratio should be 33 %. The discrepancy between theoretical and experimental Br/C values suggests that Br is split off from precursor during plasma bromination resulting in the formation of a highly reticulated brominated film. Moreover, it can be seen that the carbon content decreased after plasma bromination indicating the presence of brominated deposit on COC. The increase in oxygen may be induced either by the effect of argon plasma treatment on COC surfaces or by the effect air storage (postplasma reaction) [15, 28] as carboxylic and hydroxides groups can be incorporated in the polymer backbone. Oxygen is an unavoidable contaminant, which could be introduced by the residual oxygen in the reaction chamber or by the reaction of long-lived free radicals with oxygen upon release at air after plasma treatment. Occhiello et al. [29] have contributed to the long debate and showed by comparing static secondary ion mass spectra of samples treated in $^{18}\text{O}_2$ plasmas and aged in $^{16}\text{O}_2$ with those treated in $^{16}\text{O}_2$ plasma and aged in $^{18}\text{O}_2$, that the introduction of oxygen due to the reaction of active sites with the atmospheric oxygen was negligible. So, XPS experiments confirm and validate the adhesion of a brominated deposit by plasma bromination on COC substrate. Furthermore, XPS analysis revealed an excellent homogeneity of the deposited film in term of chemical composition.

In conclusion, all these results show that the thickness and the homogeneity of the brominated polymer on COC surfaces depend strongly of the plasma discharge power. Low powers in the range of 20-60 W have to be used to limit the abrasive effect of plasma on the brominated deposit. According to optimization of the plasma power previously performed, an excellent robustness and homogeneity of brominated deposit was obtained with a plasma power of 60 W, which can be defined as being the optimal one for a deposition time of 10 minutes.

3.3 Effect of deposition time

In this part of the work, the deposition time influence on the stability, thickness, homogeneity and chemical composition of the deposit layer onto COC surfaces was studied. Deposition times were varied from 5 to 30 min for two applied discharge powers of 40 and 60 W. High powers in the 80 – 100 W range were not used due the strong plasma abrasive

effect on brominated deposit whereas a plasma power of 20 W is not sufficient to get a brominated deposit on COC surface as previously shown.

Contact angle measurements were performed before and immediately after plasma bromination (step 2) and showed that no measurable changes were observed for a deposition time of more than 5 minutes (charts not shown similar to those observed in Figure 2). Water contact angles vary from $33.6^\circ \pm 2.1^\circ$ to $86.9^\circ \pm 2.9^\circ$, (similar to the previous part) whatever the plasma power and deposition time. Moreover, no further changes were observed after several washing steps with EtOH/H₂O (1/1 v/v) and storage for 7 days, indicating the good stability of the adhesion of the brominated polymer film to the polymeric material.

Ellipsometry experiments have shown that the deposit thickness on stainless steel increases linearly with deposition time. For a plasma power of 40 W, the measured thickness is 64.2 ± 4.6 nm, 111.7 ± 4.7 nm and 334 ± 7.4 nm for 5, 10 and 30 minutes, respectively. These results show that the introduction of bromine atoms increased linearly with time as already observed onto poly(propylene) surfaces by Friedrich *et al.* [8]. For a power of 60 W, the measured thickness is 175.2 ± 9.6 nm, 345.0 ± 8.7 nm and 643.0 ± 4.4 nm for 5, 10 and 30 minutes, respectively. The value of 643 nm obtained after 30 minutes of coating is below expected value in the range of 1030 – 1040 nm as deduced from data measured after 5 and 10 minutes of deposition on the basis of a linear model. This non-monotonic evolution is consistent with the appearance, at high power, of an abrasive effect of brominated plasma that takes over film growth for long-time deposition. Similar measured thicknesses were obtained for two plasma bromination conditions: 40 W - 30 minutes and 60 W - 10 minutes. A similar refractive index value of 1.678 was found for various deposition times at each plasma power less than or equal to 60 W, indicating that the deposition time has no effect on the physico-chemical properties of the surface. The data allow stating that the deposit thickness can be easily modulated by varying the plasma bromination time without modifying its chemical properties. A similar brominated deposit was obtained for two plasma power values by simply adjusting the deposition time.

As previously reported, the evaluation of the surface homogeneity of the deposit layer was also observed by SECM analyses. It can be shown that the homogeneity of the activated layer increases with the deposition time (Figure 72). For a 40 W plasma power, the

homogeneity of the Br-modified surface was not sufficient for 5 and 10 minutes as shown in Figure 3b and c since conductive areas are still present in the modified zone, but appeared satisfying for 30 minutes (Figure 72d), with a surface topography similar to that obtained in Figure 3a for a plasma bromination of 60 W during 10 minutes (optimal conditions). For a 60 W plasma bromination, the surface is entirely modified in less than 5 minutes. The Br-incorporation rate increases with the power [6] when the plasma abrasive effect is negligible (in the ranges of 20 – 60 W as previously shown) and may explain the difference in surface homogeneity and deposition time observed for different discharge power values and for the same deposition time. However, to overcome the loss of material after extensive washing step, a minimum deposition time of 10 minutes has been chosen due to the weak thickness of brominated deposit on COC substrate observed for 5 minutes.

In conclusion, the deposition time has a significant effect on the homogeneity of the deposit layer on substrate surfaces for low plasma power and has to be perfectly controlled. A robust and homogenous deposit on COC surface was obtained for two plasma bromination conditions : 40 W – 30 minutes and 60 W – 10 minutes. A comparison of the reactivity of these two resulting brominated deposits to CuAAC reactions will be studied in the following part.

3.4 Modification of the brominated-COC surface by click chemistry

Having optimized the functionalization of COC by plasma, the potential of “click” chemistry on such surfaces was investigated. In order to evaluate the reactivity of Br-modified COC surfaces, a fluorescent dye (AF) was coupled to the surface by CuAAC reactions after derivatization of the surface with azido groups following the procedure described in parts 2.4 and 2.5. COC surface after CuAAC reaction was examined by fluorescence microscopy and FTIR-ATR.

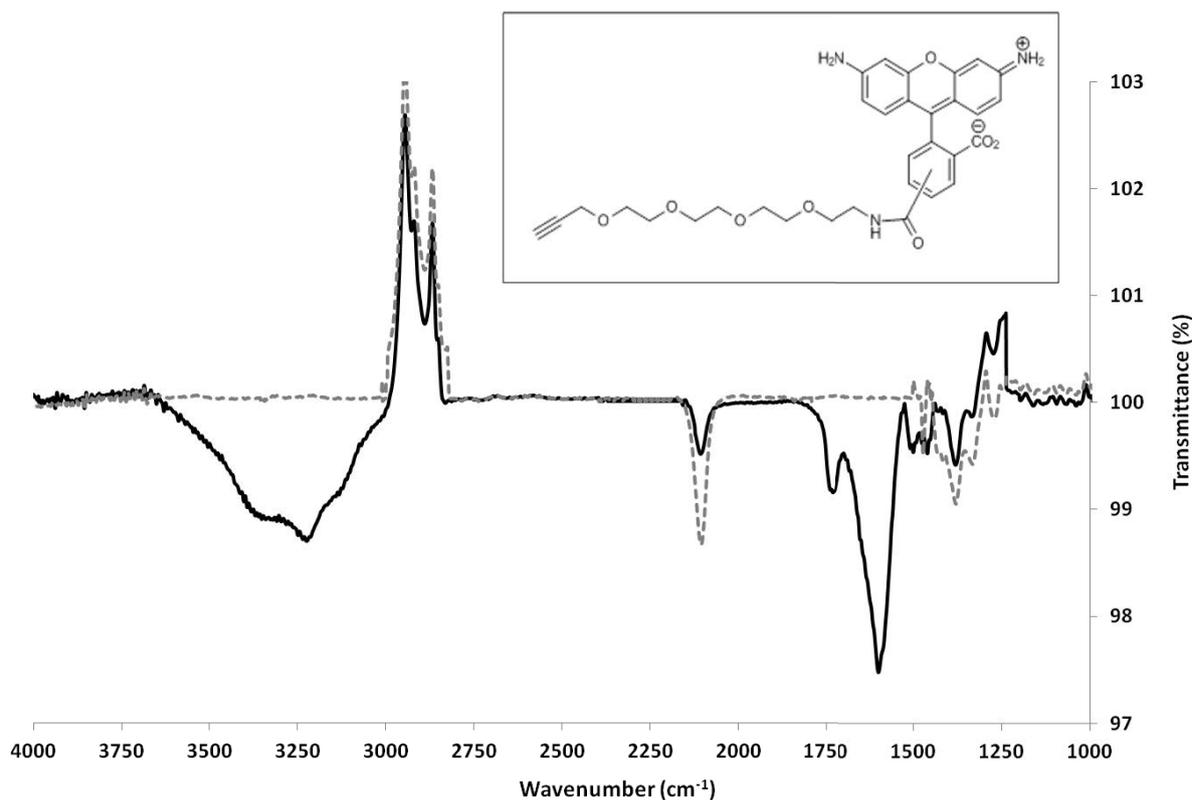


Figure 73 : Background-substracted FTIR-ATR spectra of the N₃-modified COC surface before (dashed line) or after (continuous line) CuAAC reaction with AF molecules (insert).

Figure 73 shows the FTIR-ATR spectra of N₃-modified (dashed line) and AF-modified (continuous line) COC surfaces after subtraction of the background signal measured on a bare COC surface. The negative transmittance values observed for C-H aliphatic groups (3100-2900 cm⁻¹) are due to the adhesion of brominated deposit over COC surface. Indeed, the content of C-H aliphatic groups on a bare COC surface is higher than that of a brominated polymer film. The transmittance intensity of azide groups (2100 cm⁻¹) observed for N₃-modified COC is higher than that observed for AF-modified COC (peak intensity difference of 70 %). This indicates the conversion of a large part of azide groups to triazole rings as a consequence of the immobilization of AF molecules mediated by CuAAC reaction. Moreover, the FTIR-ATR spectra of AF-modified COC clearly show several bands characteristic of the presence of primary and/or secondary amine groups (3300 cm⁻¹), carbonyl groups (1744 cm⁻¹), C=C bonds, amines and amides groups (1680-1550 cm⁻¹). This is consistent with AF immobilization on COC surfaces. Moreover, no signal was visible when the CuAAC procedure was carried out on bare COC surfaces or in the absence of the Cu(I)

catalysis. These results prove the successful covalent immobilization of a fluorescent alkyne (AF) on the initially brominated COC surfaces.

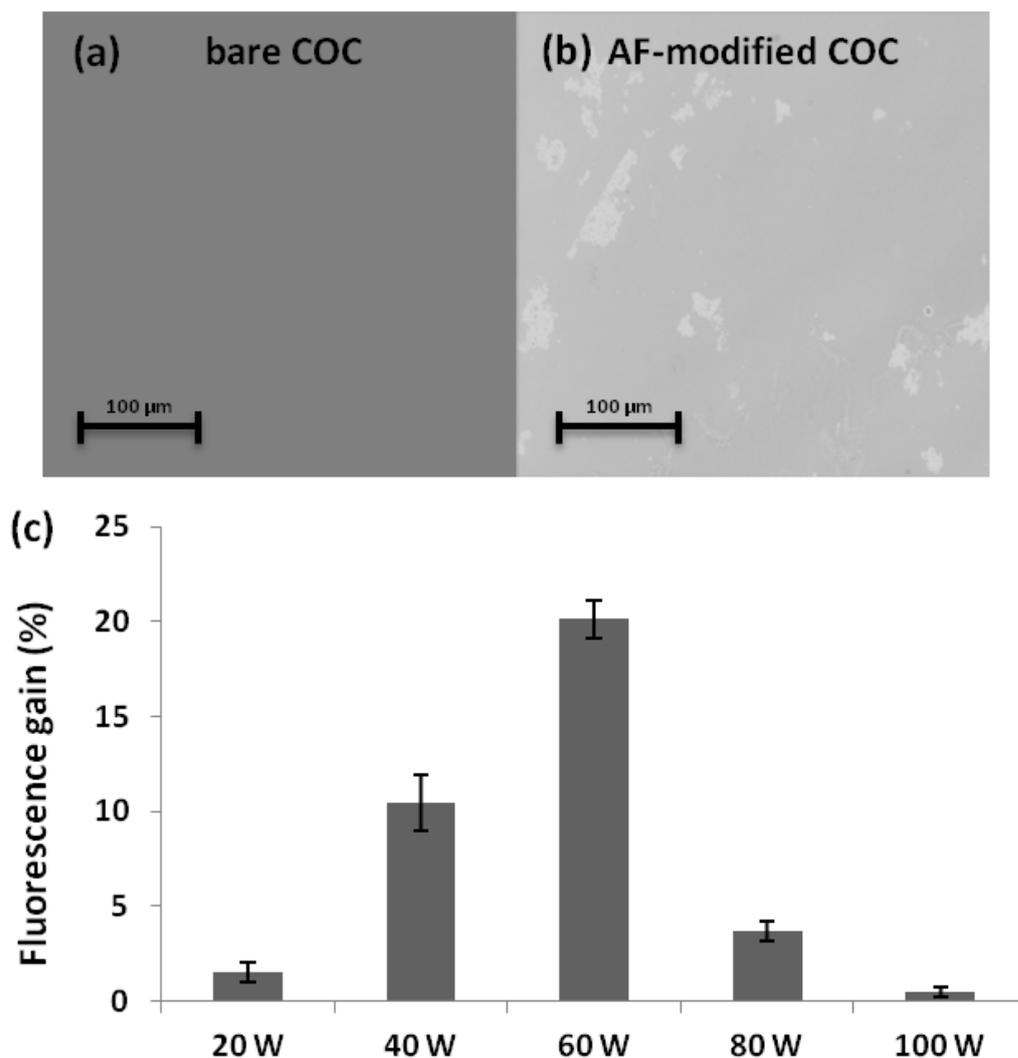


Figure 74 : Fluorescence microscopy image showing (a) the bare COC surface and (b) the AF immobilization onto N3-modified COC surface via CuAAC after 60 W plasma discharge power during 10 minutes. (c) Fluorescence intensity gain from CuAAC reactions obtained on COC surfaces modified with brominated deposit at different plasma power.

The fluorescence microscopy images (Figure 74a and b) display the expected changes owing to successful functionalization, i.e. an increase in fluorescence intensity. They confirm the homogeneity of the AF immobilization on COC surface (Figure 74b). Moreover, no signals were visible when the CuAAC procedure was carried out on bare COC surfaces or in the

absence of the Cu(I) catalyst, demonstrating the absence of nonspecific binding of AF molecules to the surface.

For a better evaluation of the fluorescence features, the concept of fluorescence intensity gain defined as being the ability of AF molecules to increase the fluorescence intensity of COC material was used. This allows estimating an increase of the fluorescence intensity gain from 3% to 20 % when the plasma power for the bromination step was varied from 20 to 60 W. This confirms the expected reactivity of the initially Br-modified COC surface transformed to N3 to the CuAAC reaction (Figure 74c). For higher power varying from 80 to 100 W, no signal was visible. This can be attributed to the strong fragmentation of the 1-bromopropane precursor at high discharge power as previously shown, leading to a loss of the associated bromine [8]. So, for a constant deposition time of 10 minutes, an excellent robustness, homogeneity and high surface reactivity to CuAAC reaction of brominated deposit was obtained with a 60 W plasma power.

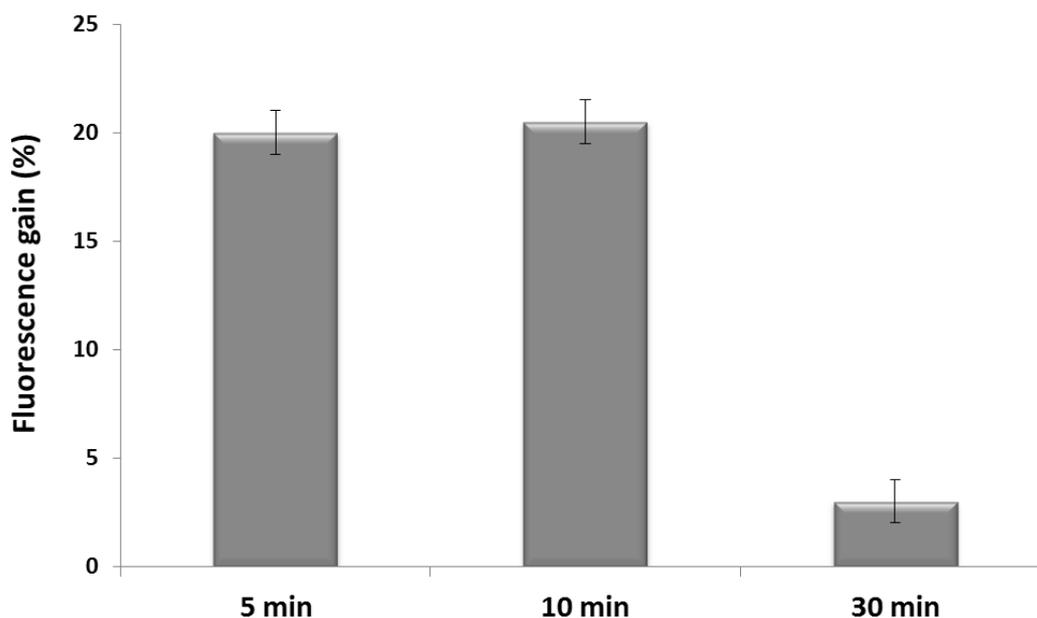


Figure 75 : Fluorescence intensity gain from CuAAC reactions obtained on COC surfaces modified with brominated deposit for different deposition time at 60 W plasma power

Figure 75 shows the effect of deposition time on the fluorescence intensity gain for a 60 W plasma power. No change in intensity was observed when the deposition time was varied

from 5 to 10 min indicating that the amount of accessible bromine atoms on COC surfaces does not vary with the deposition time. However, a decrease from 21 % to 3 % in fluorescence intensity gain can be seen for a deposition time longer than 10 minutes, indicating that the brominated polymer is not reactive to the nucleophilic substitution and CuAAC reactions. Similar variations were obtained for a 40 W plasma power where a decrease from 10 % to 2 % in fluorescence intensity gain for deposition time longer than 10 minutes was observed. So, the Br-modified COC surface reactivity rapidly decreases with long plasma exposure time. This can be explained by the recombination of neighboring radicals in the growing deposit leading to the deactivation of both the chain propagation process and the active radical sites [5]. The use of a single pulsed plasma polymerization could allow avoid losses of active radical sites [6].

All these results demonstrate the successful immobilization of a fluorescent alkyne (AF) on modified COC surfaces. Moreover, an excellent robustness, homogeneity and high surface reactivity to CuAAC reaction of brominated deposit was obtained with a plasma bromination of 60 W. To overcome the loss of material after extensive washing step which can appear for an exposure time of 5 minutes, a deposition time of 10 minutes should be used.

3.5 Conclusion

The surface modification of COC materials by plasma bromination was investigated. Studies of the effect of the plasma discharge power and deposition time were achieved to provide viable routes for the functionalization of polymeric material surfaces. These two parameters have to be finely tuned in order to activate COC surfaces with a homogenous, stable and reactive brominated polymer. Each modified surface was characterized by water contact angle measurement, ellipsometry, electrochemical microscopy (SECM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), infrared (IR) and fluorescence microscopy. When the deposition is realized under optimal conditions (60 W plasma discharge power and 10 min deposition time), Br-modified COC surfaces were found to become clickable after immersing substrates in solution of NaN_3 . The immobilization of a fluorescent alkyne (acetylene-Fluor 488) was successfully carried out and provided a visual means to monitor the CuAAC reactions on N_3 -modified COC surfaces. With this plasma and click chemistry processes, it is now possible to

incorporate numerous different functional groups on COC surfaces such as PEG to control nonspecific adsorption at COC surface. This approach opens a new and simple way that will help in the development of COC analytical microchip.

4 Modification of THV surfaces

The strategy followed to achieve COC surface activation was applied to the surface modification of THV. The overall protocol is summarized in Figure 69 and the experimental details can be found in the Materials and Methods section of this chapter.

4.1 Enhancement of the hydrophilicity of the THV surface by pre-treatment with argon plasma

The effect of argon plasma pretreatment (step 1) on the hydrophilic properties of THV substrates was evaluated by water contact angle measurements (Figure 76) for plasma powers ranging from 20 to 100 W.

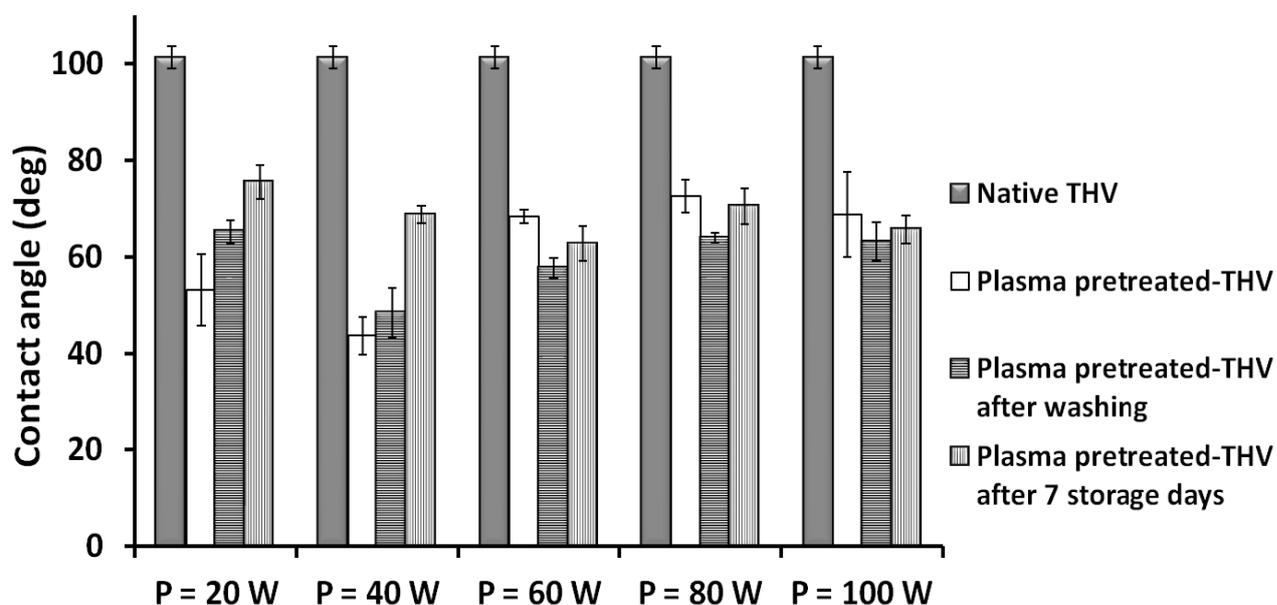


Figure 76 : Effect of plasma power on water droplet contact angles (n=3) before and after argon plasma pretreatment of THV substrate surfaces. Plasma power ranging from 20 to 100 W, 10 min deposition time, 75 sccm argon flow and 0.3 mbar base pressure.

Figure 76 shows the water contact angles measured on native THV surfaces, either on a cleaned THV surface after argon plasma treatment (step 1) or on a cleaned THV surface after argon plasma treatment followed by several washings and storage. As expected, argon

plasma pretreatment induced a drastic reduction in contact angle, the largest reduction (from $101.2^\circ \pm 1.9^\circ$ to $43.7^\circ \pm 3.7^\circ$) being observed for a 40 W plasma power. No hysteresis due to surface roughness was observed. THV surfaces become more hydrophilic due to the presence of high surface oxygen-containing functional groups on the polymer backbone after argon plasma pretreatment [30, 31]. It has to be noticed that the presence of oxygen moieties at the topmost surface layer can be due to excitation of residual air present in the reactor or to post-oxidative reactions after the release of the sample at atmospheric pressure. The surface pretreatment stability was evaluated by remeasuring the contact angle after extensive washing steps and storage in air at 20°C for 7 days. A variation of the contact angle values was observed for THV substrate pretreated with argon plasma power ranging from 20 to 40 W ($\Delta\theta \approx 20^\circ$) whereas no significant change was measured for substrates pretreated with plasma discharge power ranging from 60 to 100 W. This indicates that a surface with stable hydrophilic properties is obtained only for high power (≥ 60 W).

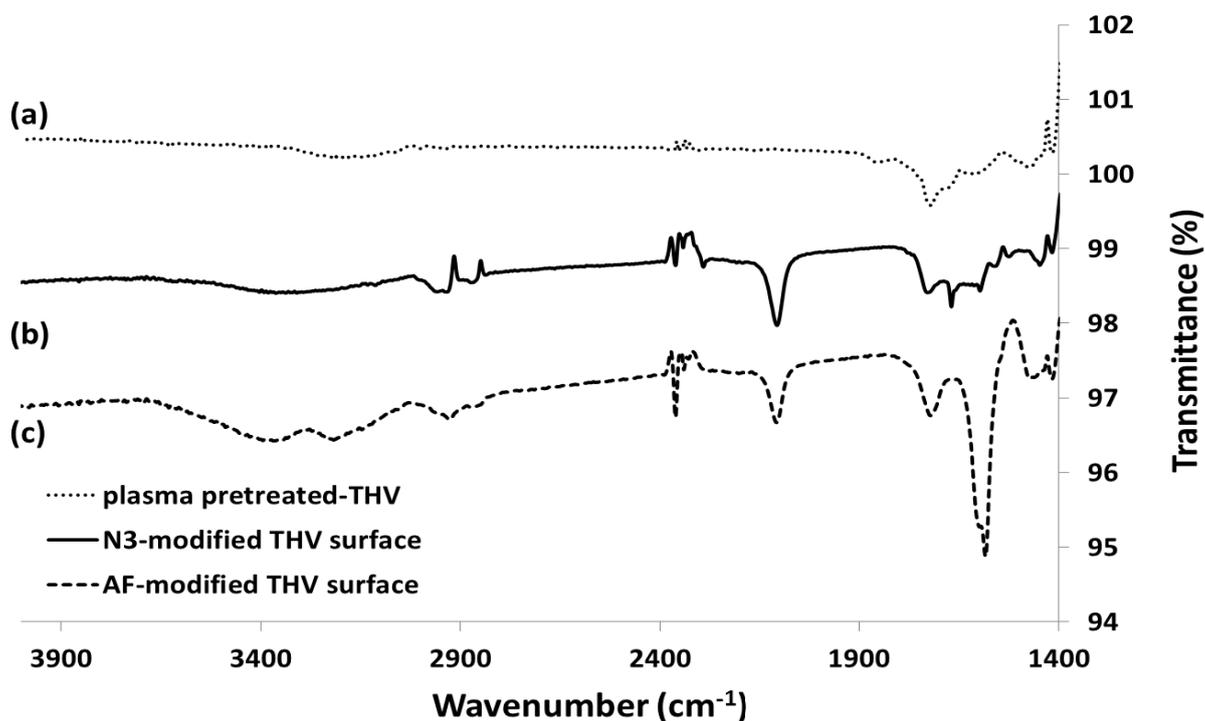


Figure 77 : FTIR-ATR spectra of (a) plasma pretreated-THV (dotted line) and N3-modified THV substrate surface (b) before (continuous line) or (c) after AF functionalization through CuAAC reaction (dashed line). Subtracted background recorded before each spectrum acquisition was that of an unmodified (or bare) THV substrate surface.

The chemical composition of plasma pretreated-THV surface under a 100 W power discharge was analyzed using FTIR-ATR spectroscopy (Figure 77) and XPS (Figure 78). Subtracted background recorded before each FTIR-ATR spectrum acquisition was that of an unmodified (or bare) THV substrate surface (Figure 77). The FTIR-ATR transmittance peak that appears at *ca.* 1750-1700 cm^{-1} is associated to the presence of carbonyl and aldehyde groups that result from surface oxidation during plasma argon pretreatment (Figure 77a). Moreover, the FTIR-ATR spectra of pretreated THV clearly show characteristic bands of the presence of —OH groups (3300 – 3100 cm^{-1}). It should be stressed that oxygen is an unavoidable contaminant of the substrate surface coming either from residual oxygen in the plasma reaction chamber or from long-lived free radical reaction with oxygen upon air release after plasma pretreatment [32-35]. The formation of carbonyl and hydroxyde groups on the surface are responsible for the hydrophilicity change of THV after argon plasma pre-treatment observed in Figure 76. The presence of oxygen is probably due to the fact that THV surface is not inert to atmospheric oxidation when in contact with air. However, FTIR is not surface sensitive and so there are probably other functional groups grafted on THV at weak concentrations, which have not been detected by FTIR-ATR. So, the chemical composition of plasma pretreated-THV surface was analyzed using XPS (Figure 78), which is a surface sensitive technique.

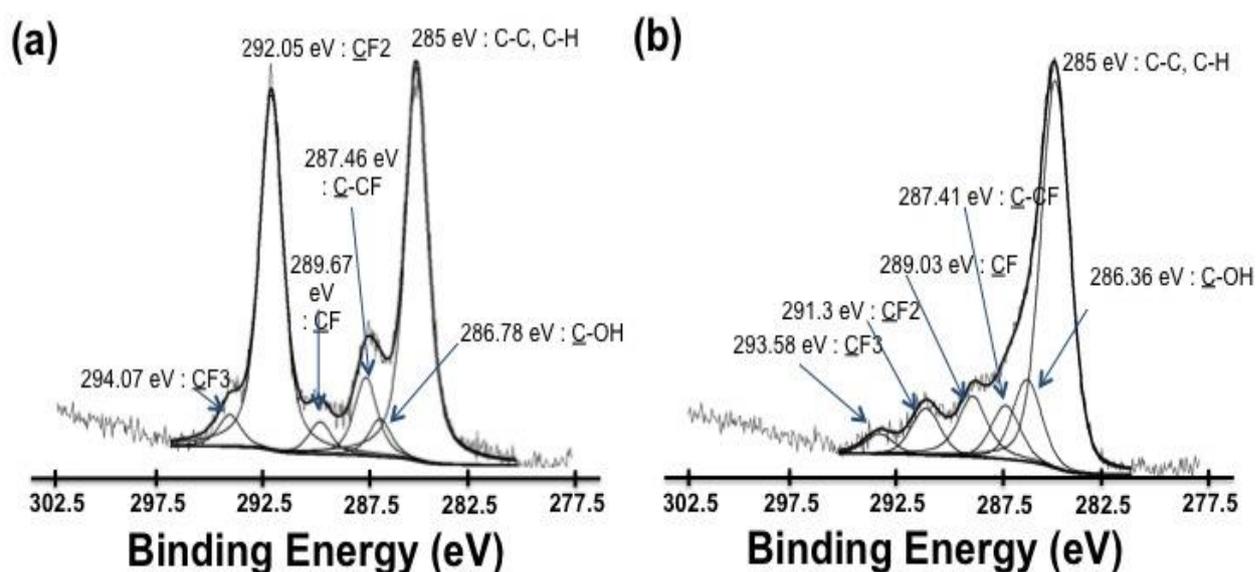


Figure 78 : XPS spectra of (a) bare THV substrate surface and (b) argon plasma pretreated THV substrate surface with a 100 W discharge power (10 min deposition time, 75 sccm argon flow and 0.3 mbar base pressure).

Typical XPS patterns for untreated and plasma treated THV substrates show the presence of CF_3 , CF_2 , CF , and $C-CF$ peaks, which are characteristic of THV substrate. These peaks confirm the presence of fluorine and carbon atoms in the polymer backbone. For untreated THV (Figure 3a), the $C(1s)$ region was calibrated to the CF_2 peak at 292 eV and $C-C$ and $C-H$ peak at 285 eV according to the literature [15, 28, 36]. The curve fitting for the high resolution $C(1s)$ peaks was determined using least-squares peak fitting. The $C(1s)$ spectra were fitted with five spectral components assigned to $C-H$ and $C-C$ (binding energy (BE) = 285 eV), $-C-CF$ and $C-OH$ (BE = 287.1 eV), $-CF$ (BE = 289.5 eV), $-CF_2$ (BE = 292 eV) and $-CF_3$ (BE = 294.1 eV) and this indicates the large part of CF_2 bonds in the polymer backbone. Moreover, a high quantity in $C-H$ and $C-C$ intensity at 285.0 eV in the $C1s$ peak is observed.

This can be the result of a contamination resulting from the fabrication process of THV sheets. Indeed, THV flat sheets are produced by hot embossing [37]. A few grams of the THV pellets are moved onto a commercial silicone mold made of PDMS containing a high concentration of $C-H$ and $C-C$ groups and melted at 210 °C overnight. Moreover, a $C-OH$ peak attributed to carbon singly bonded to oxygen was observed showing that the THV surface is not inert to oxidation when in contact with air atmosphere as already observed for the COC material [30]. The bonded fluorine-to-carbon ratio was calculated using the following equation [36].

$$\frac{F}{C} = \frac{(3\% CF_3 + 2\% CF_2 + 1\% CF)}{100}$$

Of the three copolymers of THV, tetrafluoroethylene has a F/C of 2, hexafluoropropylene has a F/C of 2, and only vinylidene fluoride has a F/C of 1. Depending on the relative concentrations of the three copolymers constituents, the overall F/C ratio should be between 1.5 and 2. For bare THV, the F/C ratio determined from Table 2 is equal to 1.1. This suggests that the bare THV substrate analyzed was contaminated with a hydrocarbon compound from the fabrication process of THV sheets, resulting in a $C-C$, $C-H$ peak at 285 eV. So, the cleaning protocol should be ineffective in removing non-polar contaminants.

For treated THV (Figure 78b), the $C(1s)$ spectra were fitted with six spectral components assigned to $C-H$ and $C-C$ (BE = 285 eV), $C-OH$ (BE = 286.4 eV); $-C-CF$ (BE = 287.4 eV), $-CF$, $COOH$ and $COOR$ (BE = 289 eV), $-CF_2$ (BE = 291.3 eV) and $-CF_3$ (BE = 293.6 eV). The CF_2 peaks

decrease drastically after plasma pre-treatment indicating defluorination of the THV surface (Figure 78b). This is confirmed by a concomitant decrease from 50.8 to 17.6 % of the surface fluorine atomic composition (Table 2) and of the F/C ratio (0.35). Moreover, argon plasma pre-treatment gave rise to the substrate surface oxygen atomic composition (from 4.2 to 16.5%, Table 2) originating from the formation of low molecular weight oxidized materials and chain scissions. An increase in the C-OH peak intensity (BE = 286.4 eV) and a new contribution of oxygen species: COOH and COOR (BE = 289 eV) are due to the presence of ester and/or carboxylic functions (Figure 78b).

FTIR-ATR and XPS analysis thus confirmed the hydrophilic enhancement of the THV material by an argon plasma pre-treatment (step 1) due to the incorporation of surface oxygen-containing functional groups into the polymer backbone. Moreover, surface contamination from the fabrication process of THV sheets seems not to affect the enhancement of the hydrophilicity of the surface of THV by pre-treatment with argon plasma.

Table 2 : Elemental atomic ratios determined by XPS on THV substrate surfaces before and after deposition of 1-bromopropane. Plasma polymer deposition : 60 W plasma discharge power, 10 min deposition time, 75 sccm argon flow rate and 0.3 mbar precursor pressure

THV Samples	F (%)	C (%)	O (%)	Br (%)
Bare surface	50.8	45.0	4.2	-
100 W Argon plasma pretreated surface	17.6	50.0	16.5	-
Br-modified surface	2.5	72.0	11.6	9.7

4.2 Bromination of THV surface

Concerning the subsequent steps of the surface functionalization procedure, preliminary experiments showed that a 20 W plasma power applied during pretreatment step (step 1) was beneficial to the following plasma bromination (step 2) as it minimizes modification of THV substrate surface roughness that becomes significant at high plasma power [30].

Furthermore, a 10 min deposition time at 60 W plasma power as experimental conditions for step 2 yielded an excellent robustness and homogeneity of the brominated deposited layer as already demonstrated on COC material (see results for COC material) and verified here on THV substrate by water contact angle measurements. Under these conditions, the chemical composition of the thin film deposited on THV substrate was evaluated by XPS and corresponding percentages of bromine, fluorine, and oxygen atoms are presented in Table 2. The average atomic concentration of bromine is 9.7% with an average atomic concentration of bromine relative to that of fluorine (bromine to fluorine atomic ratio Br/F) and carbon (bromine to carbon atomic ratio Br/C) of 348 % and 13 %, respectively. These results indicate the presence of a significant proportion of bromine in the deposited surface layer. Moreover, a concomitant decrease of fluorine and oxygen content and increase of carbon and bromine contents after plasma polymer deposition are observed. This is consistent with the presence of a brominated layer on the THV substrate. Therefore, XPS measurements confirm the adhesion of a brominated deposit on THV substrate using plasma process and revealed an excellent homogeneity (three spots analyzed) of the deposited film in terms of chemical composition.

4.3 Chemical grafting through click reaction

The reactivity of the Br-modified THV substrate was then further examined. A fluorescent dye, acetylene-Fluor 488 (AF) [37, 38], was coupled to the surface by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition reaction (CuAAC reaction) after derivatization of the surface with azido groups following steps 3 and 4 (Figure 69).

Figure 77 shows the FTIR-ATR spectra of N₃-modified THV (Figure 77b) and AF-modified THV (Figure 77c) surfaces after subtraction of the background signal measured on a bare THV surface. The negative transmittance values observed for C-H aliphatic groups (3100–2900 cm⁻¹) are due to the adhesion of brominated deposit over THV surface. Indeed, the content of C-H aliphatic groups on a bare THV surface is higher than that of a brominated polymer film. The absorbance intensity of azide groups (2100 cm⁻¹) measured for N₃-modified THV surfaces (step 3) is higher (20 % difference in peak intensity between Figure 77b and c) than that of AF-modified THV one (step 4). This observation indicates the

conversion of a portion of surface azide groups to triazole rings as a consequence of the immobilization of AF mediated by CuAAC reaction. Moreover, the FTIR-ATR spectra of AF-modified THV substrate clearly show several bands characteristic of the presence of primary and/or secondary amino groups (3300 cm^{-1}), C=C bonds, amino and amide groups ($1680\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$), as well as carbonyl groups (1744 cm^{-1}), which are consistent with AF immobilization on THV substrate surface. Moreover, none of these features were observed when performing CuAAC reaction on bare THV or in the absence of the Cu(I) catalyst proving the specificity of AF covalent immobilization on primarily brominated THV substrate surface.

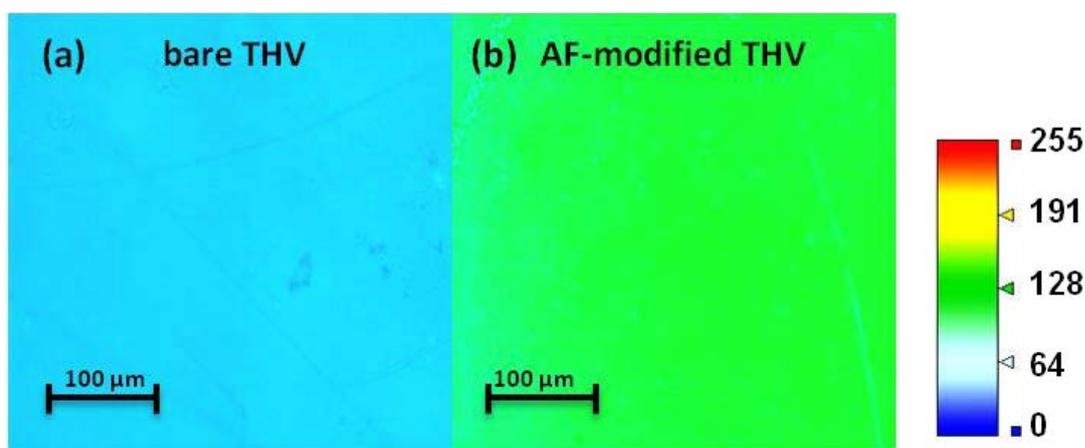


Figure 79 : Fluorescence microscopy images showing (a) bare THV substrate surface and (b) N_3 -modified THV substrate surface after AF immobilization through CuAAC reaction (plasma polymer deposition: 60 W plasma discharge power during 10 minutes, 75 sccm argon flow and 0.3 mbar base pressure).

Fluorescence microscopy images (Figure 79a and b) display the expected changes in fluorescence owing to the successful functionalization, *i.e.* an increase of 94 % in fluorescence intensity gain consistent with AF molecule immobilization. This result confirms the expected reactivity of primarily Br-modified THV substrate surface and subsequent N_3 functions involved in CuAAC AF immobilization procedure. Moreover, fluorescence imaging evidences the homogeneity of THV surface functionalization (Figure 79b) and confirms the efficiency of the entire THV surface modification procedure from surface activation to the immobilization of fluorescent ligands.

4.4 Conclusion

In conclusion, it was evidenced for the first time that plasma polymerization followed by “click” chemistry processes allow incorporation of numerous different functional groups on THV substrate surface. Indeed, it was shown that (i) the hydrophobic character of this new microchip material can be easily modified by argon plasma pretreatment, (ii) Br-modified THV surface can be obtained by plasma polymer deposition and (iii) the Br-modified THV surface was found to become “clickable” after immersing the substrate into NaN_3 solution. The specific immobilization of a fluorescent alkyne was carried out successfully and provided a visual mean to assess the CuAAC reaction yield on N_3 -modified THV surface. This approach presents a novel and simple methodology that will help in the development of analytical microchips based on fluorinated polymeric materials.

5 Conclusion and perspectives

This functionalization strategy based on the combination of plasma processes and click chemistry reaction allowed the modification of the entire surface of COC or THV substrates with different functional groups in order to avoid adsorption and control flows.

In order to create a confined preconcentration area, COC or THV microchannels have to be modified locally. Two approaches can be considered derived from the strategy presented in this chapter. First, the plasma process (step 1 and 2) can be localized to a restricted area by using masks. Bromine groups are then incorporated only on the unmasked areas and substitution by azide groups as well as functionalization by CuAAC thus take place only on these areas.

The other approach consists in the localization of the CuAAC step (step 4), by generating electrochemically the Cu(I) catalyst using a microelectrode. The Cu(I) is produced only around the microelectrode and catalyses locally the CuAAC reaction, leading to the grafting of ligands on the substrate only in the electrode vicinity, with the rest of the material surface exhibiting azide groups which may be used for another functionalization process.

6 References

1. Schreiber, H.P., M.R. Wertheimer, and A.M. Wrobel, *Thin Solid Films*, 1980. **72**(3), p. 487-494.
2. Siow, K.S., L. Britcher, S. Kumar, and H.J. Griesser, *Plasma Processes and Polymers*, 2006. **3**, p. 392-418.
3. Muir, B.W., A. Tarasova, T.R. Gengenbach, D.J. Menzies, L. Meagher, F. Rovere, A. Fairbrother, K.M. McLean, and P.G. Hartley, *Langmuir*, 2008. **24**(8), p. 3828-3835.
4. Förch, R., A.N. Chifen, A. Bousquet, H.L. Khor, M. Jungblut, L.-Q. Chu, Z. Zhang, I. Osey-Mensah, E.-K. Sinner, and W. Knoll, *Chemical Vapor Deposition*, 2007. **13**, p. 280-294.
5. Friedrich, J., *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**(9), p. 783-802.
6. Friedrich, J.F., R. Mix, R.-D. Schulze, A. Meyer-Plath, R. Joshi, and S. Wettmarshausen, *Plasma Processes and Polymers*, 2008. **5**(5), p. 407-423.
7. Chen, R.T., B.W. Muir, G.K. Such, A. Postma, R.A. Evans, S.M. Pereira, K.M. McLean, and F. Caruso, *Langmuir*, 2010. **26**(5), p. 3388-3393.
8. Wettmarshausen, S., G. Kühn, G. Hidde, H.U. Mittmann, and J.F. Friedrich, *Plasma Processes and Polymers*, 2007. **4**(9), p. 832-839.
9. Kolb, H.C., M.G. Finn, and K.B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, 2001. **40**(11), p. 2004-2021.
10. Faragher, R.J., C.S. McKay, X.D. Hoa, B. Prikrylova, G.P. Lopinski, D. Figeys, T. Veres, and J.P. Pezacki, *Canadian Journal of Chemistry*, 2011. **89**(5), p. 608-615.
11. Van Dijk, M., D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, C.F. van Nostrum, and W.E. Hennink, *Bioconjugate chemistry*, 2009. **20**(11), p. 2001-2016.
12. Lallana, E., E. Fernandez-Megia, and R. Riguera, *Journal of the American Chemical Society*, 2009. **131**(16), p. 5748-5750.
13. Ranjan, R. and W.J. Brittain, *Macromolecules*, 2007. **40**(17), p. 6217-6223.
14. Collman, J.P., N.K. Devaraj, T.P.A. Eberspacher, and C.E.D. Chidsey, *Langmuir*, 2006. **22**(6), p. 2457-2464.
15. Roy, S., C.Y. Yue, Y.C. Lam, Z.Y. Wang, and H. Hu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **150**(2), p. 537-549.
16. Mobarakeh, L.F., R. Jafari, and M. Farzaneh, *Applied Surface Science*, 2013. **284**, p. 459-463.
17. Massey, S., A. Duboin, D. Mantovani, P. Tabeling, and M. Tatoulian, *Surface and Coatings Technology*, 2012. **206**(19), p. 4303-4309.
18. Barbier, V., M. Tatoulian, H. Li, F. Arefi-Khonsari, A. Ajdari, and P. Tabeling, *Langmuir*, 2006. **22**(12), p. 5230-5232.
19. Le, N.C.H., V. Gubala, E. Clancy, T. Barry, T.J. Smith, and D.E. Williams, *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. **36**(1), p. 250-256.
20. Coates, M., E. Cabet, S. Griveau, T. Nyokong, and F. Bedioui, *Electrochemistry Communications*, 2011. **13**(2), p. 150-153.
21. Griveau, S., S. Aroua, D. Bediwy, R. Cornut, C. Lefrou, and F. Bedioui, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2010. **647**(1), p. 93-96.
22. Mirkin, M.V. and B.R. Horrocks, *Analytica Chimica Acta*, 2000. **406**(2), p. 119-146.
23. Hwang, S.-J., M.-C. Tseng, J.-R. Shu, and H. Her Yu, *Surface and Coatings Technology*, 2008. **202**(15), p. 3669-3674.
24. Roy, S., C.Y. Yue, and Y.C. Lam, *Vacuum*, 2011. **85**(12), p. 1102-1104.

25. Nikolova, D., E. Dayss, G. Leps, and A. Wutzler, *Surface and Interface Analysis*, 2004. **36**(8), p. 689-693.
26. Wheale, S.H. and J.P.S. Badyal, *Polymer*, 2011. **52**(23), p. 5250-5254.
27. Cortese, B., M.C. Mowlem, and H. Morgan, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011. **160**(1).
28. Roy, S. and C.Y. Yue, *Plasma Processes and Polymers*, 2011. **8**(5), p. 432-443.
29. Occhiello, E., M. Morra, G. Morini, F. Garbassi, and P. Humphrey, *Journal of Applied Polymer Science*, 1991. **42**(2), p. 551-559.
30. Salem, T., S. Uhlmann, M. Nitschke, A. Calvimontes, R.-D. Hund, and F. Simon, *Progress in organic coatings*, 2011. **72**(1), p. 168-174.
31. Bazaka, K. and M.V. Jacob, *Polymer Degradation and Stability*, 2010. **95**(6), p. 1123-1128.
32. Khelifa, F., S. Ershov, Y. Habibi, R. Snyders, and P. Dubois, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013. **5**(22), p. 11569-11577.
33. Stillahn, J.M., K.J. Trevino, and E.R. Fisher, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2011. **3**(5), p. 1402-1410.
34. Chong, S.K., B.T. Goh, C.F. Dee, and S.A. Rahman, *Materials Chemistry and Physics*, 2012. **135**(2), p. 635-643.
35. Silverstein, M.S., L. Sandrin, and E. Sacher, *Polymer*, 2001. **42**(9), p. 4299-4307.
36. Khairallah, Y., F. Arefi, and J. Amouroux, *Thin Solid Films*, 1994. **241**(1), p. 295-300.
37. Begolo, S., G. Colas, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, *Lab on a Chip*, 2011. **11**(3), p. 508-512.
38. Gustafsson, O., K.B. Mogensen, and J.P. Kutter, *Electrophoresis*, 2008. **29**(15), p. 3145-3152.

Chapter III

Electrochemically assisted
micro localized grafting of
aptamer in a micro channel
engraved in fluorinated
thermoplastic polymer Dyneon
THV

1 Introduction

As described in the bibliographic chapter, fluoropolymers are promising materials for microfluidics [1-3]. Their extreme inertness to chemicals and solvents and their ultimate hydrophobicity and oleophobicity make them attractive for droplet microfluidics. They can also be used for cell-based microfluidics due to their antifouling properties and biocompatibility. Dyneon THV is a new class of such fluorinated material that is well suited for droplet and organic solvent microfluidics [3]. However, as most perfluorinated materials, this emerging substrate lacks chemical reactivity. Indeed, the aliphatic carbon and fluorine atoms that constitute the THV backbone make difficult its derivatization by conventional chemical methods. Nevertheless, the surface functionalization of microsystem materials is of prime importance to control the interfacial chemical properties (hydrophilic/hydrophobic character) of the microchannel. In addition to create patterns, surface chemistry modification allows controlling the flow of the solvent for the design of nonmechanical passive valves [4], avoids potential physical adsorption of undesired species *etc.*

The introduction of chemical functionalities on fluoropolymers can be achieved by different processes [5]. Chemical [6] or electrochemical [7] activations yield either an irreversible aggressive transformation (reduction of carbone-fluorine bonds or strong base-promoted dehydrohalogenation) or a reversible supramolecular self-organisation on the surface [8]. Irradiation or plasma processes have also been used [5, 9-11]. In the previous chapter, we described one of the only examples of THV surface modification referenced so far in the literature. This method allowed the successful functionalization of the entire surface of THV material but is not adequate for the local microfunctionalization and micro-patterning of restricted area in the material, such as along or within microchannels of a microsystem.

Indeed, the local micro patterning within micro channels of a microsystem combined with the use of specific ligands such as antibodies or aptamers is now highly desired to create specific capture zones in microfluidic channels for analytical or diagnosis purposes. The ability to create “islands” of a chosen molecule on the surface of a substrate and especially within micro channels, without masking or elaborated physical constrains patterning, fits well with the use of scanning electrochemical microscopy (SECM) designing [12]. SECM development starts in the late 80’s in several groups [13, 14]. An ultramicroelectrode (UME)

is used as a probe to evaluate the local reactivity of liquid or solid samples but can also be used as a tool for the local modification of solid surfaces [15-17]. SECM consists of two main parts : a potentiostat to apply a potential and measure the current at the tip of the UME and a 3D displacement system to move the UME along the substrate (Figure 80a). The UME and the substrate are immersed in a solution containing an electroactive species and the current at the UME is measured while it scans the surface. The current variations depend on the distance between the UME and the substrate, the surface conductivity of the substrate, its electrochemical reactivity and its roughness as illustrated on Figure 80b [18].

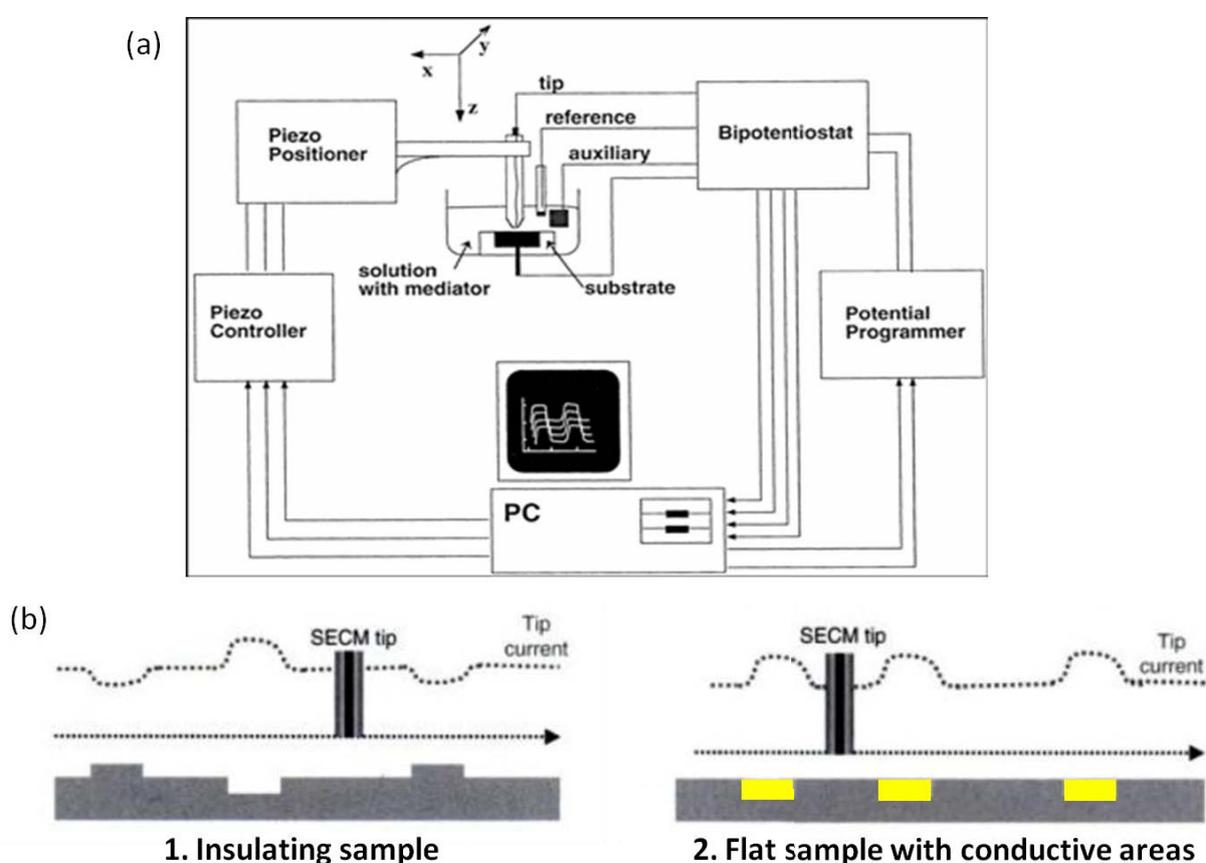


Figure 80 : (a) Schematic representation of the SECM. (b) Illustration of the current variations measured at the microelectrode tip for an insulating sample with surface roughness (1) and for a flat insulating sample with conductive areas (2). Adapted from [19].

Within the last ten years, it was shown that polymers might be functionalized locally by SECM by generating reactive species at the tip that are prone to react with the underlying material surface [20-24]. For example, it was demonstrated that SECM permits the localized

reduction of Teflon by the electrogenerated radical anion of a redox mediator. Reduction of polytetrafluoroethylene by an electrogenerated radical anion has been reported and results in its carbonization allowing further selective post-decoration of the carbonized patterns with metals [25], organic [26] and polymeric entities [27].

In this chapter, we provide a general route to built-in functional areas patterning within a perfluorinated microfluidic system. We first present the unprecedented local patterning of a Dyneon THV flat substrate by reductive carbonization assisted by SECM and extend this process to the patterning within an engraved micro channel. To this end, we adopt a three-steps approach: (1) SECM-assisted carbonization of the Dyneon THV, (2) introduction of azide groups by auto grafting of 4-azidobenzene diazonium on the carbonized area (3) covalent linkage of alkyne-bearing molecules on the particular spot, through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition (CuAAC) reaction. The overall procedure is presented on Figure 81.

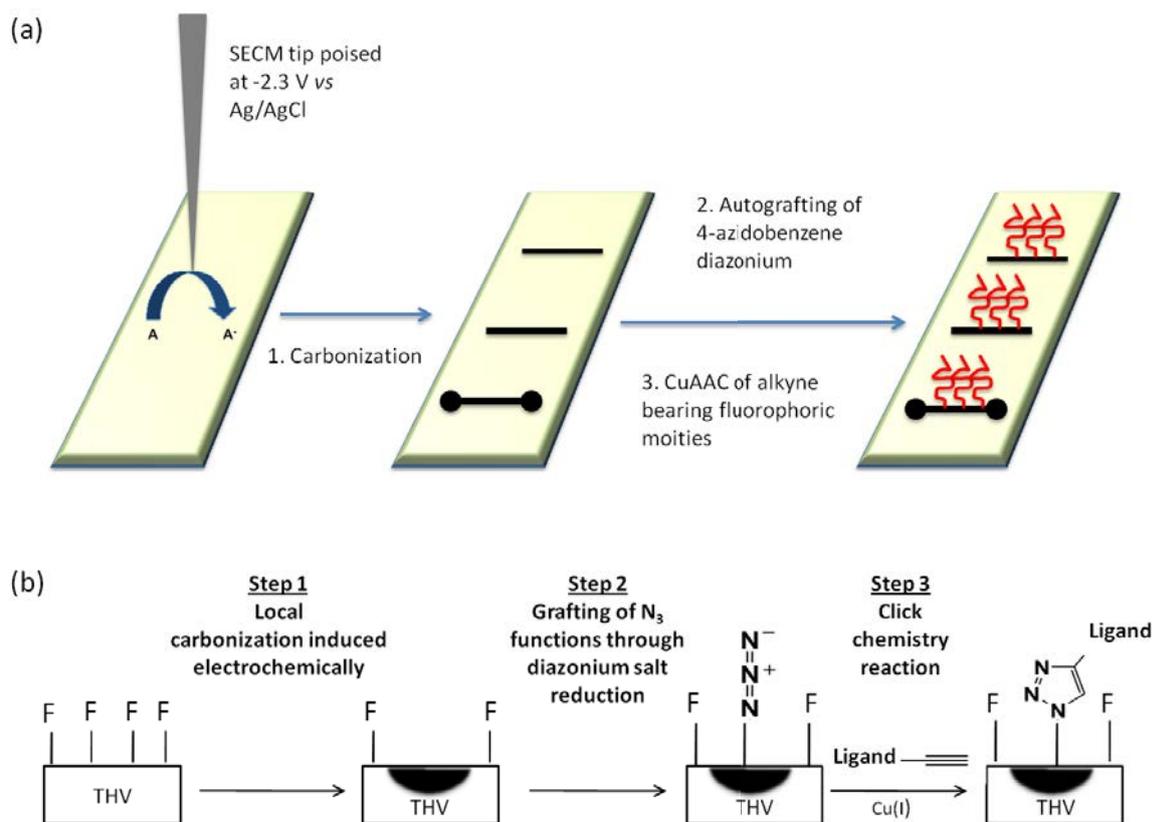


Figure 81 : (a) Strategy developed for the local modification of Dyneon THV surface by chemical functions and/or biomolecules. (b) Functional groups present at the surface at each step.

2 Materials and methods

2.1 Materials

THV pellets (Dyneon THV 500G) were first cleaned by sonication in water and ethanol for 30 min and then dried under a flow of purified argon. For the fabrication of THV plates, a few grams of the pellets were then moved onto a commercial silicone mold and melted at 210°C under vacuum overnight to obtain flat sheets with a thickness of approximately 2 mm. The sheets were then cleaned with isopropanol and cut into desired sizes for further use.

For the fabrication of microchannel plates, THV was hot embossed following a previously reported protocol [3], using an aluminium mold and a heated hydraulic press. Few grams of THV pellets were moved in a homemade PDMS mold of the same size as the aluminium mold and melted at at 210°C overnight in a vacuum oven to obtain a sheet of thermoplastic. This sheet was placed in the bottom of the aluminium mold and a sheet of PDMS with few millimeters thickness is placed on the top of the plastic sheet. The mold was then closed and put inside the press. A temperature of 180 °C and a pressure of 0.5 MPa were applied for 30 minutes. After cooling the system at room temperature, the microstructured THV plate was removed from the mold and rinsed with isopropanol and water.

2.2 General procedure for carbonization of THV substrate surfaces

In order to control the reaction environment, the whole SECM system was placed in a polyethylene glove bag. Dyneon THV surfaces were previously washed with EtOH and H₂O and immersed in a solution of aqueous 0.1 M KCl + 5 mM ferrocene methanol. The tip of a platinum electrode (diameter 25 μm or 10 μm) was positioned at a normalized current value equal to $i_T/i_{T,\infty} \approx 0.5$ or 0.25, with i_T the current measured at the UME tip and $i_{T,\infty}$ the stationary current, which corresponds to a fixed distance of $d = 0.4a$ or $d = 0.15a$ from the substrate (these values were determined by comparing experimental and simulated approach curves, Figure 82).

The aqueous solution was then removed and replaced by a solution of DMF containing 0.1 M Bu₄NBF₄ and 50 mM 2,2'-dipyridyl for experiment on THV plates or 100 mM 2,2'-dipyridyl for experiment in THV microchannels. The system was placed under N₂ atmosphere with

desiccants to obtain an environment with less than 30 % humidity before starting the carbonization reaction. As preliminary experiments confirmed that the reduction of 2,2'-dipyridyl starts at -2.2 V vs Ag/AgCl, the tip was biased at -2.3 V vs Ag/AgCl while moving the electrode at scan rates of 1, 2 or 3 $\mu\text{m/s}$.

2.3 General procedure for fluorescent dye immobilization and aptamer immobilization on N₃-modified THV substrate surfaces through CuAAC reaction

Just after carbonization, THV substrates were immersed for 1h in a solution of ACN containing 0,1 M Bu₄NBF₄ + 5 mM 4-azidobenzenediazonium for the adsorption of 4-azidobenzene groups leading to N₃-modified THV substrate.

For the AF-488 fluorescent dye immobilization by CuAAC reaction, a solution containing 100 μM AF-488, 5 mM CuSO₄ and 40 mM ascorbic acid in EtOH/H₂O (1:1) was prepared. N₃-modified THV substrate surfaces were immersed in the above mentioned solution and CuAAC reaction let proceeded at room temperature for at least 18 h in dark. For the aptamer immobilization, a solution containing 5 mM CuSO₄, 40 mM ascorbic acid and 1 μM aptamer in EtOH/H₂O (1:1) was prepared and the same protocol was used.

The resulting modified substrate surfaces were washed with copious amounts of EtOH and Milli-Q water and then dried under a flow of purified argon.

2.4 Characterization of Acetylene-Fluor 488–modified and aptamer-modified THV substrate surfaces

Fluorescence microscopy images of modified THV surfaces were recorded on an inverted fluorescence microscopic system (Axio Observer A1, Zeiss) equipped with a 100 W metal halide lamp, 488 nm excitation filter and 525 nm emission filter (filter set 75 HE). A CCD digital camera was combined with HIRIS software (RD Vision) for detection processing.

3 Results

3.1 Carbonization on THV plates and immobilization of a model dye

First experiments were performed on THV plates using the fluorophore AF to validate the strategy. Figure 82 presents the experimental approach curves to the THV made with $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ and 2,2'-dipyridyl. As expected, when $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ is used as redox mediator, the surface behaves as pure insulating material. In contrast, the approach curve obtained with 2,2'-dipyridyl mediator shows a slight deviation from pure insulating behavior. In that case, the approach curve has been fitted by finite heterogeneous kinetics at the substrate of dimensionless rate $K_{\text{app}} = k_{\text{app}} a/D$ [28] (where a is the tip radius and the D is the diffusion coefficient of the mediator) with $K_{\text{app}} = 0.04$ which gives $k_{\text{app}} = 3.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ (considering $D = 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$). This indicates that the THV surface under the tip is able to slightly recycle 2,2'-dipyridyl. This can be interpreted as a consequence of the carbonization of the underneath THV when the tips is approaching the surface at slow rate.

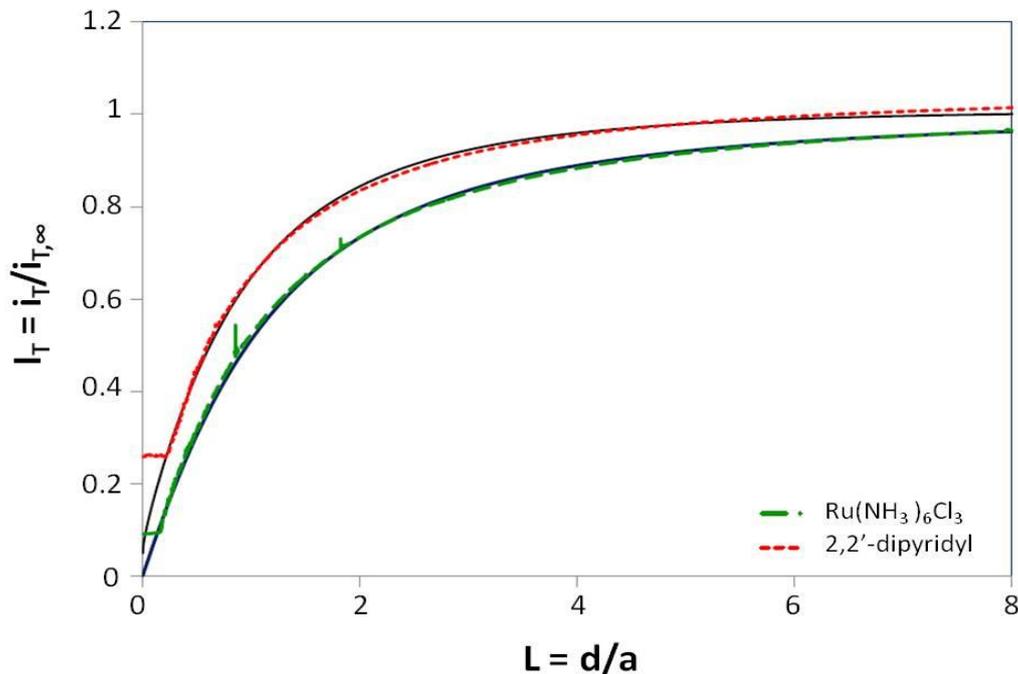


Figure 82 : experimental approach curves above Dyneon THV 500 with $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ at 5 mM for a probe polarized at -0.45V vs Ag/AgCl , $\text{RG} = 10$, diameter = $25\mu\text{m}$ and with 2,2'-dipyridyl at 50 mM for a probe polarized at -2.3V vs Ag/AgCl , $\text{RG} = 9$, diameter = $25\mu\text{m}$ and $K_{\text{app}} = 0.04$. Continuous lines represent theoretical curves. The RG value of the tip ($\text{RG} = a_{\text{glass}} / a$ with $a =$ tip radius and $a_{\text{glass}} =$ glass radius) was evaluated before each experiment by optical microscopy and d is the distance tip-substrate.

Figure 83a shows the traces of the carbonization of the THV surface observed by optical microscopy. The local reduction performed at the SECM tip yields the material carbonization as for other fluoropolymers. Distance between the UME and the substrate was kept constant, and three different scan rates were used for the UME displacement along the THV surface : $3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (line 1), $2 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (line 2) and $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (line 3). The decrease of the scan rate results in an increase of the line width, from $14 \mu\text{m}$ at $3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ to $28 \mu\text{m}$ at $1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Indeed, with a slower electrode displacement, more anion radicals can be generated and diffuse around the UME tip, resulting in a larger carbonized area. This mechanism also explains the rounded shapes observed where the UME was immobilized.

Carbonized lines were stable for 1 to 2 days but beyond this period oxidation of carbonized surface occurs. In order to ensure an optimal reactivity, the second step is performed immediately after the surface reduction.

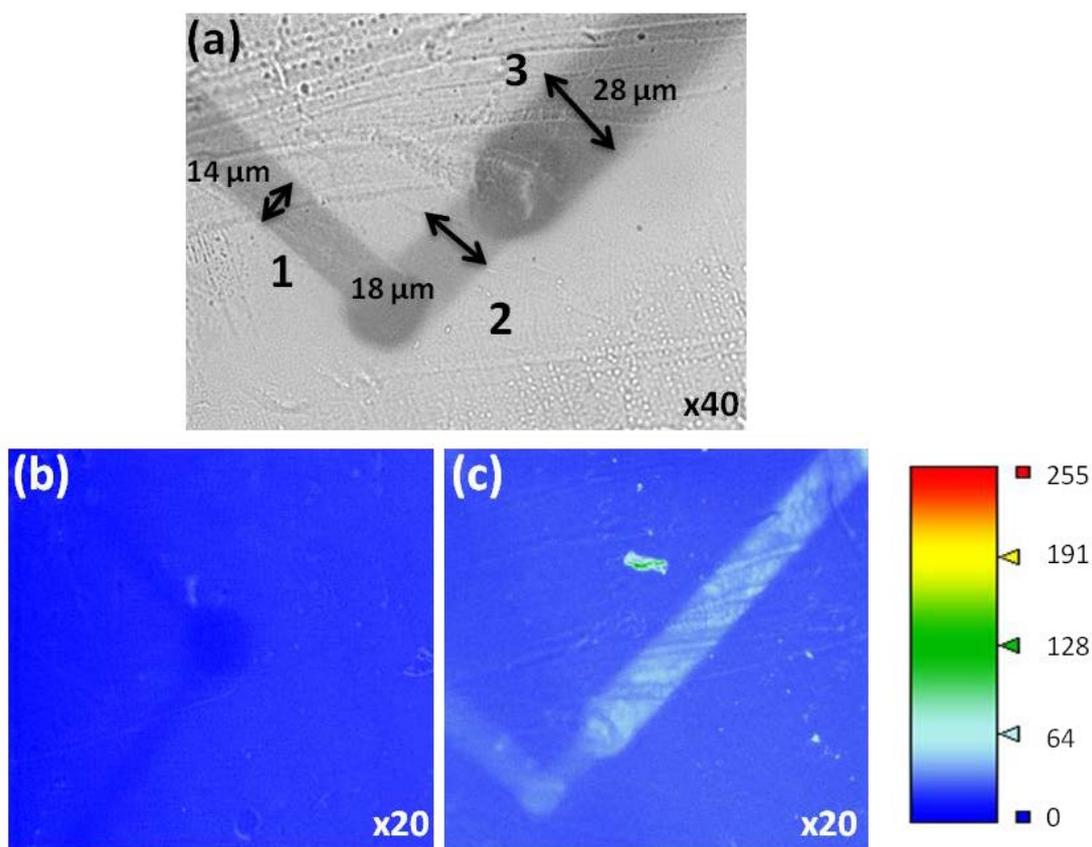
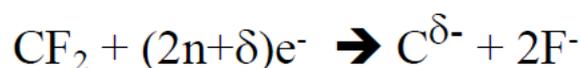
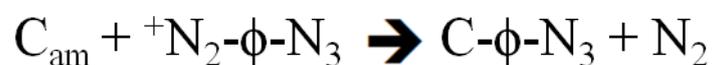


Figure 83 : (a) optical image of the electro carbonized patterns of the Dyneon THV upon the reduction of 2,2' dipyridyl in DMF solution substrate by moving the tip of the SECM at 3, 2 and $1 \mu\text{m}/\text{s}$ when positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$ (lines 1, 2 and 3, respectively). (b) Fluorescence image of the carbonized substrate after immersion in 5 mM 4-azidobenzene diazonium solution. (c) Fluorescence image after CuAAC reaction of the azide bearing patterned areas with alkyne bearing fluorophore.

The freshly carbonized surface is immersed in 4-azidobenzenediazonium (5 mM) in acetonitrile for 1 h to allow its spontaneous grafting, leading to an azide functionalization of the carbonized areas [26, 29]. The overall mechanism of the irreversible functionalization can be as follows:



Where CF_2 is the perfluorinated group of the polymer involved in the reaction with reduced 2,2'-dipyridyl and $\text{C}^{\delta-}$ is formally reduced polymer to amorphous carbon C_{am} that allows reduction of 4-azidobenzenediazonium moieties $^+\text{N}_2\text{-}\phi\text{-N}_3$ according to :



In a final step, the fluorescent dye acetylene-Fluor 488 was clicked through CuAAC reaction [30]. Figure 83 presents the fluorescence microscopy images of the THV plates after diazonium grafting (Figure 83B) and after fluorophore immobilization (Figure 83C). These images show that the specific immobilization of the fluorescent dye was carried out successfully and provides a visual means to evaluate CuAAC reaction yield on N_3 -modified THV substrate following its carbonization. It should be noticed that the same experiment conducted without copper catalyst led to adsorption of the dye in the carbonized zone with lower fluorescence intensity that disappears with ethanol rinsing. This result proved that AF immobilization on N_3 -modified carbonized surface is due to the click reaction, and not to non-specific adsorption. Heterogeneity in fluorescence intensity observed along the pattern is mainly due to defects in the THV surface, which is not perfectly smooth.

3.2 Carbonization in THV microchannel

The procedure was applied to the local modification in a THV microchannel, with typical dimensions of 950 μm width and 150 μm height. This necessitates the accurate positioning of the SECM tip inside the microchannel. To do so, the SECM tip was placed at the bottom of the channel through control over the negative feedback current in 0.1M KCl + 5 mM hexaammineruthenium(III) chloride aqueous solution (currents such that $i_T/i_{T,\infty} = 0.25$ and 0.5

were chosen). The solution was then replaced by DMF solution containing 2,2'-dipyridyl (100 mM) and Bu_4NBF_4 (0.1 M). The carbonization of the surface of the micro channel through the electrochemical reduction of 2,2'-dipyridyl was performed at two different positions of the tip and at two different scan rates. Figure 84 presents the fluorescence images of carbonized THV microchannel before (Figure 84A) or after (Figure 84B) the “click” chemistry step.

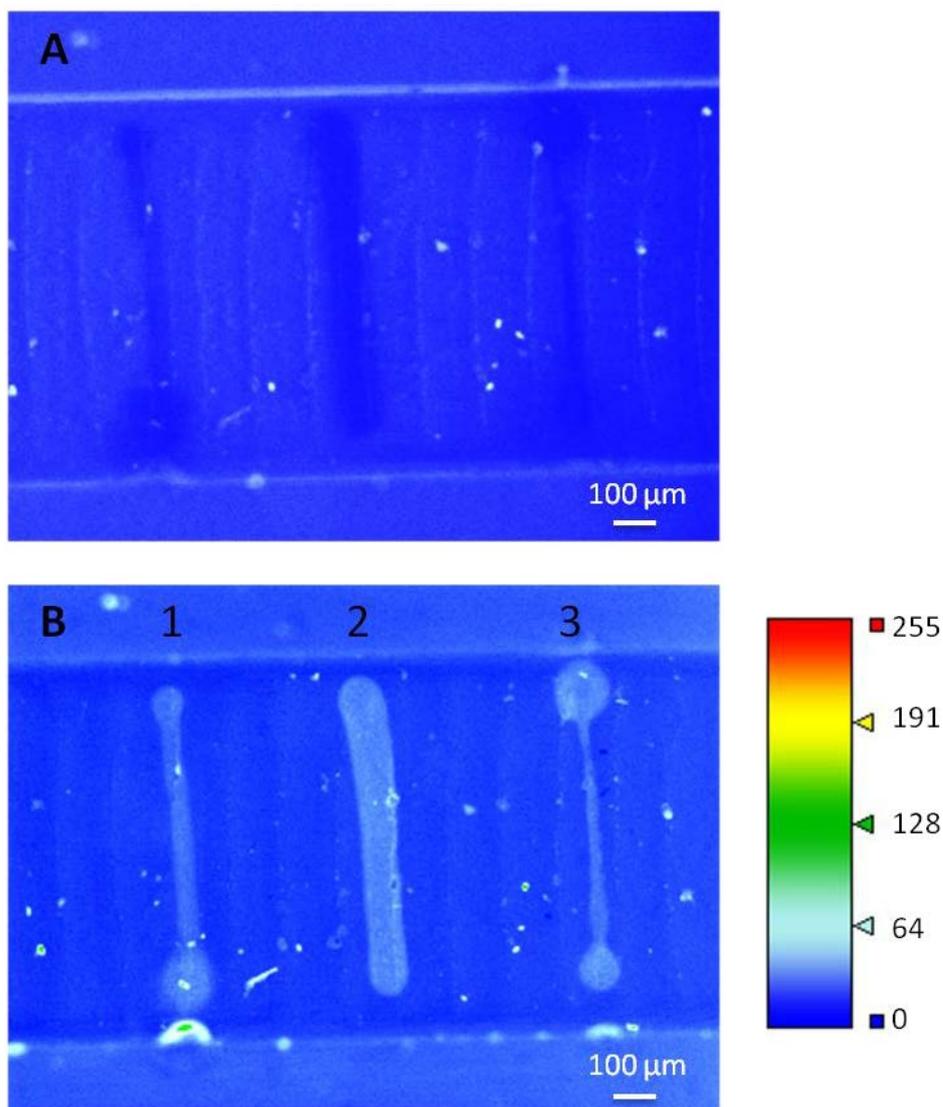


Figure 84 : (A) Fluorescence image of electro assisted carbonization of the engraved micro channel after immersion in 5 mM 4-azidobenzene diazonium solution . (B) Fluorescence image after CuAAC reaction of the azide bearing patterned areas with alkyne bearing fluorophore. Pattern 1 was obtained by carbonization when moving the tip at 3 μm/s when positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$, Pattern 2 was obtained by carbonization when moving the tip at 1 μm/s when positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$ and Pattern 3 was obtained by carbonization when moving the tip at 3 μm/s when positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.25$.

As expected, for a given normalized distance, the decrease of the scan rate during the reduction of 2,2'-dipyridyl leads to larger carbonized patterns on THV thus producing larger modified zones with acetylene-Fluor 488 after *click* reaction ($\approx 30 \mu\text{m}$ width at $1 \mu\text{m/s}$ and $\approx 14 \mu\text{m}$ width at $3 \mu\text{m/s}$). For a given scan rate during carbonization, lower working distance (between the tip and Dyneon surface) leads to narrower carbonized zone ($\approx 65 \mu\text{m}$ at a distance corresponding to $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$ and $\approx 30 \mu\text{m}$ at $i_T/i_{T,\infty} = 0.25$) due to the slowness of the surface reaction. As for THV plates, rounded shapes are observed at the patterns extremities, corresponding to areas where the UME was approached from the channel bottom in the 2,2'-dipyridyl solution, and not moved towards x- or y-axis. Whatever the carbonization conditions used, these data allow confirming the successful specific micro immobilization of the fluorescent dye within the micro channel on the N₃-modified Dyneon THV substrate following its carbonization.

3.3 Grafting of aptamer

Finally, the patterning of an aptamer of 75 bases binding diclofenac [31] with sequence 5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCA ACG TGG CGG TCA GTC AGC GGG TGG TGG GTT CGG TCC AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3' modified with 6-carboxyfluorescein (6-FAM) at the 5' end and 5-Octadiynyl at the 3' end was successfully performed following a "click" procedure similar to that of the anchoring of acetylene-Fluor488. Figure 85 shows an example of the fluorescent image of the pattern obtained with a tip of $10 \mu\text{m}$ diameter positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.5$ within the channel and moved at $1 \mu\text{m/s}$ and further derivatized with the fluorescently-tagged aptamer. It shows that the aptamer, like the fluorophore, is grafted only along the carbonized lines. The oligonucleotide grafting was stable through several rinsings with water and ethanol and upon ultra sonication.

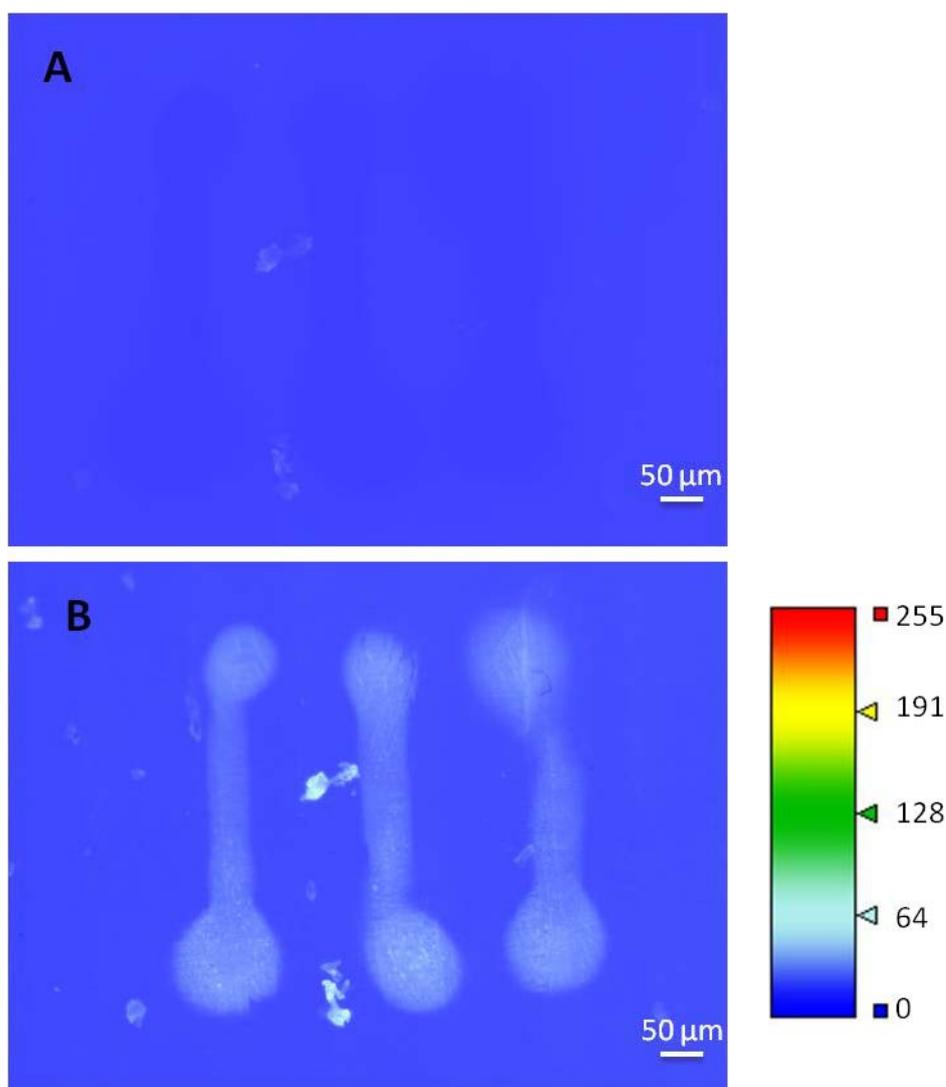


Figure 85 : (A) Fluorescence image of electro assisted carbonization of the engraved micro channel after immersion in 5 mM 4-azidobenzene diazonium solution . (B) Fluorescence image after CuAAC reaction of the azide bearing patterned areas with alkyne bearing aptamer. The three patterns were obtained by carbonization when moving the tip at 1 μm/s when positioned at $i_T/i_{T,\infty} = 0.4$.

4 Conclusion

Micro localized carbonization of perfluorinated thermoplastic material Dyneon THV was demonstrated for the first time. The process was developed to create micro areas modified with specific functions or (bio)molecules. The developed process can be performed on flat plates or inside micro channels thanks to the use of a sharp SECM tip positioned in the vicinity of the substrate and the local generation of a strong reducing agent. The dimensions and resolution of the modified zones can be tuned with the tip/material distance, the tip travelling rate during carbonization and definitely with the tip size. The obtained local zones

were further used for post-modification by substituted aryl functions with azide groups, thanks to the spontaneous irreversible adsorption of the corresponding aryldiazonium salt. Then, the locally modified areas with azido-aryl functions were used to anchor covalently (bio)molecules tagged with alkyne function by “click” reaction. Using this procedure, a fluorophore and a model aptamer were successfully locally and selectively immobilized on the SECM-formed patterns in Dyneon THV micro channels. Such a procedure, which can be easily extended to other fluorinated microfluidic materials, should allow building analytical microsystem integrating aptamer-based molecular concentration for separation and detection of trace amounts of pollutants for environmental monitoring.

5 References

1. Rolland, J.P., R.M. Van Dam, D.A. Schorzman, S.R. Quake, and J.M. DeSimone, *Journal of the American Chemical Society*, 2004. **126**(8), p. 2322-2323.
2. Nge, P.N., C.I. Rogers, and A.T. Woolley, *Chemical reviews*, 2013. **113**(4), p. 2550-2583.
3. Begolo, S., G. Colas, J.-L. Viovy, and L. Malaquin, *Lab on a Chip*, 2011. **11**(3), p. 508-512.
4. Au, A.K., H. Lai, B.R. Utela, and A. Folch, *Micromachines*, 2011. **2**(2), p. 179-220.
5. Kang, E.T. and Y. Zhang, *Advanced Materials*, 2000. **12**(20), p. 1481-1494.
6. Shoichet, M.S. and T.J. McCarthy, *Macromolecules*, 1991. **24**(5), p. 982-986.
7. Brewis, D.M. and R.H. Dahm, *International journal of adhesion and adhesives*, 2001. **21**(5), p. 397-409.
8. Motreff, A., C. Belin, R.C. da Costa, M. El Bakkari, and J.-M. Vincent, *Chemical Communications*, 2010. **46**(34), p. 6261-6263.
9. Yao, C., X. Li, K.G. Neoh, Z. Shi, and E.T. Kang, *Applied Surface Science*, 2009. **255**(6), p. 3854-3858.
10. Arefi-Khonsari, F., J. Kurdi, M. Tatouljian, and J. Amouroux, *Surface and Coatings Technology*, 2001. **142**, p. 437-448.
11. Ghosh, A., R. Ganguly, T.M. Schutzius, and C.M. Megaridis, *Lab on a Chip*, 2014. **14**(9), p. 1538-1550.
12. Bard, A.J. and M.V. Mirkin, *Scanning electrochemical microscopy*. 2012: CRC Press.
13. Liu, H.Y., F.R.F. Fan, C.W. Lin, and A.J. Bard, *Journal of the American Chemical Society*, 1986. **108**(13), p. 3838-3839.
14. Engstrom, R.C., M. Weber, D.J. Wunder, R. Burgess, and S. Winkquist, *Analytical Chemistry*, 1986. **58**(4), p. 844-848.
15. Bard, A., F. Fan, D.T. Pierce, P.R. Unwin, D.O. Wipf, and F. Zhou, *Science*, 1991. **254**(5028), p. 68-74.
16. Bard, A.J., F.-R.F. Fan, and M.V. Mirkin, *Electroanalytical chemistry*, 1994. **18**, p. 243-373.
17. Mandler, D., *Micro- and nanopatterning using the scanning electrochemical microscope*. 2001, Marcel Dekker: New York. p. 593r627.
18. Bedioui, F., S. Griveau, and A. Pailleret, *Techniques de l'ingénieur Méthodes électrochimiques*, 2009 (ref article : p2132).
19. Hascup, K.N., E.C. Rutherford, J.E. Quintero, B.K. Day, J.R. Nickell, F. Pomerleau, P. Huettl, J.J. Burmeister, G.A. Gerhardt, and A.C. Michael, *Electrochemical Methods for Neuroscience*. 2007, CRC, Boca Raton, FL.
20. Meiners, F., I. Plettenberg, J. Witt, B. Vaske, A. Lesch, I. Brand, and G. Wittstock, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013. **405**(11), p. 3673-3691.
21. Ktari, N., S. Nunige, A. Azioune, M. Piel, C. Connan, F.d.r. Kanoufi, and C. Combellas, *Chemistry of Materials*, 2010. **22**(20), p. 5725-5731.
22. Wittstock, G., M. Burchardt, S.E. Pust, Y. Shen, and C. Zhao, *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(10), p. 1584-1617.
23. Combellas, C., J. Ghilane, F.d.r. Kanoufi, and D. Mazouzi, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004. **108**(20), p. 6391-6397.
24. Tae, G., R.G.H. Lammertink, J.A. Kornfield, and J.A. Hubbell, *Advanced Materials*, 2003. **15**(1), p. 66-69.

25. Combellas, C., F. Kanoufi, D. Mazouzi, and A. Thiébault, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2003. **556**, p. 43-52.
26. Combellas, C., F. Kanoufi, D. Mazouzi, A. Thiébault, P. Bertrand, and N. Médard, *Polymer*, 2003. **44**(1), p. 19-24.
27. Combellas, C., F.d.r. Kanoufi, and S. Nunige, *Chemistry of Materials*, 2007. **19**(15), p. 3830-3839.
28. Lefrou, C. and R. Cornut, *ChemPhysChem*, 2010. **11**(3), p. 547-556.
29. Garrett, D.J., J. Lehr, G.M. Miskelly, and A.J. Downard, *Journal of the American Chemical Society*, 2007. **129**(50), p. 15456-15457.
30. Rostovtsev, V.V., L.G. Green, V.V. Fokin, and K.B. Sharpless, *Angewandte Chemie*, 2002. **114**(14), p. 2708-2711.
31. Joeng, C.B., J.H. Niazi, S.J. Lee, and M.B. Gu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. **17**(15), p. 5380-5387.

Chapter IV

Aptamer entrapment in silica
sol-gel in microchannel

1 Introduction

In the previous chapters, we reported the development of methods for the covalent grafting of molecules on the surface of COC and Dyneon THV materials to finally functionalize the walls of microchannels. This covalent grafting will provide stable functionalized surfaces for lab-on-a-chip. Another prospective strategy is presented here that could increase the ligand density in a defined volume of the microchannel, based on the encapsulation of ligands in a monolithic phase.

Among the different methods developed to synthesize monolithic phases, sol-gel approach has gained great interest in the last decades for the encapsulation of biomolecules as moderate temperature mild polymerization conditions allow their entrapment without denaturation [1]. A sol-gel is a colloidal suspension that can be acid- or base-catalyzed to form a solid in a process that involves the transition of the solution from a liquid (the colloidal “sol”) into a solid (the “gel”) phase [2]. The “sols” are generally prepared using inorganic metal salts or metal alkoxide monomers. Silicate-based gels are the most frequently used. In typical sol-gel catalysis, the precursor is subjected to a series of hydrolysis and polymerization reactions to form a colloidal suspension, followed by the particles condensation to form the gel phase, as described in Figure 86 in the case of tetraethyl orthosilicate (TEOS), a commonly used sol-gel precursor. Biomolecules can be entrapped in the gel simply by adding them to the hydrolyzed sol-gel precursor. The biomolecules are encapsulated inside the gel pores, and not adsorbed or covalently linked on the gel surface.

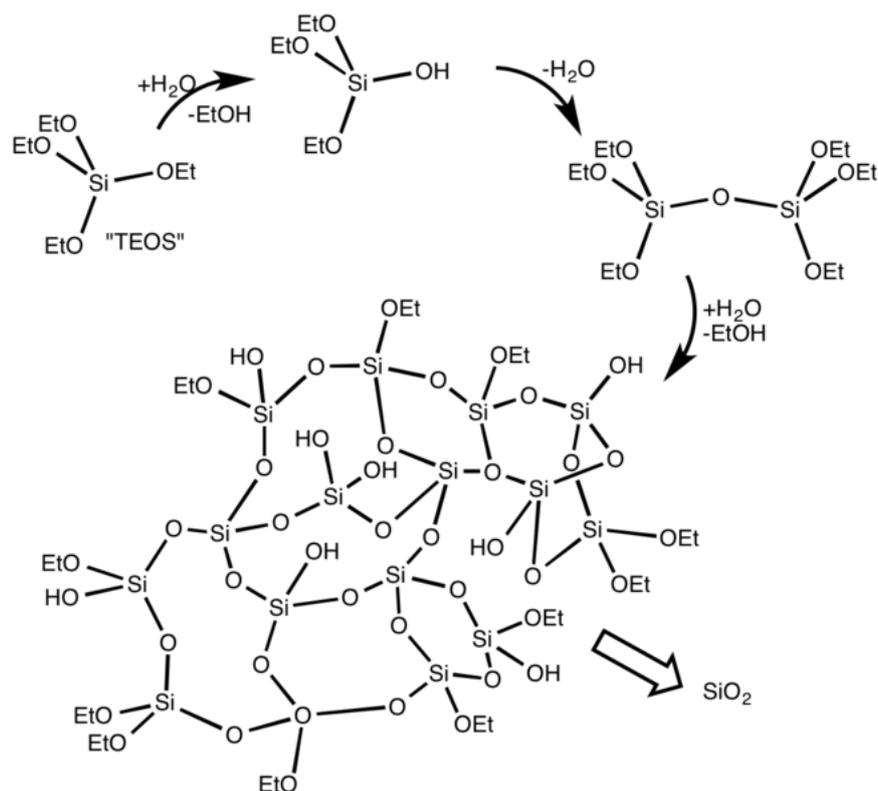


Figure 86 : Principle of TEOS polymerization

Sol-gel matrices doped with biomolecules, and especially silica based gels, have been used for the development of new biomaterials for various applications. In addition to the creation of a 3D network increasing the density of molecules per volume, the sol-gel matrices protect the biomolecules from degradation and increase their time stability [3]. This is thought to be based on two mechanisms. Firstly, the matrix pores limit the diffusion of external reagents that may denature the biomolecules. Secondly, the rigidity of the pores limits the motion of encapsulated biomolecules and may prevent irreversible structural deformations. As the gel preserves the structural conformation of biomolecules, most of them keep their activity upon entrapment in the gel : enzymes show reactivity for their target and antibodies are able to bind their corresponding antigen [4]. These interesting properties triggered the development of biosensors for medical or environmental diagnostic using metalloproteins [5-7], enzymes [8, 9] or antibodies [10-12] entrapped in silica gels.

More recently, sol-gel matrices have been used for microfluidic applications. The gelation occurs *in situ* after introduction of the sol precursor in liquid phase in the microchannel. Sol-gel matrices doped with sorbents have been used for various applications such as on-chip

SPE [13], DNA purification [14] or electrochromatography [15]. Efficient entrapment of enzymes in gel inside microchannels led to the creation of microreactors. For example, a microreactor has been developed for protein digestion by encapsulating the trypsin enzyme in a silica sol-gel matrix in a poly(ethylene terephthalate) (PET) microchannel, resulting in protein digestion with an efficiency comparable to classical in-solution digestion, and realized in few seconds instead of several hours for classical protocols [16]. The microreactor is reusable and has been successfully coupled with ESI-MS/MS to identify proteins in real sample from human liver cells, proving its suitability for proteomics studies.

Only few studies have been reported on the successful aptamer encapsulation by sol-gel. Brennan's group has encapsulated signaling aptamer sensitive to adenosine triphosphate (ATP) in different types of silica-based gels, and proved that it retains its ability to bind ATP when entrapped [17-19]. They used signaling aptamer constructs containing two parts, as shown in Figure 87.A : the aptamer strand bearing a fluorophore is hybridized with a complementary DNA strand, tagged with a quencher. Upon binding of the aptamer with its target, the quencher strand is released, resulting in a fluorescent signal. Such aptamer constructs were encapsulated in 96-well plates using different types of silica-based gels : TEOS, sodium silicate (SS) and diglycerylsilane (DGS). Hybrid materials with SS or DGS mixed with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) have also been used. After drying of the gel the aptamer leaching from the gel was evaluated and estimated between 12 and 49 %, depending on the gel type. Finally, the aptamer activity was evaluated by adding the target, and the fluorescence response of encapsulated aptamers was compared with the fluorescence response of the same aptamers in solution (Figure 87.B). Thus it has been observed that aptamer activity is maintained in the gel but with slower interaction kinetics, consistent with slower diffusion of the ATP through the silica matrix than in solution.

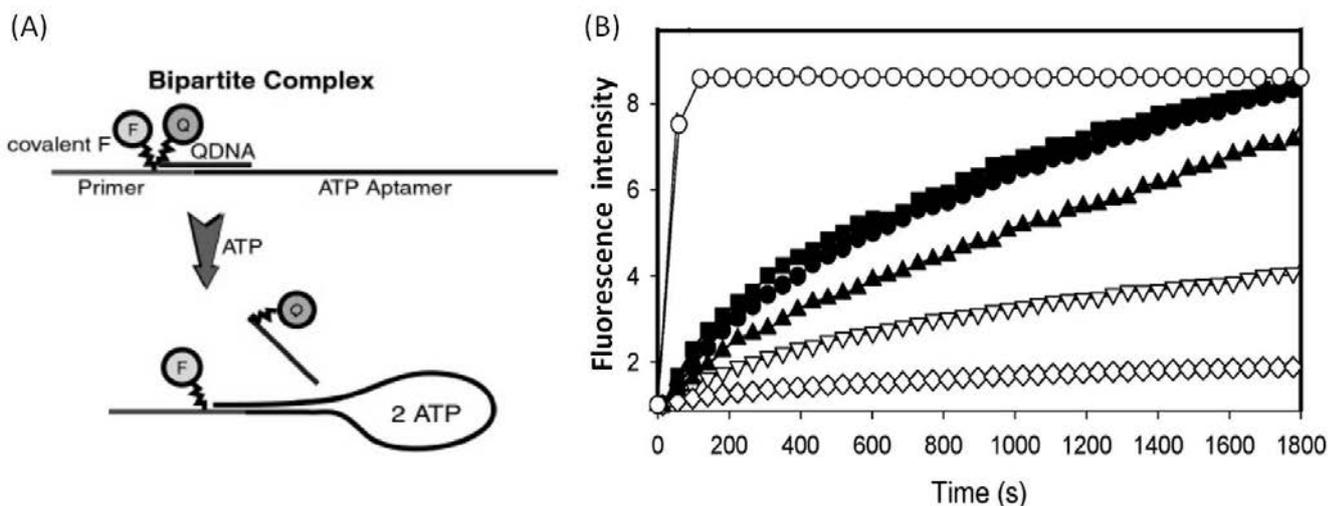


Figure 87 : (A) Structure of the aptamer construct. F : fluorophore covalently bound to the aptamer strand, QDNA : complementary DNA strand bearing a quencher. (B) Fluorescence signaling ability of the ATP-binding aptamer upon exposure to 2 mM ATP in solution (○) or when entrapped in five different sol-gel materials: SS (●), SS + 0.1% APTES (▽), DGS (■), DGS + 0.1% APTES (◇), and TEOS (▲). [17]

By using hybrid silica gels, aptamers can be covalently grafted on the gel. Deng et al. reported the covalent grafting of thrombin aptamer on a hybrid silica-based gel composed of TEOS and APTES. The APTES molecules provide amino groups for the covalent grafting of aptamers through glutaraldehyde coupling [20]. A similar method has been used to graft adenosine aptamer on a tetramethylorthosilicate (TMOS) and APTES gel [21].

However, to the best of our knowledge, no study has been published on the encapsulation of aptamers in gel inside microfluidic systems. In this chapter, we will describe the encapsulation of aptamers in silica sol-gel inside a hybrid PDMS/glass microsystem. The microsystem material was changed compared to previous chapters to validate the proof of concept on better known materials already used in the development of microreactor entrapping proteins by sol-gel [16]. The encapsulation and leaching of aptamers from the gel were analyzed. The activity of the aptamer once encapsulated inside the channel was also evaluated.

2 Materials and methods

2.1 Aptamers

All aptamers used in this study were synthesized by Integrated DNA Technology. First, a DNA aptamer selected by Joeng et al. [22] for its affinity towards diclofenac was used. It contains 75 bases with the following sequence:

5'-ATA CCA GCT TAT TCA ATT GCA ACG TGG CGG TCA GTC AGC GGG TGG TGG GTT CGG TCC
AGA TAG TAA GTG CAA TCT-3'

This aptamer is modified with 6-carboxyfluorescein at the 5' end and 5-octadiynyl at the 3' end.

In a second time, for the affinity study, we used a DNA aptamer of 29 bases binding the fluorophore sulforhodamine B (SB, structure shown in Figure 88), described by Wilson and Szostak [23], with the following sequence:

5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'

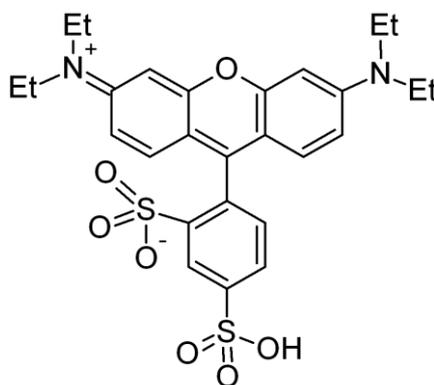


Figure 88 : Structure of the fluorophore sulforhodamine B

Two types of SB aptamers were used : the first type is modified with the fluorescent dye AlexaFluor® 532 (structure is presented on Figure 89) at the 5' end whereas the second type is not modified at the 5' end. Both types are modified with 5-octadiynyl at the 3' end.

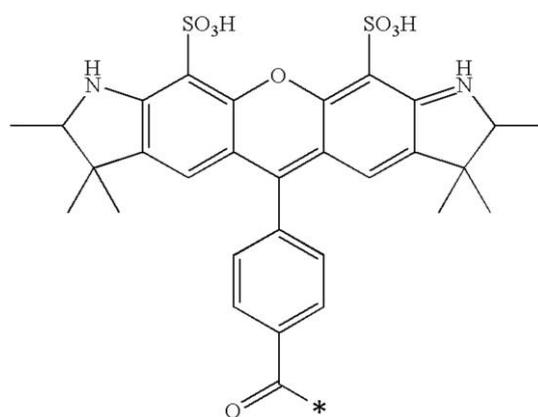


Figure 89 : Structure of the Alexa Fluor® 532 dye. * refer to the emplacement where the dye is coupled with the aptamer.

2.2 Microchip fabrication

Polydimethylsiloxane (PDMS) was mixed with its curing agent composed of octamethylcyclotetrasiloxane (mass ratio 10:1) and degazed in a vacuum chamber. Degazed PDMS was then poured on a silicon mold with a single 0.2 μL channel, with a 300 μm width, a 2 cm length and a 30 μm height (Figure 90), and cured at 60°C for at least 2h. Holes for Inlet and outlet were made using a 2,5 mm puncher. PDMS channels were then bonded on a glass slide using a plasma cleaner by placing both the PDMS and the glass slide in the reactor and then irradiating them with the plasma discharge for 40 s under vacuum. The plasma treatment oxidized the PDMS and glass surfaces, creating Si-OH groups at the surface of both materials. The two halves of the system were then put in contact and Si-O-Si bonds formed immediately and sealed the PDMS on the glass slide.

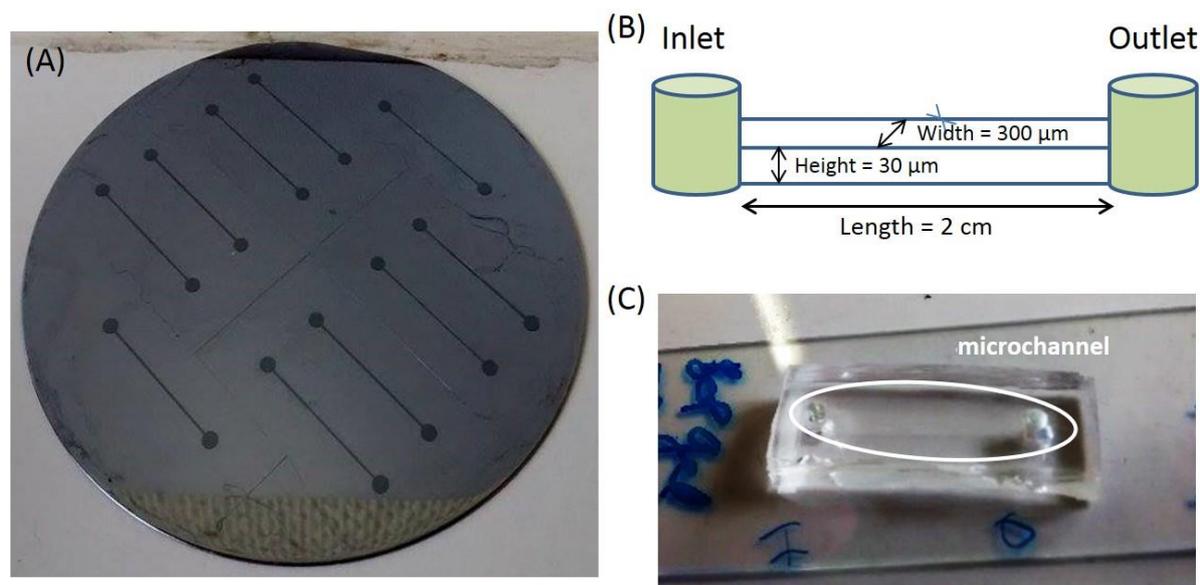


Figure 90 : (A) Silicon mold used for the fabrication of PDMS microchannels. (B) Scheme of the microchannel. (C) Picture of the final device, with the engraved PDMS piece bonded on a glass slide.

2.3 Sol-gel encapsulation of aptamers

The sol-gel precursor was prepared following the protocol described by Liu et al [16] for protein encapsulation. 1.55 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS) was hydrolyzed in 1 mL of 2.5 mM hydrochloric acid (molar ratio 1:8) prepared in Milli-Q water (resistivity $\geq 18.2 \text{ M}\Omega$). Then 5 % of liquid polyethylene glycol (400 g/mol average molecular weight) was added to the mixture. The sol-gel precursor was sonicated for 15 minutes and kept in the fridge overnight. For aptamer encapsulation, a solution of 20 μM aptamer diluted in 20 mM sodium phosphate buffer (PBS, pH 7.0) was mixed with an equivolume amount of sol-gel precursor just before the introduction in the channel. 2 μL of the mixture were dropped in the inlet of the microsystem, and pushed in the PDMS/glass microchannel using a syringe. Three types of chips were made containing either fluorescent aptamers in sol-gel, non-fluorescent aptamers in sol-gel or the sol-gel alone (without aptamer). For the last type, the sol-gel precursor was mixed with an equivolume of PBS 20 mM (pH 7.0). After sol-gel introduction, the chips were allowed to dry at ambient atmosphere for at least 2h, in the dark for the chips entrapping fluorescent aptamers to avoid photodegradation of the fluorophore. After drying the chips were stored in the fridge.

2.4 Fluorescence measurement

Fluorescence microscopy was used to characterize the immobilization of fluorescent aptamers inside chips. The images were recorded using an inverted fluorescence microscopic system (Axio Observer A1, Zeiss) equipped with a 100 W metal halide lamp for the fluorescence excitation and a CCD digital camera for image acquisition. For all studies, images were recorded at 3 different areas for each chip, using an objective with 20 x magnification. The acquisition parameters of the CCD camera were kept constant, with a 25 ms exposition time, a zero gain and no binning. A 550 nm excitation filter and a 605 nm emission filter (filter set 43 HE, Zeiss) were used for fluorescence images.

2.5 Evaluation of aptamer leaching

Aptamer leaching was evaluated using microchips containing fluorescent aptamers. After drying of the gel, the chips were rinsed with 2 μ L of 20 mM PBS (pH 7.0) using a syringe. This volume is equivalent to 10 times the volume of the empty microchannel. The fluorescence of the chips was recorded before and after rinsing. Rinsing was repeated 3 times.

2.6 Activity of encapsulated aptamers

The activity of the encapsulated aptamer was evaluated using the chip containing aptamers binding to SB. Aptamers were activated by heating the microchips filled with buffer at 70°C during 10 minutes in the oven [24]. Fluorescence images were recorded after the activation step. 2 μ L of a solution of 7 μ M SB in binding buffer (potassium phosphate buffer, 20 mM ionic strength, pH 7.0) were introduced in the microchannel and allowed to incubate for 30 minutes in the dark and in a wet environment to limit evaporation. This environment is made of an empty pipette tips box containing wet tissues. Images were taken after the incubation step, and after 3 successive rinsing with 20 mM PBS (pH 7.0).

3 Results and discussion

3.1 Aptamer encapsulation in silica sol-gel in a microchannel

In this study, the sol-gel precursor is introduced in a PDMS/glass microchip and the gelation process takes place inside the microchannel. One of the key features in the gel formation within the microchannel is the anchoring to the channel walls: suitable functional groups have to be present at the wall surface in order to anchor the gel in the channel [16]. During the microfabrication process, oxygen plasma was used to bond the PDMS part containing the microchannel on the glass part. The plasma treatment creates silanol groups at the surface of the PDMS and the glass, and condensation between these silanol surface groups leads to the formation of Si-O-Si bridges resulting in an irreversible sealing of the two materials [25]. During the plasma treatment, silanol groups are also created on the microchannel wall surface and further react with silanols present in the sol-gel precursor during the gelation process (see Figure 86), promoting the attachment of the gel on the walls. When the gel is observed after gelification in the channel (Figure 91.A), it can be seen that the gel is present in the entire channel, even on the edges, confirming the proper attachment on the channel walls.

The aptamer solution is mixed with the sol-gel precursor before its introduction in the channel. To prove that aptamers are actually present in the gel after the in-channel gelification, aptamers modified with a fluorophore were employed to assess the aptamers presence in the gel using fluorescence microscopy. Figure 91.B presents the fluorescence images of a chip containing the gel entrapping fluorescent SB aptamer. The aptamer repartition looks quite homogeneous, with aptamers distributed all along the channel, from the center to the edges. Some regions are slightly more fluorescent, indicative of higher concentration of aptamers.

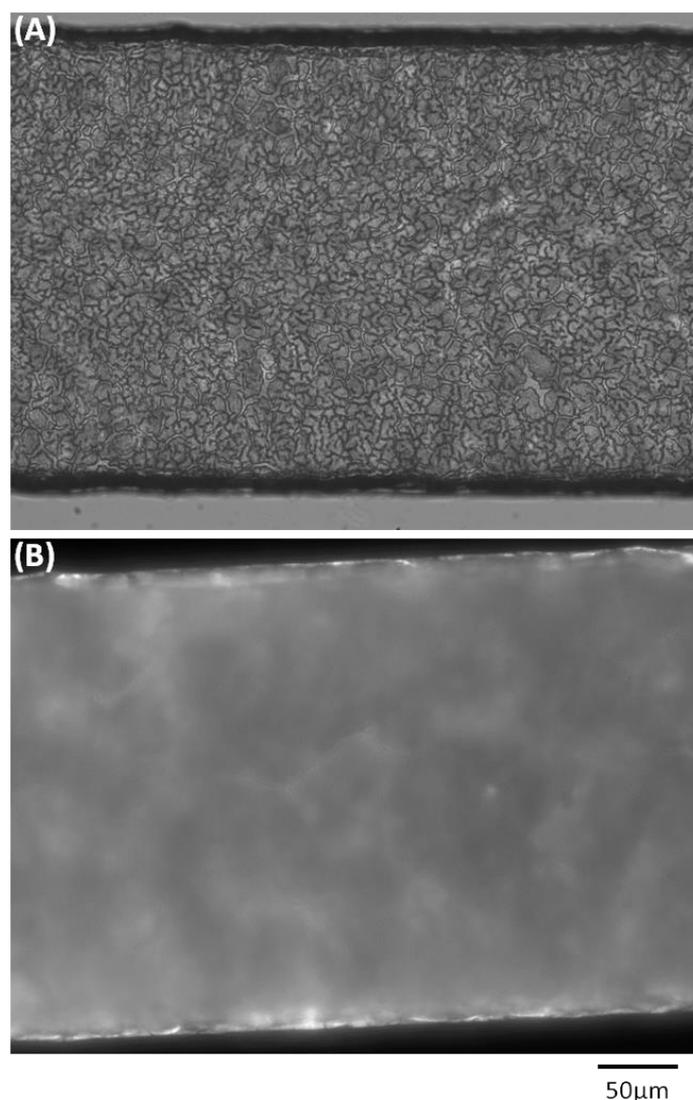


Figure 91 : Images of gel entrapping fluorescent SB aptamers inside PDMS microchannel after drying. White light image (A) and fluorescence image (B) of the same region in the middle of the channel length. Fluorescence filter set : 43HE, objective : x20. Sol-gel precursor was composed of TEOS hydrolyzed in 2.5 mM hydrochloric acid (molar ratio 1:8) + 5% of liquid PEG. Solution of 20 μM aptamer in 20 mM PBS (pH 7.0) was mixed with sol-gel precursor (volume ratio 1:1) just before the introduction in the channel.

Figure 92 reports the mean fluorescence value of the different chips containing gel with fluorescent aptamers (Figure 92, microchips 1-3), non fluorescent aptamers (Figure 92, microchips 4-6) or without entrapped aptamers (Figure 92, microchips 7-9) before any rinsing of the microchannel.

Gels with non fluorescent aptamer or without aptamer were used as blanks. Their negligible fluorescence intensity (below 1.5) indicates that there is almost no autofluorescence of the

gel, the PDMS material and the non fluorescent aptamer. In contrast, the significant fluorescence signal measured for the chips containing fluorescent aptamers (40.6 ± 6.8 , 33.9 ± 1.1 and 32.5 ± 4.8 for chips 1, 2 and 3 respectively) confirms that aptamers are present in the gel inside the microchannel. Indeed, the mean fluorescence intensity of the chips entrapping fluorescent aptamers is 25 times more important than the mean fluorescence of the other chips (35.7 versus 1.4).

The significant error bars (15-17%) for measurement on chips 1 and 3 are due to the heterogeneity of the aptamer concentration along the different analyzed regions. However there is no fluorescence gradient along the microchannel : the regions near the inlet or outlet are not more or less fluorescent than the regions in the middle of the channel length.

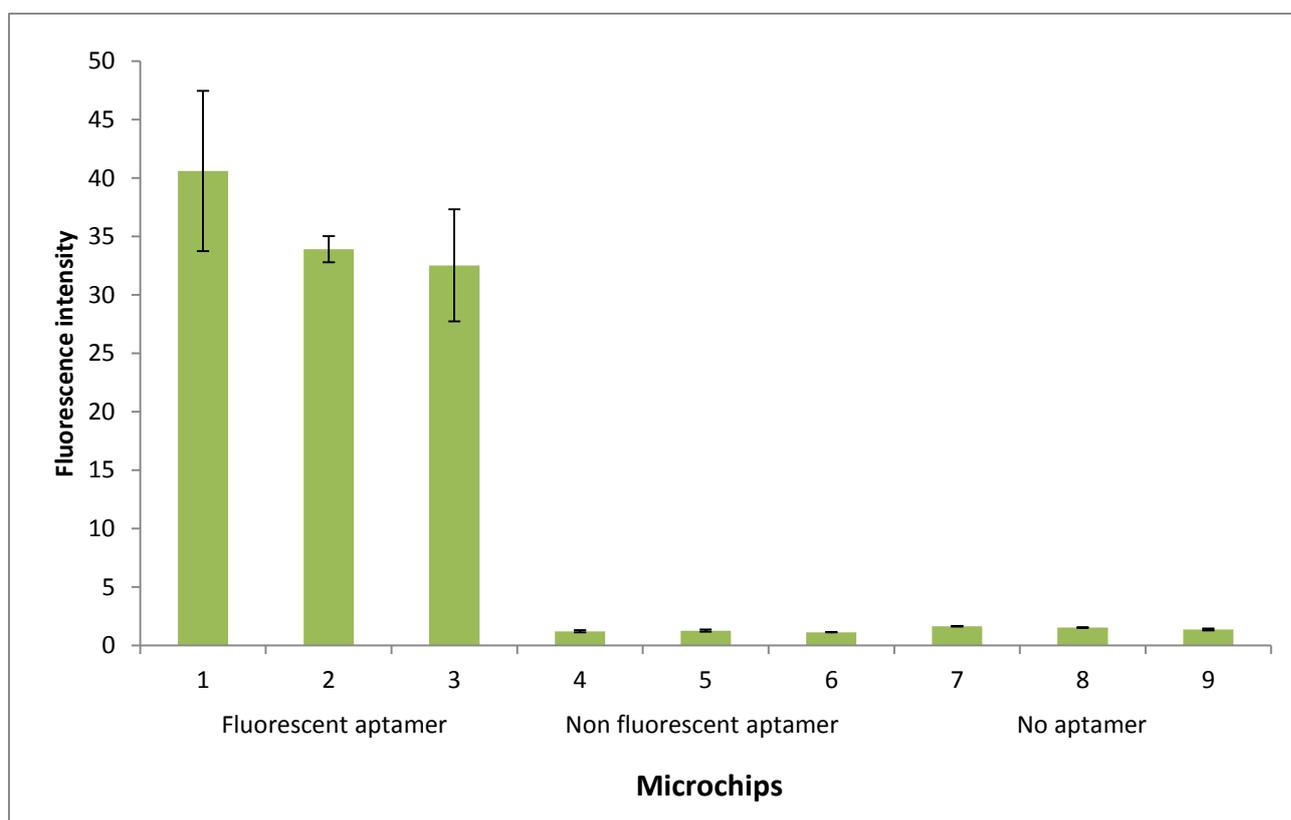


Figure 92 : Mean fluorescence of gel in microchannel. Mean intensity of 3 regions of the channel for each chip. Fluorescence filter set: 43HE. 1-3 : chips entrapping fluorescent aptamers, 4-6 : chips entrapping non fluorescent aptamer, 7-9 : chips without aptamer. Aptamer used : SB aptamer. For other experimental conditions, refer to Figure 91.

3.2 Aptamer retention

Once the aptamer encapsulation in the gel is demonstrated, the stability of this aptamer in the sol-gel matrix upon rinsing was studied. Retention of the biomolecule in the gel is an important aspect for the stability of the microchip. In the case of protein entrapment, several studies report a negligible leaching of the protein from TEOS based gels [26]. However, the smaller size of aptamers may result in more significant leaching from the gel pores as the difference between the biomolecule size and the pore size increases [17]. In order to ensure that aptamers stay in the gel, multiple rinsing with 10 times the channel volume (2 μ L) were performed, followed by a control of the fluorescence intensity of the channel after each rinsing. As observed on Figure 92, each microchip and each region of a microchip have different fluorescence intensities before rinsing. In order to compare the aptamer loss upon rinsing, fluorescence values obtained after rinsing were thus normalized with the value before rinsing. Figure 93 presents the normalized fluorescence intensity of the gel containing fluorescent aptamers before and after rinsing.

Depending on the microchip, 30 to 40 % of aptamers are removed. Leaching is quite reproducible along the different regions of each chip, with acceptable error bars (1-7 %). This may be due to leaching of aptamer from the gel and also to detachment of aptamer that are adsorbed on or interact with the gel but are not properly entrapped. This result shows that even if a part of the aptamers is released from the gel during rinsing, a significant amount (up to 70 %) remains entrapped. It has to be noticed that the most important fluorescence decrease and thus the higher aptamer leaching occurs upon the first rinsing.

If we assume that aptamers are homogeneously distributed in the sol-gel solution and homogeneously introduced in the canal, we can roughly estimate the aptamer quantity present in the gel before rinsing from the aptamer solution concentration and the channel volume. The estimated quantity is 2 pmol, corresponding to 12×10^{11} aptamer molecules. If we consider an aptamer leaching of 40 % after 3 rinsing, it means that about 7.2×10^{11} aptamer molecules should be retained in the channel.

Chips containing non fluorescent aptamers or no aptamers were used as control, to ensure that the fluorescence of the gel does not change through time or rinsing. No significant change in fluorescence upon rinsing was observed for these controls.

Same measurements were made one month after the immobilization in the channel without any significant change in the fluorescence intensity, indicating a good stability within time over a one month period.

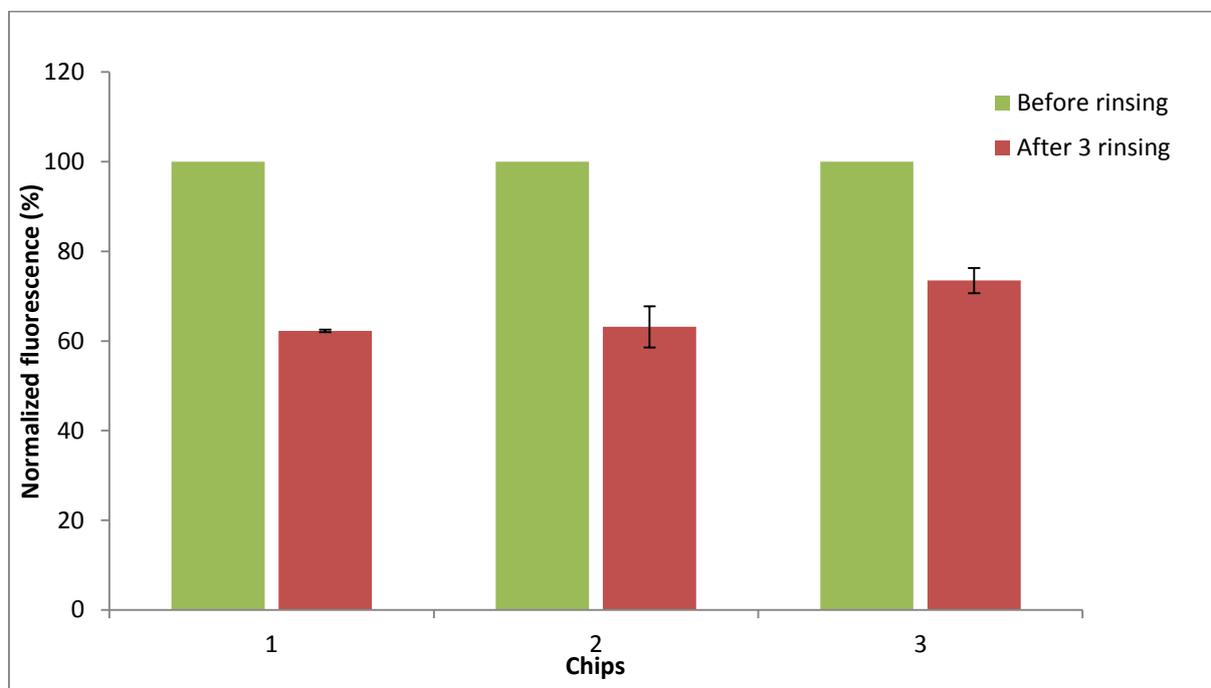


Figure 93 : Normalized fluorescence of 3 chips entrapping fluorescent aptamers before and after 3 rinsings with 2 μ L (10x the channel volume) of PBS 20mM, pH 7.0. For each chip, fluorescence intensity after rinsing is normalized with the fluorescence intensity before rinsing. Fluorescence filter set: 43HE. Aptamer used : SB aptamer. For other experimental conditions, refer to Figure 91.

3.3 Conservation of aptamer activity

After demonstrating the aptamer encapsulation in the sol-gel matrix, it is reasonable to assume that only a part of the entrapped biomolecules are active and can bind their target. Indeed, aptamers could be denatured during the gelation process or take a spatial orientation that prevents their correct folding which is essential to bind its target. In order to prove that aptamers are still able to bind their target when encapsulated in silica gel inside microchannels, a non fluorescent aptamer that binds sulforhodamine B, a fluorescent molecule, was used. Using the chips in which the aptamers were entrapped, the interaction of aptamer with its fluorescent target could be assessed by fluorescence microscopy. Chips

with no aptamer entrapped were used as control to evaluate the non-specific adsorption of the target on the gel.

Figure 94 represents the normalized fluorescence intensity after incubation and after rinsing of each chip. As for the leaching study, the fluorescence is normalized in order to compare the different chips. The fluorescence is normalized by the fluorescence value after incubation and before rinsing. A fluorescence decrease of less than 20 % is observed after 3 rinsings for chips containing aptamers whereas the fluorescence decrease for chips without aptamers is higher than 50 %. This difference in fluorescence decrease evidenced that the remaining fluorescence after incubation is not only resulting from non specific adsorption. The smaller decrease in fluorescence when aptamers are entrapped proves that the target has more interaction with the gel containing aptamer. These results confirm that the target can access the aptamer and that a part of its activity towards the target is preserved even when entrapped.

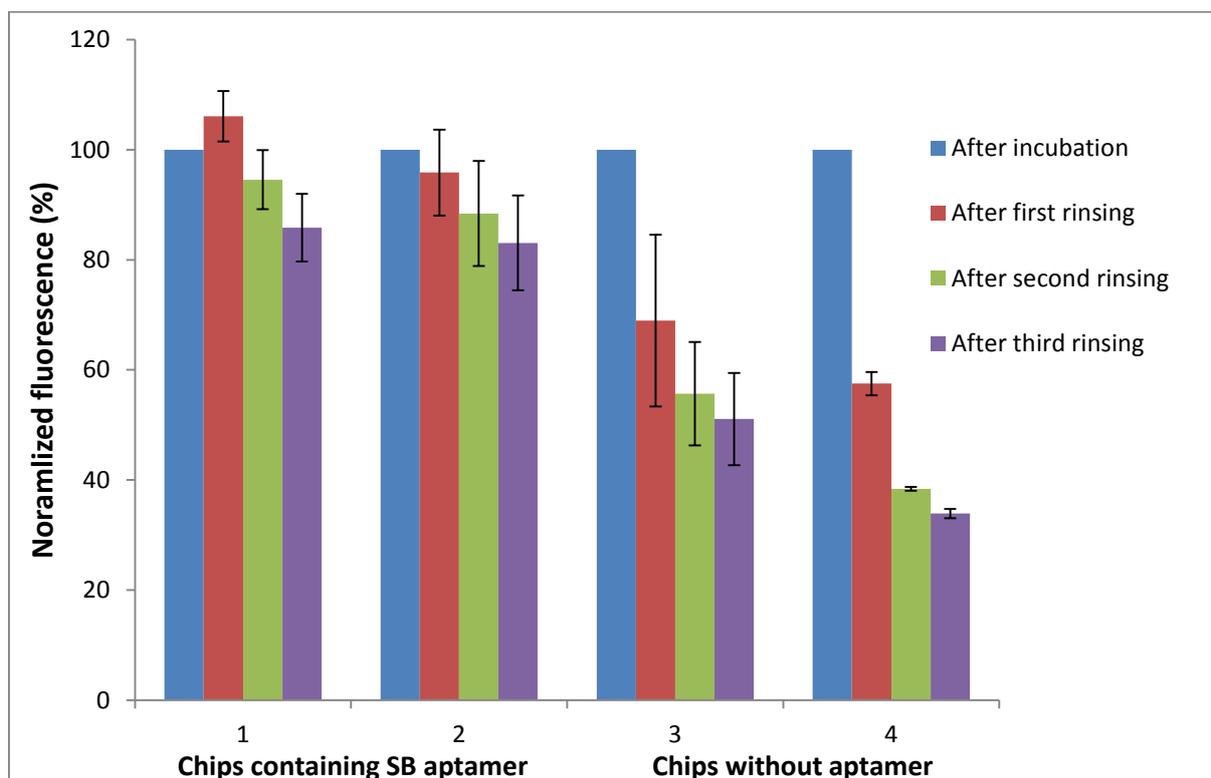


Figure 94 : Normalized fluorescence of chips with (1-2) or without (3-4) SB aptamer. Fluorescence is measured after 30 min incubation with a 7 μ M SB solution in potassium phosphate buffer (20mM, pH 7.0) and after each rinsing with 2 μ L (10x the channel volume) of the same buffer. Fluorescence is normalized by the fluorescent intensity after incubation. For more experimental conditions, refer to Figure 91.

Complementary studies have to be performed in order to prove the specificity and selectivity of the interaction between the entrapped aptamer and its target. In a first study, another aptamer should be entrapped, with no selectivity for the SB molecule, in order to assess that the measured increased retention of the fluorophore in the chip entrapping aptamers is due to the specific recognition of the SB by its aptamer and not to the presence of DNA strands only. Indeed, the presence of charged phosphate groups or hydrogen donors or acceptors present in every DNA strand could generate non specific interactions with the target. Retention should be evaluated for chips containing the specific aptamer and chips containing another DNA strand: if the retention is higher in chips entrapping the aptamer, the specificity of the interaction will be proved. In a second study, another fluorescent molecule should be incubated in gel entrapping SB aptamer, to prove the selectivity of the aptamer for its target. If the aptamer is actually selective to SB, the other fluorescent molecule should not be retained.

4 Conclusion

In this chapter, we proposed preliminary results concerning a new method to encapsulate aptamers in a silica gel inside hybrid PDMS/glass microchannels. First, the proper entrapment of aptamers in the gel inside the microchannel was confirmed by fluorescence microscopy. Then the leaching of aptamers from the gel was proved to be limited, with at least 60% of aptamers retained in the gel. Finally, using a non-fluorescent aptamer and its fluorescent target, we showed that the aptamer activity is maintained in the gel, opening the way to new methods to create selective extraction phases in microchannels, in view of the development of new μ TAS.

5 References

1. Avnir, D., S. Braun, O. Lev, and M. Ottolenghi, *Chemistry of Materials*, 1994. **6**(10), p. 1605-1614.
2. Brinker, C.J. and G.W. Scherer, *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. 1989: Academic press. pp 2-10.
3. Livage, J., T. Coradin, and C.c. Roux, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2001. **13**(33), p. R673.
4. Braun, S., S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, and M. Ottolenghi, *Materials Letters*, 1990. **10**(1), p. 1-5.
5. Blyth, D., J. Aylott, D. Russell, J. Moir, and D. Richardson, *Analyst*, 1999. **124**(2), p. 129-134.
6. Dave, B.C., B. Dunn, J.S. Valentine, and J.I. Zink, *Analytical Chemistry*, 1994. **66**(22), p. 1120A-1127A.
7. Lee, S.-K. and I. Okura, *Analytica Chimica Acta*, 1997. **342**(2-3), p. 181-188.
8. Narang, U., P.N. Prasad, F.V. Bright, A. Kumar, N.D. Kumar, B.D. Malhotra, M.N. Kamalasanan, and S. Chandra, *Chemistry of Materials*, 1994. **6**(10), p. 1596-1598.
9. Aylott, J., D. Richardson, and D. Russell, *Analyst*, 1997. **122**(1), p. 77-80.
10. Wang, J., P.V.A. Pamidi, and K.R. Rogers, *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(6), p. 1171-1175.
11. Wang, R., U. Narang, P.N. Prasad, and F.V. Bright, *Analytical Chemistry*, 1993. **65**(19), p. 2671-2675.
12. Lan, E.H., B. Dunn, and J.I. Zink, *Chemistry of Materials*, 2000. **12**(7), p. 1874-1878.
13. Karwa, M., D. Hahn, and S. Mitra, *Analytica Chimica Acta*, 2005. **546**(1), p. 22-29.
14. Breadmore, M.C., K.A. Wolfe, I.G. Arcibal, W.K. Leung, D. Dickson, B.C. Giordano, M.E. Power, J.P. Ferrance, S.H. Feldman, P.M. Norris, and J.P. Landers, *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(8), p. 1880-1886.
15. Jindal, R. and S.M. Cramer, *Journal of Chromatography A*, 2004. **1044**(1-2), p. 277-285.
16. Liu, Y., H. Qu, Y. Xue, Z. Wu, P. Yang, and B. Liu, *Proteomics*, 2007. **7**(9), p. 1373-1378.
17. Rupcich, N., R. Nutiu, Y. Li, and J.D. Brennan, *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(14), p. 4300-4307.
18. Hui, C.Y., Y. Li, and J.D. Brennan, *Chemistry of Materials*, 2014. **26**(5), p. 1896-1904.
19. Carrasquilla, C., Y. Xiao, C.Q. Xu, Y. Li, and J.D. Brennan, *Analytical Chemistry*, 2011. **83**(20), p. 7984-7991.
20. Deng, N., Z. Liang, Y. Liang, Z. Sui, L. Zhang, Q. Wu, K. Yang, L. Zhang, and Y. Zhang, *Analytical Chemistry*, 2012. **84**(23), p. 10186-10190.
21. Mu, L., X. Hu, J. Wen, and Q. Zhou, *Journal of Chromatography A*, 2013. **1279**, p. 7-12.
22. Joeng, C.B., J.H. Niazi, S.J. Lee, and M.B. Gu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009. **17**(15), p. 5380-5387.
23. Wilson, C. and J.W. Szostak, *Chemistry & Biology*, 1998. **5**(11), p. 609-617.
24. Sultan, Y., R. Walsh, C. Monreal, and M.C. DeRosa, *Biomacromolecules*, 2009. **10**(5), p. 1149-1154.
25. Duffy, D.C., J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides, *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(23), p. 4974-4984.
26. Bronshtein, A., N. Aharonson, D. Avnir, A. Turniansky, and M. Altstein, *Chemistry of Materials*, 1997. **9**(11), p. 2632-2639.

General conclusion

This work constitutes the first developments in the conception of a microfluidic analytical system for detection and quantification of pharmaceutical compounds, considered as emerging pollutants, in environmental samples. Microsystem development is a way to simplify environmental analysis by integrating the different analytical steps (from pretreatment to detection) in a single portable device compatible for on-site use, resulting in a fast and low-cost analysis, with reduced amount of sample and solvent used. The microsystem developed in the context of this PhD work is based on an original approach consisting in the integration of a preconcentration area containing aptamers as selective ligands to concentrate the target and extract it from the sample.

In these different studies, we proposed several strategies to functionalize either an entire microfluidic channel or a localized region of the channel. The first studies focus on the modification of COC and THV materials, very promising materials for microfluidics.

In a first study, we developed a new strategy for COC or THV surface modification based on the deposition of a brominated layer on the polymer surface using a plasma process followed by the substitution of the bromine groups by azide groups in order to perform subsequent CuAAC reaction between azide functional groups and a ligand bearing a terminal alkyne. Each step of the surface modification was characterized using different techniques. First, the brominated deposit was optimized and characterized by water contact angle, XPS, SECM and ellipsometry. The optimal plasma parameters were a plasma power of 60 W applied during 10 minutes. These parameters led to the deposition of a stable and homogeneous layer containing around 9 % of bromine on COC and THV surfaces. Ellipsometry measurement realized on stainless steel surface revealed a thickness of 345 nm for the deposition with optimized parameters, and the thickness is thought to be similar on COC or THV. FTIR – ATR measurements proved the apparition of azide groups at the surface of COC and THV surfaces after substitution of Br groups and their replacement by triazole rings after CuAAC reaction. Finally, the grafting of a model fluorophore through CuAAC reaction allowed the characterization by fluorescence microscopy. The fluorescence increase of 20 % or 94 % upon fluorophore immobilization on COC and THV surfaces respectively proved the successful CuAAC reaction and validate the overall functionalization process for

General conclusion

both materials. The transfer of this functionalization procedure in microchannel can allow the grafting of polymers or functional groups for the control of the surface properties, in order to limit the adsorption on the channel walls and control flows, two essential issues in the development of microfluidic systems.

In a second study, a new method was developed for the local grafting of aptamers on THV surface, by coupling an electrochemical modification and the CuAAC reaction. SECM was used to move a microelectrode along the THV substrate and the application of a potential at the tip of the microelectrode induced the local reduction of the material in the electrode vicinity, resulting in the removal of fluorine groups and carbonization of the material. Local modification was assessed by microscopy. This technique was first used on THV plates and then successfully transferred for the modification of the bottom of an open THV microchannel. After carbonization, auto-grafting of 4-azidobenzene diazonium on the carbonized patterns is used to immobilize azide groups on the surface, allowing a subsequent CuAAC reaction step to graft either a model fluorophore or an aptamer modified with a fluorophore. The local grafting of fluorescent compounds was assessed by fluorescence microscopy, with an increase of the fluorescence on the carbonized lines only. This local modification process allows the integration of a preconcentration area containing aptamer in an analytical microsystem.

Finally, a sol-gel process was used to encapsulate aptamers in silica gel inside a PDMS microchannel. Leaching studies using a fluorescent aptamer showed that the majority of aptamers remained entrapped in the gel upon several rinsings. Activity of entrapped aptamers was evaluated using a non-fluorescent aptamer and a fluorescent target, and it was shown that entrapped aptamers are still able to bind their targets. These promising preliminary results may lead to the creation of innovative selective extraction phases in microchannels.

All these functionalization methods allow us to either control the adsorption and flows inside the microchannel or graft selective ligands in the channel to create a preconcentration area, two critical steps in the development of a microsystem. These processes open the way to the development of analytical microsystems in different domains. Indeed, the methods developed here are versatile and can be used for the grafting of various biomolecules,

General conclusion

polymers or functional groups and the strategy used can be applied for the design of microfluidic systems for environmental analysis but also other fields such as clinical diagnosis.

Surface functionalization strategies for the design of a lab-on-a-chip integrating an aptamer-based molecular capture for the analysis of emerging water contaminants

Abstract

Developed to promote human health and well-being, certain pharmaceuticals are now attracting attention as crucial emerging water contaminants. To deal with this concern, we aim at developing an analytical microsystem for the identification and quantitation of these contaminants in water samples. The original aspect of this lab-on-a-chip relies on the integration inside the channel of a preconcentration zone in which ligands (aptamer in our study) are immobilized, in order to concentrate the target and extract it from the rest sample matrix. Development of this microsystem requires surface treatments to modify the microchannel surface at two scales: (1) globally (on the entire channel walls) to control surface properties and thus avoid adsorption as well as control fluid flows, or (2) locally to immobilize selective ligands in restricted areas for selective target extraction and preconcentration. Polymers COC and THV, attractive for the conception of microfluidic chips thanks to their UV-visible transparency and high resistance to aggressive solvents, were selected as the microchip material. However due their chemical inertness new functionalization techniques have to be developed to modify their surface. In this work, innovative surface treatment strategies have been developed for both materials, based on plasma, electrochemical and chemical approaches. The possibility of encapsulating aptamers in a monolithic phase inside microchannel by sol-gel process was also explored.

Keywords : analytical microsystem, aptamers, surface functionalization, COC, THV, plasma process, electrochemistry, sol-gel

Stratégies de fonctionnalisation de surface pour le développement d'un laboratoire-sur-puce intégrant une zone de préconcentration contenant des aptamères pour l'analyse de polluants émergents des eaux

Résumé

Développés pour améliorer la santé et le bien-être, certains composés pharmaceutiques sont désormais sous haute surveillance car considérés comme des contaminants émergents des eaux. Pour répondre à ce nouvel enjeu, nous visons à développer un microsystème d'analyse permettant l'identification et la quantification de ces contaminants dans des échantillons d'eau. L'aspect original de ce microsystème repose sur l'intégration au sein du canal d'une zone de préconcentration dans laquelle sont immobilisés des ligands (aptamères dans notre étude), permettant l'extraction sélective de la cible et sa concentration. Pour développer ce microsystème, deux types de fonctionnalisation de surface doivent être mis en œuvre : (1) globale, sur toute la surface des canaux, pour contrôler leurs propriétés de surface et ainsi éviter l'adsorption et contrôler les écoulements de liquides, et (2) locale, pour greffer les ligands sélectifs dans une zone confinée du canal. Les polymères COC et THV, prometteurs pour la conception de puces microfluidiques grâce à leur transparence dans le domaine UV-visible et leur excellente résistance aux solvants, ont été sélectionnés pour la microfabrication du système. Cependant, leur inertie chimique rend difficile la fonctionnalisation de leur surface, et de nouvelles méthodes de traitement de surface ont été développées. Nous présentons ainsi plusieurs méthodes innovantes pour la fonctionnalisation de surface de ces matériaux, basées sur un dépôt plasma, une modification électrochimique et/ou une réaction chimique. La possibilité d'encapsuler les aptamères dans une phase monolithique à l'intérieur d'un microcanal grâce à un procédé sol-gel a également été évaluée.

Mots-clés : microsystème analytique, aptamères, traitement de surface, COC, THV, procédé plasma, électrochimie, sol-gel