

Chimie analytique et société

Marie-Claire Hennion (*coordinatrice*), Pierre Gareil, Agnès Hagège, Alexander Kuhn et Valérie Pichon

Résumé

La chimie analytique est fortement impliquée dans le développement durable et cet article décrit quelques aspects de la recherche actuelle dans ce domaine. Les besoins en analyse de composés à l'état de traces et d'ultra-traces dans des matrices complexes nécessitent le développement d'étapes d'extraction et de préconcentration très sélectives réalisées à l'aide d'adsorbants modifiés chimiquement par des anticorps ou des aptamères ou en synthétisant des polymères à empreintes moléculaires. La toxicité réelle d'un échantillon dépend de sa concentration mais aussi de sa forme chimique : ainsi il est important de caractériser les cibles biologiques des métaux grâce au développement de nouveaux outils analytiques couplant des séparations réalisées par électrophorèse capillaire et une détection par ICP/MS. Les avancées réalisées dans les techniques de séparation miniaturisées pour répondre à la demande d'analyses rapides à partir d'échantillons de tailles très réduites sont décrites, avec d'une part les méthodes de séparation électrocinétiques capillaires et d'autre part, dans le domaine des microsystèmes analytiques en format micropuce, en insistant sur les méthodes de préconcentration intégrées. Enfin, les capteurs sont devenus indispensables pour de nombreux aspects et les avancées récentes dans le domaine des capteurs nanostructurés sont décrits.

Mots-clés

Analyse de trace, spéciation, électrophorèse capillaire, microsystèmes séparatifs, capteurs bioélectrochimiques nanostructurés.

Abstract

Analytical chemistry and society

Analytical chemistry is strongly involved in sustainable development and several aspects of the actual research are described in this paper. For trace and ultra-trace analysis in complex samples, new sorbents have been synthesized for a high selective extraction and concentration of analytes involving interaction based on the use of antibodies, aptamers or imprinted polymers. The toxicity of a given sample depends on its concentration and on its speciation. Therefore it is important to characterize the complex between metals and proteins, which can be achieved by new devices coupling zone electrophoresis separation and ICP/MS detection. In order to achieve rapid separations from small size samples, new trends are given in electrokinetic separations coupled to in-capillary separation and MS are described, as well as in the area of microsystems on chips. The last part describes the trends in bioelectrochemical biosensors with the development of macroporous materials with a controlled architecture.

Keywords

Trace analysis, speciation, capillary electrophoresis, microTAS, biosensors.

La plupart des domaines sociaux-économiques (santé publique, sécurité alimentaire, environnement, sécurité des personnes, industries, fraudes et dopage, patrimoine historique ou archéologique...) sont dépendants d'analyses chimiques, et par conséquent, la discipline « chimie analytique » est fortement impliquée dans de nombreuses actions liées au développement durable. Bien que les objets d'études soient de natures très diverses, les demandes issues des différents domaines ont aujourd'hui beaucoup d'aspects communs. Les analyses doivent être de plus en plus rapides, fiables, peu coûteuses, respecter l'environnement, être réalisées à partir de toutes petites quantités d'échantillons (quelques nL pour certains échantillons biologiques), si possible sur le terrain ou *in vivo*, être capables de détecter des composés à l'état de traces et ultra-traces dans des échantillons très complexes, ou d'identifier et quantifier un très grand nombre de composés dans des mélanges très complexes de par le nombre de composés présents (protéomique, produits naturels, pétroliers...).

Pour répondre à ces demandes, la chimie analytique moderne doit se tourner vers de nouveaux concepts, en considérant l'ensemble de la chaîne analytique, du traitement de l'échantillon à la détection. Les recherches actuelles sur

l'étape de traitement d'échantillon consistent à cibler uniquement les composés recherchés *via* le développement de nouveaux matériaux mettant en œuvre des interactions très sélectives basées sur la complexation avec des ligands spécifiques (calixarènes, dextrines...), ou bien sur la reconnaissance moléculaire (anticorps, polymères à empreinte moléculaire, aptamères...) ou biomoléculaire (enzymes, récepteurs, brins d'ADN, protéines...). De nouvelles phases séparatives comme les monolithes (organiques, inorganiques ou hybrides) permettent des hauts débits de phase mobile sans nuire à la qualité des séparations. Des couplages de modes séparatifs originaux et orthogonaux sont mis en œuvre pour l'analyse multidimensionnelle d'échantillons très complexes (challenge pour l'analyse des protéines de faible abondance). La miniaturisation est également un domaine de développement très important parce qu'elle répond aux besoins d'analyses rapides et sensibles, à moindre coût et qu'elle est très respectueuse de l'environnement puisque la consommation de solvants organiques et autres réactifs est extrêmement réduite. Enfin, un autre domaine en plein essor est celui de la mesure *in situ* et *in vivo* via des capteurs et biocapteurs, ainsi que des bioessais divers (immunoessais, inhibition enzymatique,

cellulaire...) en format laboratoire sur puce avec ou sans microfluidique associée.

Ces différents points sont développés dans plusieurs laboratoires des écoles de la Fédération Gay-Lussac, comme le montrent les quelques exemples décrits ci-après.

Approches bioanalytiques et biomimétiques du traitement de l'échantillon pour l'analyse de traces et d'ultra-traces et intégration à des systèmes miniaturisés

Quel que soit le domaine d'application, le challenge analytique est souvent lié aux faibles teneurs recherchées, mais aussi à la diversité des composés. Malgré l'évolution de l'instrumentation, notamment dans le domaine des séparations rapides et de la spectrométrie de masse, ces faibles niveaux de concentration nécessitent l'introduction d'étapes de pré-concentration avant analyse. Parallèlement, la complexité de la majorité des échantillons à analyser impose une étape de purification lors du traitement de l'échantillon, ce qui contribue à augmenter les performances de la méthode. Parmi les approches possibles, des supports d'extraction mettant en jeu un mécanisme de rétention plus sélectif basé sur la reconnaissance moléculaire peuvent être développés. L'objectif est alors d'extraire sélectivement une molécule ou une famille structurale de molécules en isolant des autres constituants de l'échantillon, de manière à rendre son analyse quantitative plus fiable.

Pour ce faire, il est possible de mettre en œuvre des immunoadsorbants constitués d'anticorps, spécifiques d'une molécule ou d'une famille de molécules, immobilisés sur un support solide (silice, gel d'agarose...). L'immunoextraction consiste donc à percoler un échantillon sur le support (figure 1). Après cette étape (qui peut être suivie si nécessaire d'une étape de lavage), seuls les composés reconnus par l'anticorps seront retenus sur le support. Il ne reste plus qu'à rompre les interactions antigène-anticorps pour récupérer un extrait contenant uniquement les molécules d'intérêt qui peuvent alors être facilement analysées.

Si la production d'anticorps spécifiques de petites molécules est difficile puisqu'elle nécessite une modification chimique du composé ciblé avant immunisation, elle conduit cependant à un support de fort potentiel pour l'extraction d'un

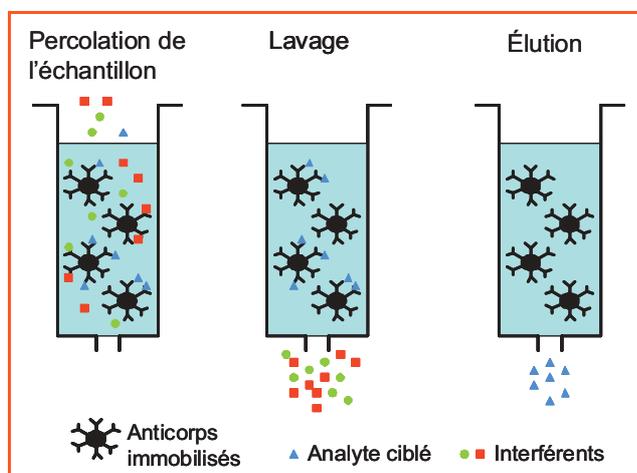


Figure 1 - Principe d'une extraction sélective d'analyte cible d'un échantillon complexe via un immunoadsorbant.

composé seul dans un échantillon complexe, mais aussi de plusieurs analogues structuraux. Ces approches ont déjà été développées pour de nombreuses classes de composés (pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques, toxines alimentaires ou algales...) [1].

Une autre approche consiste à synthétiser des polymères à empreintes moléculaires (MIP) qui sont obtenus par introduction d'une molécule modèle (empreinte ou « template ») dans un solvant en présence de monomères choisis pour leur grande affinité avec la molécule empreinte, d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation. Par initiation thermique ou photochimique, les monomères polymérisent autour de la molécule empreinte, induisant la création de cavités spécifiques à l'image complémentaire de cette molécule empreinte (figure 2).

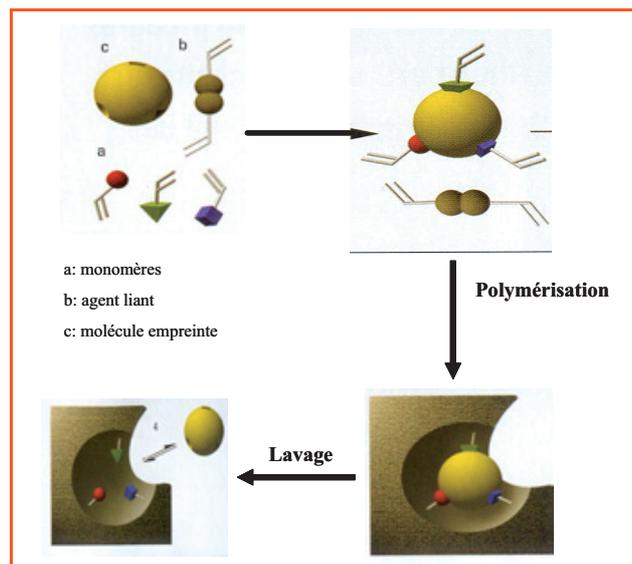


Figure 2 - Procédure de synthèse d'un polymère à empreinte moléculaire (MIP).

Une fois la polymérisation achevée, la molécule empreinte est éliminée de la matrice polymère, ce qui conduit à la formation d'un polymère macroporeux renfermant des cavités spécifiques de la molécule modèle. Ces supports ont d'ores et déjà été développés pour de nombreuses molécules de propriétés physico-chimiques différentes [2-3].

Si pour les anticorps les interactions dépendent de la molécule cible et des acides aminés impliqués dans le site de reconnaissance, dans le cas des MIP, la nature des interactions est définie par la nature des monomères et du solvant de polymérisation utilisé pour la synthèse, ce qui implique de développer des procédures d'extraction dans un solvant proche de celui-ci. Néanmoins, si la nature de ces deux supports est très différente, les résultats obtenus en termes de sélectivité pour le traitement de matrices complexes sont tout à fait comparables comme en témoigne la figure 3 [4].

Une dernière approche consiste à utiliser des aptamères, à savoir des oligonucléotides (de 15 et 60 bases) possédant une forte affinité et spécificité envers un ligand (petites molécules organiques, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules intactes). Ils sont sélectionnés à partir d'une banque aléatoire contenant jusqu'à 10^{15} séquences différentes par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée SELEX (« Systematic Evolution of Ligands by

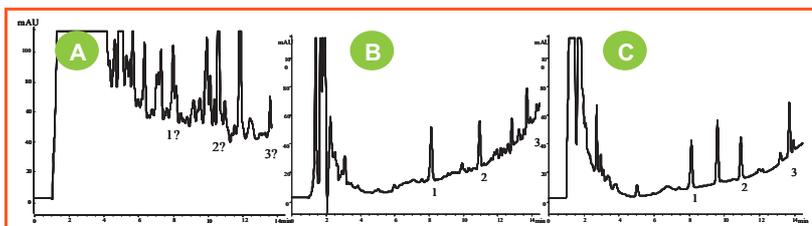


Figure 3 - Analyse d'un extrait de sol contenant des triazines (1 : simazine ; 2 : atrazine ; 3 : terbutylazine) par CPL/UV sans (A) et après purification sur immunoadsorbant (B) et polymères à empreintes moléculaires (C) (d'après [4]).

EXponential enrichment ») selon leur aptitude à reconnaître une cible, et offrent donc une sérieuse alternative à l'utilisation des anticorps.

Les aptamères font déjà l'objet de nombreuses applications analytiques : bioessais, capteurs, phases stationnaires pour les séparations chromatographiques et électrocinétiques. Des résultats très prometteurs ont été obtenus lors de leur utilisation pour l'extraction sélective d'une molécule modèle, la cocaïne, du plasma humain [5].

De plus, l'oligoextraction semble être une très bonne alternative à l'immunoextraction et présenterait même quelques avantages comme leur taille réduite comparée à celle des anticorps, permettant une meilleure densité de greffage, et donc des supports de plus grande capacité, une synthèse facilitée, des durées de régénération de quelques minutes contre 24 ou 48 h pour les anticorps. Les oligoadsorbants peuvent également remplacer les MIP lorsque la molécule cible est particulièrement chère car leur production nécessite une quantité beaucoup moins élevée d'analyte.

Enfin, le développement de systèmes séparatifs miniaturisés implique aujourd'hui l'intégration de ces outils sélectifs pour permettre d'appliquer ces systèmes à des échantillons complexes tels que les matrices alimentaires, environnementales et biologiques. À ce titre, les polymères à empreintes moléculaires peuvent être désormais générés *in situ* sous forme de monolithes dans des capillaires de 100 μm de diamètre interne et connectés en ligne avec des systèmes de nanochromatographie ou à terme dans des microcanaux de microsystèmes analytiques [6]. Une approche similaire peut alors être envisagée pour les aptamères et les anticorps en greffant ceux-ci sur un monolithe généré *in situ*.

Avancées dans les méthodes de séparation électrocinétiques capillaires

Analyse de trace et élimination de matrice par les méthodes électrocinétiques : développements méthodologiques et applications

Les techniques de séparation miniaturisées, qui ont longtemps souffert d'un manque de sensibilité, offrent la possibilité de faire des préconcentrations *in situ* en tête de capillaire, rapides, efficaces, peu coûteuses et qui ne requièrent pas la présence d'un support solide. Différentes méthodes permettent de transformer un grand créneau d'échantillon en une bande étroite contenant les analytes cibles très concentrés :

- celles d'amplification de champ électrique dans la zone contenant les composés à préconcentrer, regroupées sous le nom de « *stacking intrinsèque* » ;

- celles entraînant les composés présents à l'état de trace grâce à une interaction forte avec une espèce migrant à grande vitesse, regroupées sous le nom de « *sweeping* » ;

- celles créant des conditions de migration transitoire en mode *isotachophorèse* en début de séparation, via l'exploitation d'ions de mobilité électrophorétique adaptée (encadrant celles des composés ciblés), dits mineur et terminal, à une concentration importante.

Nos premiers travaux dans ce domaine ont utilisé l'amplification de champ pour préconcentrer les impuretés anioniques dans les liquides ioniques de type imidazolium. Nous avons mis au point par la suite la détermination des impuretés cationiques dans les mêmes liquides ioniques en utilisant une approche originale de couplage en un seul capillaire d'une préconcentration par isotachophorèse et d'une séparation par électrophorèse de zone [7]. En vue d'analyser les traces des cations Fe(II), Co(II) et Ni(II), avec les limites de détection les plus basses possibles (de l'ordre de la dizaine de ppt), pour le suivi de la corrosion dans les circuits primaires des centrales nucléaires, nous avons étudié le couplage de deux techniques de préconcentration : l'amplification de champ électrique et l'isotachophorèse transitoire (figure 4) [8].

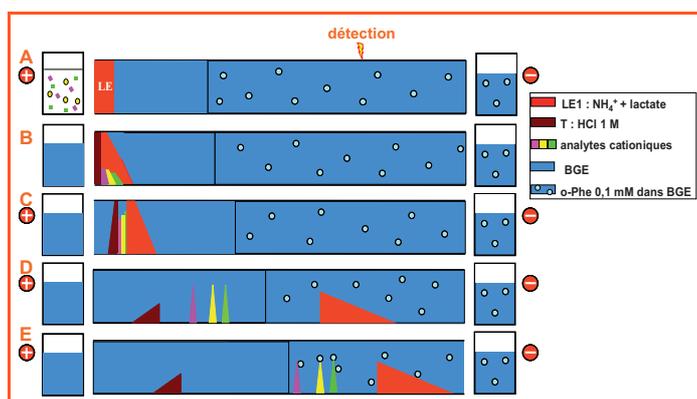


Figure 4 - Principe de l'analyse à l'état de traces des cations Fe(II), Co(II) et Ni(II) par superchargement électrocinétique, séparation par électrophorèse capillaire de zone, dérivation *in situ* et détection en mode UV direct.

A : injection électrocinétique de l'échantillon dans une zone de forte conductivité et 1^{ère} étape de préconcentration par amplification du champ électrique ; B : introduction hydrodynamique d'une zone d'ion terminal ; C : 2^e étape de préconcentration par isotachophorèse transitoire, la zone LE1 contenant l'ion mineur NH_4^+ concentré ; D : séparation en mode zone par complexation des cations avec de l'acide lactique ; E : dérivation *in situ* avec de l'ortho-phénanthroline.

Par ailleurs, l'électrophorèse capillaire permet d'éliminer des matrices complexes gênantes, via la manipulation des écoulements électroosmotiques et l'utilisation du mode électrocinétique pour l'injection. Un exemple en est la possibilité de déterminer des ions sulfate libres produits par une sulfatase (issue de coquille Saint-Jacques) en présence d'un polysaccharide sulfaté naturel (fucoïdane). La plupart des méthodes classiques n'étaient pas utilisables dans ces conditions biologiques. L'injection sélective des sulfates en mode électrocinétique permet d'éviter l'introduction de la matrice polymère et de réduire considérablement les effets de matrice et les risques d'interférences.

Ces problématiques trouvent actuellement une continuation avec l'identification de traces d'explosifs sur des prélèvements après attentat. Les matrices prélevées peuvent être très diverses (bois, gravats, huiles, fibres textiles, métaux,

verre, tissus biologiques, etc.) et il est nécessaire de croiser les résultats obtenus par différentes techniques pour en assurer la fiabilité. Les techniques électrocinétiques permettent en effet d'éliminer une partie des constituants matriciels ioniques ou neutres susceptibles d'interférer lors des analyses, par ajustement des écoulements électroosmotiques. En outre, l'application des techniques de préconcentration électrocinétiques en ligne selon le cas à des composés ionisés ou neutres et à des matrices de plus ou moins grande conductivité devrait se montrer particulièrement intéressante. Les premiers résultats obtenus pour l'identification des anions inorganiques représentatifs dans diverses matrices réelles sont très prometteurs et les comparaisons avec la chromatographie ionique sont en cours.

Couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse : développements méthodologiques et applications à la caractérisation de milieux complexes

Depuis une dizaine d'années, le couplage de l'électrophorèse capillaire (CE) à la spectrométrie de masse (MS) connaît un succès croissant et représente une alternative très intéressante au couplage chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse (LC-MS), notamment pour la détection et la caractérisation de composés ionisés ou très polaires présents dans des matrices complexes. Le couplage CE-MS permet d'allier les principes de séparation spécifiques de la CE et les avantages liés à sa miniaturisation, à la grande sensibilité de détection et à la puissance d'identification et de caractérisation structurale de la MS.

Une des problématiques principales du couplage CE-MS avec source d'ionisation par électronébulisation (ESI) réside dans le maintien du contact électrique pour la séparation électrophorétique. Nous avons mis au point de nouvelles méthodologies de séparation pour pallier cette difficulté, qui ont permis des séparations simultanées de composés cationiques et anioniques polychargés. De plus, les phénomènes mis en jeu à l'interface CE-ESI-MS ne sont pas encore complètement élucidés. Nous nous sommes intéressés à décrire de façon systématique les phénomènes de dilution, de succion et de rendements d'ionisation afin de mieux appréhender les aspects quantitatifs [9]. En particulier, le facteur de dilution engendré par l'introduction du liquide additionnel est inférieur au rapport de dilution théorique correspondant à un mélange total de l'électrolyte de séparation et du liquide additionnel.

Dans le cadre de nos études d'interactions substrat-ligand, nous avons développé une stratégie originale fondée sur le couplage de la CE en mode frontal (injection en continu

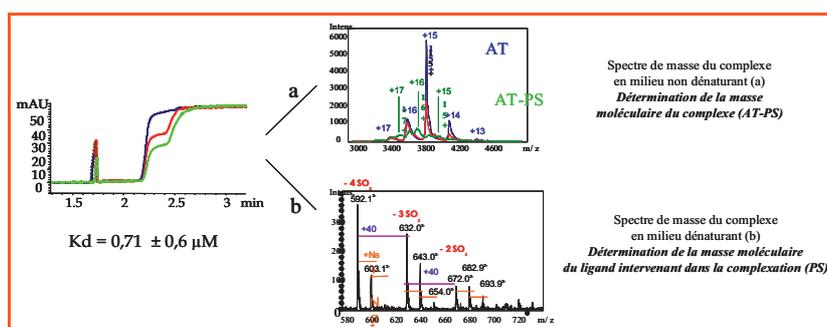
par voie électrocinétique des mélanges incubés substrat/ligand) à l'ESI-MS, permettant ainsi un temps d'acquisition du spectre de masse plus élevé, et donc une meilleure sensibilité de détection. Par exemple, dans le cas des interactions entre une protéine cible et des polysaccharides présentant une forte hétérogénéité structurale, le couplage a été mis au point à la fois pour des conditions non dénaturantes et dénaturantes de l'interaction, ce qui a permis de déterminer la masse moléculaire du complexe et celle du ligand réellement impliqué dans l'interaction (figure 5) [10]. Cette nouvelle méthodologie ouvre ainsi la voie d'une stratégie de « pêche au ligand ».

Nos travaux méthodologiques se sont orientés tout dernièrement vers le couplage en ligne de l'isoélectrofocalisation à la spectrométrie de masse (CIEF-ESI-MS). Bien que ne constituant pas une véritable approche séparative bidimensionnelle, cette méthode pourrait devenir une alternative intéressante à l'électrophorèse bidimensionnelle pour l'analyse protéomique, dans la mesure où elle fournit également les informations sur le point isoélectrique et la masse moléculaire, avec les avantages supplémentaires de rapidité et d'automatisation complète. Ce couplage implique un milieu eau-glycérol (en remplacement des gels anticonvectifs non compatibles avec la MS), qui assure la continuité électrique nécessaire à la CIEF, contribue à la stabilisation des protéines et permet l'utilisation de capillaires en silice vierge. La faisabilité de cette approche a été montrée pour un mélange standard de protéines [11]. L'application aux protéines hydrophobes du lait est en cours.

Au niveau des applications, nous nous sommes intéressés tout d'abord à la caractérisation des oligosaccharides sulfatés issus de la dépolymérisation des héparines. Par la suite, la sélectivité et les capacités d'identification du couplage CE-MS ont pu être bien évaluées lors de l'étude d'acides alkylalkylphosphoniques isomères (produits de dégradation d'agents de guerre chimique) non séparés en CE, tandis que la séparation par CE était indispensable pour différencier des acides alkylphosphoniques isomères, indiscernables en MS-MS. La préconcentration par amplification du champ électrique a permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 (limites de détection des acides alkylalkylphosphoniques entre 0,25 et 0,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dans des matrices environnementales de faible conductivité (eau potable et de rivière). La préconcentration par isotachophorèse transitoire a ensuite été développée pour améliorer la sensibilité de détection de ces acides d'un facteur 40 dans des matrices de forte conductivité (extrait de sol et urine), permettant d'atteindre des limites de détection dans ces milieux entre 5 et 75 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en mode d'ion extrait [12]. Les techniques électrocinétiques capillaires, couplées ou non à la spectrométrie de masse, devraient également apporter des solutions pertinentes pour l'identification de traces d'explosifs après attentat, pour laquelle la disposition de méthodes alternatives est primordiale, pour une confirmation juridique.

Cibles biologiques des métaux : développements analytiques à l'interface chimie/biologie

En matière d'environnement, l'intérêt de la spéciation n'est plus à démontrer, tant au niveau des études concernant la répartition des éléments au sein des différents compartiments



environnementaux que de l'évaluation de la toxicité d'un échantillon. Il est maintenant acquis que la toxicité réelle d'un échantillon ne dépend pas seulement de la concentration totale en élément mais de la forme chimique sous laquelle il est engagé.

Au début des années 2000, le concept de spéciation d'éléments traces a évolué des espèces à caractère covalent vers celles à caractère non covalent. Si la force des interactions non covalentes correspond à environ 1/20^e de celle des liaisons covalentes, il n'en reste pas moins qu'elles sont au cœur de nombreux processus. Les disciplines biologiques en particulier sont confrontées aux problématiques de mise en évidence et de caractérisation de complexes protéines-métaux [13-14]. Dans ces systèmes, les métaux de transition ont deux rôles essentiels. D'une part, ils sont capables d'organiser la matière en formant des complexes avec des molécules biologiques, et la géométrie qu'ils imposent à cette matière est caractéristique de l'élément et permettra un phénomène de reconnaissance moléculaire. D'autre part, ces mêmes éléments peuvent changer de degré d'oxydation. Ceci signifie qu'ils sont capables de donner ou de capter des électrons, ce qui va permettre un échange d'énergie exactement approprié au processus biologique et à une chimie du vivant qui se réalise à température constante.

Une conséquence extrêmement importante de ces deux propriétés est l'impossibilité pour l'organisme de réaliser une réaction biologique en utilisant un élément de transition non approprié. En cas d'intoxication par des éléments se trouvant sous la première série de transition, l'organisme peut alors construire par erreur des entités qui n'auront ni la même géométrie ni les propriétés énergétiques souhaitées, d'où l'importance de l'étude des substitutions métalliques au sein des enzymes.

Compte tenu de l'omniprésence des métaux au sein des processus biologiques, il est particulièrement important d'explorer les interactions métalliques entre les métaux essentiels et leurs interférents.

Développement de nouveaux outils de spéciation

L'une des difficultés majeures provient du fait que la stabilité de ces espèces est souvent plus réduite et plus sensible à de faibles variations de pH, température... que celle des espèces covalentes. Les outils analytiques développés doivent donc permettre le maintien de ces interactions dans les conditions d'analyse. De plus, de par la nature même des échantillons, les volumes nécessaires à l'analyse ne doivent pas excéder quelques microlitres. Enfin, en raison de la complexité des milieux biologiques, le principe de base consiste à allier une étape séparative à une méthode de détection performante.

Dans ce contexte, l'électrophorèse capillaire est une méthode séparative miniaturisée offrant le double avantage de :

- permettre des séparations n'altérant que peu ou pas l'intégrité des espèces initialement présentes, cette propriété en faisant un outil de choix en matière de spéciation ;
- posséder des efficacités de séparation très importantes (de l'ordre de 10⁶ plateaux/m), permettant ainsi l'analyse d'échantillons complexes en des temps relativement courts et ce, sur des volumes d'échantillon n'excédant pas quelques dizaines de nanolitres.

Son couplage à une méthode élémentaire spécifique sensible telle que la spectrométrie de masse à ionisation par plasma (ICP/MS) lui confère des atouts supplémentaires

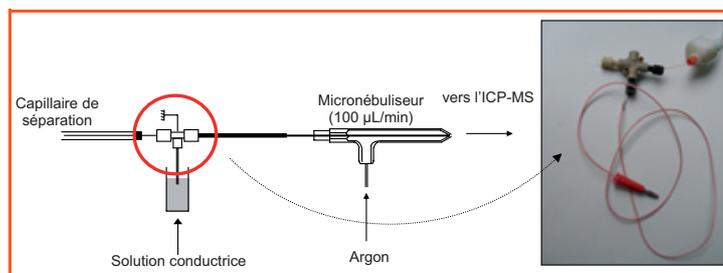


Figure 6 - Interface entre l'électrophorèse capillaire et l'ICP/MS.

[15], notamment dans la détermination de cibles minoritaires mais pertinentes au niveau biologique en raison de leur affinité importante pour les métaux.

Le développement d'une interface permettant à la fois le maintien de l'efficacité de séparation de l'électrophorèse capillaire et la sensibilité de l'ICP/MS a constitué l'un des enjeux majeurs de nos recherches (figure 6).

Cette interface alliée à une préconcentration par amplification de champ électrique en ligne permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre du picogramme de métal [16].

Criblage rapide des cibles potentielles des métaux

Contrairement aux éléments essentiels, certains métaux ne participent à aucun processus vital et sont connus seulement pour leurs effets purement toxiques sur l'organisme (mercure, plomb, cadmium...). Ils peuvent occasionner des désordres physiologiques, des troubles pathologiques en interférant avec les systèmes biologiques.

Un tel outil analytique permet ainsi d'analyser les conséquences de la présence de métaux toxiques, en particulier les échanges de métaux au sein des protéines. Des études visant à déterminer les cibles protéiques de différents métaux ont été réalisées. Comme en témoigne l'étude comparée d'intoxications au cadmium et au cobalt (figure 7), il apparaît que les protéines affectées diffèrent en fonction du métal, et que des échanges métal naturellement présent/métal contaminant peuvent avoir lieu [17]. Les

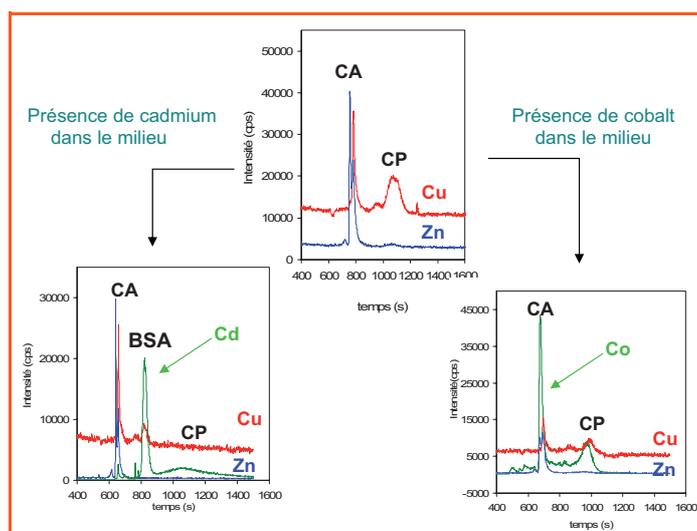


Figure 7 - Électrophérogrammes d'un mélange protéique : anhydrase carbonique (CA), albumine du sérum bovin (BSA) et céruloplasmine (CP). Capillaire de silice fondue, 75 µm i.d. x 80 cm ; Électrolyte : tampon borate 25 mM, pH 9,2 ; T = 20 °C, 25 kV.

troubles de fonctionnalité de la protéine, associés à ce type d'échange, pourraient aussi être abordés.

Les microsystèmes analytiques intégrés pour l'analyse totale

La plupart des microsystèmes séparatifs pour l'analyse totale (μ TAS) décrits dans la littérature sont réalisés sur microchips en verre ou en polymère. Les plus simples mettent en œuvre des séparations dans un microcanal libre (longueur : quelques cm, profondeur : 10 à 50 μ m, largeur : 30 à 80 μ m) en mode électrophorèse (CE), le débit de la phase mobile étant assuré par le flux électroosmotique (EOF) en appliquant aux extrémités du canal une différence de potentiel convenable (figure 8). Ils permettent d'obtenir des séparations efficaces très rapides, en utilisant très peu de réactifs et solvant, et sont parfaitement adaptés à l'analyse de microéchantillons. Ils sont portables, mais leur principal avantage est dû aux technologies de fabrication performantes qui permettent de concevoir différentes combinaisons de réactions et de séparations sur la même microchip.

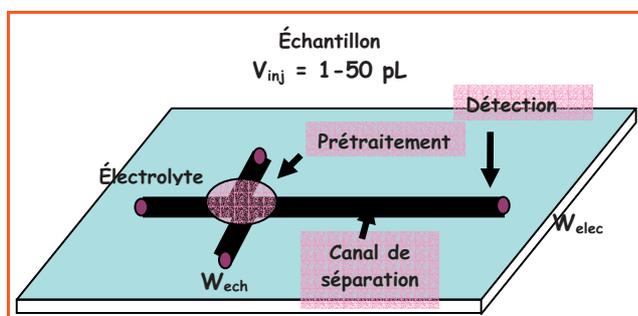


Figure 8 - Schéma d'un microsystème et montage expérimental.

Cependant, ce mode de séparation est dédié aux espèces chargées et ne peut résoudre des séparations complexes où il sera nécessaire de coupler au moins deux modes de séparation. Une solution consiste à utiliser les phases stationnaires de la chromatographie en phase liquide (CPL). Assurer le flux d'une phase mobile isocratique par une pompe extérieure est délicat car le profil du flux est alors parabolique et l'efficacité devient vite insuffisante si on se limite à quelques cm de canal. L'EOF peut être maintenu comme mécanisme de pompage, mode séparatif hybride nommé électrochromatographie, mais les phases stationnaires CPL ne sont pas adaptées (remplissage difficile, problème des frittés). Le travail que nous avons réalisé récemment a consisté à mettre au point de phases polymères synthétisées *in situ* dans les microcanaux par photopolymérisation, ce qui permet de faire un remplissage à façon sur les microchips sans aucun problème de fritté puisque ces colonnes monolithiques sont constituées d'un bloc continu de phase poreuse et rigide, formé par un réseau de pores et de globules de tailles différentes (macropores et mésopores) et interconnectés.

La première étape a été l'obtention de ces monolithes à base d'acrylates et méthacrylates et leur caractérisation par électrochromatographie, en utilisant comme support des colonnes capillaires de silice de 50 μ m de diamètre (dimensions analogues à celles des microcanaux des microchips) vides et entourées d'une gaine transparente aux UV. Un mélange constitué d'un initiateur radicalaire, d'un mélange de solvants porogènes, d'un mélange de monomères d'esters acryliques contenant une espèce

chargée pour assurer l'EOF et d'un agent réticulant est introduit dans le capillaire vide et prétraité au préalable, puis soumis à des radiations UV à 365 nm. Après rinçage, le capillaire rempli est monté sur un appareil d'EC classique pour caractérisation électrochromatographique. L'optimisation des conditions de synthèse a conduit à des monolithes efficaces (environ 300 000 plateaux/m) et reproductibles, tant du point de vue structure que du point de vue propriétés chromatographiques (flux électroosmotique, efficacité, facteur de rétention) [18]. Les profils des courbes de Van Deemter ont montré qu'on peut utiliser des vitesses de phase mobile élevées sans perdre d'efficacité comme le montre la figure 9.

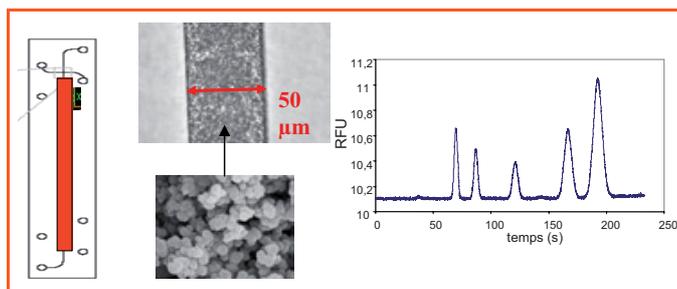


Figure 9 - Microchip remplie de monolithe organique et séparation d'hydrocarbures polyaromatiques sur canal rempli, détection par fluorescence à 1,5 cm de l'injection (RFU : « relative fluorescent unit »).

Les phases monolithiques ont été ensuite réalisées *in situ* dans des microchips en verre avec de bonnes efficacités et permettant des séparations rapides comme l'illustre la figure 9. Le nombre de plateaux théoriques obtenu est de l'ordre de 200 000 [19].

Nous avons ensuite étudié la possibilité de préconcentrer les analytes directement en tête de colonne. En effet, dans les microsystèmes, les quantités injectées sont de l'ordre de 50 nL et pour des échantillons réels, les détections classiques par UV et fluorescence ne sont pas assez sensibles. Mais cette étape doit obligatoirement être couplée à la séparation dans les microchips. Les composés sous forme neutre et dilués dans une solution aqueuse sont injectés électrocinétiquement en tête du monolithe pendant un certain temps, puis ils sont ensuite élués par passage d'un mélange hydro-organique en même temps qu'ils sont séparés. L'injection d'une solution de fluoranthène en mode électrocinétique pendant cent secondes conduit à un facteur d'enrichissement de 140. Une préconcentration identique a été réalisée pour un mélange d'hydrocarbures aromatiques, sans perte d'efficacité pour la séparation des composés, comme on peut le voir sur la figure 10 [20]. Ce sont les premiers travaux montrant à la fois la préconcentration et la séparation sur des microsystèmes.

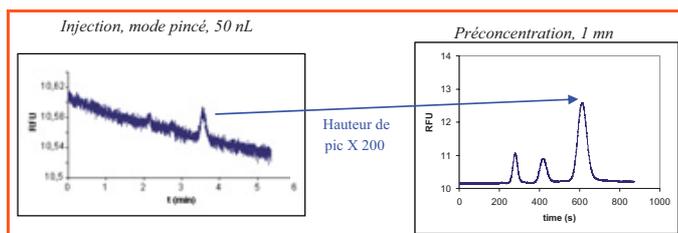


Figure 10 - Électrophérogrammes correspondant à l'injection directe d'un mélange de fluoranthène, benzo(a)anthracène et benzo(k)fluoranthène dans le microsystème via la croix d'injection (mode pincé) et après une étape de préconcentration durant une minute.

Comme le monolithe est chargé pour assurer le flux électro-osmotique, pour les composés ionisés, un mécanisme mixte combinant échange d'ions, interactions hydrophobes et phénomènes électrocinétiques est possible.

Cependant, la miniaturisation ne règle en rien le problème de la complexité des échantillons. Ainsi différents projets sont envisagés ayant pour objectif de réaliser des séparations sur microsystèmes, tout en introduisant des outils biologiques ou biomimétiques afin d'apporter de la sélectivité lors de la préconcentration, ce qui reste indispensable pour le traitement de matrices complexes.

Capteurs nanostructurés

Les capteurs sont devenus indispensables pour de nombreux aspects de notre vie avec des exemples d'applications allant de la sécurité jusqu'au domaine de la santé. Bien qu'il s'agisse d'un sujet mature qui repose sur des travaux de plusieurs décennies, l'engouement pour des recherches dans ce secteur, soit fondamentales soit appliquées, ne fait que croître comme l'illustre le graphe de la figure 11 pour les biocapteurs.

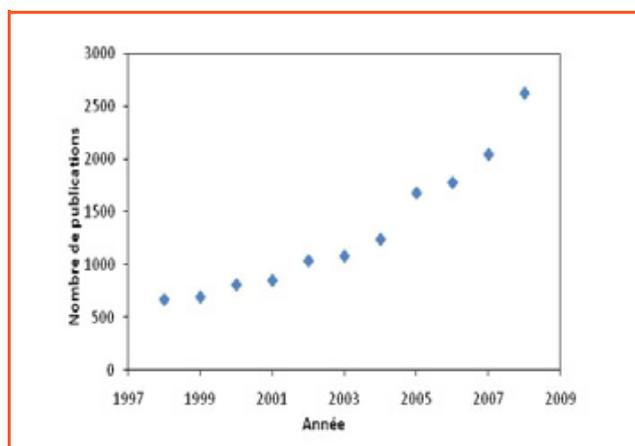


Figure 11 - Production scientifique dans le domaine des biocapteurs au cours de la dernière décennie.

La miniaturisation des systèmes analytiques répond de manière générale à des besoins multiples, comme par exemple la détection *in situ* et/ou *in vivo*, la réduction de coût, la rapidité de l'analyse et le traitement d'échantillons de très petite taille ou de très faible volume, permettant ainsi un monitoring et un contrôle de paramètres physico-chimiques et biologiques dans l'ensemble des domaines de l'activité humaine. Au-delà des demandes sociétales de plus en plus exigeantes, une préoccupation plus académique concerne particulièrement le suivi spatio-temporel d'événements biologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire, ce qui nécessite la mise au point de (bio)capteurs performants, parfois miniaturisés jusqu'aux limites imposées par la physique. Les activités de recherche dans ce dernier domaine visent à combiner les nanotechnologies, les nanomatériaux et les sciences biologiques, afin de développer des biocapteurs avec une sensibilité et une stabilité accrues, suffisamment bien adaptés pour des mesures *in situ*, rapide et en continu. Dans le cas idéal, il est souhaitable de maîtriser la structure interfaciale à plusieurs échelles afin de profiter des effets de synergie, par exemple en termes de transport de matière et de transfert d'électrons.

Structuration de la surface à différentes échelles

Les capteurs bioélectrochimiques reposent en général sur l'immobilisation d'un élément biologique (enzyme, brin d'ADN, anticorps, micro-organismes...) sur une électrode qui assure le rôle de transducteur. L'évènement de reconnaissance moléculaire est ainsi traduit en un changement de courant, de potentiel ou d'impédance. Dans le premier cas, la miniaturisation d'une électrode est inévitablement liée à une perte importante de l'intensité du signal, en l'occurrence le courant mesuré est souvent seulement de l'ordre du nano- ou picoampère. Cela entraîne un certain nombre de problèmes liés à la sensibilité et à la limite de détection que l'on peut atteindre avec un tel dispositif. Une façon de pallier à ces inconvénients consiste à compenser la perte de signal par une **structuration multi-échelle** de l'interface électrode-électrolyte. La possibilité de structurer des interfaces avec une grande précision joue un rôle de plus en plus important non seulement dans le domaine de la chimie analytique, mais aussi de manière générale dans le développement de nouvelles technologies concernant de multiples aspects de notre vie allant de la conversion d'énergie jusqu'au stockage d'information. L'ingénierie de surfaces et d'interfaces à différentes échelles de longueur, allant du moléculaire à la taille macroscopique, en faisant appel à des phénomènes d'autoassemblage et des procédés de croissance, peut être utilisée pour améliorer les performances de tels systèmes. Deux approches complémentaires bien adaptées pour atteindre ce but sont d'un côté la croissance de matériaux conducteurs ou non conducteurs à travers des structures autoorganisées, et d'un autre côté, la chimie des liaisons intermoléculaires non covalentes guidant l'assemblage de molécules vers des structures interfaciales de plus grande taille. La combinaison des deux aspects facilite l'incorporation de nanostructures dans des architectures plus complexes et permet par conséquent leur interfaçage efficace avec le monde macroscopique. Nous avons combiné les deux approches afin d'élaborer des électrodes biofonctionnalisées possédant une structure originale et bien définie à plusieurs échelles caractéristiques. La caractérisation physico-chimique approfondie nous a permis de comprendre les propriétés de ces structures multi-échelle et de valider leur utilisation en tant que biocapteur. Ces travaux sur la modification de l'interface électrode/électrolyte concernent simultanément plusieurs échelles :

L'échelle moléculaire

Pour établir une communication électrique efficace entre un élément biologique de reconnaissance moléculaire tel qu'une enzyme et une électrode, il est souvent nécessaire de faire appel à des médiateurs redox assurant un rôle de navette d'électrons. Dans ce contexte, nous avons développé depuis plusieurs années une nouvelle famille de molécules qui sont des médiateurs redox très efficaces pour l'électrooxydation du coenzyme NADH. Ceci constitue une étape clé pour établir une bonne communication électronique entre des enzymes de la famille des déshydrogénases et la surface d'une électrode. L'ingénierie moléculaire de ces médiateurs nous a permis d'adapter leur structure pour permettre leur autoassemblage sous forme de couches monomoléculaires sur différents matériaux d'électrodes, comme par exemple le carbone vitreux, le platine et l'or [21].

L'échelle supramoléculaire

En introduisant des substituants spécifiques dans la structure du médiateur et en faisant appel à des interactions

non covalentes, il est possible d'obtenir un autoassemblage du médiateur, de la coenzyme et de l'enzyme à la surface de l'électrode comprenant la totalité de la chaîne bioélectrocatalytique, ce qui rend possible l'utilisation de ces électrodes comme biocapteurs [22]. Des études approfondies par spectroscopie RMN et microbalance à quartz nous ont permis de mieux comprendre les paramètres gouvernant cet assemblage supramoléculaire.

L'échelle submicrométrique

Afin d'augmenter le rendement en termes de courant des électrodes modifiées avec la chaîne bioélectrocatalytique et d'assurer son interfaçage efficace avec le monde macroscopique, nous avons fait appel à des électrodes méso- et macroporeuses hautement organisées [23]. Un template constitué d'un cristal colloïdal de billes de latex ou de silice monodisperses est rempli par électrodéposition avec un métal pour donner naissance, après dissolution du template, à des électrodes poreuses dont la surface active augmente d'un à deux ordres de grandeurs tout en gardant la même dimension macroscopique (figure 12). Une fois cette surface interne modifiée avec la structure supramoléculaire, les courants catalytiques mesurés augmentent également jusqu'à deux ordres de grandeurs, ce qui permet une nette amélioration des performances du dispositif de mesure en termes de sensibilité et de limite de détection.

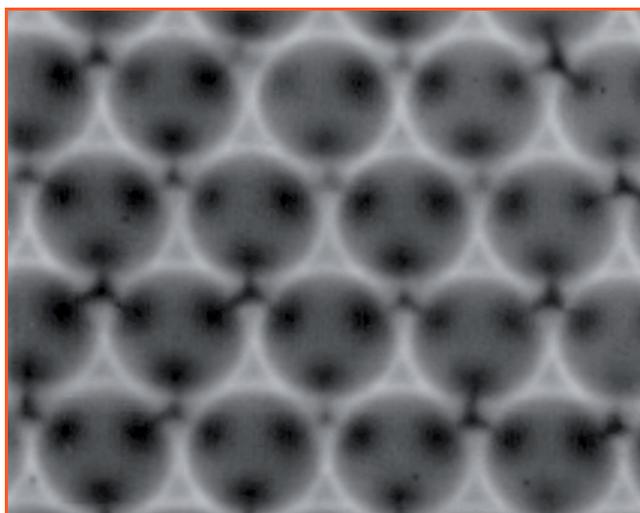


Figure 12 - Image de microscopie électronique de la surface d'une électrode poreuse obtenue par électrodéposition d'or dans une matrice constituée de billes de latex préassemblées à la surface de l'électrode. Après dissolution du template, on obtient des pores organisés d'un rayon de 200 nm avec des canaux de connections (points noirs) vers des couches inférieures.

Approche intégrée multi-échelle

Nous avons ainsi pu élaborer des microélectrodes poreuses modifiées avec la chaîne bioélectrocatalytique. Nous avons profité de la synergie entre les différentes échelles en termes de transfert de charge et de transport de matière pour amplifier les courants bioélectrocatalytiques de façon significative par rapport à des microélectrodes « classiques ». Ceci permet d'améliorer les limites de détection et la sensibilité d'un tel dispositif s'il est utilisé en tant que biocapteur miniaturisé [24], ce qui laisse envisager de multiples applications de ce concept dans le domaine de la chimie analytique [25], en particulier si on pousse la

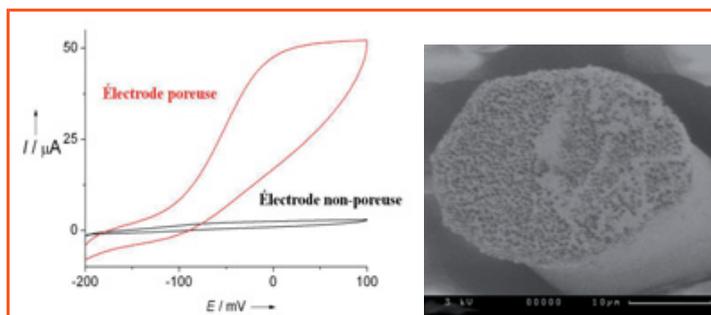


Figure 13 - Comparaison des courants bioélectrocatalytiques obtenus avec une microélectrode « classique » et une microélectrode poreuse pour la détection enzymatique du glucose (à gauche) ; image de microscopie électronique de la surface d'une microélectrode poreuse (à droite).

structuration de l'interface vers des systèmes encore plus sophistiqués [26] (figure 13).

En exploitant les possibilités offertes par les micro/nanotechnologies, la communauté analytique développe aussi de plus en plus des plates-formes fonctionnant en format réseaux qui offrent une plus grande richesse d'informations sur un espace restreint. Quelques exemples typiques sont les biopuces, les systèmes lab-on-chip et les systèmes médicaux portatifs.

Dans cet ordre d'idées, nous ne nous sommes donc pas contentés d'élaborer une microélectrode poreuse unique, mais tout un réseau organisé de microélectrodes poreuses. Nous avons mis au point une plate-forme structurée à plusieurs échelles combinant des propriétés électrochimiques et optiques remarquables [27]. Notre approche utilise comme substrat initial un faisceau ordonné de fibres optiques. À partir de ce matériau initial, un réseau de microcavités est formé par attaque chimique sélective et chaque cavité est ensuite remplie par des billes de latex (figure 14A). Comme décrit précédemment, ces billes constituent le template pour la déposition d'or. La phase suivante est la dissolution du template qui laisse une structure macroporeuse (figure 14B). Ces différentes étapes de fabrication produisent un réseau de microcavités macroporeuses qui sont adressables aussi bien optiquement qu'électrochimiquement. Les applications visées sont d'une part l'analyse optochimique par imagerie SERS (« surface-enhanced Raman scattering »), et d'autre part, l'analyse électrochimique grâce à la fonctionnalisation de tels réseaux de microcapteurs de très grandes surfaces spécifiques en utilisant les concepts décrits dans les paragraphes précédents.

Cette approche intégrée d'une structuration multi-échelle permet *in fine* d'obtenir des dispositifs analytiques

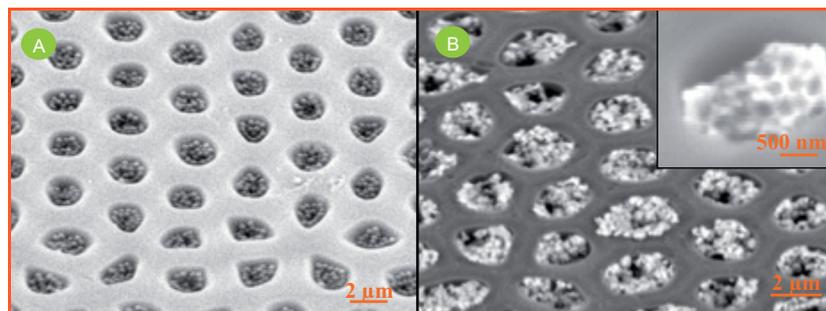


Figure 14 - Images en MEB : A) du réseau de microcavités remplies de billes de polystyrène (rayon : 140 nm) ; B) du réseau de microcavités macroporeuses. L'encart permet de visualiser les pores.

plus performants en termes de résolution spatiale, sensibilité et limite de détection.

Conclusions et perspectives

Ces divers exemples ont montré quelques aspects de la recherche actuelle en chimie analytique. Nous avons assisté à un réel essor durant cette dernière décennie, qui la relie fortement aux autres disciplines dans ses propres développements et non uniquement dans les objets analysés. Les outils biologiques sont de plus en plus employés dans la préconcentration sélective dès le traitement d'échantillons et dans les bioessais. Les capteurs et biocapteurs font de plus en plus appel aux nouveaux matériaux nanostructurés ou à des méthodes permettant par exemple une modification chimique localisée à l'échelle nanométrique de la structure des électrodes en utilisant le microscope électrochimique. La microfluidique permet de concevoir de nouveaux outils analytiques en combinant efficacement séparations des composés et bioessais divers sur une seule microchip. Le futur est certainement dans la miniaturisation, ne serait-ce que pour diminuer fortement l'emploi de solvant organique dans tout le contrôle alimentaire ou environnemental et permettre l'utilisation d'outils sélectifs qui, même s'ils sont coûteux, n'augmentent que peu le coût total de l'analyse vu la très faible quantité employée. Quelques sociétés ont d'ailleurs récemment commercialisé la nanochromatographie sur microchip.

Références

- Hennion M.-C., Pichon V., Immuno-based sample preparation for trace analysis, *J. Chrom. A*, **2003**, *1000*, p. 29.
- Pichon V., Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers, *J. Chrom. A*, **2007**, *1152*, p. 41.
- Pichon V., Chapuis-Hugon F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants: a review, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *622*, p. 48.
- Chapuis F., Pichon V., Lanza F., Sellergren B., Hennion M.-C., Retention mechanism of analytes in the solid-phase extraction process using molecularly imprinted polymers, *J. Chrom. B*, **2004**, *804*, p. 93.
- Madru B., Chapuis-Hugon F., Peyrin E., Pichon V., Determination of cocaine in human plasma by selective solid-phase extraction using an aptamer-based sorbent, *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, p. 7081.
- Bel Hadj-Kaabi F., Développement et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de composés pharmaceutiques à l'état de traces dans les fluides biologiques. Miniaturisation du format de synthèse et couplage en ligne à la nano-chromatographie, Thèse de doctorat, Paris 6, **2008**.
- Urbanek M., Varenne A., Gebauer P., Krivankova L., Gareil P., Determination of trace cationic impurities in butylmethylimidazolium-based ionic liquids: from transient to comprehensive single-capillary counter-flow isotachopheresis-zone electrophoresis, *Electrophoresis*, **2006**, *27*, p. 4859.
- Urbanek M., Delaunay N., Michel R., Varenne A., Gareil P., Analysis of sub-ppb levels of Fe(II), Co(II), and Ni(II) by electrokinetic supercharging preconcentration, CZE separation, and in-capillary derivatization, *Electrophoresis*, **2007**, *28*, p. 3767.
- Mokaddem M., Gareil P., Belgaid J.-E., Varenne A., New insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. 2: dilution effect, *Electrophoresis*, **2009**, *30*, p. 1692.
- Fermas S., Gonnet F., Varenne A., Gareil P., Daniel R., Frontal analysis capillary electrophoresis hyphenated to electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of the antithrombin/heparin pentasaccharide complex, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, p. 987.
- Mokaddem M., Gareil P., Varenne A., Online CIEF-ESI-MS in glycerol-water media with a view to hydrophobic protein applications, *Electrophoresis*, **2009**, *30*(23), p. 4040.
- La Garrigue M., Bossée A., Bégos A., Delaunay N., Varenne A., Gareil P., Bellier B., Analysis of nerve agent degradation products in high-conductivity matrices by transient isotachopheresis preconcentration and capillary zone electrophoresis separation coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, **2009**, *30*, p. 1522.
- Chausson F., Sanglier S., Leize E., Hagège A., Bridges C.R., Sarradin P.-M., Shillito B., Lallier F.H., Zal F., Respiratory adaptations to the deep-sea hydrothermal vent environment: the case of *Segonzacia mesatlantica*, a crab from the Mid-Atlantic Ridge, *Micron*, **2004**, *35*, p. 31.
- Greenwald J., Zeder-Lutz G., Hagège A., Celia H., Pattus F., The metal dependence of pyoverdine interactions with its outer membrane receptor FPVA, *J. Bacteriol.*, **2008**, *190*, p. 6548.
- Hagège A., Baldinger T., Martin-Jouet M., Zal F., Leroy M., Leize E., Van Dorselaer A., Assessment of inductively coupled plasma-mass spectrometry contribution to metalloprotein analysis: a novel approach for multiproteic complexes studies, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **2004**, *18*, p. 735.
- Chamoun J., Hagège A., Sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-inductively coupled plasma/mass spectrometry for metal/protein interactions analysis by using large volume stacking with polarity switching, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, *20*, p. 1053.
- Chamoun J., Hagège A., Contribution of hyphenated CE-ICP/MS in metal/protein interactions studies, *Radiochim. Acta*, **2005**, *93*, p. 659.
- Augustin V., Jardy A., Gareil P., Hennion M.-C., *In situ* synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: study of polymerization conditions, *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1119*, p. 80.
- Augustin V., Proczek G., Descroix S., Dugay J., Hennion M.-C., On-line preconcentration using monoliths in electrochromatography capillary format and microchip, *J. Sep. Sci.*, **2007**, *45*, p. 2858.
- Proczek G., Augustin V., Descroix S., Hennion M.-C., Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography, *Electrophoresis*, **2009**, *30*, p. 515.
- Mano N., Thienpont A., Kuhn A., Adsorption and catalytic activity of trinitrofluorenone derivatives towards NADH oxidation on different electrode materials, *Electrochem. Comm.*, **2001**, *10*, p. 585.
- Mano N., Kuhn A., Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors, *Biosensors & Bioelectronics*, **2001**, *16*, p. 45.
- Szamocki R., Reculosa S., Ravaine S., Bartlett P.N., Kuhn A., Hempelmann R., Tailored mesostructuring and biofunctionalization of gold for increased electroactivity, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, p. 1317.
- Szamocki R., Velichko A., Holzapfel C., Mücklich F., Ravaine S., Garrigue P., Sojic N., Hempelmann R., Kuhn A., Macroporous ultramicroelectrodes for improved electroanalytical measurements, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, p. 533.
- Walcarius A., Kuhn A., Ordered porous thin films in electrochemical analysis, *Trends Anal. Chem.*, **2008**, *27*, p. 593.
- Szamocki R., Masse P., Ravaine S., Ravaine V., Hempelmann R., Kuhn A., Multicomponent macroporous materials with a controlled architecture, *J. Mater. Chem.*, **2009**, *19*, p. 409.
- Zamuner M., Talaga D., Deiss F., Guieu V., Kuhn A., Ugo P., Sojic N., Fabrication of a macroporous microwell array for surface-enhanced Raman scattering, *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, *19*, p. 3129.



Marie-Claire Hennion (coordinatrice) est professeur en sciences analytiques et directrice du Laboratoire Environnement et Chimie Analytique et **Valérie Pichon** maître de conférences à l'ESPCI ParisTech¹.

Pierre Gareil est professeur à Chimie ParisTech².

M.-C. Hennion Agnès Hagège était chargée de recherche CNRS à l'ECPM Strasbourg³. Elle vient de rejoindre le CEA de Marcoule.

Alexander Kuhn est professeur à l'ENSCBP Bordeaux⁴ et responsable du groupe Nanosystèmes Analytiques de l'Institut des Sciences Moléculaires.

¹ ESPCI ParisTech, Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, UMR 7195, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris.

Courriel : marie-claire.hennion@espci.fr

² Chimie ParisTech, Groupe Séparations Électrocinétiques, UMR 7195, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris.

³ ECPM Strasbourg, IPHC, Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences Séparatives, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2.

⁴ ENSCBP Bordeaux, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex.