

Apport et défi de la microfluidique pour préconcentrer, séparer et détecter les peptides et protéines dans un contexte biomédical

Thanh Duc Mai, Cédric Crosnier de Lassichere, Nguyet Thuy Tran, Claire Smadja et Myriam Taverna

Résumé

La microfluidique est un domaine d'intérêt pour les sciences bioanalytiques qui présente de nombreux avantages, comme une faible consommation de solvants, des débits d'analyse élevés grâce à la possibilité de réaliser les analyses en parallèle ou de manière ultrarapide. Cette méthode permet de plus une intégration de plusieurs processus de la chaîne d'analyse, une réduction du temps d'analyse et de son coût. La microfluidique a pris rapidement une part importante dans l'analyse des protéines et des peptides, qui constituent des biomolécules importantes pour les applications biomédicales. Cependant, en raison de la complexité inhérente aux échantillons biologiques, des petits volumes employés, et les très faibles quantités de protéines et peptides présentes parfois dans ces échantillons, les défis à relever sont nombreux pour concevoir des microsystèmes intégrés incluant des préconcentrations efficaces, des séparations avec un pouvoir de résolution élevé et des modes de détection sensibles. Ceci a conduit les chercheurs du domaine à développer de manière continue des solutions s'appuyant sur la microfluidique permettant de relever chaque défi. Dans ce contexte, cet article présente les apports et défis identifiés à travers certains projets sur la microfluidique pour préconcentrer, séparer et détecter des peptides et des protéines dans des applications biomédicales.

Mots-clés

Microfluidique, préconcentration, séparation, détection, peptides, protéines.

Abstract

Contribution and challenge of microfluidics to pre-concentrate, separate and detect peptides and proteins in a biomedical context

Microfluidics has been a domain of interest in bioanalytical science thanks to its advantageous features, notably low chemical consumption, high throughput achieved by parallelization of multiple processes, short analysis time, better control of mass and heat transfer, better mimicking biological phenomena using microscale physics and chemistry. The downscaling of a bench-top laboratory into a lab-on-a-chip also offers significant reduction of operational cost and instrumental size and weight. Microfluidics quickly found applications in analyses of proteins and peptides, which constitute a major part of bioanalytical science. Due to the inherent complexity of biological matrices, little volumes of biological samples, and tiny amounts of proteins and peptides found sometimes in such samples, challenges in pre-concentration, separation and/or detection of these species using microfluidic devices have frequently been coped with. This therefore leads to the need of continued research and development in microfluidics in order to find solutions for each individual challenge.

Keywords

Microfluidics, pre-concentration, separation, detection, peptides, proteins.

La microfluidique au service de la bioanalyse

Les protéines sont des molécules biologiques qui jouent un rôle clé pour les cellules et les organismes vivants. Leurs fonctions peuvent être très variées : enzymes, facteurs de croissance, facteurs de la coagulation, hormones, anticorps. Que cela soit pour comprendre certains processus physiologiques ou pathologiques chez l'homme, pour rechercher des cibles pour de nouveaux traitements médicamenteux ou à des fins de diagnostic, leur analyse constitue un domaine de recherche majeur et en pleine évolution. La chimie analytique est la science qui permet d'apporter des solutions à la caractérisation, à l'analyse qualitative et au dosage de

composés très divers (ions, petites molécules, macromolécules, espèces solubles ou insolubles...) présents dans des milieux très différents (eaux, boues, air, fluides biologiques, tissus...) et à des concentrations qui peuvent varier de plusieurs échelles. Ces solutions peuvent être apportées par le traitement d'échantillon (extraction, enrichissement, purification et modification des analytes par des réactions chimiques ou biochimiques) comme au niveau de l'analyse elle-même (séparation, tri des molécules) ou encore de la détection.

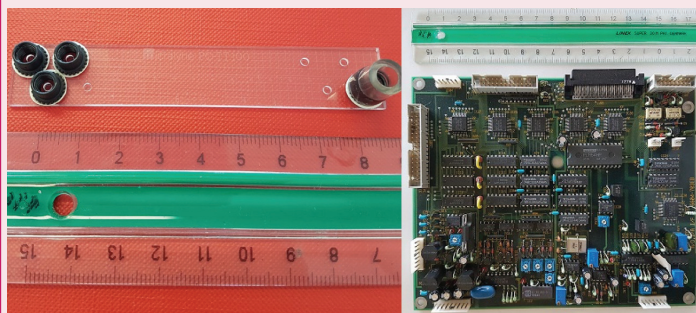
De nombreux programmes de recherche reliant la microfluidique, la bioanalyse et la médecine ont permis de contribuer à des progrès très importants au cours de ces dernières années. C'est dans ce contexte que s'est créé le LabEx Nano-Saclay, regroupant des laboratoires d'excellence du plateau

Encadré 1

La microfluidique en un coup d'œil

La microfluidique peut être considérée à la fois comme une science (étude du comportement des fluides dans les microcanaux) et comme une technologie (fabrication de dispositifs microfluidiques pour des applications telles que les laboratoires sur puce). Pour parler de microfluidique, au moins un canal doit avoir une dimension correspondant à l'échelle micrométrique.

Une puce microfluidique est un ensemble de microcanaux gravés ou moulés dans un matériau (verre, silicium ou polymère). Ce réseau de microcanaux est relié à l'extérieur par des entrées et des sorties percées à travers la puce créant une interface entre les mondes microscopique et macroscopique. Le procédé de fabrication d'une puce microfluidique est basé sur des procédés photolithographiques, dérivés de l'industrie des semi-conducteurs.



La microfluidique inspirée par la microélectronique, avec un réseau de microcanaux gravés dans une puce (gauche), et une carte électronique de microprocesseur (droite).

de Saclay (ou du sud francilien), qui a favorisé une dynamique structurante entre équipes de recherche dont l'équipe « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Analytiques » (PNAS) de l'Institut Galien Paris-Sud (UMR CNRS 8612) [1].

La microfluidique (voir encadré 1), que l'on peut définir comme l'étude et la manipulation de fluides aux petites échelles, se révèle aujourd'hui comme l'un des domaines scientifiques émergents les plus dynamiques en bioanalyse. Cette technologie possède de nombreux avantages pour fournir des outils d'analyse simples, peu coûteux et rapides, permettant de consommer de faibles volumes de réactifs et d'échantillons, tout en ayant une portabilité élevée et surtout un traitement des données intégré. Il est en effet possible de travailler avec de très petits volumes allant du microlitre au picolitre, de raccourcir considérablement les durées d'analyse pour aller jusqu'à des analyses ultrarapides de quelques secondes, d'automatiser les différentes étapes d'une analyse, mais aussi de générer très peu de déchets chimiques. En outre, l'absence ou la minimisation des dilutions facilite la détection des molécules de faible abondance. La possibilité d'intégrer de multiples étapes de la chaîne analytique et préanalytique au sein d'un même microsystème permet l'analyse des fluides biologiques complexes avec parfois des sensibilités élevées sans perte d'échantillon ou dispersion des analytes.

Les propriétés physiques des outils microfluidiques ont conduit à de nouvelles idées et concepts en bioanalyse, notamment à travers le développement de microsystèmes qui peuvent manipuler et mesurer les analytes à une échelle très petite. La microfluidique ouvre aussi de nouvelles fonctionnalités impossibles à mettre en œuvre avec les outils macroscopiques que nous connaissons aujourd'hui. Par exemple, les microsystèmes facilitent le contrôle des réactions et le transport des composés au niveau moléculaire. À ces échelles,

la cinétique des réactions est très augmentée. L'écoulement des fluides dans un dispositif microfluidique est de type laminaire et non turbulent comme dans les systèmes macroscopiques. Ainsi, le mélange dans ces microdispositifs est plus difficile et se limite principalement à la diffusion moléculaire, ce qui permet d'ailleurs d'accéder à de nouvelles fonctions dans ces systèmes, permettant par exemple d'extraire sélectivement par simple diffusion des grosses protéines d'un milieu contenant des petites molécules sur la base de leur différence de coefficient de diffusion. Les microsystèmes analytiques offrent également un contrôle fluidique précis et un transfert rapide de chaleur et de masse grâce à un rapport surface sur volume très élevé.

Les techniques de microfabrication développées initialement pour l'industrie des semi-conducteurs ont inspiré la fabrication des outils micrométriques pour la recherche biologique et chimique. Les avancées des techniques de microfabrication que nous avons connues ces dix dernières années, telles que le moulage ou la gravure par laser [2], ont permis de remplacer les processus de microfabrication longs qui nécessitaient une technicité importante, de gros équipements dédiés à la fabrication ainsi que des salles blanches pour produire les microsystèmes. Ceci a permis de démocratiser la production des dispositifs miniaturisés, notamment en utilisant les matériaux à base de polymères tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS), le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) ou le « cyclic olefin copolymer » (COC), pour une microfabrication plus aisée et rapide qu'en utilisant le verre ou le silicium. Certains microsystèmes commerciaux dédiés à l'analyse de protéines ont vu le jour [3], mais leur nombre et leur champ d'application restent faibles au regard des avancées du domaine académique. L'un des points sensibles en microfluidique, compte tenu des très faibles volumes d'échantillons analysés, est donc la sensibilité de détection. La détection par fluorescence est la méthode de détection la plus utilisée pour l'analyse en puce, due à sa sélectivité et sa sensibilité importante. Elle s'adapte aux dimensions des puces en focalisant facilement le rayon lumineux sur le microcanal en un point bien précis. L'inconvénient principal de cette détection est la dérivation pré- ou post-colonne par un fluorophore qu'il est nécessaire de réaliser en amont pour détecter les protéines. La plupart des sources lumineuses, à part celles développées avec la technologie à base de diodes électroluminescentes (« light-emitting diode », LED), sont peu miniaturisables et non portatives, excluant parfois leur utilisation dans les applications « point of care » (voir encadré 2).

Le coût de l'instrumentation optique classique, le besoin de dérivation des protéines et la portabilité limitée des sources lumineuses ont conduit à la recherche de modes de détection sensibles alternatifs tels que l'électrochimie (EC). Cette technique de détection offre des caractéristiques très intéressantes, une sensibilité remarquable, une portabilité facilitée et une grande compatibilité avec les technologies de microfabrication. Lorsque davantage d'informations sur les analytes d'intérêt sont requises, notamment les structures moléculaires, ou pour confirmer la présence des analytes dans la matrice concernée, la spectrométrie de masse (SM) peut remplacer les techniques de détection citées ci-dessus ou être complémentaire.

Malgré tous les aspects positifs des systèmes microfluidiques, ils ne constituent pas une solution universelle à tous les besoins et problèmes des sciences bioanalytiques. Des défis importants doivent être relevés. Le premier défi est la perte partielle de l'échantillon due à l'adsorption d'analytes

Encadré 2**Les dispositifs de diagnostic « point of care »**

Exemple d'un dispositif de diagnostic de type « point of care », d'une taille équivalente à celle d'une main [4].

Les dispositifs de diagnostic « point-of-care » (POC) sont utilisés soit par le patient lui-même, soit par le personnel de santé proche du patient pour effectuer un diagnostic direct. Il y a plusieurs avantages à réaliser les tests diagnostiques avec ces dispositifs, notamment pour obtenir des résultats rapides permettant de mettre en œuvre suf-

fisamment tôt une thérapie si nécessaire. Ces dispositifs, qui sont utilisés dans les cabinets médicaux, les hôpitaux et les maisons de retraite, permettent une réalisation rapide de différents tests médicaux comme la détermination des taux de glucose et de cholestérol sanguins, les dosages d'électrolytes, les tests enzymatiques, la recherche de drogues illicites dans le sang d'un patient, la détection des infections bactériennes ou virales, ou encore la réalisation de tests de grossesse.

sur les parois des canaux. Cette adsorption, renforcée par le fait que les phénomènes de surface prédominent en microfluidique, conduit aussi à des pertes de performances au niveau de l'analyse. Ainsi, des traitements de surface doivent être envisagés. Le second inconvénient est la difficulté à analyser de grands volumes d'échantillons quand cela est nécessaire. Ils doivent être concentrés en petits volumes pour être introduits dans le microsystème. Cela conduit à un interfaçage difficilement adaptable entre les volumes prélevés et les volumes analysés en microsystèmes. En effet, si les pipettes et les tubulures conventionnelles fournissent des volumes de l'ordre du microlitre, les dispositifs microfluidiques utilisent typiquement des nanolitres non compatibles avec les volumes d'échantillons utilisés actuellement. Pour ces raisons, la majorité de l'échantillon fourni ne sera pas analysé ou manipulé dans un dispositif microfluidique et sera perdue. Par ailleurs, certaines opérations macroscopiques telles que la centrifugation ou le mélange de deux liquides sont plus difficiles à réaliser aux petites échelles. Ainsi, les approches microfluidiques peuvent nécessiter des instruments spécialisés (microscopes, valves miniatures, contrôleurs/générateurs de pression, pompes à seringue, etc.), ainsi qu'une certaine expertise dans leur conception. De nouveaux outils microfluidiques sont donc sans cesse envisagés et imaginés, et d'autant mieux acceptés que les approches macroscopiques ne peuvent donner les informations souhaitées.

La microfluidique peut être divisée en deux catégories selon que l'on opère en flux continu ou discret. Dans le premier cas, le liquide circule en continu dans le microcanal, alors que dans un écoulement discret, des gouttes sont utilisées pour fractionner les milieux et les liquides. Ces deux stratégies en microfluidique sont utilisées pour différents axes de recherche analytiques, notamment le traitement et la préconcentration des échantillons, la séparation électrocinétique, le développement de microréacteurs et la détection des molécules d'intérêt. Le PNAS travaille sur le développement de nouveaux concepts miniaturisés pour préconcentrer, séparer, modifier chimiquement, réaliser des

digestions enzymatiques et détecter des protéines et peptides présents dans les fluides biologiques pour des applications diagnostiques. L'équipe exploite les flux continus ainsi que les flux discrets grâce à une collaboration avec l'équipe de J.-L. Viovy de l'Institut Curie (UMR CNRS 168). Certaines de ces réalisations sont présentées dans la suite de cet article.

Le défi de la microfluidique : les très faibles concentrations

Dans le domaine des sciences bioanalytiques, le défi est fréquemment lié aux teneurs extrêmement faibles des composés recherchés (protéines et peptides dans notre cas) et à la complexité des matrices biologiques qui contiennent bien d'autres ions, molécules de toutes natures, ou cellules parfois en très grandes quantités. Ceci nécessite l'introduction d'étapes de préconcentration, d'enrichissement, de tri, d'extraction et de purification pour traiter ces échantillons en amont des analyses. Plusieurs approches nouvelles ont été proposées par notre équipe pour pallier ces difficultés, notamment pour la préconcentration de phosphopeptides ou des peptides amyloïdes qui sont considérés comme des biomarqueurs de certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (voir encadré 3). Ces approches peuvent être divisées en deux types de stratégies : celles reposant sur des flux continus et celles employant des flux discrets.

Préconcentration des biomarqueurs : des microsystèmes efficaces

Certaines protéines phosphorylées ont déjà été identifiées comme biomarqueurs validés ou potentiels de maladies neurodégénératives. Citons pour exemple la protéine Tau dont la phosphorylation sur certains de ces acides aminés est présente en plus grande quantité chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le dosage de Tau P-181 et Tau-total, fréquemment réalisé avec la méthode immuno-enzymatique ELISA, est utilisé dans l'arsenal des tests de diagnostic de cette maladie [11]. D'autres maladies seraient associées à une phosphorylation anormale de protéines en raison de plusieurs processus cellulaires pathologiques comme certains cancers [12].

Pour développer un diagnostic basé sur l'analyse de ces biomarqueurs phosphorylés souvent présents à faibles concentrations dans les milieux biologiques et pouvant présenter une grande hétérogénéité de phosphorylation, nous avons mis au point une méthode microfluidique innovante. Il s'agit d'un laboratoire sur puce intégrant un module de préconcentration de phosphopeptides reposant sur la chromatographie d'affinité *via* des ions métalliques immobilisés (IMAC) sur un support monolithique. Les monolithes organiques constituent une option intéressante pour l'extraction sur phase solide en microsystèmes. Ils peuvent être synthétisés *in situ* par irradiation UV et leur grande surface spécifique permet de garantir des rendements d'extraction/préconcentration élevés. Pour la conception du module microfluidique de préconcentration de phosphopeptides, des monomères à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et de bisacrylamide (BAA) mélangés à un photo-initiateur de polymérisation ainsi qu'à certains solvants agissant comme des agents porogènes sont introduits dans un microcanal. L'irradiation du canal contenant cette solution initie une polymérisation formant peu à peu un monolithe solide et poreux (figure 1, gauche). Les groupements

phosphate présents en surface du monolithe forment des liaisons de coordination avec des ions métalliques (Zr^{4+} ou Ti^{4+}) ainsi immobilisés sur le support monolithique. Lorsque ce monolithe est percolé par des phosphopeptides fluorescents, ceux-ci se lient également par des liaisons de coordination avec le métal immobilisé grâce à leurs groupements phosphate et sont retenus tandis que tout le reste de l'échantillon est éliminé. Ceci permet de capturer les peptides phosphorylés de manière spécifique et efficace. On visualise ainsi une zone fortement fluorescente dans le canal en verre liée à la préconcentration du phosphopeptide (figure 1, droite). Ce module a par ailleurs été couplé en ligne à la séparation par électrophorèse et la détection par fluorescence des phosphopeptides [13-14]. Des facteurs d'enrichissement de

340 à 910 pour trois phosphopeptides et une très grande sélectivité de la capture ont été atteints. Un autre défi de cette étude a été la synthèse du monolithe poly(EGMP-co-BAA) dans des microcanaux en PDMS plutôt qu'en verre, le PDMS étant un thermoplastique souvent considéré comme incompatible avec la synthèse de monolithe polymère. Cependant, les microsystèmes polymères ont un avantage sur les microsystèmes en verre en termes de microfabrication plus facile et moins coûteuse, ce qui rend la production de masse de microsystèmes jetables plus réalisable. Nous avons mis au point une stratégie permettant, en une seule étape et sans prétraitement préalable des canaux, la polymérisation et l'ancrage du monolithe à base d'EGMP pour la première fois dans des microsystèmes en PDMS natif [12, 15].

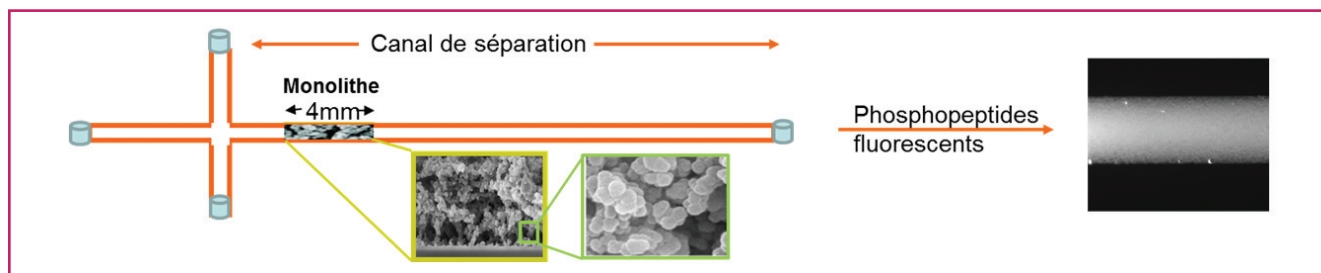
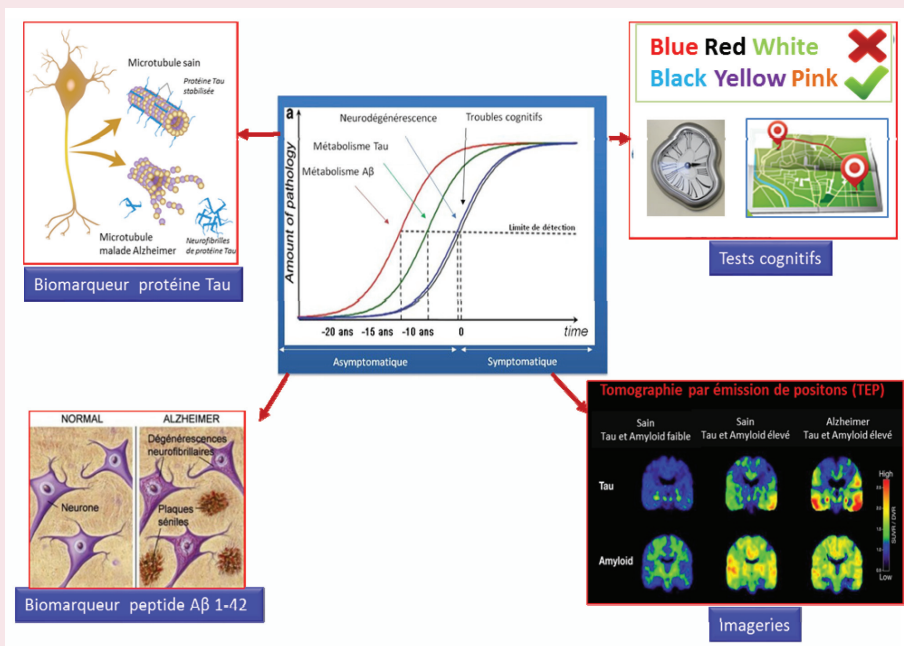


Figure 1 - Représentation schématique d'un microsystème en croix intégrant le monolithe poly(EGMP-co-BAA) synthétisé par irradiation UV dans un microcanal en verre pour la préconcentration de phosphopeptides fluorescents (gauche). Image du monolithe fluorescent dans le microcanal après percolation avec un phosphopeptide fluorescent ; ceci montre l'efficacité de sa capture (droite) (d'après [14]).

Encadré 3

La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative, liée à la formation progressive de plaques amyloïdes et de neurofibrilles, qui altère le cerveau. Elle s'accompagne de certains déficits cognitifs allant de troubles de la mémoire, du langage, à des difficultés de repérage spatiotemporel. C'est la principale cause de démence chez les personnes âgées. En France et dans les DOM-TOM, trois millions de personnes sont concernées par cette maladie. Parmi eux, un malade sur deux ignore qu'il en est atteint. À l'heure actuelle, aucun traitement curatif ou préventif ne peut être proposé au patient [5]. Ses caractéristiques sont l'accumulation des dépôts extracellulaires de peptides β -amyloïdes (plaques) et les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires provenant de la dégradation et l'agrégation des protéines Tau se détachant des microtubules neuronaux. Les peptides β -amyloïdes ($A\beta$) et la protéine Tau ont été largement étudiés dans le liquide céphalo-rachidien comme biomarqueurs de la destruction neuronale dans cette maladie.



Processus physiopathologiques et diagnostic actuel de la maladie d'Alzheimer (tests cognitifs et imageries) (d'après [6-10]).

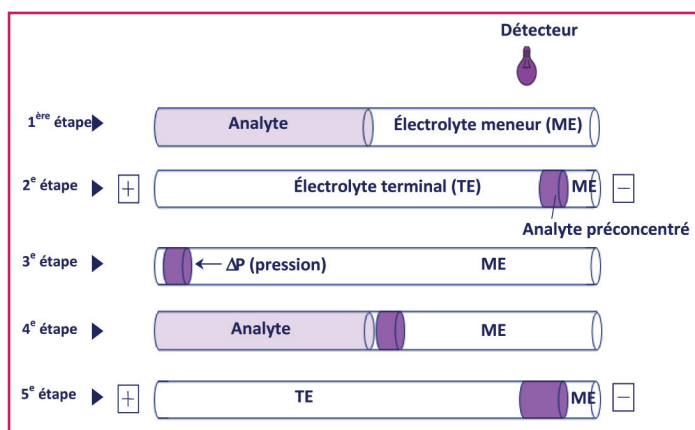


Figure 2 - **Principe de l'isotachophorèse (ITP).** 1^{ère} étape : conditionnement du capillaire avec l'électrolyte mineur puis injection d'un grand volume d'analyte ; 2^e étape : application de la tension et création d'un gradient de champ électrique (300-500 V/cm) (la concentration de l'analyte se produit entre l'électrolyte mineur et l'électrolyte terminal) et de la multi ITP ; 3^e étape : après une première ITP, une pression est appliquée pour repousser l'analyte à l'extrémité du capillaire ; 4^e et 5^e étapes : une deuxième ITP est effectuée en recommençant les 1^{ère} et 2^e étapes pour préconcentrer sous champ électrique des peptides A β dans un capillaire de silice.

Dans un autre projet concernant cette fois l'analyse des peptides A β , nous avons mis au point un système microfluidique pour la préconcentration par voie électrocinétique des peptides amyloïdes tronqués (A β 1-42, A β 1-40 et A β 1-38), considérés comme des biomarqueurs validés pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer. Les peptides A β ayant de 37 à 43 acides aminés sont naturellement produits dans les liquides biologiques, principalement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) [11]. Pour atteindre les concentrations extrêmement faibles des peptides A β (0,1-10 nM) dans des milieux biologiques (notamment le LCR), nous avons eu recours à la technique d'isotachophorèse (ITP) pour une préconcentration, n'utilisant pas de support solide comme pour l'exemple précédent. Cette technique permet de transformer un grand créneau d'échantillon introduit dans un capillaire en une bande très étroite contenant les analytes cibles très concentrés. Cette approche repose sur des différences de conductivité des solutions présentes en amont et en aval de la zone d'échantillon introduite dans le capillaire. La conductivité d'une solution quant à elle est dépendante non seulement des concentrations mais aussi des mobilités des espèces chargées qu'elle contient. L'efficacité de l'ITP a été démontrée dans un capillaire de 50 μ m mimant les dimensions d'un canal de puce (figure 2). Les peptides A β ont été détectés à une concentration aussi faible que 50 nM avec une détection par UV [16-17], voire 1 nM en utilisant la fluorescence induite par laser comme mode de détection (travail en cours de publication). L'étape suivante sera de transposer le format capillaire à la configuration microfluidique, suivi par un couplage avec un module de séparation par électrophorèse afin d'obtenir une détection ultra-sensible et sélective des peptides A β dans un dispositif miniaturisé et intégré. Cette méthode peut également être utilisée avec la spectrométrie de masse.

Afin de promouvoir l'intérêt des méthodes séparatives miniaturisées, un club d'électrophorèse capillaire a été créé très récemment au sein de l'AFSEP (Association francophone des sciences séparatives) à l'initiative de laboratoires académiques dont notre groupe [18]. L'objectif du groupe

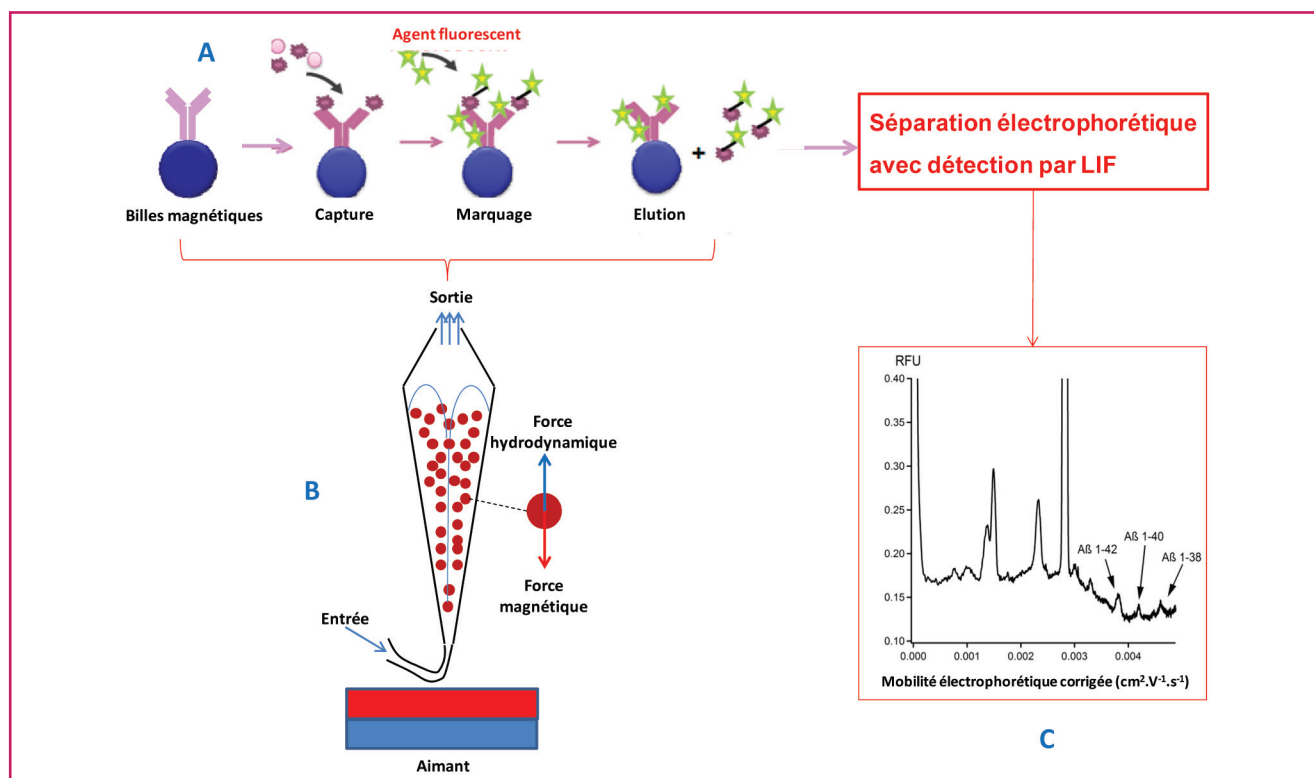
thématique d'électrophorèse capillaire est de proposer un lieu de rencontre, d'échange et de présentations scientifiques sur les méthodes de séparations électrocinétiques capillaires dans la communauté francophone [19]. Tous les modes de séparation électrocinétique en capillaire ou en microsystème sont inclus dans le périmètre scientifique du groupe, ainsi que l'ensemble de leurs applications.

Traitement de l'échantillon : un lit fluidisé performant

Le mode de détection par fluorescence est souvent utilisé pour obtenir une sensibilité de détection élevée dans les microsystèmes. De plus, la plupart des matériaux utilisés pour la fabrication des puces ne sont pas compatibles avec la détection par UV. Pour ce faire, les entités biologiques concernées (les peptides A β dans notre cas) doivent être marquées (dérivées) avec des marqueurs fluorescents avant l'étape de détection. Deux des problématiques principales liées à cette approche de dérivation sont (i) la nécessité d'optimiser les réactions entre les peptides/protéines et les marqueurs pour obtenir un marquage efficace, sélectif et reproductible, et (ii) la présence d'un excès de marqueur non lié dans l'échantillon après la réaction pouvant provoquer un bruit de fond élevé ou des interférences lors de l'analyse. Nous avons mis au point une nouvelle méthodologie microfluidique pour pallier ces difficultés, en utilisant un lit fluidisé qui contient des microbilles magnétiques (en collaboration avec l'équipe de J.-L. Viovy de l'Institut Curie) afin d'effectuer dans un même dispositif miniaturisé la capture des peptides amyloïdes, leur marquage par un agent fluorescent et leur élution (figure 3). Dans cette configuration, les billes magnétiques recirculent à l'intérieur du microcanal plutôt que de rester stationnaires, et ceci grâce à la superposition de deux forces, l'une magnétique et l'autre hydrodynamique. Ce dispositif permet d'améliorer les cinétiques de capture et de réaction ainsi que leur efficacité. Il a ainsi permis l'enrichissement des peptides A β par immuno-capture, après un marquage fluorescent *in situ* efficace des peptides A β déjà immobilisés sur les billes. Ainsi, les peptides capturés et marqués peuvent être analysés par EC après leur élution [20]. L'un des avantages de cette stratégie est l'élimination de l'excès de marqueurs fluorescents qui peut gêner la détection sensible des peptides marqués. En couplant cette stratégie de traitement des échantillons à un module d'EC couplée à une détection par fluorescence induite par laser (LIF), nous avons pu visualiser des peptides A β 1-38, A β 1-40 et A β 1-42 dans des échantillons de LCR. Le travail prospectif de ce projet sera de coupler le lit fluidisé et le module d'électrophorèse sur puce pour la conception d'un microsystème analytique totalement intégré qui permettra d'obtenir un suivi rapide, sensible et sélectif des peptides A β dans les échantillons de LCR des patients pour un diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Séparer et détecter grâce à la microfluidique

Pour analyser les protéines après leur préconcentration éventuelle, il existe plusieurs solutions : (i) se servir d'un canal de la puce comme colonne chromatographique en y introduisant une phase stationnaire (monolithique ou particulaire) pour séparer les protéines entre elles par chromatographie liquide ; (ii) établir un champ électrique dans le canal à l'aide d'électrodes pour les séparer par électrophorèse ; et (iii) mettre en œuvre des dosages immunologiques au



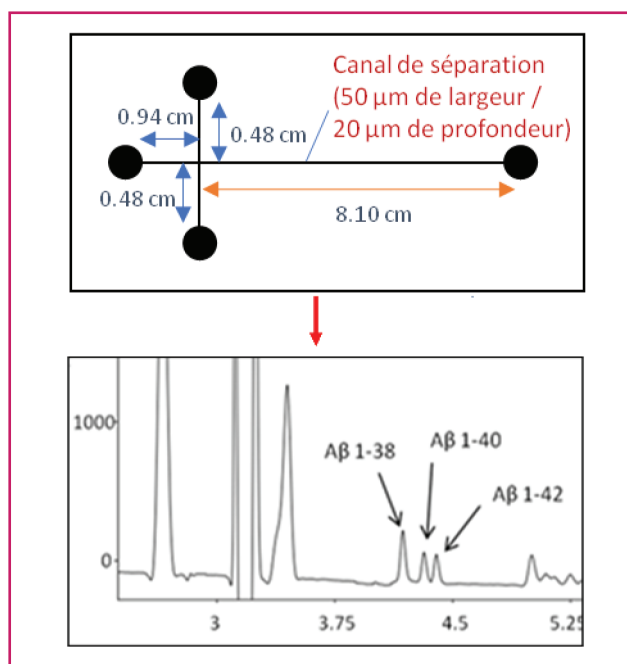
moyen d'anticorps. Au laboratoire, nous avons travaillé sur l'électrophorèse en microsystème ainsi que sur la réalisation d'un ELISA en gouttes.

L'électrophorèse dans des microsystèmes séparatifs

Nous avons mis au point une séparation des peptides Aβ dans un microsystème standard en verre. Pour y parvenir, la principale difficulté a été d'éviter leur adsorption sur les parois du microcanal et de supprimer le flux électroosmotique (EOF) dont la direction était opposée à la mobilité électrophorétique des peptides Aβ. Un recouvrement du microcanal avec un polymère neutre poly(diméthylacrylamide-co-allyl glycidyl éther) (EpDMA) s'est trouvé être l'approche la plus favorable [23]. Malgré de très courtes distances de migration dans un canal microfluidique de quelques centimètres, différents peptides Aβ N- et C- tronqués ont été entièrement résolus en quelques minutes d'analyse (figure 4). La méthode a été appliquée avec succès à la détection de peptides Aβ dans le LCR dopé [23].

Afin d'obtenir une bonne performance de séparation et détection (optique) dans un dispositif microfluidique, la sélection du substrat et de la chimie de surface appropriée pour la fabrication des puces est extrêmement importante. Les microdispositifs fabriqués à partir de verre, quartz ou silicium offrent une excellente transparence optique favorable à la détection, une isolation électrique élevée et une inertie vis-à-vis de la plupart des solvants. Toutefois, l'exigence des installations de fabrication coûteuse rend leur utilisation indésirable pour des applications cliniques qui préfèrent des microdispositifs jetables. Une alternative est l'utilisation de

matériaux à base de polymères qui rendent la production de masse des puces jetables plus réalisable. Dans ce contexte, le travail que nous avons réalisé récemment a consisté à mettre au point de nouveaux microsystèmes pour les



séparations électrophorétiques des protéines et des peptides en utilisant des matériaux innovants en polymère. Le but est de mettre en œuvre des modules séparatifs microfluidiques compatibles et qui peuvent se coupler avec des modules de prétraitement d'échantillons tels que ceux mentionnés ci-dessus. Nous avons mené dans ce sens en collaboration avec un laboratoire danois (le Département de micro- et nanotechnologie, DTU) et italien (Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM), CNR, Milan) le développement d'un microsystème composé des polymères de thiol-ène produits par la réaction de chimie click. Ces formulations à base de polymères ont suscité un intérêt considérable dans le domaine des micro- et nanofluidiques et semblent être des candidats prometteurs pour la fabrication des microdispositifs grâce à leur bonne résistance aux solvants, leur rigidité mécanique ajustable, leur très bonne transparence optique, la cinétique de polymérisation rapide, le traitement de surface facile et le faible coût de fabrication [24]. Le recouvrement des parois d'un microcanal en thiol-ène avec un ter-polymère composé de N,N-diméthylacrylamide (DMA), 3-triméthylsilanyl-prop-2-yn méthacrylate (PMA) et 3(triméthoxysilyl)-propylméthacrylate (MAPS) a permis d'obtenir des séparations efficaces de protéines basique (albumine de sérum bovin marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (BSA-FITC)) et acide (inhibiteur de la trypsine conjugué avec l'Alexa Fluor 488 (TI-Alexa 488)) sur une distance de séparation extrêmement courte (quelques millimètres), ce qui est plus difficile à obtenir avec un microcanal standard en verre (figure 5).

Une autre étude réalisée cette fois en collaboration avec l'Institut Curie (UMR 168), a porté sur le développement d'un microsystème composé du polymère Dyneon THV qui est un matériel fluoré thermoplastique de nature proche du téflon. Ce copolymère composé de tétrafluoroéthylène (TFE), hexafluoropropylène (HFP) et fluorure de vinylidène (VDF), possède plusieurs avantages tels qu'une faible énergie de surface, une résistance élevée aux produits chimiques,

une transparence sur une large gamme de longueurs d'onde et des températures de fusion basses permettant une micro-fabrication facile des canaux microfluidiques. Afin d'éviter l'adsorption non spécifique de protéines sur la paroi en Dyneon THV, nous avons développé une méthode simple de revêtement semi-permanent qui ne requiert qu'une mise en contact du canal de la puce avec du poly(oxyde d'éthylène) (PEO) stéarate [25]. Des étapes conventionnelles complexes et longues telles que l'activation de surface, le greffage photonique ou les réactions chimiques ont ainsi été évitées. La démonstration de la séparation électrocinétique dans un microcanal en Dyneon THV recouvert de PEO stéarate a été réalisée avec un mélange de protéines fluorescentes (BSA-FITC et TI-Alexa 488) (figure 6).

Diagnostic digital en gouttes

À ce jour, la méthode immuno-enzymatique ELISA permettant le dosage des biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) est la méthode de référence pour contribuer au diagnostic la maladie d'Alzheimer et d'autres formes de démence, avec une spécificité et une sensibilité élevées [11]. La miniaturisation de cette méthode laborieuse, qui requiert un grand nombre d'étapes, a permis la conception de dispositifs miniaturisés, transportables et automatisés de type « point of care » et représente un grand progrès. Dans ce contexte, il est possible d'envisager un microsystème utilisant la méthode très innovante de dosages immunologiques en gouttes avec des billes magnétiques pour la détection sensible et sélective de biomarqueurs dans un système microfluidique. Ces travaux sont envisagés dans le cadre d'un projet ANR d'investissement intitulé DIGIDIAG (ANR 10-Nano 0207, qui prendra fin en 2018) incluant treize équipes et visant à concevoir des outils miniaturisés digitaux pour le diagnostic de pathologies. Les détails de l'instrumentation que nous avons utilisée sont donnés dans les références [26-27] (figure 7). Dans un tel système, chaque goutte

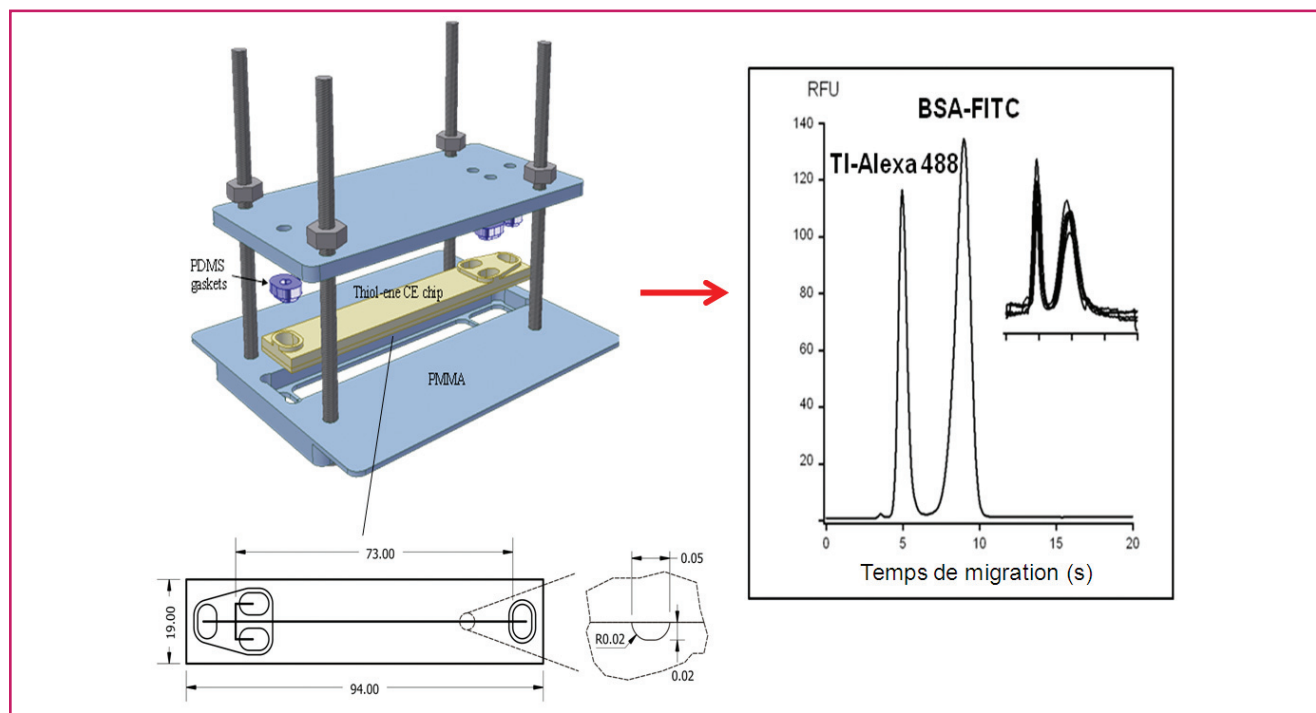


Figure 5 - Représentation schématique du support des puces en thiol-ène (avec les dimensions en mm) et séparation électrophorétique des protéines dans un microcanal en thiol-ène recouvert d'un ter-polymère pour éviter l'adsorption des analytes (d'après [24]).

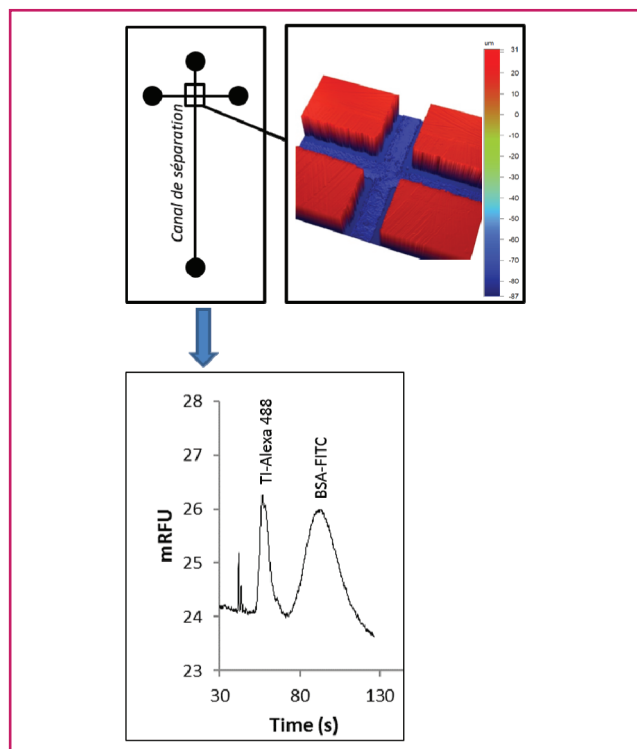


Figure 6 - Représentation schématisée d'une puce en croix en Dyneon THV. Image du profilomètre au niveau de la croix, montrant une faible rugosité des parois. Séparation électrophorétique du mélange BSA-FITC et TI-Alexa 488 dans un microcanal en Dyneon THV recouvert de PEO stéarate pour éviter l'adsorption des protéines (d'après [25]).

ou série de gouttes permet d'effectuer chacune des étapes d'un ELISA : capture de l'antigène dans l'échantillon biologique, lavage et élimination des substances interférentes, détection de l'antigène par un anticorps. Ce projet constitue une autre démonstration du grand potentiel de la technologie des gouttes microfluidiques pour le diagnostic digital, potentiel déjà démontré par les travaux réalisés par l'équipe de l'Institut Curie sur le diagnostic de l'hypothyroïdie congénitale (prévalence 1 pour 3 500 chez les nouveau-nés) [26] et du cancer du sein [27].

Conclusions et perspectives

L'intérêt et l'applicabilité de la microfluidique pour pré-concentrer, séparer et détecter des protéines et peptides ont été démontrés ici au travers des différents exemples de travaux qui ont été réalisés dans notre équipe. La microfluidique offre le potentiel de concevoir de nouveaux dispositifs analytiques intégrant plusieurs modules : séparation des composés, bio-essais, étapes de traitement d'échantillons dans un seul microsystème. Les avantages que la microfluidique apporte, à la communauté scientifique en particulier et à la société en général, sont nombreux, notamment la diminution significative de l'emploi de solvants organiques et d'échantillons, l'augmentation du débit d'analyse, la réduction des coûts d'installation et d'opération, mais aussi la possibilité de réaliser de nouvelles opérations et de permettre des fonctions non réalisables auparavant. La créativité des chercheurs dans ce domaine pour exploiter la microfluidique est sans fin. Pour réaliser des microsystèmes analytiques, il s'agit de réaliser des travaux de recherche souvent à l'interface de plusieurs disciplines telles que la physique, la chimie et la biologie.

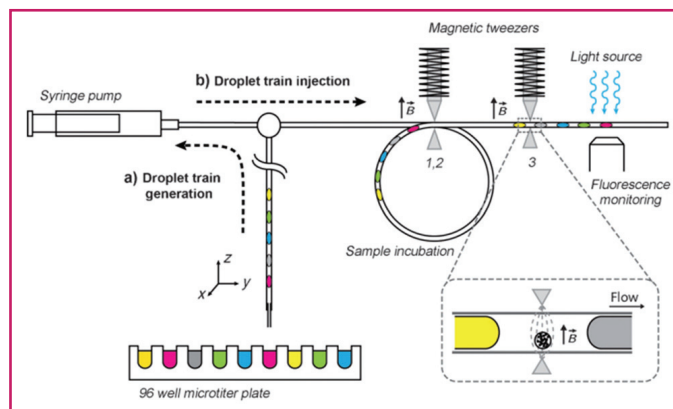


Figure 7 - Représentation schématisée du dispositif en gouttes utilisé pour les immunoessais réalisés dans les gouttes microfluidiques (d'après [26]).

Le développement d'outils de diagnostic reposant sur la microfluidique n'est possible que grâce à des collaborations entre équipes aux compétences complémentaires. C'est ce que nous avons recherché afin d'atteindre nos objectifs et ce, grâce à des collaborations très fructueuses avec les équipes de « Macromolecules and Microsystems in Biology and Medicine » (Institut Curie, UMR 168), le Département de micro- et nanotechnologie du DTU au Danemark, ou encore l'Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (ICRM, CNR) à Milan.

Bien que la miniaturisation de chaque opération ou module (préconcentration, séparation et détection) soit finalement réalisable assez aisément de façon indépendante, les défis résident dans le couplage efficace de ces modules entre eux au sein d'une plateforme unique, mais aussi dans la recherche de nouveaux matériaux pour fabriquer plus facilement les microsystèmes qui doivent être également compatibles avec toutes les opérations.

Notes et références

- [1] PNAS (Institut Galien Paris Sud), www.umn-cnrs8612.u-psud.fr/pres_eq4-uk.php
- [2] Gabriel E.F.M., Coltro W.K.T., Garcia C.D., Fast and versatile fabrication of PMMA microchip electrophoretic devices by laser engraving, *Electrophoresis*, **2014**, 35, doi: 10.1002/elps.201470140.
- [3] <http://fluidicmems.com/list-of-microfluidics-lab-on-a-chip-and-biomems-companies>
- [4] Kozma P., Lehmann A., Wunderlich K., Michel D., Schumacher S., Ehrentreich-Förster E.F., A novel handheld fluorescent microarray reader for point-of-care diagnostic, *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 47, p. 415.
- [5] <http://alzheimer-recherche.org>
- [6] Braak H., Zetterberg H., Del Tredici K., Blennow K., Intraneuronal Tau aggregation precedes diffuse plaque deposition, but amyloid- β changes occur before increases of Tau in cerebrospinal fluid, *Acta Neuropathol.*, **2013**, 126, p. 631.
- [7] <http://alzheimer-recherche.org/la-maladie-dalzheimer/symptomes-et-diagnostic/diagnostic>
- [8] <http://news.berkeley.edu/2016/03/02/pet-scans-alzheimers-tau-amyloid>
- [9] www.livescience.com/57652-mysterious-amnesia-cluster.html
- [10] <https://alzheimersnewstoday.com/2014/11/03/tau-protein-leads-to-neuronal-death-in-alzheimers>
- [11] Humpel C., Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease, *Trends Biotechnol.*, **2011**, 29, p. 26.
- [12] Araya-Farias M., Développement d'un laboratoire sur puce pour la préconcentration sur support monolithique. Application à l'enrichissement et la séparation en ligne de phosphopeptides, Thèse en chimie analytique, Université Paris-Saclay, **2016**, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01314427>
- [13] Dziomba S., Araya-Farias M., Taverna M., Guerrouache M., Carbonnier B., Tran N.T., Microscope-assisted UV-initiated preparation of well-defined porous polymer monolithic plugs in glass microchips for peptide preconcentration, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2017**, 409, p. 2155.
- [14] Araya-Farias M., Dziomba S., Carbonnier B., Guerrouache M., Ayed I., Aboud N., Taverna M., Tran N.T., A lab-on-a-chip for monolith-based preconcentration and electrophoresis separation of phosphopeptides, *Analyst*, **2017**, 142, p. 485.

- [15] Araya-Farias M., Taverna M., Woytasik M., Bayle F., Guerrouache M., Ayed I., Cao H.H., Carbonnier B., Tran N.T., A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips, *Polymer*, **2015**, *66*, p. 249.
- [16] Oukacine F., Taverna M., Suppression of apparent fluid flow in capillary isotachopheresis without recourse to capillary coating, *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, p. 3317.
- [17] Mai T.D., Oukacine F., Taverna M., Multiple capillary isotachopheresis with repetitive hydrodynamic injections for performance improvement of the electromigration preconcentration, *J. Chromatogr. A*, **2016**, *1453*, p. 116.
- [18] https://www.afsep.com/groupe-CE_group_12
- [19] Pour adhérer à ce club et participer aux séminaires organisés : <https://www.afsep.com/register.php>
- [20] Mai T.D., Pereiro I., Hiraoui M., Viovy J.-L., Descroix S., Taverna M., Smadja C., Magneto-immuncapture with on-bead fluorescent labeling of amyloid- β peptides: towards a microfluidized-bed-based operation, *Analyst*, **2015**, *140*, p. 5891.
- [21] Pereiro I., Bendali A., Tabnaoui S., Alexandre L., Srbova J., Bilkova Z., Deegan S., Joshi L., Viovy J.-L., Malaquin L., Dupuy B., Descroix S., A new microfluidic approach for the one-step capture, amplification and label-free quantification of bacteria from raw samples, *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, p. 1329.
- [22] www.rsc.org/images/loc/2012/pdf/T.8.191.pdf
- [23] Mesbah K., Verpillot R., Chiari M., Pallandre A., Taverna M., Neutral polymers as coatings for the high resolution electrophoretic separation of A β peptides on glass microchip, *Analyst*, **2014**, *139*, p. 6547.
- [24] Mesbah K., Mai T.D., Jensen T.G., Sola L., Chiari M., Kutter J.P., Taverna M., A neutral polyacrylate copolymer coating for surface modification of thiol-ene microchannels for improved performance of protein separation by microchip electrophoresis, *Microchim. Acta*, **2016**, *183*, p. 2111.
- [25] Aboud N., Ferraro D., Taverna M., Descroix S., Smadja C., Thuy Tran N., Dyneon THV, a fluorinated thermoplastic as a novel material for microchip capillary electrophoresis, *Analyst*, **2016**, *141*, p. 5776.
- [26] Ali-Cherif A., Begolo S., Descroix S., Viovy J.-L., Malaquin L., Programmable magnetic tweezers and droplet microfluidic device for high-throughput nanoliter multi-step assays, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 10765.
- [27] Ferraro D., Champ J., Teste B., Serra M., Malaquin L., Viovy J.-L., de Cremoux P., Descroix S., Microfluidic platform combining droplets and magnetic tweezers: application to HER2 expression in cancer diagnosis, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, p. 25540.



T.D. Mai

C. Crosnier
de Lassichere

N.T. Tran



C. Smadja

Thanh Duc Mai est chercheur postdoctoral, **Cédric Crosnier de Lassichere**, thésard, **Nguyet Thuy Tran**, enseignant-chercheur, **Claire Smadja** et **Myriam Taverna** (*auteur correspondant*) sont professeurs, à l'Université Paris-Sud, Équipe « Protéines et Nanotechnologies en Sciences Analytiques » (PNAS)*.



M. Taverna

* PNAS, Institut Galien de Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, CNRS, 5 rue Jean-Baptiste Clément, F-92296 Châtenay-Malabry.
Courriel : myriam.taverna@u-psud.fr



L'Union des professeurs de physique et de chimie

Une association d'enseignants au service des enseignants

Tous les Bup de 1907 à ce jour
en téléchargement gratuit pour toute adhésion et abonnement

Publication numérique mensuelle
avec impression papier trimestrielle



Consultation du Bup en ligne
par articles et par numéro avec BupDoc

- ◆ Pour tous : 1907 → 2012
- ◆ Pour les abonnés : 2013 → 2017



Un congrès organisé chaque année
par une académie différente



Le site : <http://www.udppc.asso.fr>

Espace Labo
Textes statutaires et documents
Gestion du laboratoire...

Espace Collège
Programmes
Liens intéressants

Espace Lycée
Enquêtes
Programmes...

Documents thématiques
Autour de la classification périodique
Métrologie...

Siège social et courrier : 42 rue Saint-Jacques - 75005 PARIS
Tél. : 01 40 46 83 80 - Fax : 01 46 34 76 61 - secretariat.national@udppc.asso.fr