



HAL
open science

Développement de systèmes miniaturisés à base d'aptamères pour la détection de biomarqueurs de cancer

Samantha Bourg

► **To cite this version:**

Samantha Bourg. Développement de systèmes miniaturisés à base d'aptamères pour la détection de biomarqueurs de cancer. Autre. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLECO20 . tel-02879895

HAL Id: tel-02879895

<https://pastel.hal.science/tel-02879895>

Submitted on 24 Jun 2020

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.



THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris

**Development of aptamer-based microfluidic systems for
the detection of cancer biomarkers**

**Développement de systèmes microfluidiques à base
d'aptamères pour la détection de biomarqueurs de
cancer**

Soutenue par

Samantha Bourg

le 27/09/2019

Ecole doctorale n° 406

**Chimie Moléculaire de Paris-
Centre**

Spécialité

Chimie Moléculaire



ParisTech



Composition du jury :

Laurent, CORTÉ *Président du jury*
Professeur, Mines-Paris Tech

Florence, GENESTE *Rapportrice*
Directrice de recherche CNRS, Université de Rennes 1

Christine, MÉNAGER *Rapportrice*
Professeur, Sorbonne Université

Fanny, D'ORLYÉ *Examinatrice*
Maître de Conférences, École Nationale Supérieure de Chimie
de Paris

José Alberto, FRACASSI DA SILVA *Examineur*
Professeur, Université de Campinas

Fethi, BEDIoui *Directeur de thèse*
Directeur de recherche CNRS, École Nationale Supérieure de
Chimie de Paris

Je dédie ce travail à ma mère

Remerciements

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Christine Ménager et Florence Geneste pour avoir accepté de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également Laurent Corte et José Alberto Fracassi da Silva d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Je tiens à remercier Daniel Scherman, de m'avoir permis d'effectuer mes recherches au sein de l'Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (CNRS 8258-INSERM 1022-Chimie ParisTech-Université Paris Descartes) et Carlo Adamo pour avoir réalisé une transition en douceur vers la nouvelle Unité de Chimie pour les Sciences de la Vie et de la Santé (CNRS 2027, Chimie ParisTech, PSL). J'adresse également des remerciements à l'Université Paris Sciences et Lettres qui a financé ma bourse de thèse pendant 3 ans. Je remercie les financements CAPES-COFECUB et le labex MiChem pour m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux de thèse pendant 5 mois, à l'Université de Campinas (Brésil) sous la responsabilité de José Alberto Fracassi da Silva, que je tiens aussi à remercier de son accueil chaleureux dans son laboratoire. Je tiens aussi à remercier Dosil Pereira de Jesus pour son accueil au laboratoire au Brésil, et un grand merci pour les Professeurs, Maîtres de Conférences et techniciens des laboratoires à l'Université de Campinas qui m'ont tant appris sur les techniques de caractérisation des nanoparticules d'or. Je tiens à remercier Lucas Bressan avec qui j'ai partagé de longues heures de conversation sur la culture brésilienne et la gastronomie française.

Au cours de cette thèse j'ai aussi pu travailler dans de nombreux laboratoires formidables au sein de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP), l'Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG) et au Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA). Je remercie Grégory Lefevre (ENSCP, Institut de Recherche de Paris) et Philippe Vermaux (ENSCP, Métallurgie Structurale) pour leur aide précieuse sur des méthodes de caractérisation de solutions colloïdales et de surfaces. Je tiens aussi à remercier Guillaume Laffite (IPGG), Olivier Lesage (IPGG) et Nawel Cherkoui (IPGG) pour leurs précieux conseils et leur aide en microfabrication. Un grand merci pour Thu-Hoa Tran-Thi (CEA, Service Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie) pour son aide et ses conseils avisés sur les procédés sol-gel.

Cette thèse a conduit à une autre collaboration qui est chère à mes yeux avec le Laboratoire Procédés, Plasmas, Microsystèmes (2PM) de l'ENSCP. Je tiens tout d'abord à remercier le chef d'équipe, Michael Tatoulian, qui a su directement quels étaient nos besoins et à Cédric Guyon, pour sa formation prodiguée sur les plasmas. Je remercie également tous les thésards du 2PM, Marion Gaudeau, Aurélien Lepoêtre, Pierre-Alexandre Royoux et Julien Wengler avec qui j'ai passé d'agréables *after work*. Je tiens plus particulièrement à remercier Julien Wengler pour sa formation prodiguée sur les techniques de microfabrication, Aurélien Lepoêtre pour les longues heures de discussion passées ensemble et Pierre-Alexandre Royoux pour le café généreusement offert au cours des pauses et pour les nombreux conseils.

Je tiens à remercier tous les permanents de l'équipe d'accueil Synthèse, Electrochimie, Imagerie et Systèmes Analytiques pour le Diagnostic avec qui j'ai travaillé et/ou passé d'agréables moments : Bich-Thuy Doan, Christian Girard, Camille Lescot, Laura Trapiella et Cyrine Slim.

Une thèse n'est rien sans directeurs et encadrants de thèse. J'adresse de sincères remerciements à Fethi Bedioui et Anne Varenne, directeurs de thèse, pour m'avoir fait confiance. Je remercie vivement Sophie Griveau, co-encadrante de thèse, pour son soutien, sa bonne humeur et son aide. Je remercie également Fanny d'Orlyé, co-encadrante, pour son aide au quotidien sur les méthodes d'analyses séparatives.

Un laboratoire n'est rien sans ses doctorants. Un grand merci pour Jérémie Gouyon et tes fameuses blagues. Merci Menel Ben Frej pour ta grâce et la lumière que tu apportes à ce laboratoire. Je souhaite aussi remercier les autres doctorants Sarah Boumati, Getnet Kassahun et Yuan-Yuan Zhan. Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires sans qui cela aurait été différent et notamment Diego Leon pour son travail fourni sur les hydrogels photopolymérisés en micro-canal.

Je remercie également ma mère, Nathalie Rebelo sans qui rien n'aurait été possible. Je remercie de tout mon cœur Maxime Moffront qui m'a soutenue pendant ces trois ans. Un grand merci pour tous mes amis d'avoir été présents, surtout pour aller manger au restaurant. Et enfin de l'oublions pas, merci Guizmo.

Acknowledgements

I would like to express my gratitude to Christine Ménager and Florence Geneste for having agreed to report this thesis. I would also like to thank Laurent Corte and José Alberto Fracassi da Silva for agreeing to be on my jury. I would like to thank Daniel Scherman, for allowing me to carry out my research in the Unit of Chemical and Biological Technologies for Health (CNRS 8258-INSERM 1022-Chimie ParisTech-Université Paris Descartes) and Carlo Adamo for making a smooth transition to the new Unit of Institute of Chemistry for Life and Health Sciences (CNRS 2027, Chimie ParisTech, PSL). I would also like to thank Université Paris Sciences et Lettres, which funded my thesis scholarship for 3 years. I would like to thank CAPES-COFECUB and MiChem labex fundings to permit me to carry on a research work for 5 months at the University of Campinas (Brazil) under the responsibility of José Alberto Fracassi da Silva, whom I would also like to thank for his warm welcome in his laboratory. I would also like to thank Dosil Pereira de Jesus for his welcome to the laboratory in Brazil, and a big thank you to the Professors, Associate Professor and laboratory technicians at the University of Campinas who taught me about the methods of gold nanoparticle characterizations. I would like to thank Lucas Bressan, PhD student of Campinas University, with whom I shared long hours of discussions about Brazilian culture and French cuisine.

During this thesis I had many opportunities to work with many other laboratories in France at the École Nationale Supérieure de Chimie de Paris (ENSCP), the Institut Pierre-Gilles de Gennes (IPGG) and the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA). I would like to thank Grégory Lefevre (ENSCP, Institut de Recherche de Paris) and Philippe Vermaux (ENSCP, Métallurgie Structurale) for their valuable help on nanoparticle and surface characterizations. I would also like to thank Guillaume Laffite (IPGG), Olivier Lesage (IPGG) and Nawel Cherkoui (IPGG) for their valuable advices and helps in microfabrication. Many thanks to Thu-Hoa Tran-Thi (CEA, Service Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie) for her help and wise advice on sol-gel process.

This thesis led to another collaboration that is dear to me with the ENSCP's Laboratoire Procédés, Plasmas, Microsystèmes (2PM). First of all, I would like to thank the team leader, Michael Tatoulian, who knew directly what our needs were and Cedric Guyon, for his training on plasmas. I also thank to the 2PM doctoral students, Marion Gaudeau, Aurélien Lepoêtre, Pierre-Alexandre Royoux and Julien Wengler, and, with whom I spent some pleasant after work. I would particularly like to thank Julien Wengler for his training on microfabrication technics, Aurélien Lepoêtre for the long hours of discussion spent together and Pierre-Alexandre Royoux for the coffee generously offered during the breaks and for the many advices.

I would like to thank all Associate Professors and Research Scholar of the Synthesis Electrochemistry, Imaging and Analytical Systems for the Diagnosis team with whom I have worked and/or had pleasant times: Bich-Thuy Doan, Christian Girard, Camille Lescot, Laura Trapiella and Cyrine Slim.

A thesis is nothing without thesis directors and supervisors. I would like to express my sincere thanks to Fethi Bedioui and Anne Varenne, thesis directors, for believing in me. I would like to thank Sophie Griveau, thesis supervisor, for her support,

good mood and help. I would also like to thank Fanny d'Orlyé, thesis supervisor, for her daily help with the separative analysis methods.

A laboratory is nothing without its PhD students. A big thank you for Jérémie Gouyon and your famous jokes. Thank you Menel Ben Frej for your grace and the light that you bring to this laboratory. I would also like to thank the other PhD students Getnet Kassahun, Yuan-Yuan Zhan and Sarah Boumati. I would also like to thank all the trainees without whom it would have been different and in particular Diego Leon for its work on photopolymerized hydrogels in microchannels.

I also thank my mother, Nathalie Rebelo, without whom nothing would have been possible. I thank Maxime Moffront with all my heart for his support for these 3 years. A big thank you to all my friends to be present, especially to go to restaurant. And finally, let's not forget it, thank you Guizmo.

Aide à la lecture

N.B. : Ce manuscrit est rédigé en français et en anglais. Un résumé complet de la thèse est rédigé en français, et est situé en toute première partie du manuscrit suivi d'un chapitre « état de l'art », aussi rédigé en français. Les chapitres « résultats » sont écrits en anglais. Ils sont constitués en grande partie des articles produits au cours de cette thèse et qui sont intégralement reproduits et agrémentés de données supplémentaires :

- Article 1 (Chapitre III) : OSTE polymer material for microchip electrophoresis: a methodological approach to electroosmotic flow determination
- Article 2 (Chapitre III) : Modification strategies of off-stoichiometry thiol-ene polymer surface by aptamers: a methodological study
- Article 3 (Chapitre III) : Multiple zones immobilization of synthetic oligonucleotide in open OSTE-microchannel
- Article 4 (Chapitre IV) : Surface functionalization of cyclic olefin copolymer by plasma-enhanced chemical vapor deposition using atmospheric pressure plasma jet for microfluidic applications

Les références bibliographiques citées dans le manuscrit sont numérotées de 1 à 308 et sont listées à la fin (rubrique bibliographique).

Reading assistance

N.B.: This manuscript is written in French and English. A complete summary of the thesis is written in French, situated in the first part of the manuscript followed by a chapter "state of art", also written in French. The "result" chapters are written in English. They consist of articles produced during this thesis, which are fully reproduced and supplemented with additional data:

- Article 1 (Chapter III): OSTE polymer material for microchip electrophoresis: a methodological approach to electroosmotic flow determination
- Article 2 (Chapter III): Modification strategies of off-stoichiometry thiol-ene polymer surface by aptamers: a methodological study
- Article 3 (Chapter III): Multiple zones immobilization of synthetic oligonucleotide in open OSTE-microchannel
- Article 4 (Chapter IV): Surface functionalization of cyclic olefin copolymer by plasma-enhanced chemical vapor deposition using atmospheric pressure plasma jet for microfluidic applications

The bibliographical references cited in the manuscript are numbered from 1 to 308 and listed at the end (bibliographical section).

Table des matières

Résumé des travaux de thèse	1
1. État de l'art (Chapitre I)	2
1.1. Les matériaux de systèmes microfluidiques.....	2
1.2. Les laboratoires sur puce et les méthodes de préconcentration	2
1.3. Les aptamères comme agent sélectif dans des systèmes miniaturisés pour le diagnostic.....	4
2. Objectifs du travail de thèse : stratégies de fonctionnalisation de matériaux de microsystèmes	5
3. Choix de l'aptamère : preuve de concept (Chapitre II)	6
4. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux en polymère OSTe (Chapitre III)	7
4.1. Écoulement électroosmotique.....	9
4.2. Stratégie d'immobilisation de l'aptamère sur plaques en OSTe	10
4.3. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux	13
5. Procédé sol-gel pour la fonctionnalisation localisée de micro-canaux en COC (Chapitre IV)	14
5.1. Optimisation du dépôt de la couche de silice.....	16
5.2. Intégration du sol-gel dans des micro-canaux en COC : caractérisations et optimisations	18
5.3. Encapsulation des aptamères dans le sol-gel	19
5.4. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux par le procédé sol-gel	20
6. Conclusions	21
7. Références bibliographiques	22
General Introduction	27
Chapitre I : État de l'art	29
Listes des abréviations	30
I.1. Les méthodes de diagnostic des cancers	32
I.2. Les matériaux de systèmes microfluidiques	42
I.2.1. Silicium.....	43
I.2.2. Verre	43
I.2.3. Les polymères	43
I.3. Les laboratoires sur puce et les méthodes de préconcentration	53
I.3.1. Principe de fonctionnement des laboratoires sur puce (LOACs)	53
I.3.2. Préconcentration des échantillons en microsystèmes	58
I.4. Les aptamères comme agent sélectif pour la préconcentration dans des systèmes miniaturisés pour le diagnostic	75
I.4.1. Structure des aptamères	76
I.4.2. Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX).....	78
I.4.3. Application des aptamères comme ligands d'extraction dans les dispositifs miniaturisés analytiques pour le diagnostic.....	81
I.4.4. Conclusion.....	84
Chapter II: Materials, chemicals, aptamer characterization and gold nanoparticles synthesis and characterization	87
List of abbreviations	88
II.1. Materials and chemical reagents	89

II.2. Anti-sulforhodamine B aptamer.....	91
II.2.1. Aptamer description.....	91
II.2.2. Aptamer characterization	92
II.2.3. Aptamer modification	99
II.2.4. Aptamer immobilization characterizations	99
II.3. Gold nanoparticles synthesis and characterization	100
Chapter III: Localized functionalization of OSTE microchannels.....	105
List of abbreviations	106
III.1. General introduction.....	107
III.2. Electroosmotic flow characterization	111
III.3. Strategies for aptamer immobilization.....	128
III.4. Aptamer multiple zones functionalization onto OSTE microchannel: proof of concept.....	147
III.5. Conclusions and perspectives	163
Chapter IV: Sol-gel process for localized functionalization of COC microchannels.....	165
List of abbreviations	166
IV.1. General introduction.....	167
IV.2. Silica thin film deposits in COC microchannels	171
IV.3. Electroosmotic flow characterization	187
IV.4. Sol-gel process for functionalization of COC microchannels.....	191
IV.4.1. Experimental procedure.....	191
IV.4.2. Results and discussions	192
IV.5. Encapsulation of aptamer in sol-gel.....	198
IV.5.1. Experimental procedure.....	199
IV.5.2. Results and discussions	200
IV.6. Localized functionalization	204
IV.7. Conclusions and perspectives	205
General Conclusion	209
Annex: anti-sulforhodamine B aptamer: Taylor Dispersion Analysis.....	213
Bibliographical references	215

Résumé des travaux de thèse

Les cancers sont un groupe de pathologies qui touchent toute la population mondiale et le nombre de décès ne cesse de croître au fil des années.¹ Cette maladie est souvent détectée à un stade assez avancé et la prise en charge des patients est parfois trop tardive pour les sauver.² Un diagnostic précoce des cancers permettrait de réduire considérablement le taux de mortalité.² Il a été montré que les biomarqueurs de cancer (ADN, ARN, cellules, protéines...) sont présents avant apparition des symptômes et permettent donc de réaliser des diagnostics précoces.³ Cependant, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un seul type de cancer et ils sont présents en très faibles concentrations dans les échantillons biologiques complexes (sang, urine, tissus,...) rendant ainsi leur détection et leur quantification compliquées.³ Les immunohistochimies (IHC) ou les immuno-essais sont à l'heure actuelle des techniques cliniques de dosage de biomarqueurs de cancer.^{4,6} Ces méthodes sont invasives et/ou ne permettent pas de fournir un diagnostic non erroné du fait de la détection d'un biomarqueur à la fois. De plus, ces méthodes analytiques sont longues et complexes à mettre en œuvre, car elles nécessitent de nombreuses étapes de préparation avant analyse.

Pour permettre une détection sensible et spécifique d'un ensemble de biomarqueurs de cancer sur un seul dispositif, les laboratoires sur puce sont au premier plan.⁷⁻⁹ Il s'agit de systèmes analytiques miniaturisés transportables qui sont constitués d'un ou de plusieurs réseaux de canaux de tailles micrométriques dans lesquels des fluides sont transportés d'un point vers un autre de manière contrôlée et qui comportent une ou plusieurs étapes d'analyse (Figure 1).¹⁰ Avec de tels systèmes, les temps d'analyse sont plus courts que les méthodes analytiques conventionnelles et ils limitent la consommation de solvants et d'échantillons dus à leur taille. De plus, ces systèmes permettent de réduire les étapes successives pour analyser un échantillon, ce qui permet d'éviter les erreurs de manipulation et de contamination du système ou de l'opérateur.¹⁰ Cependant, ces microsystèmes présentent des inconvénients comme un manque de reproductibilité d'un lot à l'autre surtout s'ils sont traités ou fonctionnalisés.

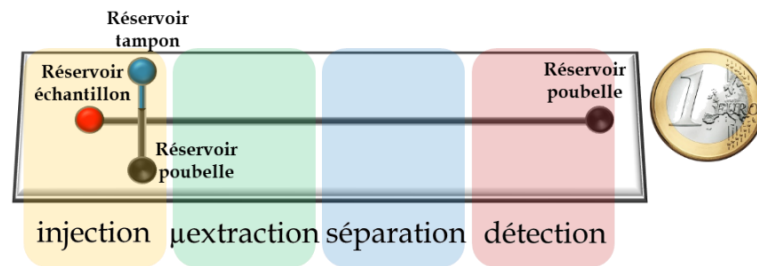


Figure 1 : Exemple de laboratoire sur puce.

1. État de l'art (Chapitre I)

Le résumé de l'état de l'art est constitué de trois sous-parties portant sur : (i) les matériaux des systèmes microfluidiques, (ii) les laboratoires sur puce et leurs méthodes de préconcentration intégrées et (iii) les aptamères comme agent sélectif dans des systèmes miniaturisés pour le diagnostic.

1.1. Les matériaux de systèmes microfluidiques

Le choix du matériau pour développer un laboratoire sur puce est primordial. Le matériau est généralement choisi en fonction de ses propriétés physico-chimiques (transparence, rigidité, groupements de surface...), de la méthode de microfabrication des micro-canaux, ou encore son coût. Les matériaux actuels utilisés en microfluidique sont le silicium¹⁰, le verre¹¹ ou encore des polymères¹²⁻¹⁴ (élastomères, thermo durcissants et thermoplastiques). Les méthodes de microfabrication des micro-canaux en silicium et en verre (gravure,...) sont complexes, onéreuses et nécessitent des salles blanches.^{10,11,13} Contrairement au silicium et au verre, les méthodes de microfabrication des micro-canaux en polymère (lithographie molle, emboutissage à chaud...) sont simples, moins chères, rapides et ne nécessitent pas de salle blanche.¹²⁻¹⁴ Le Tableau 1 résume les propriétés physico-chimiques des matériaux utilisés pour les systèmes microfluidiques.

1.2. Les laboratoires sur puce et les méthodes de préconcentration

Les laboratoires sur puce sont des systèmes miniaturisés comportant une à plusieurs étapes d'analyses. Dans de tels systèmes, le contrôle de fluides peut s'opérer sous champ électrique ou sous flux hydrodynamique. Un laboratoire sur puce peut comporter une ou plusieurs zones de préparation de l'échantillon, un canal de séparation électrocinétique ou

chromatographique et une ou plusieurs zones de détection (optique, électrochimique ou spectroscopique).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des matériaux de microsystèmes. Adapté de ¹³.

Propriétés	Matériaux			
	Silicium/verre	Élastomères	Thermo durcissants	Thermoplastiques
Résistance solvant organique et inorganique	Très bonne résistance	Faible résistance	Bonne résistance	De moyennement bonne à très bonne résistance
Surface inerte chimiquement	Non	Moyennement	De moyennement à pas inerte	Inerte
Hydrophile/hydrophobe	Hydrophile	Hydrophobe	Moyennement hydrophile	Moyennement hydrophobe
Transparence au rayonnement UV-visible	Pas du tout transparent/hautement transparent	Transparent	Transparent	Moyennement transparent à hautement transparent
Niveau de difficulté de microfabrication	Très dure	Simple	Moyennement simple	Simple
Coût final	Très cher	Peu cher	Moyennement cher	Peu cher

Les performances de séparation et de détection dépendent de l'étape de préparation de l'échantillon. La préparation d'un échantillon consiste généralement à extraire un ou plusieurs composés d'intérêt tout en les préconcentrant. Des méthodes de préconcentration basées sur des méthodes électrocinétiques et d'interactions chimiques ou de reconnaissance moléculaire utilisant des polymères à empreintes moléculaires¹⁵⁻¹⁷ ou encore des ligands¹⁸ peuvent être citées. Les méthodes d'extraction basées sur la reconnaissance moléculaire sont les plus spécifiques. Les inconvénients des polymères à empreintes moléculaires sont qu'ils ne sont pas reproductibles d'un lot à l'autre et qu'ils sont moins spécifiques que les phases extractantes à base de ligands.¹⁷ Les ligands les plus utilisés sont les anticorps (glycoprotéines), mais malgré leur forte affinité et spécificité pour les cibles d'intérêt, leur méthode de sélection utilise des animaux ou des cellules, ils ne sont pas stables sur une large gamme de température, leur régénération est compliquée et leur modification par des groupements chimiques réactifs ou des marqueurs (fluorescent, radioactif, ...) n'est pas « site dirigé ».¹⁹

Les ligands peuvent être immobilisés sur des surfaces planes, particulières ou dans des structures monolithiques par adsorption, formation de liaisons covalentes, bio affinité ou encore par encapsulation. L'immobilisation de ligands sur des surfaces est le premier choix à cause de leur simplicité de mise en œuvre.²⁰ Les billes (polystyrène, silice, agarose, ou ferromagnétique...) ont un rapport surface/volume plus important que les surfaces planes ce qui permet d'immobiliser un plus grand nombre de ligands.²⁰ Contrairement aux surfaces planes, les structures à trois dimensions offrent un plus grand nombre de sites d'immobilisation.²⁰ Par exemple, il a été estimé que des gels offrent 100 à 1000 fois plus de sites d'immobilisation que les surfaces.²¹ De plus, la distance de diffusion entre un ligand dans un monolithe et sa cible est réduite. Ainsi, de meilleures efficacités et sensibilités sont généralement obtenues avec des monolithes. Les stratégies d'immobilisation des ligands par adsorption, formations de liaisons covalentes et par bio affinité sont très souvent utilisées, mais bloquent le ligand dans une position pouvant ne pas favoriser les interactions avec sa cible. Il est de plus en plus fait appel à des systèmes où le ligand est encapsulé dans un monolithe, car cette stratégie lui évite d'être bloqué dans une orientation particulière qui limite ses interactions.²⁰

1.3. Les aptamères comme agent sélectif dans des systèmes miniaturisés pour le diagnostic

Les aptamères sont des oligonucléotides synthétiques (ADN, ARN). Ils sont généralement caractérisés par des affinités élevées pour leur cible et une spécificité remarquable. Ils miment la sélectivité et la spécificité des anticorps mais ils sont sélectionnés par une méthode *in vitro* évitant l'utilisation d'animaux ou de cellules.^{22,23} Cette méthode, nommée évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX), est un cycle de sélection qui se réitère.²⁴⁻²⁶ La première étape du procédé SELEX est l'incubation de plusieurs séquences d'ADN ou d'ARN avec une cible d'intérêt. La deuxième étape sépare les séquences qui ont une forte affinité avec la cible de ceux qui n'ont pas ou moins d'affinité. Les séquences ainsi obtenues sont amplifiées puis le cycle est réitéré entre 6 à 20 fois permettant ainsi un enrichissement progressif de la population en ADN ou en ARN ayant une interaction avec la cible.

Quelques exemples dans la littérature décrivent l'utilisation des aptamères comme phase extractante de biomarqueurs ou de polluants. Les aptamères sont soit immobilisés à la surface même de micro-canaux²⁷ ou sur des structures présentes à l'intérieur de micro-canaux

(type piliers ou billes)²⁸⁻³⁰ ou encapsulés dans des monolithes polymérisés directement dans le système microfluidique^{18,31}. Dans la plupart des cas, il a été montré que les efficacités d'extraction sont supérieures à 80%, mais ces systèmes n'ont pas toujours été testés avec des échantillons réels. De plus, les systèmes développés détectent généralement un à trois biomarqueurs de même nature (protéines ou cellules) en une seule analyse, ce qui n'est pas suffisant pour établir un diagnostic précoce sans faux positif ou négatif.³²

2. Objectifs du travail de thèse : stratégies de fonctionnalisation de matériaux de microsystèmes

Le but de cette thèse est de développer un laboratoire sur puce intégrant la totalité d'une chaîne analytique (préconcentration, séparation et détection) pour détecter de manière spécifique et sensible un ensemble de biomarqueurs. L'étape d'extraction et de préconcentration de biomarqueurs est une étape clé, car elle a une influence sur les performances des étapes de séparation et de détection qui vont lui succéder. L'immobilisation des aptamères en tant qu'agent sélectif dans un micro-canal doit être réalisée de manière localisée afin de pouvoir intégrer toutes les autres étapes de la chaîne analytique. Cette fonctionnalisation localisée doit être la plus simple possible pour ne pas complexifier et augmenter les coûts de microfabrication. Deux stratégies d'immobilisation originales d'aptamères ont été développées au cours de cette thèse en utilisant des matériaux microfluidiques émergents.

Une des stratégies dite « 2D » consiste à immobiliser les aptamères sur la surface de micro-canaux. Les aptamères ont été immobilisés dans des micro-canaux simples afin de créer plusieurs zones d'extraction. Ainsi chaque zone peut être dédiée à l'extraction d'un biomarqueur d'intérêt.

Pour cette stratégie, le matériau qui a été utilisé pour les micro-canaux est le polymère thiol-ène hors-stœchiométrie (OSTE). Ce thermo durcissant est de plus en plus utilisé dû à ses nombreux avantages : matériau transparent,^{33,34} simple à modeler,^{33,34} généralement insensible au dioxygène^{35,36}. L'OSTE est constitué de deux monomères : allyl (« ène ») et thiol (« thiol »), qui lui confère des propriétés de surfaces hydrophiles, réduisant ainsi l'adsorption non spécifique de molécules biologiques et favorisant la génération d'écoulements électroosmotiques permettant la mise en œuvre de séparations électrocinétiques contrôlées.³⁷ Les ratios massiques des monomères allyl et thiol ont été optimisés par Campos et al.³⁷ afin de

développer des microsystemes en OSTE robustes. De plus, la présence de groupements fonctionnels de surface ènes et thiols permet la modification de surface du polymère par des ligands *via* une réaction de chimie clic thiol-ene.³⁷⁻⁴⁰ Le principal avantage de ce polymère est la possibilité de modifier à façon les quantités de monomères thiol et allyl selon les besoins. Les polymères thiol-ènes sont synthétisés par réaction de chimie clic initiée par irradiation UV.³⁷⁻⁴⁰

Une autre voie explorée est une stratégie d'encapsulation des aptamères dans un monolithe polymérisé (sol-gel) dans un micro-canal. Cette stratégie dite « 3D » a été initiée au cours d'une précédente thèse au sein de notre laboratoire dans un micro-canal en polydiméthylsiloxane (PDMS).¹⁸ Afin de pallier les inconvénients de l'utilisation du PDMS (propriété thermique qui se dégrade au cours du temps, perméable à la vapeur d'eau et sensible à de nombreux produits chimiques...)⁴¹, un autre matériau a été choisi : le copolymère cyclique d'oléfine (COC). Ce thermoplastique résiste à la plupart des solvants organiques et inorganiques. Ses méthodes de microfabrication sont simples.⁴² De plus, le COC vendu sous forme de plaque est moins cher et plus facilement manipulable que le PDMS vendu sous forme liquide. Lors de la précédente étude, la fonctionnalisation des micro-canaux en PDMS par les aptamères encapsulés dans le sol-gel polymérisé dans un micro-canal n'a pas été réalisée de manière localisée.^{18,31} Grâce à une géométrie de micro-canal en croix et à un contrôle du sol-gel visqueux sous flux hydrodynamique, nous avons montré la possibilité de fonctionnaliser une seule partie du micro-canal en COC.

3. Choix de l'aptamère : preuve de concept (Chapitre II)

Pour développer des nouvelles stratégies de fonctionnalisation localisée de micro-canaux par des aptamères, un oligonucléotide synthétique (anti-sulforhodamine B) a été utilisé comme preuve de concept. Cet aptamère est dirigé contre un fluorophore la sulforhodamine B. L'aptamère possède une séquence de 29 bases qui est la suivante : 5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'. La constante de dissociation de ce couple vaut 660 ± 60 nM.⁴⁵ Par des analyses de dispersion de Taylor, il a été montré que le rayon hydrodynamique de l'aptamère augmente avec la force ionique (FI) du tampon. Le rayon hydrodynamique de l'aptamère varie de 1,9 à 4,4 nm pour des valeurs de FI allant de 0 (eau ultra-pure) à > 300 mM (tampon phosphate de sodium contenant 5 mM de MgCl₂) signalant un changement de conformation de l'oligonucléotide.^{43,44}

L'aptamère a été modifié par des groupements chimiques pour permettre son immobilisation sur des surfaces et/ou par un fluorophore (AlexaFluor® 532) pour caractériser son immobilisation par microscopie à fluorescence. Le Tableau 2 résume les modifications de la séquence de l'aptamère et de leur utilité.

Tableau 2 : Résumé des modifications de l'aptamère et de leur utilité.

Modifications	Séquence	Chapitre de thèse	Utilité des modifications
C3-SH et Alexa Fluor® 532	<p>AlexaFluor® 532-5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'-C3-SH</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'-C3-SH</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p>	Chapitre III	AlexaFluor® 532 sert à caractériser par microscopie à fluorescence l'aptamère immobilisé. La modification thiol (SH) permet d'immobiliser l'aptamère sur des groupements allyl ou sur des nanoparticules d'or.
AlexaFluor® 532	<p>AlexaFluor® 532-5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p>	Chapitre IV	AlexaFluor® 532 sert à caractériser par microscopie à fluorescence l'aptamère encapsulé dans le sol-gel.

4. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux en polymère OSTe (Chapitre III)

Les micro-canaux en polymère thiol-ène sont réalisés par lithographie molle grâce à la réticulation du polymère par réaction de chimie clic initiée par irradiation UV.^{33,37-39,46} Le chemin réactionnel est présenté en Figure 2, dont la première étape est la formation d'un radical suite à une exposition UV d'un photoinitiateur (noté I). Ce radical va par la suite réagir avec le proton du groupement thiol, formant ainsi un radical thiyl, qui va à son tour se

propager par réaction de chimie clic avec les monomères allyl. Cette propagation va continuer jusqu'à la consommation complète d'un des deux groupements.³³

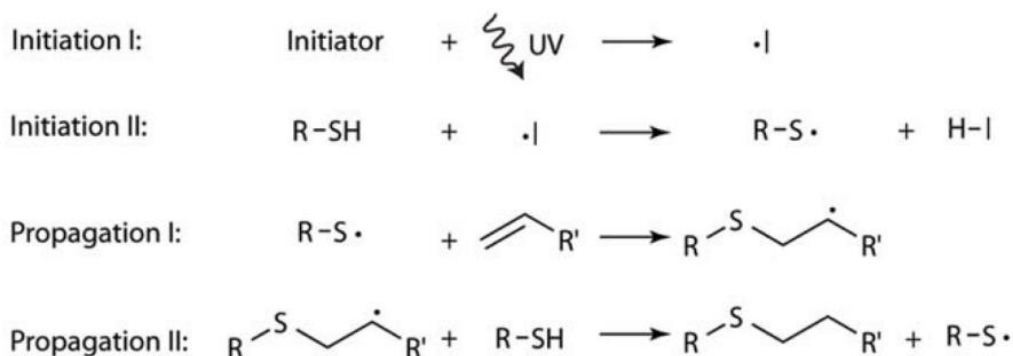


Figure 2 : Mécanisme réactionnel de la réticulation des polymères thiol-ènes par réaction de chimie clic entre un monomère thiol et allyl en présence d'un photoinitiateur.³³

Pour la première fois, les écoulements électroosmotiques de micro-canaux en polymère OSTÉ photopolymérisés en présence d'un photoinitiateur ont été caractérisés sur une large gamme de pH (3 à 12). De plus, la stabilité de cet écoulement au cours du temps (2 semaines) a été caractérisée (tampon phosphate de sodium, pH 7, FI = 20/18 mM). Les résultats obtenus, permettent d'envisager la possibilité d'opérer des séparations électrocinétiques dans des micro-canaux en polymère OSTÉ photopolymérisés en présence d'un photoinitiateur. En effet, l'écoulement électroosmotique est élevé sur la large gamme de pH étudiée et est stable au cours du temps.

Suite à cette étude, deux stratégies d'immobilisation des aptamères modifiés en 3' par un C3-SH, sur des plaques en polymère OSTÉ ont été envisagées : (i) immobilisation directe à la surface du substrat par réaction de chimie clic et (ii) immobilisation à la surface du substrat préalablement recouverte de nanoparticules d'or (Figure 3). Les résultats montrent que la présence de nanoparticules d'or à la surface du polymère permet d'immobiliser de manière spécifique l'aptamère en position 3' due à sa modification par un groupement thiol. Cette stratégie de fonctionnalisation a alors été transposée en micro-canal. Il a été montré la possibilité de fonctionnaliser de manière localisée un micro-canal ouvert par simple dépôt de goutte des aptamères et des nanoparticules d'or.

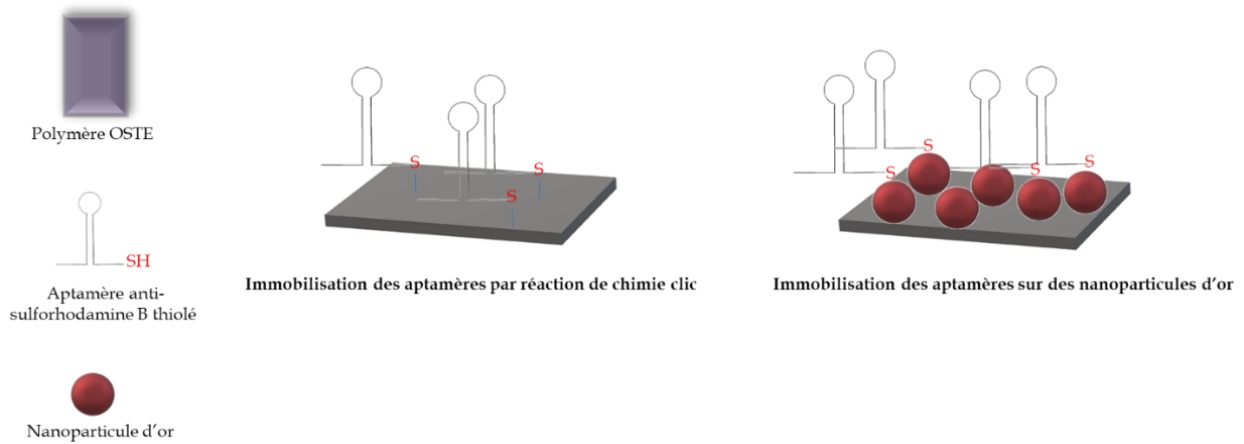


Figure 3 : Stratégies de fonctionnalisation du polymère OSTE par des aptamères thiolés.

4.1. Écoulement électroosmotique

Deux compositions de matériaux OSTE de micro-canaux ont été étudiés : 1 thiol : 1,3 allyl (w/w) (nommé 1,3 allyl) et 2,5 thiol : 1 allyl (w/w) (nommé 2,5 thiol). Les mobilités électroosmotiques (μ_{eo}) ont été déterminées dans les micro-canaux simples scellés ($100 \mu\text{m} * 30 \mu\text{m} * 6 \text{cm}$). Deux méthodes de détermination de μ_{eo} ont été mises en œuvre sous champ électrique : la mesure du courant de pH 3 à 4 et la mesure de la mobilité électrophorétique d'un marqueur neutre fluorescent (rhodamine B, $pK_A = 3,1^{47}$) de pH 5 à 12. La tension appliquée est de 800 V. La mobilité électroosmotique en fonction du pH est présentée en Figure 4.

Dans la gamme de pH étudiée, les mobilités électroosmotiques sont similaires pour les deux configurations de micro-canaux étudiées, ce qui montre une densité de charge négative en surface quasi identique pour les deux systèmes. La mobilité électroosmotique est suffisamment élevée montrant la possibilité d'opérer des séparations électrocinétiques contrôlées dans ces micro-canaux. La densité de charge négative à la surface des parois des micro-canaux en OSTE augmente de pH 3 à 6 (augmentation de μ_{eo}) et se stabilise entre pH 7 et 12 (stabilisation de la μ_{eo}) (Figure 4). Les études de détermination de la mobilité électroosmotique de micro-canaux en OSTE photopolymérisés sans photoinitiateur présentent des résultats similaires.^{46,48} De plus, il a été montré que cette mobilité à pH 7 (FI=20/18 mM) est stable pendant 2 semaines pour les deux configurations de micro-canaux étudiées lorsqu'ils sont conservés à température ambiante et à l'air. L'avantage d'utiliser un photoinitiateur pour polymériser des polymères OSTE est la diminution du temps de polymérisation du matériau et donc la diminution du temps de microfabrication.

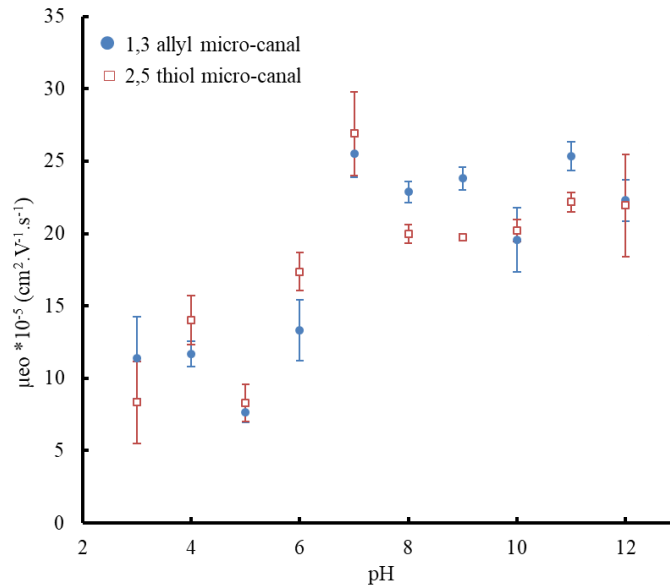


Figure 4 : Évolution de la mobilité électroosmotique (μ_{eo}) en fonction du pH dans des micro-canaux 1,3 allyl et 2,5 thiol ($100 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 6 \text{cm}$). Les mobilités ont été déterminées par la méthode de mesure de courant pour les pH 3 et 4 et par la méthode de mesure de la mobilité électrophorétique d'un marqueur neutre (rhodamine B) de pH 5 à 12, sous champ électrique. Les barres d'erreur sont les écarts-types pour 6 répétitions.

4.2. Stratégie d'immobilisation de l'aptamère sur plaques en OSTE

Deux stratégies d'immobilisation des aptamères anti-sulforhodamine B ont été étudiées : (i) immobilisation directe par réaction de chimie clic et (ii) immobilisation des aptamères sur des nanoparticules d'or préalablement immobilisées à la surface du substrat.

4.2.1. Immobilisation des aptamères par réaction de chimie clic

Pour cette étude, deux configurations de plaques en polymère OSTE ont été utilisées : 2,5 thiol : 1 allyl (w/w) (nommée 2,5 thiol) et 1 thiol : 1,3 allyl (w/w) (nommée 1,3 allyl). $100 \mu\text{M}$ d'aptamères marqués par un fluorophore (AlexaFluor® 532) en position terminale 5' et thiolés en position terminale 3', préparés dans un tampon de phosphate de sodium (pH 8, FI=300 mM) + 5 mM MgCl_2 ont été déposés sous forme de goutte ($10 \mu\text{L}$) à la surface des plaques puis ont été exposées aux UVs (40 min) pour induire une réaction de chimie clic entre les groupements thiol des aptamères et les groupements allyl du substrat. La même expérience a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales avec un aptamère fluorescent non thiolé. Un contrôle a été réalisé sans aptamère. Avant leur caractérisation, les plaques ont été lavées sous un flot continu d'eau ultra-pure pendant 3 min.

Les gains de fluorescence relatives sont présentées en Figure 5. Il est noté un gain de fluorescence de 160% (2,5 thiol) et de 70% (1,3 allyl) pour les plaques traitées avec les aptamères thiolés par rapport aux contrôles. Ceci signifie qu'il y a immobilisation des aptamères suite à l'irradiation UV. Cependant, les gains de fluorescence sont similaires entre les plaques traitées avec les aptamères thiolés et les aptamères non thiolés. Par conséquent, l'immobilisation des aptamères est principalement due à des interactions de type van der Waals, $\pi-\pi$...⁴⁹ avec la surface du polymère et non par formation de liaisons aptamère-S-CH₂-CH₂-substrat. Ainsi, pour mieux contrôler les interactions entre les aptamères et la surface du polymère, celui-ci a été recouvert par des nanoparticules d'or.

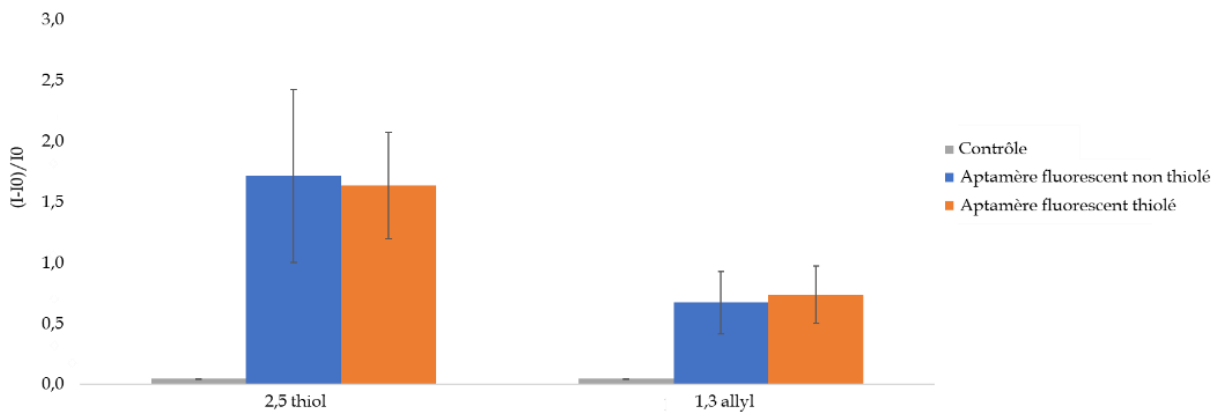


Figure 5 : Intensités de fluorescence relatives de plaques en OSTE (2,5 thiol et 1,3 allyl) fonctionnalisées par des aptamères fluorescents thiolés et non thiolés par un traitement UV. L'expérience de contrôle a été réalisée sans présence d'aptamère. Les résultats sont présentés après lavage des plaques. I représente l'intensité de fluorescence des plaques fonctionnalisées par les aptamères et après lavage. I₀ est l'intensité de fluorescence des plaques traitées par les nanoparticules d'or. Les barres d'erreur représentent les écarts-types pour 3 répétitions de l'expérience.

4.2.2. Immobilisation des aptamères sur une surface nanoparticulaire

Immobilisation des nanoparticules d'or

Bou et Ellis⁴⁰ ont montré la possibilité d'immobiliser des nanoparticules d'or à la surface du polymère OSTE possédant un excès de groupements thiol par simple incubation du substrat dans la solution colloïdale, grâce à la formation de liaisons covalentes Au-S. Nous avons donc repris ce traitement (incubation pendant 24 h) et nous avons aussi testé pour la

première fois l'immobilisation de nanoparticules d'or (28 nm de diamètre, $1,4 \cdot 10^{-10}$ mol/L) à la surface de plaques en OSTE par irradiation UV (40 min). Des caractérisations par MEB (microscopie électronique à balayage), EDS (analyse dispersive en énergie) et XPS (spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X) ont confirmé la présence de nanoparticules d'or uniquement sur les plaques traitées par irradiation UV. De plus, les caractérisations MEB ont permis de montrer une répartition de nanoparticules d'or plus homogène sur les plaques possédant un excès de groupements thiol que sur les plaques possédant un excès de groupements allyl suite à un traitement par irradiation UV (Figure 6).

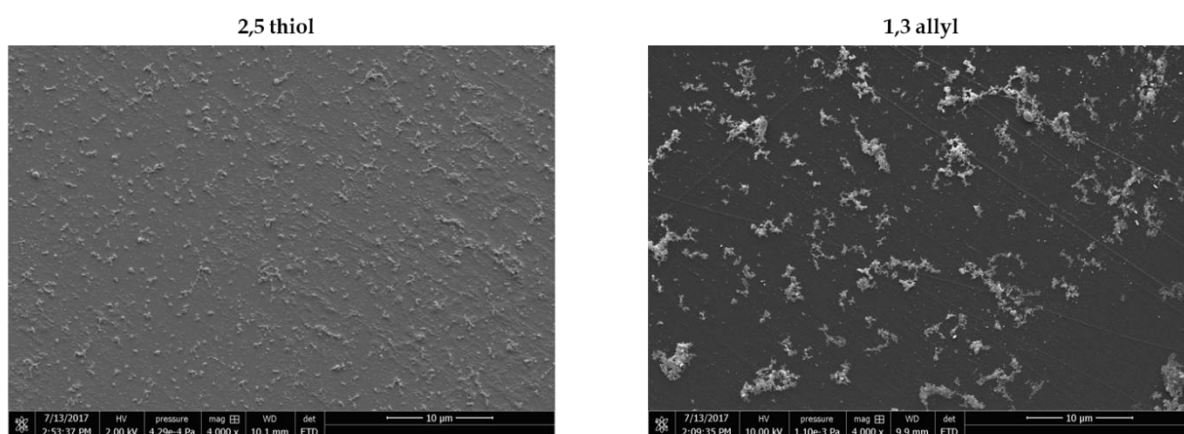


Figure 6 : Micrographies de plaques en OSTE traitées par des nanoparticules d'or suite à une irradiation UV. Les proportions des monomères thiol et allyl utilisées sont 2,5 thiol : 1 allyl (w/w) (2,5 thiol) et 1 thiol : 1,3 allyl (w/w) (1,3 allyl). Avant caractérisations par MEB, les plaques ont été lavées dans de l'eau ultra-pure dans un bain à ultrasons.

Immobilisation des aptamères

L'immobilisation de $100 \mu\text{M}$ d'aptamères fluorescents thiolés préparés dans un tampon de phosphate de sodium (pH 8, FI=300 mM) + 5 mM MgCl_2 , à la surface des plaques 2,5 thiol recouvertes de nanoparticules d'or a été réalisée soit par un traitement par incubation dans le noir pendant 24 h (traitement par incubation) ou par un traitement par irradiation UV pendant 40 min (traitement par irradiation UV). Les mêmes expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions avec un aptamère fluorescent non thiolé. Les expériences de contrôle ont été réalisées sans aptamère. Les intensités de fluorescence relatives après lavage des plaques sont présentées en Figure 7. Les gains de fluorescence relatives pour les expériences de contrôle et les expériences avec les aptamères fluorescents non thiolés sont similaires (~ 0). Des gains de fluorescence de 150% (traitement par incubation) et de 230% (traitement par

irradiation UV) pour les expériences réalisées avec les aptamères fluorescents thiolés prouvent que les aptamères sont immobilisés à la surface des nanoparticules d'or elles-mêmes immobilisées à la surface du polymère. Les gains d'intensités de fluorescence relatives sont plus élevés dans le cas où les aptamères ont été immobilisés par irradiation UV, ce qui montre potentiellement une plus grande quantité d'aptamères immobilisés *via* ce traitement. De plus, le traitement par irradiation UV est plus rapide que le traitement par incubation. C'est pour ces deux raisons que le traitement par irradiation UV a été sélectionné pour la suite.

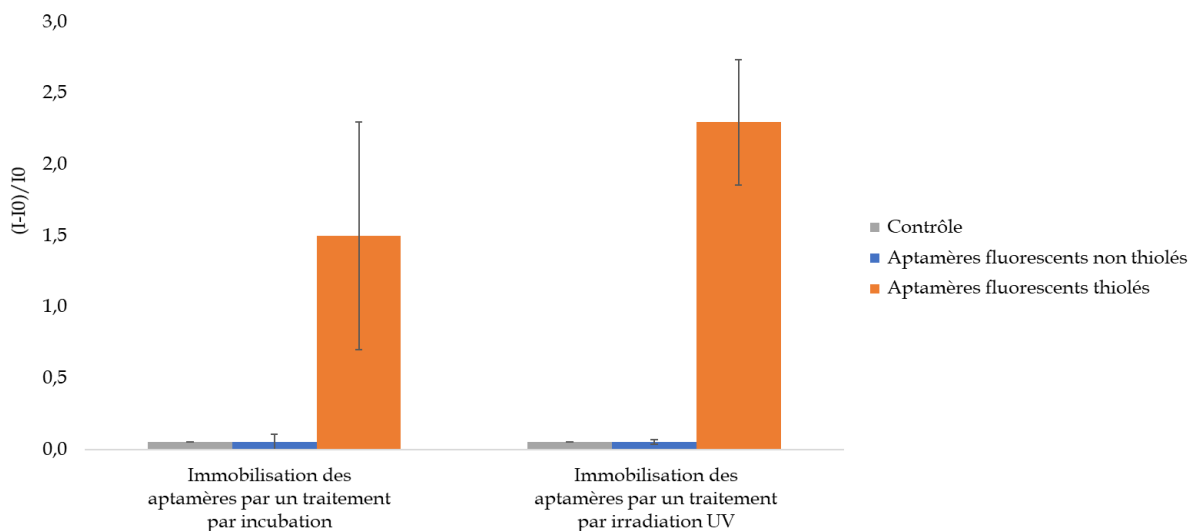


Figure 7 : Intensités de fluorescence relatives de plaques en OSTE (2,5 thiol : 1 allyl (w/w)) recouvertes de nanoparticules d'or et fonctionnalisées par des aptamères par un traitement par incubation ou par irradiation UV. Les résultats sont présentés après lavage des plaques. I représente l'intensité de fluorescence des plaques fonctionnalisées par les aptamères et après lavage. I_0 est l'intensité de fluorescence des plaques traitées par les nanoparticules d'or. Les barres d'erreur représentent les écarts-types pour 3 répétitions de l'expérience.

4.3. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux

Dans un micro-canal 2,5 thiol simple ouvert (2 mm * 40 μ m * 3,5 cm), 7 gouttes (3 μ L) d'une solution de nanoparticules d'or (18 nm de diamètre ; $1,3 \cdot 10^{-9}$ mol/L) ont été déposées puis exposées aux UVs (15 min). L'excédent de nanoparticules non immobilisées à la surface a été retiré par un lavage avec de l'eau ultra-pure dans un bain à ultrasons (1 min). Par la suite, 7 gouttes (3 μ L) de 14,5 μ M d'aptamères thiolés fluorescents ont été déposées sur les nanoparticules et le système a été encore une fois exposé aux UVs (15 min). L'excédent d'aptamères non immobilisés a été retiré par un autre lavage sous un flot continu d'eau ultra-pure (3 min). Une photographie fluorescente du système a été enregistrée, où il est clairement

identifié les zones fluorescentes correspondant aux zones traitées par les nanoparticules d'or et fonctionnalisées par les aptamères (Figure 8). Ces zones de 2 mm de diamètre chacune, sont séparées d'une distance de 3 mm, ce qui prouve que par simple dépôt de goutte, qu'il est possible de fonctionnaliser de manière localisée des micro-canaux en polymère OSTE. Grâce à des mesures d'intensité de fluorescence, il a été montré que la fonctionnalisation est reproductible et stable durant deux semaines pour des systèmes conservés dans le noir à température ambiante et à l'air. Ce procédé pourra être facilement automatisable grâce aux dépôts de gouttes avec un bras automatisable se déplaçant en x, y et z.

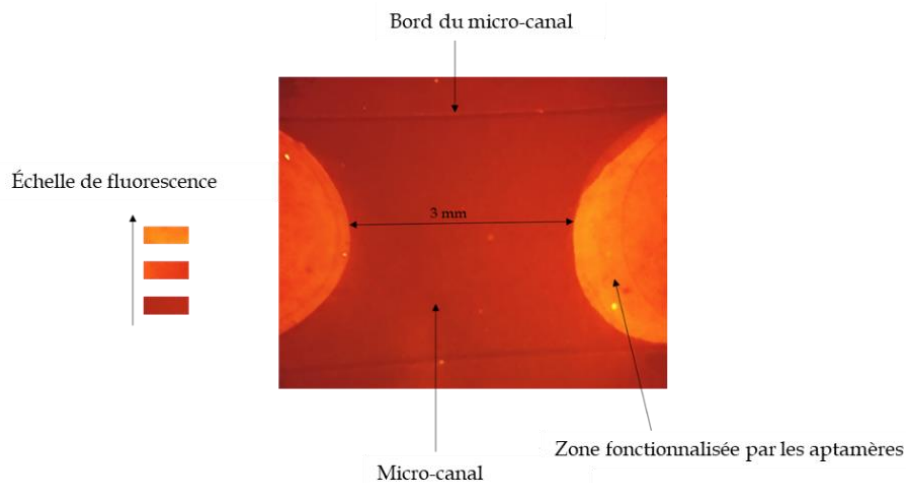


Figure 8 : Photographie fluorescente du micro-canal 2,5 thiol simple ouvert (2 mm * 40 μ m * 3,5 cm) fonctionnalisé de manière localisée par des aptamères fluorescents thiolés immobilisés sur des nanoparticules d'or. Chaque zone fonctionnalisée a un diamètre d'environ 2 mm et est séparée l'une de l'autre par une distance de 3 mm. La photographie a été enregistrée après lavage du micro-canal.

Avec ce système, l'affinité entre l'aptamère thiolé non-fluorescent et sa cible fluorescente a été montrée par des caractérisations de microscopie à fluorescence suite à une incubation (une nuit) et à un lavage par immersion d'un canal ouvert dans une solution contenant 14,5 μ M de sulforhodamine B préparée dans un tampon phosphate de sodium (pH 8, FI = 50 mM) + 5 mM $MgCl_2$.

5. Procédé sol-gel pour la fonctionnalisation localisée de micro-canaux en COC (Chapitre IV)

Dans cette étude, nous avons montré la possibilité d'encapsuler un aptamère dans un sol-gel polymérisé dans un micro-canal en COC traité par un dépôt chimique en phase vapeur

assistée par plasma à pression atmosphérique (APPECVD). Le schéma du système est présenté en Figure 9.

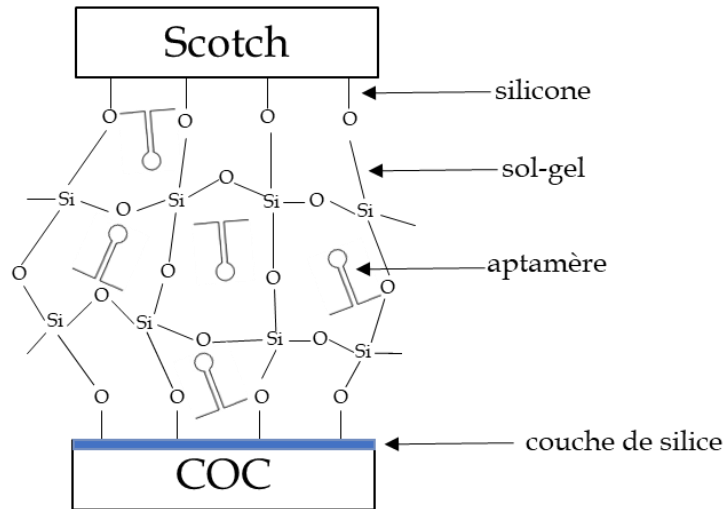


Figure 9 : Présentation de la stratégie d'encapsulation des aptamères dans un sol-gel polymérisé dans un micro-canal en COC traité par APPECVD.

Le COC est un matériau inerte chimiquement. Pour envisager sa fonctionnalisation localisée, nous avons conçu une stratégie de modification en deux étapes. La première étape consiste en un traitement de la surface du micro-canal sur toute sa longueur par APPECVD. L'objectif est de déposer une couche mince de silice à l'aide de la fragmentation d'un précurseur (TEOS, orthosilicate de tétraéthyle) dans un jet de plasma d'air dirigé perpendiculairement vers la surface vierge en COC. Cette couche de silice a deux fonctions : (i) elle confère des propriétés hydrophiles à la surface en COC hydrophobe afin de pouvoir opérer des séparations électrocinétiques et (ii) elle insère des groupements silanol (SiOH) qui sont les fonctions d'encrage du sol-gel par formation de liaisons Si-O-Si pendant sa polymérisation dans le micro-canal. La deuxième étape est la polymérisation d'un monolithe dans une partie du micro-canal par le procédé sol-gel. Le procédé sol-gel, explicité en Figure 10, est constitué de trois étapes : (i) hydrolyse du TEOS, (ii) condensation (iii) et polymérisation. L'hydrolyse et la réaction de condensation forment la solution de sol qui est par la suite mélangée avec la solution d'aptamères avant d'être injectée dans le micro-canal qui est séché afin que la réaction de polycondensation puisse se produire.

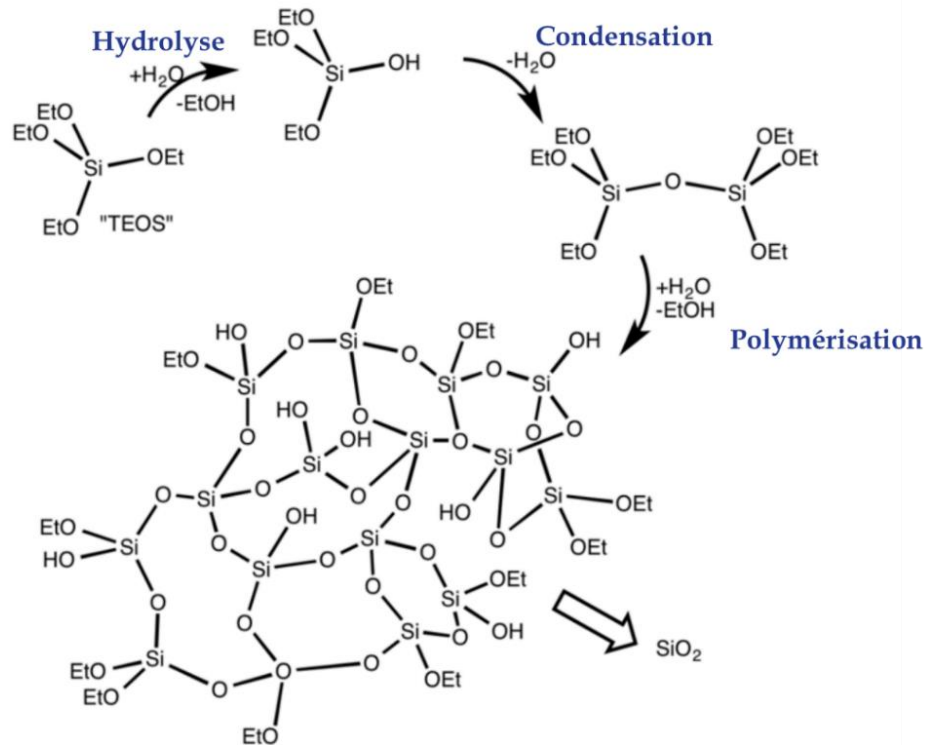


Figure 10 : Procédé sol-gel. Adaptée de ¹⁸.

5.1. Optimisation du dépôt de la couche de silice

Le dépôt de la couche mince de silice a été réalisé avec un jet de plasma air dont l'appareillage est présenté en Figure 11.

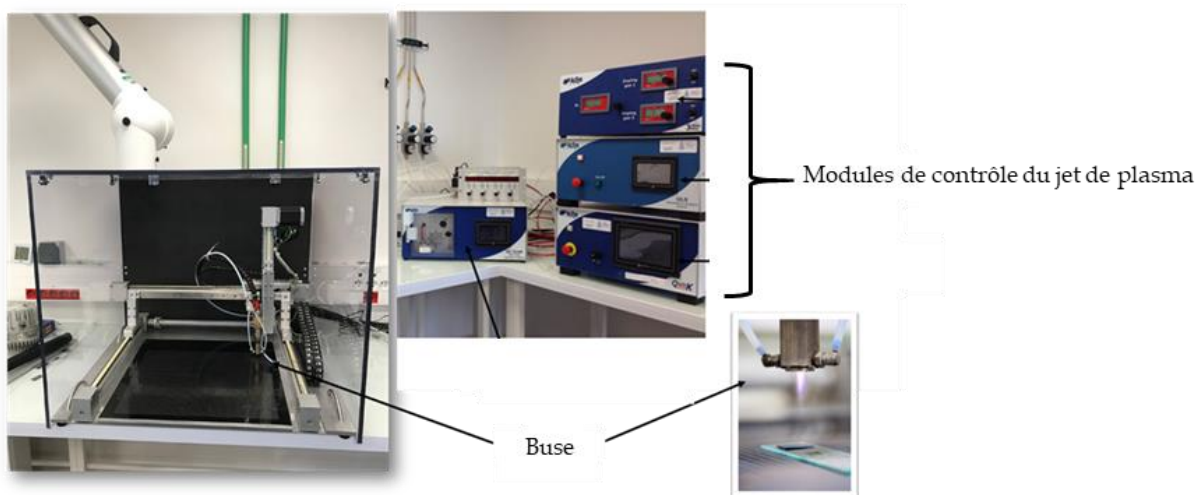


Figure 11 : Montage expérimental du jet plasma utilisé pour déposer une couche mince de silice dans des micro-canaux en COC. La buse est la partie qui se déplace en x, y et z et qui traite par plasma des surfaces. Adaptée de ⁵⁰.

Les conditions expérimentales ont été optimisées pour avoir un dépôt de silice homogène, une quantité suffisante de groupements silanol afin d'obtenir le meilleur encre possible du sol-gel aux parois du micro-canal et un écoulement électroosmotique important, stable et reproductible. Les conditions expérimentales qui ont été optimisées sont la distance entre la buse et le substrat (31,5 mm, pour l'homogénéité du dépôt), le débit d'air porteur du précurseur (20 L/min, pour la densité de silanol), le débit de TEOS (200 µL/min, pour la densité de silanol) et le nombre de passages de la buse sur une même surface (5, pour la densité de silanol). Afin de s'assurer de la présence du dépôt de silice à la surface du COC, des caractérisations par FTIR-ATR, microscopie optique, mesure d'angles de contact et par ellipsométrie avant et après optimisations ont été utilisées et sont présentées en Figure 12. Les bandes caractéristiques du dépôt de silice (3342, 1225 et 1078 cm⁻¹)⁵¹ sont présentes sur les spectres FTIR-ATR et sont plus intenses après optimisation, indiquant des densités de silice (1225 et 1078 cm⁻¹) et de silanol (3342 cm⁻¹) déposées en surface plus importantes qu'avant optimisation (Figure 12.A). Ces résultats sont confirmés par les mesures d'angle de contact et les caractérisations d'ellipsométrie, car la surface est plus hydrophile et le dépôt est plus épais après les optimisations des conditions expérimentales (Figure 12.C). Sur les images des surfaces traitées obtenues par microscopie optique, l'augmentation de la distance entre la buse et le substrat permet d'obtenir des dépôts homogènes (Figure 12.B).

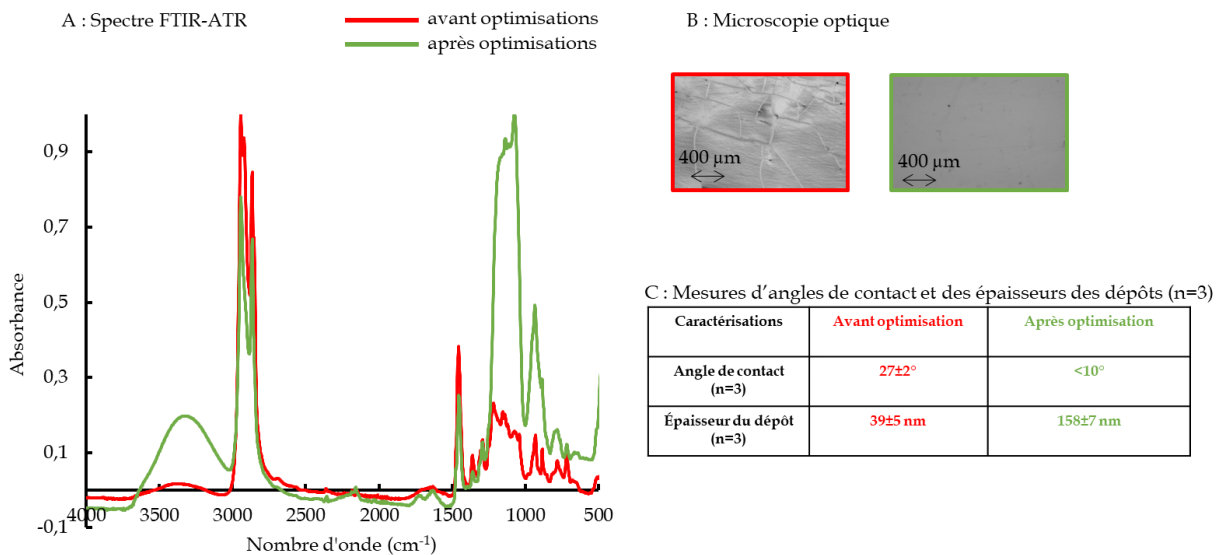


Figure 12 : Caractérisations par (A) FTIR-ATR, (B) microscopie optique, (C) mesures d'angle de contact et ellipsométrie de la couche mince de silice déposée à la surface du COC par APPECVD avant et après optimisation des conditions expérimentales du procédé plasma.

Après traitement, la surface hydrophobe du COC ($95 \pm 1^\circ$) devient hydrophile ($<10^\circ$) (Figure 12.C) rendant alors possible une séparation électrocinétique rapide et contrôlée dans un tel matériau. Pour s'assurer de cette hypothèse, l'écoulement électroosmotique de micro-canaux en COC traités par APPECVD a été caractérisé (tampon de phosphate de sodium, pH 7, FI=20/18 mM, 800V) à l'aide de la méthode du suivi de courant. Cette caractérisation a été effectuée sur une période de deux semaines pour évaluer la stabilité de l'écoulement. L'écoulement électroosmotique est de $28,3 \pm 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ juste après traitement, ce qui montre la possibilité d'effectuer des séparations électrocinétiques contrôlées dans des micro-canaux en COC traités par APPECVD. Cette mobilité diminue de 10% après sept jours et de 22% après quatorze jours de conservation à température ambiante et à l'air, montrant que ces microsystèmes peuvent être conservés une semaine.

5.2. Intégration du sol-gel dans des micro-canaux en COC : caractérisations et optimisations

Dans l'optique d'une mise en œuvre d'une étape d'extraction par un sol-gel, celui-ci doit présenter une taille de pores suffisamment grande pour pouvoir laisser circuler des fluides, mais pas trop pour pouvoir retenir les aptamères dans leur structure lors des analyses d'échantillons. Une première optimisation a été opérée afin d'obtenir un sol-gel permettant la circulation des fluides à travers ses pores lorsque celui-ci est polymérisé dans toute la longueur d'un micro-canal ($100 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m} \times 6 \text{cm}$) traité par APPECVD. Dans des conditions où l'agitation magnétique de la solution de sol dure 4 h (réaction d'hydrolyse et de condensation) et le temps de séchage du sol-gel (réaction de polycondensation) dans le micro-canal est de 2 h, il a été montré que la structure du monolithe obtenu ne permet pas le passage des fluides. Le sol-gel a été caractérisé par une isotherme d'adsorption et de désorption (Figure 13.A). Ces caractérisations montrent que le sol-gel est mésoporeux avec une distribution de pores allant de 26 à 66 Å avec un maximum à 31 Å (Figure 13.A et B). Le temps d'agitation de la solution de sol a été alors augmenté jusqu'à 8 h. Avec l'augmentation du temps d'agitation de la solution de sol, il est alors possible de faire circuler des fluides à travers le monolithe polymérisé *in situ*, indiquant ainsi une taille de pores plus grande. Pour vérifier cette hypothèse, ce sol-gel a été caractérisé par une isotherme d'adsorption et de désorption (Figure 13.C). Cette caractérisation confirme que la distribution de la taille des pores du sol-gel tend vers des mésopores un peu plus grands (de 25 à 55 Å avec un maximum à 50 Å) que ceux obtenus avec une solution de sol hydrolysée pendant 4 h (de 26 à 66 Å avec un maximum à 31 Å) (Figure 13.D).

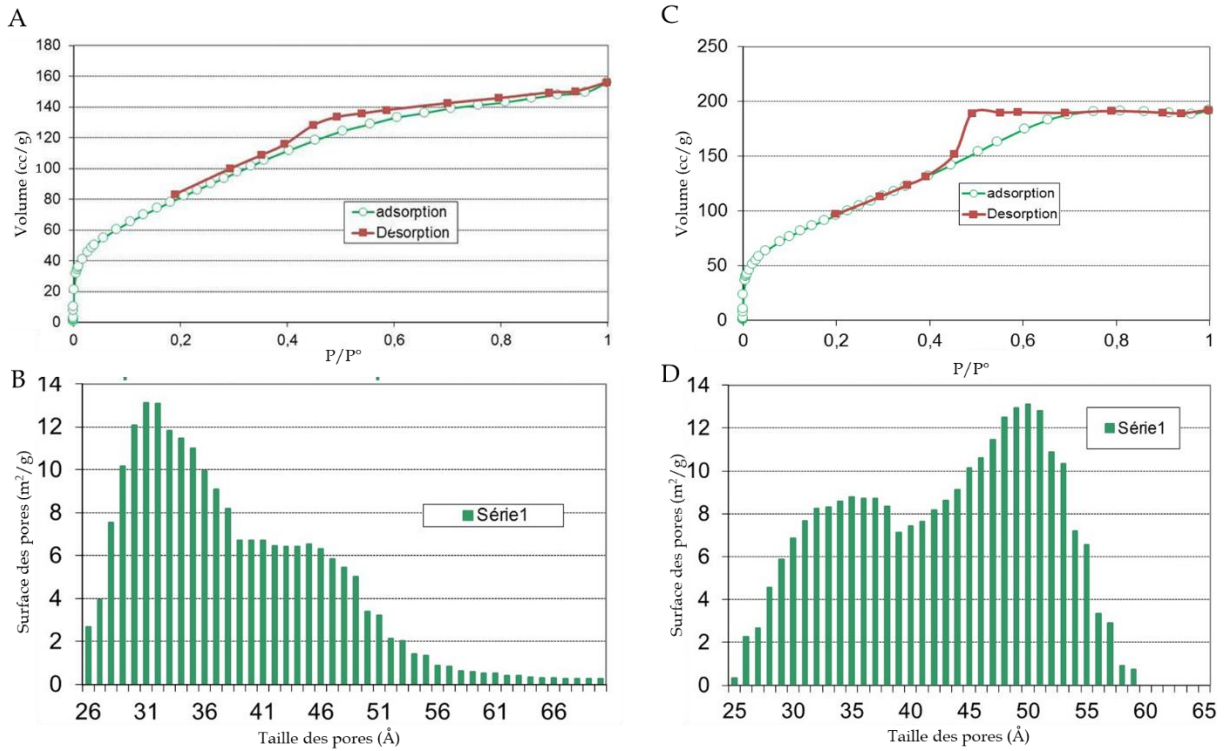


Figure 13 : (A) et (C) isothermes d’adsorption et de désorption d’un sol-gel. (B) et (D) distribution de la taille des pores. (A) et (B) résultats obtenus pour un sol-gel hydrolysé pendant 4 h et (C) et (D) hydrolysé pendant 8 h.

5.3. Encapsulation des aptamères dans le sol-gel

Des micro-canaux en COC traités par APPECVD ont été fonctionnalisés par 50 μM d’aptamères fluorescents encapsulés dans le sol-gel hydrolysé pendant 8 h (ratio volumique solutions aptamère : sol ; 1v/1v). Pour prouver l’encapsulation des aptamères dans les pores du sol-gel, des lavages par dépression du micro-canal simple totalement fonctionnalisé ont été effectués avec un tampon de phosphate de sodium (pH 8, FI=300 mM) + 5 mM MgCl_2 avec un volume total représentant 30 fois le volume total du micro-canal. L’expérience de contrôle a été réalisée sans présence d’aptamères. Les valeurs d’intensités de fluorescence sont présentées en Figure 14.

Un gain de fluorescence de 88% est noté pour les micro-canaux 1,2 et 3 par rapport aux micro-canaux contrôles 1’, 2’ et 3’. L’aptamère est donc encapsulé dans la structure du monolithe. Une isotherme d’adsorption et de désorption a permis de montrer que la taille des pores du sol-gel varie de 21 à 116 Å lorsqu’il est préparé en présence d’aptamères. Cela signifie que le sol-gel se construit autour de l’aptamère (diamètre hydrodynamique $\sim 87\text{Å}$) au cours de sa polymérisation. Des mesures de fluorescence ont montré que les micro-canaux ainsi traités

sont stables pendant une semaine lorsqu'ils sont conservés à 4°C dans des conditions humides. Comme le procédé sol-gel a été effectué dans un environnement où la température et l'humidité n'étaient pas contrôlées, il est possible que l'encapsulation des aptamères dans le monolithe ne soit pas reproductibles d'un lot à l'autre car les intensités de fluorescence des micro-puces 1, 2 et 3 ne sont pas similaires après le lavage (Figure 14).⁵²

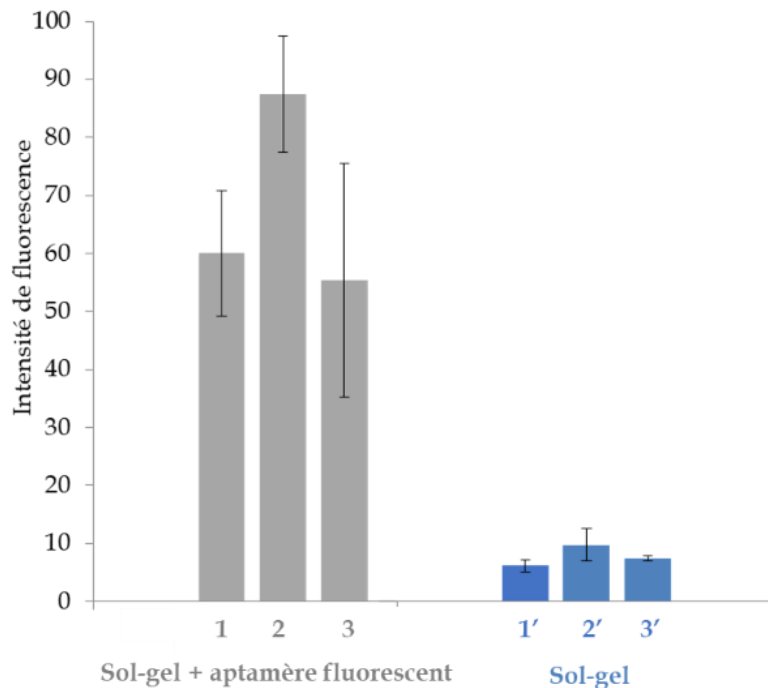


Figure 14 : Intensités de fluorescence de micro-canaux fonctionnalisés par un sol-gel encapsulant des aptamères fluorescents (sol-gel + aptamère fluorescent, canaux 1, 2 et 3) et fonctionnalisés par uniquement le sol-gel (sol-gel, canaux 1', 2' et 3'). Les résultats sont présentés après lavage des micro-canaux. Les barres d'erreurs sont les écarts-types pour 6 mesures enregistrées à un cm d'intervalle dans un micro-canal simple totalement rempli de sol-gel (100 μm * 30 μm * 6 cm).

5.4. Fonctionnalisation localisée de micro-canaux par le procédé sol-gel

Par un jeu de contrôle de la solution de sol à l'intérieur de micro-canaux en croix (50 μm * 50 μm * 4 cm) il a été montré la possibilité de fonctionnaliser de manière localisée un micro-canal par le procédé sol-gel (Figure 15). Le contrôle des fluides a été effectué sous flux hydrodynamique à l'aide d'une pompe. Pour cela, le microsysteme en croix est tout d'abord entièrement rempli de tampon puis est aspiré depuis un réservoir opposé la solution de sol mélangé à une solution tampon. Le pH élevé du tampon permet d'augmenter considérablement la cinétique de la réaction de polycondensation du sol-gel permettant ainsi

la formation du monolithe à l'intérieur du micro-canal. Comme la réaction de gélification est extrêmement rapide (< 5 min), il est alors possible de remplir uniquement un des bras du micro-canal en croix ayant pour dimension 1 cm de long, 50 μm de large et de haut. Sur la Figure 15 est présentée une image enregistrée par microscopie optique de la croix présentant la partie contenant le sol-gel de celles ne contenant pas le monolithe.

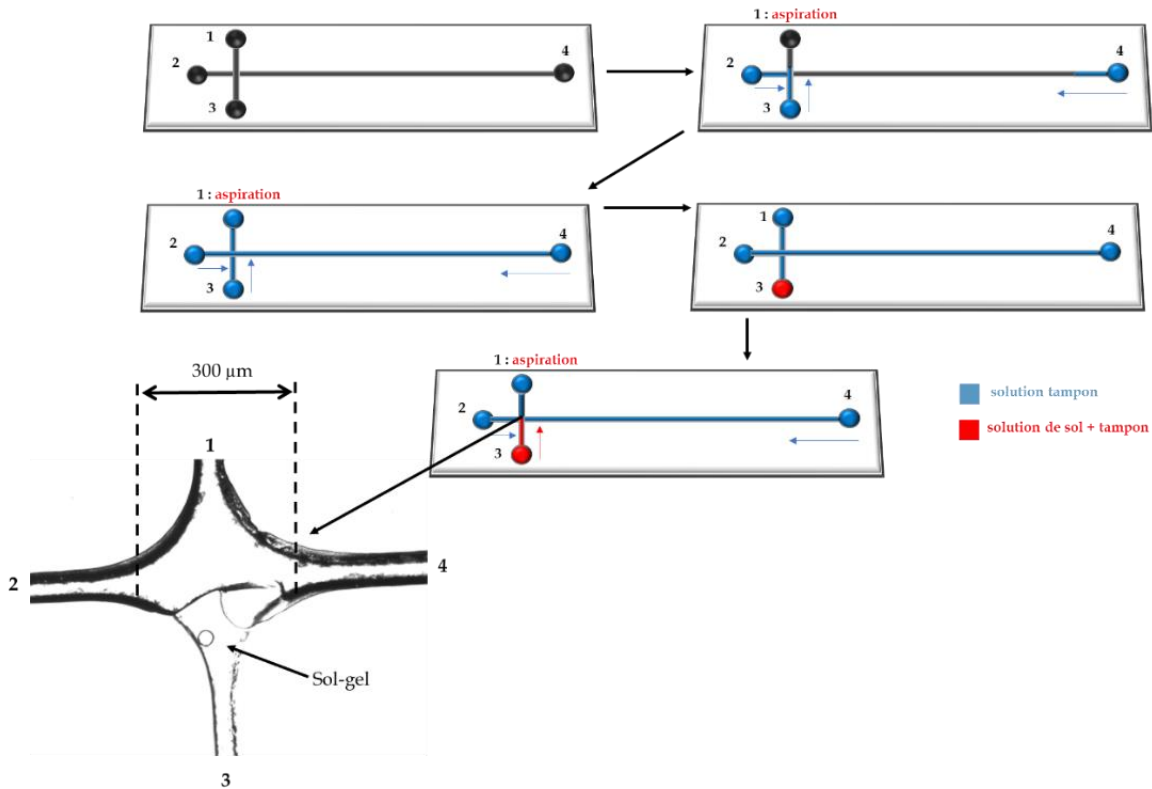


Figure 15 : Procédure de fonctionnalisation localisée par le procédé sol-gel d'un micro-canal en croix (50 μm * 50 μm * 4 cm) en COC traité par APPECVD par un jeu de contrôle de fluide sous flux hydrodynamique.

6. Conclusions

Afin de développer un LOAC sélectif et sensible pour des tests de diagnostic précoce de cancer, il est nécessaire d'intégrer toutes les étapes d'une chaîne analytique, de la préparation de l'échantillon à la détection. L'étape de préparation de l'échantillon est une étape clé, car elle a une influence sur les performances des étapes de séparation et de détection qui vont lui succéder. Pour extraire et préconcentrer de manière très sélective les biomarqueurs de cancer, nous avons décidé d'utiliser comme outil extractant les aptamères. L'enjeu de cette thèse était de développer des stratégies innovantes d'immobilisation d'aptamères dans un endroit précis de micro-canaux en polymère.

Deux stratégies d'immobilisation localisées d'aptamères dans des micro-canaux fabriqués avec des matériaux innovants ont été développées. La stratégie 2D utilisant un prétraitement par des nanoparticules de la surface thiolée du polymère OSTe par irradiation UV a permis d'immobiliser de manière spécifique les aptamères *via* leur modification par des groupements thiol en 3'. Par simple dépôt de gouttes plusieurs zones d'extraction ont été créées dans un micro-canal. Ainsi une zone peut être dédiée à l'extraction et à la préconcentration d'un biomarqueur à la fois. Cette stratégie d'immobilisation est stable à température ambiante et à l'air sur une période de deux semaines. De plus, les lots de micro-canaux ainsi traités sont reproductibles. La stratégie 3D consiste à encapsuler des aptamères dans un sol-gel polymérisé dans un micro-canal en COC préalablement recouvert par une fine couche de silice par un traitement plasma. La stratégie de fonctionnalisation localisée mettant en œuvre un traitement plasma par voie sèche est un peu plus complexe à mettre en œuvre. Comme le procédé sol-gel a été effectué dans un environnement où la température et l'humidité n'était pas contrôlées, l'encapsulation des aptamères dans le monolithe n'est pas reproductible d'un lot à l'autre. Ainsi pour améliorer la reproductibilité entre lots, il est nécessaire de travailler dans un environnement contrôlé. Les systèmes fonctionnalisés sont stables pendant une semaine dans des conditions humides à 4°C.

La première stratégie de fonctionnalisation est donc à l'heure actuelle la plus adaptée en termes de stabilité, de reproductibilité, de simplicité de fonctionnalisation et de conditions de stockage pour développer un laboratoire sur puce pour la détection d'un ensemble de biomarqueurs de cancer.

Les travaux de thèse ont été effectués en collaboration avec l'Université de Campinas (Brésil) au sein du laboratoire d'Alberto Fracassi Da Silva où j'ai effectué une partie de ma thèse (5 mois) grâce aux financements CAPES-COFECUB et au labex Michem.

7. Références bibliographiques

1. OMS | Cancer. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>. (Accessed: 6th August 2017).
2. About the SEER Program. SEER Available at: <https://seer.cancer.gov/about/>. (Accessed: 8th September 2018).
3. Tothill, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **20**, 55 (2009).
4. Füzéry, A. K., Levin, J., Chan, M. M. & Chan, D. W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clinical Proteomics* **10**, 13 (2013).

5. Mordente, A., Meucci, E., Martorana, G. E. & Silvestrini, A. *Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives*. in *Advances in Cancer Biomarkers* (ed. Scatena, R.) (Springer Netherlands, 2015).
6. Das, P., Sedighi, A. & Krull, U. J. Cancer biomarker determination by resonance energy transfer using functional fluorescent nanoprobe. *Analytica Chimica Acta* (2018). doi:10.1016/j.aca.2018.07.060.
7. Didar, T. F. & Tabrizian, M. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab. Chip* **10**, 3043 (2010).
8. Chen, J., Li, J. & Sun, Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab. Chip* **12**, 1753 (2012).
9. Pappas, D. Microfluidics and cancer analysis: cell separation, cell/tissue culture, cell mechanics, and integrated analysis systems. *The Analyst* **141**, 525 (2016).
10. Mark, D., Haerberle, S., Roth, G., von Stetten, F. & Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews* **39**, 1153 (2010).
11. Manz, A. et al. Micromachining of monocrystalline silicon and glass for chemical analysis systems. A look into next century's technology or just a fashionable craze? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **10**, 144 (1991).
12. Christensen, A. M., Chang-Yen, D. A. & Gale, B. K. Characterization of interconnects used in PDMS microfluidic systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **15**, 928 (2005).
13. Ren, K., Zhou, J. & Wu, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Accounts of Chemical Research* **46**, 2396 (2013).
14. Tsao, C.-W. & DeVoe, D. L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 1 (2009).
15. Lordel, S. Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain. (Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2011).
16. Haupt, K. Although MIPs are stable, easy to prepare, and inexpensive, there are still challenges to overcome in their fabrication and use. *Analytical Chem. A*, 377 (2003).
17. Uzun, L. & Turner, A. P. F. Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential. *Biosensors and Bioelectronics* **76**, 131 (2016).
18. Perreard, C. 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. (Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2015).
19. Crivianu-Gaita, V. & Thompson, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics* **85**, 32 (2016).
20. Kim, D. & Herr, A. E. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics* **7**, 041501 (2013).
21. Hughes, A. J., Lin, R. K. C., Peehl, D. M. & Herr, A. E. Microfluidic integration for automated targeted proteomic assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 5972 (2012).
22. Tombelli, S., Minunni, M. & Mascini, M. Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* **20**, 2424 (2005).
23. Sharma, T. K., Bruno, J. G. & Dhiman, A. ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnology Advances* **35**, 275 (2017).
24. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467 (1990).
25. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850 (1992).

26. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505 (1990).
27. Phillips, J. A., Xu, Y., Xia, Z., Fan, Z. H. & Tan, W. Enrichment of Cancer Cells Using Aptamers Immobilized on a Microfluidic Channel. *Analytical Chemistry* **81**, 1033 (2009).
28. Sheng, W. et al. Aptamer-Enabled Efficient Isolation of Cancer Cells from Whole Blood Using a Microfluidic Device. *Analytical Chemistry* **84**, 4199 (2012).
29. Nguyen, T., Pei, R., Stojanovic, M. & Lin, Q. An aptamer-based microfluidic device for thermally controlled affinity extraction. *Microfluidics and Nanofluidics* **6**, 479 (2009).
30. Koh, Y. et al. Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 2267 (2012).
31. Perréard, C. et al. Aptamer entrapment in microfluidic channel using one-step sol-gel process, in view of the integration of a new selective extraction phase for lab-on-a-chip: CE and CEC. *Electrophoresis* (2017). doi:10.1002/elps.201600575.
32. Kazarian, A. et al. Testing breast cancer serum biomarker for early detection and prognosis in pre-diagnosis samples. *Br. J. Cancer* **116**, 501 (2017).
33. Carlborg, C. F., Haraldsson, T., Öberg, K., Malkoch, M. & van der Wijngaart, W. Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab. Chip* **11**, 3136 (2011).
34. Bartolo, D., Degré, G., Nghe, P. & Studer, V. Microfluidic stickers. *Lab on a Chip* **8**, 274 (2008).
35. Cramer, N. B., Reddy, S. K., Cole, M., Hoyle, C. & Bowman, C. N. Initiation and kinetics of thiol-ene photopolymerizations without photoinitiators. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **42**, 5817 (2004).
36. Cramer, N. B., Scott, J. P. & Bowman, C. N. Photopolymerizations of Thiol-Ene Polymers without Photoinitiators. *Macromolecules* **35**, 5361 (2002).
37. de Campos, R. P. S., Campos, C. D. M., Almeida, G. B. & da Silva, J. A. F. Characterization of Off-Stoichiometry Microfluidic Devices for Bioanalytical Applications. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems* (2017). doi:10.1109/TBCAS.2017.2759510.
38. Lafleur, J. P. et al. Rapid and simple preparation of thiol-ene emulsion-templated monoliths and their application as enzymatic microreactors. *Lab. Chip* **15**, 2162 (2015).
39. Çakmakçi, E., Yuce-Dursun, B. & Demir, S. Maleic anhydride functionalization of OSTE based coatings via thiol-ene “Click” reaction for the covalent immobilization of xylanase. *Reactive and Functional Polymers* **111**, 38 (2017).
40. Bou, S. J. M. C. & Ellis, A. V. Microfluidic devices using thiol-ene polymers. in (eds. Friend, J. & Tan, H. H.) *Lab. Chip* (2013). doi:10.1117/12.2032608.
41. McDonald, J. C. & Whitesides, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Accounts of Chemical Research* **35**, 491 (2002).
42. Nunes, P. S., Ohlsson, P. D., Ordeig, O. & Kutter, J. P. Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications. *Microfluidics and Nanofluidics* **9**, 145 (2010).
43. Huang, C.-C., Cao, Z., Chang, H.-T. & Tan, W. Protein-Protein Interaction Studies Based on Molecular Aptamers by Affinity Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 6973 (2004).
44. Girardot, M., Gareil, P. & Varenne, A. Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE. *Electrophoresis* **31**, 546 (2010).
45. Wilson, C. & Szostak, J. W. Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. *Chemistry & biology* **5**, 609 (1998).
46. Tähkä, S. M. et al. Thiol-ene microfluidic devices for microchip electrophoresis: Effects of curing conditions and monomer composition on surface properties. *Journal of Chromatography A* **1426**, 233 (2015).

47. Lopez Arbeloa, F., Lopez Arbeloa, T., Tapia Estevez, M. J. & Lopez Arbeloa, I. Photophysics of rhodamines: molecular structure and solvent effects. *J. Phys. Chem.* **95**, 2203 (1991).
48. Mesbah, K. et al. A neutral polyacrylate copolymer coating for surface modification of thiol-ene microchannels for improved performance of protein separation by microchip electrophoresis. *Microchimica Acta* **183**, 2111 (2016).
49. Tang, L., Wang, Y., Liu, Y. & Li, J. DNA-Directed Self-Assembly of Graphene Oxide with Applications to Ultrasensitive Oligonucleotide Assay. *ACS Nano* **5**, 3817 (2011).
50. Bourg, S. et al. Surface functionalization of cyclic olefin copolymer by plasma-enhanced chemical vapor deposition using atmospheric pressure plasma jet for microfluidic applications. *Plasma Processes and Polymers* (2019). doi: 10.1002/ppap.201800195.
51. Da Silva, B. et al. Study of the Stability and Hydrophilicity of Plasma-Modified Microfluidic Materials. *Plasma Processes and Polymers* **14**, 1600034 (2017).
52. Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S. & Zink, J. I. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Analytical Chemistry* **66**, 1120A (1994).

General Introduction

Cancer is the first cause of death in the World according to the World Health Organization.¹ Studies have shown that a late diagnosis of patient with a cancer, reduce their survival chance.² In recent years, it has been proven the importance of the analysis of biomarkers (prostate specific antigen, human epidermal growth factor receptor 2...) for early diagnosis, because they are present before the onset of symptoms of this disease.³⁻⁶ However, biomarkers of cancer are still not widely used because of their low concentration in sample of healthy patients and also their lack of specificity taken alone.³ It is therefore necessary to use analytical method able to detect a set of biomarkers with a good sensitivity and detection limit.³ Nowadays, clinical analysis for diagnosis or therapeutic monitoring (immunohistochemistry and immunoassay) are carried out by dividing samples and measuring separately the concentration of the various relevant biomarkers. In addition, according to the methods, they can be invasive, can lead to tumor metastasis due to tissue sampling, the analytical stuff cannot always be reused, and the analysis preparations are long and complex. To overcome these drawbacks, Lab-On-A-Chips (LOACs) are forefront for the analysis of a set of relevant biomarkers.³ LOACs are transportable devices composed of a network of microchannels that should possess all analytical steps from the sample preparation to the detection system with good limit of detection and specificities. The main challenge of a LOAC is to detect and quantify small amounts of different types of analytes (DNA, cells, proteins...) in biological fluids in a single analysis, avoiding matrix effects.⁷ Nowadays, miniaturized systems are not enough robust and sensitive. To improve the analytical performances of microfluidic systems, one or several areas can be integrated to extract and preconcentrate relevant biomarkers.⁷ Different preconcentration strategies exist: the electrokinetic preconcentration methods and strategies based on chemical non covalent interactions with a stationary phase or based on molecular recognition. The latter strategy has the best specificities towards analytes of interest, particularly in the case of the use of synthesized oligonucleotide ligands (aptamers). The advantages of aptamers (DNA or RNA) as ligands for preconcentration of biomarkers are: (i) that their sequence can be easily modified by reactive chemical groups or fluorescent probes for example, which allows their immobilization on substrate surface or their detection by fluorescent microscopy respectively and (ii) their easy regeneration and high temporal stability which allows to have a reusable portable microfluidic systems.⁸⁻¹¹

The objective of the PhD work is to develop a sensitive and specific LOAC for the detection/quantification of a set of biomarkers composed of cells, proteins, DNA and RNA in order to achieve early cancer diagnosis. For this purpose, two innovative strategies for localized immobilization of aptamers inside a microchannel, which has interesting surface physico-chemical properties, were developed in order to produce an extraction phase with high specificity and extraction efficiency of different nature of biomarkers. The first strategy (2D strategy) consists in immobilizing aptamers modified by thiol groups on a polymeric surface partially covered with gold nanoparticles by simple droplet deposition and UV irradiation. The second strategy (3D strategy) is based on the encapsulation of aptamers in a polymerized sol-gel inside a thermoplastic microchannel under a controlled hydrodynamic flow. These extractions phased based on aptamers will permit to extract and preconcentrate in one step different biomarkers present in complex matrices at low concentration ($\mu\text{g/L}$ - mg/L) to allow their specific and sensitive detection.

This PhD consists of four chapters. The first chapter is a state of the art on the research topic, which is followed by the chemical reagents, aptamer and gold nanoparticles characterizations chapter and two result chapters each dedicated to one aptamers immobilization strategy.

Part of this PhD work was carried out in collaboration with the University of Campinas (Brazil) under the supervision of Alberto Fracassi Da Silva where I spent 5 months thanks to CAPES-COFECUB and the Michem labex fundings.

Chapitre I : État de l'art

Listes des abréviations

- A : adénine
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AFP : alpha-fétoprotéine
- ARN : acide ribonucléique
- APOA1 : alipoprotéine A1
- BMA : butyl méthacrylate
- C : cytosine
- CA 125 : antigène carbohydate 125
- CA 15.3 : antigène carbohydate 15.3
- CA 19.9 : antigène carbohydate 19.9
- CA 27.29 : antigène carbohydate 27.29
- CD117 : proto-oncogène c-Kit
- CEA : antigène carcino-embryonnaire
- CEM : cellules épithéliales mammaires
- COC : copolymère d'oléfine cyclique
- COMMOSS : structures de support monolithiques colocalisées (*collocated monolith support structures*)
- CTCs : cellules tumorales circulantes
- E : œstrogènes
- EDMA : éthylène diméthacrylate
- EGF : facteur de croissance épidermique
- EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique
- EOF : mobilité électroosmotique (*electroosmotic flow*)
- ER : récepteur des œstrogènes
- f-PSA : antigène prostatique spécifique libre
- FASI : préconcentration par amplification de champ électrique avec injection électrocinétique (*field-amplified sample injection in capillary electrophoresis*)
- FASS : préconcentration par amplification de champ électrique (*field-amplified sample stacking*)
- FDA : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (*Food and Drug Administration*)
- FDP : produits de dégradation de la fibrine
- G : guanine
- HE4 : protéine épidermique humaine 4
- HE2 : protéine épidermique humaine 2
- HER2 : récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains 2
- I : photoinitiateur
- iDEP : préconcentration par di électrophorèse
- IHC : immunohistochimie
- IL-6 : interleukine-6
- LLE : extraction liquide/liquide (*liquid/liquid extraction*)
- LOAC : laboratoire sur puce (*lab-on-a-chip*)
- LVSEP : préconcentration par amplification de champ électrique avec injection d'un très grand volume (*large volume stacking using the EOF pump*)
- μ LLE : micro-extraction liquide/liquide (*liquid/liquid μ extraction*)
- μ SPE : micro-extraction sur phase solide (*solid phase μ extraction*)
- MIP : polymères à empreinte moléculaire (*molecularly imprinted polymer*)
- NOA : colle photoréticulale (*norland optical adhesives*)

- OMS : organisation mondiale de la santé
- OSTE : polymère thiol-ène hors stœchiométrie (*off-stoichiometry thiol-ene polymer*)
- PC : polycarbonate
- PCR : réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
- PDMS : polydiméthylsiloxane
- PE : polyéthylène
- PEEK : polyétheréthercétone
- PET : polytéréphtalate d'éthylène
- PM : phase mobile
- PMMA : polyméthacrylate de méthyle
- PP : polypropylène
- P : progestérone
- PR : récepteur de la progestérone
- PS : phase stationnaire
- PS : polystyrène
- PSA : antigène du cancer de la prostate
- PSU : polysulfone
- PVC : polychlorure de vinyle
- PVDC : polychlorure de vinylidène
- PVDF : poly(fluorure de vinylidène)
- POEGMA : poly oligo(éthylène glycol) méthyl éther
- SELEX : évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)
- σ : conductivité
- SPE : extraction en phase solide (*solid phase extraction*)
- T : thymine
- TEOS : orthosilicate de tétraéthyle
- Tg : température de transition vitreuse
- Tg : thyroglobuline
- U : uracile
- UV : ultraviolet

I.1. Les méthodes de diagnostic des cancers

Le terme de « cancer » définit un groupe de pathologies, pouvant toucher différentes parties de l'organisme comme les poumons, le foie ou encore les seins par le développement de tumeurs malignes. Il est caractérisé par une prolifération rapide de cellules anormales qui peuvent former des métastases et envahir des parties adjacentes de l'organisme.^{12,13} D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le nombre de décès par cancer en 2018 représentait 9,6 millions de personnes et ce chiffre est en constante augmentation.¹⁴ Le nombre de décès par cancer devrait atteindre d'ici une dizaine d'années 13,1 millions de personnes par an dans le monde.¹ Cependant, des études ont montré que le taux de décès par cancer peut diminuer si la maladie est détectée à un stade précoce.²

À l'heure actuelle, les techniques de diagnostic de cancer reposent sur les changements morphologiques de tissus et de cellules, lesquels apparaissent à un stade avancé de cette maladie.¹⁵ Par exemple, la méthode de diagnostic par imagerie médicale est directement liée à la taille de la tumeur qui n'est généralement détectée que lorsque celle-ci atteint une masse critique d'environ un billion de cellules cancéreuses.¹⁶ Les examens anatomopathologiques ou les immunohistochimies (IHC) sont d'autres techniques de diagnostic de cancer qui consistent à analyser des coupes de tissus biologiques (biopsie). Dans le cas des examens anatomopathologiques, des anomalies macroscopiques ou microscopiques des tissus biologiques et des cellules pathologiques sont détectées.¹⁷ Dans le cas des IHC, le principe repose sur la localisation de protéines, biomarqueurs de cancer pertinents, au moyen d'anticorps présents dans les tissus prélevés. En plus d'être des méthodes de diagnostic invasives, les examens anatomopathologiques et les IHC peuvent conduire à la métastase des tumeurs lors du prélèvement de tissus. Pour éviter l'utilisation de techniques trop invasives et/ou qui ne permettent pas de fournir un diagnostic précoce de cancer, de plus en plus de méthodes s'appuient sur les résultats obtenus suite aux dosages de biomarqueurs présents dans des fluides biologiques tels que le sang, l'urine ou encore la salive.¹⁸

Une entité chimique ou biologique peut être qualifiée de biomarqueur uniquement si elle répond à la définition établie par le groupe de travail de l'Institut National de la Santé¹⁹ : « les biomarqueurs sont des entités chimiques ou biologiques qui sont généralement présentes dans des fluides biologiques et qui peuvent être utilisées comme des indicateurs en temps réel de maladies chez un patient ». Dans le cas particulier des cancers, un biomarqueur peut être défini comme toute entité biologique présente dans l'organisme, pouvant être dosée pour différencier un taux

normal d'un taux anormal de cette entité en réponse à un cancer.⁴ Les biomarqueurs de cancer peuvent être des ADN, des ARN, des protéines, des peptides, des hormones, des métabolites et même des processus biologiques comme l'apoptose (mort cellulaire programmée) ou l'angiogenèse (processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins) par exemple.⁵ L'Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux (FDA) a approuvé l'utilisation de molécules biologiques comme biomarqueurs de cancer dont la liste est donnée en Tableau 1. Les biomarqueurs de cancer sont classifiés en trois catégories : les biomarqueurs du diagnostic, du pronostic et de prédiction (Tableau 1).⁴⁻⁶ Les biomarqueurs du diagnostic permettent d'identifier si un patient est atteint de la maladie et de connaître son état d'avancement.⁴⁻⁶ Un exemple de biomarqueur du diagnostic est l'antigène du cancer de la prostate (PSA, biomarqueur du cancer de la prostate), lorsqu'il est surexprimé.⁴⁻⁶ Les biomarqueurs du pronostic permettent d'évaluer l'état global du patient et de prédire les risques de récurrence du cancer après un traitement initial.⁴⁻⁶ Un exemple de biomarqueur du pronostic est l'antigène carcino-embryonnaire (CEA, biomarqueur de plusieurs type de cancer).²⁰ Les biomarqueurs de prédiction, quant à eux, sont une aide pour les interventions thérapeutiques (réponse d'un patient à un traitement).²¹ Un des biomarqueurs de prédiction connus est le récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains 2 (HER2, biomarqueur du cancer du sein).²²

Tableau 1 : Liste non exhaustive de protéines, cellules et ADN approuvés par la FDA pour leur utilisation comme biomarqueurs de cancer.⁴⁻⁶

Biomarqueurs	Types	Échantillons	Utilités cliniques	Types de cancer	Méthodes d'analyse pour leur dosage
Alpha-fétoprotéine (AFP)	Protéine	Sérum	Pronostic	Testicules	Immuno-essais
Antigène carbohydre 125 (CA 125)	Protéine	Sérum	Diagnostic et pronostic	Ovaires	Immuno-essais
Antigène carbohydre 15.3 (CA 15.3)	Protéine	Sérum	Pronostic	Sein	Immuno-essais
Antigène carbohydre 19.9 (CA 19.9)	Protéine	Sérum	Pronostic	Pancréas	Immuno-essais

Antigène carbohydate 27.29 (CA 27.29)	Protéine	Sérum	Pronostic	Sein	Immuno-essais
Antigène carcino- embryonnaire (CEA)	Protéine	Sérum	Pronostic	Non spécifié	Immuno-essais
Antigène prostatique spécifique (PSA)	Protéine	Sérum	Diagnostic	Prostate	Immuno-essais
Cellules tumorales circulantes (CTCs)	Cellules	Sang	Pronostic	Sein	Immuno-essais
Libre PSA (f-PSA)	Protéine	Sérum	Diagnostic	Prostate	Immuno-essais
Produits de dégradation de la fibrine (FDP)	Protéine	Sérum	Pronostic	Vessie et colon	Immuno-essais
Protéine épidermique humaine 4 (HE4)	Protéine	Sérum	Diagnostic et pronostic	Ovaires	Immuno-essais
PSA total (PSA+f- PSA)	Protéines	Sérum	Diagnostic	Prostate	Immuno-essais
Thyroglobuline (Tg)	Protéine	Sérum	Pronostic	Thyroïde	Immuno-essais
Facteur de croissance épidermiques humains 2 (HER2)	Protéine	Tissu	Pronostic et prédiction	Sein	IHC
Proto-oncogène c- Kit (CD117)	Protéine	Tissu	Diagnostic et prédiction	Estomac et intestin	IHC
Récepteur de l'EGF (EGFR)	ADN	Tissu	Pronostic	Colon	IHC
Récepteur de la progestérone (PR)	Protéine	Tissu	Pronostic et prédiction	Sein	IHC
Récepteur des œstrogènes (ER)	Protéine	Tissu	Pronostic et prédiction	Sein	IHC

D'après le Tableau 1, les IHC et les immuno-essais permettent de doser des biomarqueurs de cancer. Les immuno-essais sont des méthodes de dosage au moyen d'anticorps de protéines dans des échantillons de sérum ou de sang par exemple. Un large choix de méthodes de détection qui peuvent être utilisées (optiques, électrochimiques ou encore spectroscopiques) pour les immuno-essais est disponible.^{3,22} Les immuno-essais

présentent certains avantages par rapport aux autres méthodes de diagnostic de cancers : diagnostic précoce possible, spécifiques, sensibles et moins invasifs que les méthodes nécessitant une biopsie. Cependant, ils ne sont pas toujours réutilisables, nécessitent des préparations avant analyse longues et complexes comme le marquage des anticorps avec des sondes fluorescentes ou chimiluminescentes pour la détection et ne permettent généralement pas de détecter plusieurs biomarqueurs en une seule analyse.³

L'utilisation des biomarqueurs reste un enjeu majeur pour le diagnostic précoce de cancer. En effet, un seul biomarqueur n'est pas spécifique d'un type de cancer.³ Il peut être spécifique de plusieurs types de cancer et/ou d'autres maladies. Par exemple, une surexpression du PSA (biomarqueur du cancer de la prostate approuvé par la FDA) peut survenir dans d'autres cas que le cancer de la prostate, comme une infection, une hypertrophie bénigne de la prostate ou encore après éjaculation. Il a été montré que seulement 30% des patients avec de hauts niveaux de PSA sont atteints du cancer de la prostate.²³ Il faut donc doser un ensemble de biomarqueurs comme signature protéique/immunologique d'un type de cancer pour fournir des diagnostics non erronés. De plus, comme les entités servant de biomarqueurs sont présentes en très faibles concentrations (du $\mu\text{g/L}$ aux mg/L) même lors de leur surexpression en réponse à un ou des cancers,³ les systèmes analytiques doivent posséder de très bonnes limites de quantification.

Parmi les méthodes analytiques développées ces dernières années, les systèmes microfluidiques sont au premier plan pour la détection de biomarqueurs de cancer.²⁴⁻²⁶ Depuis 2004, le nombre d'articles publiés avec les mots clés « *cancer biomarker* » et « *microfluidic* » est en constante augmentation (Figure 1).

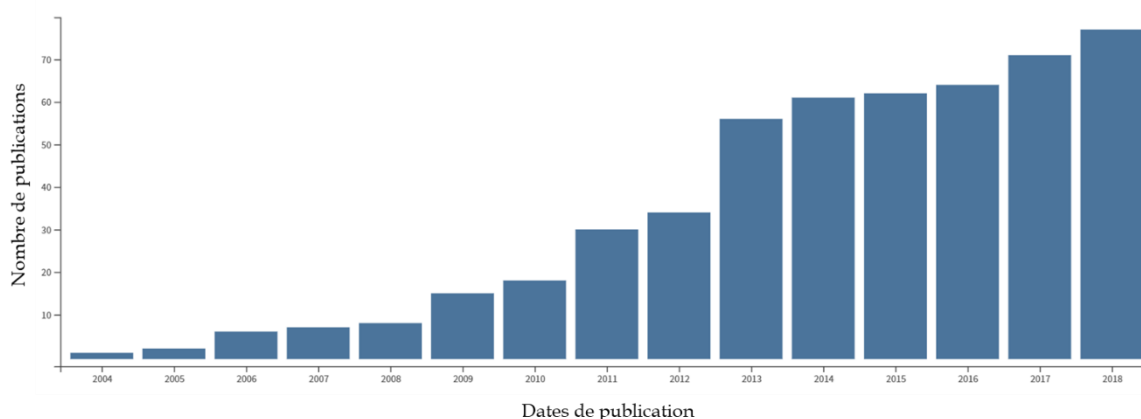


Figure 1 : Nombre de publications sur l'analyse de biomarqueurs de cancer en systèmes miniaturisés. Image tirée de Web of Science (Décembre 2018).

Ces dispositifs miniaturisés permettent d'intégrer les différentes étapes de l'analyse (de la préparation de l'échantillon, à la séparation des cibles et leur détection). Ces systèmes sont connus sous le nom de laboratoires sur puce (LOAC). Il s'agit de systèmes d'une dizaine de cm² comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont généralement de l'ordre de quelques dizaines de micromètres à centaines de micromètres. Les LOAC présentent un intérêt certain pour le diagnostic précoce de cancer, car :²⁷

- la miniaturisation des méthodes analytiques peut améliorer les performances d'analyses (limite de quantification et sensibilité)
- la consommation d'échantillon et de solvants est faible (de l'ordre de la dizaine de microlitres)
- l'intégration de toutes les étapes de l'analyse sur un seul système permet à la fois de réduire le risque de contamination du système ou de l'opérateur et le temps et les coûts d'analyse comparé aux méthodes conventionnelles
- leur portabilité permet de réaliser des diagnostics au chevet des patients ou de les commercialiser au grand public (ex : tests de grossesse, de glycémie...)
- ils peuvent être automatisables et la parallélisation possible des systèmes peut permettre ainsi un haut débit d'analyse

Le Tableau 2 présente des systèmes microfluidiques qui ont été développés pour la détection de biomarqueurs de cancer. À l'heure actuelle aucun système microfluidique a été commercialisé pour le diagnostic précoce de cancer.

Les micro-puces présentées dans le Tableau 2 permettent de détecter un à trois biomarqueur(s) maximum(s) en une seule analyse. Ces systèmes permettent de détecter très rapidement de très faibles concentrations de biomarqueurs de cancer tout en limitant la consommation d'échantillons et de solvants. Les méthodes électrochimiques et de fluorescence sont les méthodes qui permettent de détecter plusieurs biomarqueurs en une seule analyse (Tableau 2). Les systèmes présentés dans le Tableau 2 ne sont généralement pas automatisés et pour la plupart, les étapes de préparation des échantillons biologiques sont effectuées à l'extérieur des micro-canaux. Le principal enjeu est de détecter et de quantifier de faibles quantités de biomarqueurs de nature différente (ADN, cellules, protéines...) dans des échantillons biologiques en une seule analyse tout en évitant les effets de matrice.⁷

Tableau 2 : Liste non exhaustive de systèmes microfluidiques pour la détection et/ou la quantification de biomarqueurs de cancer (multi-détection = détection de plusieurs biomarqueurs en une seule analyse).

Plateformes microfluidiques	Biomarqueurs	Types de cancer	Préparation de l'échantillon en puce ou en hors puce	Multi-détection/type de détection	Limites de détection	Tests sur échantillons réels	Réf
PMMA-PMMA (polyméthacrylate de méthyle) immuno-essai	AFP (alpha-fétoprotéine)	Colon	-	Non/ électrochimiluminescence	1 pg/mL	Sérum humain	28
PDMS-PDMS (polydiméthylsiloxane) immuno-essai à base de billes en polystyrène	AFP	Colon	-	Non/ fluorescence	0,2 pg/mL	Sérum humain	29
PDMS-PDMS mélangeur de bulles intégré et immuno-essai	APOA1 (apolipoprotéine A1)	Vessie	-	Non/ fluorescence	9,16 ng/mL	Urine	30

Plateformes microfluidiques	Biomarqueurs	Types de cancer	Préparation de l'échantillon en puce ou en hors puce	Multi-détection/type de détection	Limites de détection	Tests sur échantillons réels	Réf
PDMS-verre immuno-essai à base de billes magnétiques	CEA (antigène carcinoembryon-naire) et AFP	Colon	-	Oui/ fluorescence	3,5 ng/mL (CEA) 3,9 ng/mL (AFP)	Non	31
PDMS-PDMS immuno-essai	CEA et AFP	Colon	-	Oui/ fluorescence	250 fM (CEA et AFP)	Sérum	32
PDMS-verre test à base d'aptamères	Cellule Ramos	Leucémie	Hors puce	Non/ chimilumines- -cence	30 cellules/ 3 µL	Sang	33
PMMA-PMMA immuno-essai couplé à un système de filtre	Cellules J82	Vessie	-	Non/ colorimétrie	10 cellules/min	Urine	34

Plateformes microfluidiques	Biomarqueurs	Types de cancer	Préparation de l'échantillon en puce ou en hors puce	Multi-détection/type de détection	Limites de détection	Tests sur échantillons réels	Réf
PDMS-verre extraction spécifique des cibles par des aptamères	Cellules TD05, Ramos et Toledo	Plusieurs cancers	Hors puce pour la culture cellulaire et en puce pour l'extraction et la préconcentration	Oui/ fluorescence	-	Non	35
PDMS-verre extraction spécifique des cibles par des aptamères	Cellules TD05, Ramos et Toledo	Plusieurs cancers	Hors puce pour la culture cellulaire et en puce pour l'extraction et la préconcentration	Oui/ fluorescence	-	Non	35
PDMS-verre extraction spécifique des cibles par des aptamères	CEM (cellules épithéliales mammaires)	Plusieurs cancers	Hors puce pour la culture cellulaire et en puce pour l'extraction et la préconcentration	Non/ fluorescence	-	Non	36
Verre-PDMS extraction spécifique des cibles par des aptamères	CEM	Plusieurs cancers	Hors puce pour la culture cellulaire et en puce pour l'extraction et la préconcentration	Non/ fluorescence	-	Sang	37

Plateformes microfluidiques	Biomarqueurs	Types de cancer	Préparation de l'échantillon en puce ou en hors puce	Multi-détection/type de détection	Limites de détection	Tests sur échantillons réels	Réf
PDMS-PDMS extraction spécifique de cibles par des aptamères	CTCs (cellules circulantes tumorales)	-	Extraction en puce	Non/ fluorescence	-	Sang	38
Silicium et oxyde de silicium électrode fonctionnalisée par des aptamères	HER2 (récepteur des facteurs de croissance épidermiques humains 2)	Sein	-	Non/ électrochimique	0,1 ng/mL	Sérum humain	39
PMMA- PMMA électrode fonctionnalisée par des aptamères	HL-60 (lignée cellulaire)	Leucémie	Isolation en puce	Non/ électrochimique	250 cellules/mL	Non	40
Verre-verre séparation électrocinétique	Micro ARN-126 et 141	-	Préparation hors ligne	Oui/ fluorescence	15 pM (micro ARN-126 et 141)	Échantillon cellulaire	41

Plateformes microfluidiques	Biomarqueurs	Types de cancer	Préparation de l'échantillon en puce ou en hors puce	Multi-détection/type de détection	Limites de détection	Tests sur échantillons réels	Réf
PDMS-PDMS Préconcentration par réaction en chaîne par polymérase (PCR)	Micro ARN-21	-	Préparation en puce	Non/ fluorescence	-	Sérum et plasma	42
PMMA-PMMA immuno-essai	PSA (antigène spécifique de la prostate)	Prostate	-	Non/ colorimétrie	3,2 ng/mL	Sérum	43
PDMS-PDMS immuno-essai	PSA	Prostate	Préparation de l'échantillon en hors puce	Non/ fluorescence	0,5 pM	Sérum humain	44
PDMS-PMMA immuno-essai à base de nanoparticules d'or	PSA et IL-6	Prostate	-	Oui/ électrochimique	0,23 pg/mL (PSA)-0,30 pg/mL (IL-6)	Sérum humain	45

À l'heure actuelle, les systèmes miniaturisés ne sont pas encore suffisamment robustes et sensibles pour la détection simultanée d'un ensemble de biomarqueurs de cancer.

Pour améliorer les performances analytiques d'un microsystème, une ou plusieurs zones de micro-extraction peuvent être introduites dans des micro-canaux pour extraire et préconcentrer les biomarqueurs d'intérêt.⁷ La stratégie d'introduction de la phase extractante va dépendre notamment des propriétés physico-chimiques de surface des micro-canaux. Des traitements de surface de micro-canaux sont généralement opérés pour pouvoir immobiliser des phases extractantes.⁴⁶ Cependant, les surfaces traitées ne conservent pas toujours leurs propriétés physico-chimiques dans le temps et le traitement des micro-canaux augmente la complexité et les coûts de microfabrication. De plus, les phases extractantes doivent être insérées de manière localisée dans les micro-canaux pour pouvoir introduire les autres étapes d'analyse, ce qui complexifie aussi la microfabrication. Comme l'extraction des biomarqueurs doit être spécifique, de plus en plus de phases de micro-extractions sont constituées de ligands spécifiques.⁴⁷

La suite de l'état de l'art porte sur les matériaux utilisés pour fabriquer des systèmes microfluidiques, des généralités sur les laboratoires sur puce et leurs méthodes de préconcentration intégrées en micro-canal. Une partie est totalement dédiée à l'utilisation des aptamères, ligands spécifiques, comme phase d'extraction pour la préconcentration de biomarqueurs en système LOAC.

I.2. Les matériaux de systèmes microfluidiques

Le choix du matériau utilisé pour la microfabrication des systèmes analytiques pour le diagnostic joue un rôle majeur. Il est généralement choisi en fonction de ses propriétés :

- optiques (transparence ou non à certaines longueurs d'onde notamment)
- physiques (rigidité, résistance mécanique...)
- chimiques (groupements fonctionnels réactifs en surface, résistance aux solvants...)

D'autres critères de choix peuvent intervenir comme la simplicité du procédé de microfabrication utilisé (lithographie molle, thermoformage...), ou encore son coût.

Dans cette partie, la palette des matériaux utilisés pour réaliser des micro-canaux sera présentée. Pour chaque matériau, une brève description de ses propriétés physico-chimiques et de ses procédés de microfabrication sera décrite.

I.2.1. Silicium

Le silicium a été le premier matériau utilisé en microfluidique en 1979 par Terry et al.⁴⁸ Ce matériau est issu historiquement de la microélectronique.⁴⁹ Il présente l'avantage d'avoir une excellente stabilité thermique. Cependant, il est opaque à la lumière visible ce qui rend impossible l'utilisation de techniques de détection optiques comme l'UV ou la fluorescence. De plus, les séparations électrocinétiques sont impossibles à réaliser au sein de micro-canaux en silicium, car il s'agit d'un semiconducteur. Enfin, l'analyse d'échantillons à pH élevé n'est pas possible, car il ne résiste pas aux solutions alcalines. À l'heure actuelle, dans le contexte des LOACs, le silicium est utilisé comme moule pour réaliser des micro-canaux en polymère comme des micro-canaux en polydiméthylsiloxane (PDMS) par le procédé de lithographie molle.⁴⁹

I.2.2. Verre

Le silicium a été très vite remplacé par le verre en 1991 par Manz et al.⁵⁰ En effet, le verre est transparent, ce qui permet l'utilisation de méthodes de détection optiques. De plus, dans des microsystèmes en verre, il est possible de mettre en œuvre des séparations électrocinétiques, car il s'agit d'un conducteur ionique à très faible conductivité. Enfin, il possède une très grande résistance à une large gamme de milieux chimiques (solvants organiques, pH extrêmes...). Malgré ces avantages, les processus de microfabrication des micro-canaux en verre sont longs, complexes de mise en œuvre et nécessitent l'utilisation de salles blanches. Les systèmes totalement en verre ont des coûts élevés surtout pour la réalisation de nouveaux motifs complexes de micro-canaux. Ainsi, les recherches se sont orientées vers la fabrication de systèmes hybrides verre-polymère où le verre a une fonction de capot pour les micro-canaux en polymère.

I.2.3. Les polymères

Le verre et le silicium sont des matériaux nécessitant des méthodes de microfabrication complexes en salles blanches. Pour réduire les difficultés et les coûts de microfabrication, ces dernières années, le développement de nouvelles techniques de microfabrication en salle grise a entraîné l'émergence de microsystèmes en polymère.

Chaque polymère possède des propriétés physico-chimiques, mécaniques et optiques qui leur sont propres. Dans cette partie sont décrites les propriétés physico-chimiques de

certains polymères classés en trois catégories : élastomères, thermo durcissants et thermoplastiques.^{51,52}

Élastomères

Les élastomères sont des chaînes de polymère enchevêtrées qui peuvent être comprimées ou étirées sans déformation de leur forme originelle. L'élastomère le plus communément utilisé en microfluidique est le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Figure 2). Il est peu cher et est simple à modeler.

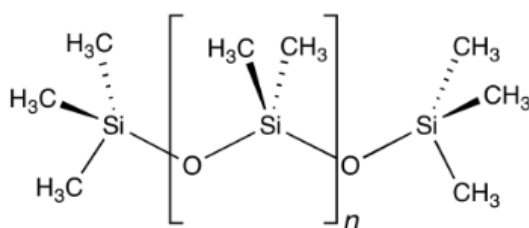


Figure 2 : Structure du PDMS.

Contrairement au silicium et au verre, le PDMS est un matériau élastique⁵³ ce qui le rend moins fragile. Cependant, ses propriétés thermiques se dégradent au cours du temps, il est perméable à la vapeur d'eau et il est sensible à de nombreux produits chimiques.⁵⁴ Son caractère hydrophobe favorise l'adsorption non spécifique de molécules.⁵⁵ Sa surface, inerte chimiquement, ne permet pas de fonctionnalisation de surface sans prétraitement.⁴⁷ Enfin, les micro-canaux en PDMS génèrent de faibles écoulements électroosmotiques ce qui limite leur utilisation pour des séparations électrocinétiques.⁵⁵

La technique de microfabrication des micro-canaux en PDMS est nommée lithographie molle. Il s'agit d'une technique de transfert des motifs d'un moule, généralement en silicium, sur un polymère. Les différentes étapes de la procédure de microfabrication des micro-canaux en PDMS sont décrites en Figure 3. Le motif du micro-canal est transféré sur un moule par dépôt et irradiation UV à travers un masque, d'une résine photopolymérisable (étape 1). La résine non polymérisée est enlevée de la surface du silicium à l'aide d'un lavage dans un solvant (étape 2). Un mélange de PDMS et d'agent réticulant est déposé sur ce moule (étape 3) qui épouse la forme des motifs avant d'être mis à chauffer (étape 4). Le chauffage induit la polymérisation pour ainsi obtenir du PDMS réticulé qui est démoulé (étape 5).⁵⁴ Pour sceller le micro-canal en PDMS à un capot, un traitement au plasma au dioxygène est réalisé pour

générer des groupements hydroxyles à la surface des substrats. Les deux parties sont ensuite mises en contact et jointes de façon irréversible par formation de liaisons Si-O-Si (étape 6). Avec cette technique de fermeture, des micro-canaux PDMS-PDMS ou PDMS-verre peuvent être ainsi fabriqués. La lithographie molle présente l'avantage d'être une technique de microfabrication rapide et qui ne nécessite pas de salle blanche.⁴⁷

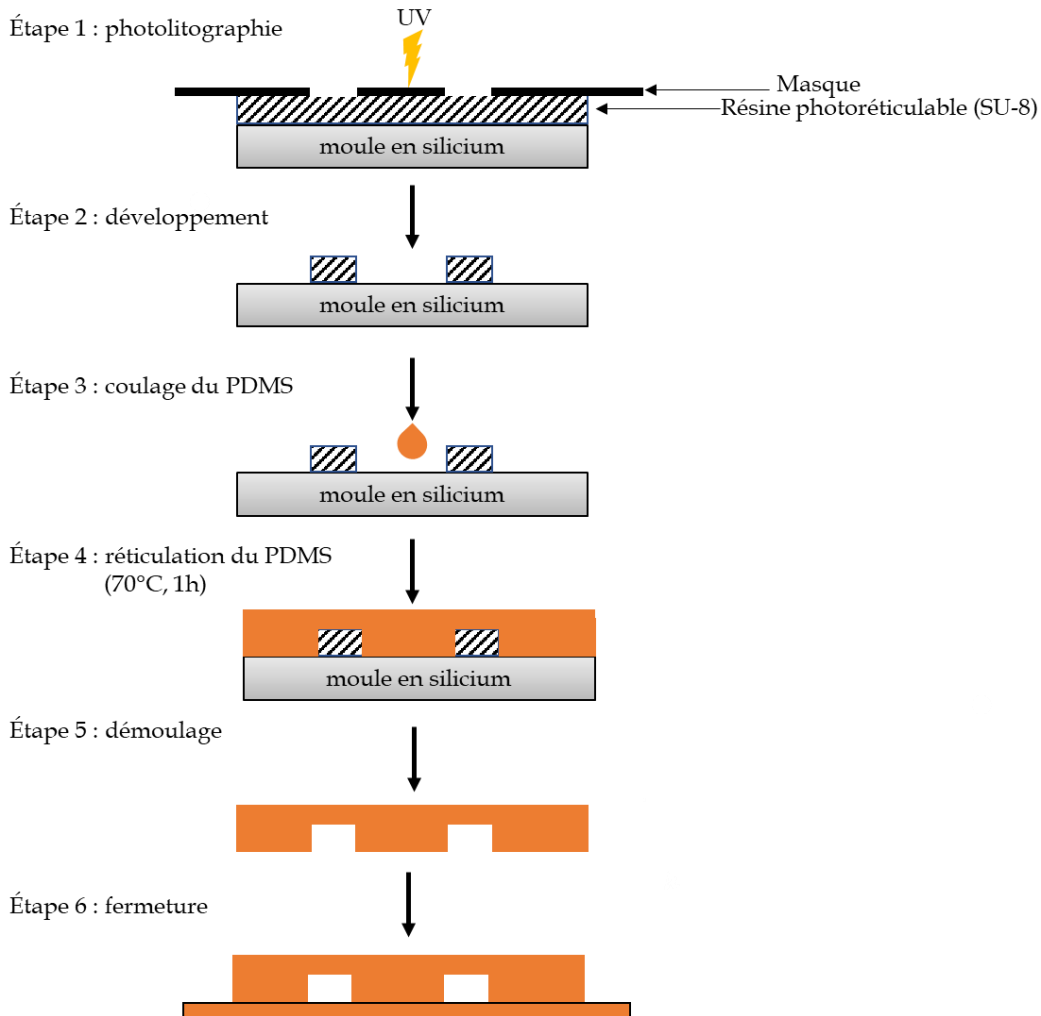


Figure 3 : Étapes de microfabrication de micro-canaux en PDMS par lithographie molle.

Thermo durcissants

Les thermo durcissants sont des polymères rigides dont la polymérisation est irréversible. La résine SU-8 (utilisée sur les galettes en silicium pour fabriquer des moules de micro-canaux), le polyimide ou encore les polymères thiol-ènes font partie de cette classe de polymères.⁵²

Les polymères thiol-ènes sont de plus en plus utilisés dus à leurs nombreux avantages : matériau transparent,^{56,57} simple à modeler,^{56,57} généralement insensible au dioxygène^{58,59}. Ils sont constitués de deux monomères : allyl (« ène ») et thiol (« thiol ») qui leur confèrent des propriétés de surfaces plus hydrophiles que le PDMS, réduisant ainsi l'adsorption non spécifique de molécules et favorisant la génération d'écoulements électroosmotiques permettant la mise en œuvre de séparations électrocinétiques.⁵⁵ De plus, la présence de groupements fonctionnels ènes et thiols de surface permet leur modification par des « ligands » *via* une réaction de chimie clic thiol-ene.^{55,60,61} Les polymères thiol-ènes sont soit commercialisés par la société Norland product Inc, connue sous le nom de NOA (abréviation de l'anglais, *Norland Optical Adhesive*), soit synthétisés en laboratoire à partir de monomères commerciaux allyl et thiol, nommés polymère OSTE (polymère thiol-ène hors-stœchiométrie).⁶² Dans ce dernier cas, les ratios de monomères allyl et thiol peuvent être ajustés à façon pour obtenir les propriétés de surface désirées, notamment pour immobiliser des ligands sur les parois de micro-canaux.^{55,60,61}

Les polymères thiol-ènes sont synthétisés par réaction de chimie clic initiée par irradiation UV.^{55,60,61,63} Le chemin réactionnel est présenté en Figure 4. La première étape du mécanisme réactionnel est la formation d'un radical suite à une exposition UV d'un photoinitiateur (noté I). Ce radical va par la suite réagir avec le proton du groupement thiol, formant ainsi un radical thiyl, qui va à son tour se propager par réaction de chimie clic avec les monomères allyl. Cette propagation va continuer jusqu'à la consommation complète d'un des deux groupements.⁶⁴⁻⁶⁶

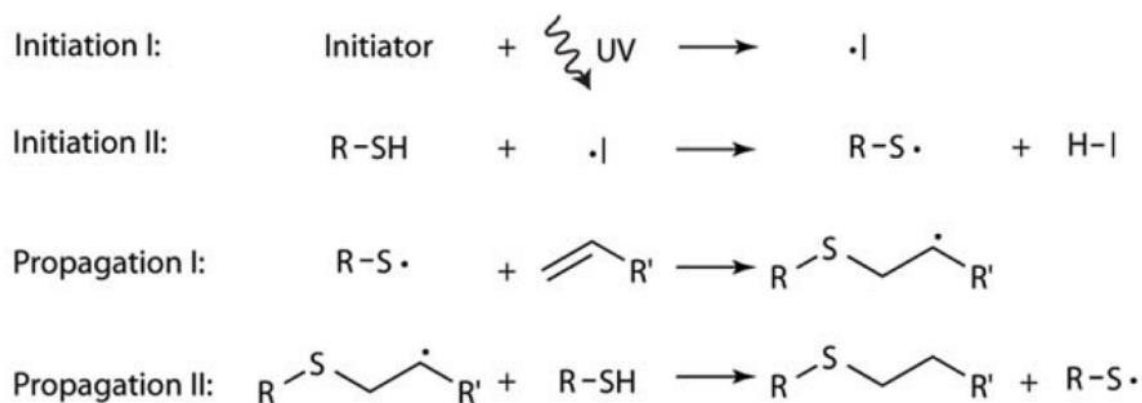


Figure 4 : Mécanisme réactionnel de la réticulation des polymères thiol-ène par réaction de chimie clic entre un monomère thiol et allyl.⁵⁶

Les techniques de microfabrication des micro-canaux en NOA-NOA ou en verre-NOA-verre sont présentées en Figure 5.

Pour réaliser un micro-canal en NOA-NOA, un contre-moule en PDMS est tout d'abord fabriqué par lithographie molle. La NOA liquide est ensuite déposée sur le contre-moule en PDMS puis elle est réticulée aux UVs par réaction de chimie clic. Par la suite, le micro-canal et le capot en NOA sont joints irréversiblement par réaction de chimie clic.⁶⁷

Les micro-canaux verre-NOA-verre nécessitent aussi l'utilisation d'un contre-moule en PDMS. Cette fois-ci, les motifs sur le PDMS sont mis en contact avec une lame de verre. La NOA liquide est coulée dans les creux des motifs puis partiellement réticulée. La puce est enfin scellée à l'aide d'une lamelle en verre qui est déposée sur la NOA avant d'être soumise à une nouvelle exposition aux UVs.⁵⁷

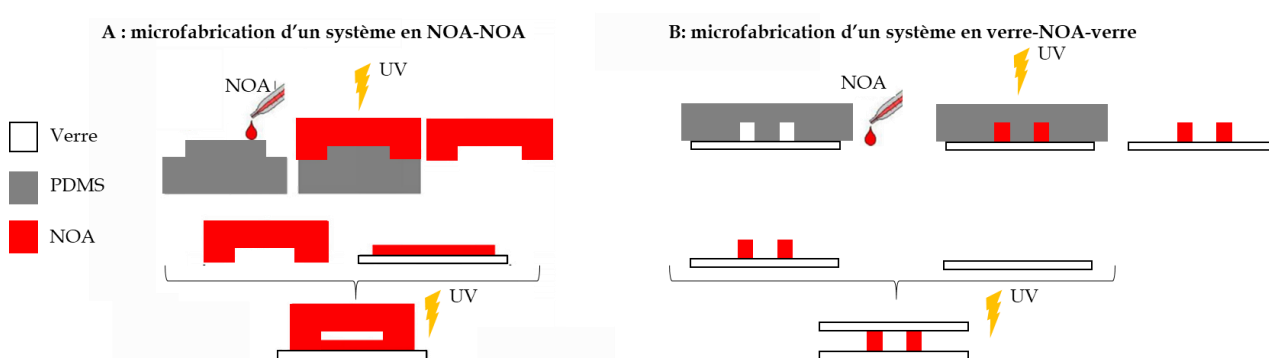


Figure 5: Exemple de procédures de microfabrication de micro-canaux en (A) NOA-NOA (adaptée de ⁵⁷) et (B) verre-NOA-verre.

Contrairement aux micro-canaux en NOA, la fabrication des micro-canaux en OSTE ne nécessite pas de contre-moule⁵⁶ comme présenté en Figure 6. La fermeture des micro-canaux OSTE se réalise en deux étapes : (i) le capot et le canal sont mis en contact et chauffés à 32°C et (ii) le système est exposé aux UVs pour sceller irréversiblement le micro-canal par réaction de chimie clic (Figure 6).

Thermoplastiques

Les thermoplastiques sont une classe de polymères qui se ramollissent lorsqu'ils sont chauffés au-dessus de leur température de transition vitreuse (T_g). Les thermoplastiques se distinguent des élastomères ou des thermo durcissants par leur capacité à être remodelés sous chauffage sans dégradation, sur une large gamme de température. Cette propriété les rend très intéressants pour une utilisation en tant que matériau pour des applications en microfluidique.

Comparés aux autres matériaux (silicium, verre, élastomères, thermo durcissants), les coûts en matières premières et en microfabrication des systèmes à base de thermoplastique sont nettement inférieurs.⁶⁸ Le Tableau 3 résume les grandes familles de thermoplastique utilisées en microfluidique et leurs propriétés associées.

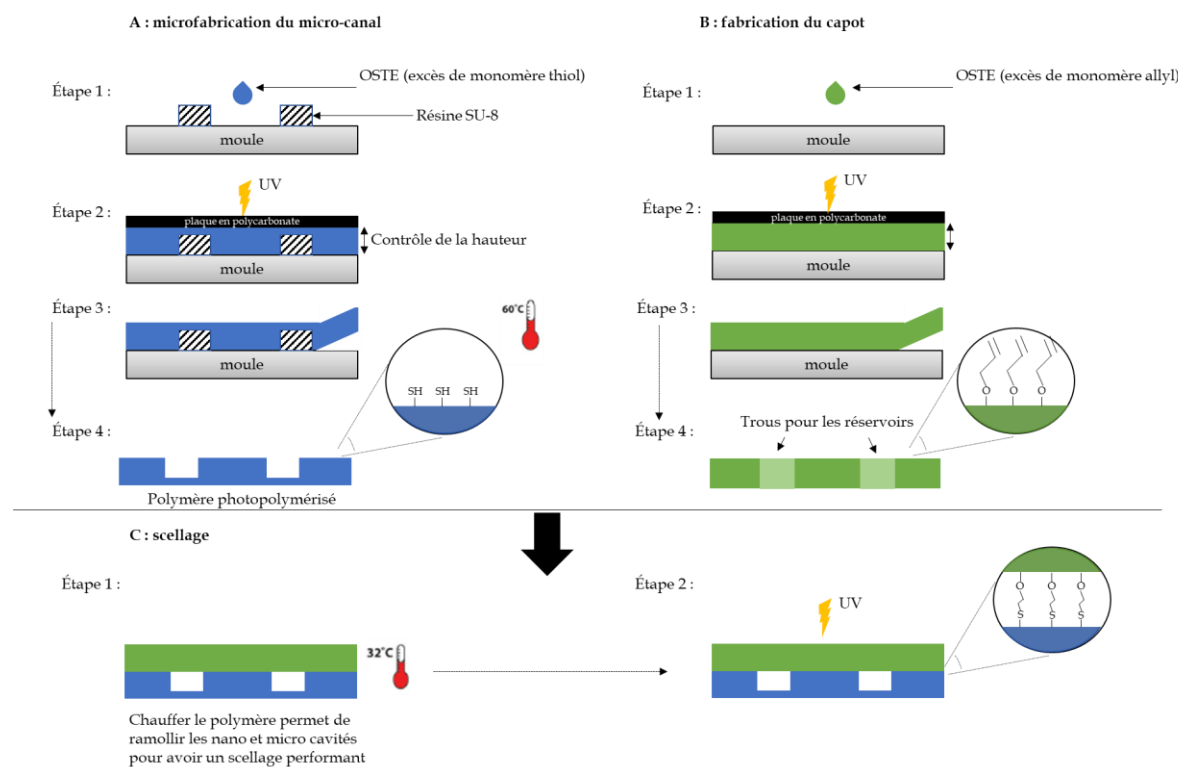


Figure 6 : Étapes de microfabrication de micro-canaux en OSTE par lithographie molle. Adaptée de ⁵⁶.

Le copolymère d'oléfine cyclique (COC) (Figure 7) possède des propriétés optiques proches de celles du verre. Il a une meilleure résistance chimique (résistant aux pH extrêmes, aux solvants...) que les autres thermoplastiques. Le COC est un très bon isolant ce qui permet d'appliquer de forts champs électriques pour la mise en mouvement de fluides.⁶⁹ Ce matériau est inerte chimiquement et hydrophobe, par conséquent, sa fonctionnalisation de surface est un enjeu crucial autant pour le contexte des écoulements électroosmotiques que pour l'immobilisation de molécules sélectives à des fins analytiques ou encore pour la limitation des adsorptions de molécules non spécifiques.⁶⁹

Le COC est synthétisé par copolymérisation d'un monomère cyclique (norbornène) avec l'éthylène (Figure 7). Le pourcentage de norbornène présent dans le mélange de polymérisation a un impact important sur les propriétés physico-chimiques du COC, notamment sa température de transition vitreuse qui peut varier de 75°C à 170°C pour 35% et 60% (pourcentage molaire) de norbornène respectivement.⁶⁹

Tableau 3 : Résumé des propriétés de thermoplastiques utilisés en microfluidique.^{68,70}

Thermoplastiques	Acronymes	Tg(°C)	Résistance aux solvants	Transmittance	
				Visible	UV
Copolymère d'oléfine cyclique	COC	70-155	Excellent	Excellent	Excellent
Dyneon THV	-	160	Bon	Excellent	Excellent
Polyméthacrylate de méthyle	PMMA	100-122	Bon	Excellent	Bon
Polycarbonate	PC	145-148	Bon	Excellent	Mauvais
Polystyrène	PS	92-100	Mauvais	Excellent	Mauvais
Polypropylène	PP	-20	Bon	Bon	Mauvais
Polyétheréthercétone	PEEK	147-158	Excellent	Mauvais	Mauvais
Polytéréphtalate d'éthylène	PET	69-78	Excellent	Bon	Bon
Polyéthylène	PE	-30	Excellent	Mauvais	Mauvais
Polychlorure de vinyle	PVC	80	Bon	Bon	Mauvais
Polychlorure de vinylidène	PVDC	0	Bon	Bon	Mauvais
Polysulfone	PSU	170-187	Mauvais	Mauvais	Mauvais

Il existe différentes techniques de fabrication des micro-canaux en COC, chacune présentant ses avantages et ses inconvénients. Les deux techniques majoritairement utilisées sont l'emboutissage à chaud et le moulage par injection.⁶⁹

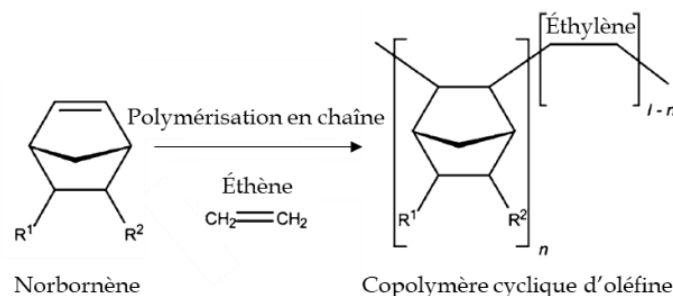


Figure 7 : Structure du copolymère d'oléfine cyclique. Adaptée de ⁶⁹.

L'emboutissage à chaud (Figure 8) permet de répliquer les motifs d'un moule sur une plaque de thermoplastique. La surface du thermoplastique est chauffée à une température supérieure à sa température de transition vitreuse (étape 1) puis pressée sur un moule possédant le motif du micro-canal souhaité (étape 2). La plaque est refroidie et la pression exercée est stoppée afin de démouler le micro-canal (étape 3).⁷¹

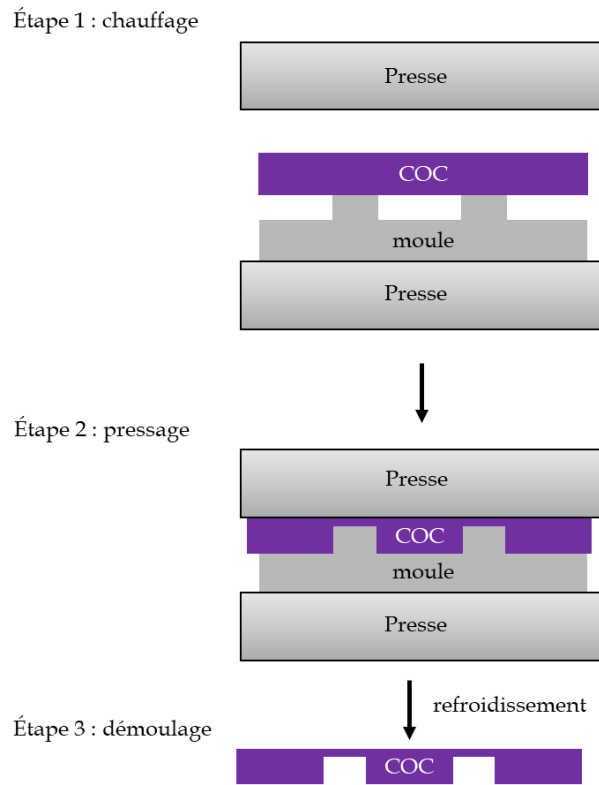


Figure 8 : Les étapes de l'emboutissage à chaud.

Le moulage par injection consiste à introduire le polymère chauffé dans le moule sous vide (étape 1). Après refroidissement (étape 2), la pièce est démoulée (étape 3) (Figure 9).⁷²

L'emboutissage à chaud permet de réaliser des micro-puces avec des motifs complexes, mais en faibles nombres contrairement au moulage par injection qui est plus adapté à la microfabrication industrielle.⁶⁹ L'emboutissage à chaud et le moulage par injection sont des techniques nécessitant des moules. D'autres techniques comme l'ablation laser⁷³ ou encore le micro-usinage⁶⁹ s'affranchissent de l'utilisation de moules.

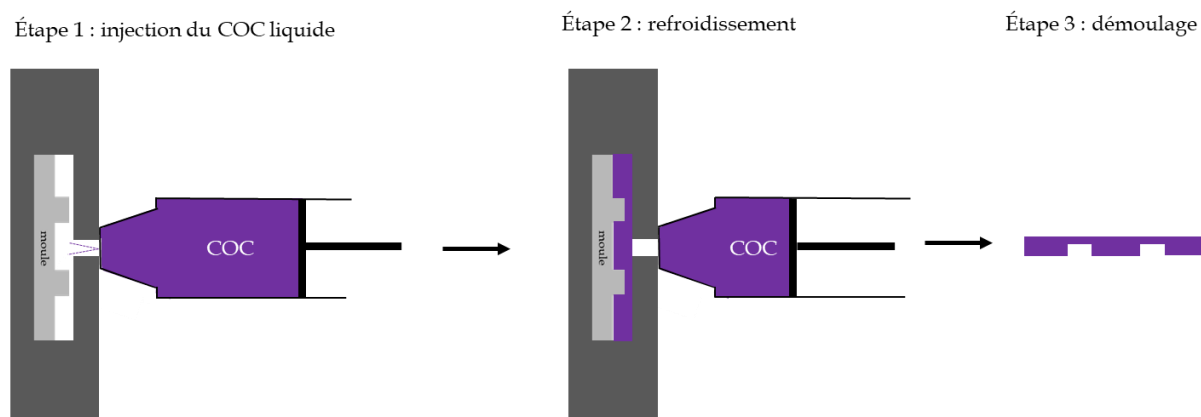


Figure 9 : Moulage par injection.

La fermeture de micro-canaux en COC peut se réaliser de différentes manières avec du COC, ou d'autres thermoplastiques.⁶⁹ La plus simple est le collage du micro-canal avec un thermoplastique plat à l'aide d'une colle en polymère époxyde (communément appelée époxy). Cependant, l'utilisation de colles liquides est risquée, car celle-ci peut s'infiltrer dans les micro-canaux lors de la mise en contact des deux parties du dispositif pouvant entraîner des phénomènes de bouchage.^{69,74} La méthode de scellage la plus usuellement utilisée est la fermeture à chaud. Celle-ci consiste à presser deux plaques de COC l'une contre l'autre au-dessus de la température de transition vitreuse du COC. Néanmoins, la fermeture à chaud du système conduit généralement à un scellage peu robuste due à la faible énergie de surface des thermoplastiques pouvant entraîner des fuites. Pour améliorer la robustesse de fermeture des micro-canaux en COC, des prétraitements par plasma peuvent être utilisés. L'utilisation de solvants organiques préalable à une fermeture à chaud est également très employée.⁶⁹ Cependant, ces techniques peuvent être sources de contamination et/ou de dégradation des traitements de surface réalisés avant fermeture des micro-canaux. Pour pallier ce problème, les micro-canaux en COC peuvent être scellés par un scotch initialement développé pour des applications de réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour ainsi avoir des systèmes COC-scotch⁷⁵. Ce scotch possède une partie recto, qui est la partie collante constituée de silicone (R_2SiO). La partie verso du scotch (non collante) est du polyoéfine $((-CH_2-CRR')_n)$. Ce scotch commercial évite l'utilisation d'équipements chers et complexes et de colle liquide ou de solvant. Le scotch résiste à une large gamme de température (-40 °C à $+120\text{ °C}$)⁷⁶ et est résistant à des pressions allant jusqu'à 5 bars à température ambiante⁷⁵. En outre, il s'agit d'une méthode extrêmement rapide de scellage de micro-canaux en COC.

Le Tableau 4 résume les propriétés physico-chimiques des principaux matériaux actuellement utilisés pour la microfabrication de systèmes microfluidiques.

Tableau 4 : Propriétés physico-chimiques des matériaux de microsystèmes. Adapté de ⁵².

Propriétés	Matériaux			
	Silicium/verre	Élastomères	Thermo durcissants	Thermoplastiques
Résistance solvant organique et inorganique	Très bonne résistance	Faible résistance	Bonne résistance	De moyennement bonne à très bonne résistance
Surface inerte chimiquement	Non	Moyennement	De moyennement à pas inerte	Inerte
Hydrophile/hydrophobe	Hydrophile	Hydrophobe	Moyennement hydrophile	Moyennement hydrophobe
Transparence au rayonnement UV-visible	Pas du tout transparent/hautement transparent	Transparent	Transparent	Moyennement transparent à hautement transparent
Niveau de difficulté de microfabrication	Très dure	Simple	Moyennement simple	Simple
Coût final	Très cher	Peu cher	Moyennement cher	Peu cher

Le choix du matériau de microfluidique est la première étape dans la conception d'un LOAC et est primordial pour le développement de systèmes analytiques. Il doit être choisi en fonction de ses propriétés physico-chimiques en regard de l'application pour lequel il va être utilisé et les techniques de microfabrication doivent être les plus simples et les moins chers possible.

Le verre et le silicium résistent à de nombreux solvants et présentent un caractère hydrophile. Cependant, leur méthode de microfabrication est longue, complexe et coûteuse. Afin de réduire les difficultés et les coûts de microfabrication d'une micro-puce, les polymères sont de plus en plus utilisés. Cependant, ils sont généralement plus hydrophobes que le verre ce qui favorise l'adsorption non spécifique de molécules et limite les déplacements de fluide sous champ électrique. Pour pallier ces inconvénients, les polymères thiol-ènes supplantent peu à peu les élastomères et les thermoplastiques par leur caractère hydrophile et leur réactivité de surface. En revanche, leur résistance chimique est moins bonne que pour les

thermoplastiques tel que le COC et le prix des matières premières (monomères et photoinitiateur) est plus élevé que pour les autres polymères (élastomère et thermoplastique).

I.3. Les laboratoires sur puce et les méthodes de préconcentration

I.3.1. Principe de fonctionnement des laboratoires sur puce (LOACs)

Une configuration simple de laboratoire sur puce consiste en un module de traitement de l'échantillon, précédé d'un système d'injection des solutions, suivi d'un canal de séparation des composés d'intérêt avant de les détecter dans une dernière étape. L'objectif de l'étape de traitement de l'échantillon est de purifier l'échantillon, extraire les composés d'intérêt et les préconcentrer. Un exemple de LOAC en croix est présenté en Figure 10.

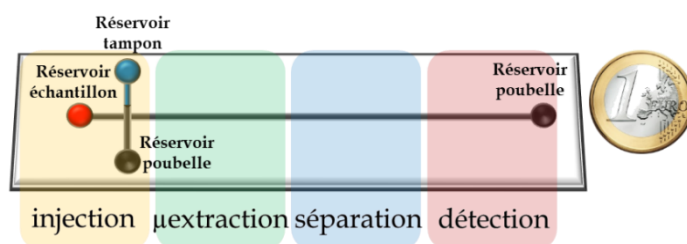


Figure 10 : Exemple d'un LOAC en croix.

Écoulement en micro-canal

Les LOACs sont classés en deux catégories, selon le mode de génération des écoulements dans les micro-canaux : sous flux hydrodynamique ou champ électrique.⁷⁷

L'application d'une pression générée par des pompes mécaniques permet la mise en mouvement de fluides à l'intérieur de micro-canaux. Ces dernières années, se sont développées des micro-pompes (Fluigent,...) capables de délivrer des pressions de quelques centaines de bars, nécessaires pour la mise en mouvement des fluides dans des systèmes miniaturisés et ainsi générer des débits contrôlables de l'ordre du nanolitre par minute.⁷⁷ L'appareillage utilisé pour la génération et le contrôle des écoulements sous flux hydrodynamique reste à l'heure actuelle difficilement miniaturisable et donc transportable.⁷⁷ Les écoulements de fluides contrôlés par des flux hydrodynamiques ont un profil de vitesse

parabolique (Figure 11.B), ce qui favorise la dispersion des zones de solutés dans les micro-canaux, provoquant ainsi une baisse d'efficacité de l'analyse.⁷⁸

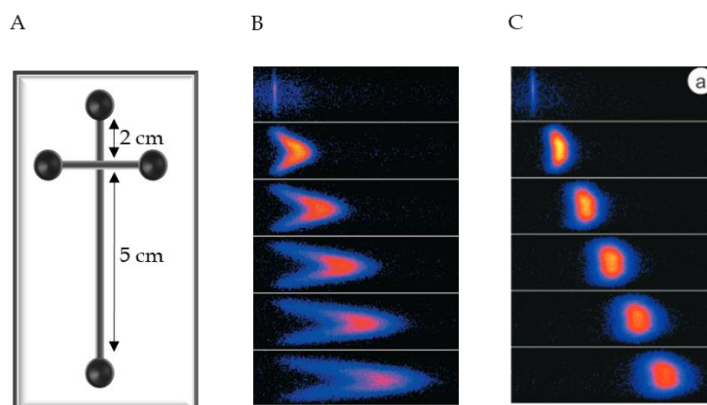


Figure 11 : Étude de l'écoulement d'un fluide dans un micro-canal en croix (A) sous flux hydrodynamique (B) et sous champ électrique (C). Adaptée de ⁷⁸.

La génération des écoulements sous champ électrique est le mode le plus simple à mettre en œuvre et l'un des plus utilisés pour miniaturiser toutes les étapes nécessaires à l'analyse.⁷⁹ L'application d'un champ électrique dans un micro-canal nécessite seulement des électrodes miniaturisées plongées dans une solution conductrice, reliées à un générateur de tension. La mise en mouvement des espèces est alors due à l'écoulement électroosmotique et leur propre mobilité électrophorétique qui dépend de leurs propriétés intrinsèques (rayon hydrodynamique, propriété acido-basique, charge nette...^{79,80} L'un des avantages de la mise en mouvement de fluide sous champ électrique est que les écoulements électrocinétiques ont un profil de vitesse plan, ce qui limite la dispersion des zones de solutés et permet d'avoir une bonne efficacité d'analyse (Figure 11.C).⁷⁸ De plus, il est possible de contrôler les écoulements de fluide par un simple changement de tension ou de leur point d'application grâce à l'utilisation de plusieurs réservoirs connectés au micro-canal, ce qui permet d'éviter d'avoir recours à des systèmes de valves. Cependant, les tensions appliquées pour mettre en mouvement des fluides peuvent provoquer des échauffements par effet Joule susceptibles de générer des effets dispersifs.

Méthodes de préconcentration en format LOAC

L'analyse de cibles d'intérêt présentes en faibles quantités dans des matrices complexes nécessite souvent un prétraitement pour les extraire et les préconcentrer.⁸¹⁻⁸³ L'extraction est une méthode de préparation de l'échantillon qui sert à séparer les cibles d'intérêt des autres

entités chimiques/biologiques tout en les préconcentrant permettant ainsi d'améliorer les performances de l'analyse chimique.⁸¹⁻⁸⁴ Les préconcentrations électrocinétiques permettent aussi de préconcentrer des cibles d'intérêt sous champ électrique.⁸³ Le mode de génération des écoulements va conditionner le choix de la méthode de préconcentration des analytes.

Une des parties suivantes est totalement dédiée aux méthodes de préconcentration en format LOAC (Partie I.3.2).

Méthodes séparatives en format LOAC

Les séparations chromatographiques et électrocinétiques sont des méthodes de séparation de composés qui sont très régulièrement utilisées en chimie analytique. Ces deux méthodes de séparation ont été transposées dans des systèmes miniaturisés dans les années 90.⁴⁶

La chromatographie est une méthode de séparation de composés, fondée sur la différence de distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire (nommée phase stationnaire) (phase greffée ou immobilisée sur un support solide), l'autre mobile (nommée phase mobile) (Figure 12).⁸⁵ Les phases stationnaires utilisées pour les systèmes miniaturisés peuvent être entre autres des billes, des phases monolithiques, des résines, des molécules greffées à la paroi des micro-canaux...⁴⁶ Les séparations chromatographiques sont des séparations spécifiques. Cela signifie que les phases utilisées pour les séparations chromatographiques peuvent aussi servir de phase d'extraction de cibles.⁸⁶ Cependant, l'intégration de phases stationnaires en micro-canal a pour inconvénient de complexifier la microfabrication des systèmes. Le mode de génération des écoulements pour des séparations chromatographiques est sous flux hydrodynamique.

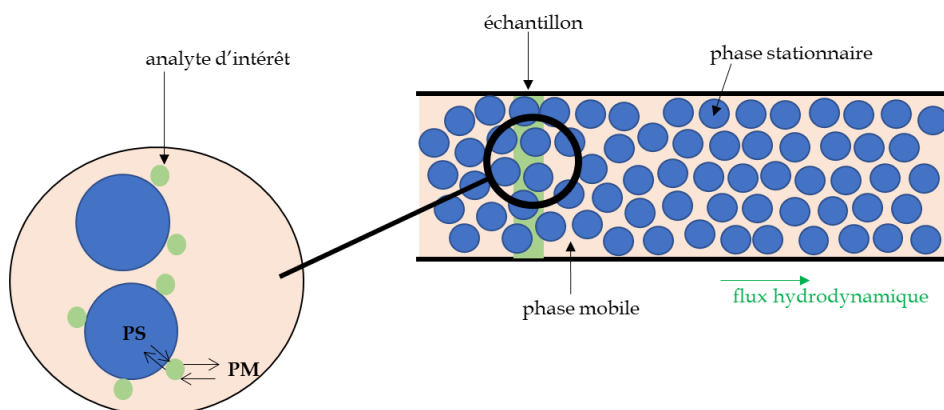


Figure 12 : Principe de la chromatographie liquide. (PS : phase stationnaire ; PM : phase mobile).

Le principe de séparation des composés en électrophorèse est différent de celui de la chromatographie. L'électrophorèse est une méthode de séparation fondée sur la différence de mobilité entre composés sous l'imposition d'un champ électrique continu.^{87,88} Les écoulements électroosmotiques et la mobilité électrophorétique des espèces à séparer dépendent de leurs propriétés intrinsèques, des propriétés physico-chimiques des parois du canal, de la composition de l'électrolyte de séparation utilisé, des dimensions du micro-canal et de la tension appliquée. La différence de mobilité des espèces soumises à un champ électrique dans une solution conductrice (électrolyte de séparation) dans un micro-canal permet leur séparation. Un exemple de séparation électrocinétique dans le cas où il y a un flux électroosmotique est présenté en Figure 13. Les méthodes de séparation développées en électrophorèse capillaire peuvent être transposées en micro-canal car le diamètre des micro-canaux et des capillaires sont similaires. Le principal avantage des micro-puces par rapport à une électrophorèse capillaire conventionnelle est la longueur du micro-canal qui est réduite par rapport à la longueur d'un capillaire, ce qui permet de diminuer considérablement les temps d'analyse. Les séparations électrocinétiques peuvent être aussi des séparations spécifiques par l'intégration d'une phase stationnaire (technique séparative nommée électro chromatographie) dans le micro-canal ou avec l'utilisation de micelles (technique séparative nommée chromatographie électrocinétique micellaire).⁸⁹

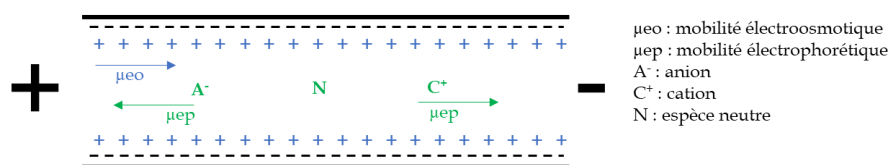


Figure 13 : Principe d'une séparation électrophorétique en zone dans un micro-canal chargé négativement lors de l'application d'une polarité positive.

Méthodes de détection

À l'issue de la séparation, l'étape de détection est une étape primordiale et la dernière étape de la chaîne analytique miniaturisée. La détection permet de fournir un signal proportionnel à la concentration ou la masse d'un composé donné. Les étapes de préconcentration et de séparation conditionnent la qualité de détection des analytes d'intérêt. Il existe plusieurs techniques de détection en micro-canal (optique, électrochimique et spectrométrique) qui ont chacune leurs avantages, leurs inconvénients et leurs limites. La

méthode de détection doit être choisie en fonction du système analytique utilisé (transparence du matériau, type de solvant utilisé...) et en fonction des propriétés physico-chimiques des composés à analyser (absorption dans l'UV, fluorescence, propriétés redox...).

La détection optique (méthodes colorimétrique, UV-visible, fluorescence...) est très utilisée dans toutes les techniques analytiques. Ce mode de détection est hautement compatible aux systèmes analytiques miniaturisés, car il n'y a pas d'interconnexion requise entre le détecteur et la puce. Cependant, les matériaux utilisés pour la fabrication des micro-canaux doivent être transparents. Le principal avantage des dispositifs basés sur la détection d'un changement de couleur, d'absorbance ou de transmittance UV-visible, est qu'ils sont transportables. Cependant, comme le chemin optique en micro-canal est court, les limites de détection sont souvent mauvaises. De plus, dans le cas des détections colorimétriques, les multi-détections de cibles sont difficiles, car elles sont généralement basées sur un changement de couleur de la solution. Les méthodes de détection de fluorescence sont plus adaptées à la multi-détection de cibles grâce à la possibilité de marquages fluorescents de molécule par des fluorophores.⁹⁰ Cependant, le marquage d'une molécule rajoute des étapes supplémentaires et donc des coûts supplémentaires. Ce mode de détection permet d'obtenir de très bonnes limites de détection comparé aux autres méthodes de détections optiques présentées précédemment. Cependant, la détection par fluorescence requiert une source lumineuse excitatrice, des filtres et un détecteur capable d'enregistrer les photons émis par un fluorophore, ce qui rend cette technique de détection plus compliquée à miniaturiser.

Les détections électrochimiques sont basées sur un changement d'un signal électrique mesurable (courant ou tension) provoqué par un transfert d'électrons lors d'une réaction d'oxydoréduction au niveau d'électrodes intégrées dans le micro-canal. Ces méthodes de détection (ampérométrie, voltammétrie...) ont été les premières à être miniaturisées. La fabrication de microélectrodes intégrées dans des micro-canaux (verre...) fait appel à des techniques de photolithographie ou de dépôt physique en phase vapeur. Ces électrodes peuvent être en métaux précieux (platine, or...) ou en carbone.⁹¹ La détection électrochimique de cibles d'intérêt au sein de systèmes analytiques miniaturisés offre les avantages d'obtenir des analyses rapides, sensibles et spécifiques.⁹² La multi-détection par voie électrochimique est la plus simple à mettre en œuvre et la moins onéreuse, car elle ne nécessite pas de marquage des molécules.

La méthode de détection spectrométrique qui a déjà été couplée aux systèmes microfluidiques est la spectrométrie de masse. Le principe de la spectrométrie de masse est la séparation de fragments chargés de molécules en fonction de leur rapport masse/charge. Cette

méthode de détection est applicable à une plus large gamme de composés comparé aux méthodes optiques ou électrochimiques. Cependant, les spectromètres de masse sont très difficilement miniaturisables et leur couplage avec les systèmes microfluidiques est extrêmement complexe.⁹³ De plus, cette méthode de détection est semi-quantitative.

Les performances d'une séparation et d'une détection dépendent de l'étape de préparation de l'échantillon qui constitue la première étape de toute analyse. Dans la partie qui suit, les différents moyens de préparation d'échantillons en micro-canal sont présentés.

I.3.2. Préconcentration des échantillons en microsystèmes

Les biomarqueurs de cancer sont présents dans des échantillons biologiques en très faibles concentrations. Afin de les détecter et de les quantifier, des étapes de prétraitements peuvent être introduites en amont du système de séparation et de détection. Parmi les méthodes de prétraitement, les méthodes de préconcentration basées sur des méthodes électrocinétiques et d'interactions chimiques ou de reconnaissance moléculaire peuvent être citées⁸⁶.

Méthodes de préconcentration électrocinétiques

Des méthodes électrocinétiques peuvent être mises en œuvre pour la préconcentration des analytes d'intérêt au sein de micro-canaux. Les méthodes de préconcentration électrocinétiques les plus courantes sont les préconcentrations par di électrophorèse (iDEP), par amplification de champ électrique (FASS), par amplification de champ électrique avec injection électrocinétique (FASI), par amplification de champ électrique avec injection d'un très grand volume (LVSEP) et par extraction dynamique.

Un mouvement di électrophorétique est un mouvement produit par polarisation de particules soumises à un champ électrique non uniforme (Figure 14). Les pôles de la particule sont soumis au champ électrique par des forces d'attraction ou de répulsion. Dans le cas où la particule est plus polarisable que son milieu de suspension, comme le champ n'est pas uniforme, le pôle qui subit le plus grand champ électrique dominera l'autre et la particule se déplacera vers ce grand champ électrique. À l'inverse, la particule se déplacera vers le plus petit champ électrique si elle est moins polarisable que son milieu de suspension.⁹⁴

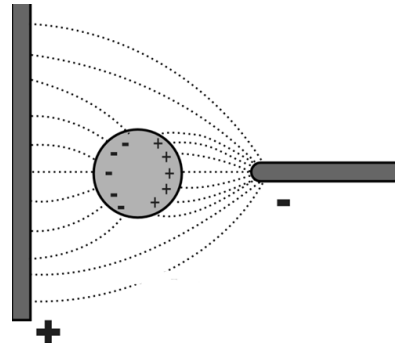


Figure 14: Principe di électrophorétique. Adaptée de ⁹⁵.

Avec cette méthode, les particules se déplacent selon leur taille, leur charge, leurs propriétés intrinsèques, et selon les propriétés du milieu de suspension. Pour créer un mouvement di électrophorétique en système miniaturisé, une tension stable circulant entre deux microélectrodes connectées à un micro-canal et à un générateur de tension continue, est appliquée. C'est la présence d'un ensemble de structures isolantes à 3 dimensions (Figure 15.A) présent au sein d'un micro-canal, qui induit un mouvement di électrophorétique dû à la déformation du champ électrique.⁹⁶ Cette méthode fait intervenir deux forces : électrophorétique et di électrophorétique.⁹⁷ Il a été montré que la préconcentration de particules au niveau des structures isolantes dépend de la tension appliquée. Plus celle-ci est élevée, plus les analytes sont préconcentrés.⁹⁸ Cependant, l'application de hautes tensions peut provoquer des effets Joule entraînant ainsi la perte d'efficacité de préconcentration.⁹⁹ Pour éviter l'utilisation de tensions trop élevées, il est possible de réduire le nombre de structures isolantes (Figure 15.B). De plus, il a été montré que la diminution du nombre de structures isolantes, pour une tension donnée, permet de concentrer jusqu'à 5 fois plus de particules d'intérêt (Figure 15.C).⁹⁸

Malgré la diminution du nombre de structures isolantes à l'intérieur des micro-canaux, cette méthode de préconcentration augmente la complexité de microfabrication. Contrairement à la préconcentration par iDEP, les méthodes de préconcentration FASS, FASI, LVSEP et d'extraction dynamique ne nécessitent pas de structure complexe en forme de pilier à l'intérieur des micro-canaux. De plus, ces méthodes permettent de préconcentrer des analytes autres que des particules polarisables. Ces méthodes de préconcentration ont été d'abord développées en électrophorèse capillaire¹⁰⁰ et ont été ensuite transposées en micro-canal¹⁰¹.

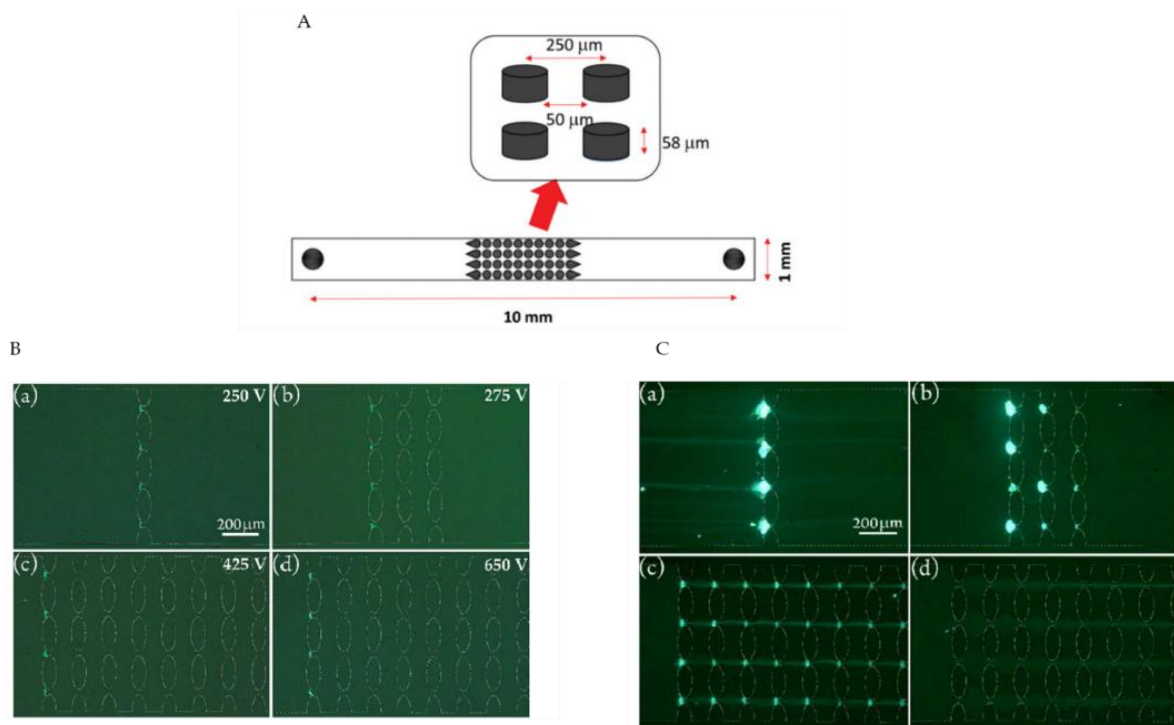


Figure 15 : (A) exemple de schéma et dimensions d'un micro-canal possédant des microstructures pour préconcentrer des particules par iDEP Adaptée de ⁹⁶. (B) diminution de la tension appliquée avec le nombre de structures isolantes : (a) 1 colonne, 250 V, (b) 3 colonnes, 275 V, (c) 11 colonnes, 425 V, (d) 21 colonnes, 650 V. C : Augmentation de la concentration des particules fluorescentes avec la diminution du nombre de structures isolantes pour une tension de 600 V appliquée : (a) 1 colonne, (b) 3 colonnes, (c) 11 colonnes, (d) 21 colonnes. Adaptée de ⁹⁸.

La préconcentration par amplification de champ électrique (FASS) est représentée en Figure 16.A, dans le cas où il n'y a pas de flux électroosmotique. Le micro-canal est d'abord conditionné par un électrolyte de séparation, puis l'échantillon est injecté (étape 1). L'électrolyte de séparation doit avoir une conductivité (σ) dix fois supérieure à celle de l'échantillon,¹⁰² ainsi comme le champ électrique est inversement proportionnel à la conductivité d'un milieu donné, les espèces chargées migrent (cations vers la cathode et anions vers l'anode) très rapidement dans la zone échantillon de haut champ électrique avant d'être fortement ralenties lorsqu'elles atteignent l'électrolyte de séparation de bas champ électrique, les préconcentrant ainsi dans cette zone frontière à l'intérieur du micro-canal (étape 2).¹⁰³ Cette technique permet d'augmenter la sensibilité d'analyse.

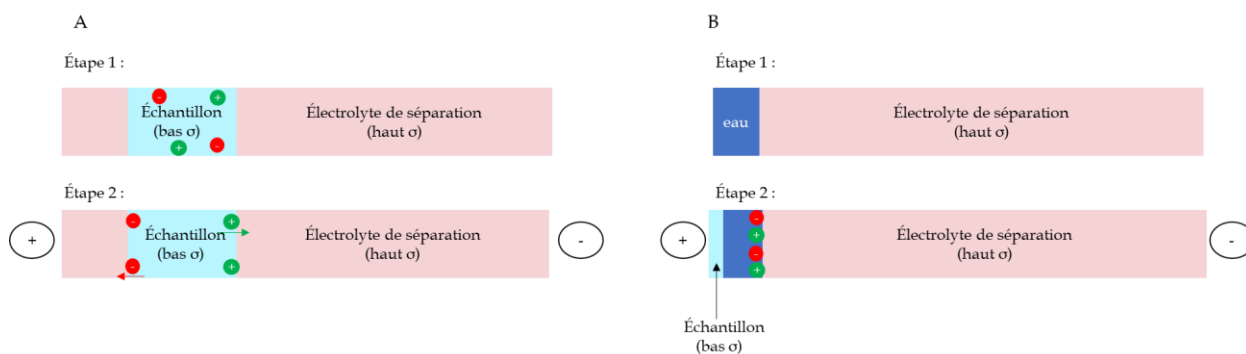


Figure 16 : Représentation schématique d'un micro-canal soumis au (A) FASS et au (B) FASI en l'absence de flux électroosmotique. L'échantillon a une conductivité (σ) au moins 10 fois inférieure à la conductivité de l'électrolyte de séparation.

Litchenberg et al.¹⁰⁴ ont été parmi les premiers à préconcentrer des analytes d'intérêt par la méthode FASS en micro-canal. Ils ont montré la possibilité de concentrer 65 fois deux acides aminés (arginine et glycine).

Giri et al.¹⁰⁵ quant à eux ont opéré un test immuno-enzymatique dans un micro-canal précédé d'une préconcentration FASS de l'enzyme réactif. Ils ont montré qu'avec leur système il est possible d'obtenir une limite de détection d'environ soixante fois supérieure aux immuno-essais vendus pour la détection du facteur de nécrose tumorale (biomarqueur de cancer).

Une alternative de la méthode FASS est la méthode FASI. Le principe est décrit en Figure 16.B. Le micro-canal est initialement conditionné par un électrolyte de séparation de haute conductivité, puis est introduit une zone peu conductrice (eau) (étape 1). L'échantillon est injecté sous champ électrique. Lors de l'application d'une tension, il règne dans la zone de faible conductivité (eau) et dans l'échantillon lui aussi de faible conductivité, un champ électrique élevé, ce qui entraîne une injection amplifiée des analytes qui vont par la suite s'accumuler à la frontière entre l'eau et l'électrolyte de séparation (étape 2).¹⁰⁶

Chandra et al.¹⁰⁷ ont combiné les méthodes de préconcentration FASS et FASI suivie d'une séparation électrocinétique pour détecter des antracyclines (médicaments anti-cancéreux) dans des échantillons d'urine de patients, à l'aide d'une méthode électrochimique basée sur la reconnaissance moléculaire. Le microsystème est présenté en Figure 17. Ainsi, quatre antracyclines (daumonycine, doxorubicine, idarubicine et mitoxantrone) ont pu être détectés avec des limites de détection allant de 1,2 à 5,5 fM.

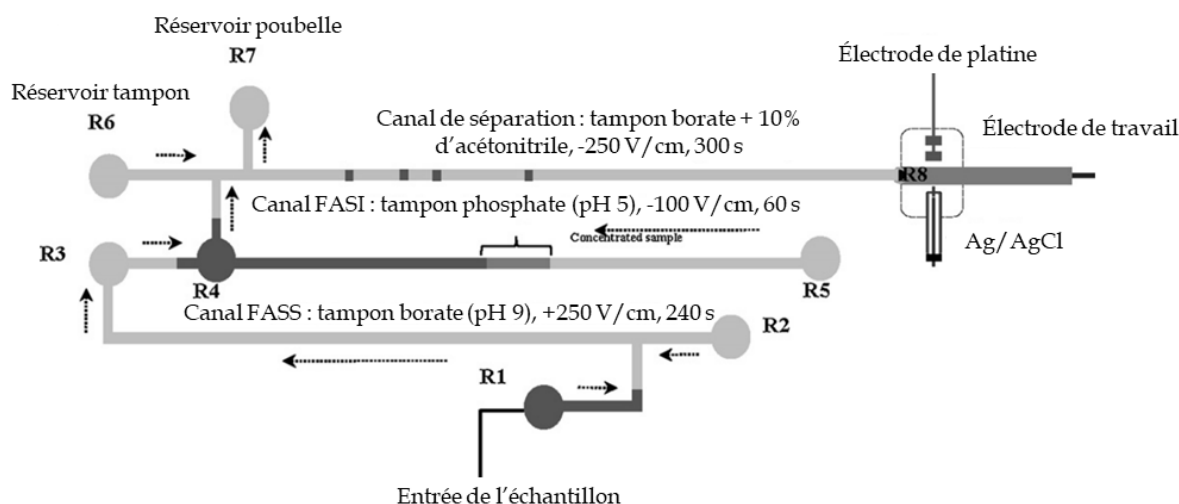


Figure 17 : Schéma du système microfluidique combinant deux méthodes de préconcentration électrocinétiques : FASS et FASI. Adaptée de ¹⁰⁷.

Les méthodes FASS et FASI souffrent de plusieurs inconvénients : i) la dispersion des ions qui est causée par la mobilité non uniforme entre l'électrolyte de forte conductivité et l'échantillon de faible conductivité, ii) le flux électrocinétique qui est instable lors de l'utilisation d'électrolytes avec des conductivités très différentes¹⁰⁶ et iii) l'augmentation de la sensibilité est faible (de 10 à 60 fois plus)^{105,108} à cause des petits volumes d'échantillon injecté.

Pour pallier le manque de sensibilité dû aux volumes d'injection limités pour les méthodes de préconcentration FASS et FASI, il est possible de réaliser des préconcentrations électrocinétiques en injectant des volumes d'échantillon plus importants.¹⁰⁹ Cette méthode est nommée LVSEP (préconcentration par amplification de champ électrique avec injection d'un très grand volume).⁹³ Elle est applicable pour des analytes ayant une mobilité électrophorétique inverse à l'écoulement électroosmotique. Le principe de la méthode LVSEP dans le cas où des anions sont préconcentrés est présenté en Figure 18. Le micro-canal est totalement rempli par l'échantillon préparé dans une matrice de plus faible conductivité que l'électrolyte de séparation et les réservoirs sont remplis avec l'électrolyte de séparation contenant un modificateur de mobilité électroosmotique (étape 1). Lors de l'application du courant, l'écoulement électroosmotique se dirige à l'entrée du réservoir et les composés chargés négativement sont préconcentrés à la frontière entre l'échantillon et l'électrolyte de séparation dû à la différence de conductivité (étape 2). Pendant cette phase, la mobilité électroosmotique devient quasiment nulle par la présence du modificateur dans l'électrolyte de séparation (étape 3). Ainsi il est possible de séparer les analytes accumulés sans avoir besoin de changer

de polarité (étape 4). Les gains de sensibilité avec cette méthode peuvent atteindre une valeur de 200. Cependant, cette méthode est applicable à un seul type d'ions à la fois.¹⁰⁹

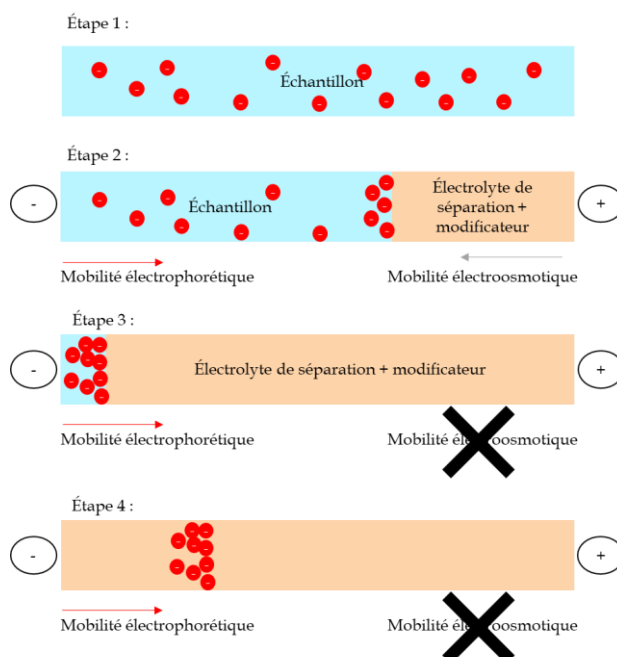


Figure 18 : Représentation schématique d'un micro-canal soumis au LVSEP.

Les méthodes de préconcentration électrocinétiques présentées permettent de préconcentrer des analytes sous champ électrique. L'utilisation d'un changement de mobilité électrophorétique pour la préconcentration d'espèce peut être réalisée en utilisant des pseudo-phases micellaires. Ce type de préconcentration porte le nom d'extraction dynamique.¹⁰⁹ Un exemple de préconcentration de cette méthode est présenté en Figure 19, dans le cas de la présence d'un flux électroosmotique cathodique et où les micelles sont chargées négativement. Un micro-canal est conditionné avec un électrolyte de séparation contenant les micelles qui possèdent des affinités chimiques (électrostatique et/ou hydrophobe) avec les analytes d'intérêt. Un large volume d'échantillon est alors injecté (étape 1). Lors de l'application d'une polarité positive, les analytes cationiques et neutres migrent plus rapidement que les micelles en présence d'un flux électroosmotique (étape 2). Ainsi les analytes sont préconcentrés au niveau des micelles par affinité chimique et leur mobilité électrophorétique est modifiée par la formation d'un complexe analyte-micelle (étape 3).¹⁰⁹

Les méthodes de préconcentration électrocinétiques sont généralement assez simples à mettre en œuvre, mais manquent de spécificité. Une alternative consiste à préconcentrer les

analytes avec des méthodes d'extraction basées sur du partage avec une phase stationnaire ou basées sur la reconnaissance moléculaire avec des ligands.

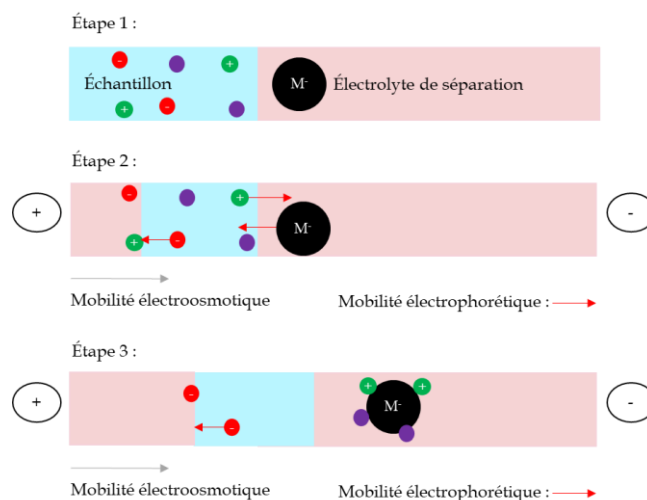


Figure 19 : Représentation schématique d'une extraction dynamique en micro-canal en présence d'un flux électroosmotique cathodique et lors d'une application d'une polarité positive.

Méthodes d'extraction

Les méthodes d'extraction sont des méthodes de prétraitement d'échantillons les plus utilisées pour isoler, purifier et préconcentrer des analytes d'intérêt présents dans des matrices complexes.⁸⁴ Elles sont facilement couplées avec des séparations analytiques et/ou des méthodes de détection¹¹⁰ et elles sont classées en deux grandes familles selon leur mode de rétention : celles basées sur des interactions chimiques (électrostatiques, hydrophiles, hydrophobes...) et celles basées sur des reconnaissances moléculaires.

Méthodes d'extraction basées sur des interactions chimiques

Les méthodes d'extraction sont divisées en deux sous-classes : l'extraction liquide/liquide (LLE) et l'extraction en phase solide (SPE).

La LLE permet d'extraire les analytes d'intérêt présents dans un échantillon liquide. L'échantillon est mélangé sous agitation avec une phase elle aussi liquide, non miscible à l'échantillon (phase extractante). Lorsque les analytes présentent de plus fortes affinités avec

la phase extractante, un transfert des analytes s'opère de l'échantillon vers la phase extractante.¹¹¹ La LLE a été transposée en micro-canal (μ LLE). Les avantages de la μ LLE par rapport à la LLE sont que les distances de diffusion des analytes sont plus courtes. Ceci permet donc de réaliser la μ LLE sans avoir besoin de mélanger. De plus en μ LLE, les rapports surface/volume sont plus importants, par conséquent, un plus grand rendement d'extraction peut être obtenu tout en utilisant de faibles volumes de solvant et d'échantillon.¹¹²

Miyaguchi et al.¹¹³ ont par exemple développé un système microfluidique pour extraire des amphétamines présentes dans des échantillons d'urine par μ LLE (Figure 20). La Figure 20 montre que les flux de solvant non miscible organique (phase extractante, 1-chlorobutane) et aqueux (échantillon) s'écoulent parallèlement sous l'action d'un flux hydrodynamique dans un micro-canal. Avec leur système, ils ont montré des efficacités d'extraction d'amphétamines présentes dans des échantillons réels proches de 100%.

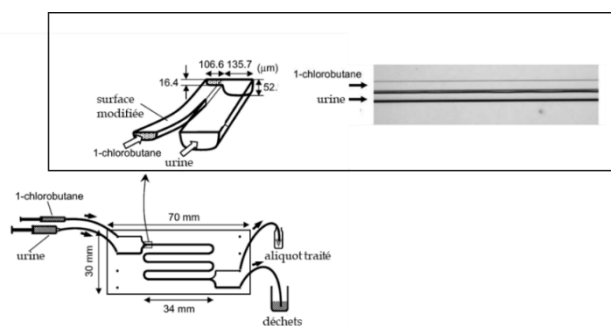


Figure 20 : Micro-extraction liquide/liquide d'amphétamines dans des échantillons d'urine dans un micro-canal. Adaptée de ¹¹³.

La SPE est aussi basée sur une différence d'affinité entre les analytes d'intérêt présents dans un échantillon et une phase. Contrairement à la LLE, la phase extractante est solide (nommée phase stationnaire). Les étapes d'une SPE sont présentées en Figure 21. Tout d'abord, la phase stationnaire est conditionnée (A) en percolant un ou des solvants. Une fois le système conditionné, l'échantillon est percolé (B), puis les interférents sont éliminés (C) par des lavages successifs avec des solvants. L'enjeu de cette étape est de conserver l'affinité des analytes d'intérêt avec la phase stationnaire tout en éliminant les interférents. Les analytes d'intérêt peuvent être ensuite élués (D) de la phase stationnaire à l'aide d'une phase mobile pour laquelle ils présentent une affinité supérieure. Le volume d'échantillon percolé est plus grand que le volume d'analytes élués permettant ainsi à la fois de purifier, d'extraire et de préconcentrer les cibles récupérées dans l'éluant.

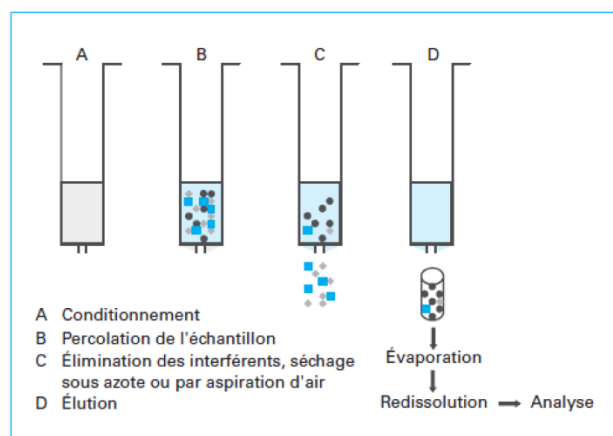


Figure 21 : Les étapes d'une extraction sur phase solide en cartouche.¹¹⁴

La micro-extraction en phase solide (μ SPE) est une méthode d'extraction qui utilise des volumes plus faibles ($<100 \mu\text{L}$ ou $<100 \text{mg}$) que l'échantillon ($>1 \text{mL}$).⁸⁴ Cela a des conséquences non négligeables sur l'efficacité de préconcentration des analytes d'intérêt. Les distances de diffusion des analytes sont plus courtes en μ SPE et la sensibilité d'extraction est plus élevée dans le cas des micro-extractions que dans le cas des macro-extractions.

Un des premiers exemples d'introduction de phase stationnaire dans un canal microfluidique comme phase extractante a été mis en place par Kutter et al.⁸⁶ dans les années 2000 (Figure 22.A). La fonctionnalisation des parois en verre de toute la longueur du micro-canal d'enrichissement a été réalisée avec de l'octadécyltriméthoxysilane, qui en réagissant avec le verre a permis d'immobiliser une phase hydrophobe C18. La phase C18 peut extraire par interaction hydrophobe des composés hydrophobes. La preuve de concept a été effectuée avec la coumarine (fluorophore neutre), qui a été préparé dans un tampon borate ($I=10 \text{mM}$, pH 8,5) contenant 15% (v/v) d'acétonitrile. Avec ce système, la coumarine a été enrichie plus de 80 fois en 4 minutes sous champ électrique (Figure 22). Son élution a été effectuée dans le tampon borate contenant 60% d'acétonitrile.

Dans cet article, la spécificité de la phase pour les composés hydrophobes n'a pas été montrée. Le problème de cette approche est que le rapport surface / volume n'est pas toujours suffisamment élevé ce qui peut limiter le rendement d'extraction et le facteur d'enrichissement.

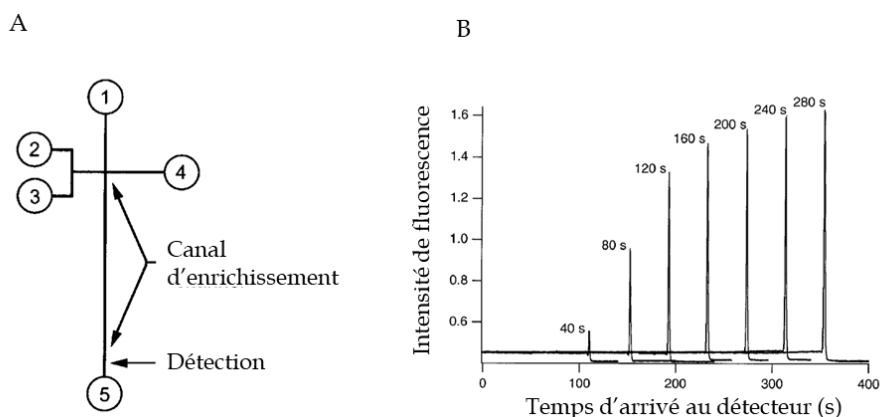


Figure 22 : Microextraction dans un micro-canal en verre fonctionnalisé par des groupements C18. (A) schéma du microsystème avec les réservoirs pour l'échantillon (1), tampon éluant contenant 60% d'acétonitrile (2), tampon de préparation des échantillons contenant 15% d'acétonitrile (v/v) (3), réservoirs poubelles pour l'échantillon (4) et les tampons (5). (B) détection de la coumarine par fluorescence après enrichissement pendant des périodes constantes dans un micro-canal. Adaptée de ⁸⁶.

Pour augmenter le rapport surface/volume, des microstructures aux motifs spécifiques peuvent être introduites dans des micro-canaux. L'introduction des microstructures spécifiques dans des micro-canaux a été opérée pour la première fois par He et Regnier¹¹⁵ en 1998. Ils ont développé la structure COMMOSS (structures de support monolithiques colocalisées) pour pouvoir opérer des séparations par électrochromatographie en micro-canal grâce à un traitement de surface de la structure par du polystyrène de sulfate (Figure 23). Ainsi ils ont montré la possibilité de séparer de la rhodamine 127 (fluorophore) dans un tel système. Cette méthode peut être employée comme technique de μ SPE.

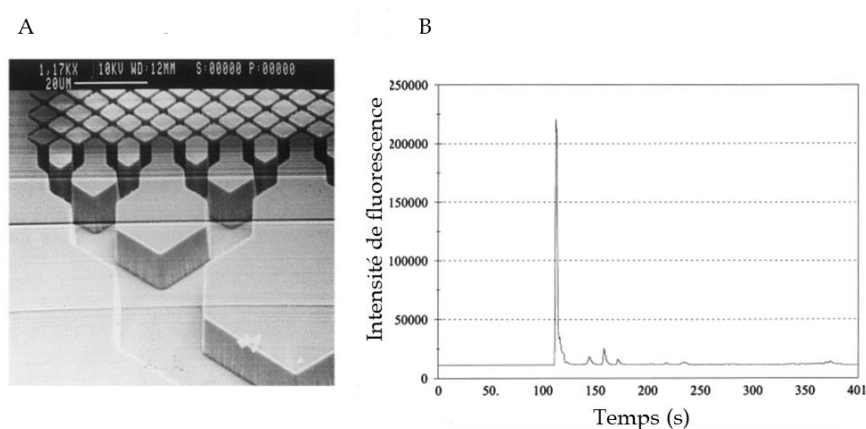


Figure 23 : (A) micrographie de la structure COMMOSS et (B) séparation de la rhodamine 127 en phase inverse dans le micro-canal COMMOSS. Adaptée de ¹¹⁵.

Pour augmenter le rapport surface/volume, des phases stationnaires à base de nano-/micro-billes peuvent être aussi utilisées. Les nano-/micro-billes insérées dans des micro-canaux peuvent être considérées comme une solution conventionnelle employée pour la μ SPE.¹¹⁶ La difficulté d'insérer des nano-/micro-billes dans des systèmes miniaturisés de manière localisée, est l'ajout d'étapes de microfabrication supplémentaires pour insérer des restrictions dans des canaux¹¹⁷ (Figure 24.A) ou des frittés¹¹⁸ (Figure 24.B) ou des micro pilliers¹¹⁹ (Figure 24.C).

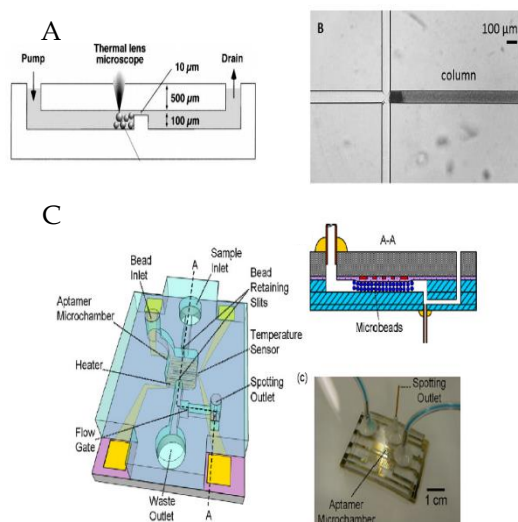


Figure 24 : Différentes méthodes d'insertion de nano-/micro-billes dans des micro-canaux. (A) billes piégées dans un micro-canal microfluidique grâce à une restriction. Adaptée de ¹¹⁷. (B) implémentation des billes dans un système en verre grâce à un fritté. Adaptée de ¹¹⁸. (C) schémas et photographie d'une puce analytique avec des pilliers pour piéger des billes. Adaptée de ¹¹⁹.

Des billes aux propriétés magnétiques avec des diamètres situés aux alentours de 3 μ m, peuvent être confinées de manière localisée dans des micro-canaux par l'utilisation d'aimants.^{120,121} Un exemple de confinement de billes magnétiques dans un micro-canal est présenté en Figure 25.

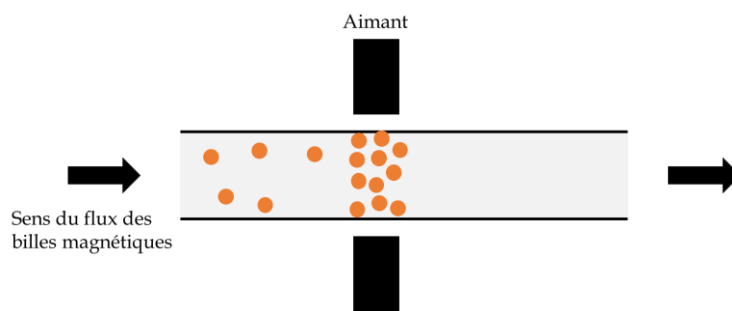


Figure 25 : Confinement magnétique de billes dans un micro-canal à l'aide d'aimants.

Une alternative aux nano-/micro-billes sont les membranes.¹¹⁷ Les membranes sont des feuilles poreuses (planes) qui peuvent extraire des analytes d'intérêt.^{47,122} Les membranes commerciales sont en polycarbonate, en nitrocellulose ou en poly(fluorure de vinylidène).^{122,123} Les membranes sont insérées physiquement entre le micro-canal et le capot du système microfluidique.¹¹⁷ L'avantage des membranes par rapport aux nano-/micro-billes est qu'elles peuvent être formées *in situ* par condensation¹²⁴ ou par électrofilage^{125,126}, par exemple. Les membranes comme pour les nano-/micro-billes ont un rapport surface/volume important.⁴⁷ Elles sont aussi utilisées comme filtre dans les micro-canaux. Cependant elles peuvent être une source de fuites de liquides dans les systèmes miniaturisés, ce qui rend leur utilisation complexe⁴⁷.

Les membranes commerciales sont de plus en plus remplacées par des membranes en hydrogel (gel constitué d'eau) formées *in situ* par photo réticulation à l'aide de masque. Les hydrogels les plus régulièrement utilisés sont en poly(éthylène glycol) (PEG) ou en poly(éthylène glycol) diacrylate (PEGDA).¹²⁷ L'avantage de ces membranes est qu'elles sont biocompatibles et la présence d'eau dans leurs pores favorise la non-détérioration des molécules biologiques. De plus, la taille des pores des hydrogels est contrôlable par l'ajout d'agent porogène (PEG, glycérol, sels...).^{128,129} Ils sont transparents aux UVs et ont une faible auto-fluorescence. Le principal inconvénient des hydrogels est leur fragilité, ce qui limite l'utilisation de champ électrique ou de flux hydrodynamique trop élevés.⁴⁷

Les monolithes sont très régulièrement utilisés comme phase stationnaire d'extraction dans des micro-canaux. Le mot monolithe provient du grec ancien *monolithos*, dont *monos* signifie seul et *lithos*, pierre. En chimie analytique, le terme de monolithe désigne un matériau solide organique ou inorganique, macro- ou méso- -poreux. Les macropores (>50 nm) fonctionnent comme des canaux d'écoulement pour les solvants et les échantillons. Les mésopores (2 à 50 nm), contrairement aux macropores augmentent considérablement le rapport surface/volume. Ils sont donc plus adaptés pour l'extraction de composés d'intérêt.¹¹⁶ Les premiers travaux sur l'insertion des monolithes en systèmes miniaturisés datent des années 2000. Yu et al. ont photopolymérisé dans un micro-canal vinyliqué un mélange d'EDMA (éthylène diméthacrylate), de BMA (butyl méthacrylate). Ils ont montré la possibilité de concentrer d'un facteur supérieur à 10^3 des terapeptides et des protéines.¹²⁸ Bhattacharyya et Klapperich ont photopolymérisé un monolithe de méthyle méthacrylate (MMA) dans un micro-canal en COC.¹³⁰ Ce monolithe a permis de préconcentrer des acides ribonucléiques messagers (biomarqueurs de cancer) avec une efficacité d'extraction de 80%.

Une famille de monolithe, les sol-gels, est de plus en plus utilisée comme phase extractante dans des micro-canaux. Après la préparation du « sol » (c'est-à-dire un monomère de métal alcoolate dans un solvant aqueux ou organique acide ou basique), le « gel » est formé par hydrolyse, puis par évaporation du solvant et par polymérisation.⁴⁷ Les sol-gels sont des matériaux flexibles. En général, ils sont transparents avec une faible auto-fluorescence. Il est possible d'encapsuler des molécules biologiques dans ces matériaux.^{131,132} À l'heure actuelle, la principale limitation de l'utilisation des sol-gels comme phase solide d'extraction (comme pour la plupart des monolithes) dans des micro-canaux est la reproductibilité des efficacités d'extraction d'un lot à l'autre.^{9,133}

Pour améliorer la reproductibilité de la polymérisation *in-situ* d'un sol-gel dans un micro-canal, Wolfe et al. ont ajouté des billes de silice (15 µm de diamètre) non fonctionnalisées à la solution de sol (orthosilicate de tétraéthyle, (TEOS) hydrolysé en présence d'acide nitrique).¹³⁴ Ils ont ainsi montré que l'efficacité d'extraction d'ADN est reproductible pour une phase extractante où les billes sont encapsulées dans un sol-gel (Tableau 5). De plus, cette phase extractante conduit à un rendement d'extraction supérieur aux rendements d'extraction obtenu avec la phase extractante en sol-gel seule ou la phase extractante constituée uniquement des billes (Tableau 5).

Tableau 5 : Exemple de systèmes miniaturisés pour l'extraction d'ADN : comparaison des rendements d'extraction de différentes phases extractantes en sol-gels. Adapté de ¹³⁴.

Phase solide d'extraction	Rendements d'extraction (%)	Déviations standard (%)	Variance (%)
Billes de silice non fonctionnalisées	57,1	43,1	75,5
Sol-gel (TEOS)	33,2	20,2	60,8
Billes de silice non fonctionnalisées encapsulées dans le sol-gel (TEOS)	70,6	2,15	3,05

Méthodes d'extraction basées sur la reconnaissance moléculaire

Plusieurs méthodes de micro-extractions classiques dans des micro-canaux peuvent créer des interactions non désirables avec les entités chimiques/biologiques présentes dans des matrices. Ceci a conduit au développement de méthodes de micro-extraction basées sur la

reconnaissance moléculaire.¹³⁵ Ces stratégies utilisent soit des polymères à empreinte moléculaire (MIP) soit des ligands spécifiques.

Les polymères à empreintes moléculaires sont des polymères à cavités spécifiques.¹³⁶⁻¹³⁹ Les interactions qui permettent d'extraire avec un MIP la molécule d'intérêt des autres constituants présents dans une matrice, sont des interactions fortes non covalentes.¹³⁶⁻¹³⁹ La polymérisation du MIP s'effectue en présence de monomères, d'un agent réticulant, d'un solvant porogène et de la molécule d'intérêt pour former les cavités spécifiques.^{136,139} Il est nécessaire de choisir des monomères qui possèdent des affinités chimiques avec la molécule d'intérêt pour former les cavités spécifiques. L'éluion de la molécule de la cavité est effectuée avec des solvants présentant des affinités plus importantes avec la molécule que la cavité. Les étapes de fabrication d'un MIP sont présentées en Figure 26. Les MIP sont très facilement synthétisables et peu chers. Cependant, un certain pourcentage de molécules d'intérêt ayant servi à créer les cavités reste piégé dans la structure du MIP même après lavage provoquant ainsi des efficacités d'extraction non reproductibles d'un lot à l'autre. De plus, les MIP consomment d'importants volumes de cibles pour les fabriquer. Pour éviter ceci, des molécules ayant des structures proches de la molécule cible sont généralement utilisées pour fabriquer les MIP, ce qui les rend moins spécifiques.¹³⁸

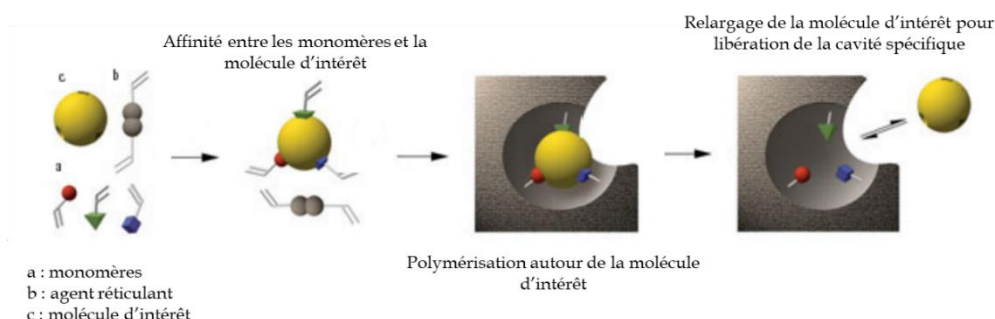


Figure 26 : Principes et étapes de fabrication d'un polymère à empreinte moléculaire. Adaptée de ¹³⁹.

Pour pallier les inconvénients des MIP, des ligands spécifiques peuvent être utilisés. En chimie analytique, un ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une cible d'intérêt par des interactions non covalentes. Ils sont utilisés en micro-canal pour préconcentrer ou détecter des cibles d'intérêt. Ils peuvent être en solution, immobilisés sur un substrat ou encore encapsulés dans des monolithes. Les premiers ligands utilisés en chimie analytique sont les anticorps. Un anticorps est une glycoprotéine qui permet de capter

spécifiquement une cible d'intérêt.¹⁴⁰ Il est possible mais complexe de modifier les anticorps par des marqueurs (fluorescent, radioactif...) pour les détecter ou encore par des groupements chimiques réactifs permettant leur greffage à la surface de substrat. Les anticorps sont de plus en plus remplacés par des oligonucléotides synthétisés, nommés aptamères.

Les aptamères miment la sélectivité et la spécificité des anticorps sauf que contrairement à ses derniers ils sont sélectionnés par une méthode *in vitro* évitant l'utilisation d'animaux ou de cellules.^{9,133} Ils peuvent être aussi facilement modifiés par des marqueurs¹⁴¹⁻¹⁴⁴ ou des groupements chimiques réactifs pendant leur synthèse^{141,145}. Contrairement aux anticorps, cette modification est « site dirigé ». De plus, les aptamères sont régénérables lorsque leur structure est modifiée suite à une exposition à de hautes températures ou à des agents dénaturants.^{8,9} La régénération s'effectue dans des conditions favorables à l'interaction. L'interaction entre un aptamère et sa cible peut être modifiée par un changement de pH, de nature des ions présents, de force ionique et de température ou encore par l'ajout de solvants. Comme les aptamères sont synthétisés et purifiés sous conditions dénaturantes, cela permet d'obtenir une plus grande reproductibilité et un degré de pureté plus élevé que pour les anticorps.¹¹ De plus, les aptamères ont une spécificité plus élevée que les anticorps.¹⁰ Leurs affinités avec leur cible sont comparables aux affinités obtenues avec les anticorps, avec des constantes de dissociation allant du nano au pico molaire.¹⁴⁶ Les aptamères présentent une meilleure stabilité temporelle que les anticorps, et peuvent être transportés à température ambiante.¹¹ Les systèmes analytiques miniaturisés à base d'aptamères sont donc plus facilement transportables et réutilisables que ceux à base d'anticorps.

Quel que soit le ligand spécifique utilisé, il est envisageable de l'immobiliser à la surface d'un substrat, d'une surface nanoparticulaire ou encore dans une phase monolithique.⁴⁷ L'adsorption ou le greffage de ligands sur des surfaces est le premier choix à cause de leur simplicité de mise en œuvre.⁴⁷ Les billes (polystyrène, silice, agarose, ou ferromagnétique...) ont un rapport surface/volume plus important que les surfaces planes ce qui permet d'immobiliser un plus grand nombre de ligands.⁴⁷ Contrairement aux surfaces planes, les structures à trois dimensions offrent plus d'avantages, avec un plus grand nombre de sites d'immobilisation (Figure 27).⁴⁷ Par exemple, il a été estimé que des gels offrent 100 à 1000 fois plus de sites d'immobilisation que les surfaces.¹⁴⁷ De plus, la longueur de diffusion entre un ligand encapsulé dans un monolithe et sa cible est réduite. Ainsi, de meilleures

efficacités et sensibilités sont généralement obtenues dans les systèmes de micro-extraction à trois dimensions.

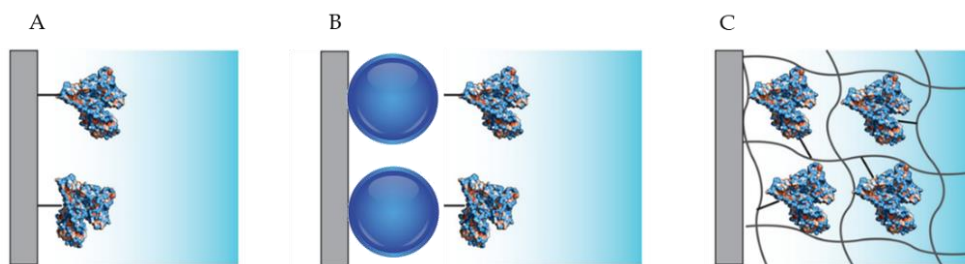


Figure 27 : Représentation schématique de l'immobilisation de ligands spécifiques. (A) Immobilisation sur une surface plane, (B) sur une surface nanoparticulaire et (C) dans une structure monolithique. Adaptée de ⁴⁷.

Différentes stratégies d'immobilisation de ligands en micro-canal ont été développées ces dernières années.⁴⁷ Un procédé d'immobilisation spécifique repose sur divers facteurs notamment les propriétés physico-chimiques de surface du substrat à fonctionnaliser, la matrice de l'échantillon à analyser, les propriétés du ligand (longueur de chaîne...) et la composition de l'électrolyte de séparation. De plus, après immobilisation du ligand, sa conformation doit être toujours favorable à l'interaction avec sa cible. Les méthodes d'immobilisation des ligands peuvent être classées en quatre catégories : (i) adsorption, (ii) liaisons covalentes (iii) immobilisation par bio affinité et (iv) encapsulation (Figure 28).⁴⁷ Les ligands peuvent être soit directement immobilisés à la surface des micro-canaux soit sur les phases stationnaires décrites dans la partie précédente.

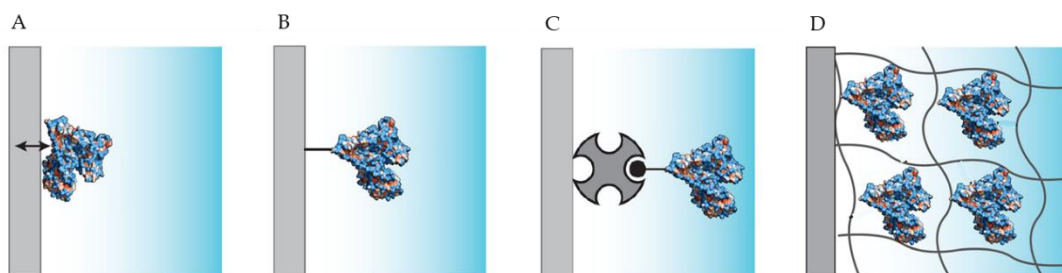


Figure 28 : Stratégies d'immobilisation de ligands dans des micro-canaux par (A) adsorption, (B) formation de liaison covalente, (C) immobilisation par bio affinité et (D) encapsulation dans une structure monolithique. Adaptée de ⁴⁷.

L'adsorption des ligands sur une surface fait intervenir des interactions (hydrophile, hydrophobe, hydrogène et/ou de Van Der Waals...) entre le ligand et la surface du micro-canal. Il s'agit d'une technique d'immobilisation très simple et très rapide qui n'utilise

généralement pas de solvant toxique. L'immobilisation de ligands se réalise par incubation à la surface.⁴⁷ Très souvent, la quantité de ligands adsorbés sur une surface est faible et l'adsorption n'est pas stable contrairement aux méthodes d'immobilisation par formation de liaisons covalentes. De plus, comme l'orientation des ligands adsorbés est aléatoire, il est difficile d'obtenir des efficacités d'extraction reproductibles d'un lot à l'autre.⁴⁷

Contrairement à l'adsorption, l'immobilisation des ligands par formation de liaisons covalentes est plus stable et plus reproductible d'un lot à l'autre.⁴⁷ Pour immobiliser un ligand, il peut être nécessaire de le modifier chimiquement par un groupement réactif chimique. Les parois des micro-canaux chimiquement inertes doivent être généralement traitées pour intégrer des groupements chimiques réactifs capables de former des liaisons covalentes avec le ligand. Cette méthode a un inconvénient majeur : les ligands ainsi immobilisés sont bloqués dans une position qui peut affecter leurs interactions avec la cible d'intérêt.

L'immobilisation des ligands par bio affinité exploite les interactions spécifiques qui existent dans la nature telles que les interactions entre un anticorps et son antigène. L'immobilisation des ligands par des interactions par bio affinité est plus avantageuse que l'immobilisation par adsorption et par formation de liaisons covalentes. En effet, les interactions par bio affinité sont relativement fortes et hautement spécifiques. De plus, les interactions par bio affinité peuvent être inversées par un changement de conditions expérimentales, telles que la composition de l'électrolyte de séparation ou la température, par exemple.⁴⁷ Une des méthodes les plus utilisées pour immobiliser des ligands par bio affinité est l'utilisation de l'avidine (glycoprotéine) et d'une biotine (vitamine B). L'avidine possède une forte affinité pour la biotine (constante de dissociation égale à 10^{-15} M)¹⁴⁸. Les interactions non covalentes entre l'avidine et la biotine sont insensibles au pH, à la température et aux agents dénaturants.⁴⁷ Généralement, le ligand est modifié en bout de séquence par une biotine et la surface des micro-canaux (en verre, ...) sont recouverts par de l'avidine par adsorption. L'adsorption de l'avidine à la surface des micro-canaux ajoute une contrainte au système, car celle-ci peut se désorber au cours du temps. Les méthodes d'immobilisation par bio affinité présentent le même inconvénient que les méthodes d'immobilisation par formation de liaisons covalentes : le ligand est bloqué dans une position qui peut ne pas être favorable à l'interaction avec sa cible.⁴⁷

Pour améliorer les interactions cible-ligand, des espaceurs, généralement des chaînes carbonées, peuvent être incorporés à la structure des ligands. L'espaceur est précédé du groupement réactif qui permet leur immobilisation par formation de liaison covalente ou par bio affinité à la surface du système analytique. L'espaceur confère un certain degré de liberté

de repliement au ligand pouvant ainsi améliorer les interactions chimiques avec sa cible.^{149,150} Lao et al., ont montré qu'un aptamère modifié par un groupement amino immobilisé sur une surface fonctionnalisée par des groupements époxy, présentent une meilleure affinité pour sa cible (la thrombine, une enzyme) lorsqu'il possède un espaceur permettant ainsi d'obtenir des sensibilités d'analyse 100 à 1000 fois plus importantes que lorsqu'il ne possède pas d'espaceur.¹⁵⁰

Pour conserver l'affinité chimique entre un ligand et sa cible sans l'utilisation d'espaceur qui rajoute des étapes et des coûts de production non négligeable, les ligands peuvent être encapsulés dans des structures en 3D car ils ne sont pas bloqués dans une position définie.⁴⁷

À l'heure actuelle, le principal enjeu est de détecter et de quantifier un ensemble de biomarqueurs de natures différentes présents en faible concentration dans des échantillons biologiques en une seule analyse en évitant des effets de matrice. Pour améliorer les performances analytiques des LOAC, des phases d'extraction ont été introduites dans des micro-canaux. Il a été montré que celles qui permettent d'avoir les plus grandes spécificités envers leur cible sont celles à base de ligands et notamment celles à base d'aptamères. L'introduction d'une phase d'extraction en micro-canal doit être la plus simple et la moins chère possible. De plus, afin d'avoir toutes les étapes analytiques dans un même micro-système, la phase d'extraction doit être fabriquée dans une zone délimitée du micro-canal. Enfin l'extraction des composés doit être reproductible d'un lot à l'autre et stable dans le temps, ce qui reste encore compliqué dû aux procédés de microfabrication qui peuvent parfois ne pas être reproductibles, le traitement de surface des micro-canaux (plasma, silanisation...) qui n'est pas toujours stable dans le temps et la fabrication des phases extractantes qui n'est pas toujours reproductible et robuste.

I.4. Les aptamères comme agent sélectif pour la préconcentration dans des systèmes miniaturisés pour le diagnostic

Les aptamères ont été découverts il y a plus de deux décennies. Cette découverte menée par de nombreuses équipes de recherche académiques s'est conclue par une industrialisation des aptamères et à l'approbation de six d'entre eux en 2017 par la FDA¹⁵¹ pour des applications thérapeutiques mais aucun pour le traitement de cancer. Les aptamères sont concurrencés par

les anticorps, car en 2017, 73 d'entre eux ont été approuvés par la FDA, dont 34 dirigés contre des biomarqueurs de cancer.¹⁵² Le nombre nettement supérieur d'anticorps approuvés par la FDA peut s'expliquer par le fait que les anticorps ont été découverts bien avant les aptamères, en 1891 par Paul Ehrlich. Les aptamères contrairement aux anticorps sont sélectionnés par une méthode *in vitro*^{9,133} et sont facilement synthétisables et modifiables par des groupements chimiques et présentent de meilleures spécificités,¹⁴¹⁻¹⁴⁵ ce qui les rend plus intéressants pour le développement de LOACs à base de ligands spécifiques pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de maladie.

I.4.1. Structure des aptamères

Les aptamères sont de courts segments d'acides nucléiques de quelques dizaines de nucléotides, synthétisés par voie chimique sous forme de simple brin. Les oligonucléotides sont composés de trois motifs chimiques répétitifs qui sont un sucre, un désoxyribose (pour l'ADN) ou un ribose (pour l'ARN), un groupement phosphate et un hétérocycle aromatique (appelé base azotée qui est la base nucléique). Il existe quatre bases pour l'ADN : adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T) et quatre bases pour l'ARN : adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et uracile (C) (Figure 29).

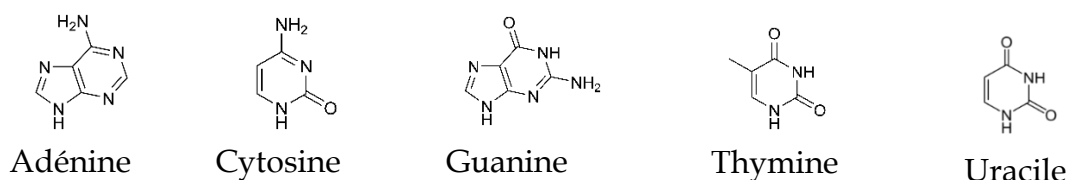


Figure 29 : Les quatre bases de l'ADN (adénine, cytosine, guanine et thymine) et les quatre bases de l'ARN (adénine, cytosine, guanine et uracile).

Les groupements phosphates confèrent aux acides nucléiques une charge négative à pH neutre. Par conséquent, les oligonucléotides sont des oligo-anions et ils possèdent des groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes (Figure 30.A).¹⁵³ La séquence des bases d'un oligonucléotide est la structure primaire (Figure 30.B). Les sites donneurs/accepteurs de ponts hydrogènes et de la base azotée des oligonucléotides peuvent s'apparier formant des paires A-T (ADN), A-U (ARN) ou G-C (ADN ou ARN) (Figure 30.C). Cet appariement provoque le repliement du brin d'ADN ou d'ARN qui forme une structure tridimensionnelle appelée structure secondaire (Figure 30.D).¹⁵³ La structure tertiaire d'un oligonucléotide est aussi une structure tridimensionnelle due au repliement du brin d'ADN

ou d'ARN (Figure 30.E). C'est ce repliement qui confère la fonctionnalité à l'oligonucléotide par la formation d'un site actif (Figure 30.F).

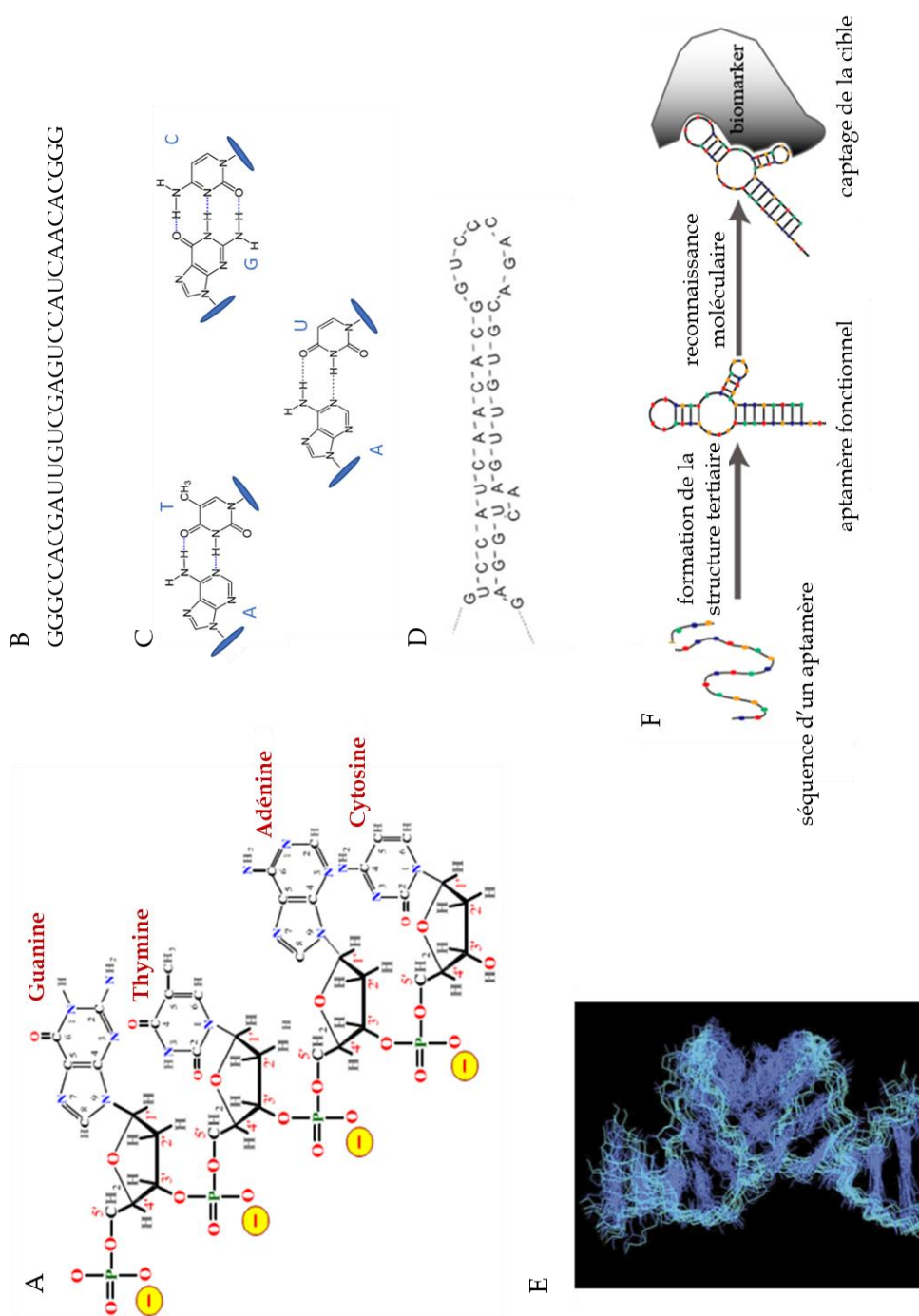


Figure 30 : (A) Structure d'un aptamère. En rouge sont représentés les sites donneurs et en bleu les sites accepteurs de liaisons hydrogènes. Adaptée de ¹⁵⁴. Exemple de (B) séquence primaire, (D) secondaire et (E) tertiaire d'un aptamère. Adaptée de ¹⁵³. (C) les paires adénine-thymine (A-T), guanine-cytosine (G-C) et adénine-uracile (A-U). (F) capture par affinité chimique d'une cible par un aptamère. Adaptée de ¹⁵⁵.

I.4.2. Évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX)

Dans les années 90, trois laboratoires indépendants ont développé la méthode SELEX. Il s'agit d'une méthode combinatoire de sélection et d'amplification *in vitro* pour isoler des séquences spécifiques d'acides nucléiques capables de se lier à des cibles avec de grandes affinités et spécificités.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Le groupe de Joyce a utilisé une procédure de mutation, de sélection et d'amplification *in vitro* pour isoler des ARN capables de cliver l'ADN à partir de ribozymes naturels.¹⁵⁶ Puis le groupe de Gold a décrit le processus expérimental visant à identifier la séquence reconnue par l'ADN polymérase T4.¹⁵⁸ Le processus de sélection *in vitro* a alors été breveté sous l'acronyme de SELEX. Enfin, l'équipe de Szostak a décrit une procédure de sélection *in vitro* permettant d'isoler des molécules capables d'être spécifiquement reconnues par les aptamères.¹⁵⁷

Le processus du SELEX comporte plusieurs cycles alternant la sélection des séquences d'aptamères et leur amplification par PCR. La méthode PCR est une méthode d'amplification *in vitro* qui permet de dupliquer un grand nombre de séquences d'ADN ou d'ARN connues, à partir d'une plus faible quantité d'acides nucléiques. Le principe du SELEX est décrit en Figure 31. Tout d'abord, une librairie combinatoire 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, permettant leur amplification par PCR. Une première sélection est effectuée dans la population de la librairie d'oligonucléotides. Cette sélection repose sur l'affinité avec la cible choisie. Les candidats potentiels sont isolés des autres séquences par une méthode de séparation, puis elles sont amplifiées. Une nouvelle population, enrichie en candidats potentiels, est alors obtenue et subit un nouveau cycle de sélection/amplification. Ces cycles sont réitérés de 6 à 20 fois permettant ainsi un enrichissement progressif de la population ayant une interaction avec la cible. Un cycle de sélection peut prendre jusqu'à une demi-journée.¹⁵⁹ La population est par la suite réduite, pour obtenir uniquement quelques séquences d'aptamères.

Une fois les séquences identifiées par des techniques classiques de génie génétique (clonage, séquençage...), elles 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.^{8,9,160}

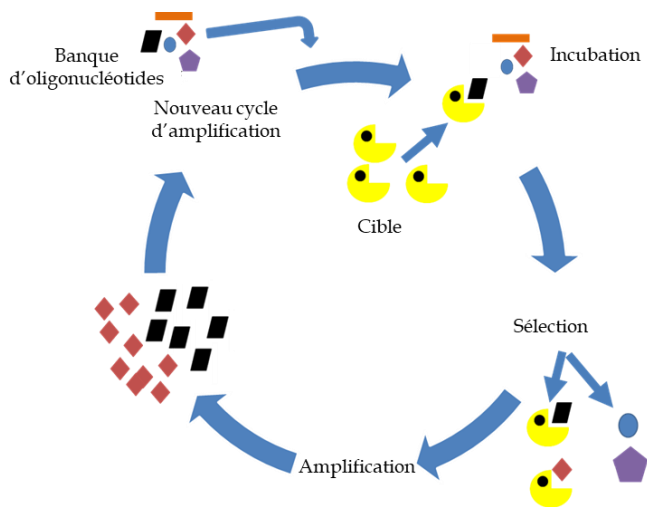


Figure 31 : Principe du procédé SELEX.

À l'heure actuelle de nombreuses séquences d'aptamère ont été sélectionnées entre 2007 et 2017 contre des biomarqueurs de cancer avec des constantes de dissociation allant de 0,11 à 169 nM comme le signale le Tableau 6.

Composition de la librairie d'oligonucléotides

La librairie combinatoire d'oligonucléotides est constituée soit d'ARN, soit d'ADN. L'un et l'autre possèdent des avantages comme des inconvénients.

Les oligonucléotides ARN ont été les premiers à être utilisés.^{156,158} Ils conduisent généralement à des aptamères présentant des affinités plus élevées que les ADN car, ils ont une plus grande capacité à adopter une large variété de conformations que les ADN. Cependant les ARN présentent une moins bonne stabilité temporelle que les ADN. De plus, ils sont très sensibles à la dégradation par des nucléases (enzymes qui clivent les liaisons phosphodiester) présentes dans des échantillons biologiques.¹¹ Par conséquent, les ADN sont plus adaptés pour une utilisation dans des systèmes de diagnostic et c'est pourquoi la majorité des aptamères sélectionnés contre des biomarqueurs sont des ADN (Tableau 6). Enfin, la sélection d'aptamères de type ARN nécessite l'ajout d'étapes de transcription lors du procédé SELEX, permettant ainsi l'amplification de l'ARN.

Tableau 6 : Liste non-exhaustive d'aptamères sélectionnés pour des biomarqueurs de cancers.^{37,161,162}

Nom de l'aptamère	ADN/ARN	Biomarqueur	Cancer	Constante de dissociation (nM)	Ref/date
-	ARN	CD30	Lymphome	0,11	163/2009
-	ARN	CEA	Plusieurs cancers	-	161/2012
41t	ADN	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	-	1	164/2012
A32	ADN	Récepteur de l'EGF	Gliome	0,62	165/2017
AS1411	ADN	Nucléoline	Plusieurs cancers	169	166/2009 167/2012 168/2012 169/2012 170/2014 171/2015 172/2015 173/2016 174/2016
KCHA10	ADN	Cellules HCT 116	Colon	21,3	175/2012 37/2012
KDED 2a-3	ADN	Cellules DLD-1	Colon	29,2	175/2012 37/2012
MUC-1	ADN	Mucine 1	Adénocarcinome	27	166/2009
S11e	ADN	Cellules A549	Foie	46,2	176/2015
S6	ADN	Cellules A549	Poumon	28,2	177/2013
Sgc8	ADN	Protéine-tyrosine kinase 7	Leucémie	0,8	36/2009 35/2009 178/2011 164/2012 175/2012 179/2012 180/2016 181/2016 182/2017
Sgd5	ADN	Cellules Toledo	Lymphome	70,8	35/2009
TD05	ADN	Gène qui encode la région C de la chaîne lourde mu	Lymphome de Burkitt	74,7	183/2007 184/2009 185/2010 175/2012
TE02	ADN	Cellules Ramos	Lymphome de Burkitt	0,76	183/2007 184/2009
TE17	ADN	Cellules CCRF-CEM	Leucémie	675	164/2012
TLS11a	ADN	Cellules HepG2	Carcinome hépatocellulaire	7	142/2017 186/2017 187/2015
TTA1	ADN	Ténacine	Plusieurs cancers	5	179/2012

Méthodes de tri

Une des étapes critiques du procédé SELEX est le tri entre les oligonucléotides présentant une certaine affinité avec la cible de ceux qui n'ont pas ou qui ont moins d'affinité avec la cible. Pour cela, plusieurs méthodes séparatives ont été utilisées comme la filtration sur membrane, la chromatographie d'affinité, la centrifugation, l'électrophorèse sur gel, l'électrophorèse capillaire...¹⁸⁸

I.4.3. Application des aptamères comme ligands d'extraction dans les dispositifs miniaturisés analytiques pour le diagnostic

Dans cette partie, les quelques applications dans la littérature scientifique de systèmes miniaturisés constitués d'une ou de plusieurs phase(s) d'extraction à bases d'aptamères pour le diagnostic sont présentées dans ce paragraphe. L'originalité de chacun des systèmes est mise en avant ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients.

En 2009, Phillips et al.³⁶ ont été les premiers à fonctionnaliser la surface des micro-canaux par des aptamères pour préconcentrer des biomarqueurs de cancer (cellules CEM). Les aptamères anti-cellules CEM modifiés par une biotine ont été immobilisés dans un micro-canal en verre traité par de l'avidine. Ils ont montré qu'avec ce système, l'efficacité d'extraction des cellules tumorales circulantes (cellules qui se déplacent avec le sang depuis une tumeur en développement) est supérieure à 80%. La même année, le même groupe de recherche a optimisé leur LOAC pour extraire, cette fois-ci, trois biomarqueurs en une seule analyse.³⁵ Par un jeu de contrôle de fluides entre les différents réservoirs sous flux hydrodynamique, ils ont pu greffer les aptamères de manière localisée dans un micro-canal en serpentin par bio-affinité. Avec un tel système, ils ont montré la possibilité d'enrichir plus de 130 fois des cellules tumorales circulantes : TD05, CEM et Toledo.³⁵ Ce microsystème prometteur n'a cependant jamais été testé avec des échantillons réels.

Une variation du premier système microfluidique développé par Phillips et al. a été développée par Sheng et al.³⁷ pour préconcentrer des cellules CEM. Les aptamères modifiés par une biotine ont été cette fois-ci immobilisés sur des piliers en verre recouvert d'avidine. L'augmentation du rapport surface/volume a montré la possibilité d'extraire 95% de cellules CEM, soit 15% de plus que pour le système développé par Phillips et al.³⁶

À la place des piliers Shen et al.³⁸ ont utilisé des nanofils en silicium comme support d'immobilisation des aptamères dirigés contre des cellules tumorales circulantes. Le système et son principe sont explicités en Figure 32. Les nanofils ont été recouverts par de la streptavidine (protéine) pour immobiliser les aptamères modifiés par une biotine (immobilisation par bio-affinité). Une fois les cellules extraites d'un échantillon de sang, les nanofils de silicium ont été traités par une nucléase afin de digérer les aptamères et permettant ainsi d'éluer les cellules. Leur système microfluidique a permis d'extraire 75% des cellules tumorales circulantes présentes dans 1 mL de sang. L'inconvénient de ce système est qu'ils éluent les cellules en détériorant les aptamères rendant ainsi leur système microfluidique non réutilisable.

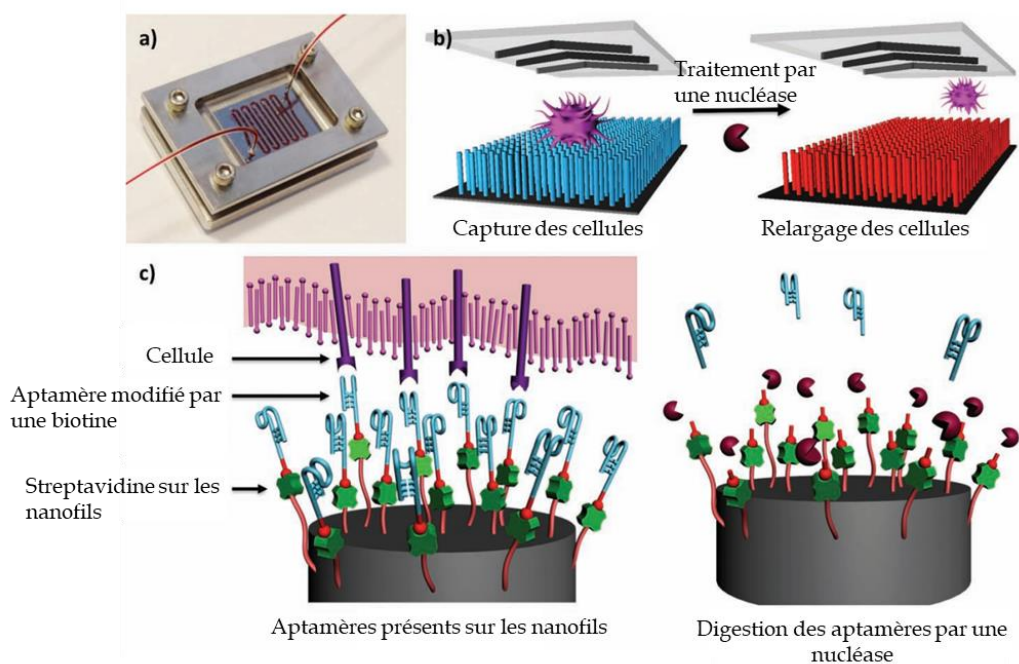


Figure 32 : (A) Photographie du système microfluidique à base d'aptamères immobilisés sur des nanofils en silicium. (B) Vue en coupe du micro-canal. C : Principe de la capture et du relargage des cellules tumorales circulantes. Adaptée de ³⁸.

Nguyen et al.¹⁸⁹ ont développé un système microfluidique réutilisable en PDMS à base d'aptamères pour extraire de l'adénosine monophosphate cyclique (intermédiaire dans l'action des neurotransmetteurs ou des hormones) présente dans des échantillons artificiels. Le système est constitué d'une micro-chambre d'extraction contenant les aptamères greffés sur des micro-billes d'agarose. Pour contenir les micro-billes, des restrictions ont été intégrées dans la chambre. Les billes (50-80 μm de diamètre) ont été recouvertes de streptavidine pour greffer par bio affinité les aptamères modifiés par une biotine. Pour la première fois, il a été

montré la possibilité de relarguer les cibles par un changement de température dans la micro-chambre. De plus, ils ont aussi montré la possibilité de régénérer les aptamères par un changement de température de la micro-chambre, ce qui permet de réutiliser le système microfluidique.¹⁸⁹ La méthode de capture, de relargage et de régénération des aptamères par un contrôle de température a été repris par Koh et al.¹⁶¹ pour détecter un biomarqueur de cancer (CEA). La procédure de capture et de relargage du CEA est présentée en Figure 33. Ils ont montré la spécificité de leur extraction grâce à l'analyse d'échantillons réels (sérum humain de patients).

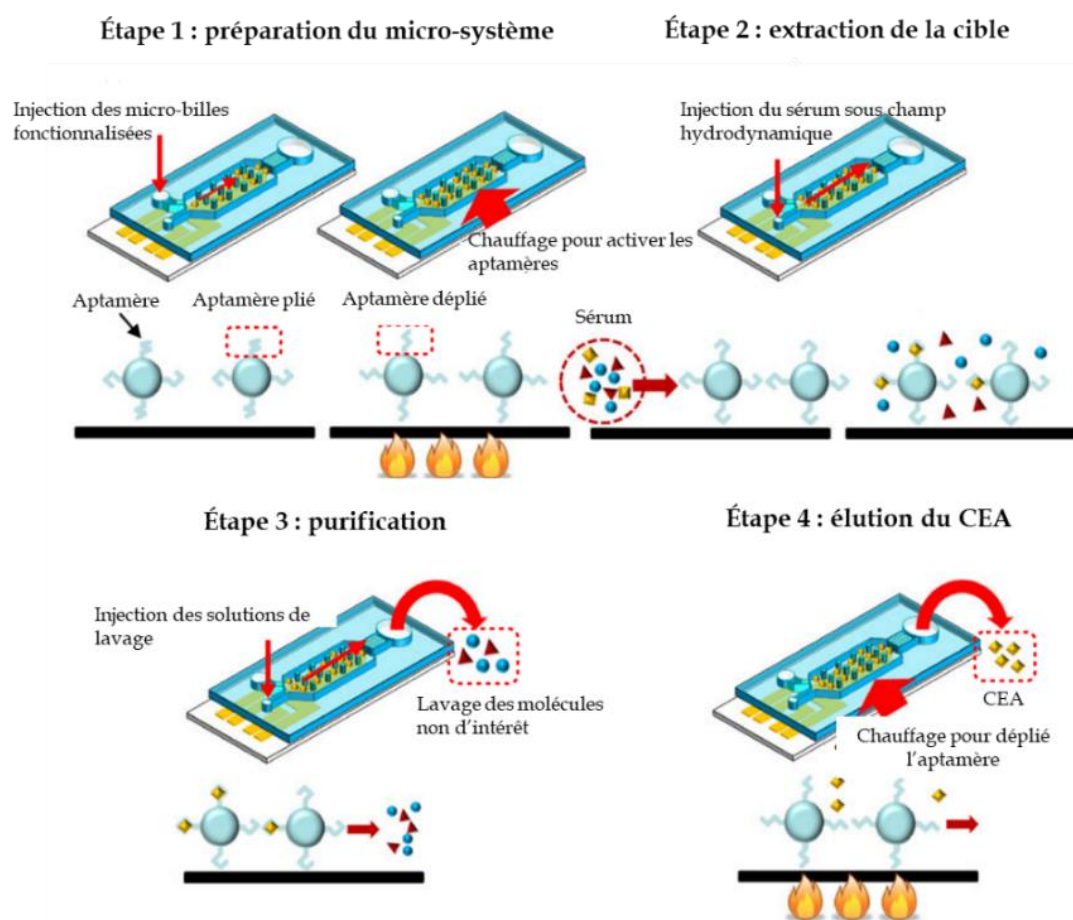


Figure 33 : Étapes de la procédure d'extraction et de relargage de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA, biomarqueur de cancer) sous contrôle de température, dans un microsystème à base d'aptamères. Les échantillons ont été préparés dans un tampon de bicarbonate d'ammonium (50 mM de force ionnique, pH 7,8). La solution de lavage est le même tampon de bicarbonate d'ammonium. Adaptée de ¹⁶¹.

Jusqu'à présent les systèmes microfluidiques présentés immobilisent les aptamères sur des surfaces. Or, nous avons vu que l'encapsulation de ligands dans des structures en trois

dimensions permet de conserver leur affinité envers leur cible, car ils ne sont pas bloqués dans une conformation et permettent d'en immobiliser un plus grand nombre.¹³²

Récemment Perréard et al.,^{131,132} ont développé une stratégie d'encapsulation d'aptamères modifiés par un marqueur fluorescent dans un sol-gel polymérisé dans des micro-canaux en PDMS-verre prétraités par plasma à dioxygène pour préconcentrer des polluants présents dans des eaux. Cette méthode consiste à polymériser directement dans des micro-canaux hydroxylés, un sol-gel dans le but d'encapsuler des aptamères dans ses pores. La présence des groupements fonctionnels -OH a permis de former des liaisons covalentes Si-O-Si entre les parois du micro-canal et le sol-gel. Des images prises du système par microscopie optique et par fluorescence sont présentées en Figure 34, montrant la présence du sol-gel dans un micro-canal (Figure 34.A) et la présence d'aptamères via un signal de fluorescence (Figure 34.B).

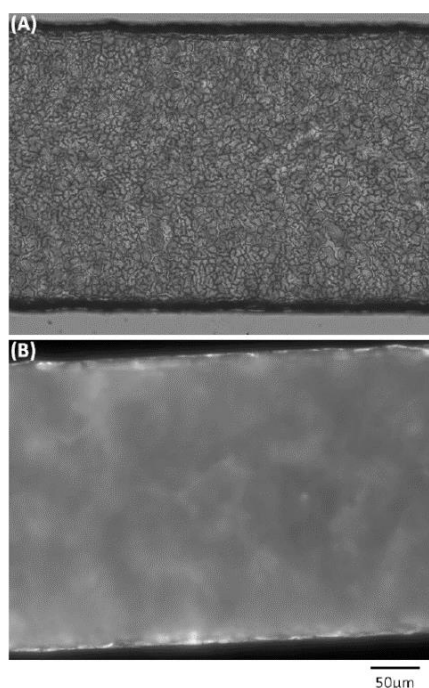


Figure 34 : Images d'un micro-canal en PDMS-verre fonctionnalisé par des aptamères encapsulés dans un sol-gel. (A) caractérisation par microscopie optique et (B) caractérisation par microscopie à fluorescence du micro-canal.¹³¹

I.4.4. Conclusion

Les aptamères présentent de nombreux avantages : résistant à une large gamme de température, régénération facile, modification de leur séquence à une position définie par des

groupements chimiques réactifs ou des marqueurs. Ils peuvent être immobilisés suivant différentes stratégies dans des micro-canaux : adsorption, formation de liaisons covalentes, interaction par bio affinités ou encore encapsulation dans un monolithe. Dans les exemples trouvés dans la littérature, les aptamères sont généralement immobilisés sur des surfaces traitées, par bio affinité. Or cette méthode d'immobilisation présente des inconvénients par rapport à l'encapsulation : aptamère bloqué dans une configuration qui ne peut pas être favorable à l'interaction avec sa cible et nécessité de fonctionnaliser la surface pour qu'elle soit recouverte généralement d'avidine. De plus, parmi les méthodes de fonctionnalisation présentées ci-dessus, très peu sont des méthodes de fonctionnalisation localisées, ce qui empêche l'intégration des autres étapes d'analyses dans un seul LOAC.

Le choix du matériau pour fabriquer des micro-canaux est primordial pour l'immobilisation localisée des aptamères. L'immobilisation d'aptamères sur des surfaces en verre, en silicium ou encore en PDMS nécessite généralement des modifications de surfaces des substrats par des traitements (plasma, silanisation...) longs, qui augmentent les coûts et la complexité de la microfabrication des LOACs. De plus, les surfaces traitées ne conservent pas toujours leurs propriétés physico-chimiques dans le temps. Les matériaux possédant des groupements chimiques réactifs de surface, comme les polymères thiol-ènes, permettant l'immobilisation rapide de ligands sans aucune modification de leur surface sont donc les premiers choix pour ce développement technologique.

L'objectif de cette thèse est de développer un LOAC sensible et spécifique pour la multi-détection/quantification de biomarqueurs afin de réaliser des diagnostics précoces de cancer. Pour cela, des stratégies de fonctionnalisation localisée d'aptamères ont été développées dans des micro-canaux en polymère dans le but de fabriquer des μ SPE à haut rendement de spécificité et d'extraction. La première stratégie, dite 2D, fait appel à des micro-canaux en OSTE sur lesquels des aptamères modifiés par un groupement thiol ont été immobilisés sur une couche de nanoparticules d'or préalablement déposée à la surface du polymère suite à une irradiation UV ou par incubation de la solution de ligands. La deuxième stratégie, dite 3D, fait appel au procédé sol-gel réalisé directement à l'intérieur de micro-canaux en COC traité par un procédé plasma pour l'encapsulation *in-situ* d'aptamères. Les stratégies ont été comparées en termes de spécificité, d'efficacité et de stabilité d'immobilisation des aptamères, de complexité de mise en œuvre, de reproductibilité entre lots et la possibilité de réaliser des fonctionnalisations localisées de manière simple et rapide.

Chapter II: Materials, chemicals, aptamer characterization and gold nanoparticles synthesis and characterization

List of abbreviations

- A: adenine
- BGE: background electrolyte
- C: cytosine
- D: diffusion coefficient
- CE: capillary electrophoresis
- ESI: electrospray ion source
- G: guanine
- IS: ionic strength
- IS_x: ionic strength of the phosphate sodium buffer (x = 50, 150 or 300 mM)
- k_B: Boltzmann constant ($1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$)
- K_d: dissociation constant
- l: effective length
- L: total length of the capillary
- μ_{app}: apparent mobility
- μ_{eo}: electroosmotic mobility
- μ_{ep}: electrophoretic mobility
- MSD: single quadrupole mass spectrometer
- η: medium viscosity
- R_C: capillary internal radius
- R_h: hydrodynamic radius
- σ_t: temporal variance
- T: absolute temperature
- T: thymine
- t_{app}: apparent time
- t_{eo}: electroosmotic time
- t_{ep}: electrophoretic time
- t₀: average elution time
- TDA: Taylor dispersion analysis
- V: applied voltage

II.1. Materials and chemical reagents

The materials and the chemical reagents are given in Table 7.

Table 7: List of material and chemical reagent.

Product	N°CAS	Purity	State	Sold by
Chapter II				
Anti-sulforhodamine B aptamer	-	No guarantee	Lyophilized	Integrated DNA Technologies
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	7558-79-4	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Magnesium chloride (MgCl ₂)	7786-30-3	>99%	Solid	Fluka
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	7558-80-7	100%	Solid	Sigma-Aldrich
N,N-dimethylformamide (C ₃ H ₇ NO)	68-12-2	99.8%	Liquid	Sigma-Aldrich
Chapter III				
2-propanol (C ₃ H ₈ O)	67-63-0	99.9%	Liquid	GPR Rectapur
Acetic acid (C ₂ H ₄ O ₂)	200-580-7	100%	Solid	Sigma-Aldrich
AlexaFluor®532 (Atto 532)	-	>90%	Solid	Sigma-Aldrich
Anti-sulforhodamine B aptamer	-	No guarantee	Lyophilized	Integrated DNA Technologies
Brass	-	-	Plates (8 cm * 8 cm * 5 cm)	GREM
Cetrimonium bromide (CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Br)(CH ₃) ₃)	57-09-0	99%	Solid	Sigma-Aldrich
Chloroauric acid (HAuCl ₄)	16903-35-8	99.9%	Liquid	Sigma-Aldrich
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	7558-79-4	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	64-17-5	99.5%	Liquid	VWR
Ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate	84434-11-7	97%	Viscous liquid	Ark Pharma.Inc.
Glass slide	-	-	Slide	RS France
Gold nanoparticles stabilized in citrate (diameter: 30, 40, 50 et 60 nm)	-	-	Colloidal solution	Sigma-Aldrich
Magnesium chloride (MgCl ₂)		>99%	Solid	Fluka
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	7786-30-3	100%	Solid	Sigma-Aldrich
N,N-dimethylformamide (C ₃ H ₇ NO)	68-12-2	99.8%	Liquid	Sigma-Aldrich

Pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) (HSCH ₂ CO ₂ CH ₂) ₄ C	10193-99-4	>90%	Viscous liquid	TCl
Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)	7664-38-2	85%	Solid	Sigma-Aldrich
Poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate	32171-39-4	-	Liquid	VWR
Poly(methylmethacrylate) (C ₅ H ₈ O ₂) _n	-	-	Plates	-
Rhodamine B (C ₂₈ H ₃₁ ClN ₂ O ₃)	81-88-9	95%	Solid	Sigma-Aldrich
Silica wafer	-	-	Wafer (4 inches, 500 μm of thick)	Prolog Semicor
Sodium acetate (NaC ₂ H ₃ O ₂)	127-09-3	99%	Solid	Sigma-Aldrich
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	144-55-8	100%	Solid	Fluka
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	497-19-8	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Sodium citrate (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	68-04-2	-	Solid	Labsynth, product by Ltda Laboratory
Sodium dodecyl sulfate (CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na)	151-21-3	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Sodium phosphate (Na ₃ PO ₄)	7601-54-9	100%	Solid	Acros Organics
SU-8	-	-	Viscous liquid	MicroChem
Tablets for phosphate buffer	-	-	Tablets	Sigma-Aldrich
Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione	1025-15-6	98%	Viscous liquid	Sigma-Aldrich
Chapter IV				
2-propanol (C ₃ H ₈ O)	67-63-0	99.9%	Liquid	GPR Rectapur
Anti-sulforhodamine B aptamer	-	No guarantee	Lyophilized	Integrated DNA Technologies
Brass	-	-	Plates (8 cm * 8 cm * 5 cm)	GREM (France)
Cyclic olefin copolymer (grade 8007)	-	-	Plates (1 mm of of thick)	Chip Shop Microfluidic
Disodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	7558-79-4	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	64-17-5	99.5%	Liquid	VWR
Hydrochloric acid (HCl)	7647-01-0	37%	Liquid	Sigma-Aldrich
Magnesium chloride (MgCl ₂)	7786-30-3	>99%	Solid	Fluka
Monosodium phosphate (NaH ₂ PO ₄)	7558-80-7	100%	Solid	Sigma-Aldrich
Polyethylene glycol 400 (H(OCH ₂ CH ₂) _n OH)	25322-68-3	-	Viscous liquid	Sigma-Aldrich

Silica wafer	-	-	Wafer (4 inches, 500 μm of thick))	Prolog Semicor
Tape	-	-	Sheet	ThermalSeal RTS™
Tetraethylorthosilicate (C ₈ H ₂₀ O ₄ Si)	78-10-4	98%	Liquid	Sigma-Aldrich

II.2. Anti-sulforhodamine B aptamer

II.2.1. Aptamer description

Two strategies of aptamer immobilization in microchannel were developed to fabricate a microextraction zone inside polymeric microchannel. In this thesis, one aptamer was used as proof of concept called anti-sulforhodamine B aptamer. This aptamer was selected by Wilson et Szostack¹⁹⁰ against a fluorophore: sulforhodamine B (Figure 35). The aptamer sequence is a rich G-aptamer with 29 bases: 5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'; with a dissociation constant (Kd) in solution equal to 660±60 nM.¹⁹⁰ The Kd characterizes the chemical affinity between the concentrations of the aptamer ([aptamer]), the target ([target]) and the complex ([aptamer-target]) at equilibrium:

$$Kd = \frac{[aptamer] * [target]}{[aptamer - target]} \quad (1)$$

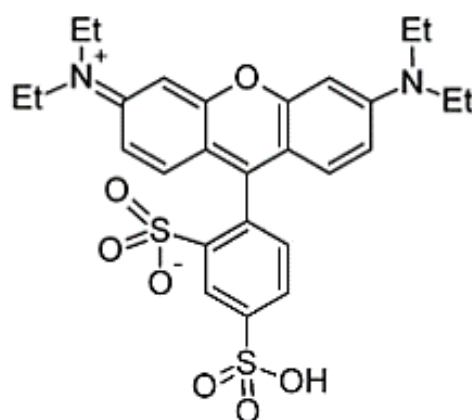


Figure 35 : Sulforhodamine B structure.

The aptamer anti-sulforhodamine B was chosen because the affinity studies between the aptamer and the fluorophore can be studied *via* fluorescence detection.

In this part, anti-sulforhodamine B aptamer was characterized by UV-Vis, mass spectrometry, Taylor Dispersion Analysis (TDA) and capillary electrophoresis separation.

II.2.2. Aptamer characterization

Aptamer preparation

Lyophilized aptamer anti-sulforhodamine B was purchased from Integrated DNA Technologies (Iowa, USA). Aptamers were suspended in ultra-pure water (18.2 M Ω .cm resistivity, Purelab Flex system, Elga Veolia, France) and were separated in aliquot to be stored at -20°C before their use. According to experiments, aptamers were suspended in a background electrolyte (BGE) or water and were activated at 70°C for 10 min¹⁶¹ and allowed to cool to room temperature. The composition of BGE used was: phosphate sodium (pH 8, ISx with x = 50, 150 or 300 mM) + 5 mM MgCl₂.

Aptamer characterizations

A 7100 capillary electrophoresis (CE) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) coupled to a diode-array detection system and to a single quadrupole mass spectrometer (InfinityLab LC/MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), equipped with an Agilent electrospray ion source (ESI) was used to determine the UV-Vis and mass spectra of aptamer. Its hydrodynamic size was analyzed by TDA. To check the presence of different conformers of the aptamer, CE separations were managed. The capillary used was a fused silica capillary (Polymicro Technologies, Molex, USA) with an internal diameter of 50 μ m. The capillary length used for the UV-Vis, TDA characterizations and CE separations was 35 cm, with the diode-array detection system at 26.5 cm from the capillary inlet. For the MS characterizations, the length of the capillary was 97.5 cm and the source of the mass spectrometer was coupled to the capillary at this distance from the capillary inlet. New capillary was conditioned by successive flushes with 1 and 0.1 M NaOH and then with ultra-pure water under a pressure of 935 mbar for 5 min each. Before analysis, the capillary was conditioned with ultra-pure water or BGE for 10 min. The temperature in the capillary cartridge was set at 25°C.

To plot the UV-Vis spectrum, 10 μ M of oligonucleotides prepared and activated in ultra-pure water was injected (50 mbar, 3s) in a capillary conditioned with ultra-pure water. The UV-Vis spectrum was recorded between 200 and 350 nm.

The mass spectrum was obtained by infusion (*i.e.* a continuous pressure push) at 50 mbar of 200 μM of aptamer in water by ESI/MSD coupled to EC. The capillary was conditioned with ultra-pure water. The capillary voltage of ESI/MSD was maintained at -4000 V and the sampling orifice was set to ground potential for the negative ion mode. Nitrogen was used as the nebulizer and the drying gas, at a pressure of 8 psi and with a flow rate of 7 L/min, respectively. The drying gas was heated to 350°C . The sheath liquid consisted of 25% (v/v) 2-propanol and 1% triethylamine in deionized water (pH 11) and was kept at a flow rate of 4 L/min by an Agilent series iso-pump. Mass spectrum was acquired over the mass range 500–2000 Da. The values of fragmentor, step size, and gain, were set at 100, 0, and 1, respectively.

The aptamer hydrodynamic radius was calculated thanks to the acquisition of TDA experiments. TDA permits to determine the diffusion coefficient (D) and the hydrodynamic radius (R_h) of molecules. This method is based on the spread of a solute band under a laminar flow in a capillary.^{191,192} According to the TDA theory, D ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) can be determined by the following formula¹⁹³:

$$D = \frac{R_C^2 t_0}{24 \sigma_t^2} \quad (2)$$

With:

R_C : capillary internal radius (m)

t_0 : average elution time (s)

σ_t : temporal variance of the solute (s)

Hydrodynamic radius (m^2) is calculated *via* D determined by the formula (2) using the Stokes-Einstein formula^{154,194}:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (3)$$

With:

k_B : Boltzmann constant ($1.38\cdot 10^{-23}$ J.K⁻¹)

T: absolute temperature (K)

η : medium viscosity (Pa.s)

The influence of the ionic strength (IS_x) of the background electrolyte (BGE) on the aptamer size was studied. To this end, 10 μM aptamer solution was prepared and activated in ultra-pure water or sodium phosphate BGE (pH 8, IS_x with $x = 50, 150, 300$ mM) + 5 mM

MgCl₂. Aptamer solutions were injected under hydrodynamic injection (20 mbar, 6s) in a fused silica capillary and pushed under a hydrodynamic flow (50 mbar) until the diode-array detection system (260 nm). The calculated temporal variance of the elution profile (σ_t) is the width at half-height of the obtained signal.

The presence of aptamer conformers was studied with the EC system coupled to diode-array detection system (260 nm). 10 μ M of aptamers prepared in the sodium phosphate buffer (IS=50 mM, pH 8) + 5 mM MgCl₂ was injected (50 mbar, 3 s) by the application of a negative pressure by the outlet-end of the capillary conditioned with the buffer solution used to prepare aptamer. An separation voltage (-15 kV) was applied at the inlet of the capillary to permit the separation of potential aptamer conformers. The effective distance of the diode-array detection system from the outlet-end was equal to 8.5 cm. The electroosmotic mobility (μ_{eo}) was determined by injecting and separating 200 μ M of dimethylformamide (neutral marker) prepared in BGE solutions (sodium phosphate buffer, IS=50 mM, pH 8 + 5 mM MgCl₂) (n=3) following the formula:

$$\mu_{eo} = \frac{L * l}{V * t_{eo}} \quad (4)$$

With:

L: total length of the capillary (35 cm)

l: effective length (8.5 cm)

V: applied voltage (15000 V)

t_{eo}: electroosmotic time (s)

The electroosmotic mobility was equal to $36.9 \pm 0.2 * 10^5 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (n=3). The apparent mobility (μ_{app}) aptamer was calculated due to the apparent time (t_{app}) which corresponds to the time of the analyte takes to reach the detection system from the extremity of the capillary where it is injected:

$$\mu_{app} = \frac{L * l}{V * t_{app}} \quad (5)$$

The electrophoretic mobility (μ_{ep}) of aptamer conformers was determined with the following formula:

$$\mu_{ep} = \mu_{app} - \mu_{eo} \quad (6)$$

The experiments were repeated 3 times.

The software used to record and treat data were ChemStation OpenLab (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

Results

The UV-Vis spectrum of the aptamer solution is presented in Figure 36.

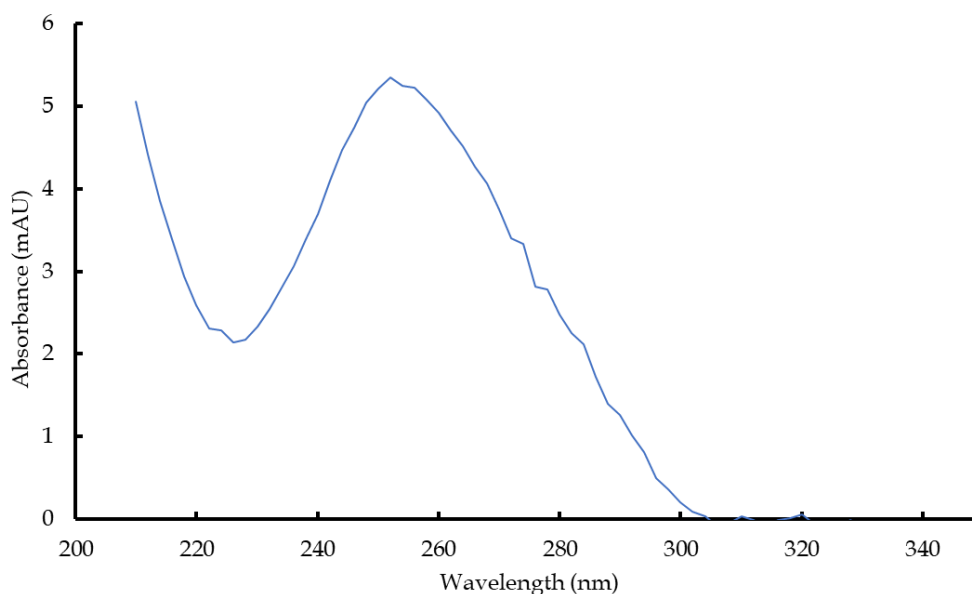


Figure 36: UV-Vis spectrum (200-350 nm) of 10 μ M of aptamer anti-sulforhodamine B prepared and activated in ultra-pure water.

The maximum absorbance is observed at 252 nm. The UV-Vis spectrum profile is characteristic of DNA.¹⁹⁵

The mass spectrum obtained is presented in Figure 37. The aptamer molecular mass is 9147 Da. The mass spectrum corresponding to the theoretical spectrum calculated for the scanned range is presented in Table 8.

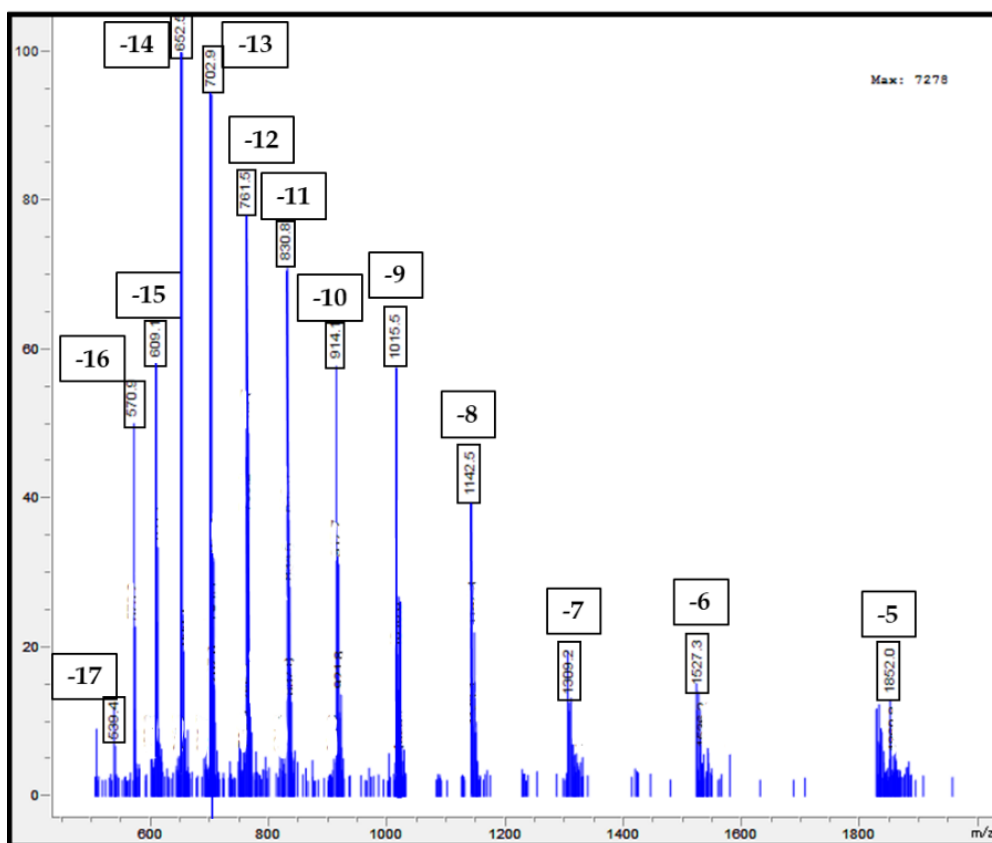


Figure 37: Mass spectrum of 200 μ M of anti-sulforhodamine B aptamer obtained by ESI/MSD by direct infusion. Mass spectrum is acquired over 500-2000 m/z.

For each m/z, we observe a massif consisting of a set of peaks, which could come from by the formation of adducts with any salts from the synthesis and/or of purification steps and present in trace amounts in the aptamer solution or by the formation of isotopes. The calculation of the surplus of mass in relation to the theoretical mass of the aptamer (9147 Da) suggests in particular the existence of adducts with sodium ($M = 23.0 \text{ g.mol}^{-1}$), and triethylamine ($M = 101.2 \text{ g.mol}^{-1}$) (Table 9).

Table 8: Theoretical mass spectrum of the anti-sulforhodamine B aptamer ($M=9147 \text{ Da}$) between 500 and 2000 m/z.

z	-5	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	-15	-16	-17
m/z theoretical	1829	1525	1307	1143	1019	915	832	762	704	653	610	572	538

Table 9 : Allocation of set of peaks corresponding to the charge -14.

z	m/z	Mass (Da)	Surplus	Adduct
-14	655.5	9177.0	30.0	Na
-14	661.0	9254.0	107.0	triethylamine

The UV-Vis and the mass spectrometry characterizations prove the presence of aptamer anti-sulforhodamine B in samples sent by Integrated DNA Technologies, that does not guarantee the purity of aptamer.

The hydrodynamic radius values of aptamers prepared in different ionic strengths (ISx) BGE are presented in Table 10. The obtained Taylorgrams at 260 nm are presented in Annex.

Table 10: Hydrodynamic radius of anti-sulforhodamine B aptamer prepared with different BGE compositions (n=3).

BGE composition	Hydrodynamic radius (nm)
Ultra-pure water	1.9±0.1
Sodium phosphate buffer (pH 8, ISx= 50 mM) + 5 mM de MgCl ₂	3.7±0.1
Sodium phosphate buffer (pH 8, ISx= 150 mM) + 5 mM de MgCl ₂	3.8±0.1
Sodium phosphate buffer (pH 8, ISx= 300 mM) + 5 mM de MgCl ₂	4.4±0.1

Some studies have shown that a rich guanine (G)-aptamer sequence can possess several conformations when the oligonucleotide strands are prepared in alkali metals or alkaline earth metal solution.^{196,197} The conformation of G-rich aptamer can adopt, in accordance with these studies, a linear or G-quadruplex structure. A G-quadruplex structure is a higher ordered structure consisting of two or more G-quarters, which can be stabilized by various monovalent and divalent cations.¹⁹⁷ The G-quadruplex structure depends on the radius, the charge and the concentration of the cation present in the solution used to prepare aptamers.¹⁹⁶ It is noted in Table 10 that the hydrodynamic radius of the anti-sulforhodamine B aptamer (rich G-aptamer)

increases with the ionic strength of BGE. So, this result could be explained by the presence of different conformations of the aptamer sequence depending on the ionic strength of the BGE.

To verify the presence of different aptamer conformations, CE separations was carried on with aptamer prepared in sodium phosphate buffer (IS=50 mM, pH 8) + 5 mM MgCl₂. The electropherogram is presented in Figure 38.

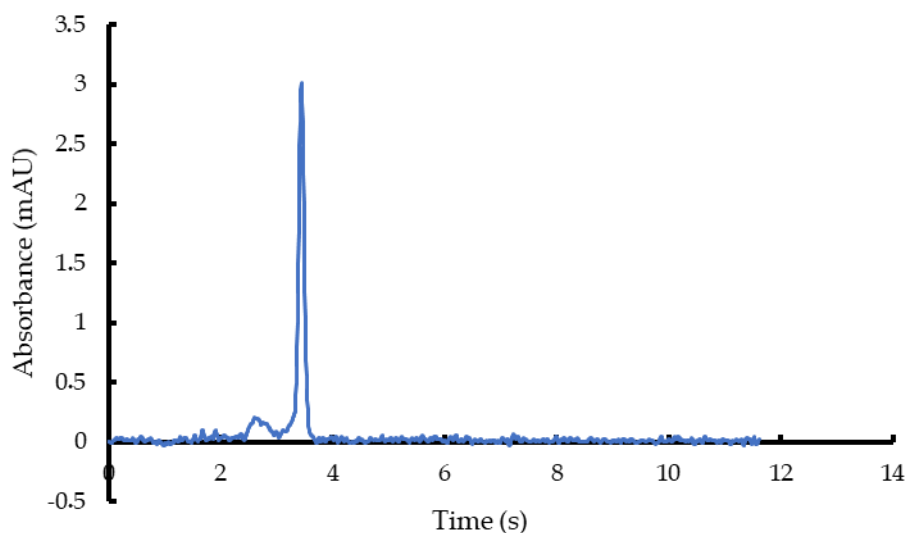


Figure 38: Electropherogram at 260 nm of 10 μ M of aptamer prepared in sodium phosphate buffer (IS = 50 mM, pH 8) + 5 mM MgCl₂. The aptamer solution was injected by the outlet-end of the capillary (3s, 50 mbar). The voltage applied was -15 kV. Capillary dimensions: L=35 cm, l=8.5 cm and internal diameter = 50 μ m.

Two peaks are present on the electropherogram, which may correspond to two different conformations of the aptamer (G-quadruplex and linear conformations) or to the presence of aptamer fragment sequences or to a synthesis contamination non remove during the purification by high performance liquid chromatography. For each peak, the plotted UV spectrum corresponds to a UV spectrum characteristic of a DNA with a maximum of absorbance at 532 nm permitting to confirm the presence of aptamer inside the sample and not the presence of chemical pollutants. This experiment was repeated with different batches of aptamer with or without their activation at 70°C for 10 min. For each test, we obtained always an electropherogram with the two identical peaks. For the moment, we are not able to assign the peaks. The electrophoretic mobility was calculated (for n=3): $-24.1 \pm 0.2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $-27.3 \pm 0.1 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for the first small peak, and the second big peak respectively.

II.2.3. Aptamer modification

In the following chapters, anti-sulforhodamine B aptamer sequence was modified by reactive chemical group to immobilize it on substrate surface and/or was modified by a fluorophore to detect it. The aptamer sequence modifications are given in Table 11.

Table 11: Resume of chemical modifications of anti-sulforhodamine B aptamer sequence.

Modifications	Sequence	Thesis chapter	Chemical modification utilities
C3-SH and Alexa Fluor® 532	<p>AlexaFluor® 532-5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'-C3-SH</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'- C3-SH</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p>	Chapter III	AlexaFluor® 532 is used for the fluorescent characterizations of the immobilized aptamer. The thiol modification (SH) permits to immobilize the aptamer on allyl groups or on gold nanoparticles.
AlexaFluor® 532	<p>AlexaFluor® 532-5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p> <p>-----</p> <p>5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'</p>	Chapter IV	AlexaFluor® 532 is used for the fluorescent characterizations of the immobilized aptamer.

In each following chapter, the aptamer sequence is modified by a fluorophore in 5': AlexaFluor® 532 (Figure 39). This modification permits to characterize the aptamer density immobilized in microfluidic systems by fluorescence microscopy.¹⁹⁸ It can also be modified in 3' with a thiol function so as to be linked to the substrate.

II.2.4. Aptamer immobilization characterizations

In each following chapter, the aptamer immobilization on the surface of different substrates was characterized by fluorescent microscopy. The experimental set-up was composed by an inverted fluorescence microscope system used in reflexion mode (Axio Observer A1, Zeiss, Germany), equipped with a metal halide lamp (200 or 120 W, Osram, Munich, Germany) for fluorescence excitation and a CCD digital camera (Pike F145B, Allied

Vision Technologies Stadtroda, Germany) for image acquisition. The image acquisition was managed *via* Hiris (RD Vision, France) or MicroFluo software (RD Vision, France). The images obtained were reprocessing by Zen software (Zeiss, Germany) and Image J. A 550 nm excitation filter and a 605 nm emission filter (filter set 43 HE, Zeiss, Germany) were used for fluorescence imaging.

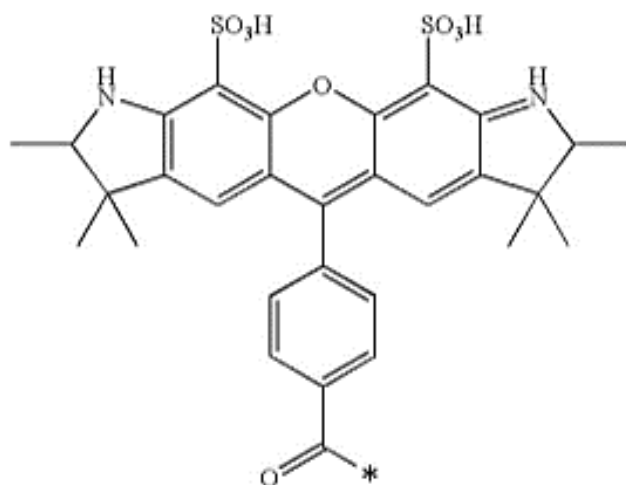


Figure 39: AlexaFluor® 532 structures. * represents the site where the fluorophore is attached to the aptamer.¹³¹

The camera acquisition parameters used are summarized in Table 12.

Table 12: Resume of camera acquisition parameters used in Chapters III and IV.

Experiences	Lamp power (W)	Objective	Camera acquisition parameters
Article 1	200	20 X	5000 μ s exposition time, no gain and no binning
Article 2	120	10 X	1 s exposition time, no gain, and no binning
Article 3	120	10X or 5 X	1 s exposition time, no gain, and no binning
Chapter IV	120	40 X	0,1 s exposition time, no gain, and no binning

II.3. Gold nanoparticles synthesis and characterization

In chapter III, two AuNP solutions (AuNPs-1 and -2) were synthesized using the Turkevich et al method.¹⁹⁹ 95 mL ultra-pure water with 36.6 μ L HAuCl₄ solution were mixed

under heating (100°C) with 1.6 mL or 1.8 mL of 2% (w/w) citrate sodium solution for AuNPs-1 and -2 respectively. During synthesis, the solution changed from light yellow color to black color and finally to cherry color. The heating was stopped when the colloidal solution reached the cherry color. The AuNP solutions were kept at 4°C before uses. Both solutions were characterized by UV-visible spectrophotometry (Specord 210 plus, Germany), DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, France) and by TEM (JEOL JEM-2000EX, Japan). This method permitted to determine the hydrodynamic diameter (by DLS, noted Dh) and dry diameter (TEM, noted Dd) of AuNPs. The characterizations are presented on Figure 40. Absorbance spectra were the average of 3 measures. DLS characterizations presented were the average of 10 measures. TEM micrographs were retreated by Image J to measure the diameter of 10 nanoparticles per sample.

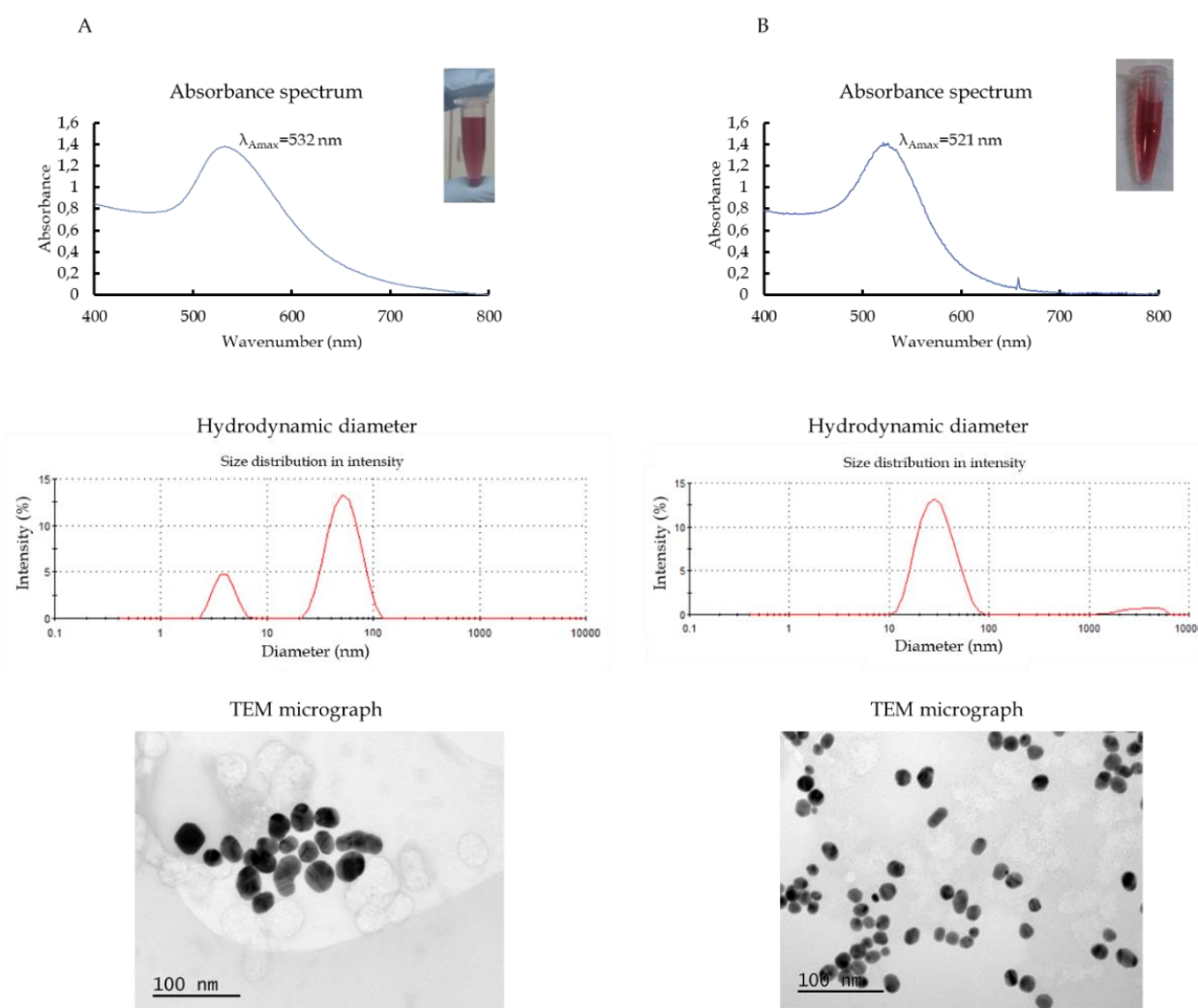


Figure 40: UV-Vis, DLS and TEM characterizations of A: AuNP-1 and B: AuNP-2 solutions.

AuNPs-1 present two size distributions whereas AuNPs-2 have one size distribution. The mean dry diameter of AuNPs-1 is equal to 28 nm and the one of AuNPs-2 is equal to 18 nm.

Commercial AuNP solutions (30, 40, 50 et 60 nm of diameter) were also characterized in the same manner as AuNP-1 and AuNP-2 solutions to permit to calculate the concentration of the synthesized solutions due to calibration curves. The characterization results of commercial solution are presented in Table 13. TEM characterizations showed that the shape of commercial AuNPs are less spherical than AuNPs-1 and -2.

The diameter values measured for commercial solutions are those given by Sigma-Aldrich's technical data sheets. A_{max} as function of the concentration of commercial AuNP solutions (C) diluted successively by 2, 3, 4 and 5 was plotted to determine their molar extinction coefficient (ϵ) thanks to Beer-Lambert's Law (Figure 41):

$$A_{max} = C\epsilon l \quad (7)$$

Table 13: Wavelength averages for maximum absorbances (n=3), hydrodynamic diameters (n=10), and dry diameters (n=10) of synthesized and commercial AuNPs solutions.

	AuNPs	λ_{Amax} (nm)	Dh	Dd
Synthesized	AuNPs-1	532	54 nm (81%)-4 nm (19%)	28 nm
	AuNPs-2	521	28 nm	18 nm
Commercial	30 nm	529	42 nm	25 nm
	40 nm	532	50 nm	33 nm
	50 nm	543	69 nm	51 nm
	60 nm	544	77 nm	61 nm

The molar extinction coefficients determined are close to those provided in the technical data sheets of the commercial AuNPs. Thus a calibration curve $\ln(\epsilon) = f(\ln(Dh))$ was plotted with the experimental data obtained. The equation of the calibration curve is: $\ln(\epsilon) = 3.282 * \ln(Dh) + 9.8805$ with $r^2 = 0.97$. The values of the slope and y-axis at the origin are in accordance with other studies.^{200,201} Indeed, according to the experimental study by Liu et al.²⁰⁰ the slope and the origin are 3.32 and 10.8 respectively and according to the theoretical study by El-Sayed et al.²⁰¹ the values obtained are 3.36 and 8.1, respectively. Using the experimental linear relationship, we are able to determine the molar concentrations of AuNP-1 and -2 solutions which are $1.4 \pm 0.3 * 10^{-10}$ and $1.3 \pm 0.6 * 10^{-9}$ mol/L respectively.

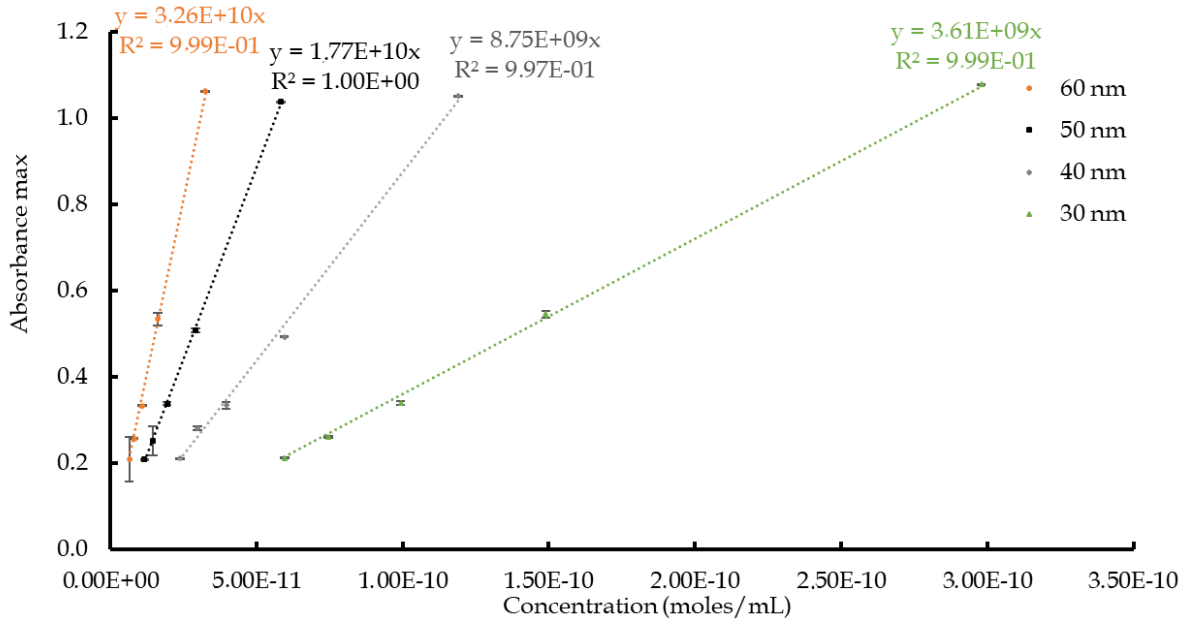


Figure 41: Absorbance max in function of the concentration of AuNP commercial solution.

Chapter III: Localized functionalization of OSTE microchannels

List of abbreviations

- AuNPs: gold nanoparticles
- BGE: background electrolyte
- CTAB: cetrimonium bromide
- Δ IS: difference of ionic strength for one BGE composition
- Dd: dry diameter
- Dh: hydrodynamic diameter
- DLS: dynamic light scattering
- ϵ : molar extinction coefficient
- EDS: energy-dispersive X-ray spectroscopy
- EOF: electroosmotic flow
- I: fluorescent intensity
- I₀: fluorescent intensity of blank
- IS: ionic strength
- IS_H: high ionic strength BGE
- IS_L: low ionic strength BGE
- IS_x: ionic strength of the phosphate sodium buffer ($x= 50, 150$ or 300 mM)
- l: effective length of the capillary
- LOAC: lab-on-a-chip
- MCE: microchip capillary electrophoresis
- μ_{eo} : electroosmotic mobility
- OSTE: off-stoichiometry thiol-ene polymer
- PDMS: polydimethylsiloxane
- r^2 : correlation coefficient
- SDS: sodium dodecyl sulfate
- SEM: scanning electron microscopy
- TEM: transmission electron microscopy
- t_{eo} : electroosmotic time
- UV: ultraviolet
- V: applied voltage
- WCA: water contact angle
- XPS: X-ray photoelectron spectroscopy

III.1. General introduction

In recent years, off-stoichiometry thiol-ene polymer (OSTE) is increasingly used as microfluidic substrate particularly due to its physico-chemical and surface properties allowing to manage electrokinetic separations⁶² or surface functionalization by ligands.^{55,60,61} OSTE polymer is composed by thiol and allyl monomers as precursors whose ratios are tunable that allows to control the surface density of both ene and thiol functions according to the need. The microfabrication of thiol-ene microchannels used the soft lithography protocols and is based on the thiol-ene click chemistry reaction^{55,56,60-63} *i.e.* the UV-initiated step-growth radical polymerization initiated between thiol (“thiol”) and allyl (“ene”) monomers. The first step consists on the formation of a UV-sensitive initiator radical, followed by hydrogen abstraction from a thiol precursor. The resulting thiyl radical can then propagate due to the presence of allyl precursors. The second step is the classical propagation chain transfer until thiol-ene polymerization is completed.⁶⁴⁻⁶⁶ This reaction may occur in the presence of a photoinitiator to reduce considerably time of microfabrication.^{55,62,202}

In 2015, Tähkä et al.⁶² were the first to study the electroosmotic mobility in OSTE microchannels (2 thiol: 1.2 allyl and 2 thiol: 1.8 allyl (w/w)) from pH 4.5 to 10. OSTE was photopolymerized without addition of photoinitiator. Within these OSTE microchannels, electrokinetic separation (borate buffer, pH = 10, IS = 20 mM) of a protein mixture was performed in 30 min. Some other studies showed the possibility to functionalize the OSTE microchannel walls with ligands by click chemistry reaction^{55,61} or by the formation of disulfide covalent bonds⁶⁰. However, only one study proved the possibility to locally immobilize a molecule (enzyme) in OSTE microchannel.⁵⁵ In this study, Campos et al.⁵⁵ first optimized the formulation of OSTE microchannel photopolymerized with photoinitiator to obtain irreversible sealing of the electrophoretic microchip by click chemistry reaction. The optimized mass ratios of thiol and allyl monomers were respectively: 1:1.3 (microchannel) and 2.5:1 (top) (w /w). The process of OSTE microfabrication and the structure of allyl and thiol monomers used by Campos et al. are presented in Figure 42. They showed by Raman an excess of allyl and thiol groups and their homogeneous distribution on the surface for both formulation of OSTE surfaces (1:1.3 and 2.5:1 (w/w), respectively). Moreover, the wettability properties of OSTE surface were characterized by water angle measurement. Contact angles were close to 70°C for the both OSTE substrates. With this system, this team has successfully grafted cysteine by click chemistry reaction initiated by UV irradiation on the wall sealed-microchannel. Thanks to a mask placed on the top of OSTE microchannel, only areas exposed

to ultraviolet radiation were functionalized by the molecule (Figure 42). Unfortunately, the electroosmotic mobility was only characterized at pH 6 with morpholinoethanesulfonic acid and histidine buffer (IS=50/10 mM). This mobility was equal to $38 \pm 3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.

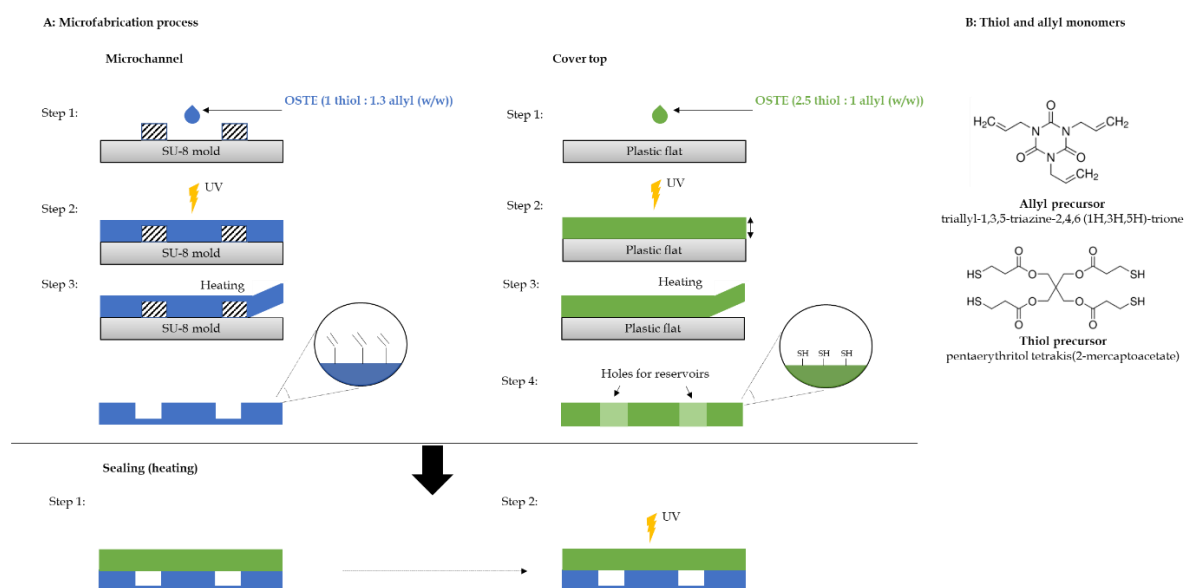


Figure 42: (A) Microfabrication process and (B) thiol and allyl monomers used by Campos et al.⁵⁵ for the development of an OSTE microchip.

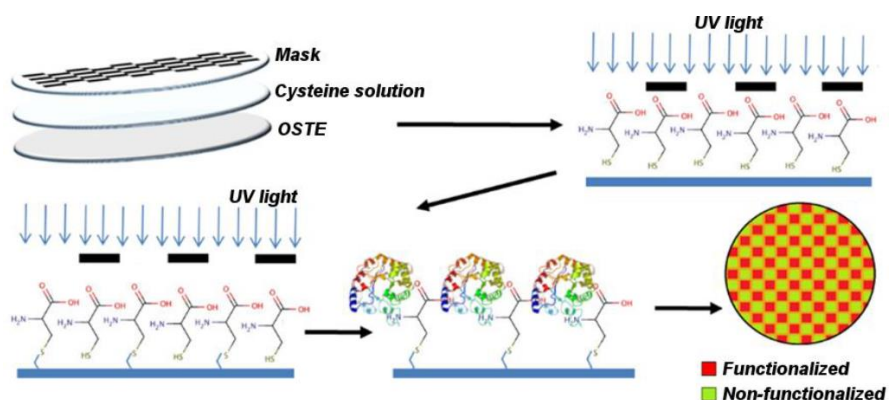


Figure 43: Localized functionalization of OSTE sealed microchannel by cysteine using click chemistry reaction initiated by UV irradiation.⁵⁵

During this work a deeper characterization of this microchannel was performed on the overall pH range for further implementing electrokinetic separations. The electroosmotic flow (EOF) of OSTE microchannels photopolymerized with the optimized formulation of Campos et al.⁵⁵ was determined between pH 3 to 12 in the following study. Two EOF determination methods, the current-monitoring and the neutral marker methods, were optimized and compared to give the most accurate and reproducible electroosmotic mobility (μ_{eo}). To this aim, two OSTE microchannels were used. In the first, the single channel was made of 1:1.3

(w/w) thiol-ene polymer and the top cover was made of 2.5:1 (w/w) thiol-ene polymer, named 1.3 allyl microchannel. In the second, the single channel was made of 2.5:1 (w/w) thiol-ene polymer and the top cover was made of 1:1.3 (w/w) thiol-ene polymer, named 2.5 microchannel. These two configurations were made by soft lithography and the dimensions of single OSTE rectangular microchannels were: 6 cm length, 100 μm width and 30 μm height (Figure 44.A). The both single channel have a similar electroosmotic mobility which in the all pH range studied (3-12) from 8.4 to $22.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and it is stable in air for 14 days (sodium phosphate buffer, pH=7, IS=20/18 mM). All the results obtained during this study led to the writing of an article (Article 1) which will be submitted in *MicroChimica Acta* and reproduced in full below.

Moreover, no article was published so far on the aptamer immobilization in OSTE microchannels. So, we have developed an aptamer immobilization strategy on OSTE plates and implemented it in open OSTE-microchannels in multiple localized zones by droplet deposition of the aptamer solution. During this study, we have shown the possibility to immobilize aptamer modified in 3'-end by C3-SH on a gold nanoparticle layer deposited beforehand on thiol excess surface by UV irradiation. The presence of this layer permits to avoid non-specific adsorption of the oligonucleotide on the surface. Moreover, we have tested the affinity between the aptamer and the sulforhodamine B with the developed system. The formula of the unsealed microchannel was made of 2.5:1 (w/w) thiol-ene polymer (named open OSTE-microchannel). The microfabrication technique used was the soft lithography and the dimensions of single OSTE rectangular microchannels were: 3.5 cm length, 2 mm width and 40 μm height (Figure 44.B.). The results obtained during the study on the strategy of aptamer immobilization led to the writing of an article (Article 2) submitted in *Microelectronic Engineering* and reproduced in full below. The results obtained during the study on the proof of concept for aptamer multiple zones functionalization onto OSTE microchannel led to the writing of an article (Article 3) not yet submitted and reproduced in full below.

All these results were obtained thanks to the collaboration established between our team and the Chemistry Institute of the University of Campinas (Brazil) where I spent 5 months. I wrote and proposed a first version of the Articles 1, 2 and 3 which were reworked by the co-authors. Transmission electron microscopy and dynamic light scattering characterizations of AuNP solution were made thanks to a collaboration with IRCP (*Institut de*

Recherche de Chimie de Paris), Chimie ParisTech PSL, CNRS 8247. Characterizations of gold nanoparticle solutions synthesized are presented in Chapter II.

This chapter will be report on the:

- electroosmotic flow characterization (p. 111)
- strategies of aptamer immobilization (p. 128)
- aptamer multiple zones functionalization onto OSTE microchannel (p.147)

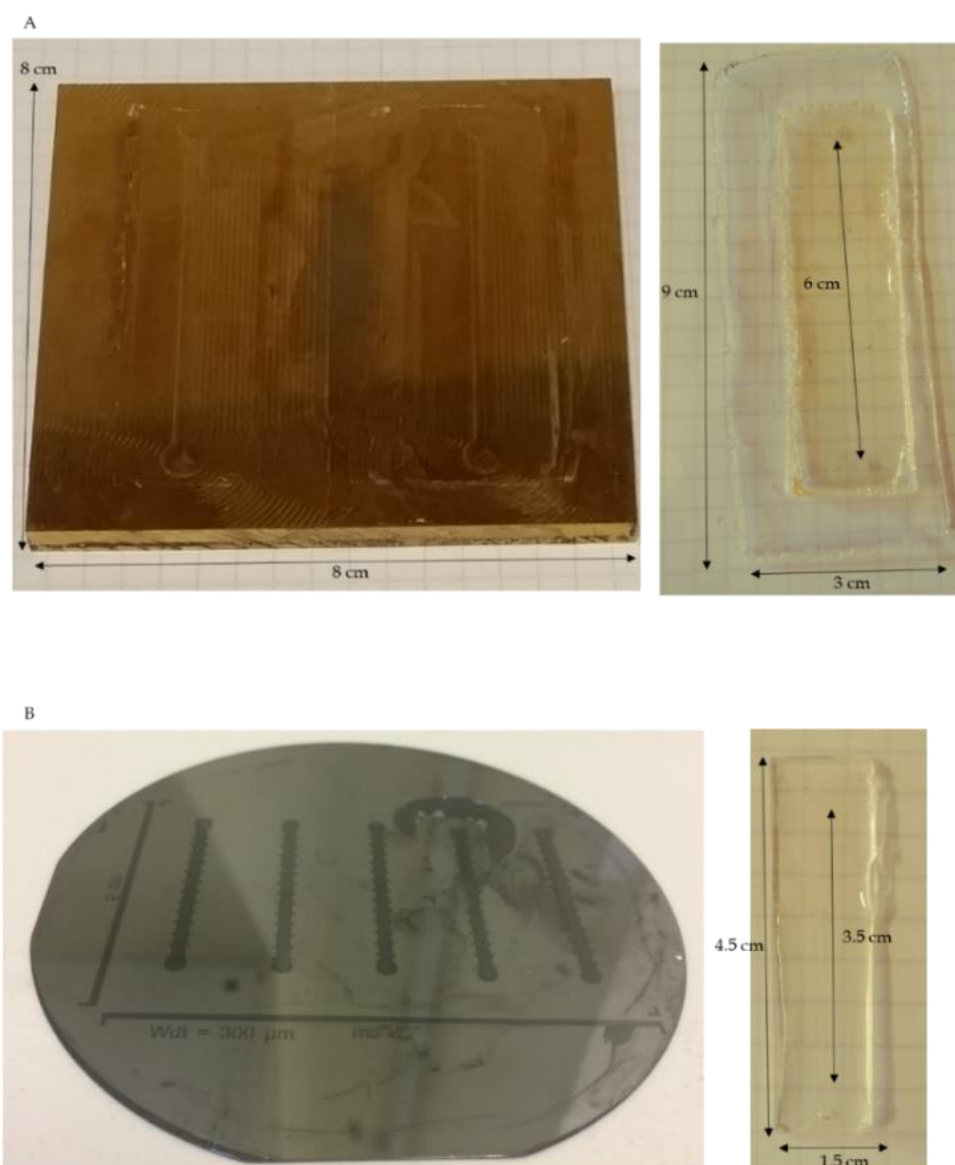


Figure 44: Photography of molds and OSTE microchannels. (A) brass mold and single 1.3 allyl sealed microchannel (100 μm width, 30 μm height and 6 cm length) and (B) silica mold and single open 2.5 thiol-microchannel (2 mm width, 40 μm height and 3.5 cm length).

III.2. Electroosmotic flow characterization

OSTE polymer material for microchip electrophoresis: a methodological approach to electroosmotic flow determination

Samantha Bourg¹, Fanny d'Orlyé¹, Sophie Griveau¹, Fethi Bedioui¹, José Alberto Fracassi da Silva^{2},
Anne Varenne^{1*}*

*1 Chimie ParisTech PSL, CNRS FRE 2027, Institute of Chemistry for Life and Health Sciences, 11
rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris France*

*2 Department of Analytical Chemistry-Chemistry Institute, State University of Campinas, Campinas,
SP, Brazil*

Corresponding authors :

J. A. F. Da Silva*

E-mail: fracassi@iqm.unicamp.br

A. Varenne*

E-mail: anne.varenne@chimieparistech.psl.eu

Abbreviation: BGE (background electrolyte) ; CTAB (cetrimonium bromide) ; EOF (electroosmotic flow) ; IS (ionic strength) ; LOAC (lab-on-a-chip) ; MCE (microchip capillary electrophoresis) ; μ_{eo} (electroosmotic mobility) ; OSTE (off-stoichiometry thiol-ene polymer) ; PDMS (polydimethylsiloxane) ; SDS (sodium dodecyl sulfate) ; t_{eo} (electroosmotic time) ; UV (ultraviolet) ; WCA (water contact angle).

Abstract

Among the methods to separate compounds in microfluidic systems, microchip electrophoresis (MCE) is an attractive way for rapid and efficient characterizations. Polymeric materials are good candidates to produce MCE systems because they do not require special cleanroom facilities and their manufacturing processes are easy and cheap. However, for most of them, surface treatments are necessary to confer hydrophilic properties that allow the control of electroosmotic flow in microchannels. In order to prevent the use of surface treatments which may result in unstable physico-chemical surface properties and increase microfabrication cost, time and complexity, a new class of homemade polymers off stoichiometry thiol-ene polymer (OSTE), is used as material for microfluidic chips. OSTE polymer is composed of two monomers, allyl and thiol, reticulated with a UV-initiated click

chemistry reaction in presence/absence of photoinitiator, while the use of a photoinitiator during the reticulation process reduces drastically the microfabrication time. No study has been carried out on the systematic determination of the electroosmotic flow in a large range of pH within OSTE microchannels photopolymerized in presence of photoinitiator.

Thus, we aim at reporting the in-depth characterization of such OSTE microfluidic channels in terms of surface charge density and chemical stability to evaluate the potential impact on the surface properties of the presence of the photoinitiator in the reticulation process. A methodological approach to EOF determination in OSTE microchannels is presented which allows to highlight the pH-dependence over a pH range from 3 to 12.

1. Introduction

Current trends in analytical chemistry are to develop miniaturized automated platforms integrating all laboratory operations in a single device to detect and quantify small amounts of analytes in complex matrices. Such a miniaturized platform called Lab-on-a-Chip (LOAC) allows to operate field analysis due to portability, low sample and solvent consumption and short overall analysis time.

Among methods to separate compounds in a LOAC format, microchip electrophoresis (MCE) is an attractive methodology for rapid and efficient analytical separations of complex samples²⁰³ as it offers high resolution and large peak capacities²⁰⁴. The choice of microchip material is crucial as it influences electroosmotic flow (EOF) as well as sample-wall interactions and therefore analysis robustness and efficiency.

Glass is a common material for microfluidic chips due to its well-known surface properties and its performance similar to that of conventional fused silica capillaries.²⁰⁵ However, the fabrication of glass-based microchannels requires special cleanroom facilities as well as complicated and expensive manufacturing processes.^{206,207} Thus, there is a high demand for new microchip materials with easier and cheaper microfabrication processes. As a result, many different polymeric materials are proposed as substrates for MCE systems. Among them, polydimethylsiloxane (PDMS) is the most widely used^{208,209}. PDMS is a heat-curable polymer with high optical transparency and rapid and easy microfabrication process (soft lithography)^{208,209}. However, PDMS is a hydrophobic substrate that promotes nonspecific adsorption of molecules and generates low electroosmotic flows that limit its use for electrophoretic separation purpose.⁵⁵ Some surface treatments have been developed to better control EOF inside PDMS microchannels, but increase the overall time and cost microfabrication process and may lack of stability over time.²¹⁰

To overcome all these drawbacks, it is necessary to develop/design new plastic materials for MCE system as an alternative to PDMS.^{55,62} In this context, thiol-ene polymers, made of thiol and allyl monomers as precursors, have several interesting properties such as optical transparency, rapid prototyping and uncomplicated processing.^{56,57} The microfabrication of thiol-ene microchannels is based on the thiol-ene click chemistry reaction^{55,56,60-63}, *i.e.* the UV-initiated step-growth radical polymerization initiated between thiol (“thiol”) and allyl (“ene”) monomers. The first step consists in the formation of a UV-sensitive initiator radical, followed by hydrogen abstraction from a thiol precursor. The resulting thiyl radical can then propagate due to the presence of allyl precursors. The second step is the classical propagation chain transfer until thiol-ene polymerization is completed.⁶⁴⁻⁶⁶ This reaction may occur in the presence of a photoinitiator.^{55,62,202} Thiol-ene polymers are either commercial (from Norland products Inc., NOA) or homemade (named off-stoichiometry thiol-ene polymer, OSTE). Whereas the exact composition of commercial polymers remains unknown, the tunable ratio of precursors for homemade ones allows to control the surface density of both ene and thiol functions.⁶² In such a way, polymer bulk and surface properties can be adapted to the need.

The evaluation of such material potentiality for MCE system goes through electroosmotic velocity measurements. Two methodologies are mainly described for OSTE microchannel characterization based on EOF determination either by the so called current-monitoring method^{55,62}, or by the so called constant effective mobility method²⁰². The first method measures the time required for the current to stabilize and reach a plateau by generating an ionic strength discontinuity within the microchannel. It consists in the continuous electrokinetic introduction of a low ionic strength background electrolyte (BGE) within a microchannel originally filled with a BGE of same nature but at higher ionic strength, or the other way around. The second method evaluates the electroosmotic mobility from the measurement of (i) the apparent mobility of a model molecule, the fluorescent dye FP-488 in a thiol-ene microchannel filled with a given electrolyte and (ii) the effective mobility of FP-488 in a fused silica capillary filled with the same BGE using a standard capillary electrophoresis instrumentation.²⁰² To our knowledge, only three articles report such systematic characterization of OSTE microchannels for different polymeric formulations either with⁵⁵ or without^{62,202} photoinitiator and over restricted ranges of pH.

Thus, we aim at reporting the in-depth characterization of OSTE microchannels polymerized in presence of photoinitiator in terms of surface charge density and long-term stability over a large range of pH to study its potential impact on OSTE material surface

properties. Conventional surface characterizations were first performed on OSTE plates by Raman spectroscopy, water contact angle measurements and optical microscopy. Then, a systematic study was carried out to evaluate EOF determination robustness in OSTE microchannels with two different methods at pH 7 (phosphate buffer), 10 (carbonate buffer) and 12 (phosphate buffer) for different ionic strengths (IS = 20, 18, 15 and 10 mM). The first method used for this study was the current monitoring method because it is an easy method²⁰⁴ already used for EOF determination in OSTE microchips^{55,62}. The second method is the most common used to determine EOF based on the detection of a neutral marker displacement inside microchannel named neutral marker method.²⁰⁴ Eventually, the pH-dependence of the EOF in OSTE microchannels polymerized in presence of a photoinitiator was characterized for the first time over a wide pH-range (3-12) and polymer surface stability was accessed over time at pH 7 for two weeks. This opens the way for the development of controlled MCE system in OSTE microchannels for any type of sample mixtures.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione, phosphate tablets, phosphoric acid, monosodium phosphate, sodium phosphate dibasic, acetic acid, sodium carbonate, sodium acetate, sodium dodecyl sulfate, cetrimonium bromide and rhodamine B were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). Pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) was purchased from TCI (India). Ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate was purchased from Ark Pharm. Inc (Interchim, Montluçon, France). Sodium bicarbonate was purchased from Fluka (USA). Trisodium phosphate was purchased from Acros Organics (Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Acetone and ethanol were purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania, USA). All solutions were prepared with ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ.cm, Purelab Flex, Elga Veolia, France).

2.2. Microchip fabrication

OSTE microchips were processed as described elsewhere,⁵⁵ with pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) (thiol) and triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione (ene) as monomeric precursors. Briefly, both precursors were mixed in disposable polystyrene cups using two different thiol:ene mass ratio: 1:1.3 (allyl excess substrate) and 2.5:1 (thiol excess substrate), respectively. The proper amount of each precursor was weighed and mixed with

0.01% w/w photoinitiator (ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate). To remove air bubbles inside the viscous mixture, the polystyrene cups were put in vacuum desiccators for 15 min. Finally, 2.5:1 (w/w) or 1:1.3 (w/w) thiol:ene mixtures were poured over a brass mold (for chip microchannel) or a plastic flat support (for chip top cover) and exposed to UV irradiation (Vilber Lourmat, San Sebastián, Spain) for 20 min (5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J). After UV exposure, the substrates were heated to 70°C for 5 min in the oven to facilitate unmolding. The reservoirs were punched with a drill. All substrates were washed using ethanol and deionized water under ultrasounds for 5 min and dried using nitrogen. For microchip sealing, allyl excess substrate (microchannel or top cover) and its complementary thiol excess substrate (top cover or microchannel, respectively) were put into contact and heated at 120°C for 20 min. Then, the two parts in contact were submitted to UV irradiation (Vilber Lourmat, San Sebastián, Spain) for 20 min (5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J) to induce irreversible bond through thiol-ene click reaction.

In this study, two OSTE chip configurations were studied, subsequently named 1.3 allyl microchannel and 2.5 thiol microchannel, corresponding to allyl excess or thiol excess microchannel, respectively. The dimensions of all single OSTE microchannels used in this study were 6 cm length, 100 μm width and 30 μm height (rectangular section).

2.3. Surface characterizations

OSTE surfaces were characterized by Raman spectroscopy, water contact angle (WCA) and optical microscopy. The OSTE plates (1cm * 3 cm * 0.5 mm) for surface characterizations were fabricated in the same experimental conditions as OSTE microchips. It is known that the UV irradiation dose can change the surface properties of OSTE substrates,⁶² so the total UV irradiation time of OSTE plates for photopolymerization was kept constant and equal to 40 min. All substrates were washed using ethanol and deionized water under ultrasounds for 5 min and dried using nitrogen before characterizations.

Raman spectroscopy characterizations of thiol-ene substrates (1:1.3 and 2.5:1 (w/w)) were performed with a Raman Station 400F spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a 785 nm laser (record power 250 mW). Data were acquired using Spectrum software (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) and treated with Excel (Microsoft, USA).

Static ultrapure water contact angle (WCA) measurements were done thanks to a DSA25-Drop Shape Analyser from Krüss (Germany). A 2 μL droplet was released from a syringe and placed slowly on the surface which contact angle was measured after 30s. Images

of droplet formation captured using a high-resolution camera were analyzed with the Advance Image Analysis Software (Krüss, Germany). Reported contact angle values were an average of at least three measurements at various locations on each OSTE plate.

Optical microscopy was performed with an inverted microscope (Axio Observer A1, Zeiss, Oberkochen, Germany) in transmission mode, equipped with CCD digital camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies Stadtroda, Germany) for image acquisition and processing *via* Hiris platform (RD Vision, France).

2.4. EOF measurements

EOF was measured from pH 3 to 12 for the two configurations of OSTE microchips: 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels. BGE were: sodium phosphate buffer (pH 3, 6, 7, 8, 9, 11 and 12 ; IS = 10, 15, 18 and 20 mM), sodium acetate buffer (pH 4 and 5 ; IS = 20 mM) and sodium carbonate buffer (pH 10 ; IS = 10, 15, 18 and 20 mM). BGE were prepared with the assistance of PHoEBus software (Analis, Suarlée, Namur, Belgium). Two methods for EOF determination were studied and compared, mentioned below as the current-monitoring and the neutral marker mobility methods.

For both methods, a high voltage sequencer (LabSmith, Livermire, California, USA) was used to apply a positive voltage (800 V) *via* platinum electrodes immersed in the inlet and outlet reservoirs of single OSTE microchannels. To favor the electric double layer stability at the solid/solution interface, microchannel and reservoirs were rinsed with the BGE and a voltage (800V) was applied for 1 min for preconditioning. Then, the microchannel was purged and refilled with fresh BGE before analysis.

For the current-monitoring method, the inlet reservoir was filled with a low ionic strength (IS_L) BGE, whereas the microchannels and the outlet reservoir were beforehand filled with a higher ionic strength (IS_H) BGE or the other way around. Ionic strength differences were evaluated to optimize measurement stability and sensitivity: 20/18 mM (named $\Delta IS = 2$ mM); 20/15 mM (named $\Delta IS = 5$ mM) and 20/10 mM (named $\Delta IS = 10$ mM). The experiments were repeated 3 times ($n=3$) with the both possible configurations of ionic strength BGE described above ($n=6$). Signals were treated with Excel (Microsoft, USA) so as to measure the time required for the current to stabilize and reach a plateau as materialized by the two horizontal asymptotes (Fig.S1).

For the neutral marker mobility monitoring method, 27 μM rhodamine B, a fluorescent dye, was employed as the neutral marker prepared in BGE solutions. Rhodamine B was introduced at the inlet of the microchannel with the continuous electrokinetic injection mode (positive polarity). The detection of rhodamine B was performed at the outlet end of the microchannel (6 cm) from the inlet reservoir *via* an inverted fluorescence microscopy system (Axio Observer A1, Zeiss, Oberkochen, Germany) in reflexion mode equipped with a 200 W metal halide lamp (Osram, Munich, Germany) for fluorescence excitation and a CCD digital camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies Stadtroda, Germany) for image acquisition *via* MicroFluo software (RD Vision, France). For all studies, images were recorded using an objective with 20 X magnification. The acquisition parameters of the CCD camera were kept constant with a 5000 μs exposition time, a zero gain and no binning. A 550 nm excitation filter and a 605 nm emission filter (filter set 43 HE, Zeiss, Oberkochen, Germany) were used for fluorescence imaging. Experiments were repeated 6 times for each BGE composition. Fluorescent intensity sigmoidal signals were treated with Excel (Microsoft, USA) so as to measure the time at the inflexion point corresponding to the time at the peak apex of the signal first derivative as shown in Fig.S2.

The electroosmotic mobility, μ_{eo} ($\text{cm}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$) was calculated from the following equation, where l is the distance of detection system (6 cm is the total length of microchannel), V is the applied voltage (800 V) and t_{eo} is EO time:

$$\mu_{eo} = \frac{l^2}{V t_{eo}} \quad (1)$$

3. Results and discussions

In this work, the monomers pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) and triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione as thiol and allyl precursors, respectively, were selected because their ene and thiol groups situated at the terminal position allow for easy click chemistry reaction for the chip sealing. The mass ratios of thiol-ene polymers used were the optimized ratios for the chip sealing: 2.5:1 (w/w) and 1:1.3 (w/w) thiol-ene.⁵⁵

The physico-chemical properties of OSTE plates were studied by Raman spectroscopy, WCA and optical characterizations. Then, the ionic strength dependence of the current-monitoring method for the EOF determination were evaluated and EO values were compared with the ones obtained with the neutral marker method at pH 7 (phosphate buffer), 10 (carbonate buffer), 12 (phosphate buffer) for IS = 20, 18, 15 and 10 mM in 1.3 allyl microchannels. Finally, the pH dependence of EOF was investigated in OSTE microchannels

over a pH range 3-12 (IS = 18 and 20 mM), and the stability of the surface charge density over time was evaluated at pH 7 (phosphate buffer, IS = 18 and 20 mM).

3.1. Surface characterizations of OSTE plates

Raman spectroscopy characterizations permit to compare the relative densities of functional groups on the surface of OSTE substrates. Raman spectroscopy spectra of 1:1.3 and 2.5:1 thiol-ene (w/w) polymer are presented on Fig1.

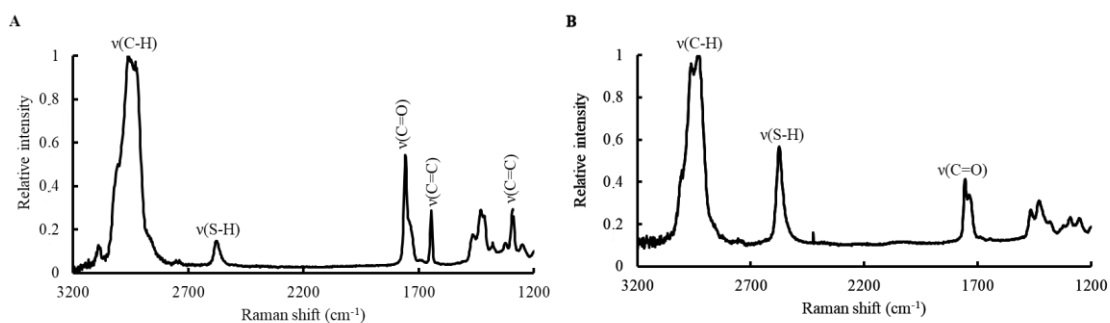


Fig1. Raman spectroscopy spectra of raw OSTE plates with the following formulations: (A) 1.3 allyl and (B) 2.5 thiol substrate.

The peak at 2930 cm^{-1} observed on Fig1A and 1B corresponds to the stretching mode of C-H bond. The peak at 2572 cm^{-1} observed on Fig1A and 1B corresponds to the stretching mode of S-H bond.⁵⁵ The peak intensity is 6 times higher for thiol excess substrates than for allyl excess ones, with is consistent with the polymer formulation.⁵⁵ The peak at 1754 cm^{-1} and 1744 cm^{-1} corresponds to the stretching mode of C=O group of the triazine-trione ring²¹¹ and the ester of the pentaerythritol group²¹², respectively (Fig1). The ratios of intensity of $1754\text{ cm}^{-1}/1744\text{ cm}^{-1}$ peaks are 3 (Fig 1A) and 1 (Fig 1B) for allyl and thiol excess substrates, respectively, which is consistent with the polymer formulation. The peaks at 1642 cm^{-1} and 1288 cm^{-1} are characteristics of the stretching mode of C=C.⁵⁵ These last peaks are present on the spectrum of allyl excess substrate but not on thiol excess ones which is again consistent with the polymer formulation.⁵⁵

WCA measurements permitted to characterize the hydrophilic properties over time of the OSTE substrate stored at room temperature and in air (Fig2).

For allyl excess substrates, the WCA values are between 55° and 65° and for thiol excess substrate between 43° and 76° (Fig2), indicating a hydrophilic surface, that can favor high EO rates in accordance with Campos et al. results⁵⁵. WCA values for allyl excess surfaces are

relatively stable for 2 weeks (Fig2). For thiol excess surfaces, the WCA value just after the photopolymerization is equal to $43.4 \pm 2.1^\circ$ and increase up to $\sim 64^\circ$ approximately, two days after photopolymerization. Between days 2 and 14, WCA values stay relatively stable with an average of 64° (Fig2). Tähkä et al.⁶² showed that WCA values of thiol excess substrates photopolymerized without photoinitiator diminished approximately by 20° on 14 days due to the oxidation of the free thiol groups with oxygen of the ambient air. In this study, the WCA values of thiol excess substrates evolve for the two first days after polymer photoreticulation, probably due to the degradation of the photoinitiator introduced in excess for the photopolymerization.⁶² With these results we have shown that it is better to use the OSTE polymer, particularly when it is composed with an excess of thiol groups, few days after the photoreticulation until to attain a stabilization of the hydrophilic properties of the surface of the substrate.

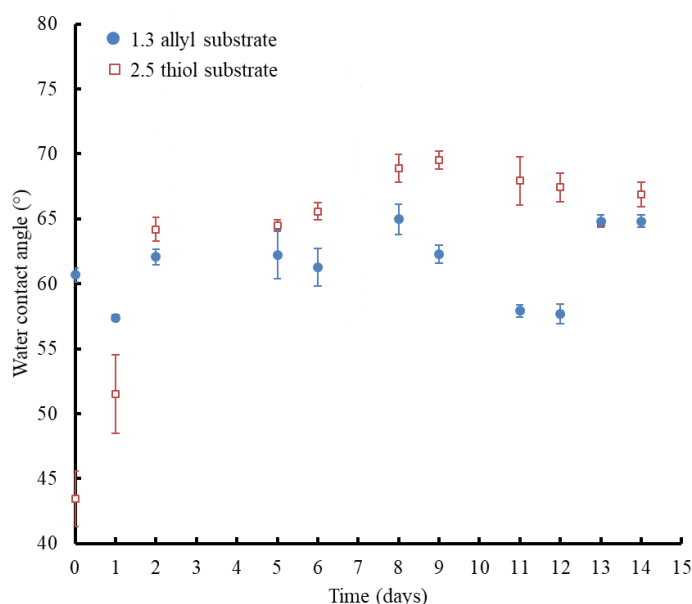


Fig2. Evolution of WCA measurements as a function of time storage (0 to 14 days) for allyl excess and thiol excess substrates photopolymerized with a photoinitiator. Error bars are the standard deviation for $n=3$.

To use OSTE microchips as MCE system, it is necessary to assess the chemical resistance of the polymer with common media used for electrokinetic separations or for microchannel washing. To this aim, OSTE plates were immersed in different media for several hours and the surfaces were characterized by optical microscopy. We tested a classical BGE for electrokinetic separations: sodium phosphate buffer. Moreover, we tested the addition of anionic and cationic surfactants, SDS and CTAB, respectively, at a concentration below their

critical micellar concentration, in this buffer, as they are generally employed for dynamic coating to modify the surface charges of microchannel walls²¹³. Ethanol and acetone were also tested, as organic solvents employed for microchannel washing. The OSTE plates were immersed in each of these media, and the control experiment consisted in immersing OSTE plates in ultra-pure water.

Table 1. Chemical resistance tests of allyl excess and thiol excess substrates immersed into different solvents. +++: no macroscopic effect. ++: few asperities on the surface. +: a lots asperities on the surface. -: rough surface. --: crater on the surface. ---: partial dissolution of the polymer.

Solvents	1.3 allyl substrate	2.5 thiol substrate
Milli-Q water	+++	+++
Phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)	+++	+++
Phosphate buffer with SDS (0.3 mM)	++	+
Phosphate buffer with CTAB (0.3 mM)	+++	+++
Ethanol	+++	++
Acetone	-	---

From optical measurements, the OSTE substrates are resistant to common media used for electrophoretic separations (phosphate sodium buffer with or without SDS and CTAB). The two configurations of OSTE substrates resist to ethanol but not to acetone because it is a solvent with a high dipolar moment²¹⁴. It seems that the substrate with an excess of thiol has a weaker resistance to anionic surfactant and organic solvents (Table 1).

3.2. Methodological approaches to EOF determination in OSTE microchannels

To perform MCE separations with a new polymeric material, the evaluation of electroosmotic flow over a large range of pH is crucial.²¹⁵ The two most commonly used methods are the current-monitoring and the neutral marker methods. The current-monitoring method relies on the time required for a dilute buffer to displace a more concentrated one (or the other way around) under an electrical field along the entire microchannel. As the dilute buffer is less conductive than the concentrated one, the electrophoretic current should decrease over time as the dilute buffer progressively enters in the microchannel (or the other way around) (FigS1).^{204,215} The main weakness of this method is that the different ionic strengths of BGE used during analysis may induce wall surface density instabilities and therefore a lack of method robustness.^{203,204,215} The neutral marker method consists in

measuring the time required for a neutral marker molecule to migrate to the detection system under an electric field. The main weakness of this method is the possible adsorption of the neutral marker leading to EOF instabilities between each analysis.²⁰⁴ So, the methodological choice to determine electroosmotic mobility in a new microchannel materials is crucial.²¹⁵ In this context, both methods were studied and compared, for the OSTE materials in a systematic approach.

1.3 allyl microchannel was used throughout the study for the wetting properties and long-term stability of 1:1.3 (w/w) thiol-ene surfaces. Cathodic separations were performed in OSTE microchannels under a 800 V to assure a good stability of the intensity throughout the analysis in the pH range studied and with all the BGE compositions used (by checking the Ohm's law, data not shown).

The electroosmotic mobility was determined with the current-monitoring and the neutral marker methods for phosphate (pH 7 and 12) and carbonate (pH 10) buffers for $\Delta IS = 2, 5$ and 10 mM. Table 2 presents electroosmotic mobility corresponding to an average of 3 repetitions of experiments with low ionic strength (IS_L) BGE that replaces the high ionic strength (IS_H) BGE ($IS_L \rightarrow IS_H$) and 3 repetitions in the other way around ($IS_H \rightarrow IS_L$). The mean of the both experiments ($n=6$) is also given in Table 2. Concerning the neutral marker method, $27 \mu M$ rhodamine B prepared in phosphate (pH 7 and 12) and carbonate (pH 10) buffers ($IS = 20$ mM) was used as neutral marker. This fluorophore was selected, as Campos et al.⁵⁵ have shown that this neutral marker has a negligible adsorption on OSTE surfaces. All analyses were performed in with one unique 1.3 allyl microchannel.

For pH 7, 10 and 12 the electroosmotic mobility is evaluated between 20 and $37 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, evidencing a negative charge on 1.3 allyl microchannel. This may be probably due to the presence of thiolate chemical functions (pK_a 8-10 in solution), in accordance with other studies^{55,62,202}.

Table 2. Electroosmotic mobility values ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) in 1.3 allyl microchannel, determined with the current-monitoring and the neutral marker method at pH 7, 10 and 12. ΔIS tested with the current monitoring method were: 2 mM ($\text{IS}=20/18 \text{ mM}$), 5 mM ($\text{IS}=20/15 \text{ mM}$) and 10 mM ($\text{IS}=20/10\text{mM}$). 3 repetitions were made with IS_L buffer which replaces IS_H ($\text{IS}_L \rightarrow \text{IS}_H$) and 3 repetitions were made with IS_H buffer which replaces the IS_L buffer ($\text{IS}_H \rightarrow \text{IS}_L$). The mean of both experiments is given for $n=6$. The electroosmotic mobility measurements with the neutral marker (rhodamine B) method were repeated 6 times ($n=6$).

Electroosmotic mobility value ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)							
	Current-monitoring method						Neutral marker method
	$\Delta\text{IS}= 2 \text{ mM}$		$\Delta\text{IS}= 5 \text{ mM}$		$\Delta\text{IS}= 10 \text{ mM}$		
pH	$\text{IS}_L \rightarrow \text{IS}_H$	$\text{IS}_H \rightarrow \text{IS}_L$	$\text{IS}_L \rightarrow \text{IS}_H$	$\text{IS}_H \rightarrow \text{IS}_L$	$\text{IS}_L \rightarrow \text{IS}_H$	$\text{IS}_H \rightarrow \text{IS}_L$	20 mM
7	26.6 \pm 5.6 (n=3)	27.6 \pm 1.2 (n=3)	25.0 \pm 3.2 (n=3)	29.9 \pm 4.2 (n=3)	27.6 \pm 5.6 (n=3)	35.9 \pm 5.3 (n=3)	25.5 \pm 1.6 (n=6)
	27.1 \pm 3.8 (n=6)		27.5 \pm 4.3 (n=6)		31.7 \pm 6.7 (n=6)		
10	20.5 \pm 3.2 (n=3)	22.8 \pm 3.8 (n=3)	24.1 \pm 4.3 (n=3)	31.2 \pm 5.2 (n=3)	32.5 \pm 9.0 (n=3)	30.3 \pm 4.2 (n=3)	19.6 \pm 2.2 (n=6)
	21.6 \pm 3.8 (n=6)		27.7 \pm 5.8 (n=6)		31.4 \pm 6.4 (n=6)		
12	24.5 \pm 1.8 (n=3)	23.7 \pm 2.5 (n=3)	26.3 \pm 4.0 (n=3)	30.1 \pm 3.7 (n=3)	32.0 \pm 6.9 (n=3)	36.9 \pm 4.1 (n=3)	22.3 \pm 3.0 (n=6)
	24.1 \pm 2.0 (n=6)		28.2 \pm 4.0 (n=6)		34.5 \pm 5.8 (n=6)		

Concerning the current monitoring method, when IS_H buffer replaces IS_L buffer, the electroosmotic time is higher than when IS_L buffer replaces the IS_H buffer, in accordance with the study of Lim et al.²¹⁵ This phenomenon, named hysteresis effects,²¹⁵ is based on the hydronium (H_3O^+) depletion (diminution of hydronium concentration) and accumulation (increasing of hydronium concentration) in microchannel during the analysis resulting to a pH change that alters the zeta potential in the microchannel and thus alters the electroosmotic

mobility. The pH for the IS_L and IS_H buffers is identical and thus both BGE have the same concentration of hydronium. When the IS_H buffer replaces the IS_L buffer, the inlet flux of H₃O⁺ is lower than the outlet flux provoking the depletion of hydronium at the boundary of BGE. In contrast, when IS_L buffer replaces the IS_H buffer, the inlet flux H₃O⁺ is higher than the outlet flux, causing accumulation of hydronium at the interface of the two BGE.²¹⁵ The zeta potential development at OSTE surface is caused by the deprotonation of thiol groups in contact with an aqueous solution: $\text{-SH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{-S}^- + \text{H}_3\text{O}^+$. If the H₃O⁺ concentration increases, the equilibrium shifts to the left, resulting in lesser S⁻ groups. This effect lowers the concentration of negatively-charged groups on the OSTE surface and reduces the magnitude of zeta potential. But if the H₃O⁺ concentration diminishes, the equilibrium shifts to the right, resulting in higher S⁻ groups. As the zeta potential increases with the pH, when IS_H buffer replaces the IS_L, the electroosmotic flow is higher than when IS_L buffer replaces the IS_H buffer.²¹⁵

Concerning the neutral marker method, the electroosmotic mobility and standard deviation increases with ΔIS . For example at pH 10, μ_{eo} increases from $21.6 \pm 3.8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ to $27.7 \pm 5.8 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, and to $31.4 \pm 6.4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n=6$) when ΔIS increases from 2 mM, to 5 mM and 10 mM, respectively. These results permit to conclude that: i) the hysteresis effect increases with ΔIS ii) and leads to less reproducible experiments.

Smaller standard deviations are obtained with the neutral marker method (Table 2). It means that this method is more robust compared to the current-monitoring method. The electroosmotic mobility difference between the current-monitoring and the neutral marker methods is equal to 8%, 19% and 31% for ΔIS equal to 2 mM, 5 mM and 10 mM respectively. Therefore, one should privilege either the neutral marker method or the current-monitoring method with a very low ΔIS . However, the very low difference in current intensity with low ΔIS can lead to a lesser precision of the measure. The neutral marker method implies the use of a chemical apart from the BGE, that must be neutral at the pH of study, which can lead to constraints.

3.3. EOF in OSTE microchannels for a pH range from 3 to 12

The EOF in 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels was determined with the current-monitoring method ($\Delta\text{IS} = 2 \text{ mM}$) for pH 3 and 4, and with the neutral marker method from pH 5 to 12 (Fig3). Indeed, the marker used in this study (rhodamine B, $\text{pK}_\text{A} = 3.1$ ²¹⁶) is charged at pH 3 and 4. It is complicated to have a fluorescent marker neutral in a large range of pH and

compatible with the excitation and emission filter used (A 550 nm excitation and a 605 nm emission filter) to have the lower autofluorescence as possible of the OSTE substrate. In our case the current monitoring method used to determine μ_{eo} at pH 3 and 4 permit to avoid the use of another excitation and emission filter. Different batches of OSTE chips were used to determine the electroosmotic mobility as a function of pH. For each new chips, electroosmotic mobility were measured with the neutral marker method at pH 10 to verify the reproducibility of the microfabrication with an error inferior to 10%.

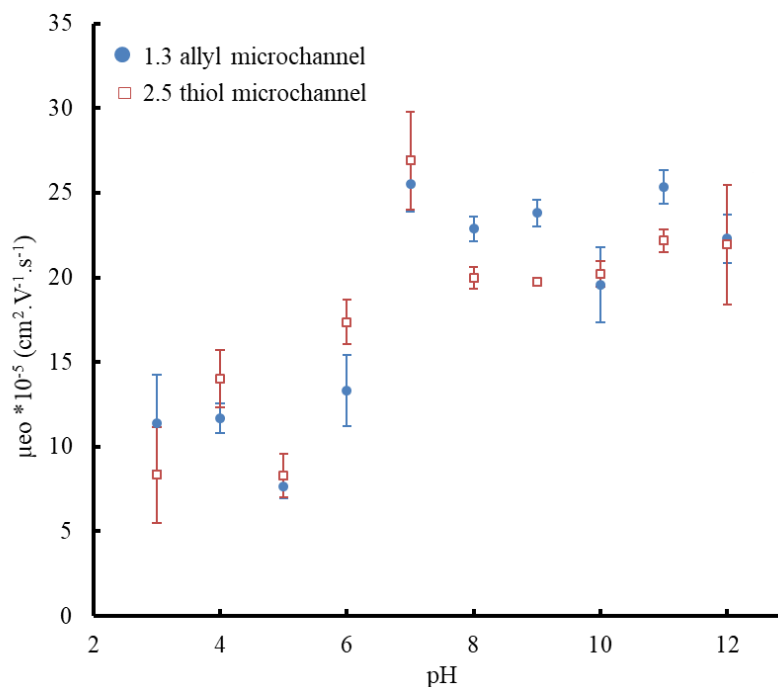


Fig3. pH dependence of μ_{eo} in 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels for a pH range for 3 to 12 were determined at pH 3 and 4 with the current-monitoring method ($\Delta IS = 2$ mM) with $IS_L \rightarrow IS_H$ (n=3) and $IS_H \rightarrow IS_L$ (n=3). μ_{eo} were determined from pH 5 to 12 with the neutral marker method. Error bars represent standard deviations for n=6.

From pH 3 to 12, electroosmotic mobility vary between 8.4 and $22.0 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, and is similar for both OSTE microchip formulations (1.3 allyl and 2.5 thiol) (Fig3), which is in accordance with other studies.^{62,202} Thus, the thiol or ene excess configurations used for microchannel manufacturing do not seem to influence the EOF. The electroosmotic mobility increased from pH 3 to pH 6 and then reached a plateau at pH ~ 7 (Fig3). This evolution is in accordance with the pKa value of thiol groups in solution (pKa 8-10). The pH-dependence has already been reported with OSTE microchannel photopolymerized without photoinitiator and show similar values.^{62,202,217} The obtained results show that the μ_{eo} of OSTE microchannels are lower than those obtained with glass chip ($20 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ for pH 4 to $100 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

for pH 12)²¹⁸ indicating that the negative charge densities of OSTE materials (-S-) are less important than on glass (SiO-). However, the value of electroosmotic mobility usually used in the pH range (2-12) for conventional electrokinetic separations is situated between 10 to 70 * 10⁻⁵ cm².V⁻¹.s⁻¹ ²¹⁹, thus the OSTE microchannels are adaptable for MCE applications.

3.4. EOF stability

The EOF stability in 2.5 thiol and 1.3 allyl microchannels stored at room temperature and in air for 14 days was studied with the current-monitoring method at pH 7 and $\Delta I = 2$ mM with one microchannel for each configuration (1.3 allyl and 2.5 thiol) (Fig4).

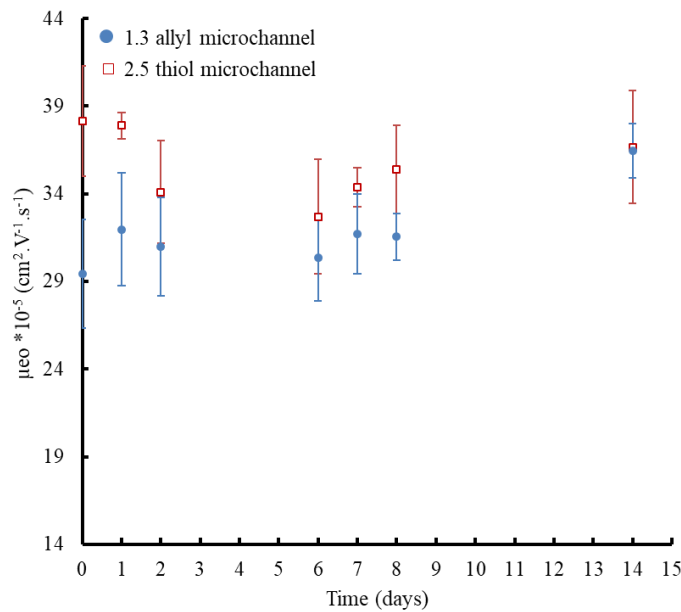


Fig4. Evolution of μ_{eo} in function of storage time (0 to 14 days) for 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels. μ_{eo} was monitoring with the current-monitoring method in the phosphate buffer (pH 7, IS= 20 /18 mM). The experiments were repeated 3 times when IS_L buffer replaces IS_H buffer and 3 times in the other way. The results presented are the average of the 6 experiments. Error bars represent standard deviations for n=6.

No significant modification of the electroosmotic mobility upon storage in ambient air can be observed over a period of 14 days (Fig4). Therefore, the modification of wettability observed in the two first days after photopolymerization for thiol excess substrate, is probably due to the degradation of the photoinitiator and has no critical effect on the electroosmotic mobility.

The variation in μ_{eo} is around 24% at pH 7 from one microchannel to another (Fig3 and 4). This difference can be explained by the experimental conditions for the

photoreticulation of the OSTE polymer.⁶² To increase the microfabrication reproducibility, the power of the UV lamp must be control and the photoinitiator must be regularly renewed by a new solution due to its degradation over time.

4. Conclusion

The electroosmotic mobility was determined in various BGEs (from pH 3 to 12) with two OSTE microchip configurations, *i.e.* 1:1.3 (w/w) thiol-ene microchannel and 2.5:1 (w/w) thiol-ene top cover (named 1.3 allyl microchannel) and 2.5:1 (w/w) thiol-ene microchannel and 1:1.3 (w/w) thiol-ene top cover (named 2.5 thiol microchannel) that were photopolymerized in the presence of a photoinitiator. Two methods for EOF determination, the current-monitoring and the neutral marker methods, in MCE systems were compared in terms of robustness at pH 7, 10 and 12. The most reproducible μ_{eo} were obtained with the neutral marker method. Indeed, the use of two BGE with different ionic strengths with the current-monitoring method provides a hysteresis effect due to the destabilization of the electric double layer at the solid/solution interface during analysis. It was evidenced that the hysteresis effect diminishes with the difference in ionic strength used for the high and low ionic strength BGE. The current monitoring method with the lower difference in ionic strength ($\Delta IS = 2$ mM) provides similar values as the ones obtained with the neutral marker method. Therefore, according to cases and conditions, one could privilege the neutral marker method or the current monitoring method.

The evolution of the electroosmotic mobility in the 3-12 pH indicates the presence of negative charges on the channel surface, due to the presence of thiolate groups, with comparable charge densities for 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels. The negative density increases over pH, reaching a plateau at pH 7. This evolution is comparable to the one in OSTE microchannels produced without photoinitiator. The μ_{eo} values were stable for 14 days for chips that were stored at room temperature and in air. This opens the way for the development of controlled MCE systems for analysis of any complex samples.

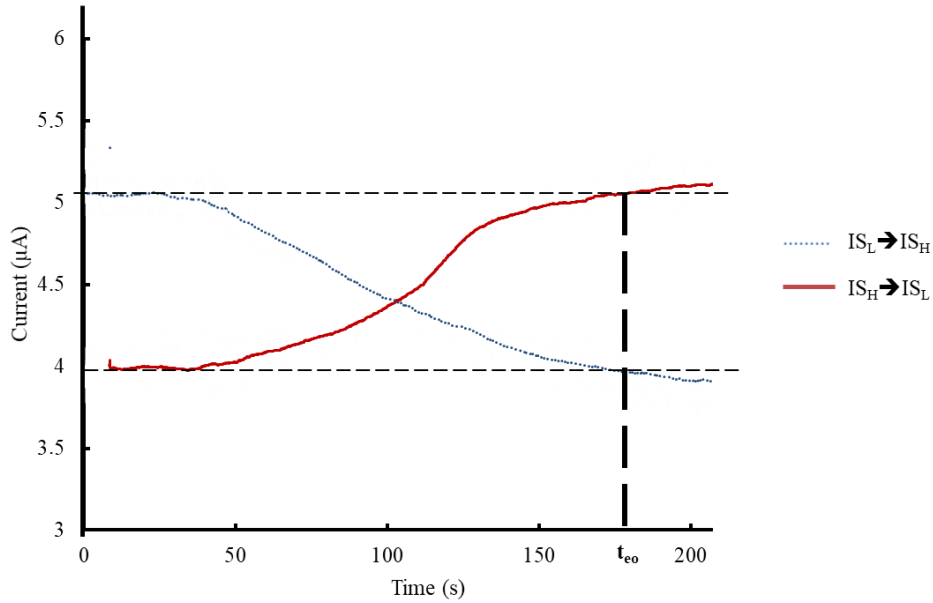
Acknowledgments

This work was financially supported by CAPES-COFECUB (802-14); FAPESP (2013/22127-2); CNPq (444514/2014-7); INCTBio and Michem.

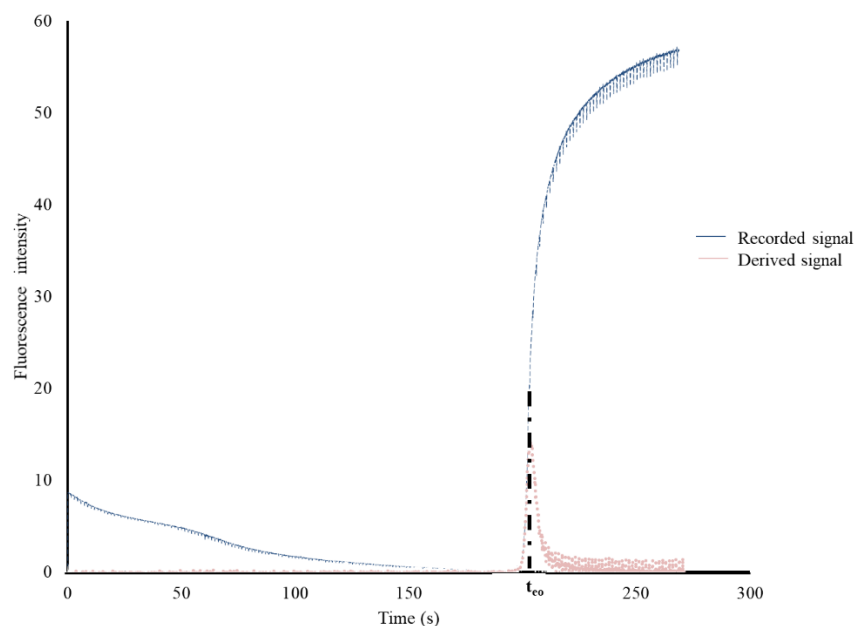
This study has received the technical support of “Institut Pierre-Gilles de Gennes” (laboratoire d’excellence, “Investissements d’avenir” program ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-10-LABX-31).

S.B. acknowledges PSL (France) for their support.

Supporting information



FigS1. Electrophoretic current *vs* time for one example of current-monitoring measurement of electroosmotic flow in 1.3 allyl microchannel with the sodium carbonate buffer (pH 10, $\Delta IS=5$ mM). The electrophoretic potential was 800 V. The experiments were made with the IS_L buffer replaced the IS_H (IS_L \rightarrow IS_H) and with the IS_H buffer replaced the IS_L (IS_H \rightarrow IS_L). The dashed lines illustrate the method used to determine the endpoint for t_{eo} value.



FigS2. Electrophoretic fluorescence *vs* time for one example of neutral monitoring measurement of electroosmotic flow in 1.3 allyl in microchannel. The BGE used was carbonate buffer (IS = 20 mM, pH 10). The electrophoretic potential was 800 V. The dashed lines illustrate the method used to determine the endpoint for t_{eo} value due to the derivatization of the recorded signal.

III.3. Strategies for aptamer immobilization

In the previous section, the surface of OSTE substrates were characterized by Raman, WCA measurements, optical microscopy and electroosmotic flow was determined. In this section, strategies of functionalization of this thermoset by aptamers were studied in order to create multiple zones into microchannel for extraction of analyte of interest.

Modification strategies of off-stoichiometry thiol-ene polymer surface by aptamers: a methodological study

*Samantha Bourg*¹, *Fanny d'Orlyé*¹, *Sophie Griveau*¹, *Fethi Bedioui*¹, *José Alberto Fracassi da Silva*^{2*},
Anne Varenne^{1*}

¹ *Chimie ParisTech PSL, CNRS FRE 2027, Institute of Chemistry for Life and Health Sciences, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris France*

² *Department of Analytical Chemistry-Chemistry Institute, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil*

Corresponding authors:

J. A. F. Da Silva*

E-mail: fracassi@iqm.unicamp.br

A. Varenne*

E-mail: anne.varenne@chimieparistech.psl.eu

Abbreviation: AuNPs (gold nanoparticles) ; EDS (energy dispersive spectroscopy) ; OSTE (off-stoichiometry thiol-ene polymer) ; PMMA (polymethyl methacrylate) ; SEM (scanning electron microscopy) ; UV (ultraviolet) ; XPS (X-ray photoelectron spectroscopy).

Abstract

Off-stoichiometry thiol-ene polymer (OSTE) is an promising emerging substrate in the microfluidic field. This polymer based on the versatile UV-curable thiol-ene chemistry, with an excess of thiol or allyl groups at its surface, may allow the attachment of (bio)receptor molecules through incubation or UV treatments. Additionally, physico-chemical properties can be tuned by adjusting the molar ratio of monomers. We report here on the immobilization of thiol-modified (C3-SH) aptamers on OSTE polymer surfaces by two functionalization strategies. The first one relies on a direct UV-initiated click chemistry reaction to graft thiol-terminated aptamers on ene-terminated OSTE polymer surfaces. The second one consists on the immobilization of thiol-terminated aptamers onto OSTE substrates covered by gold nanoparticles. The presence of an intermediate gold nanoparticles layer has shown great interest in allowing for efficient immobilization of aptamers and preventing their non-specific adsorption, for further use in lab-on-a-chip designs.

1. Introduction

Polymeric materials are very useful for the development of microfluidic systems such as lab-on-chip due to their ease of processing by soft lithography or hot embossing. In particular, Carlborg et al. described the use of Off-Stoichiometry Thiol-Ene polymer (OSTE) for microfluidic applications.⁵⁶ This polymer is prepared through the versatile UV-curable thiol-ene click chemistry.^{55,60,61,63} The first step of this process consists in the formation of a UV-sensitive initiator radical, followed by hydrogen abstraction from a thiol precursor. The resulting thiyl radical can then propagate due to the presence of allyl precursors. The second and final step is the classic propagation chain transfer until thiol-ene polymerization is completed.^{65,66,220} OSTE has several interesting properties such as optical transparency, rapid

prototyping (soft lithography) and uncomplicated processing.⁵⁶ Moreover, thiol-ene polymers are generally insensitive to dioxygen.^{58,59} Finally, due to the presence of thiol and allyl groups in excess, surface modification for analytical applications is facilitated.

In this context, some studies^{55,63} proposed simple and fast (less of 2 h) surface modifications of OSTE polymeric substrates. Bou and Ellis have for example shown the possibility of immobilizing gold nanoparticles (AuNPs) onto OSTE surface to prepare gold electrodes without further biofunctionality.⁶³ AuNPs were immobilized through chemisorption *via* thiolate bonding by incubating OSTE substrates into diluted colloidal gold solution. Two years later, Lafleur et al. presented a rapid and simple method for the preparation of emulsion-templated OSTE monoliths in microfluidic channels based on thiol-ene chemistry.⁶⁰ They also demonstrated that the prepared OSTE monoliths can be reversibly post-functionalized with enzymes through the formation of disulfide bonds upon incubation during several hours at low temperature. In 2016, Çakmakçi et al. reported the functionalization of OSTE surface with thiol excess by maleic anhydride through click chemistry reaction initiated by UV light in the presence of a photoinitiator.⁶¹ The proposed mechanism is the following: thiyl radicals obtained in the first step react with the carbon double bonds of maleic anhydride to form covalent bonds between the polymer and the organic molecule. Similarly, in 2017, Campos et al. immobilized cysteine molecules on microchannels with allyl excess by click chemistry reaction.⁵⁵

The conception of new analytical microfluidic systems often requires microchannel surface modifications to integrate selective ligands towards a target compound for concentration and detection purposes.²²¹ Among others, aptamers are oligonucleotides (DNA or RNA) that interact specifically with their target (like small organic molecules, peptides, nucleic acids, proteins...) by chemical affinity.¹⁵³ They are useful for specific extraction/preconcentration of targets present at low level in complex samples such as biological fluids.⁸⁴ Aptamers can also be labeled with a fluorescent dye or modified with a reactive group for detection purposes or immobilization, respectively. Several chemical methods for the immobilization of aptamers have been developed over the years.²²² The functionalization of macroscopic gold surfaces by aptamers is one of the most common surface treatment method.²²² Typically, a cleaned gold substrate is immersed in an aqueous buffer solution of thiol-terminated aptamers, which then form a self-assembled monolayer-like aptamer on gold surface.²²² Aptamers have also been immobilized onto surfaces of gold nanoparticles (AuNPs) using similar procedures.²²³ In 2013, Girardot et al. proved that aptamers grafted on maghemite/silica core shell particles preserved their activity as compared

to free aptamers in solution.²²⁴ Silicate and silicon substrates have also been used for aptamer immobilization by chemical reaction between pretreated substrates and modified-aptamers. Recently, the direct grafting of aptamers on monolithic structures has attracted attention too.²²⁵ Monolithic supports have generally been chemically modified to insert chemical groups that can further react with modified aptamers. The grafting of aptamers modified by thiol groups was mainly carried out on ene-monolith by heat-²²⁶ or UV-²²⁷ induced click chemistry reaction, the latter in the presence of a photoinitiator. In another work, the high affinity between thiol and gold was used to cover a thiol-substituted monolithic oligosorbent with gold nanoparticles and then immobilize thiol-terminated aptamers on the top of it.²²⁸ Another study proved the retention of aptamers into sol-gel structure (monolith) without any modification or covalent grafting of aptamers on the polymeric network structure, and the preservation of their activity towards their target.¹³²

To the best of our knowledge, no study on the immobilization of aptamers onto OSTE polymer surfaces has been reported so far. We propose here two functionalization strategies using OSTE material as substrate, either with thiol or allyl excess. The first strategy is based on the UV-initiated click chemistry reaction between surface reacting groups and fluorescent labeled aptamers bearing a C3-SH function at the 3' end. The second one involves the coating of OSTE surfaces with AuNPs followed by the immobilization of the same aptamers onto their intermediate AuNP layer. The polymeric surfaces were characterized by SEM, XPS and fluorescence to evidence the immobilization of aptamers.

2. Experimental

2.1. OSTE plates fabrication

In this work, the following monomers have been used for the preparation of OSTE plates: pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) (>90 %, TCI) and triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione (98 %, Sigma Aldrich) as thiol and allyl precursors, respectively, to form OSTE plates (1cm x 3 cm x 0.5 mm) in presence of a 0.01% w/w photoinitiator (ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate) (97 %, Ark Pharm. Inc.) and UV irradiation (5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J, Vilber Lourmat), as described elsewhere.⁵⁵ Briefly, the allyl and thiol precursors were mixed with the photoinitiator in the dark. Then, the mixture was allowed to stand in the dark for 40 minutes to remove air bubbles. Finally, the polymer was poured over a flat PMMA (polymethyl methacrylate) support and exposed to UV radiation for 20 minutes. After UV exposure, the substrates were heated to 70°C for 5 min in the oven to facilitate unmolding. These monomers were selected because their ene and thiol groups at the terminal

position allowed for easy click chemistry reaction and surface functionalization. The ratios between thiol and allyl precursors were: 2.5:1 (w/w) and 1:1.3 (w/w),⁵⁵ named 2.5 thiol and 1.3 allyl respectively.

2.2. OSTE plate functionalizations and characterizations

The aptamer used as proof of concept is a DNA synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT, USA) which has the following sequence: 5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'. 100 μ M aptamer solutions were prepared in 300 mM phosphate buffer (pH 8) + 5 mM MgCl₂ and then heated at 70°C for 10 min. To functionalize OSTE surfaces, aptamers were modified at their 3'-end with C3-SH group. Fluorescence microscopy was used to characterize the aptamers on OSTE plates thanks to a modification at their 5'-end with a fluorescent tag: AlexaFluor® 532. To quantify non-specific adsorption, the same aptamer was used but without C3-SH group at the 3'-end. Control OSTE plates were only treated with aptamer solubilization buffer. Before fluorescence characterization, to remove all excess of aptamers, plates were washed under a continuous flow for 3 min with ultra-pure water (18.2 M Ω .cm resistivity, Purelab Flex system, Elga Veolia, France).

2.3. Fluorescence microscopy

Fluorescence images were recorded using an inverted fluorescence microscopy system (Axio Observer A1, Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with a 120 W metal halide lamp (Osram, Munich, Germany) for fluorescence excitation and a CCD digital camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies Stadtroda, Germany) for image acquisition *via* Hiris software (RD Vision, France). Images were reprocessed by Zen software (Zeiss, Oberkochen, Germany). For all studies, images were recorded using an objective with 10 X magnification. The acquisition parameters of the CCD camera were kept constant, with a 1 s exposition time, a zero gain and zero binning. A 550 nm excitation filter and a 605 nm emission filter (filter set 43 HE, Zeiss) were used for fluorescence imaging. The relative fluorescence gain was presented as follows: (I-I₀)/I₀, with I the fluorescence intensity measured on plates treated with aptamers after rinsing and I₀ the fluorescence intensity measured on OSTE substrates, either raw or gold-coated, according to cases. I and I₀ are the mean of one independent measure on 3 different samples (n=3) treated under identical experimental conditions.

2.4. Gold nanoparticles

AuNP solution (diameter: 54 nm, concentration: $1.4 \cdot 10^{-10}$ mol/L, measured by DLS and UV-Vis characterizations²²⁹) was prepared following the method of Turkevich et al.¹⁹⁹ 95 mL of ultra-pure water with 36.6 μ L HAuCl₄ (99.9 %, Sigma-Aldrich) solution were mixed under heating (100°C) with 1.6 mL of 2 % (w/w) citrate sodium solution (Labsynth, products by Ltda Laboratory) prepared in ultra-pure water. During synthesis, the solution changed from light yellow color to black color and finally to cherry color. The heating was stopped when the colloidal solution was taken the cherry color. The solution was stirred to reach the ambient temperature. The immobilization of AuNPs on OSTE plates was characterized by Scanning Electron Microscopy (MEB, Quanta-FEG-250), by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS, JSM-6360 L) and by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS, Kratos Axis Ultra DLD). Before characterizations, to remove all physisorbed AuNPs, plates were washed for 1 min with ultra-pure water using ultrasound.

2.5. Aptamer immobilization

Two immobilization strategies of thiolated aptamers have been investigated on OSTE plates: i) *via* the click chemistry reaction between the 3'-end C3-SH group of the aptamers and allyl groups on OSTE surfaces under UV irradiation (40 min, 5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J) or ii) *via* the immobilization of aptamers on AuNPs deposited beforehand on OSTE surfaces. For each strategy, a 10 μ L drop of 100 μ M aptamer solution was deposited on OSTE surfaces. Two strategies for immobilization of AuNPs have been studied: i) immersion of plates into AuNP solution (1 day, natural light, room temperature, named "incubation treatment") or ii) deposition of a 10 μ L AuNP suspension drop under UV irradiation (40 min, 5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J, named "UV treatment"). In the same manner, two strategies for aptamer immobilization on gold-coated OSTE surfaces were considered: a 10 μ L drop of 100 μ M aptamer solution was deposited and i) let rest for 24 h in the dark, named "incubation treatment", or ii) UV-irradiated for 40 min (5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J), named "UV treatment". The strategies of aptamer immobilization with detailed procedures are summarized in Figure S1.

3. Results

3.1. Aptamer immobilization by UV-initiated click chemistry reaction

In the first approach, a direct UV-initiated click chemistry reaction was performed to graft thiol-terminated fluorescent aptamers (thiolated aptamers) on OSTE surfaces (**Figure S1**). The ratios of thiol and allyl precursors were: 2.5:1 (w/w) and 1:1.3 (w/w)⁵⁵, named 2.5 thiol and 1.3 allyl respectively. The fluorescence intensity was measured after plate rinsing to remove aptamers in excess. Experiments were run in triplicates on independent polymeric substrates (2.5 thiol and 1.3 allyl). Non-specific adsorption was evaluated by using the same fluorescent aptamer sequence under identical experimental conditions, but without C3-SH modification at the 3' end (non-thiolated aptamer). Results of the direct UV-initiated click chemistry reaction between thiol aptamer and allyl surface function on OSTE plates are shown on **Figure 1**. The fluorescence intensity of plates only treated with solubilization buffer was also measured as control.

Fluorescence gain measured on UV-irradiated OSTE plates modified with thiolated aptamers is significant as compared to control and reaches about 160% and 70% for 2.5 thiol and 1.3 allyl plates, respectively (Figure 1). This indicates the presence of aptamers on OSTE surfaces. It can be noticed that the increase in fluorescence intensity on 2.5 thiol plates is higher than on 1.3 allyl plates probably due to the formation of disulfure bonds between the thiol groups of the aptamer and the 2.5 thiol plate surface.⁶³ However, fluorescence gains of UV-irradiated OSTE plates look similar in presence of thiolated and non-thiolated aptamers. This tends to show that the main mechanism controlling aptamer immobilization on OSTE plates is non-specific adsorption over the expected UV-initiated covalent bonding. Aptamer adsorption may be attributed to strong interactions with the substrate, such as van der Waals forces, π - π interaction, hydrogen bond.²³⁰

3.2. Aptamer immobilization on gold-coated OSTE surfaces

3.2.1. Immobilization of gold nanoparticles

To avoid the non-specific adsorption of aptamers, OSTE surface were chemically treated to create selective bonding between the chemically modified substrate surface and thiolated aptamers. Therefore, a second strategy involving a surface pretreatment with AuNPs

was envisioned. In a first attempt two immobilization ways of AuNPs on OSTE surfaces (2.5 thiol and 1.3 allyl) were explored (**Figure S1**). The first one, named incubation treatment, consisted on immersing OSTE plates into an AuNP solution ($1.4 \cdot 10^{-10}$ mol/L) for 24 h (**Figure S1**). As for the second one, 10 μ L of a AuNP solution ($1.4 \cdot 10^{-10}$ mol/L) was deposited onto OSTE surfaces, that were then irradiated for 40 min under UV light (**Figure S1**). This treatment is named UV treatment. SEM images and corresponding XPS spectra of gold-coated OSTE plates are presented in **Figure 2**.

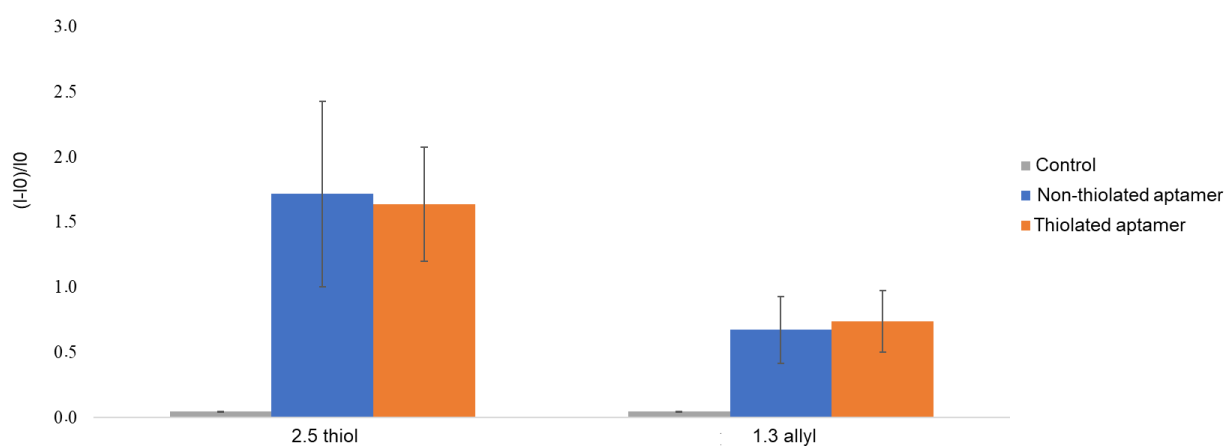


Figure 1. Relative fluorescence intensity of UV-irradiated OSTE plates (2.5 thiol and 1.3 allyl). I_0 is the fluorescence intensity of the raw material and I the fluorescence intensity of UV-irradiated OSTE plates measured after rinsing (See experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). The error bars represent the standard deviation for 3 repetitions.

3.3. Aptamer immobilization on gold-coated OSTE surfaces

3.3.1. Immobilization of gold nanoparticles

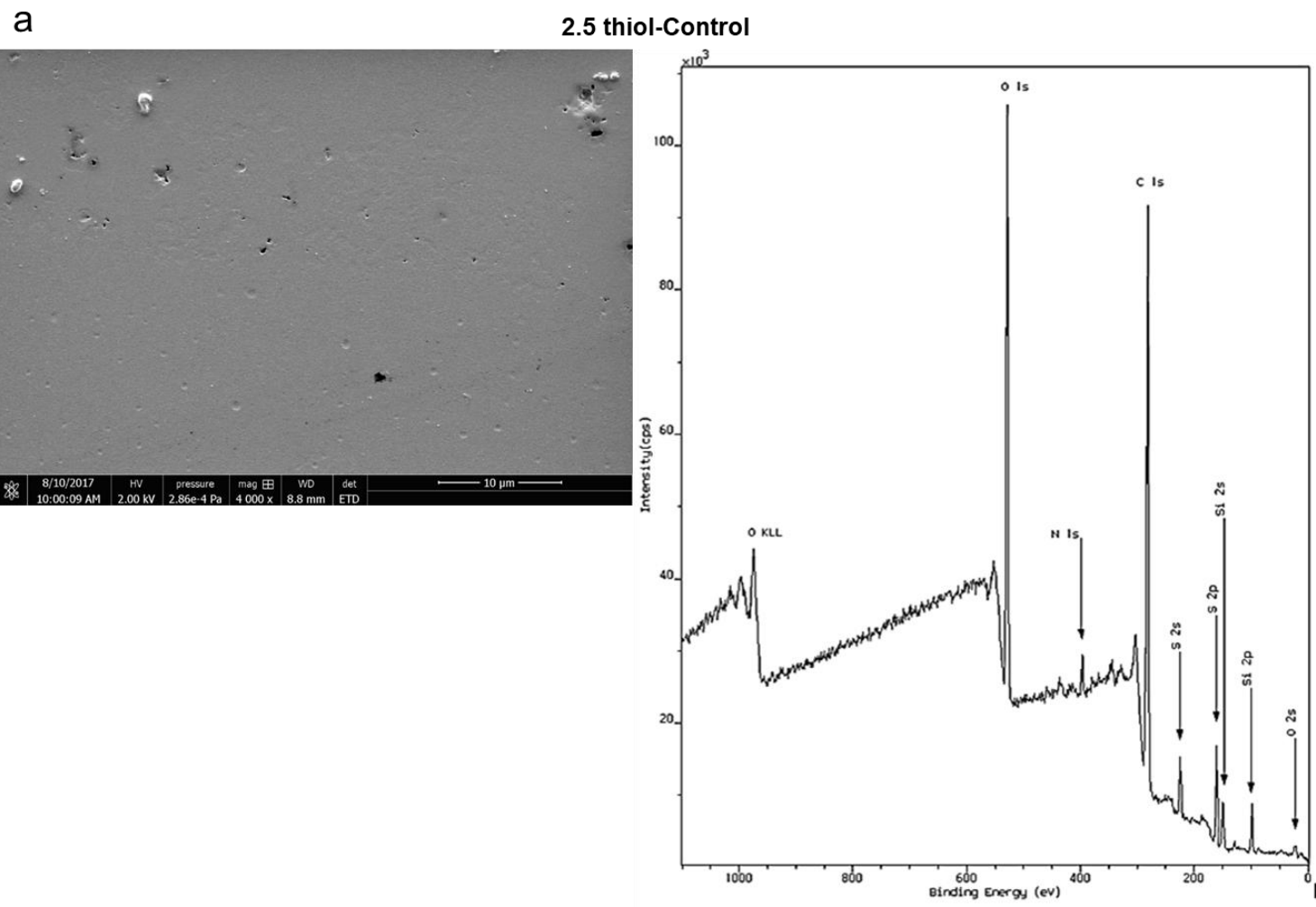
To avoid the non-specific adsorption of aptamers, OSTE surface were chemically treated to create selective bonding between the chemically modified substrate surface and thiolated aptamers. Therefore, a second strategy involving a surface pretreatment with AuNPs was envisioned. In a first attempt two immobilization ways of AuNPs on OSTE surfaces (2.5 thiol and 1.3 allyl) were explored (**Figure S1**). The first one, named incubation treatment, consisted on immersing OSTE plates into an AuNP solution ($1.4 \cdot 10^{-10}$ mol/L) for 24 h (**Figure S1**). As for the second one, 10 μ L of a AuNP solution ($1.4 \cdot 10^{-10}$ mol/L) was deposited onto

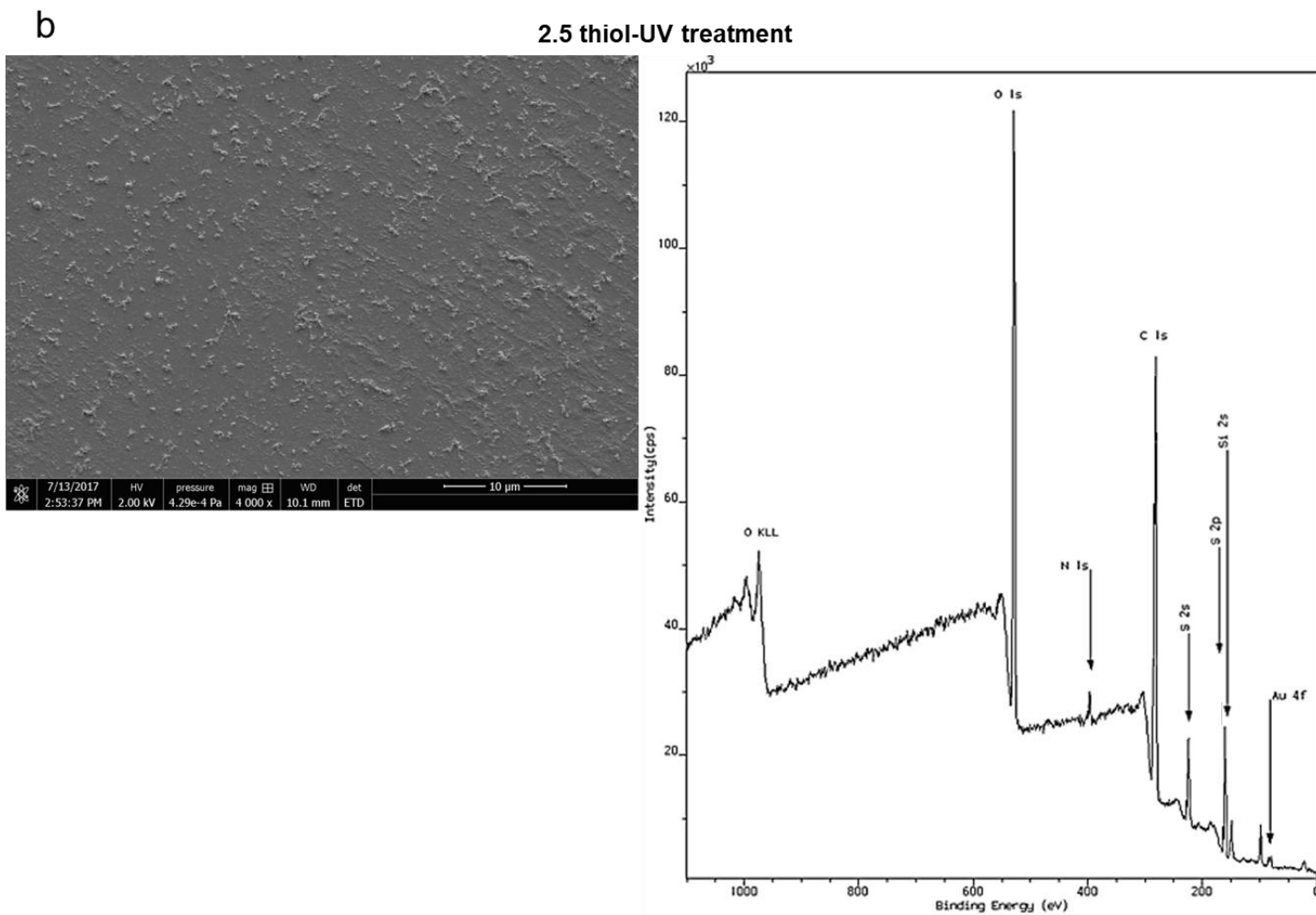
OSTE surfaces, that were then irradiated for 40 min under UV light (**Figure S1**). This treatment is named UV treatment. SEM images and corresponding XPS spectra of gold-coated OSTE plates are presented in **Figure 2**.

The S 2p peak on XPS spectra of OSTE control plates (**Figure 2.a and 2.c**) is 10 times higher for 2.5 thiol plate than for 1.3 allyl plate, with is consistent with the polymer formulation. SEM, EDS and XPS characterizations did not permit to confirm the presence of gold on OSTE surfaces (2.5 thiol and 1.3 allyl) after incubation treatment (**Table S1 and Figure S2**). However, SEM and XPS spectra (**Figure 2**) as well as EDS (**Table S1**) confirmed the presence of gold on OSTE plates after UV treatment. A close observation of the 2.5 thiol and 1.3 allyl surface topologies obtained with SEM characterization seems to evidence the presence of AuNP aggregates (**Figure 2.b and d**). The AuNP monolayer between AuNP aggregate cannot be evidenced due to the resolution of micrography compared to the nanometric size of AuNPs. However, we highlight a more homogeneous distribution of AuNPs aggregate on 2.5 thiol than 1.3 allyl surface (**Figure 2.b and d**). Subsequent aptamer immobilization studies were therefore first performed on the latter substrate.

3.3.2. Immobilization of aptamers

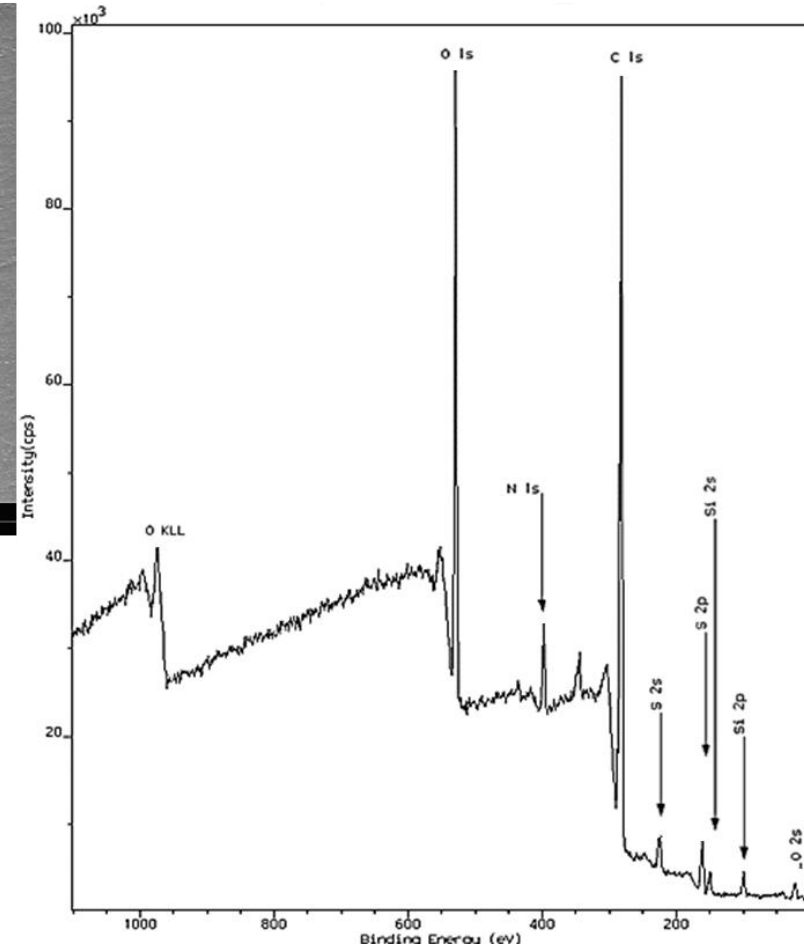
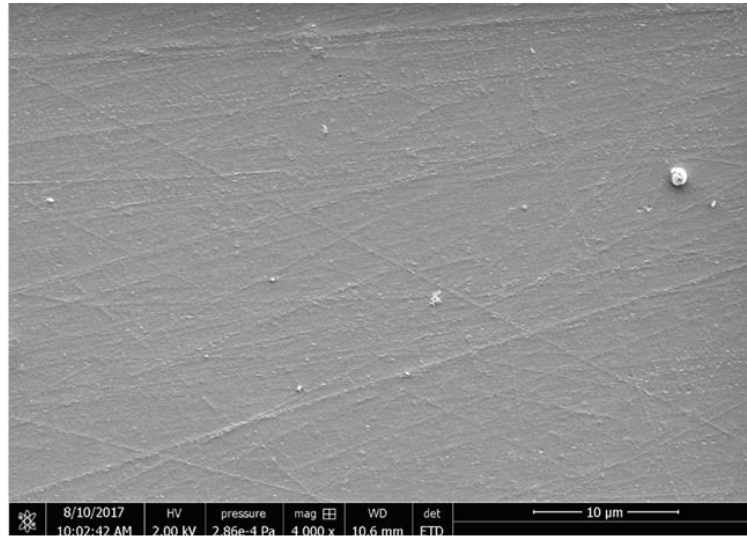
For subsequent C3-SH-modified aptamer immobilization onto AuNPs-coated 2.5 thiol plates by UV treatment, two strategies were employed: incubation or UV treatments (**Figure S1**). Non-specific adsorption was evaluated by implementing the same protocol with non-thiolated aptamers. AuNPs-coated 2.5 thiol plates (UV treatment) treated with solubilization buffer only were considered as control. Corresponding fluorescence gains due to fluorescent aptamer retention onto gold-coated 2.5 thiol plates are displayed in **Figure 3**.





C

1.3 allyl-Control



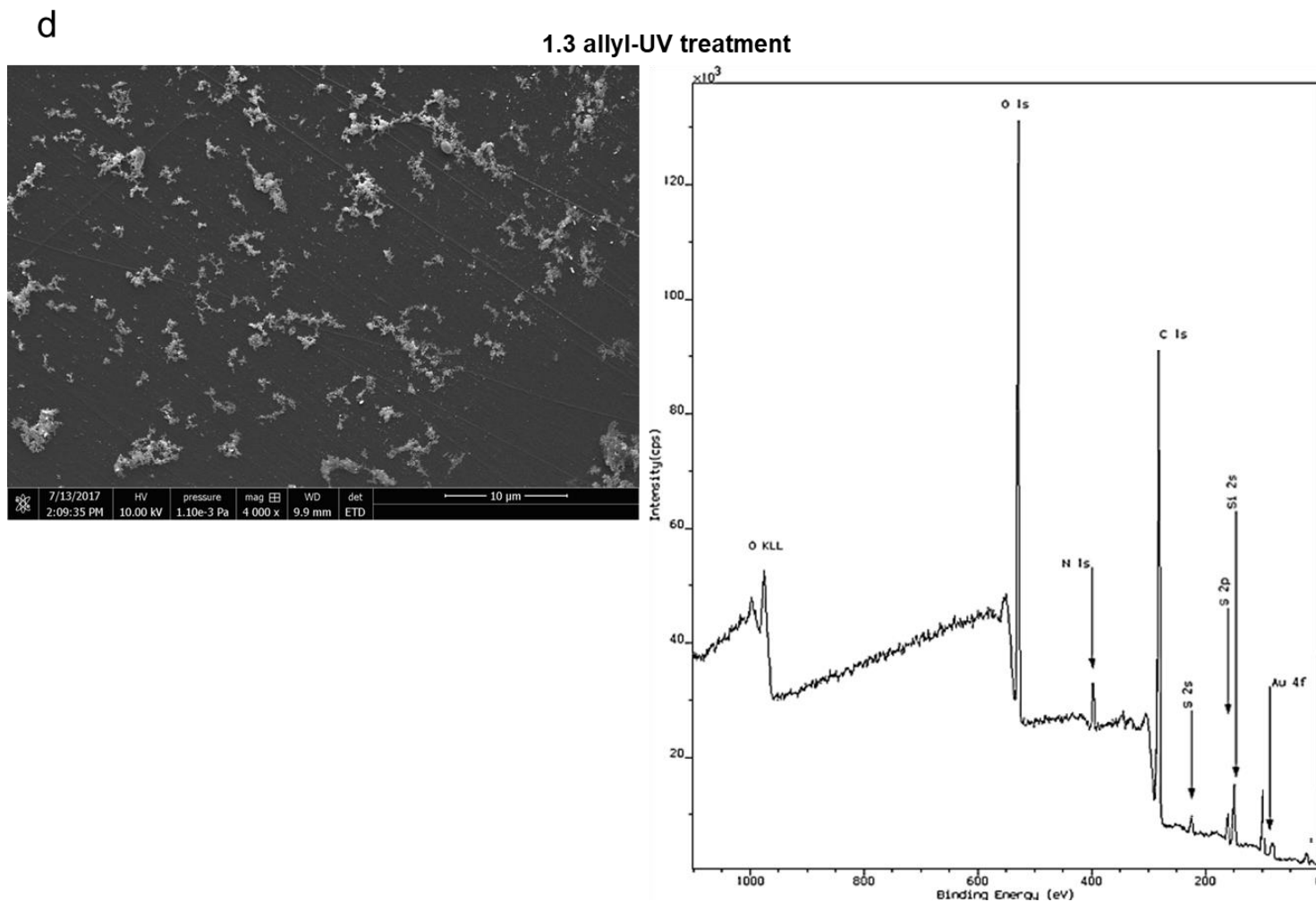


Figure 2. SEM micrography and XPS spectra of OSTE surfaces ((a, b) 2.5 thiol and (c, d) 1.3 allyl) raw material for control (a,c) and after UV treatment (b,d). Plates were washed with ultra-pure water using ultrasound for 1 min before surface characterizations (See experimental section for more details on experimental condition).

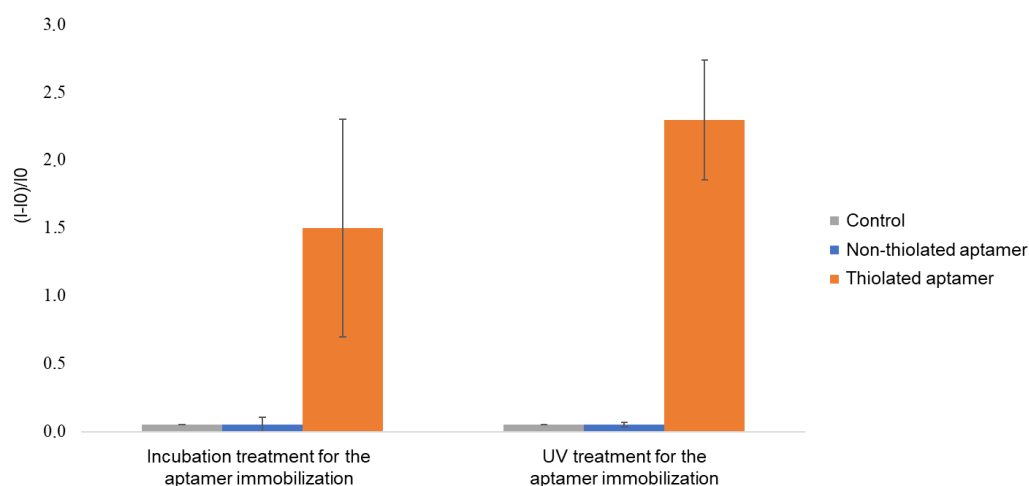


Figure 3. Relative fluorescence intensity of gold-coated 2.5 thiol plates functionalized by fluorescent aptamer. I_0 is the fluorescence intensity of gold-coated 2.5 thiol substrate. I is the intensity of fluorescence measured after functionalization by aptamers and rinsing (See experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). The error bars represent the standard deviation for 3 repetitions.

Whatever experimental strategy (incubation or UV treatment), fluorescence gains are close to zero for the control and plates treated with non-thiolated aptamers. From these results, it clearly appears that the presence of a gold homogeneous nanostructured layer beforehand deposited on 2.5 thiol plates by UV treatment (i) promotes aptamers immobilization through specific covalent bonding and (ii) prevents any non-specific adsorption, as compared to the OSTE plate pretreatment strategy based on UV-irradiation (**Figure 1**). It means that the homogeneous AuNPs layer coated on 2.5 thiol plates prevent aptamer strong interactions (van der Waals forces, π - π interaction, hydrogen bond) with the substrate²³⁰. Besides, the fluorescence gains for AuNPs-coated plates treated with thiolated aptamers are markedly high (150% for incubation treatment and 230% for UV treatment, respectively) (**Figure 3**). It is not possible to quantitatively compare fluorescence gains obtained through UV or incubation treatments as UV excitation induces greater photobleaching of the fluorescent tag. Indeed the exposure of the aptamer fluorescent tag (AlexaFluor® 532) to UV light led to a $64 \pm 10\%$ decrease in measured fluorescence intensity. The UV treatment is a faster treatment than the incubation one.

C3-SH-modified aptamer immobilization onto AuNPs-coated 1.3 allyl plates by UV treatment was performed under the same experimental conditions as for 2.5 thiol AuNPs-coated plates. The obtained results show an important adsorption of non-thiolated aptamer.

Indeed, the relative fluorescence gains values for non-thiolated and thiolated aptamer were 210% and 260% for incubation treatment, and 200% and 130% after UV treatment, respectively (**Figure 4**). This existence of non-specific interaction was mainly attributed to the inhomogeneous coverage of 1.3 allyl plates by AuNPs (**Figure 2.d**), allowing for non-specific adsorption on the native OSTE material. Therefore 2.5 thiol substrate appeared to be the most suitable material to prevent non-specific adsorption after surface pretreatment with AuNPs.

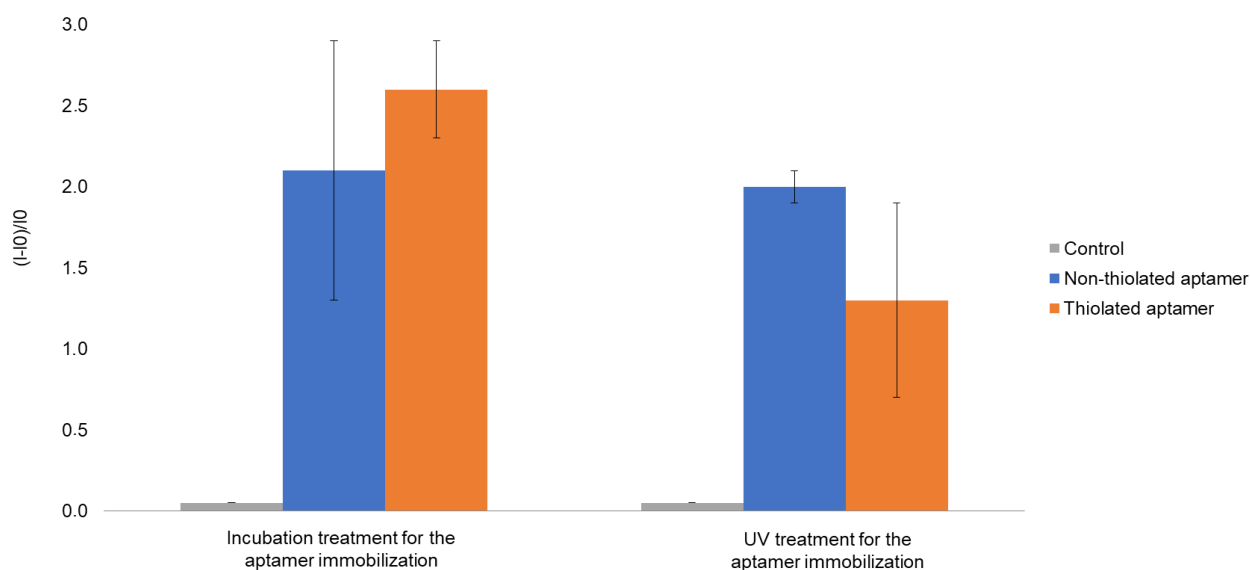


Figure 4. Relative fluorescence intensity of gold-coated 1.3 allyl plates functionalized by fluorescent aptamer. I_0 is the fluorescence intensity of gold-coated 1.3 allyl substrate. I is the intensity of fluorescence measured after functionalization by aptamers and rinsing (See experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). The error bars represent the standard deviation for 3 repetitions.

4. Conclusions

Two strategies for OSTE functionalization by aptamers were studied on thiol-ene substrate with different composition, either with an excess of thiol or allyl groups. The direct UV-initiated click chemistry reaction between allyl groups of OSTE materials and thiolated aptamers favoured the non-specific adsorption of the aptamers on OSTE surface. A second strategy consisted in pre-coating OSTE materials with AuNPs either by incubation or UV treatment, the latter providing a better coverage ruggedness and a more homogeneous distribution of AuNPs on thiol plates. Finally, aptamers modified with C3-SH at their 3'-end were immobilized on gold-coated 2.5 thiol plates by both UV and incubation treatments, with negligible non-specific adsorption. This methodological development allows to further

considering OSTE materials for lab-on-a-chip designs integrating a sample pretreatment step based on molecular recognition by ligands, such as aptamers, in a specific zone of the microchannel.

Acknowledgments

This work was financially supported by CAPES-COFECUB (802-14); FAPESP (2013/22127-2); CNPq (444514/2014-7); INCTBio and Michem.

S.B. acknowledges the Doctoral School ED 406 from Sorbonne University and PSL (France) for their support.

Figures S1, S2 and Table S1 are available supporting information

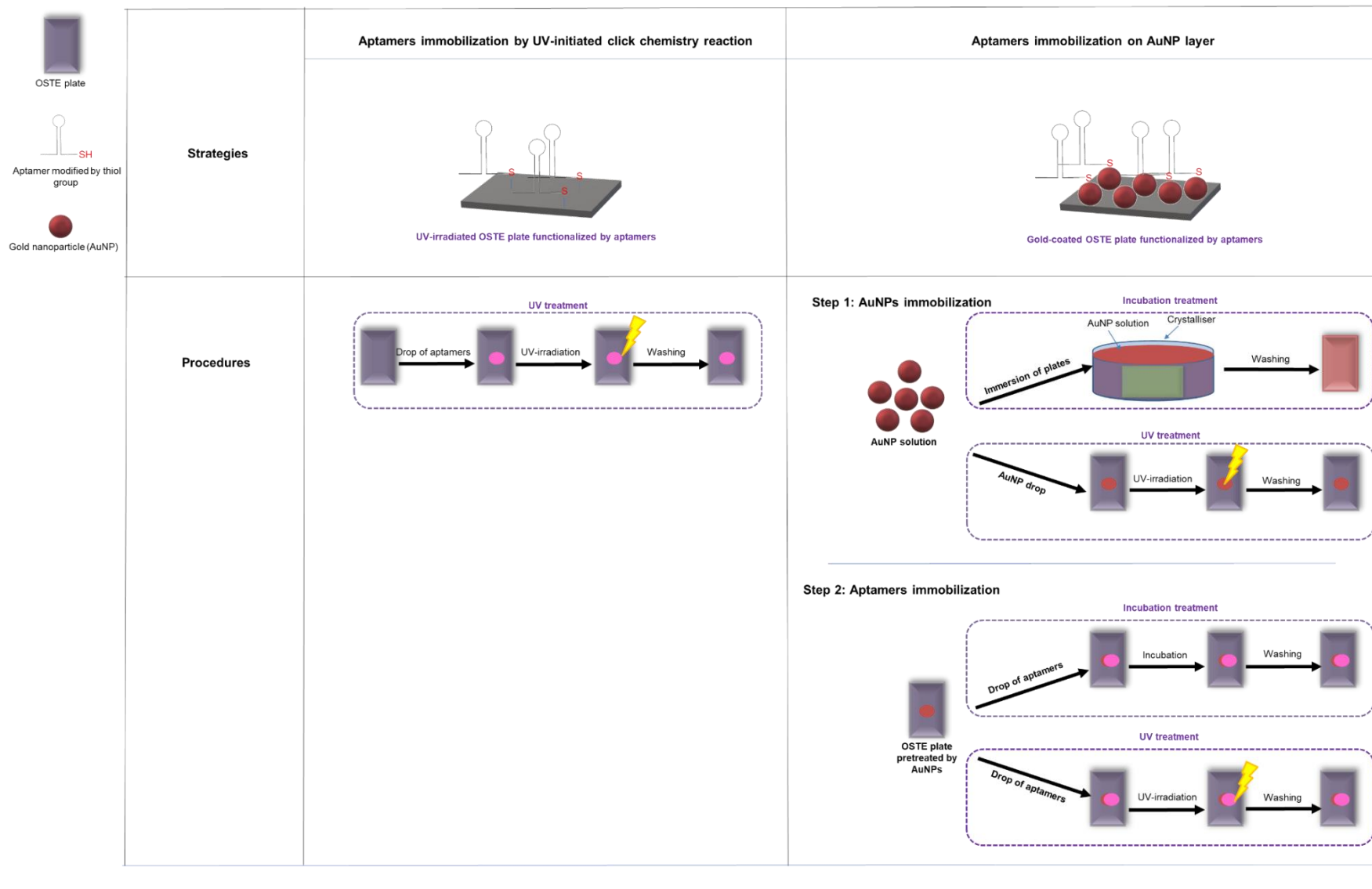


Figure S1. Strategies and procedure of functionalization

Table S1. Gold atoms percentages characterized by EDS of OSTE surfaces either raw or treated (incubation and UV treatments) with gold nanoparticles. Plates were washed with ultra-pure water using ultrasound for 1 min before surface analysis (See experimental section for more details on experimental conditions).

Treatment	2.5 thiol	1.3 allyl
Control	0.00 %	0.00 %
Incubation	2.02 %	0.00 %
UV	0.47 %	0.06 %

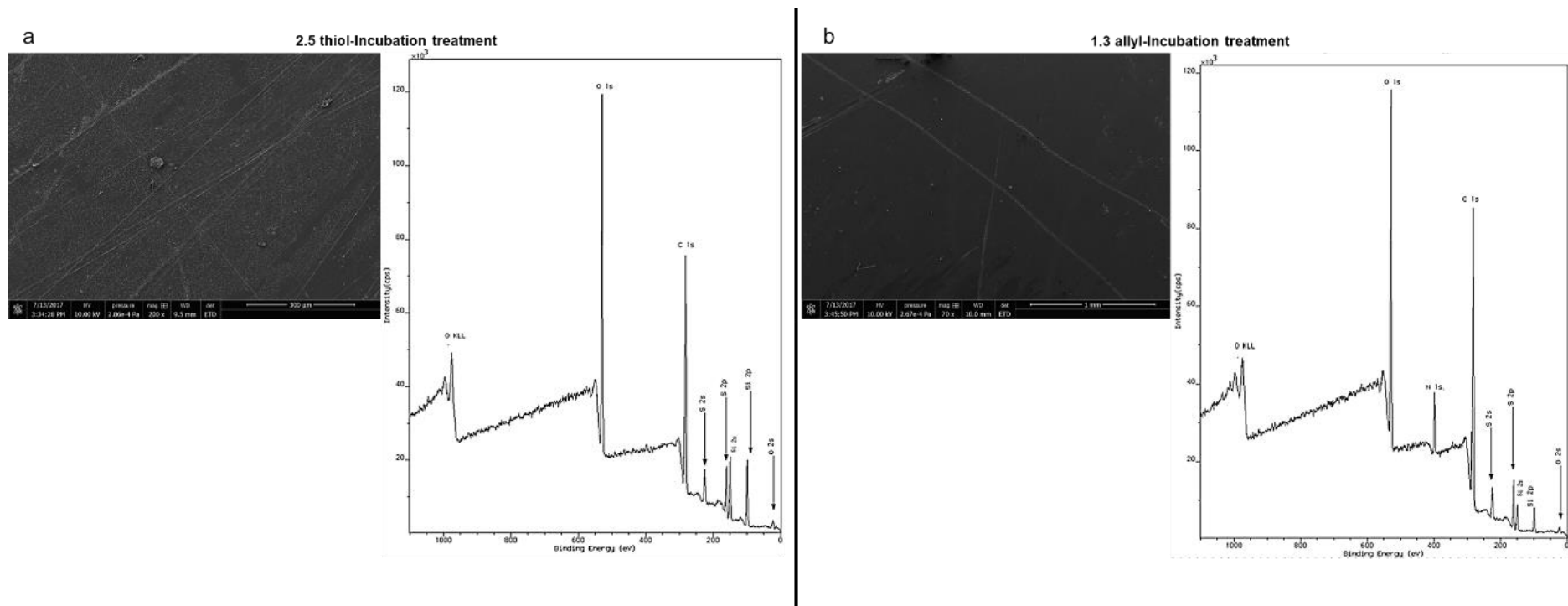


Figure S2. SEM micrography and XPS spectra of OSTE surfaces ((a) 2.5 thiol and (b) 1.3 allyl) after incubation with gold nanoparticles. Plates were washed with ultra-pure water using ultrasound for 1 min before surface characterizations (See experimental section for more details on experimental conditions).

III.4. Aptamer multiple zones functionalization onto OSTE microchannel: proof of concept

In the previous section, the strategy of functionalization of OSTE surface was studied. In this section, the optimized strategy was implemented in microchannel for the fabrication of extraction and preconcentration of multiple zones in OSTE open-microchannel.

Multiple zones immobilization of synthetic oligonucleotide in open OSTE-microchannel

Samantha Bourg¹, Fanny d'Orlyé¹, Sophie Griveau¹, Philippe Vermaut², Grégory Lefèvre³, Fethi Bedioui¹, José Alberto Fracassi da Silva^{4}, Anne Varenne^{1*}*

1 Chimie ParisTech PSL, CNRS FRE 2027, Institute of Chemistry for Life and Health Sciences, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris France

2 Structural Metallurgy, IRCP, Chimie ParisTech PSL, CNRS 8247, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

3 IRCP, Chimie ParisTech PSL, CNRS 8247, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

4 Department of Analytical Chemistry-Chemistry Institute, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

Corresponding authors :

J. A. F. Da Silva*

E-mail: fracassi@iqm.unicamp.br

A. Varenne*

E-mail: anne.varenne@chimieparistech.psl.eu

Abbreviation: AuNPs (gold nanoparticles) ; Dh (hydrodynamic diameter) ; I (fluorescence intensity) ; I₀ (fluorescence intensity of blank) ; IS_x (ionic strength) ; LOAC (lab-on-a-chip) ; OSTE (thiol-ene off-stoichiometry)

Abstract

Lab-On-Chip (LOAC) technology has the primary goal of improving the analytical performances while reducing costs compared to conventional analytical methods. Silica and glass have been primarily used as microchip material, but their complex and expensive microfabrication process makes them less and less interesting for LOAC development and are

less convenient for industrial continuous operations than newer polymer materials. Thus, great efforts and considerable resources have been focused on the development and evaluation of new substrates, microfabrication techniques, and preparation methods to attain inexpensive, robust, disposable, and portable devices. In this context, thiol-ene polymer is a good candidate. This emerging thermoset plastic has interesting properties for the development of cheap and robust LOAC: non-complex and cheap microfabrication process, easy surface modification, good optical transparency, biocompatibility... Nowadays, one of the biggest challenges for LOAC development is the integration of all the analytical steps in one microchannel and particularly the extraction/preconcentration step of analytes of interest. In this study for the first time, we showed the possibility to create multiple zones for the extraction and preconcentration of analytes in an open OSTE-microchannel thanks to the immobilization of synthetic oligonucleotides in consecutive areas pretreated with gold nanoparticles by simple droplets deposition. This first and cheap strategy of localized functionalization is adaptable to a large range of analytical applications and for LOAC industrialization. Moreover, the use of synthetic oligonucleotides will permit to develop a reusable and portable LOAC as these ligands are regenerable and have a good temporal stability.

1. Introduction

Using microfluidic devices to perform analysis of complex samples is an interesting approach that has gained much attention in the past years.^{7,231,232} This increasing interest can be attributed to the fact that microfluidic devices are portable, automated, require small sample and reagent volumes, and can conveniently integrate the necessary steps for rapid analysis. A microfluidic system integrating all conventional analysis steps is called Lab-On-A-Chip (LOAC). This technology has a primary goal of improving the analytical performances while reducing costs. Thus, great efforts and considerable resources have been focused on the development and evaluation of new substrates, microfabrication techniques, and preparation methods to attain inexpensive, robust, disposable, and portable LOAC²³³ for their further commercialization²³⁴. Silica and glass have been primarily used for microfluidic device fabrication, but their high cost associated to complex and expensive manufacturing processes are not convenient for industrial continuous operations.^{206,207} Thus, there is a high demand for new microchip materials with easier and cheaper microfabrication processes. As a result, many different polymeric materials are proposed as substrates for LOAC systems. Among them, off-stoichiometry thiol-ene polymers (OSTE) possess interesting properties such as

rapid prototyping, uncomplicated processing and optical transparency.^{56,57} The microfabrication of thiol-ene microchannels is based on the thiol-ene click chemistry reaction^{55,56,60-63}, *i.e.* the UV-initiated step-growth radical polymerization between thiol (“thiol”) and allyl (“ene”) monomers. The first step consists in the formation of a UV-sensitive initiator radical, followed by hydrogen abstraction from a thiol precursor. The resulting thiyl radical can then propagate due to the presence of allyl precursors. The second step is the classical propagation chain transfer until thiol-ene polymerization is completed.^{65,66,220} This reaction may occur in the presence of a photoinitiator.^{55,62,202} Due to the presence of allyl and thiol groups on the surface of this substrate, further surface modifications can easily be managed within microchannel. To the best of our knowledge, no LOAC integrating all analytical steps in a single OSTE microchannel was developed so far. Some studies have shown the possibility to manage electrokinetic separations^{55,62,202} or surface modification by gold nanoparticles⁶³, enzymes^{55,60} or aptamer (synthetic oligonucleotide) in closed chip or in plates format. In an effort to integrate all analytical steps in a single microchannel, only one study presented the potentiality to create multiple zones of immobilization of an enzyme (cysteine) in a close OSTE-channel by UV-initiated click chemistry reaction.⁵⁵ A mask allowed to locally irradiate the microchannel and further immobilize biomolecules in restricted areas. The mask for cysteine local grafting was designed as a chess-board, with square spots of 1*1 cm. In this work, we developed for the first time, multiple zones functionalization strategy based on droplets deposition (≈ 1 mm of radius) in an open OSTE-microchannel for local ligand immobilization. Our strategy permits to functionalize smaller zones than the strategy developed by Campos et al.⁵⁵ Aptamers were selected as ligand as they specifically interact with their target (such as small organic molecules, peptides, nucleic acids, proteins...) by chemical affinity.¹⁵³ They proved to be interesting tool for specific extraction/preconcentration of targets present at low level in complex samples such as biological fluids.⁸⁴ Aptamers can also be labeled with a fluorescent dye or modified with a reactive group for detection or immobilization purposes, respectively. In addition, they possess a good temporal stability and their regeneration is simple.¹¹

In this context, we propose here a two-step strategy for the local immobilization of aptamer modified by C3-SH in 3'-end: 1) UV-initiated immobilization of gold nanoparticles (AuNPs) and 2) UV-initiated immobilization of aptamer on gold-coated open OSTE-microchannel. We proved the interest of immobilizing AuNPs onto OSTE surfaces to prevent non-specific interaction of the oligonucleotide with the thiol-ene surface. We aim at designing and develop a LOAC with OSTE material integrating multiple zones for

extraction/preconcentration based on molecular recognition by immobilizing aptamers directed against several type of analytes for multiple targeting in a single analysis.

So as to develop these multiple zones of preconcentration, we first studied the influence of experimental conditions (BGE ionic strength and gold nanoparticle size) on the immobilization of aptamers on OSTE substrate and secondly proved the feasibility of aptamer immobilization and its affinity toward its target in multiple zone of an open OSTE-microchannel.

2. Experimental

2.1. Chemicals and Materials

The aptamer used for proof of concept is an oligonucleotide anti-sulforhodamine B purchased from Integrated DNA Technologies which has the following sequence: AlexaFluor® 532-5'-CCG GCC TAG GGT GGG AGG GAG GGG GCC GG-3'-C3-SH. The aptamer sequence was modified at 5'-end with a fluorescent tag: AlexaFluor® 532 and at 3'-end with C3-SH group. Sulforhodamine B, AuNP solutions (diameter 30, 40, 50 and 60 nm), triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione, monosodium phosphate, chloroauric acid, sodium phosphate dibasic were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) was purchased from TCI (India). Ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate was purchased from Ark Pharm. Inc (Interchim, France). SU-8-2050 was purchased from MicroChem (USA). Citrate sodium was purchased from Labsynth, product by Ltda Laboratory (Brazil). Magnesium chloride was purchased from Fluka (France). Poly(methylmethacrylate) and ethanol were purchased from VWR (USA). All solutions were prepared with static ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ.cm, Purelab Flex, Elga Veolia, France).

Silica wafers (4 inches, 500 μm of thick) were purchased from Prolog Semicor (Ukraine).

2.2. Aptamer preparation

Lyophilized aptamer anti-sulforhodamine B was suspended in ultra-pure water and were separated in aliquot to be stored at -20°C. Before use, aptamers were prepared in a BGE and activated at 70°C for 10 min, then allowed to cool to room temperature. The final compositions of BGEs were phosphate sodium (pH 8, IS_x with x = 50, 150 or 300 mM) + 5 mM MgCl₂. In the case where, the strands of aptamer were tagged with a fluorophore (AlexaFluor® 532) in 5'-end, the preparations were made in the dark.

2.3. Synthesis of gold nanoparticles

Two AuNP solutions (AuNPs-1 and -2) were synthesized using the Turkevich et al method.¹⁹⁹ 95 mL of ultra-pure water with 36.6 μ L chloroauric acid solution were mixed under heating (100°C) with 1.6 mL or 1.8 mL of 2% (w/w) citrate sodium solution for AuNPs-1 and -2 respectively. During synthesis, the solution changed from light yellow color to black color and finally to cherry color. The heating was stopped when the colloidal solution reached the cherry color. AuNP solutions were stored at 4°C. The solutions were characterized by UV-visible spectrophotometry (Specord 210 plus, Germany), TEM (JEOL JEM-2000EX, Japan) and DLS (Zetasizer Nano ZS, Malvern Panalytical, France) to determine the concentration and the size of AuNPs. The concentration of AuNP solutions synthesized was determined using calibration curves obtained by the UV-Vis spectrophotometric characterization (400-800 nm) of AuNP commercial solutions with 30, 40, 50 and 60 nm of diameter using the Beer-Lambert Law to determine the molar extinction coefficient. AuNPs-1 have a dry diameter of 28 nm with a concentration equal to $1.4 \pm 0.3 \times 10^{-10}$ mol/L. AuNPs-2 have a dry diameter of 18 nm with a concentration equal to $1.3 \pm 0.3 \times 10^{-9}$ mol/L.

2.4. Microchip and plates fabrication

First, microchannel patterns were fabricated by photolithography using a chrome photo mask. Photoresist (SU-8-2050) was poured onto a 4-inch silicon wafer, heated (65°C for 3 min and 95°C for 6 min) and spin-coated at 4000 rpm. Then the silica wafer was heated (65°C for 1 min and 95°C for 6 min) before UV irradiation (UV-KUB Z, France) for 7s at 23.4 mW.cm² through the chrome mask to create a mold master of 40 μ m thick structure. The development was managed with poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate) solvent for 5 min. Then OSTE open-microchips were processed as described below with pentaerythritol tetrakis(2-mercaptoacetate) (thiol) and triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6 (1H,3H,5H)-trione (ene) as monomeric precursors. Both precursors were mixed in disposable polystyrene cups with the following thiol:ene mass ratio: 2.5:1. The proper amount of precursor was weighed and mixed with 0.01% (w/w) photoinitiator (ethyl phenyl (2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate). To remove air bubbles inside the viscous mixture, the polystyrene cups were put in vacuum desiccators for 15 min. Finally, the viscous mixture was poured over a SU-8 mold and exposed to UV irradiation (Vilber Lourmat, Spain) for 20 min (5 * 8 W tubes, 365 nm, 0.025 J). After UV exposure, the substrates were heated to 70°C for 5 min in the oven to facilitate unmolding. With this technic, single OSTE rectangular microchannels are fabricated with the following dimensions: 3.5 cm length, 2 mm width and 40 μ m height.

OSTE plates (1cm x 3 cm x 0.5 mm) were made with the aforementioned process using a plastic support as mold. All substrates were washed using ethanol and deionized water into ultrasounds for 5 min and dried using nitrogen before functionalization.

2.5. Plates and open-microchips functionalization

The procedure of immobilization of aptamer on plates was developed in a previous study managed in our laboratory. This strategy was adapted for open-microchannel. Briefly, a 10 μL (for plates) or 3 μL (for microchannel) drop of a solution of AuNPs was deposited and the substrate was irradiated under UV light (Vilber Lourmat, Spain) for 40 min or 15 min respectively at 365 nm to immobilize AuNPs onto thiol excess OSTE surface. To remove the unadsorbed AuNPs, the substrates were washed in ultra-pure water in ultrasonic bath for 1 min. 10 μL (for plates) or 3 μL (for microchannel) drop of aptamer solution was then deposited on gold-coated OSTE surface and exposed to UV light with the same parameters used for AuNP immobilization. The aptamer concentration in deposited solution was 100 μM for plates and 14.5 μM for microchannel. Ungrafted aptamers were washed out under a continuous flow of ultra-pure water for 3 min. Droplet deposition was carried out manually with a micropipette.

2.6. Affinity test

The affinity test was managed in open-microchannel functionalized by aptamer with the same process described in **2.5 Part**. For this study the aptamer was not modify in 5'-end by the fluorescent tag. The open-microchannel was immersed for one night in a solution containing 14.5 μM of sulforhodamine B (fluorescent target) prepared with BGEs (phosphate sodium at pH 8 and with ISx with $x = 50$ or 300 mM + 5 mM MgCl_2). The microchannels were washed by immersion for 3 min in BGE solution (phosphate sodium at pH 8 and with ISx with $x = 50$ or 300 mM + 5 mM MgCl_2) to remove all sulforhodamine B non-retained by aptamer.

2.7. Fluorescence characterizations

Fluorescence images were recorded using an inverted fluorescence microscopy system in reflexion mode (Axio Observer A1, Zeiss) equipped with a 120 W metal halide lamp (Osram, German) for fluorescence excitation and a CCD digital camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies Stadtroda, Germany) for image acquisition *via* Hiris software (RD Vision, France). Images were reprocessed by Zen software (Zeiss). For all studies images were

recorded using an objective with 10 X (for plates) or 5 X (for microchannel) magnification. The acquisition parameters of the CCD camera were kept constant, with a 1 s exposition time, no gain and no binning for studies on the influence of experimental conditions and on the localized functionalization of aptamer in open-OSTE microchannel. For studies on affinity between the aptamer and the target, the CCD camera were kept constant, with 2.5 s exposition time, no gain and no binning. A 550 nm excitation filter and a 605 nm emission filter (filter set 43 HE, Zeiss) were used for fluorescence imaging for all studies. The relative fluorescence gain (for plates) was calculated as follows: $(I-I_0)/I_0$, with I the fluorescence intensity measured on surface functionalized with aptamers after rinsing and I_0 the fluorescence intensity measured on gold-coated OSTE surface. I and I_0 were the mean of one independent measure on 3 different samples (n=3) treated under identical experimental conditions in the plate format. The fluorescence intensity value of microchannel was given after treatment and rinsing. The fluorescence intensity is the mean of one independent measure on 7 different areas treated by aptamer in the same microchannel (n=7). To test the robustness of the whole microfabrication process, the measurements were carried out on 3 different microchannels treated under identical experimental conditions for tests of the localized immobilization of aptamer.

2.8. Calibration curves

To estimate the density of aptamer immobilized on gold-coated OSTE surfaces, calibration curves were plotted as following: $f((I-I_0)/I_0)=a*[Apt]$ or $f(I)=a*[Apt]+b$, with [Apt] the surface concentration (picomoles/mm²) of aptamer in plate and microchannel format respectively. On OSTE surfaces, AuNP droplets were deposited and exposed to the UV irradiation as described in **Part 2.5**. To remove non-chemisorbed AuNPs, OSTE substrates were washed in ultra-pure water in ultrasonic bath for 1 min. Then, a known DNA aptamer concentration was deposited on gold-coated OSTE plates following the process described in **Part 2.5**. Experimental set-up and parameters to measure fluorescence intensity are the same than the ones used for the characterization of functionalized OSTE surface (**Part 2.7**). To estimate the density of sulforhodamine B retained by aptamer immobilized on gold-coated OSTE surfaces, calibration curves were plotted as following: $f(I)=a*[SB]+b$ with [SB], the molar concentration of sulforhodamine B in microchannel format. On OSTE microchannel, AuNP droplets were deposited and exposed to the UV irradiation as described in **Part 2.5**. To remove non-chemisorbed AuNPs, OSTE substrates were washed in ultra-pure water in ultrasonic bath for 1 min. Then, a known sulforhodamine concentration was deposited on gold-coated OSTE microchannels following the process described in **Part 2.5**. Experimental set-up and

parameters to measure fluorescence intensity are the same than the ones used for the characterization of functionalized OSTE microchannel (**Part 2.7**).

3. Results

The influence of the ionic strength (IS_x with x=50, 150, 300 mM) of the BGE and the size of gold nanoparticles on the solubilization and immobilization aptamers was studied. The stability of functionalized plates stored at room temperature and in air for 14 days was checked. The feasibility of aptamer immobilization in multiple zones into an open OSTE-microchannel has been successfully demonstrated by droplet deposition. The affinity between the aptamer and the target was evaluated with two BGEs (phosphate sodium at pH 8 and with IS_x with x = 50 or 300 mM + 5 mM MgCl₂) in microchannel.

3.1. Influence of experimental conditions

3.1.1. Influence of the BGE ionic strength

The influence of the BGE ionic strength on aptamer immobilization onto gold nanoparticle surface was already studied elsewhere.^{235,236} The aptamer is a negatively charged molecule with ionizable phosphate groups. Thus, in low ionic strength buffers, the surface coverage of aptamers on gold surface should be low, owing to the repulsion between the negatively charged aptamer strands. Under high ionic strength conditions, the intermolecular electrostatic repulsion between neighboring strands of aptamers is minimized because the charged strands are electrostatically shielded, thus allowing higher surface densities of aptamer.²³⁶ In this context, the influence of the ionic strength of the sodium phosphate buffer used to solubilize aptamers on their immobilization efficiency on gold (AuNPs-1)-coated OSTE plate was studied. The composition of the BGE was: sodium phosphate buffer (pH 8, IS_x with x =50, 150 and 300 mM) + 5 mM MgCl₂. The fluorescence intensities were measured after plates rinsing to remove non-immobilized aptamers. Relative fluorescence gains obtained are presented in **Figure 1**.

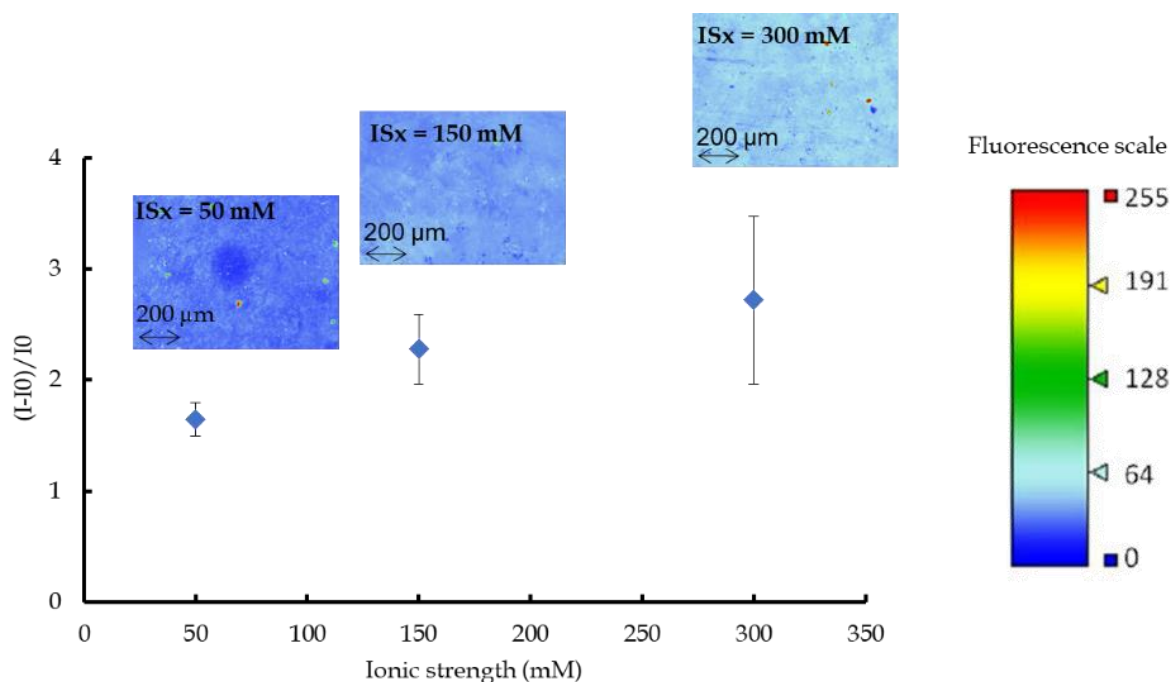


Figure 1: Relative fluorescence gains and fluorescence images (recorded as false color) of gold (AuNPs-1)-coated OSTE plates functionalized with aptamer in sodium phosphate buffer (pH 8, IS_x with $x = 50, 150$ and 300 mM) + 5 mM MgCl₂. I_0 is the fluorescence intensity of gold-coated OSTE substrate. I is the fluorescence intensity measured after functionalization with aptamers and rinsing (see experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). The error bars represent standard deviation for 3 repetitions.

Regardless the value of IS_x, the fluorescence distribution on OSTE plates functionalized with aptamer is homogeneous (**Figure 1**). Relative fluorescence intensity values measured on OSTE plates increase with the BGE ionic strength. Standard deviation values also increase with the BGE ionic strength: standard deviation represents 13% and 30% of the relative fluorescence intensity average measured for IS_x=50 mM and for IS_x=300 mM, respectively. The functionalization of gold-coated OSTE surface by aptamers prepared in a 300 mM IS_x BGE seems less repeatable than in a 50 mM IS_x BGE. To determine the density of aptamers immobilized, calibration curves was plotted. As we did not know at this time if the IS_x has an influence on measured fluorescence intensity, one calibration curve was plotted for each buffer IS_x used to solubilize aptamers at a concentration between 0 to 8 μ M. The equations of the calibration curves are: $(I-I_0)/I_0=0.5233*[Apt]$ ($r^2=0.9831$) for IS_x=50 mM, $(I-I_0)/I_0=0.3805*[Apt]$ ($r^2=0.8881$) for IS_x=150 mM and $(I-I_0)/I_0=0.3343*[Apt]$ ($r^2=0.9171$) for IS_x=300 mM. These calibration curves allowed evaluating the density of aptamer immobilized

on the plates. After rinsing, the densities were calculated as: 5 ± 1 picomoles/ mm^2 ; 6 ± 1 picomoles/ mm^2 and 5 ± 2 picomoles/ mm^2 in $\text{IS}_x = 50, 150$ and 300 mM, respectively. Thus, the ionic strength of the BGE used to prepare aptamer solutions has a negligible influence on the immobilization process. Concerning the fluorescence increased with IS_x , it could be explained by the variation in the distance between the dye and the surface according to IS_x value.²³⁷ Rant et al.²³⁸ have studied the influence of the distance of one dye from a gold-coated surface: the energy transfer of the excited dye molecule to the metal facilitates nonradiative transitions for relaxation to the dye's electronic ground state, causing a "quenching" of the observed fluorescence. Thus, the smaller the distance between the dye and the metal is, the greater fluorescence quenching effect should be causing a decrease of a fluorescence intensity emission.²³⁸ In this study, it should mean that the dye on the anti-sulforhodamine B aptamer is closer to the gold-coated OSTE surface for $\text{IS}_x = 50$ mM than for $\text{IS}_x = 300$ mM. This variation distance between the dye and the surface could be provoked by a conformational change of the aptamer depending of the IS_x value. Indeed, some studies have shown the influence of the nature and the concentration of alkali metals or alkaline earth metal solutions on aptamer structure.^{196,197}

3.1.2. Influence of gold nanoparticle size

To have the best efficiency for analyte extraction, it is important to optimize the density of oligonucleotide strands immobilized on the gold surface. The size of the gold nanoparticle is an important factor on the possible number of oligonucleotide strands that can be immobilize. Two sizes of gold nanoparticles (28 and 18 nm of diameter named AuNPs-1 and -2, respectively) typically used for ligand immobilizations (< 60 nm of diameter)²³⁹ have been tested to study their influence on the immobilization density of anti-sulforhodamine B aptamers on gold-coated OSTE surfaces. Fluorescent aptamers were dissolved in sodium phosphate buffer at $\text{IS}_x = 50$ mM + 5 mM of MgCl_2 , because the functionalization is more repeatable at this ionic strength and the affinity between an aptamer and its target is favored in a low ionic strength medium (below 200 mM).²⁴⁰ Gold-coated OSTE plates treated only with the buffer (sodium phosphate pH 8, $\text{IS}_x = 50$ mM + 5 mM of MgCl_2) were considered as control. The relative fluorescence intensities of gold-coated OSTE plates after treatment and washing under a continuous water flow for 3 min are represented as a function of gold nanoparticle size. As it is known that the fluorescence quenching of dyes increases with the decrease of gold nanoparticles size,²⁴¹ calibration curves were determined for each nanoparticle size, to

determine as accurately as possible the surface density of immobilized aptamer. The calibration curves realized with AuNPs-1 was plotted for [Apt] situated between 0 to 10 picomoles/mm² and was: $(I-I_0)/I_0=0.33 [Apt]$, with $r^2= 0.9171$. The calibration curves realized with AuNPs-2 was plotted for [Apt] situated between 0 to 4 picomoles/mm² and was: $(I-I_0)/I_0=0.23 [Apt]$, with $r^2= 0.9739$. Slope values of the calibration curves permit to show no significative fluorescence quenching effect due to AuNP size. Indeed, slope values are equal to 0.33 and 0.23 for AuNPs-1 and -2 respectively. The density of aptamer immobilized is equal to 5 ± 1 and 3 ± 1 picomoles/mm² for AuNPs-1 and AuNPs-2, respectively. In this study the AuNP size has no significant effect on the density of aptamer immobilized.

3.1.3. Stability of aptamer immobilization

The stability of the overall immobilization process is an important parameter to allow for commercialization of LOACs. The stability of gold (AuNPs-1)-coated OSTE plates functionalized by aptamers stored at room temperature, in air and in the dark was studied for 14 days. The plates with AuNPs-1 only were used as control. The relative fluorescence intensities of controls are close to 0 from day zero to 14 days after treatment. For plates functionalized with aptamers, the relative fluorescence intensity was similar regardless of ISx value. Indeed, relative fluorescence intensities were equal to 1.6 ± 0.2 and 1.3 ± 0.2 for ISx= 50 mM; to 2.3 ± 0.3 and 1.9 ± 0.3 for ISx= 150 mM : and, to 2.7 ± 0.8 and 2.5 ± 0.3 for ISx= 300 mM, just after functionalization and after 14 days of storage, respectively. We conclude that the functionalization is stable in air over time, and thus the microfluidic system can be stored before its utilization.

3.2. Demonstration of multiple zones immobilization feasibility

Immobilization of aptamers in multiple zones of an OSTE microchannel was performed by successive droplet deposition of AuNPs-2 and aptamers tagged solutions with a micropipette. In one 3.5 cm length channel, we have shown that it is possible to deposit 7 droplets of ≈ 1 mm radius separated by ≈ 3 mm of distance. A fluorescence image of the functionalized microchannel after rinsing is presented in **Figure 2**. Campos et al.⁵⁵ successfully grafted enzymes on the wall of a closed-microchannel by UV-initiated click chemistry reaction. Using a mask placed on the top of the OSTE microchannel only areas exposed to UV irradiation were functionalized with the molecule of interest.⁵⁵ The mask for cysteine localized grafting was designed as a chess-board, with square spots of 1*1 cm. Thus, our strategy permits to functionalize smaller zones and with smaller distance between each zone, than the

strategy developed by Campos et al.⁵⁵ After this process, it is possible to close the microchannel without denaturation of the synthetic oligonucleotide.

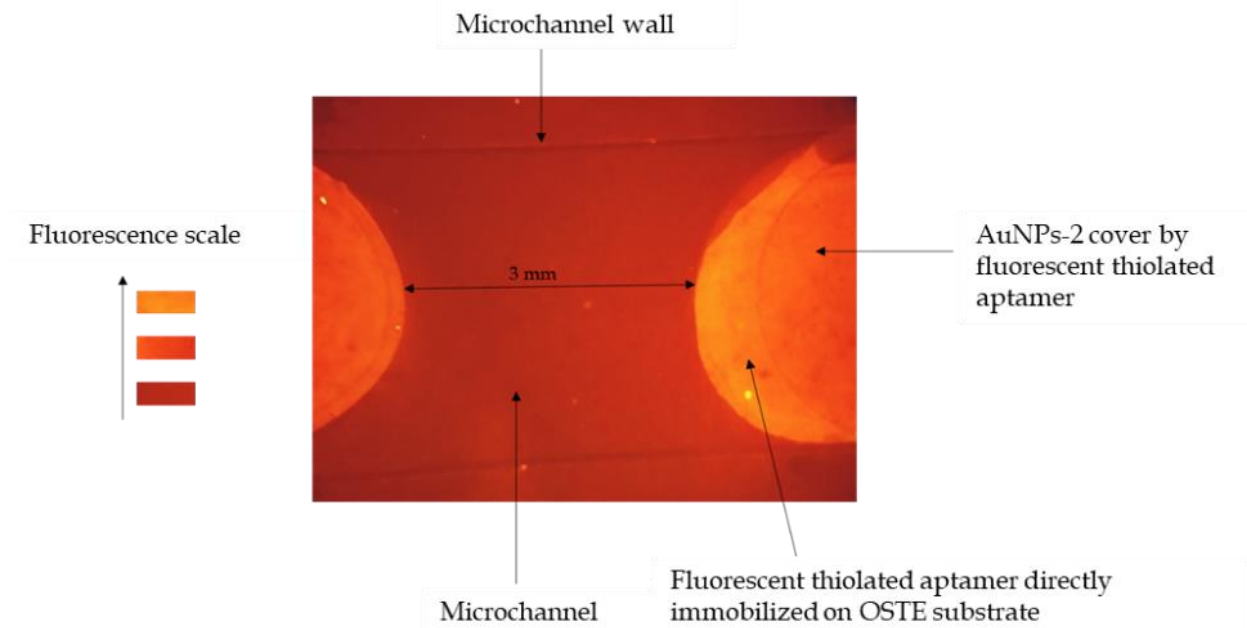


Figure 2: Fluorescence micrography of an open OSTE-microchannel coated with AuNPs-2 and functionalized with fluorescent aptamers. The image acquisition was recorded after rinsing of excess aptamer (see experimental part for more details on experimental conditions and the fluorescence detection set-up).

In our study, distinct fluorescent droplets corresponding to the distinct areas functionalized with fluorescent aptamers are evidenced. So, a two-step droplets deposition on open gold-coated OSTE-microchannel, allows to functionalize several localized zones of the chip in an easy and cheap way. However, the overlay of AuNP and aptamer droplets is not always aligned. To have a perfect overlay of gold and aptamer layers, it will be necessary to use a motorized arm in x , y , z that will permit to automatically deposit droplets of defined size and at a given distance between each other.

Fluorescence intensity values of open OSTE-microchannels functionalized with fluorescent aptamers (aptamer modified in 5'-end by a fluorophore), non-fluorescent aptamer (aptamer not modified by a fluorophore) and without aptamer (as experience of control) after rinsing are presented in **Figure 3**.

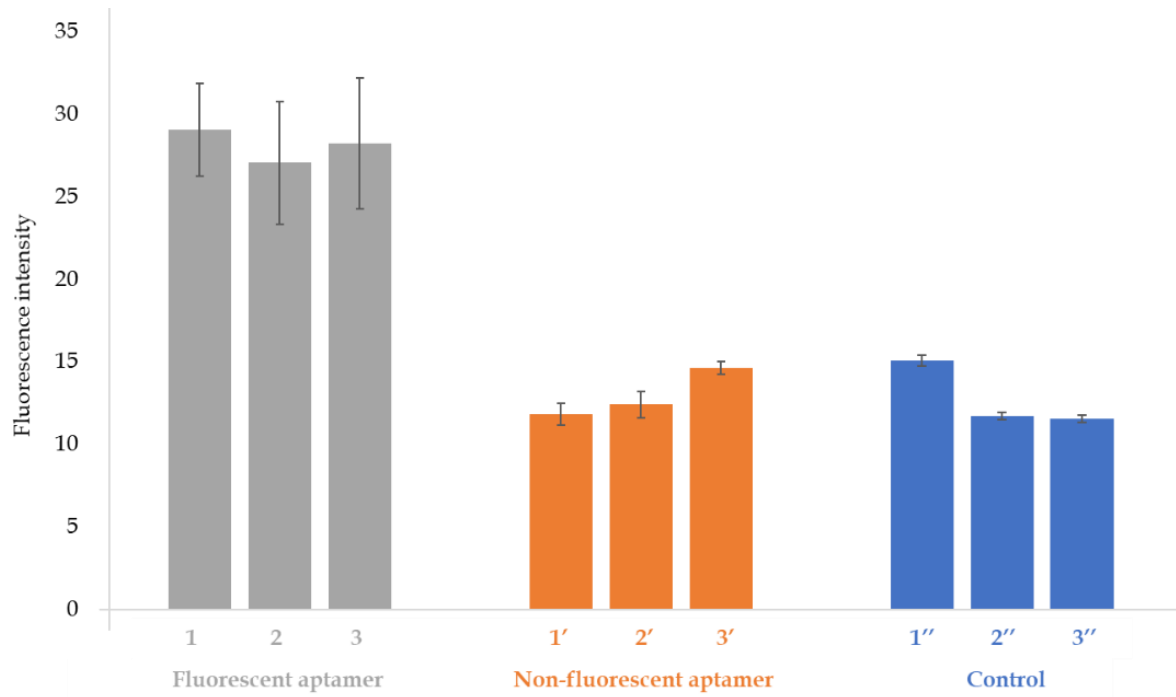


Figure 3: Fluorescence intensity of gold (AuNPs-2)-coated open OSTE-microchannels functionalized with fluorescent aptamers (channels 1, 2 and 3), non-fluorescent aptamer (channel 1', 2' and 3'). As control, microchannels (1'', 2'' and 3'') were treated with the same experimental process but only with droplets of sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 50 mM) + 5 mM MgCl₂. Fluorescence intensities are presented after washing of microchannels (see experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). Error bars represent standard deviation for 7 repetitions.

Fluorescence intensities of the controls and the microchannels treated with non-fluorescent aptamers are similar (~13). The fluorescence intensity gain for experiments performed in the presence of fluorescent aptamers is 54% compared to the control realized. This result demonstrates the efficient and local immobilization of aptamers on gold-coated open OSTE-microchannels. In addition, the gain fluorescence intensity between the experiments in presence of fluorescent (54%) and non-fluorescent aptamers indicates that the fluorescence is only due to the fluorescent tag on the aptamer strand in 5'-end. Between batches of microchannels functionalized by fluorescent aptamers (channels 1, 2 and 3), the fluorescence intensity values are similar, which proves the reproducibility of the overall microfabrication process (**Figure 3**). Indeed, the difference of fluorescence intensity value between chips 1, 2 and 3 is inferior to 10%. The density of aptamer immobilized is calculated using a calibration curve which equation is $(I-I_0)/I_0 = 1.8684 \cdot [Apt] + 11.9$ with r^2 equal to 0.91. The calibration curve was plotted for a aptamer surface concentration situated between 0 and

14 picomoles/mm² The average density of aptamer immobilized through this process on gold-coated 2.5 thiol microchannels is equal to 9 ± 1 picomoles/mm². In this case the density of aptamer immobilized is more important than the one previously calculated on plates (3 picomoles/mm²). This result can be explained by a higher preconcentration effect due to the rapid evaporation of the 3 μ L droplets deposited on microchannel during the UV-irradiation.

3.3. Affinity test

It is knowing that the ionic strength of the BGE used for affinity test can have an important influence on the non-covalent interactions between the aptamer and the target.²⁴⁰ Two different ISx was used for the aptamer and sulforhodamine B solutions: ISx = 50 or 300 mM. For one microchannel, the ISx was the same used for preparation of the aptamer and the sulforhodamine B solutions. Open-microchannels were functionalized with the same process than the **Part 3.2**: AuNPs-2 and aptamer was immobilized by 7 droplets deposition (3 μ L) of ≈ 1 mm radius separated by ≈ 3 mm of distance. For this study, only non-fluorescent aptamer was used for the functionalization to permit to measure a gain of fluorescent due to the presence of the fluorescent target: sulforhodamine B.¹³²

Then, the open-microchannel were immersed one night in a solution containing 14.5 μ M of sulforhodamine B. To remove the non-retained sulforhodamine B by aptamer the microchannels were immersed for 3 min in the BGE solution with the same ISx used for the affinity test. As experiment of control, the aptamer was replaced by just the BGE solution (phosphate sodium, pH 8, ISx= 50 or 300 mM + 5 mM MgCl₂).

Fluorescence intensity values (n=7) of open OSTE-microchannels after incubation and rinsing are presented in **Figure 4**.

The fluorescence intensities are non-significantly different between the experiments of control and the affinity test for ISx= 300 mM (**Figure 4**), so we cannot to affirm if there is affinity between the aptamer and the fluorescent target. However, for ISx= 50 mM, the gain of fluorescence for the affinity test compare to the control experience is equal to 25%. This result permit to confirm the affinity between the aptamer and the target. The fluorescence images (recorded as false color) of microchannel after the affinity test and rinsing are presented in **Figure 5**.

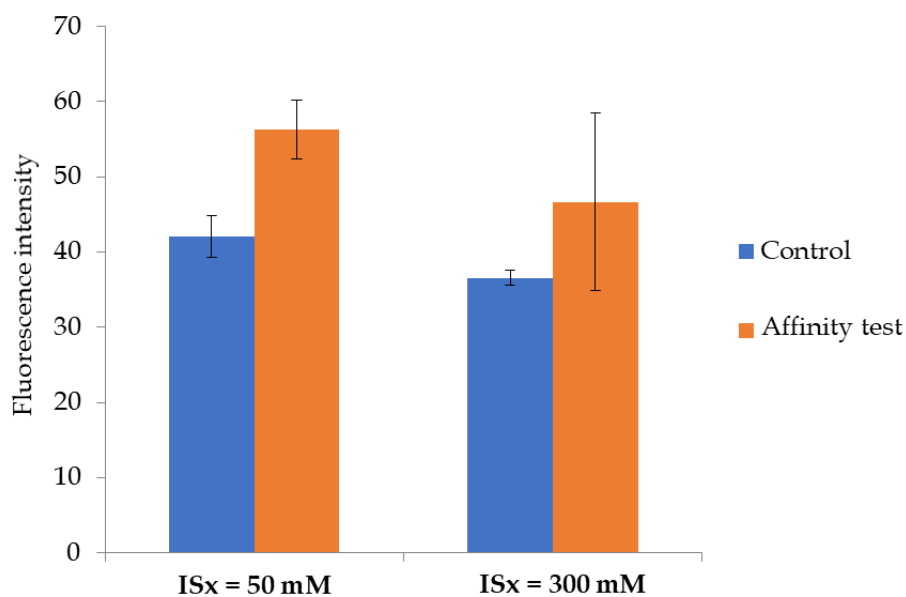


Figure 4: Fluorescence intensity of gold (AuNPs-2)-coated open OSTE-microchannels functionalized with non-fluorescent aptamers immersed in 14.5 μM of sulforhodamine B for one night and after rinsing (see experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). Error bars represent standard deviation for 7 measurements recorded on the 7 areas functionalized by non-fluorescent aptamer in one microchannel.

For ISx= 50 and 300 mM, we identify a higher fluorescent signal on areas functionalized by non-fluorescent aptamer (affinity test) compare to areas non-functionalized by the non-fluorescent aptamer (control) (**Figure 5**). But there are non-specific interactions (electrostatic interactions) between the negative-charged fluorescent target and the surface of gold nanoparticles because we can distinguish fluorescent droplets for control experiences with ISx= 50 and 300 mM (**Figure 5.A and C**). The fluorescent intensities of experiences of control are equal to 42 ± 3 and 37 ± 3 for ISx= 50 mM and ISx= 300 mM respectively. Consequently, the ionic strength of the BGE has no a significant influence on the non-specific adsorption of the sulforhodamine B on the gold-coated OSTE surface. On **Figure 5.B and D**, we identify a better coverage of the fluorescent target on the area functionalized by non-fluorescent aptamer (affinity test) for ISx= 50 mM than for ISx= 300 mM, in accordance with other studies.¹³² Indeed, we have shown that it is better to work with low ISx ((below 200 mM).²⁴⁰ Due to calibration curve plotted between $[\text{SB}] = 0$ to $3.3 \cdot 10^{-9}$ mol/L ($I = 1 \cdot 10^{10} [\text{SB}] + 37.357$ with $r^2 = 0.9955$), we have calculated the concentration of sulforhodamine B for ISx= 50 mM present after rinsing on

functionalized areas corresponding to the concentration of complex aptamer-sulforhodamine B formed. The concentration of the complex formed is equal to $1.9 \pm 0.1 \cdot 10^{-9}$ mol/L.

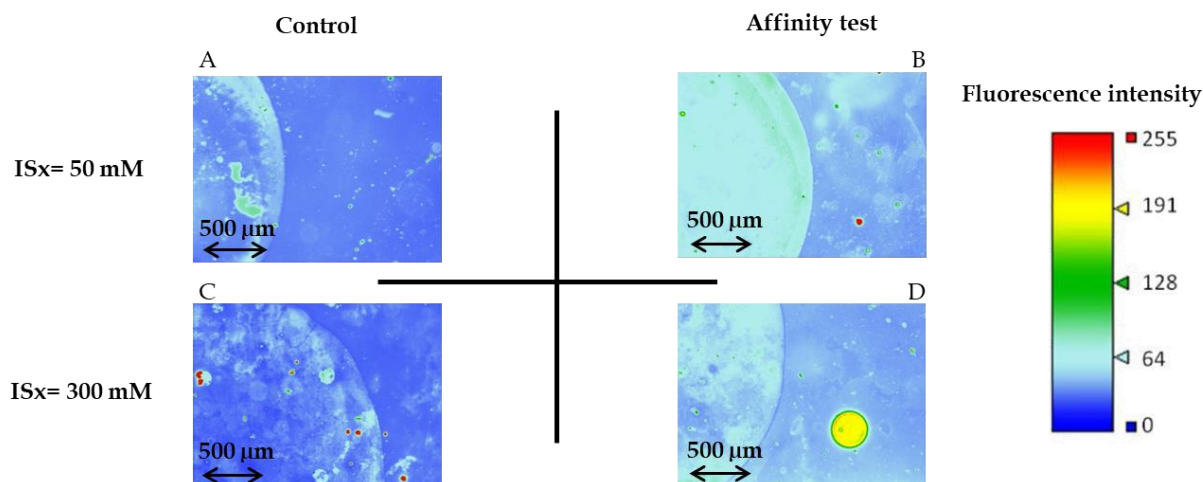


Figure 5: The fluorescence images (recorded as false color) of microchannel after the affinity test and rinsing (see experimental section for more details on experimental conditions and fluorescence measurement parameters). A and B are the fluorescence images recorded for experiences carry on with the phosphate sodium buffer with $IS_x = 50$ mM, for the control and affinity test respectively and C and D are the fluorescence images recorded for experiences carry on with the phosphate sodium buffer with $IS_x = 300$ mM.

The results obtained prove that the aptamer immobilized on gold-coated microchannel can capture the target with $IS_x = 50$ mM, so this microfluidic system can be adapted for the development of LOAC containing several zones of extraction/preconcentration for multiple compounds of interest present in low concentration in complex sample.

4. Conclusions

In this study a fast and cheap method to create multiple immobilization zones of aptamers by droplet deposition with a micropipette was demonstrated for the first time in OSTE open-microchannels. This functionalization strategy is composed of two steps: 1) immobilization of AuNPs by UV-irradiation and 2) immobilization of aptamers modified by C3-SH in the 3'-end on gold-coated OSTE surface by UV-irradiation. This two-step droplet deposition strategy does not necessitate expensive and complicated devices and allows to create several zones of 1 mm radius in only 30 min on several open single OSTE-microchannels. By affinity test we have proven that this new strategy of functionalization zones in OSTE channels will be adapted for the development of LOAC containing several

zones of extraction/preconcentration for multiple compounds of interest present in low concentration in complex sample.

This work was financially supported by CAPES-COFECUB (802-14); FAPESP (2013/22127-2); CNPq (444514/2014-7); INCTBio and Michem.

This study has received the technical support of “Institut Pierre-Gilles de Gennes” (laboratoire d’excellence, “Investissements d’avenir” program ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-10-LABX-31).

Acknowledges PSL (France) for their support.

III.5. Conclusions and perspectives

The purpose of this study was to produce a LOAC based on preconcentration multiple zones integrating aptamers and electrokinetic separations for simultaneous analysis of analytes present in complex samples.

The electroosmotic mobility was determined in various BGEs (from pH 3 to pH 12) with two OSTE microchip configurations, *i.e.* 1.3 allyl microchannel and 2.5 thiol microchannel that were photopolymerized in the presence of a photoinitiator. The evolution of the electroosmotic mobility in the 3-12 pH range indicates the presence of negative charges on the channel surface, due to the presence of thiolate groups, with comparable charge densities for 1.3 allyl and 2.5 thiol microchannels. The electroosmotic mobility vary between 8.4 from 22.0 * 10⁻⁵ cm⁻¹.V⁻¹.s⁻¹ with a plateau reached at pH 7. A stability study based on the electroosmotic mobility measurements showed that this chip can be stored in air for 14 days without affecting transport mobilities. The high electroosmotic flow and its stability demonstrate the possibility to operate electrokinetic separations in OSTE microchannels.

Two strategies for OSTE functionalization by aptamers modified in 3'-end by C3-SH were studied. The direct UV-initiated click chemistry reaction between allyl groups of OSTE materials and thiolated aptamers favoured the non-specific adsorption of the aptamers on OSTE surfaces. A second strategy consisted in pre-coating OSTE materials with AuNPs either by incubation or UV treatment, the latter providing a better coverage ruggedness and a more homogeneous distribution of AuNPs on 2.5 thiol plates. Finally, aptamers modified with C3-SH at their 3'-end could be efficiently immobilized on gold-coated 2.5 thiol plates by both UV and incubation treatments, with negligible non-specific adsorption of the aptamer. As UV

treatment allows to reach a higher surface density of aptamer immobilized as compared to incubation treatment, it was chosen for the development of microchannel with multiple functional zones based on the immobilization of thiolated aptamer. This strategy of treatment is adaptable for continuous industrial operation.

Thanks to this methodological development, a fast and cheap method to create multiple aptamer immobilization zones by droplet deposition was demonstrated for the first time in a 2.5 thiol open-microchannel. The droplet deposition does not necessitate expensive and complicated devices and allows to create several consecutive zones of 1 mm radius in only 30 min in open single OSTE-microchannels. The surface coverage density of aptamer in each functional zone was 9 ± 1 picomoles/mm² of aptamer. Moreover, we have proven that the aptamer has an affinity for its target with the developed system proving that this strategy will be adapted for the development of LOAC containing several zones of extraction/preconcentration for multiple compounds of interest present in low concentration in complex samples.

Now we want to study the affinity of the aptamer anti-sulforhodamine B toward its target and to evaluate the extraction efficiency of the OSTE chip. With this system, we want to show the possibility to extract and separate different biomarkers present in low concentration in liquid biopsy samples.

Chapter IV: Sol-gel process for localized functionalization of COC microchannels

List of abbreviations

- APAP: air plasma at atmospheric pressure
- APPECVD: plasma-enhanced chemical vapor deposition at atmospheric pressure
- APPJ: atmospheric pressure plasma jet
- ATR-FTIR: attenuated total reflexion-Fourier transform infra-red
- BGE: background electrolyte
- COC: cyclic olefin copolymer
- Δ IS: delta of ionic strength used for EOF determination
- DFT: density functional theory
- IS: ionic strength
- LOAC: lab-on-a-chip
- μ eo: electroosmotic mobility
- MPTMS: methacryloxypropyltrimethoxysilane
- MTMS: methyltrimethoxysilane
- MTrMOS: methyltrimethoxysilane
- OSTE: off-stoichiometry thiol-ene polymer
- PDMS: polydimethylsiloxane
- PECVD: plasma-enhanced chemical vapor deposition
- PEG: polyethylene glycol
- SS: sodium metasilicate
- t_{eo} : electroosmotic time
- TEOS: tetraethylorthosilicate
- TMOS: tetramethylorthosilicate
- UV: ultraviolet
- WCA: water contact angle
- XPS: X-ray photoelectron spectroscopy

IV.1. General introduction

In the previous chapter, a 2D strategy of localized functionalization with aptamers of an off-stoichiometry thiol-ene polymer microchannel was reported in order to develop localized microextraction zones for specific target analysis. Another strategy of localized immobilization of aptamers on polymeric microchannels is presented here. This 3D strategy consists in encapsulating aptamers in a tetraethylorthosilicate (TEOS) sol-gel in cyclic olefin copolymer (COC) microchannels coated with a silica layer. The interest of this strategy compared to the 2D strategy, is that the aptamer should more easily preserve their chemical affinity towards their target because the oligonucleotide is not blocked in one specific position due to covalent bonding to a surface.^{131,132} Sol-gel has many advantages among which transparency to UV light and low autofluorescence that permits to use optical and fluorescent detection modes, room temperature processing and tunable size pore distribution.^{131,132,242} The strategy of encapsulating molecules in sol-gels for analytical applications has been widely used as shown in Table 14.

Table 14: Non-exhaustive list of molecules encapsulated in sol-gels for various analytical applications.

Sol-gels	Encapsulated biomolecules	Supports and pre-treatments of supports	Applications	Ref
TEOS (tetraethyl- -orthosilicate)	Aptamers	Microfluidic PDMS-glass pretreated with oxygen plasma	Preconcentration of water pollutants	132
	Enzymes	-	Increasing the catalytic properties of an enzyme for future industrial applications	243
MTrMOS (methyltrimethoxysilane)	Enzymes	Glass-PDMS well system. Glass coating with polyvinyl acetate	Measurement of enzyme activity	244
MTrMOS and TMOS (tetramethyl- -orthosilicate)	Antibodies	Glass coating with polyvinyl acetate	Immunoassay	245

SS (sodium metasilicate)	Aptamers	96-well microtitre plates	Aptasensor	²⁴⁶ and ²⁴⁷
TMOS et MTMS (methyltrimethoxy-silane)	Proteins	Fused-silica capillary coated with MPTMS (methacryloxypropyltrimethoxysilane)	Chiral separations	²⁴⁸
	Antibodies	96-well microtitre plates	Immunoassay for hormones detection	²⁴⁹
TMOS	Antibodies	Cuvette for fluorescence measurements	Study of the affinity between an anti-fluorescein antibody and fluorescein for proof of concept	²⁵⁰
	Antibodies	Cartridge column	Preconcentration and detection of water pollutants	²⁵¹

However, to the best of our knowledge, only one article was published on the functionalization of a microchannel by aptamers encapsulated in a sol-gel to pre-concentrate analytes of interest.¹³² This technology was recently conceived in our laboratory in 2015 and developed for the detection of diclofenac in polluted water. The procedure was as follows: (1) TEOS is hydrolyzed in an acidic media to obtain a « sol » solution (transparent and viscous solution), (2) polyethylene glycol (PEG) was added at the end of hydrolysis step, (3) anti-diclofenac aptamers were mixed with the sol solution before the polycondensation reaction, (4) the « *sol-aptamer* » mixture was then injected into a PDMS-glass microchannel oxidized by O₂ plasma and dried at room temperature for several hours, and (5) during the polymerization reaction, Si-O-Si bonds were formed between the sol-gel and silanol groups (SiOH) present on the surface of the pre-treated microchannel walls. Figure 45 shows the mechanism of formation of a TEOS sol-gel.

With this procedure, our team demonstrated the feasibility of extracting molecules of interest through the presence of aptamers encapsulated in the pores of the TEOS sol-gel polymerized within microchannel. However, this system has not been totally optimized and some studies remain necessary for a better understanding of the system. First, the material used as a microchannel substrate (PDMS) has many disadvantages due to its poor physico-

chemical properties (thermal properties that degrade over time, permeability to water vapour and sensitivity to many chemicals...).⁵⁴ In this work, we chose to replace PDMS by COC, a more robust material. Indeed, the final cost of manufacturing COC microchannels is cheaper than for PDMS. Secondly, the PDMS-glass microchannels were oxidized with a vacuum plasma treatment that increased the time, complexity and final cost of the microchip microfabrication. Third, it has been shown in the scientific literature that sol-gel cracks due to the continuous ageing of the monolith over time.^{252,253} However, no stability tests were performed during the previous study conducted in our team.^{131,132} Fourth, in this latter study, the microchannels were fully functionalized by sol-gel.^{131,132} However, it is necessary to functionalize only a localized area of the system in order to integrate the analytical steps (injection, preconcentration, separation and detection) into only one microsystem.

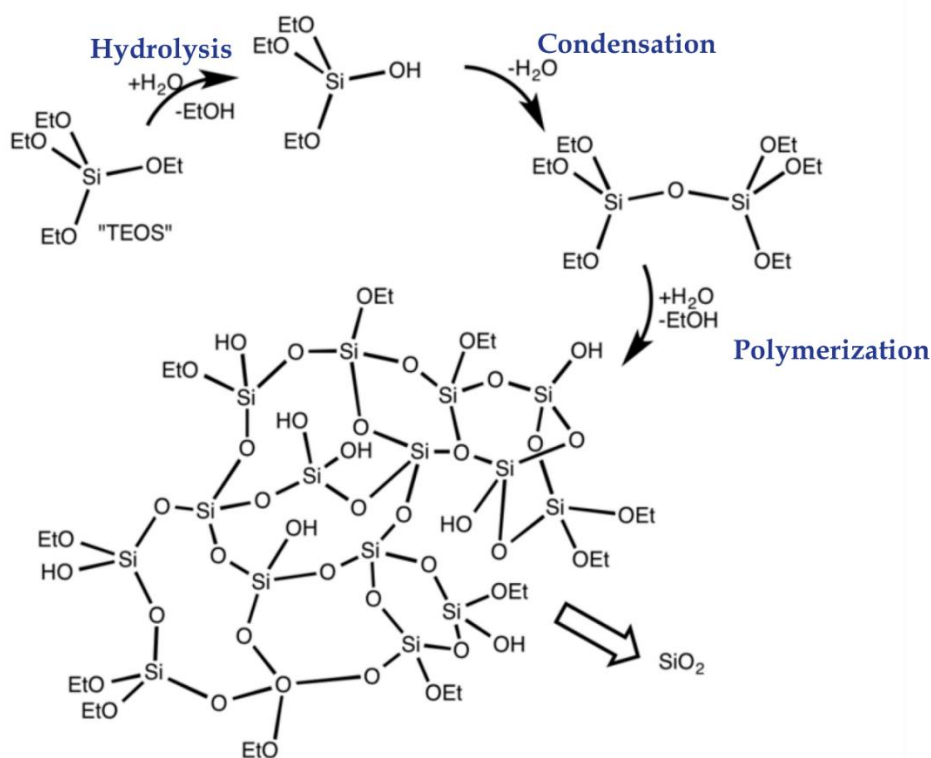


Figure 45: Mechanism of sol-gel process. Adapted from ¹³¹.

In this chapter, we optimized or answered the points previously listed. To this aim, two microsystems were used: i) a single microchannel (Figure 46.A.) (100 μm wide, 30 μm height and 6 cm length) for studies on sol-gel process optimization and encapsulation of aptamers and ii) a cross-shaped microchannel (Figure 46.B.) (50 μm width and height, separation channel of 4 cm length and side-channels of 1 cm length) used for studies on localized functionalization by the sol-gel.

The microfabrication technic used to create the microchannel engraved in COC was hot embossing (150°C, 30 min).

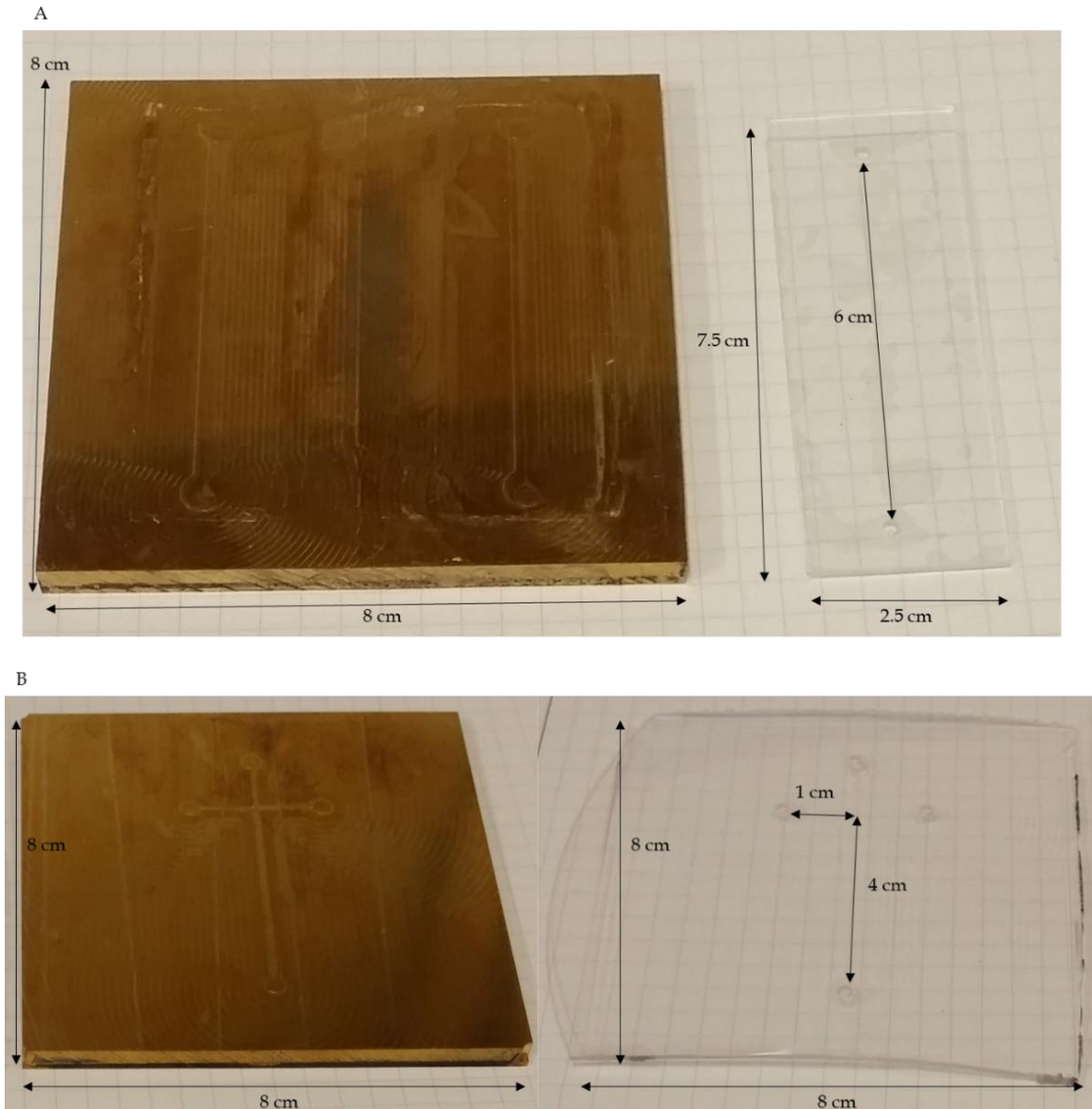


Figure 46: Brass mold and COC microchannels. (A) single microchannel (100 μm width, 30 μm height and 6 cm length) and (B) cross-shaped microchannel (50 μm width and height, separation channel of 4 cm length and side-channels of 1 cm length).

Due to the chemical inertness of COC an atmospheric plasma treatment is first processed to deposit a silica layer to anchor the sol-gel in COC microfluidic walls. This treatment is faster and less expensive and complex than the one developed by Perréard et al.^{131,132} Moreover, this treatment improves the wettability properties of the thermoplastic. The microsystem is then closed with a silicone (R_2SiO , ThermalSeal RTS™) tape initially developed

for polymerase chain reaction applications.⁷⁵ The structure of the silica layer and a transversal view of the system integrating aptamers encapsulated in sol-gel are presented in Figure 47.

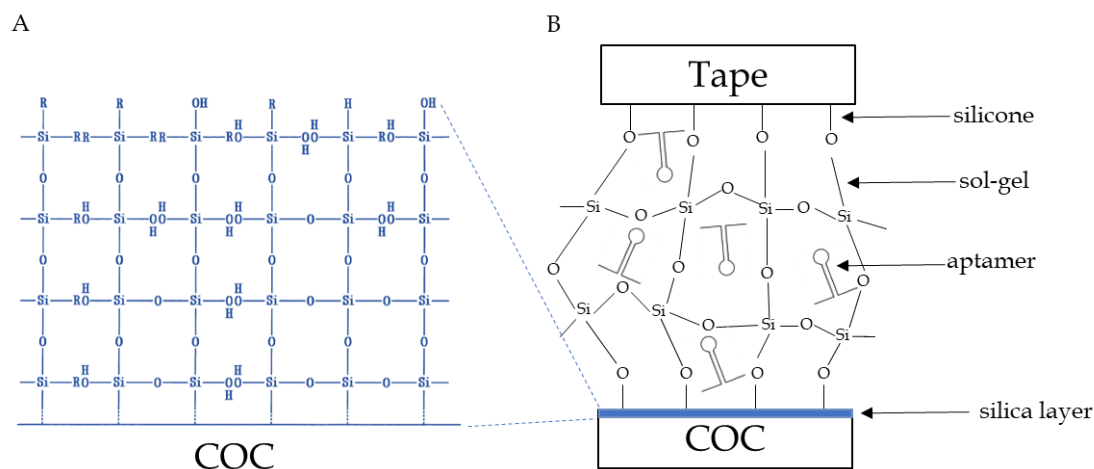


Figure 47: (A) structure of thin silica layer deposited by plasma in COC microchannel. Adapted from ²⁵⁴. (B) transversal view of a COC microchannel integrating aptamers encapsulated in sol-gel.

IV.2. Silica thin film deposits in COC microchannels

The most common method used for the thin silica layer deposition on COC surfaces is the Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition (PECVD).²⁵⁵ This low-pressure plasma process consists on the fragmentation of a precursor inside gas plasma. Organosilicon-oxygen mixtures are widely used to generate thin silica film deposition, notably for microfluidic applications.^{256,257} The thin silica layer confers hydrophilic properties allowing the generation of a controlled electroosmotic flow inside COC microchannels.²⁵⁸ The main drawback of many plasma treatments is the use of low pressures leading to expensive and cumbersome plasma equipments hardly adapted for industrial continuous operations.²⁵⁹ Moreover, generation of a vacuum could take several hours and increase the overall process time. To overcome this, plasma surface treatments have been recently developed at atmospheric pressure. Theelen et al.²⁵⁶ have demonstrated the possibility to deposit a thin silica film in few minutes inside COC microchannels at atmospheric pressure with organosilicon precursor. The silica layer is deposited with a helium-oxygen plasma generated between two electrodes integrated outside the chip and an organosilicon precursor circulating inside the COC channel. The scheme of the system developed by Theelen et al. is presented in Figure 48.

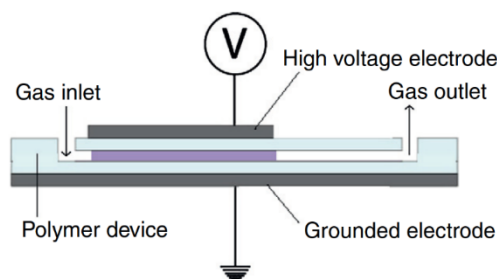


Figure 48: Scheme of the experimental set-up for the deposition of a thin silica layer in COC microchannel by atmospheric plasma process.²⁵⁶

A new strategy for the deposition of a thin silica layer in COC microchannel by an atmospheric plasma was developed within the scope of this study (Article 4). The *in-situ* silica coating was performed with a plasma jet. Plasma jet is advantageous compared to the plasma process of Theelen et al. because it does not require the integration and the alignment of electrodes outside the chip, nor a gas flow through the microchannel, which greatly simplifies the microfabrication and avoids the use of several external equipment. Moreover, the plasma jet permits to treat several microchannels simultaneously in a few seconds.

All the results obtained led to the writing of an article published in *Plasma Processes and Polymer* and reproduced in full below. These results were obtained thanks to the collaboration established between our team and the Plasma Processes, Microsystems Group where I carried out the implementation of the plasma process and the characterizations of the treatment. I wrote and proposed a first version of the manuscript which was later reworked by the co-authors.

Cyclic olefin copolymer surface functionalization by plasma-enhanced chemical vapor deposition using atmospheric pressure plasma jet for microfluidic applications

Samantha Bourg¹, Sophie Griveau¹, Fanny D'Orlyé¹, Michael Tatouljian², Fethi Bedioui¹, Cédric Guyon^{2*}, Anne Varenne^{1*}

¹ Chimie ParisTech PSL, CNRS FRE 2027, Institute of Chemistry for Life and Health Sciences, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris France

² PM (Plasma Processes, Microsystems Group) IRCP, Chimie ParisTech PSL, CNRS 8247, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

Corresponding authors :

Cédric Guyon*

E-mail: cedric.guyon@chimieparistech.psl.eu

A. Varenne*

E-mail: anne.varenne@chimieparistech.psl.eu

Abbreviation: APAP (air plasma at atmospheric pressure) ; APPECVD (plasma-enhanced chemical vapor deposition at atmospheric pressure) ; APPJ (atmospheric pressure plasma jet) ; ATR-FTIR (attenuated total reflection-Fourier transform infra-red) ; COC (cyclic olefin copolymer) ; LOAC (lab-on-a-chip) ; PDMS (polydimethyl siloxane) ; PECVD (plasma-enhanced chemical vapor deposition) ; TEOS (tetraethylorthosilicate) ; UV (ultraviolet) ; WCA (water contact angle) ; XPS (X-ray photoelectron spectroscopy).

Abstract:

Lab-On-A-Chip (LOAC) technology promises solutions for high throughput and highly specific analysis for environment and health applications. The choice of the material to engineer them is crucial. Indeed, each material has its own physicochemical properties which determine the microfabrication method. Moreover, it is sometimes necessary to modify the physico-chemical properties of the microchannel surface for subsequent functionalization and/or fluid flow control. Therefore, the challenge is to develop LOAC materials allowing fast, easy and cheap microfabrication methods and efficient surface treatment.

Cyclic Olefin Copolymer is a thermoplastic which allows easy microfabrication for both rapid prototyping and low-cost mass production of microfluidic devices. It is thus a promising material for the conception of LOACs for environment and health applications. However, the strategies for COC surface modification are time-consuming, expensive and/or not adapted for industrial development. This study reports for the first time the optimization of an easy silica coating process on COC substrate by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition at Atmospheric Pressure (APPECVD) with plasma jet and tetraethylorthosilicate (TEOS) as precursor. The overall procedure was designed so as to simply obtain silanol groups for further immobilization of a ligand or a monolithic structure and also to carry on electrokinetic separations within COC microchannels. For this purpose, the influence of different parameters of the silica-coating procedure were studied on COC plates first and optimized: the distance between the torch and the substrate (31.5 mm), the TEOS flow rate (200 μ L/min), the carrier air flow rate (20 L/min) and the number of treatment cycles (5). The physico-chemical properties of the coatings were analyzed by ATR-FTIR, contact angle measurements and ellipsometry. Under optimized conditions, the deposited silica layer

presents a thickness of 158 ± 7 nm and is stable for 14 days stored at atmospheric pressure and room temperature. This new process was then successfully transposed on a COC-embedded microchannel (100 μm) and paves the way for a simplified and controlled COC surface modification for the development of versatile LOAC.

1 Introduction

Since nearly 20 years polydimethyl siloxane (PDMS) has been a popular material for the fabrication of microfluidic devices due to its easy microfabrication method, its elastic and transparency properties and its biocompatibility.^{208,209} However, there is nowadays a move towards thermoplastic materials for their reduced cost and easier microfabrication.²⁶⁰⁻²⁶⁴ Among the various thermoplastics, cyclic olefin copolymer (COC) has emerged as it offers a high chemical resistance and exhibits an optical transparency close to that of glass (for wavelengths over 300 nm).⁶⁹ COC microsystems are furthermore easily micro fabricated allowing for both rapid prototyping and low-cost mass production.^{265,266}

Despite all these advantages, COC's main drawbacks as a material for microfluidics are its surface chemical inertness and its hydrophobic properties. In the case of LOACs, the integration of the different steps of an analytical chain (pre-concentration, separation and detection) in microchannels mainly implies a chemical modification of the COC surface. Some COC microchannel treatments provide hydrophilic properties to control electrokinetic separations²⁶⁷⁻²⁷¹ or to integrate chemical reactive groups for ligands^{268,269,272-275} or monolith²⁷⁶⁻²⁷⁸ immobilization. Moreover, surface functionalization of COC micro channels minimizes the adsorption of analytes in particular biological molecules.^{267,270,274,279} Nowadays, three main COC surface functionalization strategies are commonly used: UV/ozone oxidation,^{280,281} photografting^{267,269,271,276,277,279,282-285} and plasma processes^{256,257,272,275,286-290}.

The UV/ozone oxidation procedure relies on the exposition of the COC surface under a mercury lamp and in an air-filled chamber at atmospheric pressure resulting in the generation of ozone. This treatment permits to confer hydrophilic properties to COC surfaces.^{280,281}

Photografting is performed by a photoinitiator under a UV light, which excitation promotes abstraction of hydrogen atoms from the COC surface, leading to the formation of radicals which then initiate a surface grafting polymerization process.²⁵⁸ Generally, photografting is performed through a single step, that can lead to a significant amount of ungrafted polymer.²⁷⁹

Plasma is widely used for COC surfaces treatment^{256,272,275,286,288-292}, so as to shift the COC surface to a hydrophilic one, due to its oxidation, molecule chain scissions, substitution and recombination^{291,292}. Several gases or gas mixtures have been extensively used for plasma generation such as oxygen, argon or nitrogen.^{286,288,291,292} The main advantages of this surface treatment are that it is an environmentally benign process and leads to a homogeneous surface.^{286,288,291,292}

One renowned plasma process to deposit chemical layer on surfaces is Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition (PECVD).²⁵⁵ This low-pressure plasma process consists on the fragmentation of a precursor inside gas plasma. Organosilicon-oxygen mixtures are widely used to generate thin silica film deposition, notably for microfluidic applications.^{256,257} The thin silica layer confers hydrophilic properties allowing the generation of a controlled electroosmotic flow for electrokinetic separations inside COC microchannels.²¹³ Moreover, the presence of reactive chemical functions, such as silanol groups (SiOH), due to plasma polymerization of organosilicon precursors,^{256,257} could allow the grafting of several chemical entities^{293,294}. Da Silva et al. have shown the possibility to deposit by PECVD at low pressure thin layers of silica (700 nm thickness) on COC surface.²⁵⁷ This layer was characterized by water contact angle (WCA), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and ellipsometry measurements, showing the presence of a silica film on the COC substrate. Ladner et al. demonstrated the activation of COC surface by a plasma at low pressure composed of 1-bromopropane as the brominated precursor and of argon gas, to create brominated functionalities that could permit to immobilize ligands through subsequent chemical modifications *via* a click chemistry reaction.²⁷⁵

The main drawback of many plasma treatments is the use of low pressures leading to expensive and cumbersome plasma equipments hardly adapted for industrial continuous operations.²⁵⁹ Moreover, generation of a vacuum could take several hours, and increase the overall process time. To overcome this, plasma surface treatments were further developed at atmospheric pressure. A study has demonstrated the possibility to deposit a thin silica film in few minutes inside COC microchannels at atmospheric pressure with organosilicon precursor.²⁵⁶ The silica layer was deposited with a helium-oxygen plasma generated between two electrodes integrated outside the chip and an organosilicon precursor circulating inside the COC channel.

This study reports, for the first time, the deposition of a silica coating inside COC microchannel with a plasma jet at atmospheric pressure. Plasma jet is advantageous over plasma treatments at atmospheric pressure proposed by Theelen et al.²⁵⁶ Indeed, it does neither

need the integration and the alignment of electrodes outside the chip, nor a gas flow through the microchannel, which greatly simplifies the microfabrication steps and avoids the use of several external equipments. Moreover, the plasma jet permits to treat several microchannels simultaneously in a few seconds. The experimental conditions for this COC surface modification with tetraethylorthosilicate (TEOS) were optimized so as to obtain a homogeneous density of silanol groups on its surface, for further functionalization and for the generation of an electroosmotic flow inside COC microchannels. Experimental conditions were optimized in terms of distance between the nozzle and the substrate, TEOS and carrier air flow rates, and number of treatment cycles. The treatment of COC channels by the Atmospheric Pressure plasma jet proved to be fast and easily transposable for industrial applications. This process does not require complicated microfabrication steps, is environmentally friendly and will allow to design new LOACs involving COC materials.

2 Materials and Chemicals

COC plates (Topas® grade 8007, $T_g = 75^\circ\text{C}$, 1 mm thickness) were purchased from Microfluidic ChipShop. Brass mold (8 cm * 8 cm * 5 mm) was purchased from GREM (France). Silica wafers (4 inches, 500 μm of thickness) were purchased from Prolog Semicor (Ukraine). Tetraethylorthosilicate (TEOS, 98%), was purchased from Sigma-Aldrich. 2-propanol (99.9%) was purchased from GPR Rectapur. Ultra-pure water (resistivity 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, Purelab Flex, Elga Veolia, France) was used.

3 General Procedure for the Silica-Like Deposition Using AcXys® plasma jet on COC Surface

In this study, the silica thin film has been deposited with an atmospheric pressure plasma system produced by AcXys® Technologies (Saint Martin le Vinoux, France). This system is composed of three command modules and a moving nozzle. The frequency is set with ULS command module where the power and the gas throughout are displayed. Thus, the APPJ (Atmospheric Pressure Plasma Jet) nozzle is mounted on a motorized xyz table (controlled using the Quickset module) so that it can sweep the surface of the sample at constant speed (fixed at 150 mm/s) in order to deliver a homogeneous treatment. The plasma jet is generated by introducing air (35 L/min) into the plasma torch. The ULC module is used to inject the liquid organosilicon precursor (TEOS) contained in a pressurized tank into the treatment nozzle at a flow rate between 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 500 $\mu\text{L}/\text{min}$. The carrier gas (at a flow

rate between 5 L/min and 25 L/min) vaporizes the liquid precursor which is then injected in post-discharge *via* pipes placed on each side of the nozzle.

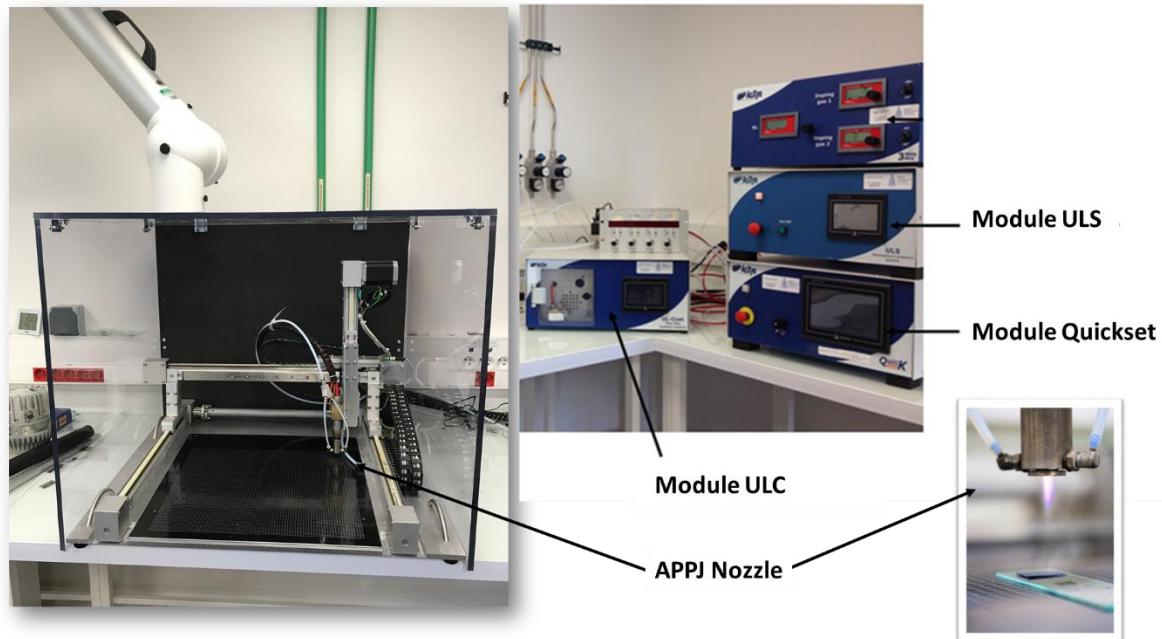


Figure 1. Picture of the torch plasma AcXys®.

4 Microfabrication of COC Channels

The design of channels was performed with the 3D CAO software Inventor® and then transposed on a brass mold with micro-molding technic (Minitech®). Afterwards, hot embossing was applied to COC (75 mm * 25 mm * 1 mm) plates, inside a 3 tons hydraulic press (Scannex®) at 150°C, under a 15 bars pressure for 30 min. The system was then cooled at room temperature before shutting off the pressure. The dimensions of simple COC microchannels used during the study are of 6 cm length, 100 μm width and 30 μm height.

5 Characterizations of the Silica-Like Deposition on COC Surface

Infrared spectra were acquired using a Fourier Transform Infrared Spectrometer (Cary 660 Spectrometer, Agilent) with an Attenuated Total Reflectance module (GladiATR, Pike). The ATR-FTIR spectra were collect from 4 000 to 500 cm⁻¹, at a resolution of 4 cm⁻¹. 100 scans were made for each measurement. The background (air) was taken before each measurement.

Static ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ.cm) contact angle (WCA) measurements were done thanks to a DSA25-Drop Shape Analyser from Krüss. A 2 μL droplet was released from a syringe and placed slowly on the surface which contact angle was measured after 30 s. Similar experiment were conducted on the modified material after 14 days of storage in a petri

dish at room temperature and at atmospheric pressure to simulate the COC microchips storage conditions. Images of droplet formation captured using a high-resolution camera were analyzed with the Advance Image Analysis Software (Krüss). The reported contact angle values are an average at least three measurements at various locations on COC plates.

Optical microscopy (Axio Observer A1, Zeiss) was performed with a CCD digital camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies Stadtroda, Germany) and an image acquisition software (Hiris, RD Vision, France). Images were reprocessed *via* Image J software.

Spectroscopic ellipsometry (UVISEL, Horiba Jobin Yvon) was performed at an incidence angle of 60°, with a 75 W Xe lamp over a spectral range of 245-2100 nm (i.e., 0.6-5 eV). Ellipsometry is based on variation of light polarization, which is reflected by the sample.²⁹⁵ As COC substrates do not reflect light,⁶⁹ a silica wafer was chosen as model substrate to determine the thickness of silica deposits²⁷⁵. The reported thickness values are an average of at least three measurements at various locations on modified of plate surfaces.

6 Results and Discussion

As a preliminary treatment, COC plates were sonicated in isopropanol and then water (during 3 min). When treated with the plasma jet, COC plates were attached with carbon tape on a holder. So as to remove eventual low molecular weight fragments at the top of COC surface layer,²⁵⁷ they were pre-treated by Air Plasma at Atmospheric Pressure (APAP) at 80 kHz (987 W, 35 L/min air) with a nozzle speed of 150 mm/s. In a second step, a silica film was then deposited on COC surfaces by APPECVD process, under an air plasma to decompose TEOS 80 kHz (1030 W, 35 L/min air) with a nozzle speed of 150 mm/s. The APPECVD process could be applied several times, “a treatment cycle” being defined as one APPECVD process. The influence of several experimental parameters on the silica coating of COC substrates (2 cm²) was studied. These parameters are the distance between the nozzle and the substrate surface (from 16.5 to 31.5 mm), the TEOS flow rate (from 100 μL/min to 200 μL/min), the carrier air flow rate (from 5 to 20 L/min), and the number of treatment cycles (from 1 to 5). The COC plates before treatment, after the APAP step, and after APAP + APPECVD were characterized by ATR-FTIR, WCA and optical microscopy. The thickness of silica layers was measured by ellipsometry.

6.1 Characterizations of Untreated and Plasma Treated COC Plates

Figure 2 shows ATR-FTIR (**Figure 2.a**) and optical microscopy characterizations (**Figure 2.b**) of COC surfaces, either before any treatment, after APAP treatment and after

APAP+ one APPECVD cycle. The water contact angle measurements were done for each step of the silica deposit process. The thickness of the silica layer after APPECVD treatment was also measured.

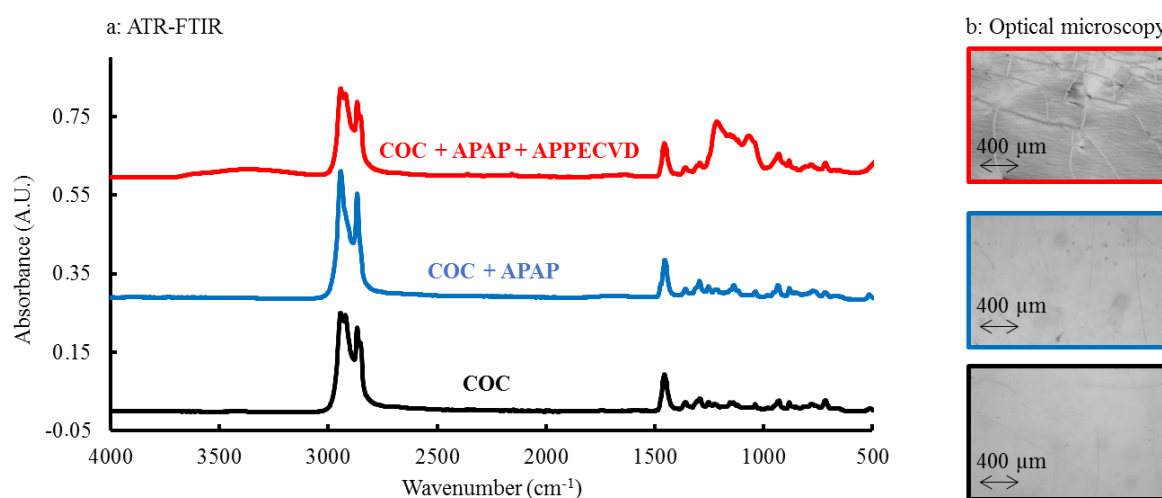


Figure 2. COC substrate characterizations before any treatment (bottom graph and image), after APAP treatment (middle graph and image) and after APAP + APPECVD treatments (upper graph and image) by (a) ATR-FTIR, and (b) optical microscopy. Experimental conditions for APAP: 16.5 mm between torch and surface and 150 mm/s nozzle speed (~300 ms treatment time). Experimental conditions for APPECVD: 16.5 mm between torch and surface, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ TEOS, 5 L/min carrier air and 150 mm/s nozzle speed (~300 ms treatment time).

Untreated COC surfaces present an ATR-FTIR spectrum (**Figure 2.a**) with absorption bands located at 2947 and 2868 cm^{-1} which are assigned to carbon/hydrogen stretching vibration modes of $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ groups from the polymer backbone. The band around 1456 cm^{-1} corresponds to the wagging mode of $-\text{CH}_3$ groups.²⁵⁷ The WCA measurements of untreated COC plate ($95\pm 1^\circ$) confirmed the hydrophobic properties of the polymer.⁶⁹ Optical microscopy characterization showed that the COC surface was transparent and homogeneous (**Figure 2.b**).⁶⁹

The ATR-FTIR spectrum of APAP-treated COC surface did not present any difference with that of the untreated COC surface (**Figure 2.a**). After APAP treatment, the WCA values dropped from $95\pm 1^\circ$ to $48\pm 7^\circ$. This can be explained by the insertion of polar functional groups onto the surface of the raw hydrophobic COC substrate after APAP treatment,^{286,289,290,292,296} leading to a more hydrophilic surface. ATR-FTIR spectroscopy is not sensitive enough to

detect the presence of polar groups deposited by APAP treatment. Roy et al. have suggested a possible reaction mechanism on COC surface during plasma treatment²⁹², the electrons, ions and free radicals generated during high energy plasma irradiation promoting breakage of the C-H and C-C bonds. This would lead to shorter polymer carbon chain, the formation of other molecules through recombination reaction and also crosslinking.²⁹² As oxygen atoms are present, chemical interactions between the radicals from air and thermoplastics occur, which promote the insertion of polar groups like hydroxyl, ketone or carboxylic acid for example.²⁸⁸ Optical microscopy characterization showed that APAP-treated COC surface did not present any difference compared to untreated COC (**Figure 2.b**). APAP treatment did not seem to modify the COC surface at a macroscopic scale and preserved the optical transparency of the substrate.

After APPECVD treatment, three new ATR-FTIR bands appeared in addition to the characteristic bands of COC backbone. During APPECVD treatment, a silica layer was deposited due to the reaction between oxygen reactive atoms and the precursor, generating emission of carbon dioxide and water.²⁵⁷ The two bands at 1225 cm^{-1} and 1078 cm^{-1} correspond to the Si-O-Si asymmetrical and symmetrical stretching modes, respectively.^{257,297} The band located at 3342 cm^{-1} is assigned to hydroxyl group (stretching mode). This band is related to the presence of Si-OH groups, as the interaction between the $-\text{SiO}_2$ layer and the air leads to the formation of $-\text{OH}$ groups at the outer surface of the coating.²⁵⁷ The initial bands originating from the COC thermoplastic backbone (2947 , 2868 and 1456 cm^{-1}) were still present due to the low thickness of the silica layer ($39\pm 5\text{ nm}$) compared to the depth to the analysis.²⁵⁷ The WCA values dropped from $48\pm 7^\circ$ to $27\pm 2^\circ$ for APAP- and APAP + APPECVD-treated COC surface, respectively, evidencing the deposition of a more hydrophilic layer. Optical microscopy characterization shows that APPECVD treatment induced micro-cracked surface layer (**Figure 2.b**).

In order to generate a homogeneous immobilization of ligands/monoliths or a repeatable electroosmotic flow between various batches of COC LOACs, the surface layer should be as homogeneous as possible. Micro-cracks may be due to the generation of an elevated temperature during plasma treatment that could degrade the surface. By increasing the distance between the nozzle and the substrate, temperature during the treatment should be lowered.

6.2 Influence of the Distance Between the nozzle and the Surface on the Silica Coating

To avoid the presence of cracks evidenced on APAP + APPECVD-treated COC surface, probably caused by a too high treatment temperature process, the distance between the torch and the substrate was increased, step by step (by 5 mm), from 16.5 mm and 31.5 mm. The increase in this distance should allow reducing the temperature during the treatment. The study was performed in the same experimental conditions as previously described except for the distance between the torch and the substrate. For each distance, the thickness of the silica layer was measured by ellipsometry and the presence of cracks was checked by optical microscopy (**Table 1**).

Table 1. Influence of the distance between the torch and the COC surface on the silica layer thickness determined by ellipsometry. For experimental conditions for silica deposition, see Figure 2.

Distance between the torch and the surface of the substrate [mm]	Silica coating thickness [nm]	Presence of cracks
16.5	39±5	Yes
21.5	43±11	Yes
26.5	38±8	Yes
31.5	20±3	No

When torch/substrate distance was increased, the silica layer thickness decreased concomitantly. This can be explained by the fact that, air/TEOS plasma spot reaches the COC surface with a large diameter, leading to less TEOS reactive species density onto the COC surface. The cracks were no more visible when applying a distance of 31.5 mm. For all the tested distances, the wettability did not change, with a constant value of ~30°.

6.3 Influence of the TEOS flow rate and number of treatment cycles

The influence of the TEOS flow rate (100 and 200 $\mu\text{L}/\text{min}$) and the number of treatment cycles (1, 3 and 5) on the properties of the deposited silica layer were studied by ATR-FTIR, WCA and ellipsometry (**Figure 3**). For this study, the carrier air flow rate was fixed at its high value (20 L/min) to consider a high silica and silanol density, for a better sensitivity with ATR-FTIR measurements.

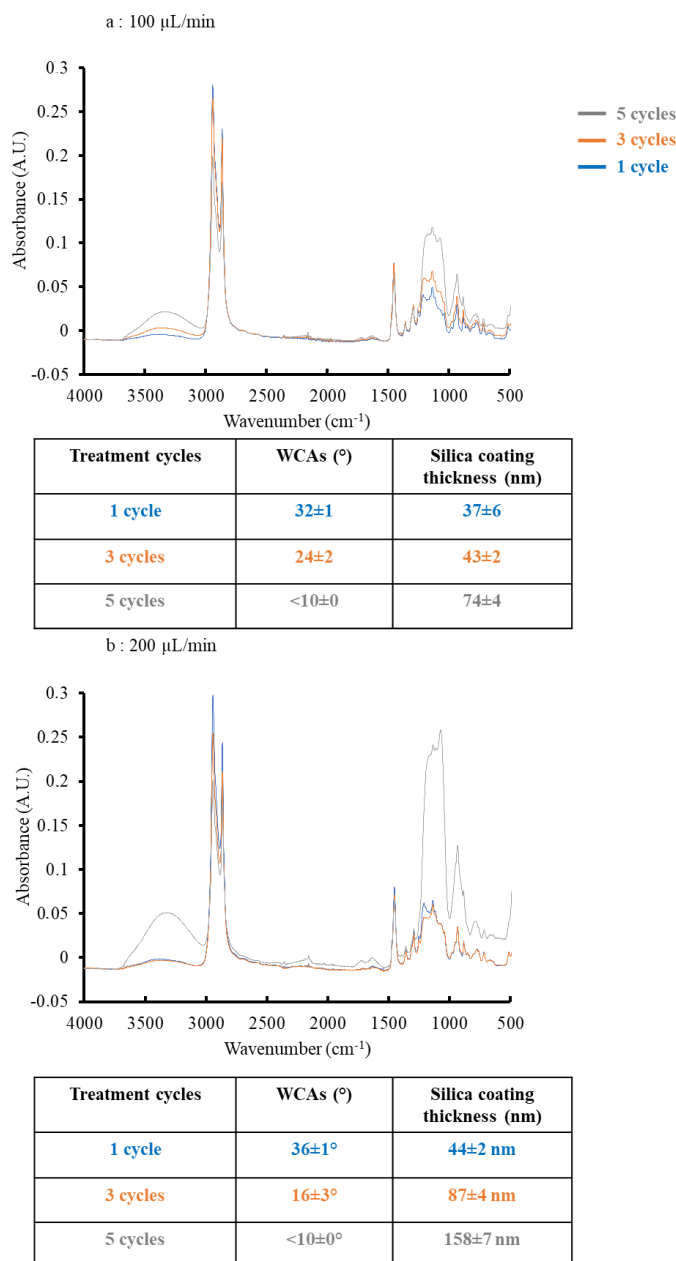


Figure 3. COC substrate characterizations (ATR-FTIR, WCA and ellipsometry) after the overall plasma treatment: (APAP followed by 1 (~300 ms), 3 (~900 ms) or 5 (~1.5 s) APPECVD treatment cycles. Experimental conditions for APAP pre-treatment: 31.5 mm between torch and surface, 1 cycle treatment (300 ms). Experimental conditions for APPECVD: 31.5 mm between torch and surface, (a) 100 or (b) 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ of TEOS and 20 L/min of carrier air flow rate.

For each TEOS flow rate, the peak intensities attributed to the silica thin film (3342, 1225 and 1078 cm^{-1}) increased with the number of treatment cycles. On the other side, peak intensities originating from the thermoplastic backbone (2947, 2868 and 1456 cm^{-1}) decreased

when increasing the number of cycles (**Figure 3**). These results are consistent with an increase in silica deposit with the number of cycles. These results were confirmed by WCA measurements (**Figure 3**): the wettability increased with the number of treatment cycles. Concerning ellipsometry measurements, the layer thickness was confirmed to increase with the number of treatment cycles.

Moreover, the TEOS flow rate played a key role on the silica layer characteristics. The intensity of the band attributed to -OH groups from silanol (3342 cm^{-1}) was twice higher at $200\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ (5 cycles) compared to $100\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ (5 cycles) of flow rate (**Figure 3**). The higher the flow rate, the more hydrophilic the treated surface and the thicker the layer. This result is in accordance with previous studies.²⁹⁸ So a higher silica density was deposited with the higher TEOS flow rate on COC surface. Optical microscopy characterizations were done to verify the absence of visible cracks with all combinations of experimental conditions tested. For all of them, no crack on the surface treated by APAP + APPECVD were noticed (data not shown).

6.4 Influence of the Carrier Air Flow Rate

Another experimental parameter for the optimization of the silica layer is the carrier air flow rate, which was varied from 5 to 20 L/min. For each flow rate, ATR-FTIR, WCA and ellipsometry measurements were performed and the presence of cracks was checked by optical microscopy (**Figure 4**).

ATR-FTIR spectra indicate that the absorbance of the bands attributed to the silica layer (3342 , 1225 and 1078 cm^{-1}) increased with the carrier air flow rate, whereas the absorbance of the bands originating from the thermoplastic backbone (2947 , 2868 and 1456 cm^{-1}) decreased (**Figure 4.a**). The thickness of the silica layer increased from $78\pm 2\text{ nm}$ to $158\pm 7\text{ nm}$, when the carrier air flow increased from 5 L/min to 20 L/min (**Figure 4.b**). It therefore seems that the increase in carrier air flow provoke an increase in interaction between SiO_2 layer and the air leading to the formation of -OH groups at the surface of deposit layer thus generating a higher silanol density on plasma treated COC thermoplastic (**Figure 4.a and 4.b**). With 5 L/min and 20 L/min carrier air flow rates, the optical characterizations of the surface proved the absence of crack on the silica deposit (**Figure 4.c**). Therefore, the objective to obtain a sufficient and homogeneous surface silanol density for further functionalization^{293,294} and generation of a controlled electroosmotic flow inside COC microchannels²¹³ can be reached with the following APPECVD conditions: a 31.5 mm distance between the torch and the surface, $200\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$ TEOS flow rate, 20 L/min carrier air flow rate and 5 treatment cycles. The silica layer was then

of 158 ± 7 nm thickness with a contact angle of less than 10° . These performances can be compared to the ones of other plasma processes on COC surfaces for silica deposition (**Table 2**), in terms of layer thickness and wettability.

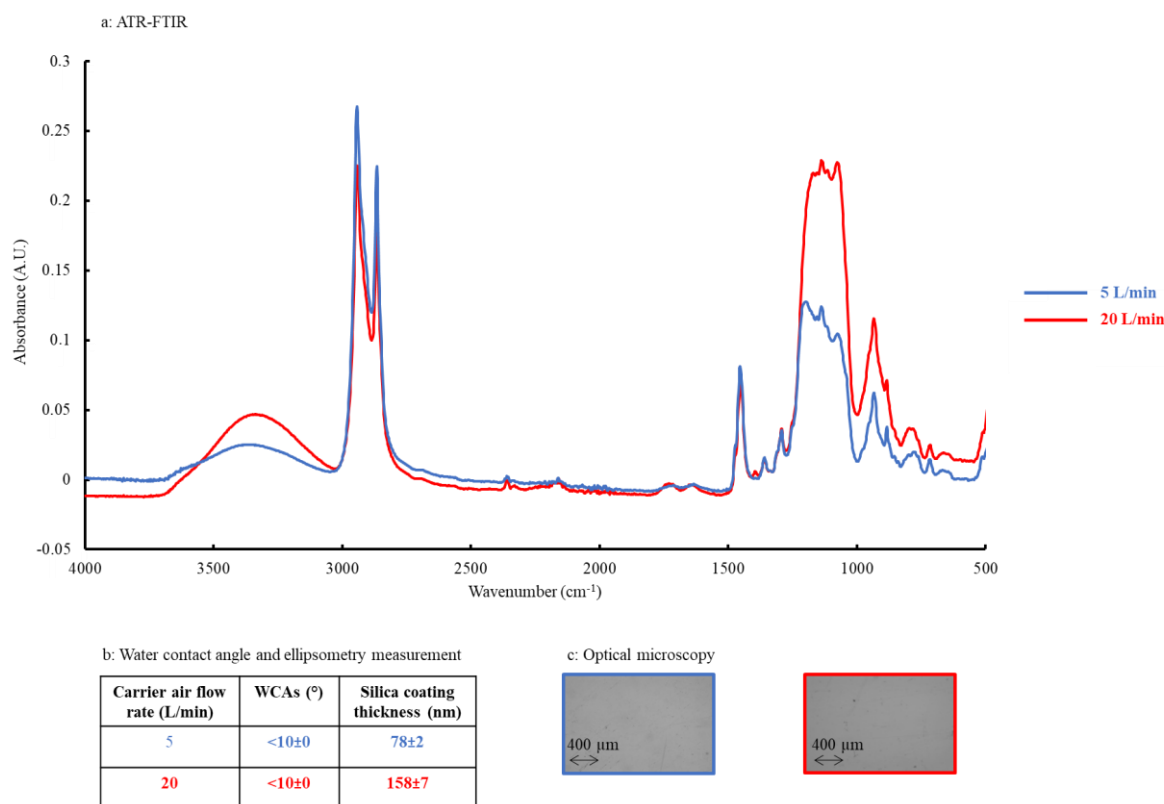


Figure 4. COC substrate characterizations by (a) ATR-FTIR, (b) WCA and ellipsometry, and (c) optical microscopy after APAP and 5 APPECVD treatment cycles. Experimental conditions for APAP pre-treatment: 31.5 mm between torch and surface, 1 cycle (300 ms). Experimental conditions for APPECVD: 31.5 mm between torch and surface, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ of TEOS, 5 treatment cycles (1.5 s) and 5 (blue) or 20 L/min (red) of carrier air flow rate.

The plasma process described herein relies on simplified conditions in terms of equipments, treatment rapidity and costs²⁹³ and allows generating the deposition of a silica layer on COC surface with a similar wettability and the same order of magnitude for the silica layer thickness (between 100 and 900 nm) as the plasma process at low pressure (**Table 2**).

The plasma process at atmospheric pressure developed by Theelen et al.²⁵⁶ provides the same silica layer characteristics as our process (**Table 2**). However, the proposed plasma process herein is simpler than the one of Theelen, as it does not require the insertion of electrode outside the COC microchannels and gas inlet and outlet, which should simplify the development of LOAC systems. Moreover, the plasma treatment with the torch is faster (few

seconds) than the process at atmospheric pressure developed by Theelen et al.²⁵⁶ (few minutes) (Table 2).

Table 2. Comparison of the proposed plasma process with the ones described in other studies, in terms of experimental conditions (gas and precursor natures), thickness and wettability of the silica layer.

Pressure	Gas	Precursor	Thickness [nm]	WCAs [°]	Time of treatment	Ref
Atmospheric pressure	Air	TEOS	158	<10	Few secondes	This study
Atmospheric pressure	Helium/Oxygen	HMDSO	250	5-11	Few minutes	²⁵⁶
Low pressure	Oxygen	HMDSO	700	<10	Few hours to obtain a low pressure and few minutes for the plasma treatment	²⁵⁷

6.5 Stability of the Silica Layer

The stability of the silica layer deposited using the optimized experimental conditions (APPECVD: 31.5 mm between torch and surface, 200 μ L/min TEOS flow rate, 20 L/min carrier air flow rate and 5 treatment cycles) was studied by WCA measurements. APAP + APPECVD-treated COC plate was stored in a petri-dish at room temperature and at atmospheric pressure for 14 days to simulate the COC microchips storage conditions. As a matter of comparison, untreated COC surface and APAP-treated COC plates were stored and studied under the same conditions (Figure 5).

As shown in Figure 5, silica layers deposited on COC surface are stable over 14 days, in accordance with another study.²⁵⁷ The COC plates with a APAP + APPECVD plasma treatment can thus be stored during 2 weeks at atmospheric pressure and room temperature before further processing.

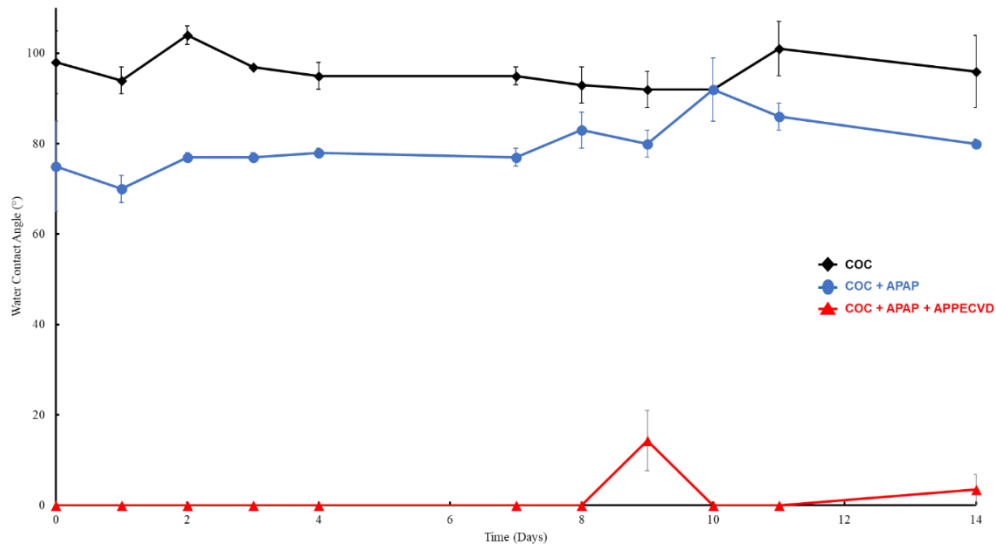


Figure 5. Evolution of WCA measurements in function of storage time (0 to 14 days) for raw (COC), pre-treated with APAP (COC + APAP) and fully treated (COC + APAP + APPECVD) COC surface. Storage conditions: in petri-dish at atmospheric pressure and room temperature. Experimental conditions for APAP: 31.5 mm between torch and surface and 1 cycle (300 ms). Experimental conditions for APPECVD: 31.5 mm between torch and surface, 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ TEOS flow rate, 20 L/min carrier air flow rate and 5 treatment cycles (1.5 s).

6.6 Optical Characterization of Plasma Treated COC Microchannels

So as to evaluate the transposition of our process into COC microchannels, preliminary experiments were conducted using optimized conditions for silica coating in single COC microchannels of 6 cm length, 100 μm width and 30 μm height. Optical characterizations of COC microchannels were performed before and after APAP + APPECVD treatment, as illustrated in Figure 6.

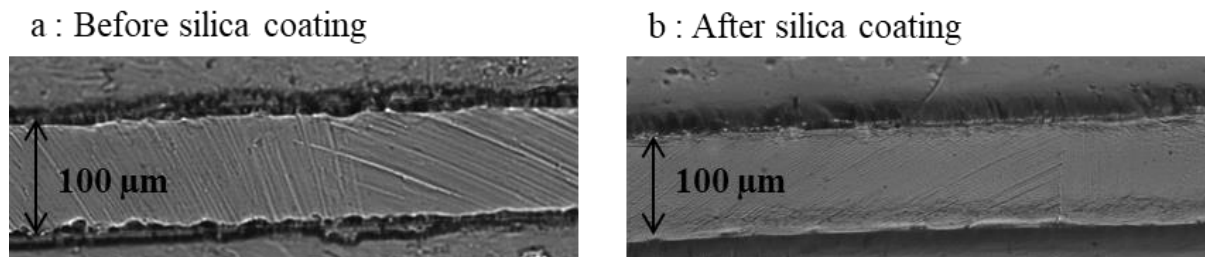


Figure 6. Optical characterizations of COC microchannels (a) before and after (b) silica coating by plasma treatment at atmospheric pressure. Experimental conditions for APAP and APPECVD: see Figure 5. Fully treatment time (COC + APAP + APPECVD) microchannel is ~ 2.4 s. The black line is 100 μm bar scale.

This figure shows that scratches inside COC microchannel due to the brass mold can be observed (Fig 6 a). After APAP + APPECVD treatment, almost all scratches disappeared, probably screened by the deposition of a thin silica layer into the microchannel (**Figure 6.b**). The thin silica layer overlaid the defects inside COC microchannels. These results prove the efficient transposition of the *in situ* plasma process, inside microdevices.

7 Conclusion

This study reports for the first time a new plasma process for simplified, quick and efficient silica layer deposition on COC surfaces. This new procedure employs Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition at Atmospheric Pressure (APPECVD) with a plasma jet, TEOS as precursor and air gas. The optimization of different experimental conditions allowed to generate a homogeneous silica coating on COC surface. The optimal experimental conditions permitted to deposit a 158 ± 7 nm hydrophilic silica layer that proved to be stable over 14 days stored at room temperature and atmospheric pressure.

This fast and versatile plasma process compared to the ones generated at low pressure, allowed to deposit thin silica layers of similar properties on COC substrate. This plasma jet treatment also allowed *in situ* treatment of COC microchannels, that is to say fast and easy microfabrication process of the microchips, is environmentally friendly and can be further used for industrial application, among which the production of COC LOAC.

Acknowledgements: Ecole Doctorale 406 (PSL and Sorbonne Université) is acknowledged for its financial support. This work has received the technical support of "Institut Pierre-Gilles de Gennes" (laboratoire d'excellence, "Investissements d'avenir" program ANR-10-IDEX-0001-02 PSL and ANR-10-LABX-31.).

IV.3. Electroosmotic flow characterization

Further characterizations of the chemical treatment of COC surface have been performed in order to evaluate the electroosmotic flow generated inside such COC microchannels, in order to develop MCE system.

The electroosmotic flow (EOF) of a single rectangular COC microchannel (100 μm width, 30 μm height and 6 cm length) treated by APAP + APPECVD in optimal experimental conditions (Article 4) was determined with the current-monitoring method and its stability

was estimated during one week. The current-monitoring method relies on the time required for a dilute buffer to displace a more concentrated one (or the other way around) under an electrical field along the entire microchannel. As the dilute buffer is less conductive than the concentrated one, the electrophoretic current should decrease over time as the dilute buffer progressively enters in the microchannel (or the other way around) (Figure 49).^{204,215}

The electroosmotic mobility (μ_{eo}) was determined using a background electrolyte (BGE) with the following composition: phosphate buffer, pH 7, IS = 20/18 mM (Δ IS = 2 mM). A high power supply (LabSmith Sequencer, Livermore, California, USA) was used to apply a positive voltage (1 kV) *via* platinum electrodes connected to the inlet and outlet reservoirs of the single COC microchannels. To stabilize the surface charge density between each experiment, the microchannel and reservoirs were filled with the BGE and a voltage (1 kV) was applied during 1 min. Then, the microchannel was filled with fresh BGE just before the experiment. The inlet reservoir was filled with the diluted BGE (the other way around), whereas the microchannels and the outlet reservoir were filled with a more concentrated BGE (the other way around). The experiments were repeated 3 times with the diluted BGE and 3 times with the concentrated BGE in the inlet reservoir. The chip was stored at room temperature and in air for 7 days. The values presented are the average of the 6 experiments (n=6). The current intensity signals obtained were treated with Excel (Microsoft, USA).

The electroosmotic mobility determined in silica-coated COC microchannels stored at room temperature and in air for 7 days is presented in Figure 50.

After APAP + APPECVD treatment, the μ_{eo} is equal to $28.3 \pm 1.9 * 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. This mobility is similar to those obtained with OSTE microchannels (Article 1). A μ_{eo} decrease is observed, at a value of 10% and 22%, seven and fourteen days after the APAP + APPECVD treatment, respectively. Thus, these microchannels can be stored 1 week at room temperature and in air.

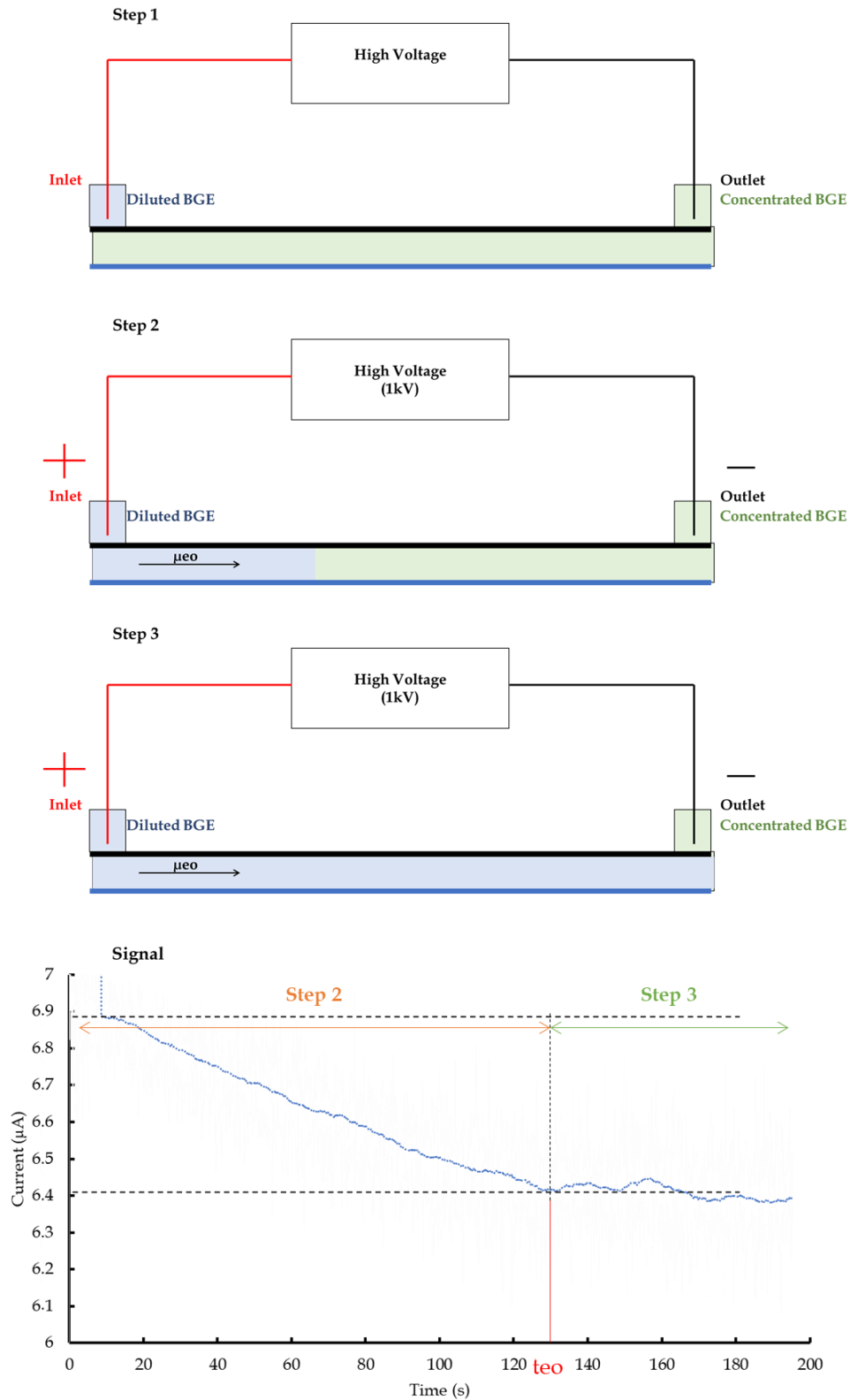


Figure 49: Procedure of the current-monitoring method to determine the electroosmotic time (t_{eo}), in the case where the dilute BGE replaces the concentrated BGE (sodium phosphate buffer, pH 7, IS=20/18 mM).

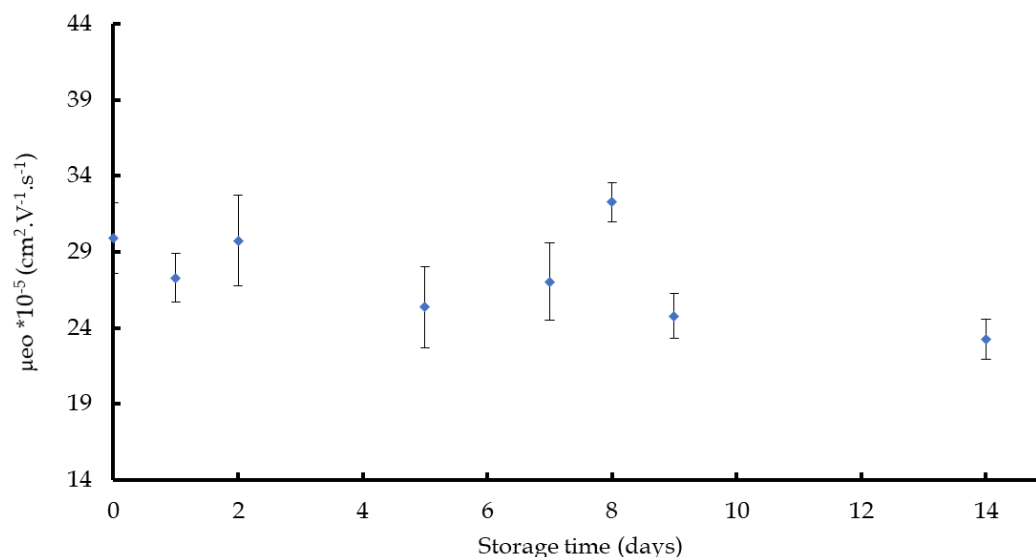


Figure 50: Electroosmotic mobility (μ_{eo}) evolution in function of the storage time (0 to 14 days) of COC microchannel treated by APAP + APPECVD and stored at room temperature and in air. The error bars represent standard deviation for 6 repetitions.

Table 15 presents different strategies of COC microchannels treatment to obtain a high electroosmotic flow. The highest value of electroosmotic mobility was obtained with the system developed by Roy and al.²⁸², but the UV-grafting of the 2-hydroxyethyl methacrylate in COC microchannel is more complex to implement because it is composed of several steps and the time of treatment is longer (more than 8 h) than the APAP + APPECVD treatment. Our strategy of functionalization to have a high EOF in COC microchannel is one of the faster reported in the literature.

Table 15 : Electroosmotic mobilities in COC microchannels treated.

Microfluidic dimensions	Treatment	Time treatment	EOF method	μ_{eo} ($10^{-5} * \text{cm}^2.V^{-1}.s^{-1}$)	Stability μ_{eo}	Ref
100 μm width, 30 μm height and 6 cm long	APAP + APPECVD	~2.4s	current monitoring method	28.3	stable 1 week	Our study
100 μm width and 40 μm height	UV-grafting of polyacrylamide	>24h	current monitoring method IS = 6.6/10 mM	variation from 4.1 (pH 4) to 15 (pH 9)	stable 20 min	267

100 μm width, 69 μm height and 4 cm long	UV/ozone	-	current monitoring method 100 mM Tris, 10/20 mM boric acid, pH 9	29	-	280
200 μm width, 50 μm height, 6 cm long	UV-grafting 2-hydroxyethyl methacrylate	>8h	current monitoring method Tris-HCl buffer (pH 8.49, IS = 20/19 mM)	74.3	stable for 21 days	282

IV.4. Sol-gel process for functionalization of COC microchannels

This section presents the experimental procedure and the optimization of the sol-gel polymerized in single silica-coated COC microchannels to permit the creation of an extraction/preconcentration zone due to this sol-gel and allowing fluid flow within the microchannel for subsequent separation and detection steps.

IV.4.1. Experimental procedure

Sol-gel was synthesized according to the protocol developed by Pérreard et al.^{131,132} Briefly, 1.55 mL of TEOS was hydrolyzed with 2.5 mM of hydrochloric acid (1 mL) prepared with ultra-pure water (18.2 M Ω .cm resistivity, Purelab Flex system, Elga Veolia, France) (molar ratio TEOS : water ; 1 : 8 respectively) under magnetic stirring until the obtention of one transparent solution and then 5% (wt) of poly(ethylene glycol) (Mw = 400 g.mol⁻¹, PEG 400) was added to the sol solution. The sol solution was kept in the fridge (4°C) for one night before its use. The sol solution was then mixed with sodium phosphate buffer solution (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (volumetric ratio: 1v/1v). The mixture was injected with a vacuum pump in the entire COC single-microchannel treated by APAP + APPECVD with the optimized experimental conditions determined in Article 4. The sol solution dried at room temperature during the *in situ* polymerization process.^{131,132} Sol-gel was washed with sodium phosphate buffer solution (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂. This action was repeated 3

times with a volume that represents 10 times of the total volume of one channel. The microchip was stored in a seal box containing wet paper at 4°C and the microchannel and reservoirs were filled with BGE.

An inverted optical microscope (Axio Observer A1, Zeiss, Germany) was used with a digital CCD camera (Pike F145B, Allied Vision Technologies, Stradtroda, Germany) in transmission mode. The images were acquired using the Hiris software (RD Vision, France). The images were processed with the Image J software.

The porosity properties (surface area and pore size distribution) of the sol-gel were analyzed with a porosimeter Autosorb-1 Quantachrome, by establishing the isotherms of adsorption and desorption of nitrogen at 77 K and using Density Functional Theory (DFT). The degassing step of samples before characterizations was carried out at 150°C to remove all organic molecules present inside sol-gel pores. The analysis was performed in collaboration with Dr. Thu-hoa Tran-Thi from the *Nanosciences et Innovation pour les Matériaux, la Biomédecine et l'Énergie* unit at *Commissariat à l'Énergie Atomique* from Saclay (France) (CEA-Saclay, DRF/IRAMIS/NIMBE UMR 3685). To obtain a sufficient amount of sol-gel for porosity characterizations (at least 2 mg), samples were made in glass containers, under the same experimental conditions as those polymerized in microchannels with a volume of reagent multiplied by 4. The samples thus prepared were then stored in a hermetically sealed box containing wet paper at 4°C before their characterizations.

IV.4.2. Results and discussions

Preliminary experiments

A sol solution was prepared under the experimental conditions described in Part IV.4.1. The magnetic agitation of the sol solution was stopped after obtaining a transparent solution (4 h of magnetic stirring) and adding PEG 400. PEG 400 into sol-gel, as recommended by previous researchers.^{299,300} PEG 400 is reported to improve the activity of entrapped ligands, and possible mechanisms include reducing biological molecule-silica interaction and adsorption and preventing gel shrinkage and pore collapse by acting as a pore filler. The use of low- rather than high-molecular weight PEG is thought to lead to the formation of smaller pores with a larger surface area.^{299,301}

After one night of storage of the sol solution at 4°C, BGE was added and the mixture was then injected into a silica-coated COC microchannel. The system was dried at room temperature for several hours. Characterizations by optical microscopy of the sol-gel after injection of sol in microchannel (T0) and after drying times of sol-gel for 30 min (T+30 min) 1 h (T+1 h), 2 h (T+2 h) and 3 h (T+3 h) were performed. Example of classical recorded images are depicted in Figure 51.

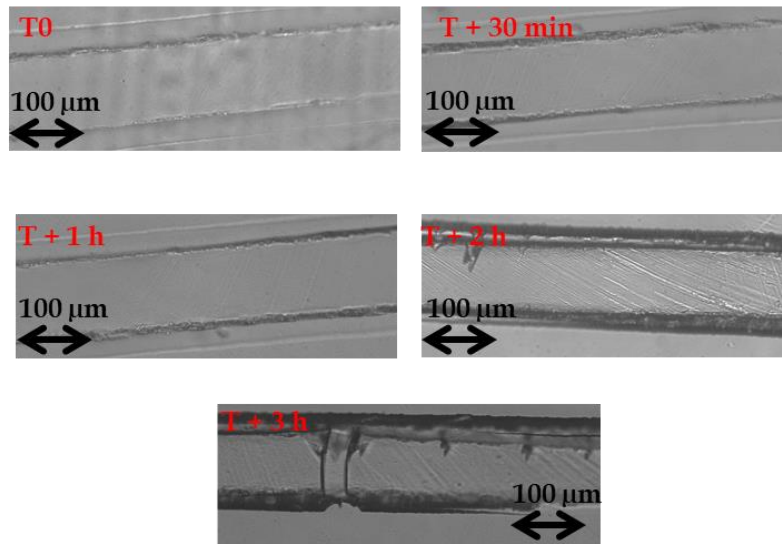


Figure 51: Characterization by optical microscopy of an area of a single microchannel (100 μm width, 30 μm height and 6 cm length) in COC treated with APAP+APPECVD and functionalized with a sol-gel hydrolyzed for 4 h. T0 is the moment just after the hydrodynamic injection of the sol solution into the microchannel by depression. T= i h is the drying time of the sol-gel at room temperature after introduction of the sol solution at T0.

At T0 the sol-gel is transparent and is evenly distributed in the microchannel. These results are in accordance with those of Perréard et al^{131,132}. From T0 to T=2 h after hydrodynamic injection of the sol solution, there is no macroscopic structural difference of the sol-gel. The white lines present in the channel at T+2 h are the scratches present at the bottom of the system. However, after 3h of drying at room temperature and in air, a crack in the sol-gel appears (Figure 51). Thanks to a test performed in a glass container, we have shown that the gelation of the sol-gel occurs less than 5 min after the addition of the BGE to the sol solution. It means that the sol-gel is formed almost directly after the sol solution injection in the microchannel. The presence of cracks at T+3 h can be explained by structural rearrangements in the wet sol-gel because the chemical reactions leading to the network formation are not

completed with the reaction.^{252,253,302} This phenomenon increases the stiffness of the sol-gel and is called aging. Aging is due to two main processes:^{252,253,302}

- the network of a wet sol-gel still contains a continuous liquid phase composed of condensable monomers that can react between each other and form smaller pore that increase the rigidity of the sol-gel.
- the gel network is originally still very flexible allowing neighboring R-OH or R-OR groups inside pore surface to approach each other and to undergo condensation reactions, causing contraction of the network and expulsion of pore liquid. This phenomenon is favored by vaporization of the solvent from pores and the contraction of the sol-gel can provoke cracks.

Therefore, to avoid any change in its structure at the macroscopic level, it was decided to dry the sol-gel at room temperature and in air for 2 h. The adsorption and desorption isotherms and the pore size distribution of the sol-gel are presented in Figure 52.

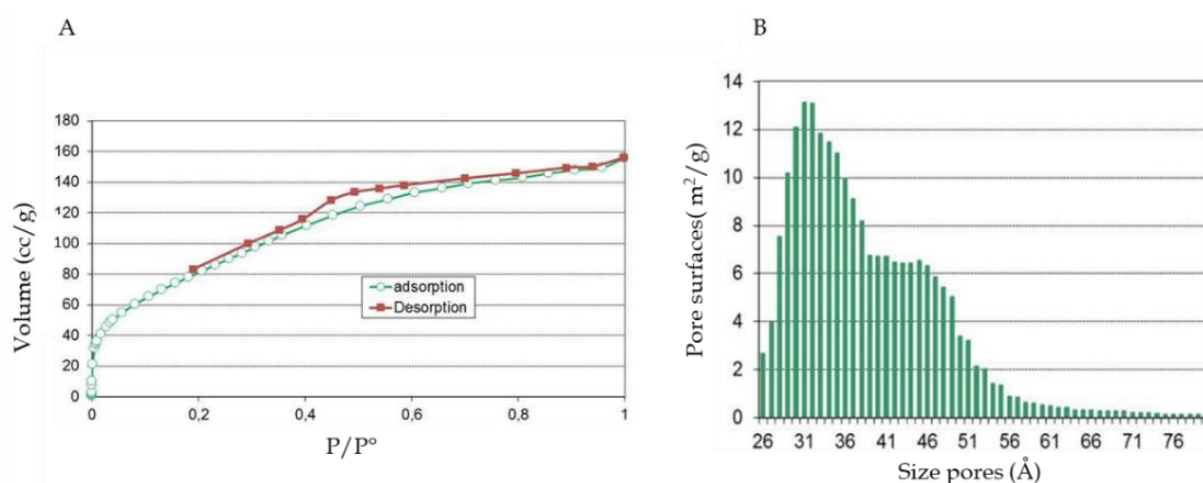


Figure 52: A: adsorption (green) and desorption (red) isotherms and B: pore sizes distribution of sol-gel hydrolyzed for 4 h, mixed with sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (1v :1v), dried for 2 h at room temperature and in air and stored at 4°C in humid conditions before characterizations.

The adsorption and desorption isotherms are typical of mesoporous materials (Figure 52.A).³⁰³ Figure 52.B shows that the sol-gel pore sizes have a bimodal distribution situated between 26 and 76 Å with a maximum at 31 Å. Mesopores (20 to 50 Å) are pores whose size is adapted to the retention of ligands, but is not always tailored to the fluid flow.¹¹⁶ It was therefore checked if whether it was possible to inject a BGE solution (sodium phosphate buffer

(pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM de MgCl₂) *via* a pump by depression into the microchannel functionalized with the sol-gel hydrolyzed for 4 h and dried at room temperature and in air for 2 h. Under these conditions no fluid could be injected in the channel. To perform analyses with a system containing a sol-gel microextraction area, an optimization of the pore size of the sol-gel was carried out.

Optimization of the sol-gel pore size

The pore sizes of the polymerized sol-gel COC in microchannel were not large enough to further circulate fluids in the microchannel. A dense sol-gel can be caused by²⁴²: (i) the presence of PEG 400, or (ii) the kinetics of hydrolysis and gelation reactions that give small pores. We therefore optimized each, parameter modified so as to increase the sol-gel pore sizes. Tests were performed by injecting a BGE solution (sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM de MgCl₂) *via* a pump by depression in the simple microchannel totally filled with the sol solution.

The effect of PEG 400 on pore size was evaluated by repeating the previously described protocol but without PEG 400. It has been shown that even without PEG 400, the sol-gel remains too dense to allow the injection of liquid solutions through its structure. Therefore, under these conditions, PEG 400 has little or no effect on the sol-gel pore sizes polymerized in COC microchannel.³⁰⁴

To find out if the gelation time has an effect on pore sizes, the drying time of the sol-gel in the microchannel was reduced to 5 min. Even with a shorter drying time, no fluid could be injected through sol-gel. The drying time therefore has little or no effect on the increase in sol-gel pore size polymerized in COC microchannel.

Another route was therefore tested: the stirring time of the sol solution, which corresponds to the hydrolysis and the condensation reaction time.²⁵³ The sol-gel is prepared under the same experimental conditions as before except that the stirring time of the sol solution is doubled (8 h). With 8 h of magnetic agitation of the sol solution, it has been shown that the pores of the sol-gel are large enough for fluid circulation in the COC microchannel. Table 16 summarizes the different parameters that were optimized to obtain liquid solution injection through the structure of the polymerized monolith into a coated-silica COC microchannels.

The influence of hydrolysis time on average pore sizes of the sol-gel was assessed by performing adsorption and desorption isotherms of sol-gel hydrolyzed for 8 h (Figure 53).

Table 16: Optimization of the experimental conditions of the sol-gel polymerization process in COC microchannel. For each test the solution of sol was mixed with BGE (sodium phosphate (pH 8, IS=300mM) + 5 mM MgCl₂) (1v/1v) before its hydrodynamic injection in the COC microchannel entirely functionalized by sol-gel.

N° Tests	Molar ratio TEOS : eau	Time of magnetic agitation of the sol solution	PEG 400 (wt%)	Drying time	Liquid solution circulation
1	1:8	4 h	5	2 h	No
2	1:8	4 h	0	2 h	No
3	1:8	4 h	5	5 min	No
4	1:8	8 h	5	2 h	Yes

The adsorption and desorption isotherms of the sol-gel hydrolyzed for 8 h are typical of mesoporous materials (Figure 53.A).³⁰³ The distribution of the pore sizes is bimodal as the sol-gel hydrolyzed for 4 h but pore sizes distribution of the sol-gel hydrolyzed for 8 h is shifted to higher values (from 25 to 60 Å), *i.e.* larger pore size (Figures 52 and 53). These results show that the pore sizes of this sol-gel can be controlled with the stirring time of the sol solution. The increase in the sol solution stirring time could provoke the formation of more Si-O-Si bonds³⁰⁵ during the condensation reaction that could permit to have longer and/or more reactive chain monomers ($[(OR)_3Si-O-Si(OR)_3]$) resulting in the formation of larger pores during the gelation.

The sol-gel was then characterized in microchannels. 2 h after the hydrodynamic injection of the sol solution in the microchannel, the sol-gel was washed with sodium phosphate buffer (pH 8, IS=300 mM) + 5 mM MgCl₂ with a volume representing 10 times the total volume of the microchannel by depression. This action was repeated 3 times. Optical microscopy characterizations were also performed before and after washing to verify the presence or absence of a macroscopic structural modification of the sol-gel. The appearance of cracks in the sol-gel hydrolyzed for 8 h and polymerized in the APAP + APPECVD treated COC microchannel was visualized by optical microscopy (Figure 54).

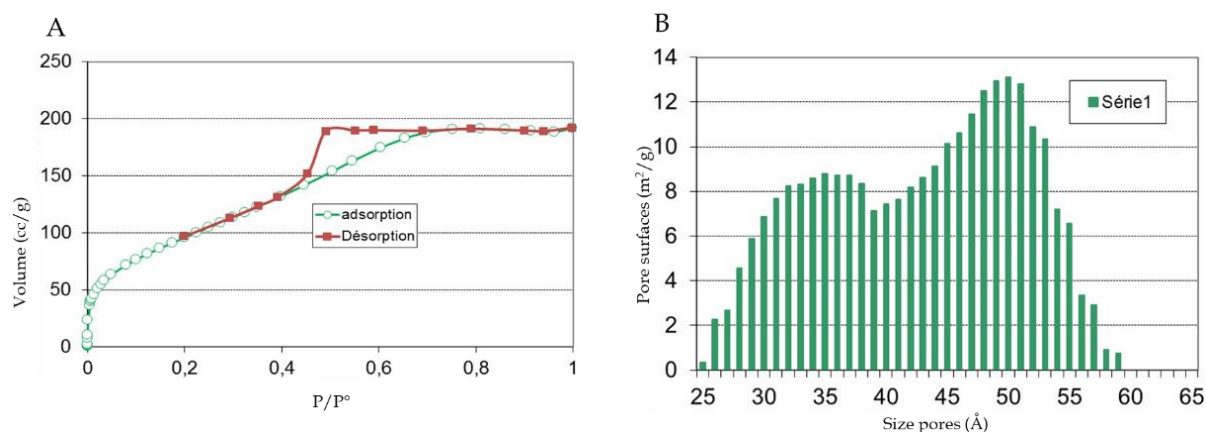


Figure 53: (A) adsorption (green) and desorption (red) isotherms and (B) pore sizes distribution of sol-gel hydrolyzed for 8 h, mixed with sodium phosphate buffer (pH 8, IS= 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (1v:1v), dried for 2 h at room temperature and in air and stored at 4°C in humid conditions before characterizations.

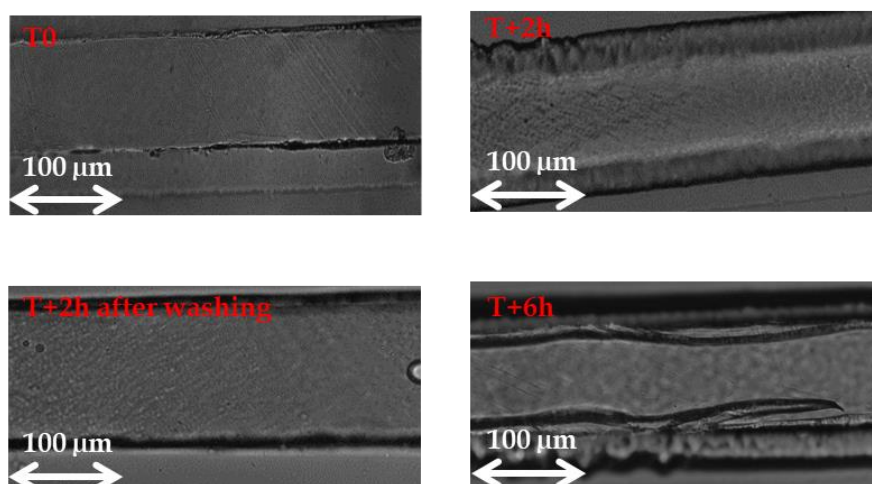


Figure 54: Characterization by optical microscopy of an area of a single silica-coated COC microchannel (100 μm width, 30 μm high and 6 cm length) in COC treated by APAP+APPECVD and functionalized with a sol-gel hydrolyzed for 8 h. T0 is the moment just after the hydrodynamic injection of the sol solution into the microchannel by depression. T= i h is the drying time of the sol-gel at room temperature after injection of the sol solution at T0.

The magnetic stirring of the sol solution has no influence on the transparency of the sol-gel (Figures 51 and 54). In addition, there is no macroscopic change in the sol-gel even after washing and until 2 h of its drying (Figure 54). At T+6h after hydrodynamic injection of sol solution, cracks appear on the edges of the microchannel (Figure 54). So, the increase in the

stirring time of the sol solution permits to slow down the appearance of cracks. In accordance with the scientific literature³⁰⁶, latter appearance of cracks can be explained by: i) the decrease of the capillary pressure exerted by pore fluid and/or ii) the increase in elasticity of the sol-gel. The appearance of cracks on the edges of the microchannel could be explained by the diminution of hydroxy groups³⁰⁵ with the increasing of the stirring time of the sol solution resulting to less reactive anchor group (SiOH) of the sol-gel on microchannels walls.

Stability of the sol-gel

In the previous section, it was shown that under atmospheric conditions, the sol-gel hydrolyzed for 8 h and polymerized in a silica-coated COC microchannel can be stored for a maximum of 6 h at room temperature and in air. To slow the appearance of cracks, the sol-gel can be stored in a place where the temperature is low and the humidity percentage is high.²⁵³

To improve the stability of the sol-gel over time, the monolith was prepared and stored with the following experimental conditions. A sol-gel hydrolyzed for 8 h was polymerized in a silica-coated COC simple microchannel. After 2 h of drying at room temperature and in air, the sol-gel was rinsed with sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ with an equivalent volume 10 times the total volume of one microchannel. This action was repeated 3 times. Microchannels and reservoirs were then refilled with buffer and the chip was placed in a hermetic sealed box containing wet paper. This hermetic sealed box was placed at 4°C for twenty days. Every day, the wet paper was replaced, and the reservoirs were refilled with fresh BGE. Figure 55 shows an example of classical microscopic optical images of the microchannel totally functionalized by a sol-gel at T0 and after 20 days of storage.

The storage of the sol-gel at low temperature and humid conditions permits to store for 20 days the sol-gel without macroscopic structure modification (Figure 55).

IV.5. Encapsulation of aptamer in sol-gel

In the previous part, we have optimized the synthesis of the sol-gel that allows for fluid flow on the microchannel and we have determined the conditions to store microchannels. We then evaluated the entrapment of aptamers in this polymerized monolith in microchannels.

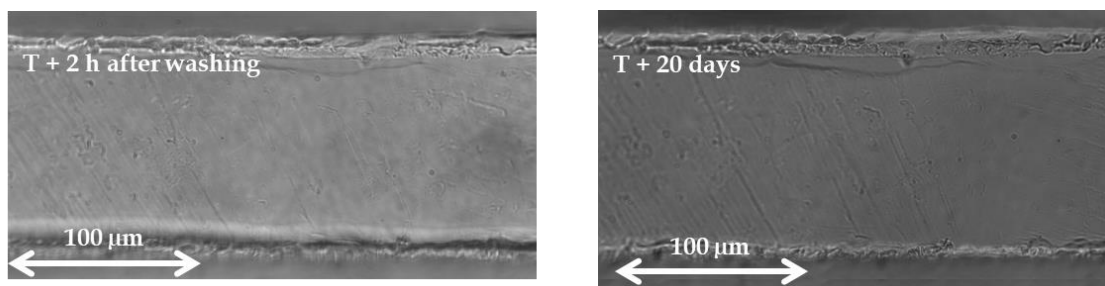


Figure 55: Characterization by optical microscopy of an area of a single microchannel (100 μm width, 30 μm height and 6 cm length) in COC treated with APAP+APPECVD and functionalized with a sol-gel hydrolyzed for 8 h. T + 2 h after washing corresponds to the sol-gel polymerized and washed with the sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl_2 . T+ 20 days represents the sol-gel stored at 4°C in humid conditions for 20 days.

IV.5.1. Experimental procedure

Sol-gel was synthesized under the optimized experimental conditions. Briefly, TEOS (1.55 mL) was hydrolyzed in 2.5 mM of hydrochloric acid (1 mL) prepared in ultra-pure water (18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ resistivity, Purelab Flex system, Elga Veolia, France) (molar ratio 1 : 8, TEOS : water) under magnetic agitation for 8 h. 5% (wt) of PEG 400 was mixed with the sol solution under magnetic agitation. The sol solution was then stored overnight at 4°C before use. 100 μM of aptamers prepared in sodium phosphate BGE (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM of MgCl_2 was activated at 70°C for 10 min and mixed with the sol solution (volume ratio 1v/1v) to obtain a final concentration of aptamer equal to 50 μM . This mixture was hydrodynamically injected by depression (using a pump) in a coated-silica COC microchannel treated by APAP + APPECVD with the optimized conditions determined in Article 4. The sol solution was dried at room temperature for 2 h in the dark before characterizations by fluorescence microscopy.

To study the encapsulation of aptamers in sol-gel, fluorescence microscopy characterizations were performed. For this purpose, the anti-sulforhodamine B aptamer was modified in 5' by a fluorophore: AlexaFluor® 532 (Chapter II). Encapsulation of the fluorescent aptamer in the monolithic structure (experiment named *sol-gel + fluorescent aptamer*) was tested by washing 3 times the microchannels (100 μm * 30 μm * 6 cm) with the buffer solution (sodium phosphate buffer (pH 8, IS= 300 mM) + 5 mM of MgCl_2). The volume of one wash corresponds to a volume equivalent to 10 times the total volume of the microchannel. To characterize the leaching of fluorescent aptamer, between each washing fluorescence microscopy characterizations were carried on. Six measures of fluorescence intensity were recorded in one microchannel at 1 cm of interval (n=6). To test the reproducibility between batches of

microchannel, the experiments were carried out in three different microchips. The same experiment was performed under the same experimental conditions with the non-fluorescent aptamer (named *sol-gel + non-fluorescent aptamer*). The experiment without the presence of aptamers under the same experimental conditions as above was performed as a control experiment (named *sol-gel*). The stability of microsystems was tested for 7 days by fluorescence microscopy. For that the microchannels and reservoirs were filled with buffer and stored at 4°C in a hermetic box containing wet paper. Each days the reservoirs were refilled with fresh BGE and the wet paper was changed.

The experimental set-up and the camera acquisition parameter are those described in Chapter II.

The sol-gel prepared with 100 µM aptamer in sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂, were characterized in terms of porosity by adsorption and desorption isotherms in the same experimental conditions described previously (IV.4.1).

IV.5.2. Results and discussions

Figure 56 presents the characterizations of functionalized silica-coated COC microchannels by aptamers encapsulated in sol-gel hydrolyzed for 8 h after the washing of COC microchannel.

The fluorescence gain for microchannels functionalized by fluorescent aptamers encapsulated in sol-gel is 76% compared to microchannels functionalized with non-fluorescent aptamers (Figure 56). In addition, the fluorescence gains of microchannels functionalized with fluorescent aptamers are equal to 88% compared to the control experiment (*sol-gel*) (Figure 56). These results permit to confirm that the aptamers are immobilized in the microchannel. These results are similar to those obtained by Perréard et al.^{131,132} The fluorescence intensity is however not similar between microchannel batches which indicates that the density of aptamers encapsulated is not reproducible. In addition, for the same microchannel, the standard deviations of fluorescence intensity measurements indicate that the distribution of aptamers in a microchannel is not homogeneous after washing. Since the experiments are conducted under conditions where temperature and humidity are not controlled, the monolithic structure may vary from batch to batch and inside one microchannel.²⁴² To obtain homogeneous batches and density distributions of aptamer encapsulated in a sol-gel, it is necessary to work under controlled conditions in terms of temperature and humidity.

It has been shown that the pore diameters of the sol-gel (25 to 60 Å, Figure 53) are smaller than the hydrodynamic diameter of aptamer (~87 Å, Chapter II, Table 10). Therefore, it is likely that sol-gel is built around the aptamer, thus allowing its encapsulation.²⁵²

To check this hypothesis the distribution of the pore sizes with a sol-gel prepared in the presence of aptamers was characterized by adsorption and desorption isotherms. The result is presented in Figure 57.

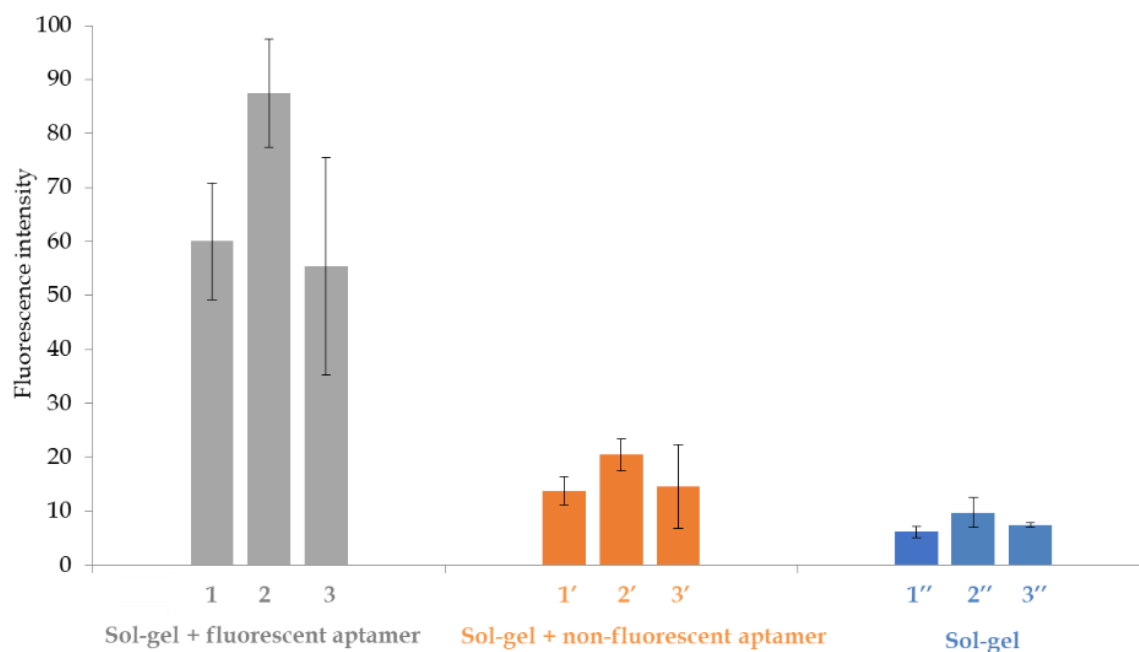


Figure 56: Fluorescence microscopy characterizations of COC microchannel functionalized with fluorescent aptamer encapsulated in sol-gel (1, 2 and 3) ; functionalized with non-fluorescent aptamer encapsulated in sol-gel (1', 2' and 3') and functionalized with sol-gel without aptamer (1'', 2'' and 3''). The results are presented after rinsing with sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (see Chapter II for more details for fluorescence measurement parameters and IV.5.1. for more details on the experimental conditions). The error bars represent standard deviations for 6 repetitions.

The pore sizes distribution of sol-gel prepared with aptamer is situated between 21 to 116 Å, with the maximum of pore sizes being at around 36 Å (Figure 57) which corresponds to the maxima of pore size (30-40 Å, Figure 53) of the sol-gel hydrolyzed for 8 h prepared without aptamer. Compared to the pore sizes distribution of the sol-gel hydrolyzed for 8 h (Figure 53) prepared without aptamer, there are a few pores (80-116 Å) adapted for the aptamer encapsulation. This second population of pores is probably the one that allows

aptamers encapsulation, the sol-gel being potentially constructed around the aptamer during the sol-gel process.

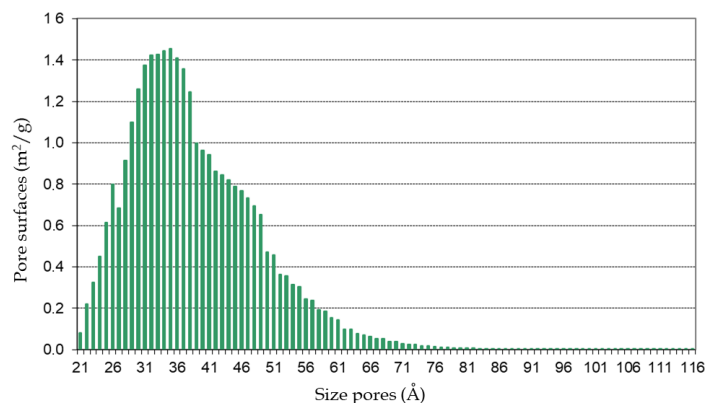


Figure 57: Pore size characterizations of sol-gel prepared with a final aptamer concentration of 50 μM without any modification of its sequence (see Part IV.4.1. for more details on experimental conditions).

Between each washing of microchannels 1, 2, 3, 1'', 2'' and 3'', fluorescence intensity measurements were recorded with the same experimental set-up and camera acquisition parameters (Chapter 2) for Figure 56, to evaluate the retention of aptamers in sol-gel structure. The results are presented in Figure 58.

For chips 1, 2 and 3, more of 76% of aptamers are removed (Figure 58.A). Leaching of aptamer is not reproducible between batches. This may be attributed to the fact that the sol-gel process was made in an environment where the temperature and the humidity were not controlled.²⁴² The leaching of aptamers from the sol-gel can be attributed to the removal of only physisorbed aptamers on gel.^{131,132} It is noted that there is no difference fluorescence intensity of the sol-gel prepared without aptamer before and after washing (Figure 58.B).

To work in a controlled environment Dr. Tran-Thi (Research Director CNRS, NIMBE, UMR, CEA-CNRS 3685) has developed an experimental glass set-up.³⁰⁷ This is a custom-made desiccator with an inlet and outlet for gas. For this system, a gas flow controller (FlowBus, Brönkhort, France) and a bubbler (Techlab, France) have been added. Due to time constraints, this system could not be tested with our microchips.

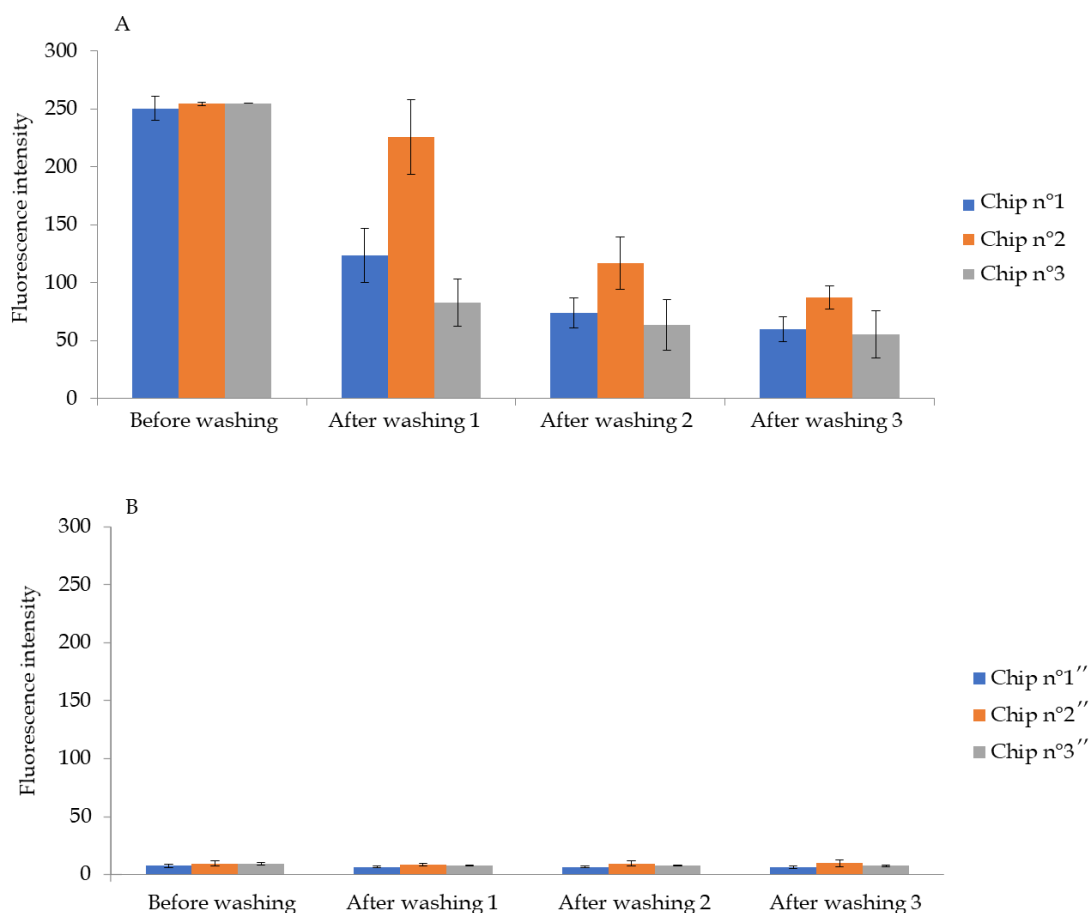


Figure 58: Fluorescence intensities of COC microchannel functionalized with (A) fluorescent aptamer encapsulated in sol-gel (1, 2 and 3) and functionalized with (B) sol-gel without aptamer (1'', 2'' and 3'') before and after several washing with phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (see the Chapter II for more details for fluorescence measurement parameters and IV.5.1. for more details on the experimental conditions). The error bars represent standard deviation for 6 repetitions.

The stability of microchannel functionalized by aptamer encapsulated in sol-gel was tested. The system was stored at 4°C in humid condition for 7 days. Fluorescent intensities of microchannels functionalized with fluorescent aptamers and without aptamer are presented in Figure 59.

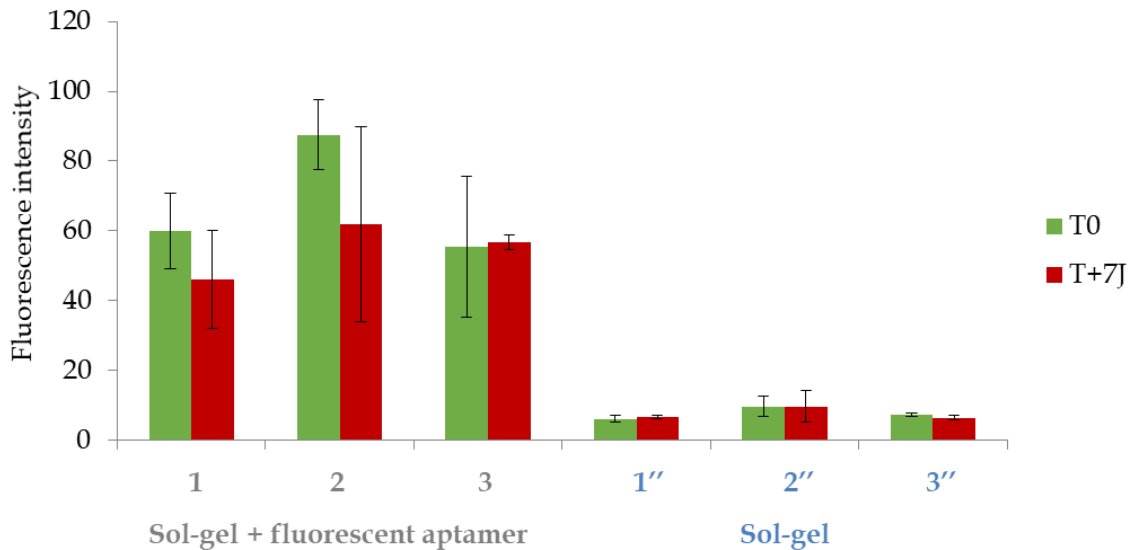


Figure 59: Fluorescence microscopy characterizations of COC microchannels functionalized with fluorescent aptamer encapsulated in sol-gel (1, 2 and 3) and functionalized with sol-gel without aptamer (1'', 2'' and 3''). The results are presented after rinsing with sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ (see Chapter II for more details for fluorescence measurement parameters and IV.5.1. for more details on the experimental conditions). The error bars represent standard deviation for 6 repetitions.

The fluorescence intensity of control chips 1'', 2'' and 3'' is similar just after functionalization and 7 days after functionalization. So, there is no evolution of the sol-gel autofluorescence over time. The fluorescence intensities of microchannels 1, 2 and 3 are not significantly different after functionalization and after 7 days after functionalization. The microchips stored at humid condition and at 4°C are thus stable for 1 week.

IV.6. Localized functionalization

The functionalization of a microchannel with sol-gel in a localized area is challenging. Park et al.³⁰⁸ showed the possibility to polymerize a sol-gel in a PDMS microchannel in a localized way, between two platinum electrodes. The electrodes were inserted into a microchannel, then a corona discharge was performed, generating hydroxy groups on the surface of the PDMS walls. These groups then reacted with the sol solution forming -Si-O-Si- bonds between the hydroxylated walls of the microchannel and the sol-gel. The system is presented in Figure 60.

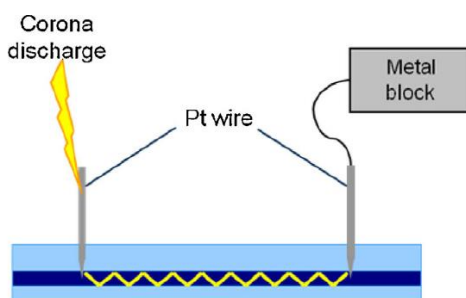


Figure 60: Corona discharge in PDMS microchannel to graft sol-gel in oxidized PDMS microchannel between two platinum electrodes. Adapted from ³⁰⁸.

To avoid the use of a high voltage and an electrode system integrated in the microchannel, a new simple and cheap strategy of localized functionalization of microchannel by the sol-gel process was developed based on the injection and fluid flow hydrodynamic control into the microchannel. The steps for the localized functionalization of a cross-shaped silica-coated COC microchannel are presented in Figure 61. First, reservoirs 2, 3 and 4 were filled with sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ and then, the buffer was sucked up with a pump *via* reservoir 1, with the aim to fill all the microchannel. Then, the sol solution hydrolyzed for 8 h was mixed with the sodium phosphate buffer (pH 8, IS = 300 mM) + 5 mM MgCl₂ and was hydrodynamically injected from the reservoir 3. As BGE solution moves faster than the sol solution, only the part between reservoir 3 and the center of the cross was filled with the sol solution. Thus, the sol-gel is polymerized only in this part that constitutes the extraction/concentration zone, where the target should be extracted due to the presence of aptamer in the sol-gel and should be then released for electrokinetic separation in the channel situated between the cross and reservoir 4. An optical microscopy characterization of the functionalized cross is presented in Figure 61.

IV.7. Conclusions and perspectives

The purpose of this study was to produce a μ SPE zone based on aptamers encapsulated in a sol-gel polymerized in a silica-coated COC microchannel.

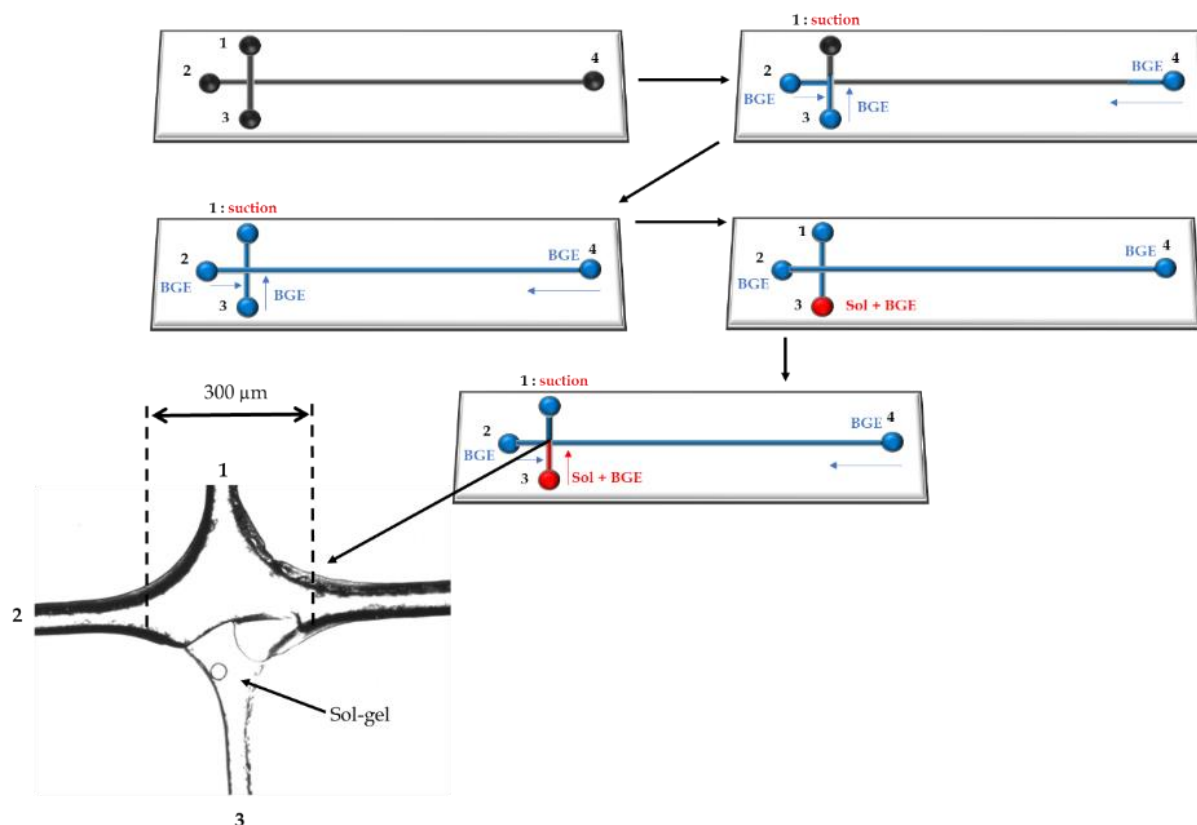


Figure 61: Localized functionalization steps of a silica-coated COC microchannel and optical microscopy characterization of the cross functionalized with the sol-gel. The blue color represents the BGE and the red color is for the sol solution.

To graft the sol-gel on the chemical inert COC walls, a plasma treatment at atmospheric pressure named APAP + APPECVD was developed. This treatment deposits silica thin film in few seconds and permits to have silanol groups (anchoring chemical function to graft the sol-gel on walls surfaces by formation of Si-O-Si bonds) and confers hydrophilic properties of the hydrophobic thermoplastic. The experimental conditions were optimized to have a homogeneous thin film with a high density of silanol groups. We have measured the electroosmotic flow (phosphate buffer, pH 8, $\Delta IS=2$ mM) inside silica-coated microchannel: $28.3 \pm 1.9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. The study of electroosmotic flow over time shows that the chips can be stored one week in air. The microsystem developed seems to be adapted for analysis of compounds by electrokinetic separations. We demonstrated the *in-situ* encapsulation of aptamers in sol-gel polymerized with silica-coated microchannel. Moreover, due to a hydrodynamic control flow, we have functionalized a specific zone of a silica-coated cross-shaped microchannel with the sol-gel. This system could be used to preconcentrate several targets with the microextraction area. The pre-concentrated targets will then be separated in the silica-coated separation channel by electrokinetic separations. This study should be further

continued to optimize the encapsulation of aptamer in sol-gel. Indeed, this step is not reproducible in the current conditions. This should be resolved by a control on temperature and humidity during the sol-gel process, to verify the reproducibility from one batch to another.

General Conclusion

This work is one of the first development in the design of a Lab-on-a-Chip (LOAC) based on aptamers for the detection of a set of biomarkers. With such analytical systems, analysis time could be reduced as well as the risk of contaminations compared to the conventional analytical chain. In addition, LOAC consume a few microliters of solvents and samples and are portable to patient's bedside.

The main goal of this PhD work was to develop innovative strategies for immobilizing aptamer in one or several localized areas in a microchannel with innovative materials for extraction and preconcentration of targets, such as biomarkers, that would then allow for their electrokinetic separation and detections within these systems.

The first strategy, named *2D strategy*, consists in immobilizing thiolated aptamers on gold-coated OSTE microchannels. Localized functionalization was achieved by simply depositing droplets of the solutions of gold nanoparticles and then aptamers in single open OSTE-microchannels. It has been shown that the gold layer avoids non-covalent interactions between the aptamer and the polymer surface. With this system, 9 ± 1 picomol/mm² of aptamers can be immobilized in only 30 min. This functionalization strategy is reproducible. In addition, it has also been shown for the first time that electrokinetic separations can be performed in photopolymerized OSTE microchannels (using a photoinitiator) with a controlled electroosmotic flow in aqueous media with pH ranging from 3 to 12.

The second strategy, named *3D strategy*, has used the sol-gel process to encapsulate aptamers in its structure. The sol-gel was polymerized directly inside the COC microchannels treated by an innovative plasma process called APPECVD (Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition at Atmospheric Pressure). Plasma treatment makes possible the deposition of a silica layer in a few seconds *via* the fragmentation of an alkoxy precursor in an air plasma. This treatment confers hydrophilic properties to the surface of the COC, promoting a high electroosmotic flow required for fast and controlled electrokinetic separations. It also allows the deposition of silanol functions, which are the linking functions of the sol-gel to the walls of the microchannel. It has been shown for the first time that a localized zone of the microchannel can be modified by the sol-gel process thanks to a control of fluids under hydrodynamic flow and the possibility to operate electrokinetic separations in such systems.

The characteristics of the two systems are summarized in Table 17 :

Table 17: Summary of the characteristics of the two developed microsystems. (μeo : electroosmotic mobility, IS: ionic strength)

	OSTE polymer microchannel	COC microchannel
Microfabrication	Soft-lithography <ul style="list-style-type: none"> • 1h30/chip • low cost • sealing by click chemistry reaction • robust 	Hot embossing <ul style="list-style-type: none"> • 1h/chip • very low cost • sealing by tape • very robust
Surface pre-treatment	<ul style="list-style-type: none"> • droplet deposition of gold nanoparticle solution in microchannel (localized) • duration: 15min/chip • low cost • simple process • does not use complex and expensive equipment • treatment stability has not been tested 	<ul style="list-style-type: none"> • thin silica layer deposition with an air plasma jet (not localized) • duration: ~2.4s/chip • fast and cheap plasma process compared to vacuum plasma • but performed with complex and expensive equipments compared to the 2D strategy • stable for 1 week at room temperature and in air
EOF	<ul style="list-style-type: none"> • $\mu\text{eo} = 25.5 \pm 1.6 * 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pH 7, IS = 20 mM) • stable for 2 weeks at room temperature and in air • EOF between chip batches reproducible 	<ul style="list-style-type: none"> • $\mu\text{eo} = 28.3 \pm 1.9 * 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pH 7, IS = 20/18 mM) • stable for 1 week at room temperature and in air • untested EOF reproducibility between chip batches
Localized immobilization of aptamers	<ul style="list-style-type: none"> • droplet deposition of aptamer solution in gold-coated microchannel (localized) • aptamer modified by C3-SH • stable for two weeks at room temperature and in air • duration: 15min/chip • reproducible batches • density of immobilized aptamers: $9 \pm 1 \mu\text{moles}/\text{m}^2$ 	<ul style="list-style-type: none"> • hydrodynamic flow control of sol solution (localized) • no modification of the aptamer sequence • stable for one week at 4°C in humid condition and in air • duration: 8h of hydrolysis and 2h gelation of sol-gel • no reproducible batches • density of immobilized aptamers has not been determined
Affinity	<ul style="list-style-type: none"> • Tested in open-microchannel. Aptamer has an affinity for a BGE with IS_x = 50 mM 	<ul style="list-style-type: none"> • Not tested

Although the microfabrication method of COC microchannels is more robust and cheaper than the microfabrication of OSTE microchannel, the OSTE devices developed here often many advantages:

- the pre-treatment of the OSTE polymer by gold nanoparticle under UV-irradiation does not use complex and expensive equipment compared to the air plasma jet used to treat COC microchannels
- the charge density is stable over a longer period for OSTE microchannels than the silica-coated COC microchannels
- the localized functionalization by aptamers of the OSTE polymer microchannels is fast (30 min) and very simple (drop deposition) while the functionalization of the COC microchannels is longer (8 h+2 h) and more complicated because it requires the control of fluids under hydrodynamic flow
- the functionalization of OSTE substrate is stable longer (14 days) than COC microchannel (7 days) and is reproducible between chip batches

So as to complete the comparison between the two systems in terms of efficiency and robustness, it will be important to evaluate the affinity of the aptamer towards its target (in our study: sulforhodamine B) in both configurations.

The short-term perspectives of this work are to evaluate the extraction and preconcentration efficiencies with the 2D and 3D strategies and to prove the concept of the separation of different biomarkers to identify the best strategy for a cancer early diagnosis application, first on model molecules and finally on real samples.

This work was carried out with a model aptamer, which makes these strategies of aptamer-based extraction and preconcentration for efficient separation and quantitation of several targets applicable to other fields of application than early diagnosis of cancers.

Annex: anti-sulforhodamine B aptamer: Taylor Dispersion Analysis

The Taylorgrams obtained for aptamer anti-sulforhodamine B prepared in different BGE are presented in Figure AI-1.

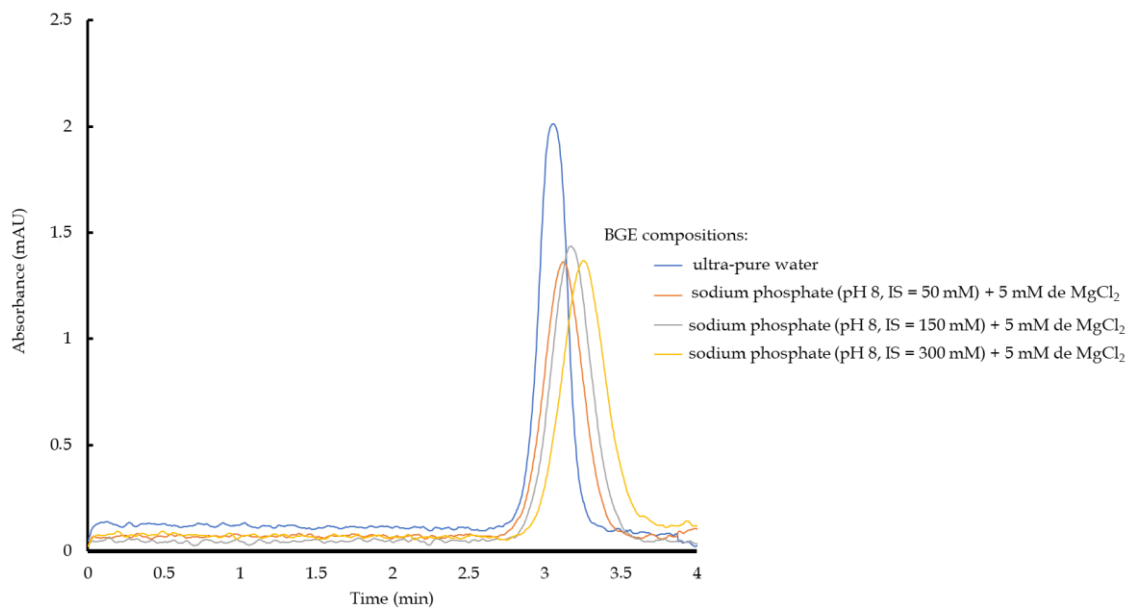


Figure AI-1: Taylorgrams of the anti-sulforhodamine B aptamer prepared in different BGE compositions. 10 μ M of activated aptamer is hydrodynamically injected (20 mbar, 6s). The aptamer is detected with a diode-array system at 260 nm coupled to a capillary electrophoresis equipment (Refer to Chapter II for more details on the experimental conditions).

Bibliographical references

1. OMS | Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>.
2. About the SEER Program. *SEER* <https://seer.cancer.gov/about/>.
3. Tothill, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 55 (2009).
4. Füzéry, A. K., Levin, J., Chan, M. M. & Chan, D. W. Translation of proteomic biomarkers into FDA approved cancer diagnostics: issues and challenges. *Clin. Proteomics* **10**, 13 (2013).
5. Mordente, A., Meucci, E., Martorana, G. E. & Silvestrini, A. Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives. in *Advances in Cancer Biomarkers* (ed. Scatena, R.) vol. 867 9–26 (Springer Netherlands, 2015).
6. Das, P., Sedighi, A. & Krull, U. J. Cancer biomarker determination by resonance energy transfer using functional fluorescent nanoprobe. *Anal. Chim. Acta* (2018) doi:10.1016/j.aca.2018.07.060.
7. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab. Chip* **17**, 3558–3577 (2017).
8. Mairal, T. *et al.* Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 989 (2008).
9. Tombelli, S., Minunni, M. & Mascini, M. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2424 (2005).
10. Crivianu-Gaita, V. & Thompson, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosens. Bioelectron.* **85**, 32 (2016).
11. O'Sullivan, C. K. Aptasensors – the future of biosensing? *Anal. Bioanal. Chem.* **372**, 44 (2002).
12. Action des substances chimiques sur les organes: la cancérogénèse. <http://www.techniques-ingenieur.fr/fiche-pratique/environnement-securite-th5/maitriser-le-risque-chimique-management-sante-et-securite-dans-l-entreprise-dt118/action-des-substances-chimiques-sur-les-organes-la-cancerogenese-1179/>.
13. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646 (2011).
14. *Dernières données mondiales sur le cancer : le fardeau du cancer atteint 18,1 millions de nouveaux cas et 9,6 millions de décès par cancer en 2018*. Press released n°263. Centre international de Recherche sur le Cancer (2018).
15. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2963 (2015).
16. Mahato, K., Kumar, A., Maurya, P. K. & Chandra, P. Shifting paradigm of cancer diagnoses in clinically relevant samples based on miniaturized electrochemical nanobiosensors and microfluidic devices. *Biosens. Bioelectron.* **100**, 411 (2018).
17. Biopsie - Diagnostic | Institut National Du Cancer. <http://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Diagnostic/Biopsie>.
18. Good, D. M. *et al.* Body Fluid Proteomics for Biomarker Discovery: Lessons from the Past Hold the Key to Success in the Future. *J. Proteome Res.* **6**, 4549 (2007).
19. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89 (2001).
20. Oldenhuis, C. N. A. M., Oosting, S. F., Gietema, J. A. & de Vries, E. G. E. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur. J. Cancer* **44**, 946 (2008).
21. Mehta, S. *et al.* Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2**, 125 (2010).

22. Mittal, S., Kaur, H., Gautam, N. & Mantha, A. K. Biosensors for breast cancer diagnosis: A review of bioreceptors, biotransducers and signal amplification strategies. *Biosens. Bioelectron.* **88**, 217 (2017).
23. Falco, M. *et al.* Tumour biomarkers: homeostasis as a novel prognostic indicator. *Open Biol.* **6**, 160254 (2016).
24. Didar, T. F. & Tabrizian, M. Adhesion based detection, sorting and enrichment of cells in microfluidic Lab-on-Chip devices. *Lab. Chip* **10**, 3043 (2010).
25. Chen, J., Li, J. & Sun, Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab. Chip* **12**, 1753 (2012).
26. Pappas, D. Microfluidics and cancer analysis: cell separation, cell/tissue culture, cell mechanics, and integrated analysis systems. *The Analyst* **141**, 525 (2016).
27. Mark, D., Haeberle, S., Roth, G., von Stetten, F. & Zengerle, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1153 (2010).
28. Liu, Y. *et al.* Microchip-based ELISA strategy for the detection of low-level disease biomarker in serum. *Anal. Chim. Acta* **650**, 77 (2009).
29. Zhang, H., Liu, L., Fu, X. & Zhu, Z. Microfluidic beads-based immunosensor for sensitive detection of cancer biomarker proteins using multienzyme-nanoparticle amplification and quantum dot labels. *Biosens. Bioelectron.* **42**, 23 (2013).
30. Lin, Y.-H., Wang, C.-C. & Lei, K. F. Bubble-driven mixer integrated with a microfluidic bead-based ELISA for rapid bladder cancer biomarker detection. *Biomed. Microdevices* **16**, 199 (2014).
31. Yu, X. *et al.* On-chip dual detection of cancer biomarkers directly in serum based on self-assembled magnetic bead patterns and quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* **41**, 129 (2013).
32. Hu, M. *et al.* Ultrasensitive, Multiplexed Detection of Cancer Biomarkers Directly in Serum by Using a Quantum Dot-Based Microfluidic Protein Chip. *ACS Nano* **4**, 488 (2010).
33. Liu, W., Wei, H., Lin, Z., Mao, S. & Lin, J.-M. Rare cell chemiluminescence detection based on aptamer-specific capture in microfluidic channels. *Biosens. Bioelectron.* **28**, 438 (2011).
34. Liang, L. *et al.* Microchips for detection of exfoliated tumor cells in urine for identification of bladder cancer. *Anal. Chim. Acta* (2018) doi:10.1016/j.aca.2018.07.044.
35. Xu, Y. *et al.* Aptamer-Based Microfluidic Device for Enrichment, Sorting, and Detection of Multiple Cancer Cells. *Anal. Chem.* **81**, 7436 (2009).
36. Phillips, J. A., Xu, Y., Xia, Z., Fan, Z. H. & Tan, W. Enrichment of Cancer Cells Using Aptamers Immobilized on a Microfluidic Channel. *Anal. Chem.* **81**, 1033 (2009).
37. Sheng, W. *et al.* Aptamer-Enabled Efficient Isolation of Cancer Cells from Whole Blood Using a Microfluidic Device. *Anal. Chem.* **84**, 4199 (2012).
38. Shen, Q. *et al.* Specific Capture and Release of Circulating Tumor Cells Using Aptamer-Modified Nanosubstrates. *Adv. Mater.* **25**, 2368 (2013).
39. Arya, S. K. *et al.* Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum. *Biosens. Bioelectron.* **102**, 106 (2018).
40. Amouzadeh Tabrizi, M., Shamsipur, M., Saber, R. & Sarkar, S. Isolation of HL-60 cancer cells from the human serum sample using MnO₂-PEI/Ni/Au/aptamer as a novel nanomotor and electrochemical determination of thereof by aptamer/gold nanoparticles-poly(3,4-ethylene dioxythiophene) modified GC electrode. *Biosens. Bioelectron.* **110**, 141 (2018).
41. Wei, K. *et al.* A novel multiplex signal amplification strategy based on microchip electrophoresis platform for the improved separation and detection of microRNAs. *Talanta* **189**, 437 (2018).
42. Potrich, C. *et al.* Simple PDMS microdevice for biomedical applications. *Talanta* **193**, 44 (2019).
43. Adel Ahmed, H. & Azzazy, H. M. E. Power-free chip enzyme immunoassay for detection of prostate specific antigen (PSA) in serum. *Biosens. Bioelectron.* **49**, 478 (2013).

44. Hoffman, J. M., Stayton, P. S., Hoffman, A. S. & Lai, J. J. Stimuli-Responsive Reagent System for Enabling Microfluidic Immunoassays with Biomarker Purification and Enrichment. *Bioconjug. Chem.* **26**, 29 (2015).
45. Chikkaveeraiah, B. V., Mani, V., Patel, V., Gutkind, J. S. & Rusling, J. F. Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4477 (2011).
46. Tetala, K. K. R. & Vijayalakshmi, M. A. A review on recent developments for biomolecule separation at analytical scale using microfluidic devices. *Anal. Chim. Acta* **906**, 7 (2016).
47. Kim, D. & Herr, A. E. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics* **7**, 041501 (2013).
48. Terry, S. C., Jerman, J. H. & Angell, J. B. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Trans. Electron Devices* **26**, 1880 (1979).
49. Waldbaur, A., Rapp, H., Länge, K. & Rapp, B. E. Let there be chip – towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Anal. Methods* **3**, 2681 (2011).
50. Manz, A. *et al.* Micromachining of monocrystalline silicon and glass for chemical analysis systems A look into next century's technology or just a fashionable craze? *TrAC Trends Anal. Chem.* **10**, 144 (1991).
51. Nge, P. N., Rogers, C. I. & Woolley, A. T. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chem. Rev.* **113**, 2550 (2013).
52. Ren, K., Zhou, J. & Wu, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Acc. Chem. Res.* **46**, 2396 (2013).
53. Palchesko, R. N., Zhang, L., Sun, Y. & Feinberg, A. W. Development of Polydimethylsiloxane Substrates with Tunable Elastic Modulus to Study Cell Mechanobiology in Muscle and Nerve. *PLoS ONE* **7**, e51499 (2012).
54. McDonald, J. C. & Whitesides, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices. *Acc. Chem. Res.* **35**, 491 (2002).
55. de Campos, R. P. S., Campos, C. D. M., Almeida, G. B. & da Silva, J. A. F. Characterization of Off-Stoichiometry Microfluidic Devices for Bioanalytical Applications. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* doi:10.1109/TBCAS.2017.2759510.
56. Carlborg, C. F., Haraldsson, T., Öberg, K., Malkoch, M. & van der Wijngaart, W. Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab. Chip* **11**, 3136 (2011).
57. Bartolo, D., Degré, G., Nghe, P. & Studer, V. Microfluidic stickers. *Lab. Chip* **8**, 274 (2008).
58. Cramer, N. B., Reddy, S. K., Cole, M., Hoyle, C. & Bowman, C. N. Initiation and kinetics of thiol-ene photopolymerizations without photoinitiators. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **42**, 5817 (2004).
59. Cramer, N. B., Scott, J. P. & Bowman, C. N. Photopolymerizations of Thiol-Ene Polymers without Photoinitiators. *Macromolecules* **35**, 5361 (2002).
60. Lafleur, J. P. *et al.* Rapid and simple preparation of thiol-ene emulsion-templated monoliths and their application as enzymatic microreactors. *Lab. Chip* **15**, 2162 (2015).
61. Çakmakçi, E., Yuce-Dursun, B. & Demir, S. Maleic anhydride functionalization of OSTE based coatings via thiol-ene "Click" reaction for the covalent immobilization of xylanase. *React. Funct. Polym.* **111**, 38 (2017).
62. Tähkä, S. M. *et al.* Thiol-ene microfluidic devices for microchip electrophoresis: Effects of curing conditions and monomer composition on surface properties. *J. Chromatogr. A* **1426**, 233 (2015).
63. Bou, S. J. M. C. & Ellis, A. V. Microfluidic devices using thiol-ene polymers. in (eds. Friend, J. & Tan, H. H.) 89232B (2013). doi:10.1117/12.2032608.

64. Kharasch, M. S., May, E. M. & Mayo, F. R. The peroxide effect in the addition of reagents to unsaturated compounds. Xviii. The addition and substitution of bisulfite. *J. Org. Chem.* **03**, 175 (1938).
65. *Radiation curing in polymer science and technology. Vol. 4: Practical aspects and applications.* (Elsevier Applied Science, 1993).
66. Cramer, N. B. & Bowman, C. N. Kinetics of thiol-ene and thiol-acrylate photopolymerizations with real-time fourier transform infrared. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **39**, 3311 (2001).
67. Wägli, Ph., Homsy, A. & de Rooij, N. F. Norland optical adhesive (NOA81) microchannels with adjustable wetting behavior and high chemical resistance against a range of mid-infrared-transparent organic solvents. *Sens. Actuators B Chem.* **156**, 994 (2011).
68. Tsao, C.-W. & DeVoe, D. L. Bonding of thermoplastic polymer microfluidics. *Microfluid. Nanofluidics* **6**, 1 (2009).
69. Nunes, P. S., Ohlsson, P. D., Ordeig, O. & Kutter, J. P. Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications. *Microfluid. Nanofluidics* **9**, 145 (2010).
70. Begolo, S., Colas, G., Viovy, J.-L. & Malaquin, L. New family of fluorinated polymer chips for droplet and organic solvent microfluidics. *Lab. Chip* **11**, 508 (2011).
71. Rötting, O., Röpke, W., Becker, H. & Gärtner, C. Polymer microfabrication technologies. *Microsyst. Technol.* **8**, 32 (2002).
72. Giboz, J., Copponnex, T. & Mélé, P. Microinjection molding of thermoplastic polymers: a review. *J. Micromechanics Microengineering* **17**, R96 (2007).
73. Russek, U. A. *et al.* Laser beam welding of thermoplastics. in (eds. Pique, A. *et al.*) 458 (2003). doi:10.1117/12.478606.
74. Becker, H. & Gärtner, C. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* **21**, 12 (2000).
75. Serra, M. *et al.* A simple and low-cost chip bonding solution for high pressure, high temperature and biological applications. *Lab. Chip* **17**, 629 (2017).
76. ThermalSeal®, ThermalSeal Ministrips™, and ThermalSeal RT™ Sealing Films for PCR. http://www.excelscientific.com/thermalseal_content.html.
77. Fluigent's broad range of solutions for use in microfluidic applications. *Fluigent* <https://www.fluigent.com/product/microfluidic-components/>.
78. Ross, D., Johnson, T. J. & Locascio, L. E. Imaging of Electroosmotic Flow in Plastic Microchannels. *Anal. Chem.* **73**, 2509 (2001).
79. Blas, M., Delaunay, N. & Rocca, J.-L. Electrokinetic-based injection modes for separative microsystems. *Electrophoresis* **29**, 20 (2008).
80. Karlinsey, J. M. Sample introduction techniques for microchip electrophoresis: A review. *Anal. Chim. Acta* **725**, 1 (2012).
81. Wan Ibrahim, W. A., Abd Ali, L. I., Sulaiman, A., Sanagi, Mohd. M. & Aboul-Enein, H. Y. Application of Solid-Phase Extraction for Trace Elements in Environmental and Biological Samples: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **44**, 233 (2014).
82. Buszewski, B. & Szultka, M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **42**, 198 (2012).
83. Sonker, M., Sahore, V. & Woolley, A. T. Recent advances in microfluidic sample preparation and separation techniques for molecular biomarker analysis: A critical review. *Anal. Chim. Acta* **986**, 1 (2017).
84. Reyes-Garcés, N. *et al.* Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. *Anal. Chem.* **90**, 302 (2018).
85. Choix d'une méthode de séparation. *Techniques de l'Ingénieur* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/chromatographie-en-phase-liquide-p1455/choix-d-une-methode-de-separation-p1455niv10007.html>.

86. Kutter, J. P., Jacobson, S. C. & Ramsey, J. M. Solid phase extraction on microfluidic devices. *J. Microcolumn Sep.* **12**, 93 (2000).
87. Principe général et grandeurs fondamentales. *Techniques de l'Ingénieur* <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/analyse-des-macromolecules-biologiques-42380210/electrophorese-capillaire-p3365/principe-general-et-grandeurs-fondamentales-p3365niv10001.html>.
88. Wuethrich, A. & Quirino, J. P. A decade of microchip electrophoresis for clinical diagnostics – A review of 2008–2017. *Anal. Chim. Acta* **1045**, 42 (2019).
89. Kecskemeti, A. & Gaspar, A. Particle-based liquid chromatographic separations in microfluidic devices - A review. *Anal. Chim. Acta* **1021**, 1 (2018).
90. Sanjay, S. T. *et al.* Biomarker detection for disease diagnosis using cost-effective microfluidic platforms. *The Analyst* **140**, 7062 (2015).
91. Vilknær, T., Janásek, D. & Manz, A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Anal. Chem.* **76**, 3373 (2004).
92. Munge, B. S., Stracensky, T., Gamez, K., DiBiase, D. & Rusling, J. F. Multiplex Immunosensor Arrays for Electrochemical Detection of Cancer Biomarker Proteins. *Electroanalysis* **28**, 2644 (2016).
93. Wang, X. *et al.* Microfluidics-to-mass spectrometry: A review of coupling methods and applications. *J. Chromatogr. A* **1382**, 98 (2015).
94. Pohl, H. A. *Dielectrophoresis: the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields.* (Cambridge University Press, 1978).
95. Derouard, J. Manipulation sans contact. (Université de Grenoble I, 2009).
96. Almeida, G. B., Poppi, R. J. & da Silva, J. A. F. Trapping of Au nanoparticles in a microfluidic device using dielectrophoresis for surface enhanced Raman spectroscopy. *The Analyst* **142**, 375 (2017).
97. Srivastava, S. K., Gencoglu, A. & Minerick, A. R. DC insulator dielectrophoretic applications in microdevice technology: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 301 (2011).
98. Perez-Gonzalez, V. H., Gallo-Villanueva, R. C., Cardenas-Benitez, B., Martinez-Chapa, S. O. & Lapizco-Encinas, B. H. Simple Approach to Reducing Particle Trapping Voltage in Insulator-Based Dielectrophoretic Systems. *Anal. Chem.* **90**, 4310 (2018).
99. Chou, C.-F. *et al.* Electrodeless dielectrophoresis of single-and double-stranded DNA. *Biophys. J.* **83**, 2170 (2002).
100. Anrès, P. Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces. (Université Pierre et Marie Curie, 2012).
101. Song, S. & Singh, A. K. On-chip sample preconcentration for integrated microfluidic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**, 41 (2006).
102. Huhn, C. & Pyell, U. Diffusion as major source of band broadening in field-amplified sample stacking under negligible electroosmotic flow velocity conditions. *J. Chromatogr. A* **1217**, 4476 (2010).
103. Jung, B., Bharadwaj, R. & Santiago, J. G. Thousandfold signal increase using field-amplified sample stacking for on-chip electrophoresis. *Electrophoresis* **24**, 3476 (2003).
104. Lichtenberg, J., Verpoorte, E. & de Rooij, N. F. Sample preconcentration by field amplification stacking for microchip-based capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **22**, 258 (2001).
105. Giri, B. & Dutta, D. Improvement in the sensitivity of microfluidic ELISA through field amplified stacking of the enzyme reaction product. *Anal. Chim. Acta* **810**, 32 (2014).
106. Giordano, B. C., Burgi, D. S., Hart, S. J. & Terray, A. On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review. *Anal. Chim. Acta* **718**, 11 (2012).

107. Chandra, P., Zaidi, S. A., Noh, H.-B. & Shim, Y.-B. Separation and simultaneous detection of anticancer drugs in a microfluidic device with an amperometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **28**, 326 (2011).
108. Kitagawa, F. & Otsuka, K. Sample Preconcentration Protocols in Microfluidic Electrophoresis. in *Microfluidic Electrophoresis* (ed. Dutta, D.) vol. 1906 65–78 (Springer New York, 2019).
109. Chien, R. Ling. & Burgi, D. S. Sample stacking of an extremely large injection volume in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **64**, 1046 (1992).
110. Tang, S., Zhang, H. & Lee, H. K. Advances in Sample Extraction. *Anal. Chem.* **88**, 228 (2016).
111. Biparva, P. & Abbas, A. Microextraction Techniques as a Sample Preparation Step for Metal Analysis. in *Atomic Absorption Spectroscopy* (ed. Akhyar Farrukh, M.) (InTech, 2012). doi:10.5772/30501.
112. Yamini, Y., Rezazadeh, M. & Seidi, S. Liquid-phase microextraction - The different principles and configurations. *TrAC Trends Anal. Chem.* **112**, 264 (2019).
113. Miyaguchi, H. *et al.* Microchip-based liquid/liquid extraction for gas-chromatography analysis of amphetamine-type stimulants in urine. *J. Chromatogr. A* **1129**, 105 (2006).
114. PICHON, V. Extraction sur phase solide pour l'analyse de composés organiques. Ref: TIP630WEB - 'Techniques d'analyse' <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/extraction-sur-phase-solide-pour-l-analyse-de-composes-organiques-p1420/> (2006).
115. He, B. & Regnier, F. Microfabricated liquid chromatography columns based on collocated monolith support structures. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 925 (1998).
116. Dziomba, S. *et al.* Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review. *Anal. Chim. Acta* **955**, 1 (2017).
117. Peterson, D. S. Solid supports for micro analytical systems. *Lab. Chip* **5**, 132 (2005).
118. Thurmann, S., Mauritz, L., Heck, C. & Belder, D. High-performance liquid chromatography on glass chips using precisely defined porous polymer monoliths as particle retaining elements. *J. Chromatogr. A* **1370**, 33 (2014).
119. Nguyen, T., Pei, R., Landry, D. W., Stojanovic, M. N. & Lin, Q. Microfluidic aptameric affinity sensing of vasopressin for clinical diagnostic and therapeutic applications. *Sens. Actuators B Chem.* **154**, 59 (2011).
120. Pamme, N. Magnetism and microfluidics. *Lab. Chip* **6**, 24 (2006).
121. Gijs, M. A. M. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluid. Nanofluidics* (2004) doi:10.1007/s10404-004-0010-y.
122. de Jong, J., Lammertink, R. G. H. & Wessling, M. Membranes and microfluidics: a review. *Lab. Chip* **6**, 1125 (2006).
123. Gao, J., Xu, J., Locascio, L. E. & Lee, C. S. Integrated Microfluidic System Enabling Protein Digestion, Peptide Separation, and Protein Identification. *Anal. Chem.* **73**, 2648 (2001).
124. Hisamoto, H. *et al.* Chemicofunctional Membrane for Integrated Chemical Processes on a Microchip. *Anal. Chem.* 350 (2003).
125. Liu, Y., Zhang, X., Xia, Y. & Yang, H. Magnetic-Field-Assisted Electrospinning of Aligned Straight and Wavy Polymeric Nanofibers. *Adv. Mater.* **22**, 2454 (2010).
126. Liu, Y., Yang, D., Yu, T. & Jiang, X. Incorporation of electrospun nanofibrous PVDF membranes into a microfluidic chip assembled by PDMS and scotch tape for immunoassays. *Electrophoresis* **30**, 3269 (2009).
127. Venzac, B. Development of an integrated, portable DNA amplification and detection system based on electrohydrodynamic aggregation. (Université Pierre et Marie Curie, 2016).

128. Yu, C., Davey, M. H., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device. *Anal. Chem.* **73**, 5088 (2001).
129. Lee, A. G., Beebe, D. J. & Palecek, S. P. Quantification of kinase activity in cell lysates via photopatterned macroporous poly(ethylene glycol) hydrogel arrays in microfluidic channels. *Biomed. Microdevices* **14**, 247 (2012).
130. Bhattacharyya, A. & Klapperich, C. M. Differential gene expression using mRNA isolated on plastic microfluidic chips. in *2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* 1067–1070 (IEEE, 2009). doi:10.1109/IEMBS.2009.5335124.
131. Perreard, C. 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. (Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2015).
132. Perréard, C. *et al.* Aptamer entrapment in microfluidic channel using one-step sol-gel process, in view of the integration of a new selective extraction phase for lab-on-a-chip: CE and CEC. *Electrophoresis* (2017) doi:10.1002/elps.201600575.
133. Sharma, T. K., Bruno, J. G. & Dhiman, A. ABCs of DNA aptamer and related assay development. *Biotechnol. Adv.* **35**, 275 (2017).
134. Wolfe, K. A. *et al.* Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids. *Electrophoresis* **23**, 727 (2002).
135. Du, F. *et al.* Recent advances in aptamer-functionalized materials in sample preparation. *TrAC Trends Anal. Chem.* **67**, 134 (2015).
136. Lordel, S. Synthèse et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de résidus d'explosifs pour le développement de dispositifs de terrain. (Université Pierre et Marie Curie, 2011).
137. Li, Z., Yu, Y., Li, Z. & Wu, T. A review of biosensing techniques for detection of trace carcinogen contamination in food products. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 2711 (2015).
138. Uzun, L. & Turner, A. P. F. Molecularly-imprinted polymer sensors: realising their potential. *Biosens. Bioelectron.* **76**, 131 (2016).
139. Haupt, K. Although MIPs are stable, easy to prepare, and inexpensive, there are still challenges to overcome in their fabrication and use. *Chemical Reviews* **7**, 2495 (2000).
140. Goding, J. W. *Monoclonal antibodies: Principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology.* (Academic Press, 1996).
141. Costantini, F. *et al.* Aptamer-based sandwich assay for on chip detection of Ochratoxin A by an array of amorphous silicon photosensors. *Sens. Actuators B Chem.* **230**, 31 (2016).
142. Hu, Z. *et al.* Aptamer Combined with Fluorescent Silica Nanoparticles for Detection of Hepatoma Cells. *Nanoscale Res. Lett.* **12**, (2017).
143. de Sousa Lacerda, C. M. *et al.* (1→3)- β -D-glucan aptamers labeled with technetium-99m: Biodistribution and imaging in experimental models of bacterial and fungal infection. *Nucl. Med. Biol.* **46**, 19 (2017).
144. Gao, S. *et al.* Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer interferometry biosensor for palytoxin. *Biosens. Bioelectron.* **89**, 952 (2017).
145. Wang, L. *et al.* QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*. *Food Chem.* **221**, 776 (2017).
146. Perret, G. & Boschetti, E. Aptamer affinity ligands in protein chromatography. *Biochimie* **145**, 98 (2018).
147. Hughes, A. J., Lin, R. K. C., Peehl, D. M. & Herr, A. E. Microfluidic integration for automated targeted proteomic assays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5972 (2012).
148. Bayer, E. A. & Wilchek, M. Application of avidin – biotin technology to affinity-based separations. *J. Chromatogr. A* **510**, 3 (1990).

149. Brut, M. *et al.* Bringing aptamers into technologies: Impact of spacer terminations. *Appl. Phys. Lett.* **100**, 163702 (2012).
150. Lao, Y.-H., Peck, K. & Chen, L.-C. Enhancement of Aptamer Microarray Sensitivity through Spacer Optimization and Avidity Effect. *Anal. Chem.* **81**, 1747 (2009).
151. Stein, C. A. & Castanotto, D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther.* **25**, 1069 (2017).
152. New Monoclonal Antibody Drug Approvals Hit Record Levels in 2017 – Creative Biolabs Blog. <https://www.creative-biolabs.com/blog/index.php/new-monoclonal-antibody-drug-approvals-in-2017/>.
153. Toulmé, J.-J. *et al.* Les aptamères: Du concept à l’outil. *Médecine Nucl.* **31**, 478 (2007).
154. Girardot, M. Aptamères et électrophorèse capillaire : caractérisation physico-chimique d’aptamères libres en solution ou greffés sur des nanoparticules, et étude de leur affinité avec une cible protéique en vue de leur emploi pour des méthodes sensibles de diagnostic. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010).
155. Sun, H. & Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* **20**, 11959 (2015).
156. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467 (1990).
157. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* **355**, 850 (1992).
158. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505 (1990).
159. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. SELEX – A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **24**, 381 (2007).
160. Kang, K.-N. & Lee, Y.-S. RNA Aptamers: A Review of Recent Trends and Applications. in *Future Trends in Biotechnology* (ed. Zhong, J.-J.) vol. 131 153–169 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
161. Koh, Y. *et al.* Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **404**, 2267 (2012).
162. Ruiz Ciancio, D. *et al.* Aptamers as Diagnostic Tools in Cancer. *Pharm. Basel Switz.* **11**, (2018).
163. Zhang, P. *et al.* Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells. *Lab. Invest.* **89**, 1423 (2009).
164. Douglas, S. M., Bachelet, I. & Church, G. M. A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads. *Science* **335**, 831 (2012).
165. Tang, J. *et al.* Aptamer-conjugated PEGylated quantum dots targeting epidermal growth factor receptor variant III for fluorescence imaging of glioma. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 12**, 3899 (2017).
166. Kang, W. J., Chae, J. R., Cho, Y. L., Lee, J. D. & Kim, S. Multiplex Imaging of Single Tumor Cells Using Quantum-Dot-Conjugated Aptamers. *Small* **5**, 2519 (2009).
167. Lian, S. *et al.* A Universal Quantum Dots-Aptamer Probe for Efficient Cancer Detection and Targeted Imaging. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **12**, 7703 (2012).
168. Kim, J. K., Choi, K.-J., Lee, M., Jo, M. & Kim, S. Molecular imaging of a cancer-targeting theragnostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle. *Biomaterials* **33**, 207 (2012).
169. Qiu, L. *et al.* A Targeted, Self-Delivered, and Photocontrolled Molecular Beacon for mRNA Detection in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12952 (2013).
170. Li, J. *et al.* Gadolinium Oxide Nanoparticles and Aptamer-Functionalized Silver Nanoclusters-Based Multimodal Molecular Imaging Nanoprobe for Optical/Magnetic Resonance Cancer Cell Imaging. *Anal. Chem.* **86**, 11306 (2014).

171. Lee, J. *et al.* Simultaneous Imaging of Two Different Cancer Biomarkers Using Aptamer-Conjugated Quantum Dots. *Sensors* **15**, 8595 (2015).
172. Li, H. *et al.* Synthesis of fluorescent dye-doped silica nanoparticles for target-cell-specific delivery and intracellular MicroRNA imaging. *The Analyst* **140**, 567 (2015).
173. Borghei, Y.-S. *et al.* Visual detection of cancer cells by colorimetric aptasensor based on aggregation of gold nanoparticles induced by DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta* **904**, 92 (2016).
174. Keshtkar, M., Shahbazi-Gahrouei, D., Khoshfetrat, S. M., Mehrgardi, M. A. & Aghaei, M. Aptamer-conjugated Magnetic Nanoparticles as Targeted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Breast Cancer. *J. Med. Signals Sens.* **6**, 243 (2016).
175. Bamrungsap, S. *et al.* Pattern Recognition of Cancer Cells Using Aptamer-Conjugated Magnetic Nanoparticles. *ACS Nano* **6**, 3974 (2012).
176. Wu, C. *et al.* A recognition-before-labeling strategy for sensitive detection of lung cancer cells with a quantum dot-aptamer complex. *The Analyst* **140**, 6100 (2015).
177. Shi, H. *et al.* Whole Cell-SELEX Aptamers for Highly Specific Fluorescence Molecular Imaging of Carcinomas In Vivo. *PLoS ONE* **8**, e70476 (2013).
178. Shi, H. *et al.* Activatable aptamer probe for contrast-enhanced in vivo cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 3900 (2011).
179. Zhao, W. *et al.* Bioinspired multivalent DNA network for capture and release of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 19626 (2012).
180. Tan, J. *et al.* Aptamer-Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells. *Nanoscale Res. Lett.* **11**, 298 (2016).
181. Khoshfetrat, S. M. & Mehrgardi, M. A. Amplified detection of leukemia cancer cells using an aptamer-conjugated gold-coated magnetic nanoparticles on a nitrogen-doped graphene modified electrode. *Bioelectrochemistry* **114**, 24 (2017).
182. Chen, K. *et al.* Tumor cell capture patterns around aptamer-immobilized microposts in microfluidic devices. *Biomicrofluidics* **11**, 054110 (2017).
183. Tang, Z. *et al.* Selection of Aptamers for Molecular Recognition and Characterization of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **79**, 4900 (2007).
184. Liu, G. *et al.* Aptamer-Nanoparticle Strip Biosensor for Sensitive Detection of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **81**, 10013 (2009).
185. Shi, H. *et al.* In vivo Fluorescence Imaging of Tumors using Molecular Aptamers Generated by Cell-SELEX. *Chem. - Asian J.* **5**, 2209 (2010).
186. Lai, Z. *et al.* An 'activatable' aptamer-based fluorescence probe for the detection of HepG2 cells. *Oncol. Rep.* **37**, 2688 (2017).
187. Wei, Z. *et al.* Multifunctional nanoprobe for cancer cell targeting and simultaneous fluorescence/magnetic resonance imaging. *Anal. Chim. Acta* **938**, 156 (2016).
188. Gopinath, S. C. B. Methods developed for SELEX. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 171 (2006).
189. Nguyen, T., Pei, R., Stojanovic, M. & Lin, Q. An aptamer-based microfluidic device for thermally controlled affinity extraction. *Microfluid. Nanofluidics* **6**, 479 (2009).
190. Wilson, C. & Szostak, J. W. Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. *Chem. Biol.* **5**, 609 (1998).
191. Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **219**, 186 (1953).
192. On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci.* **235**, 67 (1956).
193. Chamieh, J. *et al.* Limits in Size of Taylor Dispersion Analysis: Representation of the Different Hydrodynamic Regimes and Application to the Size-Characterization of Cubosomes. *Anal. Chem.* **89**, 13487 (2017).

194. D'Orlyé, F. Caractérisation physicochimique par électrophorèse capillaire de nanoparticules magnétiques, anioniques et cationiques : distribution de taille, densité de charge et coefficient de diffusion collectif. (L'Université Pierre et Marie Curie, 2008).
195. Glasel, J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* **18**, 62 (1995).
196. Huang, C.-C., Cao, Z., Chang, H.-T. & Tan, W. Protein-Protein Interaction Studies Based on Molecular Aptamers by Affinity Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 6973 (2004).
197. Girardot, M., Gareil, P. & Varenne, A. Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE. *Electrophoresis* **31**, 546 (2010).
198. Hianik, T., Ostatná, V., Sonlajtnerova, M. & Grman, I. Influence of ionic strength, pH and aptamer configuration for binding affinity to thrombin. *Bioelectrochemistry* **70**, 127 (2007).
199. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55 (1951).
200. Liu, X., Atwater, M., Wang, J. & Huo, Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **58**, 3 (2007).
201. Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7238 (2006).
202. Mesbah, K. *et al.* A neutral polyacrylate copolymer coating for surface modification of thiol-ene microchannels for improved performance of protein separation by microchip electrophoresis. *Microchim. Acta* **183**, 2111 (2016).
203. Wang, W., Zhou, F., Zhao, L., Zhang, J.-R. & Zhu, J.-J. Measurement of electroosmotic flow in capillary and microchip electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1170**, 1 (2007).
204. Gilman, S. D. & Chapman, P. J. Measuring Electroosmotic Flow in Microchips and Capillaries. in *Microchip Capillary Electrophoresis* vol. 339 187 (Humana Press, 2006).
205. Soper, S. A. *et al.* Peer Reviewed: Polymeric Microelectromechanical Systems. *Anal. Chem.* **72**, 642 A A (2000).
206. Rodriguez, I., Spicar-Mihalic, P., Kuyper, C. L., Fiorini, G. S. & Chiu, D. T. Rapid prototyping of glass microchannels. *Anal. Chim. Acta* **496**, 205 (2003).
207. Chen, Y. & Pépin, A. Nanofabrication: Conventional and nonconventional methods. *Electrophoresis* **22**, 187 (2001).
208. Xia Y and Whitesides GM (1998) Soft Lithography. Annual Review of Materials Sciences 28:153. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.28.1.153>.
209. Zhou, J., Ellis, A. V. & Voelcker, N. H. Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices. *Electrophoresis* **31**, 2 (2010).
210. Wong, I. & Ho, C.-M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **7**, (2009).
211. Goreshnik, E. A., Mazej, Z. & Mys'kiv, M. G. Synthesis, crystal structure and Raman spectra of $\text{AgBF}_4 \cdot \text{C}_3\text{O}_3(\text{NC}_3\text{H}_5)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a silver(I) π -complex with 1,3,5-triallyl-1,3,5-triazine-2,4,6-trione. *J. Organomet. Chem.* **695**, 2201 (2010).
212. Lin-Vien, D., Colthup, N. B., Fateley, W. G. & Grasselli, J. G. Compounds Containing the Carbonyl Group. in *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules* 117 (Elsevier, 1991). doi:10.1016/B978-0-08-057116-4.50015-8.
213. Belder, D. & Ludwig, M. Surface modification in microchip electrophoresis. *Electrophoresis* **24**, 3595 (2003).
214. Saharil, F., Carlborg, C. F., Haraldsson, T. & van der Wijngaart, W. Biocompatible "click" wafer bonding for microfluidic devices. *Lab. Chip* **12**, 3032 (2012).

215. Lim, C. Y., Lim, A. E. & Lam, Y. C. Ionic Origin of Electro-osmotic Flow Hysteresis. *Sci. Rep.* **6**, 22329 (2016).
216. Lopez Arbeloa, F., Lopez Arbeloa, T., Tapia Estevez, M. J. & Lopez Arbeloa, I. Photophysics of rhodamines: molecular structure and solvent effects. *J. Phys. Chem.* **95**, 2203 (1991).
217. Lambert, W. J. & Middleton, D. L. pH hysteresis effect with silica capillaries in capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* **62**, 1585 (1990).
218. Kenndler, E. & Maier, N. M. Capillary Electrophoresis in Organic Solvents. in *Capillary Electromigration Separation Methods* 69 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809375-7.00004-6.
219. Dickens, J. E., Gorse, J., Everhart, J. A. & Ryan, M. Dependence of electroosmotic flow in capillary electrophoresis on Group I and II metal ions. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **657**, 401 (1994).
220. Kharasch MS, May EM, Mayo FR (1938) The peroxide effect in the addition of reagents to unsaturated compounds. *The Journal of Organic Chemistry* 03:175. <https://doi.org/10.1021/jo01219a010>
221. Xu, Y., Yang, X. & Wang, E. Review: Aptamers in microfluidic chips. *Anal. Chim. Acta* **683**, 12 (2010).
222. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A. & Spivak, D. A. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1009 (2008).
223. Castañeda, M. T., Alegret, S. & Merkoçi, A. Electrochemical Sensing of DNA Using Gold Nanoparticles. *Electroanalysis* **19**, 743 (2007).
224. Girardot, M., d'Orlyé, F., Descroix, S. & Varenne, A. Aptamer-conjugated nanoparticles: Preservation of targeting functionality demonstrated by microchip electrophoresis in frontal mode. *Anal. Biochem.* **435**, 150 (2013).
225. Masini, J. C. & Svec, F. Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. *Anal. Chim. Acta* **964**, 24 (2017).
226. Wang, Z., Zhao, J., Lian, H. & Chen, H. Aptamer-based organic-silica hybrid affinity monolith prepared via "thiol-ene" click reaction for extraction of thrombin. *Talanta* **138**, 52 (2015).
227. Marechal, A., Jarrosson, F., Randon, J., Dugas, V. & Demesmay, C. In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **1406**, 109 (2015).
228. Chen, Y. *et al.* Aptamer functionalized hydrophilic polymer monolith with gold nanoparticles modification for the sensitive detection of human α -thrombin. *Talanta* **154**, 555 (2016).
229. Baldim, V. *et al.* Amperometric Quantification of S-Nitrosoglutathione Using Gold Nanoparticles: A Step toward Determination of S-Nitrosothiols in Plasma. *Anal. Chem.* **88**, 3115-3120 (2016).
230. Tang, L., Wang, Y., Liu, Y. & Li, J. DNA-Directed Self-Assembly of Graphene Oxide with Applications to Ultrasensitive Oligonucleotide Assay. *ACS Nano* **5**, 3817 (2011).
231. Aurox, P.-A., Koc, Y., deMello, A., Manz, A. & Day, P. J. R. Miniaturised nucleic acid analysis. *Lab. Chip* **4**, 534 (2004).
232. Sackmann, E. K., Fulton, A. L. & Beebe, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181 (2014).
233. Tomazelli Coltro, W. K., Cheng, C.-M., Carrilho, E. & de Jesus, D. P. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications: Microfluidics and Miniaturization. *Electrophoresis* **35**, 2309 (2014).
234. Chin, C. D., Linder, V. & Sia, S. K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab. Chip* **12**, 2118 (2012).

235. Herne, T. M. & Tarlov, M. J. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8916 (1997).
236. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A., McCarley, R. L. & Spivak, D. A. Designing Highly Specific Biosensing Surfaces Using Aptamer Monolayers on Gold. *Langmuir* **22**, 6446 (2006).
237. Tello, A., Cao, R., Marchant, M. J. & Gomez, H. Conformational Changes of Enzymes and Aptamers Immobilized on Electrodes. *Bioconjug. Chem.* **27**, 2581 (2016).
238. Rant, U. *et al.* Structural Properties of Oligonucleotide Monolayers on Gold Surfaces Probed by Fluorescence Investigations. *Langmuir* **20**, 10086 (2004).
239. Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V. & Singh, S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials* **1**, 31 (2011).
240. Zhang, J., Loo, R. R. O. & Loo, J. A. Structural Characterization of a Thrombin-Aptamer Complex by High Resolution Native Top-Down Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **28**, 1815 (2017).
241. Xue, C., Xue, Y., Dai, L., Urbas, A. & Li, Q. Size- and Shape-Dependent Fluorescence Quenching of Gold Nanoparticles on Perylene Dye. *Adv. Opt. Mater.* **1**, 581 (2013).
242. Hench, L. L. & West, J. K. The sol-gel process. *Chem. Rev.* **90**, 33 (1990).
243. Zubiolo, C. *et al.* Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2014) doi:10.1007/s00449-014-1151-3.
244. Park, C. B. & Clark, D. S. Sol-gel encapsulated enzyme arrays for high-throughput screening of biocatalytic activity. *Biotechnol. Bioeng.* **78**, 229 (2002).
245. Kim, Y.-D., Park, C. B. & Clark, D. S. Stable sol-gel microstructured and microfluidic networks for protein patterning. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 331 (2001).
246. Rupcich, N., Nutiu, R., Li, Y. & Brennan, J. D. Entrapment of Fluorescent Signaling DNA Aptamers in Sol-Gel-Derived Silica. *Anal. Chem.* **77**, 4300 (2005).
247. Hui, C. Y., Li, Y. & Brennan, J. D. Fluorescence Analysis of the Properties of Structure-Switching DNA Aptamers Entrapped in Sol-Gel-Derived Silica Materials. *Chem. Mater.* **26**, 1896 (2014).
248. Kato, M., Sakai-Kato, K., Matsumoto, N. & Toyo'oka, T. A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. *Anal. Chem.* **74**, 1915 (2002).
249. Shalev, M. & Miriam, A. Sol-Gel Entrapped Levonorgestrel Antibodies: Activity and Structural Changes as a Function of Different Polymer Formats. *Materials* **4**, 469 (2011).
250. Wang, R., Narang, U., Prasad, P. N. & Bright, F. V. Affinity of anti-fluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass. *Anal. Chem.* **65**, 2671 (1993).
251. Bronshtein, A., Aharonson, N., Avnir, D., Turniansky, A. & Altstein, M. Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: Atrazine binding properties. *Chem. Mater.* **9**, 2632 (1997).
252. Dave, B. C., Dunn, B., Valentine, J. S. & Zink, J. I. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.* **66**, 1120A (1994).
253. Jin, W. & Brennan, J. D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta* **461**, 1 (2002).
254. Kim, M. T. Deposition kinetics of silicon dioxide from tetraethylorthosilicate by PECVD. *Thin Solid Films* **360**, 60 (2000).
255. Merche, D., Vandecasteele, N. & Reniers, F. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. *Thin Solid Films* **520**, 4219 (2012).
256. Theelen, M., Habets, D., Staemmler, L., Winands, H. & Bolt, P. Localised plasma deposition of organosilicon layers on polymer substrates. *Surf. Coat. Technol.* **211**, 9 (2012).

257. Da Silva, B. *et al.* Study of the Stability and Hydrophilicity of Plasma-Modified Microfluidic Materials: Study of the Stability and Hydrophilicity of Plasma-Modified.... *Plasma Process. Polym.* **14**, 1600034 (2017).
258. Rånby, B., Yang, W. T. & Tretinnikov, O. Surface photografting of polymer fibers, films and sheets. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* **151**, 301 (1999).
259. Shenton, M. J. & Stevens, G. C. Surface modification of polymer surfaces: atmospheric plasma versus vacuum plasma treatments. *J. Phys. Appl. Phys.* **34**, 2761 (2001).
260. Stachowiak, T. B., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Chip electrochromatography. *J. Chromatogr. A* **1044**, 97 (2004).
261. Faure, K. Liquid chromatography on chip. *Electrophoresis* **31**, 2499 (2010).
262. Pumera, M. Microchip-based electrochromatography: designs and applications. *Talanta* **66**, 1048 (2005).
263. Wu, D., Qin, J. & Lin, B. Electrophoretic separations on microfluidic chips. *J. Chromatogr. A* **1184**, 542 (2008).
264. Ren, K., Zhou, J. & Wu, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Acc. Chem. Res.* **46**, 2396 (2013).
265. Novak, R., Ranu, N. & Mathies, R. A. Rapid fabrication of nickel molds for prototyping embossed plastic microfluidic devices. *Lab. Chip* **13**, 1468 (2013).
266. Attia, U. M., Marson, S. & Alcock, J. R. Micro-injection moulding of polymer microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **7**, 1 (2009).
267. Li, C., Yang, Y., Craighead, H. G. & Lee, K. H. Isoelectric focusing in cyclic olefin copolymer microfluidic channels coated by polyacrylamide using a UV photografting method. *Electrophoresis* **26**, 1800 (2005).
268. Muck, A. & Svatos, A. Chemical modification of polymeric microchip devices☆. *Talanta* (2007) doi:10.1016/j.talanta.2007.09.012.
269. Pu, Q., Oyesanya, O., Thompson, B., Liu, S. & Alvarez, J. C. On-Chip Micropatterning of Plastic (Cyclic Olefin Copolymer, COC) Microfluidic Channels for the Fabrication of Biomolecule Microarrays Using Photografting Methods. *Langmuir* **23**, 1577 (2007).
270. Zhang, J., Das, C. & Fan, Z. H. Dynamic coating for protein separation in cyclic olefin copolymer microfluidic devices. *Microfluid. Nanofluidics* **5**, 327 (2008).
271. Roy, S., Das, T. & Yue, C. Y. High Performance of Cyclic Olefin Copolymer-Based Capillary Electrophoretic Chips. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 5683 (2013).
272. Jönsson, C. *et al.* Silane-dextran chemistry on lateral flow polymer chips for immunoassays. *Lab. Chip* **8**, 1191 (2008).
273. Raj, J. *et al.* Surface immobilisation of antibody on cyclic olefin copolymer for sandwich immunoassay. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2654 (2009).
274. Sung, D., Shin, D. H. & Jon, S. Toward immunoassay chips: Facile immobilization of antibodies on cyclic olefin copolymer substrates through pre-activated polymer adlayers. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 3967 (2011).
275. Ladner, Y. *et al.* Surface Functionalization of COC Microfluidic Materials by Plasma and Click Chemistry Processes: Surface Functionalization of COC Microfluidic Materials. *Plasma Process. Polym.* **10**, 959 (2013).
276. Stachowiak, T. B. *et al.* Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic microdevices. *Electrophoresis* **24**, 3689 (2003).
277. Faure, K. *et al.* Development of an acrylate monolith in a cyclo-olefin copolymer microfluidic device for chip electrochromatography separation. *Electrophoresis* **29**, 4948 (2008).
278. Liu, J. *et al.* Polymer Microchips Integrating Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Polymethacrylate Monoliths. *Anal. Chem.* **81**, 2545 (2009).

279. Stachowiak, T. B. *et al.* Hydrophilic surface modification of cyclic olefin copolymer microfluidic chips using sequential photografting. *J. Sep. Sci.* **30**, 1088 (2007).
280. Tsao, C. W., Hromada, L., Liu, J., Kumar, P. & DeVoe, D. L. Low temperature bonding of PMMA and COC microfluidic substrates using UV/ozone surface treatment. *Lab. Chip* **7**, 499 (2007).
281. Bhattacharyya, A. & Klapperich, C. M. Mechanical and chemical analysis of plasma and ultraviolet-ozone surface treatments for thermal bonding of polymeric microfluidic devices. *Lab. Chip* **7**, 876 (2007).
282. Roy, S., Yue, C. Y., Venkatraman, S. S. & Ma, L. L. Low-temperature (below T_g) thermal bonding of COC microfluidic devices using UV photografted HEMA-modified substrates: high strength, stable hydrophilic, biocompatible surfaces. *J. Mater. Chem.* **21**, 15031 (2011).
283. Jena, R. K., Yue, C. Y. & Anand, L. Improvement of thermal bond strength and surface properties of Cyclic Olefin Copolymer (COC) based microfluidic device using the photografting technique. *Sens. Actuators B Chem.* **157**, 518 (2011).
284. Ladner, Y. *et al.* New “one-step” method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels. *Lab. Chip* **12**, 1680 (2012).
285. Ladner, Y., Crétier, G. & Faure, K. Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip: A cost-effective and easy-to-use technology: Microfluidics and Miniaturization. *Electrophoresis* **33**, 3087 (2012).
286. Hwang, S.-J., Tseng, M.-C., Shu, J.-R. & Her Yu, H. Surface modification of cyclic olefin copolymer substrate by oxygen plasma treatment. *Surf. Coat. Technol.* **202**, 3669 (2008).
287. Roy, S. & Yue, C. Y. Surface Modification of COC Microfluidic Devices: A Comparative Study of Nitrogen Plasma Treatment and its Advantages Over Argon and Oxygen Plasma Treatments. *Plasma Process. Polym.* **8**, 432 (2011).
288. Xu, B.-Y., Yan, X.-N., Xu, J.-J. & Chen, H.-Y. One step high quality poly(dimethylsiloxane)-hydrocarbon plastics bonding. *Biomicrofluidics* **6**, 016507 (2012).
289. Cortese, B., Mowlem, M. C. & Morgan, H. Characterisation of an irreversible bonding process for COC-COC and COC-PDMS-COC sandwich structures and application to microvalves. *Sens. Actuators B Chem.* **160**, 1473 (2011).
290. Nikolova, D., Dayss, E., Leps, G. & Wutzler, A. Surface modification of cycloolefinic copolymers for optimization of the adhesion to metals. *Surf. Interface Anal.* **36**, 689 (2004).
291. Roy, S. & Yue, C. Y. Surface Modification of COC Microfluidic Devices: A Comparative Study of Nitrogen Plasma Treatment and its Advantages Over Argon and Oxygen Plasma Treatments. *Plasma Process. Polym.* **8**, 432 (2011).
292. Roy, S., Yue, C. Y., Lam, Y. C., Wang, Z. Y. & Hu, H. Surface analysis, hydrophilic enhancement, ageing behavior and flow in plasma modified cyclic olefin copolymer (COC)-based microfluidic devices. *Sens. Actuators B Chem.* **150**, 537 (2010).
293. El-Nahhal, I. M. & El-Ashgar, N. M. A review on polysiloxane-immobilized ligand systems: Synthesis, characterization and applications. *J. Organomet. Chem.* **692**, 2861 (2007).
294. J. Křenková and F. Foret. Immobilized microfluidic enzymatic reactors. *Electrophoresis* **25**, 3550 (2004).
295. Passaglia, E., Stromberg, R. R. & Kruger, J. *Ellipsometry in the measurement of surfaces and thin films : symposium proceedings.* (National Bureau of Standards (U.S.)).
296. Lawton, R. A., Price, C. R., Runge, A. F., Doherty, W. J. & Saavedra, S. S. Air plasma treatment of submicron thick PDMS polymer films: effect of oxidation time and storage conditions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **253**, 213 (2005).
297. Ma, K.-S., Reza, F., Saaem, I. & Tian, J. Versatile surface functionalization of cyclic olefin copolymer (COC) with sputtered SiO₂ thin film for potential BioMEMS applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 7914 (2009).

298. Twomey, B., Dowling, D., Byrne, G., O'Neill, L. & O'Hare, L.-A. Properties of Siloxane Coatings Deposited in a Reel-to-Reel Atmospheric Pressure Plasma System. *Plasma Process. Polym.* **4**, S450 (2007).
299. Hussain, F., Birch, D. J. S. & Pickup, J. C. Glucose sensing based on the intrinsic fluorescence of sol-gel immobilized yeast hexokinase. *Anal. Biochem.* **339**, 137 (2005).
300. Keeling-Tucker, T. & Brennan, J. D. Fluorescent Probes as Reporters on the Local Structure and Dynamics in Sol-Gel-Derived Nanocomposite Materials. *Chem. Mater.* **13**, 3331 (2001).
301. Higginbotham, C. P., Browner, R. F., Jenkins, J. D. & Rice, J. K. Dependence of drying technique on surface area and pore size for polyethylene glycol/tetramethoxysilicate hybrid gels. *Mater. Lett.* **57**, 3970 (2003).
302. Schubert, U. & Hüsing, N. *Synthesis of inorganic materials*. (Wiley-VCH, 2012).
303. Tran-Thi, T.-H. Matériaux hybrides nanoporeux pour la détection de polluants de l'air intérieur. *Techniques de l'Ingénieur* (2015).
304. Sun, Y. W., Wang, Y. J., Guo, W., Wang, T. & Luo, G. S. Triblock copolymer and poly(ethylene glycol) as templates for monolithic silica material with bimodal pore structure. *Microporous Mesoporous Mater.* **88**, 31 (2006).
305. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. *Sol-Gel Science: the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. (Elsevier Science, 2014).
306. Smith, D. M., Scherer, G. W. & Anderson, J. M. Shrinkage during drying of silica gel. *J. Non-Cryst. Solids* **188**, 191 (1995).
307. Crunaire, S. *et al.* Discriminating Bacteria with Optical Sensors Based on Functionalized Nanoporous Xerogels. *Chemosensors* **2**, 171 (2014).
308. Park, J., Jo, K. H., Park, H. Y. & Hahn, J. H. Spatially controlled silica coating in poly(dimethylsiloxane) microchannels with the sol-gel process. *Sens. Actuators B Chem.* **232**, 428 (2016).

RÉSUMÉ

Les méthodes habituelles de diagnostic du cancer sont invasives et coûteuses et permettent rarement de dépister la maladie à un stade précoce. L'apparition de biomarqueurs de cancer a été mise en évidence à un stade précoce de la maladie, bien avant le développement des symptômes. Ces marqueurs sont encore peu utilisés, notamment du fait de leur présence en faible quantité chez des individus sains, mais aussi de leur manque de spécificité pris individuellement. Dans ce contexte, le développement de dispositifs permettant la détection simultanée de ces marqueurs dans les fluides biologiques représente un véritable défi. Par ailleurs, la miniaturisation des dispositifs de mesure et leur intégration sur puce ouvrent la voie vers des unités d'analyse automatisables, transportables au chevet du patient et répondant aux besoins des milieux hospitaliers en termes d'analyses rapides, sur de faibles volumes d'échantillons, à bas coût et haut débit, sensibles et spécifiques. L'objectif de cette thèse est de développer des méthodes permettant l'immobilisation localisée de ligands sélectifs basés sur la reconnaissance moléculaire (aptamères) sur différents matériaux de microsystèmes pour la détection simultanée de plusieurs biomarqueurs. Les aptamères sont de nouvelles classes de molécules d'ADN/ARN synthétiques, reconnus pour leur haute affinité et leur excellente spécificité pour une cible sélectionnée. Ils présentent de plus l'intérêt d'être manipulables à température ambiante, et facilement régénérable après dénaturation. Malgré ces avantages, très peu de publications portent sur les technologies à base d'aptamères pour l'extraction sélective et l'analyse de traces de biomarqueurs en dispositif microfluidique. La création de telles zones de confinement permet d'assurer la surconcentration des analytes cibles pour une meilleure performance de la détection.

MOTS CLÉS

Laboratoire sur puce, micro-extraction, aptamère, fonctionnalisation de surface, polymère OSTE, polymère COC

ABSTRACT

Common methods of cancer diagnosis are invasive, expensive and rarely allow early cancer diagnosis. The discovery of cancer biomarkers present in the early stage of the disease, well before the development of symptoms make them interesting candidate for early cancer diagnosis. These markers are still not widely used, particularly because of their low concentration in healthy patient samples, but also because of their lack of specificity taken individually. In this context, the development of devices for the simultaneous detection of these markers in biological fluids is a real challenge. In addition, the miniaturization of measurement devices and their integration on a chip opens the way to automated analysis units that can be transported to the bedside and meet the needs of hospitals for fast, low-volume, low-cost, high throughput, sensitive and specific analyses. The objective of this thesis is to develop methods for the localized immobilization of selective ligands based on molecular recognition (aptamers) on different microsystem materials for the simultaneous detection of several biomarkers. Aptamers are new classes of synthetic DNA/RNA molecules, known for their high affinity and excellent specificity for a selected target or family of targets. They also have the advantage of being easy to handle at room temperature and easily regenerated after denaturation. Despite these advantages, very few publications have been published on aptamer-based technologies for the selective extraction and analysis of biomarker traces in microfluidic devices. The creation of such localized zones ensures the overconcentration of target analytes to improve detection performance.

KEYWORDS

Lab-On-A-Chip, micro extraction, aptamer, surface functionalization, OSTE polymer, COC polymer