



Développement d'un laboratoire sur puce pour la préconcentration sur support monolithique. Application à l'enrichissement et la séparation en ligne de phosphopeptides.

Monica Araya-Farias

► To cite this version:

Monica Araya-Farias. Développement d'un laboratoire sur puce pour la préconcentration sur support monolithique. Application à l'enrichissement et la séparation en ligne de phosphopeptides.. Chimie analytique. Université Paris-Saclay, 2016. Français. <NNT : 2016SACLS060>. <tel-01314427>

HAL Id: tel-01314427

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01314427>

Submitted on 11 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLS060

UNIVERSITE PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE 2MIB
Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes

Discipline : Chimie

Proteins and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS)
Institut Galien Paris-Sud – UMR 8612 CNRS
Faculté de Pharmacie

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 22 Mars 2016

par

Monica Araya-Farias

Développement d'un laboratoire sur puce pour la
préconcentration sur support monolithique. Application à
l'enrichissement et la séparation de phosphopeptides

Composition du jury :

Mme Thuy Tran-Maignan	Maître de Conférences à l'Université Paris-Sud	Directeur de Thèse
Mme Stéphanie Descroix	Chargé de Recherche CNRS à l'Institut Curie UPMC	Rapporteur
Mme Karine Faure	Chargé de Recherche CNRS à l'Université de Lyon 1	Rapporteur
M Bruno Baudin	Professeur à l'Université Paris-Sud	Président
Mme Myriam Taverna	Professeur à l'Université Paris-Sud	Examinateur
M Benjamin Carbonnier	Professeur à l'Université Paris-Est Créteil	Examinateur

RESUME

Les laboratoires sur puce sont des dispositifs miniaturisés qui offrent la possibilité d'intégrer en ligne toutes les étapes de la chaîne analytique tout en réduisant les volumes d'échantillon et les temps d'analyse. Ainsi, ils constituent potentiellement un outil de diagnostic particulièrement adapté pour l'analyse de biomarqueurs phosphorylés, pour lesquels une préconcentration est nécessaire en raison de leur faible abondance dans les fluides biologiques. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes, dédiées à l'enrichissement de phosphopeptides, ont été développées ces dernières années et en particulier celles utilisant des supports solides basées sur la chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (IMAC). Parmi les supports solides intégrables en microsysteme, les monolithes organiques constituent une option privilégiée grâce à la possibilité d'être synthétisés in situ. Le but de ce travail de thèse était donc de développer un laboratoire sur puce intégrant une préconcentration des phosphopeptides sur support monolithique basé sur le principe de l'IMAC et leur séparation électrophorétique en ligne.

Dans un premier temps, nous avons développé deux approches innovantes qui ont permis de synthétiser pour la première fois un monolithe à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et de bisacrylamide (BAA) par voie photochimique dans des microsystemes. La première stratégie développée dans des puces en verre repose sur la synthèse du monolithe à l'aide d'un microscope à épifluorescence. La deuxième approche est basée sur les propriétés photochimiques d'un nouvel amorceur qui a permis de synthétiser et d'ancrer le monolithe, en une seule étape, aux parois des puces en polydiméthylsiloxane (PDMS) sans étape de prétraitement de surface. Une caractérisation de ce monolithe en termes de morphologie, de perméabilité, de porosité et de surface spécifique a ensuite été réalisée. Ceci a permis de démontrer le potentiel de ce monolithe pour la préconcentration.

Dans un deuxième temps, une méthode de séparation par électrophorèse de zone couplée à une détection par fluorescence a été développée sur puce en verre. Celle-ci a permis de séparer un mélange de phosphopeptides modèles fluorescents ne différant que par leur site ou degré de phosphorylation. Les phosphopeptides ont été détectés en moins de 2 min avec une excellente résolution (>3) et une bonne efficacité (275000 à 625000 pL/m). Enfin, le couplage en ligne des modules de préconcentration monolithique (basée sur l'IMAC-Zr⁴⁺) et de séparation/détection a été réalisé. L'efficacité de la capture et de l'élution des phosphopeptides a été démontrée et des facteurs de préconcentration supérieurs à 340 ont été obtenus. En conclusion, ce laboratoire sur puce ouvre des perspectives très prometteuses dans le domaine du diagnostic de pathologies dont le processus physiopathologique implique des modifications de la phosphorylation des peptides.

Mots clés : laboratoire sur puce, microsysteme, phosphopeptide, IMAC, monolithe, photopolymérisation, préconcentration, électrophorèse de zone sur puce

SUMMARY

A lab on-a-chip is a miniaturized device that integrates onto a single chip different analytical steps (preconcentration, separation, detection...) with minimal sample consumption and short analysis time. They are potentially beneficial in phosphorylated biomarker analysis for which a preconcentration step is necessary because of their low abundance in biological fluids. That's why selective enrichment methods of phosphopeptides have been developed in recent years in particular those based on solid supports like Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Among the solid supports, organic polymer monoliths present practical advantages when used in microchips due to their ease of preparation and *in situ* photopolymerization. The aim of this work was to develop a lab-on-a-chip integrating a monolithic support for online IMAC-based preconcentration and electrophoretic separation of phosphopeptides.

In the first part, we developed two innovative approaches which allowed us to synthesize, for the first time, an ethylene glycol methacrylate phosphate-co-bisacrylamide (poly (EGMP-co-BAA)) monolith by a photo-driven process in microsystems. The first monolith synthesis approach was developed in glass microchannels using an inverted epifluorescence microscope as UV-irradiation source. The second approach was based on the photochemical properties of a new initiator which allowed the simultaneous synthesis and anchorage of the monolith in native polydimethylsiloxane (PDMS) microchips. A characterization (morphology, permeability, porosity and specific surface area) of (poly (EGMP-co-BAA)) monolith was then performed which demonstrated the potential of this monolith for preconcentration.

Then, a zone electrophoresis method coupled to a detection by fluorescence was developed glass microchip to separate a mixture of model fluorescent labelled phosphopeptides differing only by their phosphorylation degree or site. The phosphopeptides were detected in less than 2 min with excellent resolution (> 3) and good efficiencies ranging from 275000 to 625000 pL/m. Finally, an integrated microdevice was developed by combining online IMAC-Zr⁴⁺-based preconcentration and separation/detection of phosphopeptides. The performance of this integrated microdevice to capture and to elute the phosphopeptides was demonstrated and signal enhancement factors higher than 340 were obtained. This lab-on-a-chip device opens new perspectives for phosphoproteomic applications and disease diagnostics where the pathophysiological process involves modifications of peptide phosphorylation.

Keywords : lab on-a-chip, microsystem, phosphopeptide, IMAC, monolith, photopolymerization, preconcentration, microchip electrophoresis

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer toute ma gratitude aux personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse de doctorat. J'exprime avant mes remerciements les plus profonds à ma directrice de thèse, Mme Thuy Tran, pour m'avoir accueilli comme étudiante et pour la confiance qu'elle m'a accordée. Sa disponibilité n'a d'égal que son dévouement et sa rigueur scientifique. Je la remercie pour sa gentillesse et son soutien tout au long de mon travail tant sur le plan scientifique qu'humain.

Je tiens à manifester toute ma reconnaissance à Mme Myriam Taverna, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son laboratoire. Merci pour votre écoute, appui et bienveillance, et pour m'avoir fait découvrir le monde de la chimie analytique et de la microfluidique. Je remercie également M. Elias Fattal pour son accueil au sein de l'Institut Galien-Paris-Sud.

Mes sincères remerciements vont à Mme Karine Faure et au Mme Stéphanie Descroix pour avoir accepté de rapporter cette thèse. Je remercie également M. Benjamin Carbonnier, M. Bruno Baudin ainsi que Mme Myriam Taverna pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je remercie le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) pour ma bourse d'études ainsi que l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour leur financement.

Je remercie aussi toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasions de travailler : Marion Woytasik, Ha H. Cao, Fabien Bayle, Magdalena Couty, Emile Martincic et David Bouville de l'Institut d'Electronique Fondamentale à Orsay ainsi que Mohamed Guerrouache et Benjamin Carbonnier de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est à Thiais. Merci à tous pour votre collaboration et assistance qui m'ont été d'une aide indispensable pour la réalisation de mon projet.

Merci également à Szymon Dziomba qui par le biais de son stage post-doctoral a fortement contribué à ce travail durant les derniers mois de ma thèse et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler. J'aimerais également remercier Ichraf Ayed pour son aide tout au début de ma thèse.

Je tiens également à remercier très chaleureusement tous les membres de l'équipe de Protein and Nanotechnology in Analytical Science de l'Institut Galien Paris-Sud. Merci à Claire Smadja pour ses encouragements, sa bonne humeur et son service de 'covoiturage' après le boulot. Merci à Isabelle Le Poitier pour son écoute et sa préoccupation lors des moments difficiles pendant mon travail de thèse. Merci à Marie-Claude Anmela pour ses merveilleux gâteaux et aide dans les démarches administratives ainsi que les autres membres administratifs de l'Institut Galien Paris-Sud : Sylvie, Patricia et Dominique. J'aimerais également remercier Antoine Pallandre pour ses précieux conseils et discussions scientifiques.

Un merci très chaleureux à mes camarades de bureau avec qui j'ai partagé mon quotidien lors de ces trois dernières années : Jeanne, Yasmine, Emmanuel, Duc, Anne-Lise, Dimitri, Kiarach, Sonia, Ly, Ludivine, Dimitri, Romain, Corentin, Coralie, Cédric. Merci à tous pour votre agréable compagnie, gentillesse et tous les bons moments partagés. Je tiens à

remercier tout particulièrement Nacéra pour qui j'ai une grande affection. Merci 'ma belle' pour ton amitié, ton soutien, tes petits gâteaux en fin de journée et pour m'avoir utilisé comme cobaye pour tes 'expériences culinaires' Je garderai un précieux souvenir de mon doctorat grâce à vous tous.

Je remercie Cristina Ratti, Laurent Bazinet et Diane Gagnon de l'Université Laval au Québec pour leur soutien et leurs encouragements et à toute ma gang du Canada/France : Rocio, Flor, Maria Elena, Alejandra, Cécile, Ali, Sergey, Shyam, Elodie, Fatou, Felipe, Catherine, Raquel, Hélène, Loubna et Nicolas. Un merci spécial à Laurianne Bazinet pour ses jolies lettres et dessins qui m'ont apporté de la joie et du bonheur.

Enfin, j'aimerais remercier à mes grands amis qui depuis des années m'accompagnent, me font confiance et ne manquent jamais de m'aider : Louis Perreault, 'Susanita' Pagé, Lorena Martinez, Claudia Jorquera, Maritza Brito, Marisol Figueroa, Maria Bustos, Erica Carevic, Eric Husson et Erick Ayala. A ma famille, spécialement à mes parents et mes frères, la famille Perreault, ma tante Julia, ma cousine Carolina et à mon chéri du fond du cœur pour leur soutien, leurs encouragements et leur présence réconfortante dans les moments de doute.

A tous sincèrement... *GRACIAS*

*A ma mère
avec tout mon amour*

Abréviations

μTAS	Micro total analysis system
AA	Acrylamide
ACA	Acide Acrylique
ACN	Acétonitrile
AD	Alzheimer disease
ADN	Acide désoxy ribonucléique
AIBN	2,2'Azobisisobutyronitrile
ALS	Amyotrophic lateral sclerosis
ATP	Adénosine triphosphate
BAA	Bisacrylamide
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BSA	Albumine de sérum bovin
CFJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
CMAsp	Carboxyméthylaspartate
COC	Cyclic olefin copolymer
CZE	Capillary zone electrophoresis
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DLB	Démence à Corps de Lewy
DMA	Diméthyle acrylamide
DMF	Diméthylformamide
DMPA	2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EC	Electrophorèse capillaire
EDMA	Ethylène diméthacrylate
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EGDMA	Ethylène glycol diméthacrylate
EGMP	Ethylène glycol méthacrylate phosphate
ERK (1 /2)	Extracellular signal regulated kinases
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray
FES	Facteur d'Enrichissement en signal
GMA	Glycidylméthacrylate
HEA	2-hydroxy éthyleacrylate
HILIC	Chromatographie d'interactions hydrophiles
HSAB	Hard and soft acids bases
IDA	Iminodiacétate
IMAC	Chromatographie d'affinité sur des métaux immobilisés
IRG	2-méthyle-4'-(méthylthio)-2-morpholino-propiofenone
JNK/SAPK	Stress-activated protein kinase
LB	Corps de Lewy
LC	Chromatographie Liquide
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LOD	Limite de Détection
LOQ	Limite de Quantification
MA	Maladie D'Alzheimer
MAA	Acide méthacrylique

MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MAPKs	Mitogen activated protein kinase
MAPS	3-(trimethoxysilyl) propyl méthacrylate
MEK	Mitogen extracellullar kinase
MIP	Mercury intrusion porosimetry
MOAC	Metal Oxide Affinity Chromatography
MS	Spectrométrie de Masse
MSA	Atrophie multi systémique
NaOH	Hydroxyde Sodium
NP	Peptide non phosphorylé
NTA	Nitrilotriacétate
p	Groupement phosphate
PD	Maladie de Parkinson
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène Glycol
pI	Point isoélectrique
PMMA	Polymetacrylate de méthyle
PSA	Antigène prostatique spécifique
ERLIC	Chromatographie de répulsion électrostatique-interactions-hydrophiles
RNA	Acide Ribonucléique
SAX	Chromatographie d'Exchange d'anions
SCX	Chromatographie d'Exchange de cations
SEF	Signal enrichment factor
SEM	Scanning electron microscopy
SIMAC	Sequential elutim from IMAC
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SM	Spectrométrie de masse
SPE	Extraction sur phase solide
TFA	Acide Triflouracétique
THV	Tétrafluoroéthylène hexafluoropropylène fluorure de vinylidène
UV	Ultraviolet

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	3
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. PRECONCENTRATION DE PHOSPHOPEPTIDES	8
1.1. Généralités : Phosphorylation des protéines	8
1.1.1 Rôle des protéines ERK dans les pathologies humaines	10
1.1.2 Les biomarqueurs protéiques phosphorylés des maladies neurodégénératives	12
1.2. Stratégies d'enrichissement de phosphopeptides	14
1.2.1. Les méthodes d'affinité	14
1.2.1.1 La chromatographie d'immunoaffinité	14
1.2.1.2 La chromatographie de type IMAC	15
1.2.1.2.1 Principe de l'IMAC	15
1.2.1.2.2 Les ligands-chélateurs et les supports solides	17
1.2.1.2.3 Procédure IMAC : spécificité et sélectivité	21
1.2.1.3 La chromatographie d'affinité de type MOAC	22
1.2.1.4 Méthodes d'affinité alternatives	26
1.2.2 Autres méthodes chromatographiques	26
1.2.3 Les modifications chimiques	28
1.3 Conclusion	29
2. PRECONCENTRATION DE PROTEINES ET PEPTIDES SUR SUPPORT SOLIDE EN MICROSYSTEME	31
2.1 Introduction	31
2.2 Publication : Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices : A review	33
2.3 Conclusion	81
3. SYNTHÈSE DE MONOLITHES ORGANIQUES EN MICROSYSTEME	82
3.1 Introduction	82
3.2. Polymérisation radicalaire en chaîne sous irradiation UV	83
3.2.1 L'amorçage	83
3.2.1.1 Mécanisme de Type I : Processus de rupture homolytique	85
3.2.1.2 Mécanisme de Type II : Processus d'abstraction d'hydrogène	87
3.2.1.3 Cinétique de l'amorçage	88
3.2.2 La Propagation	89
3.2.3 La Terminaison	90
3.3 Vitesse globale de polymérisation radicalaire en chaîne	91
3.3.1 Vitesse et facteurs qui influencent la photopolymérisation	92
3.4 Méthodes d'ancrage de monolithe en microsystèmes	94
3.4.1 Traitement des canaux en verre	94
3.4.2 Traitement des canaux en PDMS	95
3.5 Conclusion	98
REFERENCES	100

PARTIE EXPERIMENTALE	110
INTRODUCTION	111
CHAPITRE 1. SYNTHÈSE PAR VOIE PHOTOCHEMIQUE D'UN MONOLITHE A BASE D'ETHYLENE METHACRYLATE PHOSPHATE (EGMP) EN MICROSYSTEME	113
1.1 Introduction	113
1.2 Short Communicate : Microscope-assisted UV-induced synthesis of well-defined phosphate monolithic plugs in glass chips for peptide preconcentration	115
1.3 Publication : A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips	133
1.4 Conclusion	159
2. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE SEPARATION DE PHOSHOPEPTIDES PAR ELECTROPHORESE SUR PUCE EN VERRE	161
2.1 Introduction	161
2.2 Quelques notions générales sur les microsystèmes séparatifs	162
2.3. Matériels et Instrumentation	165
2.3.1 Matériels	165
2.3.2 Instrumentation	167
2.4. Méthodes	168
2.4.1 Traitement de surface des canaux en verre	168
2.4.2 Séparation des phosphopeptides par électrophorèse sur puce	168
2.5. Résultats et Discussions	169
2.5.1 Optimisation des conditions d'analyse	169
2.6 Conclusion	174
3. DEVELOPPEMENT D'UN LABORATOIRE SUR PUCE EN VERRE : PRECONCENTRATION DE TYPE IMAC SUR SUPPORT MONOLITHIQUE ET SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DE PHOSHOPEPTIDES	175
3.1 Introduction	175
3.2 Publication : Lab-on-a-chip for polymer monolith-based preconcentration and separation of phosphopeptides	178
3.3 Conclusion	203
REFERENCES	204
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	206
ANNEXE : PRODUCTION SCIENTIFIQUE	209

Introduction Générale

Ces dernières années, les besoins dans le domaine de la chimie analytique ont créé, une tendance assez générale à aller vers la miniaturisation des méthodes d'analyse. Cette évolution vers la miniaturisation a conduit, au début des années 90, à l'apparition du concept de laboratoire sur puce (Lab-on-a-chip) [1]. Il s'agit de dispositifs miniaturisés intégrant les différents modules analytiques (préparation, séparation, détection...) sur une même puce. La miniaturisation et la parallélisation des étapes de l'analyse, communément effectuées en laboratoire, présentent de nombreux avantages comme la réduction des coûts et du temps des analyses, la faible consommation d'échantillon et de réactifs ainsi que la faible quantité de rejets. L'émergence des laboratoires sur puce repose principalement sur la microfluidique qui permet la fabrication de microcanaux de quelques micromètres permettant la manipulation de liquides et d'échantillons à de très faibles volumes ce qui présente un intérêt majeur pour l'analyse d'échantillons biologiques. A ces avantages s'ajoute aussi la possibilité d'amener des fonctionnalités nouvelles au sein des microsystèmes, où les événements sont pilotés par des lois physiques parfois différentes de celles du monde "macroscopique". La majorité des applications des laboratoires sur puce relève du domaine de la biologie, notamment, pour l'analyse de molécules et macromolécules biologiques tels que l'ADN, RNA, les anticorps, les protéines et les peptides mais aussi pour l'analyse des cellules ou de bactéries. Les laboratoires sur puce présentent un grand potentiel pour le diagnostic de maladies et beaucoup d'applications ont aussi été déjà explorées [2].

La détection ou quantification de composés cibles ou de biomarqueurs de pathologies dans des échantillons biologiques complexes nécessite la plupart du temps une étape d'extraction sélective ou d'enrichissement suivie ensuite des étapes propres à l'analyse (séparation, détection de ces composés, réactions chimiques ou biologiques). Les microsystèmes représentent une alternative intéressante grâce à la possibilité d'intégrer en ligne toutes les étapes de l'analyse, tout en réduisant les volumes morts et l'intervention des manipulateurs. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines jouant un rôle important dans plusieurs processus cellulaires. Ainsi, certains cancers ou

maladies neurodégénératives seraient associés à une phosphorylation anormale de protéines [3]. Certaines phosphoprotéines ont déjà été identifiées comme biomarqueurs potentiels des maladies neurodégénératives telles que la protéine Tau pour la maladie d'Alzheimer [4], ou tout récemment, la protéine α -synucléine pour la maladie de Parkinson et proposée comme cible thérapeutique [5]. Pour développer un diagnostic basé sur l'analyse de ces biomarqueurs phosphorylés souvent présent à faible concentration dans les milieux biologiques et qui peuvent par ailleurs présenter une certaine hétérogénéité de phosphorylation, le développement de méthodes innovantes est essentiel pour atteindre des sensibilités de détection suffisantes.

Les méthodes d'enrichissement/préconcentration applicables en microsystèmes relèvent de deux principales catégories : celles qui utilisent des supports solides (monolithes organiques ou à base de silice, membranes, billes...) et celles qui reposent sur des techniques électrocinétiques de préconcentration (amplification par gradient de champ, isotachophorèse...). La chromatographie d'affinité sur des métaux immobilisés (IMAC), est une stratégie de préconcentration sur phase solide de phosphopeptides largement utilisée mais très peu développée en microsystèmes [6]. A présent, seulement deux publications ont porté sur ce sujet [7, 8]. Parmi les phases stationnaires existantes, les monolithes organiques qui sont des structures polymériques et poreuses, ont montré un grand potentiel pour le traitement d'échantillons complexes de par leur grande surface spécifique et leur porosité contrôlée [9]. Ils sont classiquement obtenus par polymérisation radicalaire initiée par voie thermique ou photochimique, nonobstant l'initiation par voie photochimique est la plus simple pour obtenir une phase solide monolithique dans un microcanal. Cependant, malgré ces avantages les monolithes organiques ont été peu exploités pour la préconcentration de protéines en microsystème et encore moins pour la préconcentration de phosphopeptides. Effectivement la première publication portant sur ce sujet est apparue en 2011 [8]. Par la suite, un deuxième travail a été réalisé au sein de notre équipe en 2012 lors de la thèse d'Ichraf Ayed.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse porte sur le développement d'un laboratoire sur puce intégrant un module de préconcentration par IMAC de phosphopeptides sur une phase monolithique en amont d'un module de séparation par électrophorèse de zone. Les travaux présentés ici portent principalement sur le développement des modules de préconcentration et de séparation et sur leur couplage en ligne. La première partie de ce manuscrit comporte

une étude bibliographique où nous présentons d'abord l'état de l'art sur la préconcentration de phosphopeptides en exposant quelques notions générales sur la phosphorylation des protéines et les biomarqueurs phosphorylés ainsi qu'une description détaillée des différentes stratégies de préconcentration des phosphopeptides. Ensuite, nous proposons une revue qui fait l'objet du deuxième chapitre bibliographique intitulée « *Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices : A review* » qui sera soumise au journal *Analytica Chimica Acta*. Elle porte sur les dernières avancées des méthodes de préconcentration des protéines et peptides sur support solide en microsystème, en regroupant les travaux réalisés entre 2005 et 2015. Elle a été rédigée en collaboration avec les membres de notre équipe et des chercheurs de l'ICMPE à Thiais. Enfin, le dernier chapitre bibliographique est consacré à un état de l'art sur la synthèse et l'utilisation de monolithes organiques en microsystèmes en insistant particulièrement sur leur mode de synthèse par voie photochimique qui est la voie qui a été retenue pour les travaux de thèse.

La deuxième partie de ce manuscrit comporte 3 chapitres décrivant le travail expérimental réalisé dans le cadre de cette thèse. Le chapitre 1 est dédié à la mise au point de la synthèse par voie photochimique du monolithe à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et bisacrylamide (BAA) en microsystème en verre et en polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce monolithe a été déjà synthétisé par Dong et al. [10] mais uniquement par voie thermique et en format capillaire. Ce monolithe est en effet destiné à être utilisé comme support de préconcentration de phosphopeptides par IMAC grâce à la présence des groupements phosphate en surface. Dans une première partie du chapitre, la synthèse d'un monolithe avec des bords bien définis dans des canaux en verre à l'aide d'un microscope à épifluorescence est présentée. Ce travail a fait l'objet d'une publication sous forme de 'short communication' intitulée « *Microscope-assisted UV-induced synthesis of well-defined phosphate monolithic plugs in glass chips for peptide preconcentration* » qui sera soumise au journal *Analytica Chimica Acta*. L'effet du grossissement de l'objectif sur la longueur du monolithe formé est discuté. Le rôle important d'inhibiteurs de la polymérisation tels que l'hydroquinone est également détaillé. Dans la deuxième partie de ce chapitre, une nouvelle stratégie de synthèse et d'ancrage du monolithe à base d'EGMP dans des microsystèmes en PDMS est développée. Ce procédé se réalise en une seule étape grâce aux propriétés photochimiques de d'un nouvel amorceur permettant d'ancrer le monolithe aux parois de la puce en PDMS. Cette approche innovante ainsi que le

photoamorceur utilisé qui n'avait encore jamais été utilisé pour la synthèse de monolithe organique ont permis la publication en 2015 d'un article intitulé : « *A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips* » dans le journal *Polymer* (Vol 66, pp : 249-258).

Le chapitre 2 est consacré au développement d'une méthode de séparation électrocinétique de phosphopeptides sur puce en verre pour l'intégrer au sein d'un microsystème afin d'aboutir à la conception d'un laboratoire sur puce. Après un rappel des microsystèmes séparatifs, nous détaillons ensuite la méthode de séparation qui a été développée pour permettre des séparations hautement résolutive d'un mélange de phosphopeptides fluorescents modèles possédant différents sites et degrés de phosphorylation. Ces phosphopeptides correspondent à un fragment de la protéine ERK2 qui est une kinase impliquée dans les processus de phosphorylation et parfois décrite comme un biomarqueur potentiel de maladie d'Alzheimer.

Enfin, le dernier chapitre décrit le laboratoire sur puce qui a été développé en intégrant l'étape d'enrichissement en ligne de phosphopeptides suivi de leur séparation électrocinétique et d'une détection par fluorescence. La détermination du temps de chargement et d'éluion des échantillons est aussi présentée. Pour finir, à travers l'obtention du facteur d'enrichissement en signal des phosphopeptides testés, les performances en termes d'enrichissement du monolithe à base d'EGMP sont démontrées. Ce travail est présenté sous la forme d'un article en cours de préparation. Ce dispositif contribuera dans l'avenir au développement d'un microsystème d'analyse totale pour les biomarqueurs phosphorylés des maladies neurodégénératives.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui présente également les avenues envisageables pour pousser plus loin et améliorer les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse.

- [1] Manz, A. et al. 1990. *Sensors and Actuators*, 1, 244-248.
- [2] Vieillard, J et al. 2005. *Archives INRA*. 1-7.
- [3] Hanger M. et al. 2009. *Trends Mol. Med.* Vol (15), 3, 112-119.
- [4] Wiltfang, P. 2005, *J. Biol. Psychiatry*, 6, 69-84.
- [5] Xu, Y. et al., 2015. *J. Neurochem*, 135, 1, 4-18.
- [6] Thingholm, T. et al. 2009. *Meth. Prot.*, 527, 67-78.
- [7] Yue, Y. et al. 2006. *Anal. Chim. Acta*, 564, 116-122.
- [8] Namera, M. et al. 2011. *J Sep. Sci.*, 34, 901-924.
- [9] Wang, Z. et al. 2011. *J. Sep. Sci.*, 34, 2113-2121.
- [10] Dong, J. et al. 2007. *J. Sep. Sc.*, 30, 2917-2923.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PRECONCENTRATION DE PHOSPHOPEPTIDES

Dans ce premier chapitre bibliographique, nous traitons de la préconcentration de phosphopeptides. Nous présentons dans un premier temps les notions générales sur la phosphorylation de protéines et les différentes kinases impliquées dans cette réaction, et plus particulièrement les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPKs, acronyme de l'anglais Mitogen Activated Protein Kinase) impliquées dans différentes maladies neurodégénératives et cancers. Nous présentons ensuite des exemples de biomarqueurs phosphorylés potentiels de plusieurs maladies neurodégénératives. Enfin, nous détaillons les différentes stratégies de préconcentration de phosphoprotéines et de phosphopeptides dans des échantillons complexes.

1.1. Généralités : Phosphorylation des protéines

La phosphorylation est une des modifications post-traductionnelles (MPTs) les plus répandues, 30% à 50% des protéines eucaryotes possédant un ou plusieurs sites de phosphorylation [1–3]. La phosphorylation est un événement majeur intervenant dans plusieurs processus cellulaires tels que la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation, la signalisation intracellulaire ainsi que l'apoptose [4].

La phosphorylation fait intervenir des protéines kinases qui catalysent l'addition d'un groupement phosphate (PO_3^{-2}) provenant de l'adénosine triphosphate (ATP) sur un acide aminé d'une protéine [5]. Ce phénomène est réversible et la déphosphorylation des protéines est catalysée par les protéines phosphatases. Les protéines peuvent être phosphorylées au niveau de neuf acides aminés. Il existe quatre types de phosphorylation [6,7]:

- La O-phosphorylation du groupement hydroxyle de trois acides aminés hydroxylés (sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) par la formation d'une liaison O-P). Ce type de phosphorylation avec un rapport d'abondance de pS/pT/pY de 1800/200/1 est l'une des formes les plus abondantes dans les cellules eucaryotes [3,8].
- La N-phosphorylation de la fonction amine des résidus histidine, arginine ou lysine.
- L'Acylphosphorylation des résidus acide aspartique ou acide glutamique.
- La S-phosphorylation des cystéines.

Ces trois derniers types de phosphorylation sont également présents chez d'autres organismes, en particulier les cellules procaryotes bien que de façon moins abondante [7].

Les kinases et les phosphatases, constituent environ 2% du génome humain [4,9,10]. Les kinases sont classifiées en trois groupes selon le résidu acide aminé ciblé. Le groupe des sérine/thréonine kinases, le plus important par son abondance (67%), est constitué de MAPKs. Les trois MAPKs les plus étudiées sont les kinases régulées par un signal extracellulaire (ERK, acronyme de l'anglais extracellular signal regulated kinases) dont ERK1 et ERK2 (ou ERK1/2), la kinase du N-terminal de c-Jun/protéine kinase (JNK/SAPK) et la kinase p38 [11,12]. Les deux autres groupes sont constitués de tyrosine kinases (récepteurs tyrosine kinases et tyrosine kinases cytoplasmiques) représentant 17%, et de tyrosine kinases-like et de kinases atypiques (dont les lipides kinases) représentant 16% [13].

Les MAPKs jouent un rôle crucial dans la régulation des voies de signalisation en permettant une activation rapide d'un programme d'expression génique en réponse aux stimuli extracellulaires tels que les facteurs de croissance, le stress oxydatif (thermique et osmotique) et les cytokines inflammatoires [12]. Ces voies de signalisation sont constituées de protéines kinases qui s'activent en cascade par un mécanisme complexe impliquant à la fois la phosphorylation et la déphosphorylation. Le signal est transmis par une suite d'interactions entre protéines. La voie typique ou modèle de signalisation des MAPKs est composée de 3 protéines kinases : la MAPK kinase kinase (MAP3K) activée par la MAP4K (ou l'enzyme GTPase) en réponse à un stimuli, phosphoryle la MAPK kinase (MAP2K) qui phosphoryle à son tour la MAPK (Fig.1A). Par exemple, la très importante voie de signalisation Raf/MAPK/ERK est activée en réponse aux facteurs de croissance. L'information est transmise à la protéine Ras (GTPase) *via* les récepteurs tyrosine kinases (RTK). Ras active la protéine Raf à la membrane qui phosphoryle la protéine kinase MEK,

qui active à son tour de manière hautement spécifique ERK par une double phosphorylation [12,14]. Les protéines kinases ERK vont transmettre le signal généré par les récepteurs en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments subcellulaires, ce qui conduit à l'exécution de fonctions biologiques aussi diverses que la prolifération, la différenciation ou la migration cellulaire [11,15] (Fig.1B). La voie de signalisation des ERK est aussi impliquée dans le contrôle de la mort cellulaire [11]. Ces kinases sont aussi essentielles pour le développement normal et la plasticité du système nerveux central [11,16]. Les MAPKs sont donc régulées par une multitude de signaux et régulent elles-mêmes plusieurs mécanismes cellulaires, ce qui montre la complexité du processus de phosphorylation.

1.1.1 Rôle des protéines ERK dans les pathologies humaines

Une phosphorylation anormale des protéines peut être associée à différentes pathologies. En effet, une perturbation des voies de signalisation peut survenir à travers un certain nombre de mécanismes tels que des mutations ou expressions dérégulées des kinases ou phosphatases qui se traduisent par une augmentation ou une diminution de l'activité enzymatique, ce qui peut entraîner de graves dommages des cellules et conduire à des pathologies [1,17].

Comme mentionné précédemment, les protéines kinases ERK sont au cœur d'une voie de signalisation importante régulant elles-mêmes divers mécanismes cellulaires. Des études ont montré qu'une dérégulation de l'activité de ces kinases serait impliquée dans le développement de différentes maladies neurodégénératives. En effet, une accumulation anormale des ERK1/2 phosphorylées a été observée dans les neurones de la 'substance noire' des cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson ou à Corps de Lewis [18,19]. Dans une étude plus récente, une augmentation significative de la concentration des ERK1/2 a été observée dans le liquide céphalo-rachidien des patients Alzheimer en comparaison à des sujets sains. Les auteurs ont observé que seule une petite fraction de ERK1/2 se trouvait sous sa forme diphosphorylée (forme totalement active des ERK) [20]. Par ailleurs, les mutations de la protéine Ras ont été observées dans 20% à 30 % des cancers (du pancréas, du côlon, du poumon, de la thyroïde...) [21]. Elles sont à l'origine de la suractivation de la voie Raf/MEK/ERK et donc d'une possible hyperphosphorylation des protéines ERK. La corrélation entre le degré de phosphorylation des ERK et la cause des cancers n'a cependant pas été concluant. Des études ont montré une relation directe entre

l'accumulation des ERK phosphorylées dans le noyau de la cellule et la progression de la tumeur cancéreuse [22]. En revanche, d'autres études ont mis en évidence le rôle protecteur des ERK qui déclenchent un processus de suppression des tumeurs cancéreuses [23].

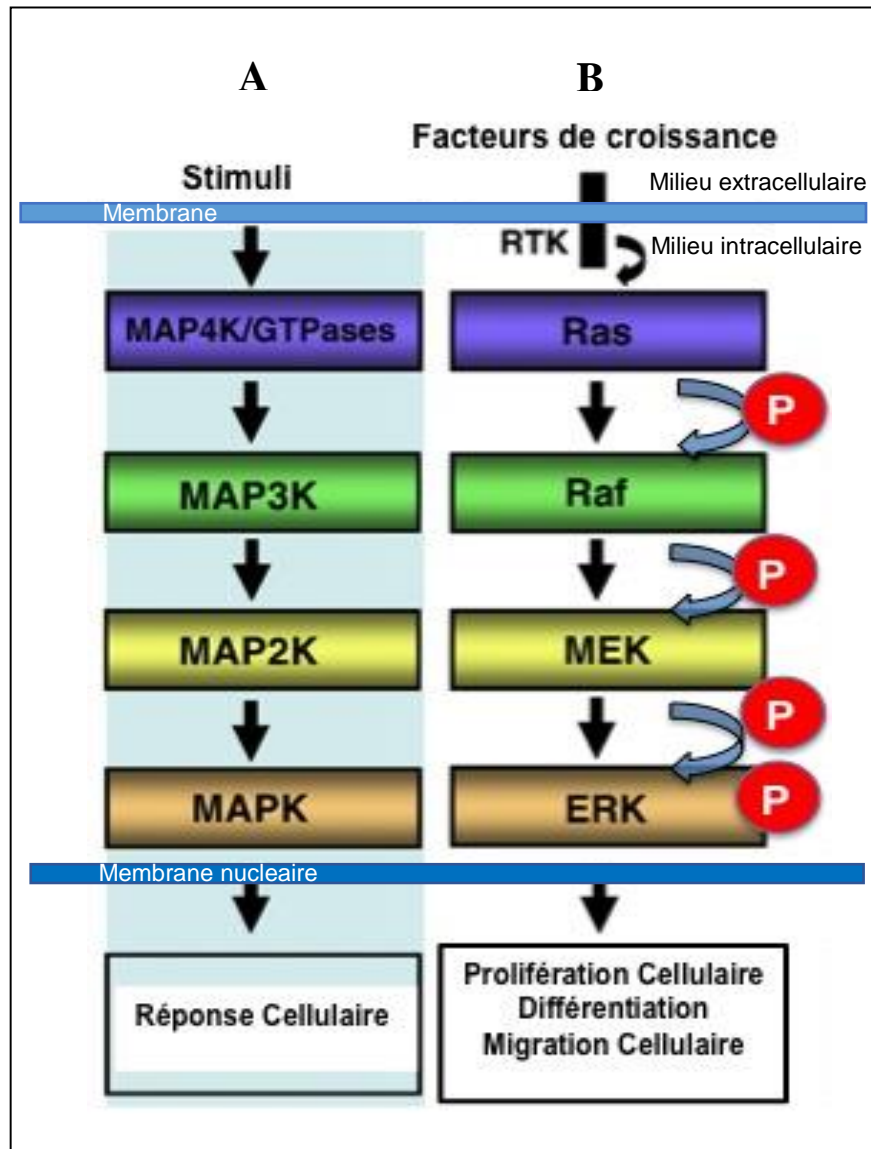


Figure 1. La cascade de signalisation des ‘Mitogen Activated Protein Kinases’ (MAPKs) [12].

A) Schéma simplifié d’une voie typique de signalisation des MAPKs. La MAP3K activée par la MAP4K phosphoryle la MAP2K qui phosphoryle à son tour la MAPK.

B) Schéma simplifié de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK. La kinase Raf, initiatrice de la voie, phosphoryle et active les kinases MEK. Les MEKs activent par une double phosphorylation les kinases ERK. Les ERK activées transmettent le signal en phosphorylant une multitude de substrats dans différents compartiments subcellulaires. P : Groupement phosphate ; MAPK kinase kinase : MAP4K ; MAPKs kinase kinase: MAP3K, MEK1 (pour Mitogen/Extracellular kinase); MAPKs kinase : MAP2K, MEK, MKK3, MKK4, MKK6, et MKK7 (MKK est une protéine kinase à spécificité double). MAPKs : ERK, RTK : récepteur tyrosine kinase ; GTPase : Guanosine triphosphatase; RAS et Raf : protéines.

1.1.2 Les biomarqueurs protéiques phosphorylés des maladies neurodégénératives

Un biomarqueur est une caractéristique biologique mesurable liée à un processus normal ou anormal des cellules [24]. Il doit permettre la caractérisation d'un état physiologique, un état pathologique, une évolution d'une maladie ou encore une réponse à un traitement donné. Certains biomarqueurs protéiques sont quantifiables dans le sang, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou la salive. Un biomarqueur est spécifique à une maladie et doit présenter un pouvoir de diagnostic élevé. Ainsi, on peut citer par exemple la PSA (antigène prostatique spécifique) dans le cas du cancer de la prostate, la troponine dans l'infarctus cardiaque, la protéine HER2 (récepteur pour le facteur de croissance épidermique humaine) dans le cancer du sein, la transferrine dans le cas des anomalies congénitales de la glycosylation.

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par un dysfonctionnement métabolique conduisant à la perte progressive de neurones dans des régions plus ou moins localisées du système nerveux. Les signes cliniques peuvent être des troubles cognitifs aboutissant à la démence comme dans la maladie d'Alzheimer (MA) ou la maladie de Pick, des anomalies motrices prédominantes comme dans la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ou la maladie de Parkinson (PA), ou l'association des deux anomalies comme dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CFJ).

La MA est la principale cause de démence et une cause majeure de décès chez les personnes âgées. Les caractéristiques de cette maladie sont l'accumulation des dépôts extra-cellulaires de peptides β -amyloïdes (plaques) et les dégénérescences neurofibrillaires intra-cellulaires provenant de la dégradation et agrégation des protéines Tau se détachant des microtubules neuronaux [25]. Les peptides β -amyloïdes et la protéine Tau ont été largement étudiés dans le LCR comme biomarqueurs de la destruction neuronale dans la MA [26–28]. La protéine Tau est peu phosphorylée à l'état physiologique sain mais possède 85 sites potentiels de phosphorylation essentiellement au niveau des sérines et thréonines [25,29]. Or, des molécules hyperphosphorylées de la protéine Tau forment différents enchevêtrements neurofibrillaires selon l'acide aminé phosphorylé [28]. L'hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau a donc été associée à la MA [30] mais le grand débat reste à savoir si elle est la cause ou la conséquence de son agrégation.

Une des principales stratégies thérapeutiques vise à réduire la phosphorylation de Tau en inhibant les protéines kinases spécifiques impliquées [31,32].

Par ailleurs, la protéine α -synucléine (α -syn), abondante dans le LCR, forme des agrégats anormaux appelés corps de Lewy (LB) dans les neurones dans certaines maladies neurodégénératives réunies sous le nom de synucléinopathies: la maladie de Parkinson (PD), la Démence à corps de Lewy (DLB) et l'Atrophie multisystématisée (MSA, acronyme de l'anglais Multiple System Atrophy) [33]. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la phosphorylation de la α -syn joue un rôle majeur dans cette agrégation anormale. Des études post-mortem réalisées sur des coupes de cerveaux de patients victimes de PD ont montré que 90% de la α -syn dans les LB étaient phosphorylées sur le résidu sérine 129, tandis que dans un cerveau sain, moins de 4% de la α -syn est phosphorylée sur ce résidu [34,35]. Dans une autre étude post-mortem du cerveau de patients victimes de PD, AD, DLB et MSA, la quantité de α -syn phosphorylée au niveau de la sérine 87 était nettement plus élevée que dans les cas de patients sains [36]. Plus récemment, il a été mis en évidence que la quantité de α -syn phosphorylée au niveau de la Tyrosine 125 diminuait avec l'âge mais cette évolution était inversée pour la α -syn phosphorylée au niveau de la sérine 129 pour un modèle de PD [37]. Ces études *in vivo* et *in vitro* ont montré que la phosphorylation de la α -syn joue un rôle majeur dans son agrégation anormale et que cette MPT est fermement associée à la PD mais le mécanisme exact reste à déterminer. L'étude des kinases qui régulent la phosphorylation de la α -syn permettrait de cibler les voies où la phosphorylation pourrait être inhibée/modulée afin de mieux comprendre le mécanisme de la PD et de prévenir l'évolution de cette maladie. Récemment, la communauté scientifique s'est accordée sur l'idée que la phosphorylation de la α -syn fournirait un grand potentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la PD [33,38].

L'analyse des phosphoprotéines ou des biomarqueurs phosphorylés n'est pas simple en raison de leur faible concentration dans les liquides biologiques et leur l'hétérogénéité. Ce type d'analyse est devenu possible en grande partie grâce au développement de différentes techniques d'enrichissement de protéines/peptides phosphorylés dont les principales stratégies sont décrites dans la section suivante.

1.2 Stratégies d'enrichissement de phosphopeptides

Plusieurs méthodes d'enrichissement de phosphoprotéines ou phosphopeptides ont été développées pour augmenter la sensibilité de détection mais également pour réduire la complexité des échantillons avant leur analyse. Ces techniques ont été décrites dans plusieurs revues dans la littérature [6,39–48]. Les principales stratégies sont résumées à la Fig.2. Les méthodes d'affinité sont traditionnellement utilisées, la chromatographie d'affinité plus fréquemment que les méthodes alternatives comme la précipitation des phosphopeptides par le calcium (hydroxyapatite) ou le lanthane. Cependant d'autres méthodes telles que la chromatographie d'échange de cations (SCX) ou d'anions (SAX), d'interactions hydrophiles (HILIC) ou de répulsion électrostatique-interactions-hydrophiles (ERLIC)) ou les modifications chimiques sont également utilisées. Ces méthodes sont brièvement décrites dans cette section.

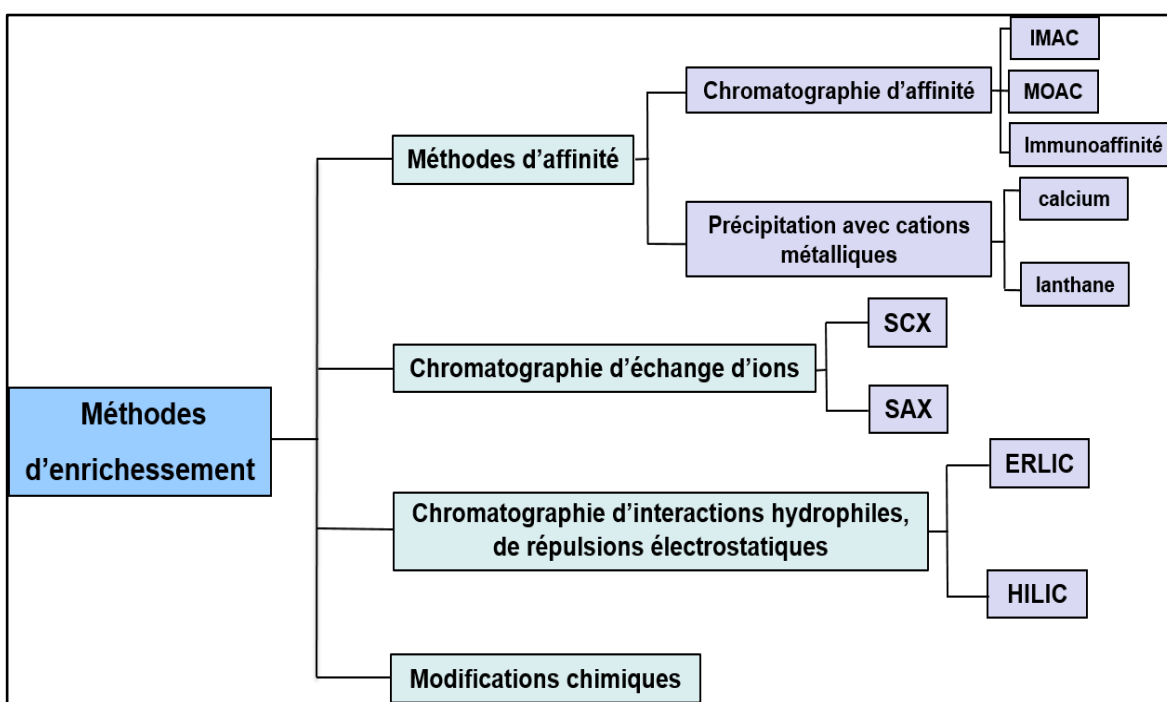


Figure 2. Stratégies d'enrichissement de phosphoprotéines et de phosphopeptides.

1.2.1 Les méthodes d'affinité

1.2.1.1 La chromatographie d'immunoaffinité

Des anticorps qui reconnaissent l'épitope d'une sérine, d'une thréonine ou d'une tyrosine phosphorylée sont utilisés pour isoler les phosphopeptides. Toutefois, cette technique

pourtant très performante présente deux inconvénients d'ordre technique et économique. Les liaisons entre les anticorps et les résidus phosphorylés ne sont pas très fortes et le coût élevé des anticorps. Malgré le coût, la spécificité des anticorps procure un avantage pour les phosphotyrosines étant donné leur faible ratio dans le phosphoprotéome (rapport pS/pT/pY de 86%/12%/2%) [3,46]. Ainsi, la disponibilité d'anticorps hautement spécifiques pour les phosphotyrosines a permis d'identifier les substrats des kinases ERK1/2 [49] ou l'identification des protéines tyrosine kinases oncogènes à partir des cellules cancéreuses (NSCLC) du poumon [50].

1.2.1.2 La chromatographie de type IMAC

La technique d'enrichissement de phosphopeptides ou phosphoprotéines la plus utilisée est la chromatographie d'affinité sur des ions métalliques immobilisés (IMAC, acronyme de l'anglais Immobilized Metal Affinity Chromatography) qui a été décrite dans plusieurs revues dans la littérature [51–54]. L'IMAC a été introduite à l'origine par Porath et al.[55] pour la purification et le fractionnement des peptides/ protéines riches en histidine. Dans ces travaux les auteurs ont décrit l'utilisation des ions métalliques immobilisés sur un support solide pour fractionner les protéines de milieux biologiques. En 1986, Andersson et Porath ont démontré pour la première fois que les acides aminés et protéines phosphorylées se liaient sélectivement aux ions métalliques [56]. Depuis, la technique a été largement utilisée pour l'enrichissement de phosphopeptides.

1.2.1.2.1 Principe de l'IMAC

L'IMAC est basée sur la formation de liaisons de coordination entre des ions métalliques immobilisés sur un support solide via un ligand-chélateur et des groupements fonctionnels spécifiques de la protéine, qui sont électro-donneurs et qui contiennent des atomes électro-négatifs (azote, oxygène, soufre) [52]. Généralement, il s'agit des résidus histidine ou histidyls (non protonés) mais l'acide glutamique, l'acide aspartique, la tyrosine, la cystéine, l'arginine, la lysine et la méthionine ainsi que les chaînes aromatiques du tryptophane et de phénylalanine peuvent aussi participer à la liaison de coordination [57]. Grâce à leurs groupements imidazole et thiol respectifs, l'histidine et la cystéine présentent une plus grande affinité pour les ions métalliques. Dans le cas d'une protéine ou peptide phosphorylé, l'ion métallique chargé positivement fait des liaisons avec les charges négatives portées par les atomes d'oxygène du groupement phosphate (Fig.3).

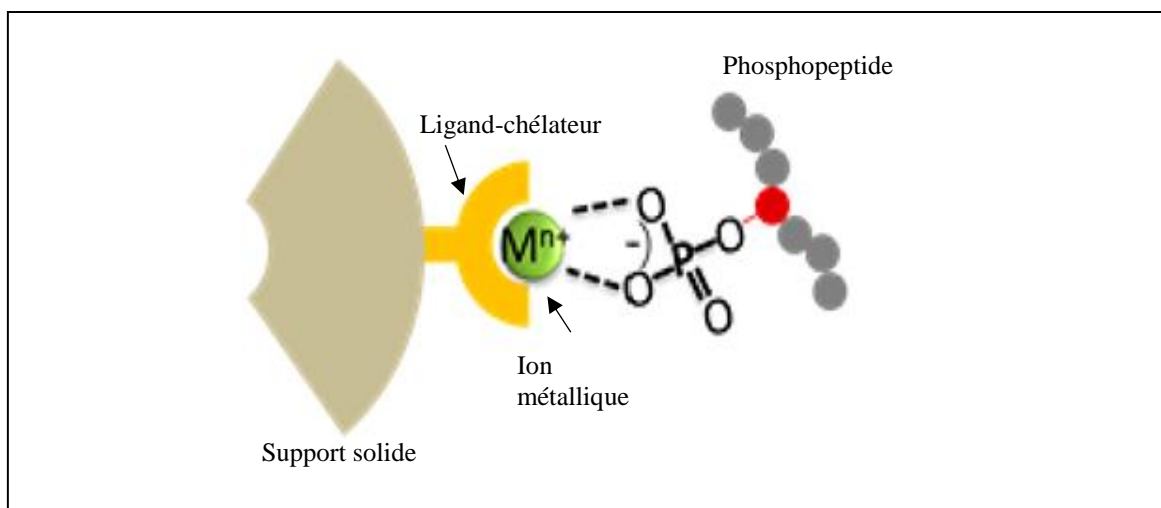


Figure 3. Schéma du principe de l'IMAC [58].

La liaison de coordination entre les métaux et les protéines peut être expliquée par le concept chimique de réactivité résultant du principe HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) proposé par Pearson [59]. Ce principe stipule que lorsque deux atomes forment une liaison, l'un se comporte comme un acide de Lewis (accepteur d'électrons) tandis que l'autre se comporte comme une base de Lewis (donneur d'électrons). La force de cette liaison est gouvernée par la dureté ('hardness') ou la mollesse ('softness') des atomes. Une liaison forte est formée entre un acide et une base de Lewis '*durs*'. Ainsi, les ions métalliques peuvent être divisés en trois catégories. Nous citerons ici principalement ceux utilisés en IMAC. Les ions de petite taille, peu électronégatifs et possédant un degré d'oxydation élevé (charge positive) tels que le Ti^{4+} , Zr^{4+} , Fe^{3+} , Ga^{3+} ou Al^{3+} se comportent comme des acides de Lewis *durs* tandis que les gros ions électronégatifs et faiblement chargés positivement tels que le Cu^+ ou Ag^+ sont appelés acides de Lewis *mous*. Les ions dits *intermédiaires* tels que le Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ont une plus grande affinité envers les groupements contenant l'azote alors que les ions dits acides de Lewis durs ont plus d'affinité pour les groupements riches en oxygène comme dans le cas des phosphates.

De la même façon, les bases de Lewis peuvent être classifiées en bases dites *dures* telles que les protéines contenant des groupements carboxyliques, amines (asparagine, glutamine) ou phosphates (aminoacides phosphorylés), en bases dites *molles* telles que les protéines contenant des groupements thiol (cystéine) ou en bases dites *intermédiaires* telles que les protéines contenant un azote aromatique (histidine ou tryptophane).

Traditionnellement, les ions métalliques trivalents (Fe^{3+} ou Ga^{3+}) étaient utilisés pour l'enrichissement des phosphopeptides en raison de leur affinité pour les groupements fonctionnels riches en oxygène tel que les groupements phosphate [60–62]. Cependant, ils développent des liaisons non spécifiques avec des biomolécules portant des groupements acides. De nos jours, les ions tétravalents (Zr^{4+} et Ti^{4+}) sont de plus en plus utilisés pour l'enrichissement de phosphopeptides [63–66] en raison de leur forte affinité pour les groupements phosphate montrant ainsi une plus grande spécificité par rapport au traditionnel système IMAC- Fe^{3+} . L'ion métallique des terres rares Ce^{4+} a aussi été utilisé pour l'enrichissement des phosphopeptides [67]. Il est connu que les ions métalliques du groupe IV tels que le Zr^{4+} ou Ti^{4+} peuvent former un complexe octaédrique (MO_6) dans lequel chaque ion engage six liaisons de coordination avec les oxygènes appartenant à plusieurs groupements phosphate. Par conséquent, ces ions métalliques sont fortement liés aux groupements phosphate, améliorant ainsi significativement la spécificité d'un enrichissement des phosphopeptides par IMAC [6,68].

1.2.1.2.2 Les ligands-chélateurs et les supports solides

La nature du support solide ainsi que le type de ligand-chélateur sont aussi des facteurs primordiaux dans l'utilisation de la technique IMAC. Les supports traditionnels utilisés en IMAC sont à base de gels ou de billes polysaccharidiques tels que l'agarose ou le dextran. Ils sont biologiquement compatibles, facilement activables et fonctionnalisables. Différents produits commerciaux sont disponibles tels que le Sephadex®, le Sepharose® (Pharmacia) ou le Bio-Gel® (Bio-Rad). Cependant ces supports ne peuvent être utilisés qu'à basse pression. Pour palier ce problème d'autres supports tels que la silice et des polymères synthétiques (styrène, méthacrylate) ont été développés [69].

La rétention de l'ion métallique sur le support solide dépend principalement de la structure du ligand-chélateur et du nombre de liaisons de coordination qu'il peut générer (bidentaté à pentadenté). On trouve principalement des groupements chélateurs de type iminodiacétate (IDA), carboxyméthylaspartate (CMAsp), tris(carboxyméthyl)éthylènediamine (TED), nitrilotriacétate (NTA) et tris (2amino-éthyl) amine (TAE) [51,52]. Par exemple, le NTA tétradenté a une plus grande affinité pour l'ion Ni^{2+} que l'IDA tridenté (Fig.4). Par ailleurs, la longueur du bras du ligand-chélateur reliant le groupement chélatant au support solide joue un rôle important dans l'organisation spatiale du chélate formé, influençant ainsi sa

spécificité vis à vis de l'ion métallique mis en jeu. Dans le cas des ligands-chélateurs tridentés comme l'IDA, l'ordre d'affinité pour les ions métalliques est le suivant : $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$, tandis que le NTA a une forte affinité pour le Cu^{2+} et le Ni^{2+} [70].

Les ligands-chélateurs IDA et NTA sur gel d'agarose ont été les plus couramment utilisés pour l'immobilisation de l'ion Fe^{3+} pour l'enrichissement des phosphopeptides [56,71–75]. Cependant, cet ion Fe^{3+} ne peut se complexer qu'à un seul ligand IDA ou NTA, provoquant une perte des ions métalliques durant les étapes de chargement des échantillons ou de rinçage [58].

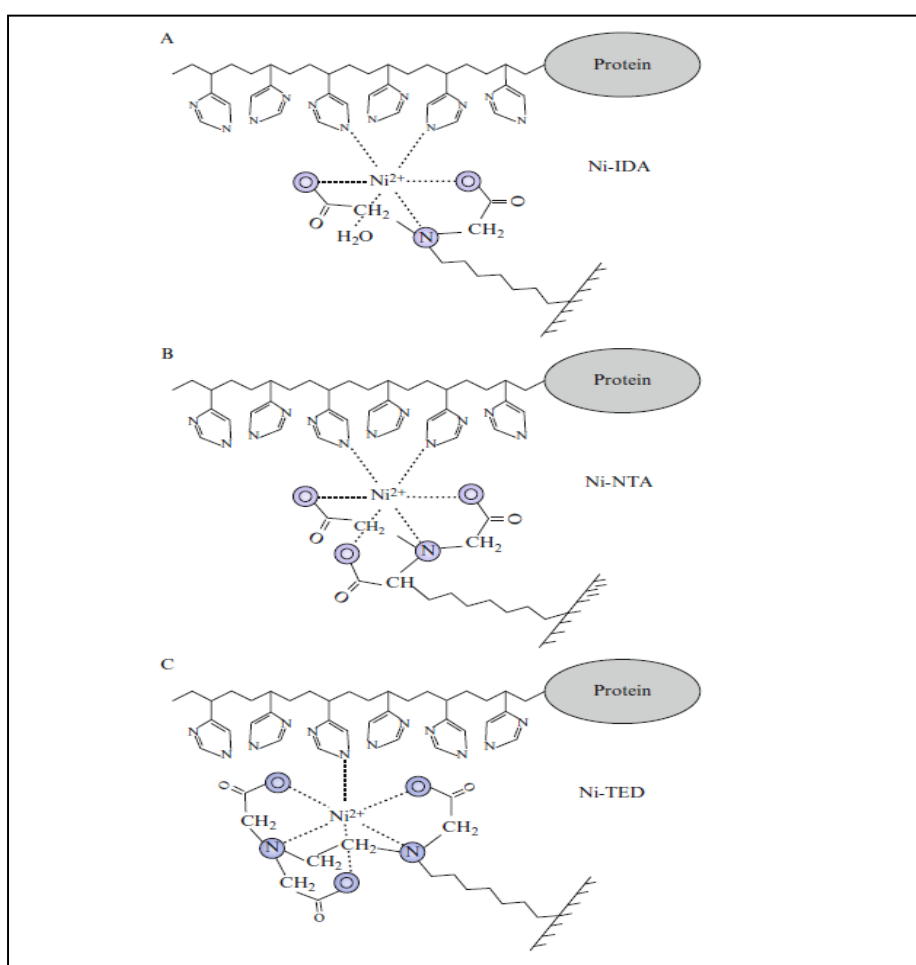


Figure 4. Modèle d'interaction entre les résidus de protéines portant une étiquette histidine et le Ni^{2+} chélaté par des ligands-chélateurs tridentés (A), tétradentés (B) et pentadentés (C)[76].

Ainsi, les recherches ont été orientées ces dernières années vers le développement de nouveaux ligand-chélateurs avec de meilleure capacité de chélation pour l'enrichissement

de phosphopeptides et phosphoprotéines [58]. Par exemple, l'arsénite ($-\text{AsO}_3^{-2}$) [77], le phosphate ($-\text{PO}_3^-$), l'adénosine triphosphate (ATP) [78] ou la dopamine [79] ont été développés et utilisés avec succès pour l'immobilisation des ions métalliques Zr^{4+} et Ti^{4+} (Fig.5). L'ATP présente deux avantages majeurs contribuant à augmenter la performance de l'enrichissement des phosphopeptides par IMAC. Les nombreux groupements phosphate sur l'ATP aide le ligand à chélater abondamment les ions métalliques tandis que son caractère hydrophile diminue les interactions non spécifiques en retenant les phosphopeptides sur le support par des liaisons hydrogène. Quant à la dopamine, ses atouts résident dans la forte chélation générée entre les groupements hydroxyl du cathécol et les ions métalliques ainsi que dans son caractère hydrophile.

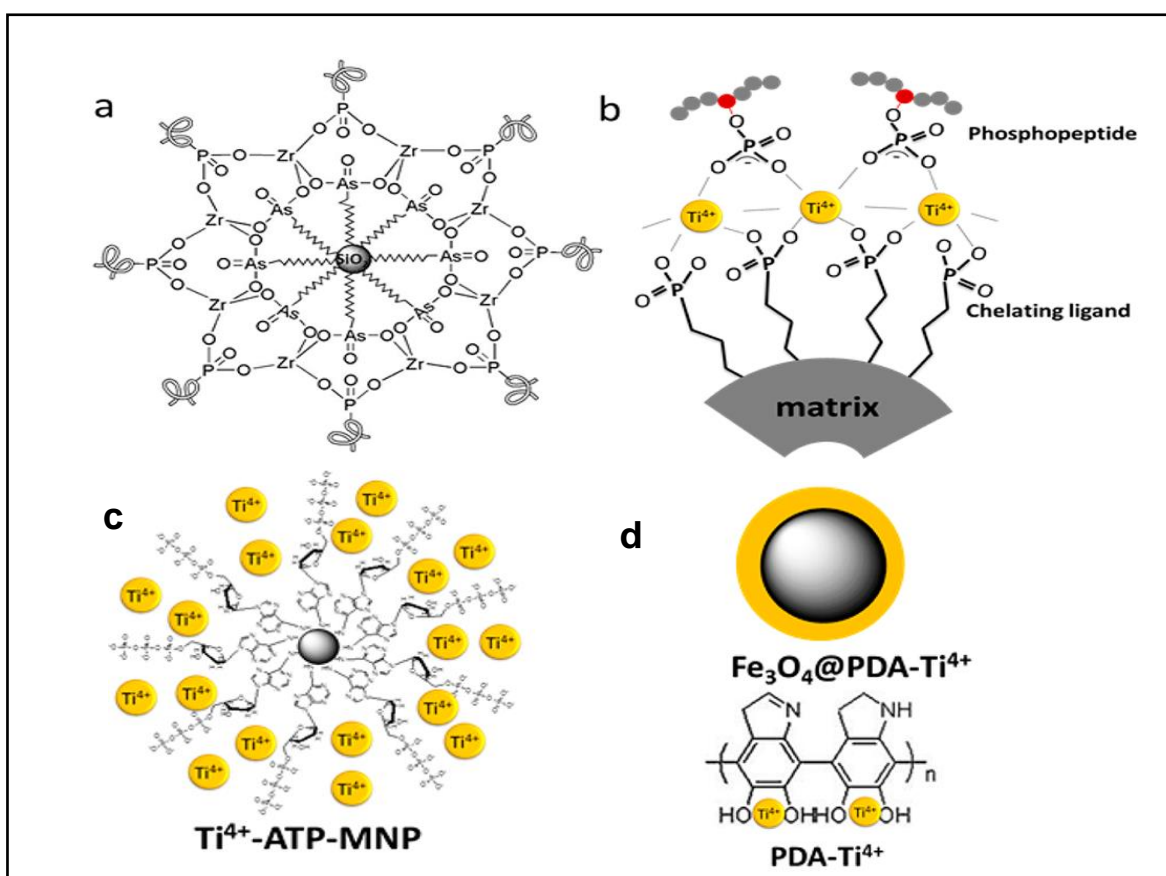


Figure 5. Schéma montrant les nouveaux ligand-chélateurs pour l'enrichissement de phosphopeptides : (a) matrice arsénite- Zr^{4+} , (b) matrice phosphate- Ti^{4+} , (c) matrice ATP-nanoparticules magnétiques (MNP) - Ti^{4+} , (d) matrice Fe_3O_4 -polydopamine- Ti^{4+} [58].

Nous détaillons ici davantage les exemples concernant les ligand-chélateurs phosphatés qui sont directement liés à notre stratégie de recherche. De tels ligands avec de nombreux groupements phosphate permettent d'obtenir une surface stable et réactive vis-à-vis des

ions métalliques via la formation d'un complexe octaédrique (MO_6) pour capturer efficacement des phosphopeptides. La modification des matrices polymériques portant des groupements (amine ou époxy) réactifs avec des ligand-chélateurs phosphatés fournit une surface fortement décorée de groupements phosphate permettant l'immobilisation d'un grand nombre d'ions métalliques, générant ainsi un système IMAC possédant une grande capacité d'enrichissement de phosphopeptides. Par exemple, le système d'affinité sur microsphères polymériques $Fe_3O_4@SiO_2@PEG-Ti^{4+}$ a permis une meilleure capacité de capture des phosphopeptides (2447 phosphopeptides) d'un digestat trypsique de plantes par rapport à un système $Fe_3O_4@SiO_2-Ti^{4+}$ (1186 phosphopeptides) [80]. Les polymères naturels (chitosan et cellulose) ont l'avantage d'être peu coûteux et de posséder de nombreux groupements facilement fonctionnalisables. Leur estérification en présence d'acide phosphorique produisent du chitosan ou de la cellulose phosphatée qui est ensuite fonctionnalisé avec des ions Ti^{4+} . Les matrices IMAC obtenues étaient très sélectives [81,82].

Pour simplifier la préparation des matrices IMAC-phosphate, des monomères possédant les groupements phosphate tels que le 3-(trihydroxysilyl) propyle méthyle phosphonate [83], le diethoxyphosphorylethyl-triethoxysilane [84] ou l'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) [64,85] ont été développés. Par exemple, la synthèse d'un monolithe à partir de l'EGMP a permis d'obtenir une surface riche en groupements phosphate. Dans ces études, les systèmes IMAC poly (EGMP)- Ti^{4+} et poly (EGMP)- Zr^{4+} ont permis de préconcentrer respectivement 216 et 185 phosphopeptides d'un lysat de foie de souris. Ces nombres sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec le traditionnel système IMAC- Fe^{3+} (47 phosphopeptides). Des microsphères synthétisées à partir de nanoparticules Fe_3O_4 recouvertes d'une première couche de PMMA puis d'EGMP associées au Ti^{4+} ont montré une excellente sélectivité envers les phosphopeptides avec un recouvrement de 87% [86].

Des plaques MALDI recouvertes avec des ligand-chélateurs tels que des couches d'ions métalliques, des films polymériques complexés avec des ions métalliques ou même des plaques commerciales (Cypherger et Qiagen) ont aussi été développées comme support pour l'enrichissement de phosphopeptides directement sur la plaque (Dunn et al., 2010) [42]. Cette technologie permet l'analyse rapide de petits volumes d'échantillons dilués ainsi qu'une perte d'échantillon plus faible par rapport aux techniques conventionnelles.

Cependant, ces systèmes n'ont pas permis d'identifier la totalité des phosphopeptides de mélanges complexes.

1.2.1.2.3 Procédure IMAC : spécificité et sélectivité

La procédure IMAC comprend des étapes d'immobilisation d'ions métalliques, de chargement des échantillons, de rinçages et d'éluion qui doivent être optimisées afin d'obtenir la meilleure efficacité (Fig.6).

L'immobilisation des ions métalliques peut être effectuée en milieu neutre (eau) ou acides (tampons dilués). L'excès d'ions métalliques peut également être éliminé par des rinçages à l'eau ou en milieu acide (solutions diluées).

La principale limite de cette technique réside dans les liaisons non spécifiques entre les ions métalliques chargés positivement et les peptides/protéines non-phosphorylés qui contiennent des acides aminés acides (acide glutamique ou aspartique). Pour réduire ces interactions et améliorer la spécificité de l'IMAC pour les phosphopeptides, plusieurs stratégies peuvent être envisagées [42,43,47]. L'utilisation de tampons de chargement d'échantillon et de rinçage très acides (pH=1-2.5) favorisent la protonation des groupements carboxyliques et l'ionisation des groupements phosphates (pKa 2.1) qui sont alors retenus sur le support IMAC tandis que les peptides acides non phosphorylés sont éliminés lors du rinçage [45]. Cependant, la déprotonation des groupements phosphate risque d'être incomplète à des pHs aussi acides, induisant ainsi une perte de sensibilité. Ces conditions drastiques peuvent également provoquer une perte des ions métalliques du support solide [87]. Les facteurs importants à optimiser pour une bonne efficacité sont donc la nature, la concentration et le pH de l'acide [6,40,88]. L'estérification des fonctions carboxyliques des peptides réduit leur acidité et empêche ainsi leur interaction avec le système IMAC mais des réactions incomplètes ou secondaires et la perte d'échantillon en font une stratégie peu utilisée [89]. Une augmentation de la concentration en acétonitrile (ACN), généralement utilisé pour éviter les interactions hydrophobes entre les peptides/protéines et le support solide, permet de réduire l'ionisation des résidus acides tandis que l'ionisation des groupements phosphate n'est pas affectée [72].

Un autre biais possible de la méthode d'enrichissement des phosphopeptides par IMAC est la plus grande affinité du système pour les peptides multiphosphorylés par rapport aux

peptides monophosphorylés. La sélectivité de la méthode peut être optimisée en ajustant les tampons d'éluion. L'éluion peut être réalisée en milieu acide (par exemple TFA) ou alcalin (hydroxyde d'ammonium à pH 10-11). Pour un système IMAC-Fe³⁺ par exemple, les peptides monophosphorylés sont élués plus efficacement avec une concentration élevée de TFA alors que les conditions alcalines (hydroxyde d'ammonium à pH 10-11) sont plus adaptées à l'éluion des peptides multiphosphorylés [90]. Une autre stratégie consiste à ajouter dans le tampon d'éluion des compétiteurs tels que l'imidazole, l'EDTA [40,64,85,90,92].

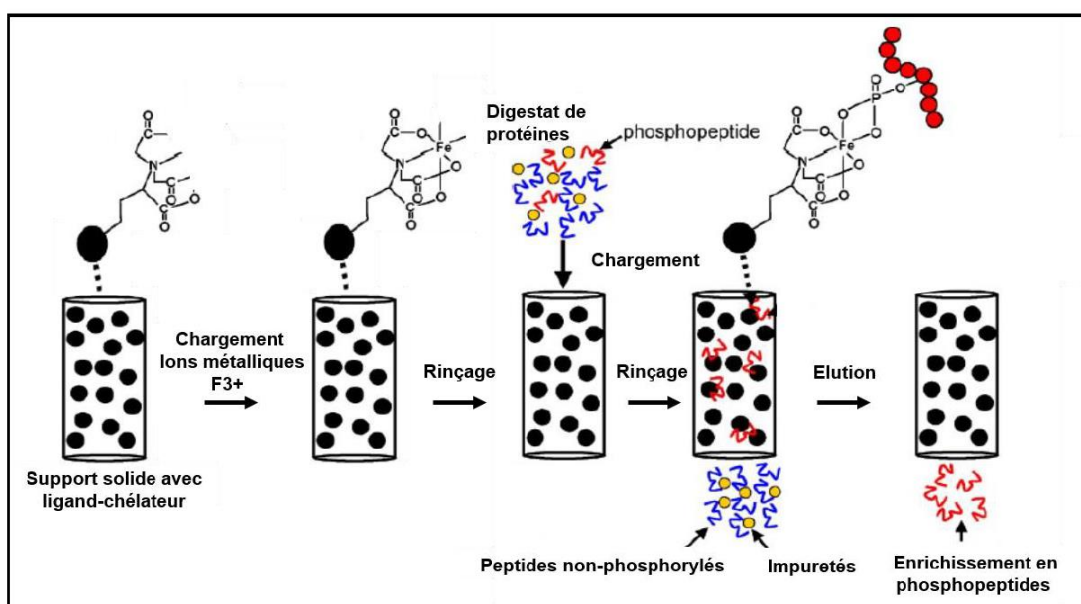


Figure 6. Schéma général des étapes IMAC pour l'enrichissement des phosphopeptides [42].

1.2.1.3 La chromatographie d'affinité de type MOAC

La chromatographie de type MOAC (pour l'acronyme en anglais Metal Oxide Affinity Chromatography) est une autre technique largement utilisée pour l'enrichissement de phosphopeptides. Elle a été décrite dans plusieurs revues [42,43,45]. L'interaction entre les phosphopeptides et les oxydes métalliques (OMs) est basée sur l'affinité des oxygènes des groupements phosphates pour les atomes métalliques [42,43,47]. Dans le cas du dioxyde de titane (TiO₂), l'affinité du phosphate est forte et similaire à celle des acides carboxyliques aromatiques (10⁴-10⁵ M⁻¹) [93] mais cette interaction est de nature chélatante bidentée (avec une molécules de TiO₂) [94], tandis que le groupement phosphate forme un pont entre deux molécules de TiO₂ (Fig7).

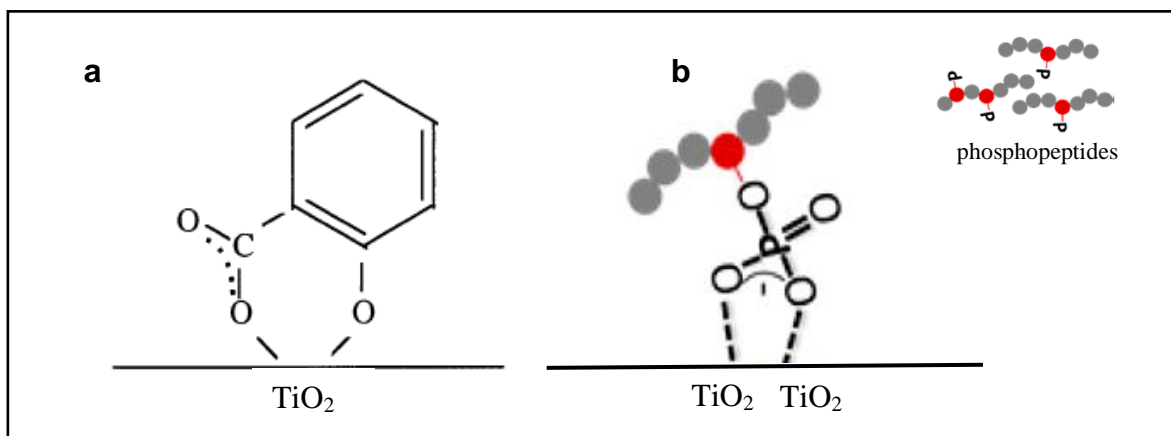


Figure 7. Schéma représentant le mode d'interaction entre le TiO_2 et a) les acides carboxyliques aromatiques et b) le groupement phosphate, P: groupement phosphate [94].

La plupart des OMs étant amphotères (par exemple le TiO_2 a deux pK_a , $\text{pK}_{a1} = 4.4$ et un $\text{pK}_{a2} = 7.7$), ils agissent comme des acides de Lewis *forts* (« *durs* ») avec des surfaces chargées positivement en milieu acide ou comme des bases de Lewis *fortes* (« *dures* ») avec des surfaces chargées négativement en milieu basique. Les phosphopeptides sont donc généralement capturés à pH acide (par exemple, pH 2.7) et élués à pH alcalin (par exemple, pH 10.5) [58], selon un mécanisme réversible d'interactions acide-base de Lewis.

Les dioxydes de titane (TiO_2) et de zirconium (ZrO_2) ont été utilisés avec succès pour l'enrichissement de phosphopeptides bien que le TiO_2 soit le plus fréquemment utilisé [3,95–102]. Leur efficacité pour l'enrichissement des peptides mono-phosphorylés est similaire mais le TiO_2 présente une plus grande affinité pour les peptides multi-phosphorylés [98,101]. De plus, une étude a montré que le ZrO_2 capture plus de peptides non-phosphorylés que le TiO_2 [99].

En effet, de façon similaire à l'IMAC, les résidus acides interagissent également avec les dioxydes métalliques. Le protocole MOAC comprend les mêmes étapes de chargement d'échantillons, de rinçage et d'éluion que l'IMAC. Depuis 2004, plusieurs protocoles dédiés principalement à l'optimisation des tampons de chargement et de rinçage ont été proposés afin d'augmenter la spécificité des systèmes MOAC pour la purification des phosphopeptides. Ainsi, en plus des conditions acides de chargement et de lavage, l'addition de divers acides organiques a permis d'éliminer les interactions non-spécifiques et augmenter la spécificité des oxydes métalliques pour les peptides phosphorylés. Les

acides traditionnellement utilisés sont l'acide formique, l'acide acétique [101], l'acide trifluoracétique (TFA), l'acide phosphorique, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) [97], l'acide glutamique[103] ou encore l'acide lactique [99]. Ces acides entrent en compétition avec les résidus acides des peptides non-phosphorylés au niveau des sites d'interaction, se liant aux oxydes métalliques plus fortement que les groupements carboxyles mais plus faiblement que les groupements phosphates [41]. Larsen et al. [97] ont établi une classification de ces acides organiques selon leur capacité à inhiber les interactions non-spécifiques avec le TiO_2 : 2,5 DHB > acide benzoïque > acide phosphorique > acide formique > TFA > acide acétique. D'une part, des études de spectroscopie infrarouge ont montré que les acides carboxyliques aromatiques interagissent plus fortement avec le TiO_2 que les acides carboxyliques aliphatiques [94]. D'autre part, le 2,5 DHB entre en compétition plus facilement avec les peptides non phosphorylés qu'avec les phosphopeptides en raison de la différence de géométrie de coordination de ces acides pour les oxydes métalliques [97].

Plus récemment, l'utilisation du glycérol a également permis d'augmenter la sélectivité du TiO_2 pour les phosphopeptides. Les trois groupements hydroxyle du glycérol, en s'adsorbant sur la surface TiO_2 , forment des complexes de coordination tridentés qui bloquent les sites d'adsorption non-spécifique des groupements carboxyliques des peptides acides non phosphorylés et réduisent ces liaisons bidentées non-spécifiques[104]. Dans cette étude, l'addition du glycérol a permis d'isoler davantage de peptides mono-phosphorylés en comparaison de l'acide lactique.

L'élution des phosphopeptides est généralement réalisée avec des solutions alcalines tels que l'hydroxyde d'ammonium ou le phosphate d'ammonium. Cependant, des conditions de pH très alcalin et de force ionique élevée permettent d'éluer plus efficacement les peptides multi-phosphorylés qui interagissent plus fortement que les peptides mono-phosphorylés avec le TiO_2 . Il faut cependant noter l'hydrolyse des groupements phosphates à pH trop élevé [43]. L'utilisation combinée de l'hydroxyde d'ammonium et du bis-Tris propane a permis d'éluer des phosphopeptides de petites et grandes masses moléculaires respectivement, permettant ainsi d'augmenter l'efficacité d'enrichissement des phosphopeptides [104].

Par ailleurs, la proportion peptides /oxydes métalliques doit être optimisée pour augmenter l'efficacité et la sélectivité de l'enrichissement des phosphopeptides selon la nature de l'échantillon. Par exemple, une quantité insuffisante de TiO_2 favorise l'enrichissement des peptides multi-phosphorylés tandis qu'un excès augmente les interactions non spécifiques [105].

Jusqu'à présent, divers OMs tels que Fe_2O_3 [106], SnO_2 [107], Nb_2O_5 [108], Ta_2O_5 [109], HfO_2 [110], $\text{Al}(\text{OH})_3$ [111], Ga_2O_3 [112], et ZnO [113] ont été développés pour l'enrichissement de phosphopeptides par la méthode MOAC avec des affinités et spécificités différentes que TiO_2 ou ZrO_2 . Au cours des 5 dernières années, de nouveaux composites ont été conçus pour l'enrichissement des phosphopeptides issus de digestats protéiques (protéines standards (BSA, α - et β -caséines), du sérum humain, issues des mitochondries de foie de rat, des lysats de cellules HeLa), tels que des colonnes capillaires à base de monolithes $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ [100] ou de monolithe poly (GMA-co-EDMA) recouvert de nanoparticules d'oxyde de fer [101], des aérogels mésoporeux en TiO_2 et de ZrO_2 [78] ou des nanoparticules magnétiques en fer et fonctionnalisées par du TiO_2 [116]. Agilent Technologies a développé et commercialisé un dispositif miniaturisé, incluant un module d'enrichissement basé sur la méthode MOAC et le mode de chromatographie en phase inverse sur C18 (TiO_2 -RP ou RP- TiO_2 -RP) et un module de séparation par nanoLC, couplé à un spectromètre de masse (Fig. 8). Ce système a été utilisé pour l'analyse de digestats protéiques issus de lysats de cellules HEK293 [117].

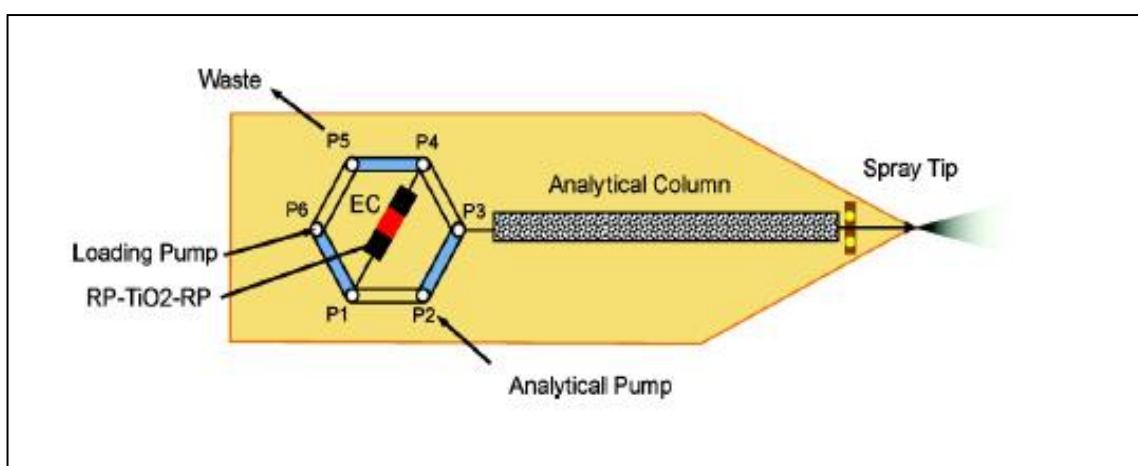


Figure 8. Design du dispositif 'MOAC on chip' pour l'enrichissement de phosphopeptides basé sur la technologie LC-chip d'Agilent Technologies [117].

Les plaques métalliques de type MALDI sont les principaux supports utilisés pour l'enrichissement sur plaque de phosphopeptides, par exemple issus des digestats de α et β -caséines [118]. Des nanoparticules d'or sont immobilisées sur des plaques en acier inoxydable et ensuite couvertes de TiO_2 . Après le chargement de l'échantillon sur la plaque, l'analyse est directement réalisée par MALDI-SM. Le groupe de Turecek a démontré que différentes surfaces d'oxydes métalliques peuvent être préparées par électropulvérisation d'alcoxydes métalliques [119]. Ces plaques sont cependant très coûteuses et des lames en verre ont donc été utilisées comme support alternatif.

A la différence de l'IMAC, la matrice de type MOAC est composée d'oxydes ou d'hydroxydes métalliques, ce qui évite l'étape de greffage d'un ligand-chélateur. Par ailleurs, dans les OMs, le cation métallique (M) est fortement lié à l'oxygène (O) anionique, ce qui permet de surmonter les problèmes de pertes des métaux souvent rencontrés en IMAC [58]. Etant plus tolérantes au pH très acide des tampons de chargement et de lavage qui protonent les groupements carboxyliques en laissant les groupements phosphates chargés négativement, les matrices MOAC sont moins soumises aux interactions non-spécifiques que l'IMAC. Les OMs ont une meilleure résistance chimique [120,121] face aux sels et détergents, ce qui empêche les interactions non spécifiques avec les acides nucléiques comme dans le cas des matrices IMAC. Ces matrices sont donc plus stables que les supports solides à base de silice [42].

La méthode SIMAC (« Sequential elution from IMAC »), développée par Thingholm et al. [90] combine les deux méthodes IMAC et MOAC. En comparaison avec la MOAC ou l'IMAC seule, cette combinaison améliore la sélectivité et la sensibilité de l'enrichissement des phosphopeptides, notamment pour les peptides mono et multi-phosphorylés à partir de mélanges protéiques complexes [90]. L'éluion séquentielle permet d'obtenir des fractions de phosphopeptides moins complexes et facilite leur analyse ultérieure par MS.

1.2.1.4 Méthodes d'affinité alternatives

Des méthodes alternatives basées sur la précipitation sélective des phosphopeptides en présence de cations métalliques tels que le calcium (Ca^{+2}) [122] ou plus récemment le lanthane (La^{+3}) ont été développées [123,124]. Les phosphopeptides forment des complexes insolubles avec le Ca^{+2} (phosphate de calcium) qui précipitent et qui sont ensuite isolés de la solution de départ puis identifiés par LC-MS/MS. Cette méthode a

permis l'identification de plus de 500 phosphopeptides dans une étude post-mortem du cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer [122]. Plus récemment, l'hydroxyapatite (phosphate de calcium cristallin $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$) a été utilisé pour la purification des phosphopeptides d'un digestat de α et β caséines [125]. Les lanthanides (Ln) sont des acides de Lewis *durs* et peuvent former des liaisons de coordination très fortes avec l'oxygène. Ces cations trivalents peuvent chélater les groupements phosphate pour former des complexes $LnPO_4$ stables et presque insolubles qui peuvent être facilement séparés de ses homologues non-phosphorylés par une simple centrifugation. Le mécanisme de précipitation peut être expliqué par l'effet combiné du 'salting-out' et de la co-précipitation. Les ions lanthanides, en interagissant avec les protéines en solution, modifient le pH de la solution et le point isoélectrique des protéines, diminuant ainsi leur solubilité [126]. L'absence de support solide, qui peut générer des interactions non spécifiques, dans la mise en œuvre de ces techniques en fait leur principal avantage. L'efficacité d'enrichissement des peptides multi phosphorylés par précipitation est meilleure que par la méthode MOAC en utilisant le TiO_2 . En plus d'être très facilement utilisables, ces méthodes montrent une très grande reproductibilité.

1.2.2 Autres méthodes chromatographiques

Outre les différentes chromatographies d'affinité, la chromatographie d'échange d'ions dont le mécanisme repose sur les interactions électrostatiques entre les groupements phosphates et les charges de la phase stationnaire, a aussi été utilisée pour l'enrichissement des phosphoprotéines et phosphopeptides. En chromatographie échangeuse de cations (SCX « strong cation exchange »), les phosphopeptides, fortement chargés négativement en milieu acide, sont peu ou pas retenus sur la phase stationnaire contrairement aux peptides non-phosphorylés, et sont soit élués avant les peptides non-phosphorylés soit passés dans la fraction de lavage. Bien que cette technique ait été appliquée avec succès à l'enrichissement de phosphopeptides d'extraits protéiques cellulaires HeLa (cellules cancéreuses utilisées comme 'standards') [127], les peptides non phosphorylés très acides peuvent coéluer avec les phosphopeptides. La chromatographie échangeuse d'anions (SAX « strong anion exchange ») est une méthode alternative plus adaptée à l'enrichissement des phosphopeptides qui sont fortement retenus sur la phase stationnaire SAX comparés aux peptides non phosphorylés du fait de l'ionisation complète des groupements phosphates en milieu acide. Han et al. [6] ont montré que la chromatographie SAX permettait d'éluer

séparément les peptides mono et multi-phosphorylés obtenus à partir d'un digestat trypsique de la β -caséine.

La chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC) est basée sur des interactions par liaison hydrogène entre la phase stationnaire neutre et hydrophile et les peptides. Les phosphopeptides, qui sont plus hydrophiles que les peptides non phosphorylés, sont plus retenus sur la phase stationnaire mais peuvent néanmoins co-éluer avec les peptides non phosphorylés [128]. La chromatographie de répulsion électrostatique-interactions hydrophiles (ERLIC) qui utilise les propriétés de la HILIC et de la chromatographie d'échange d'ions a été aussi utilisée pour l'enrichissement des phosphopeptides [129].

L'efficacité de ces techniques (SCX, SAX, HILIC et ERLIC) mises en œuvre seules pour l'enrichissement des phosphopeptides est relativement faible en raison de leur faible spécificité. Cependant, elles sont complémentaires des méthodes traditionnelles et plus spécifiques telles que l'IMAC ou la MOAC. Leur combinaison permet d'augmenter la sélectivité et la sensibilité de l'enrichissement des phosphopeptides. Ces stratégies ont été bien décrites dans plusieurs revues dans la littérature. Par exemple, McNulty et Annan [128] ont couplé les techniques HILIC et IMAC (Fe^{3+}) pour enrichir des phosphopeptides à partir d'un lysat de cellules HeLa. L'utilisation de ces deux techniques s'est avérée plus efficace et a permis de récupérer une plus grande quantité de phosphopeptides que si l'on utilise l'IMAC seule, en particulier pour l'enrichissement de peptides monophosphorylés. Une autre approche basée sur la combinaison des méthodes SAX et MOAC (TiO_2) a été publiée par Nie et al. [130]. Des peptides multiphosphorylés acides sont préférentiellement isolés par SAX tandis que les peptides monophosphorylés basiques par MOAC (TiO_2). En utilisant cette stratégie, 3462 phosphopeptides ont été identifiés, avec une bonne reproductibilité, à partir d'un lysat de cellules HeLa. Lorsque la SIMAC a été couplée à SCX, plusieurs milliers de phosphopeptides ont été identifiés dans un lysat de cellules NIH 3T3 [131].

1.2.3 Les modifications chimiques

L'enrichissement des phosphopeptides par dérivations chimiques est basé sur la modification sélective du groupement phosphate par un groupement fonctionnel avant leur enrichissement. Diverses techniques ont été décrites par Leitner et al. [120], Dunn et al. [42] et Batalha et al. [132]. Bien qu'applicable seulement aux phosphosérines et

phosphothréonines, l'approche la plus communément utilisée met en jeu une β -élimination du groupement phosphate par clivage de la liaison phosphoester en présence d'une base forte. Les composés intermédiaires formés réagissent par une réaction d'addition de Michael avec un groupement fonctionnel nucléophile (thiol, amine, alcool) pour former une liaison chimique plus stable. Ce marquage des phosphopeptides par substitution du groupement phosphate leur permet d'être enrichi par affinité [43]. Par exemple, des phosphopeptides marqués avec la biotine de façon réversible ont été purifiés par chromatographie d'affinité à base d'avidine [2]. Toutefois, des réactions secondaires ou des modifications post-traductionnelles favorables à la β -élimination (comme la O-glycosylation) peuvent causer une fausse interprétation des résultats. De plus, les multiples étapes réactionnelles ainsi que le rendement limité de chaque étape peut causer une perte d'échantillon.

1.3 Conclusion

Le développement des méthodes d'enrichissement des peptides et protéines phosphorylés a propulsé le champ d'étude de la phosphoprotéomique et permet actuellement d'identifier quelques milliers de sites de phosphorylation, dans la majorité des cas par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS). Chacune des techniques d'enrichissement citée dans ce chapitre offre certains avantages mais souffrent aussi de certains inconvénients.

L'utilisation des anticorps pour l'isolation des molécules phosphorylées reste une technique très performante et simple. Ces anticorps sont spécifiques et réagissent avec un seul type de résidu phosphorylé mais leur coût de production rend cette méthode plus onéreuse que les autres. Les deux méthodes IMAC et MOAC permettent l'enrichissement des peptides mono et multi-phosphorylés, mais l'IMAC est plus spécifique des peptides multi-phosphorylés tandis que la MOAC l'est envers les peptides mono-phosphorylés. Cependant, ces méthodes souffrent d'un problème d'interactions non-spécifiques entre le support solide et les peptides contenant plusieurs résidus d'acides aminés acides. Les modifications chimiques offrent la possibilité d'intégrer dans la procédure d'enrichissement le marquage des phosphopeptides pour leur quantification mais ce sont des méthodes longues bien que relativement simples à mettre en œuvre et peu coûteuses. Les autres méthodes d'enrichissement, tels que la précipitation par calcium, hydroxyapatite

ou lanthanides, les techniques chromatographiques SCX, SAX, HILIC ou ERLIC semblent très efficaces comme méthodes de pré-fractionnement mais également complémentaires aux techniques classique IMAC et MOAC. Étant donné les différentes spécificité et sélectivité de ces diverses techniques (biais dans l'enrichissement), il est avantageux en terme d'efficacité, mais plus laborieux, de combiner ces techniques. Elles sont parfois utilisées simultanément ou consécutivement pour augmenter le nombre de phosphopeptides identifiés. L'optimisation et le développement de nouvelles méthodes d'enrichissement sont toujours d'actualité.

PRECONCENTRATION DE PROTEINES ET PEPTIDES SUR SUPPORT SOLIDE EN MICROSYSTEME

2.1 Introduction

Le concept de ‘laboratoire sur puce’ (Lab on a Chip) est apparu au début des années 90 pour définir un dispositif miniaturisé intégrant de multiples étapes de la chaîne analytique incluant la préparation d’échantillon (marquage fluorescent, digestion enzymatique, capture/ enrichissement par immunoextraction, préconcentration...), la séparation et la détection [133]. Ces systèmes connus sous le nom de ‘microsystème intégré pour l’analyse totale’ ou ‘MicroTAS’ (pour l’acronyme en anglais ‘Micro Total Analysis System’) permettent des analyses automatisées, rapides et moins coûteuses tout en consommant un faible volume d’échantillon et de réactifs. A l’heure actuelle, plusieurs laboratoires sur puce ont été développés dans des domaines d’application très variés (protéomique, environnement, diagnostic médical, agroalimentaire).

En dépit des nombreux avantages qu’offrent les microsystèmes intégrés, il est important de considérer que le faible volume d’échantillon injecté représente un facteur critique pour la détection des composés à l’état de traces spécialement dans le cas d’échantillons biologiques dont l’analyse requiert une haute sensibilité. Ainsi, le développement de méthodes de préconcentration en microsystèmes nécessite une attention particulière de la part des chercheurs, ce qui a généré un nombre important de publications dans ce domaine

ces dernières années. Les méthodes de préconcentration envisageables en microsystèmes peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes basées sur des phénomènes électrocinétiques (amplification de champ électrique, isotachophorèse, déplacement d'équilibres chimiques...) et les méthodes reposant sur un support solide [134,135]. L'extraction sur phase solide (SPE) reste la méthode de préconcentration la plus attractive en terme de sélectivité, notamment les phases qui agissent par reconnaissance moléculaire telles que les immunoadsorbants ou les polymères à empreinte moléculaire qui sont cependant généralement utilisés pour des petites molécules plutôt que pour les protéines et peptides. Différents matériaux tels que les billes[136], les monolithes [137], les membranes [138] ou encore les nanocanaux [139] ont été développés comme support solide pour la préconcentration de protéines et peptides. L'utilisation de supports solides et de membranes en microsysteme a été décrite par Peterson [135] et de Jong [139], respectivement. Bien qu'un certain nombre de revues traitant du principe d'extraction et de préconcentration en microsysteme ait été publié par la suite, la plupart d'entre elles ne donnent qu'une brève description des applications [134,140,141], ou sont focalisées sur l'utilisation d'un support solide spécifique tels que les supports monolithiques [142] ou les membranes [143,144].

Nous nous intéressons principalement aux protéines et peptides qui présentent un intérêt clinique notamment dans le suivi des maladies ou dans un contexte de diagnostic. Cependant, leur extraction est compliquée en raison de leur structure complexe et leur hétérogénéité, et d'autant plus dans le cas des biomarqueurs protéiques qui sont présents à de faibles concentrations dans les fluides biologiques [145]. Malgré ces difficultés, l'intérêt pour le développement des méthodes d'extraction/préconcentration de protéines et de peptides en microsysteme a considérablement augmenté ces dernières années [146–149]. Une étude détaillée de la littérature relative aux derniers développements des microsystèmes intégrés appliqués à l'extraction/préconcentration des protéines et peptides n'a montré aucune revue récente, ce qui nous a motivés à proposer la rédaction d'une revue regroupant les travaux publiés entre 2005 et 2015. Ce chapitre est donc présenté sous forme d'une revue intitulée : « *Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices : A review* », qui sera soumise au journal *Analytica Chimica Acta*. Cette revue présente les dernières avancées techniques sur la préconcentration de peptides et protéines sur support solide, notamment les plus rencontrés dans la littérature incluant les billes, les monolithes et les membranes.

**Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides
in microfluidic devices: A review**

Szymon Dziomba^{a,b}, Monica Araya-Farias^b, Claire Smadja^b, Myriam Taverna^b, Benjamin Carbonnier^{a*}, N. Thuy Tran^{b**}

^a*Université Paris-Est, ICMPE UMR7182 CNRS, UPEC, Thiais, 94320, France*

^b*Institut Galien Paris Sud, UMR8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

*Corresponding authors : *carbonnier@icmpe.cnrs.fr, ** thuy.tran-maignan@u-psud.fr*

Abstract

Analysis of proteins and peptides is among the main challenges of today's bioanalytical chemistry. The application of microchip technology in this field is an exhaustively developed concept that aims to create integrated and fully automated analytical devices able to quantify or detect one or several proteins from a complex matrix. Selective extraction and preconcentration of targeted proteins and peptides especially from biological fluids is of highest importance for successful realization of this vision. Incorporation of solid structures or supports is a convenient solution employed to face these demands. This review presents a critical view on the latest achievements in sample processing techniques for protein analysis using solid supports in microfluidics. The study covers the period from 2006 to 2015 and focuses mainly on the strategies based on microbeads, monolithic materials and membranes. Less common approaches have also been briefly discussed. The reviewed literature indicates the future trends which are enclosed in the concluding remarks.

Abbreviations used: *A β* – β amyloid; *BSA* – bovine serum albumin; *CEA* – carcinoembryonic antigen; *CP* – concentration polarization; *DMF* – digital microfluidics; *EDL* – electric double layer; *ELISA* – enzyme-linked immunosorbent assay; *EOF* – electroosmotic flow; *GFP* – green fluorescent protein; *HAS* – human serum albumins; *HSP* – heat shock proteins; *IL* – interleukin; *IMAC* – immobilized metal-affinity chromatography; *LC* – liquid chromatography; *MALDI* – matrix-assisted laser desorption ionization; *MMP* – matrix metalloproteases; *OVA* – ovalbumin; *PE* – phycoerythrin; *POC* – point-of-care; *SPE* – solid phase extraction; *TSH* – thyroid-stimulating hormone; μ *CE* – microchip electrophoresis; μ *TAS* – micrototal analysis system.

1 Introduction

Microchip technology has emerged in the early 90s of the last century and was rapidly adopted in various fields of life science [1–3]. Especially the concept of micro-total analysis systems gained much attention [4] and soon after, the first automated microdevices were reported [1,2]. In practice, development of a so called lab-on-a-chip platform faces many difficulties including sampling, sample processing, mixing and detection, just to mention few [5]. Sample preparation step is usually considered as a bottle neck of the whole analytical procedure and, as such, deserves a special attention.

Performance of extraction/enrichment in chip format is challenging due to the microscale of the whole process. Its successful implementation requires proper design of the system of microchannels and chambers. The layout complexity is usually less demanding in the case of solid supports in comparison to liquid-based processes (like liquid-liquid extraction) as the whole procedure might be conducted in a single channel [6]. This raises also the major issue of liquid mixing in microdevices and makes the former solution more preferable than the latter one. Moreover, a variety of available chemical modifications and great preconcentration potential additionally states for solid supports. Solely electrokinetic techniques like field amplified stacking methods or sweeping feature higher enrichment efficiency in comparison to solid phase extraction (SPE). However, they are generally devoided of selectivity and are less efficient for highly saline samples analysis like biological fluids. Preconcentration strategies either based on electrokinetic process or on solid supports and adapted to microfluidics were thoroughly reviewed by Lin et al. and Giordano et al. and the reader is strongly encouraged to get acquainted with these comprehensive works [7,8].

The main difficulty in employing solid supports lies in their integration into the microsystem. A number of approaches have been published to date for on chip extraction and preconcentration including packed [9] and monolithic [10] beds, membranes [11,12], micropillars [13] or microchannel surface modifications [14]. However, these are only the most common solutions. Adoption of a certain support brings a number of advantages and disadvantages which makes the decision on the proper option difficult. Further considerations include the chemistry of the support which depends on the characteristics of targeted compounds.

Proteins are clinically relevant molecules especially for diagnostic purposes. Extraction of these substances is a challenging task due to their complex structure and non-uniform properties. The issue is even more complicated considering the fact that most of the proteins identified as validated biomarkers are extremely low abundant [15]. Trace level of proteins in analyzed samples and microscale of in-chip processes make the enrichment of targets as much important as their selective isolation from the sample matrix. Exhaustive researches conducted in this area provided a number of solutions for efficient extraction and preconcentration of proteins. Among the published methods, straightforwardly transferred macroscopic techniques were implemented in a miniaturized form as well as novel approaches taking full advantage of the microscale were presented [16–18]. The early steps in the field were summarized by Freire and Wheeler in 2006 [19]. Likewise, Peterson published a comprehensive review on solid supports for on-chip applications and just after De Jong and coworkers reviewed the use of membrane techniques in microfluidics [20,21]. Despite the later published reviews dealing with the principals of

extraction and preconcentration in microfluidic, the discussion on the topic lacked of more detailed description of recent developments especially in the context of peptides and proteins [22,23]. Other articles solely includes selected topics on monoliths [24] or membranes [16,17]. However, since the publication of Freire and Wheeler [19], no comprehensive work summarizing the latest achievements in extraction and preconcentration of proteins and peptides in chips has been provided.

The present review covers the application of the solid supports for extraction and preconcentration of peptides and proteins in microfluidics over the period of the last 10 years. It entails standard peptides/ protein as well as toxins and biomarkers from different media from simple solution to complex biological fluids. The well-established strategies based on microbeads, monoliths and membranes are critically assessed with regards to efficiency, microfabrication easiness and applicability. A brief discussion on extraction and preconcentration mechanisms is also presented in selected cases for a better understanding. This conducted literature study is concluded with some comments on future perspectives of this fast and dynamically developing field.

2. Beads

2.1 Packed beds

Micro- and nanoscale particles packed in microfluidic channel can be considered as a conventional solution commonly employed in chromatographic or SPE columns. Packed bed formation in microchip channel can be found somewhat problematic as additional fabrication of weir-like structures for microbeads retention is usually required [20]. The most often applied solutions involve channel geometry modifications that serve as dams [20], *in-situ* polymerized frits [25] or micropillars [26]. However, it was also found advantageous. Haes and coworkers developed a displacement immunoassay for detection of Staphylococcal Enterotoxin B in the low fM level in milk samples [27]. In the assay, the beads were packed between two slits. This specific geometry of channel resulted in detection sensitivity improvement during electrokinetic sample loading due to the stacking phenomenon. In spite of inconvenient bed deposition in microchannels, chemical modification of beads surface can be performed off-line, before their introduction into microchip system, which is undeniable merit of this solution. Several bed-based processes, requiring significantly different chemistry, can be integrated in a single device. For instance, Yuc and coworkers coupled proteins digestion on trypsin-grafted beads with subsequent selective phosphopeptides capturing on immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) bed [28]. The enzymatic cleaving and digest enrichment was performed in the same channel under continuous sample flow with beds connected in series. The successful application was presented for β -casein while serum analysis revealed significant non-specific interactions. Similar approach was presented by Harrison group [29]. Sample digestion was performed with trypsin-immobilized beads followed by on-line peptides enrichment on commercially available *Oasis*TM HLB beads. Complete cytochrome c (CytC) cleavage could have been obtained within 6 minutes with an order of magnitude preconcentration of the digest. Wen and coworkers used C18-modified beads as a precleaning filter for blood proteins retention which significantly increased the capacity of serial silica-based monolith for nucleic acids extraction [30].

Implementation of any of the certain supports is usually preceded by tedious optimization of bed preparation. In case of permanent structures like monoliths or membranes this

process is inextricably connected with a number of wasted chips. Despite some alternative solutions are being developed for monoliths functionalization [31], off-line beads modifications as well as the possibility of commercial beads application are very advantageous. They are particularly suitable for proteins or peptides pre-concentration due to their large surface area, biocompatibility and easy manipulation. For instance, Gasilova and coworkers proposed the utilization of magnetic microspheres for peptides extraction using C8- and C18-modified beads [32]. The idea was based on gradient elution of extracted material for direct MS analysis. The approach combined several advantages like purification, enrichment and sample desalination together with microdevice simplification (no separation channel or column). Despite detection of selected peptides in human serum samples after OFFGEL fractionation was successfully presented, application to comprehensive proteomic analysis needs further developments. Several authors have also employed magnetic beads, bio-functionalized with antibodies or aptamers, to extract selectively peptides or proteins from complex matrix such as body fluids i.e plasma, cerebrospinal fluid. Thus, Mohamadi and coworkers presented immunocapture of β -amyloid peptides ($A\beta$) from human cerebrospinal fluid samples [33]. The extraction was performed in a single straight channel in which bio-functionalized magnetic beads were maintained using external magnets. Off-line analysis of collected eluate with μ CE and MALDI-MS enabled quantification of $A\beta$ peptides in Alzheimer's disease patients as well as healthy control. Recently, the same group reported integration of discussed extraction method together with preconcentration of eluate on nanoporous membrane followed by μ CE analysis [34]. Despite no significant improvement of $A\beta$ peptides detection was presented, this work is a meaningful step toward fully automated μ TAS system for Alzheimer's disease diagnosis (Figure 1). Analogous workflow to [33] was applied for arginine vasopressin determination [26]. Magnetic beads grafted with aptamers were immobilized in extraction chamber through which diluted sample was continuously perfused for 8h. Despite the time can be considered as relatively long, its significant reduction was achieved when compared to standard immunoassay (3-11 days).

Moreover, a 1000-fold analyte enrichment was obtained. This allowed a sensitive detection down to 1 pM concentration of arginine vasopressin using off-line MALDI-MS spectrometer. The authors have also highlighted that simple static incubation of such a low concentration of analyte with beads was not sufficient to obtain desired sensitivity. Koh and coworkers have reported application of similarly designed device [35]. Aptamer-coated particles were retained in chip using micropillars and diluted blood serum was injected through the system for 20 min. Under the optimized conditions, the authors were able to detect down to about 8 ng of carcinoembryonic antigen (CEA) in 20 μ L of analyzed samples. However, the sensitivity was found far insufficient for CEA quantification in healthy subjects.

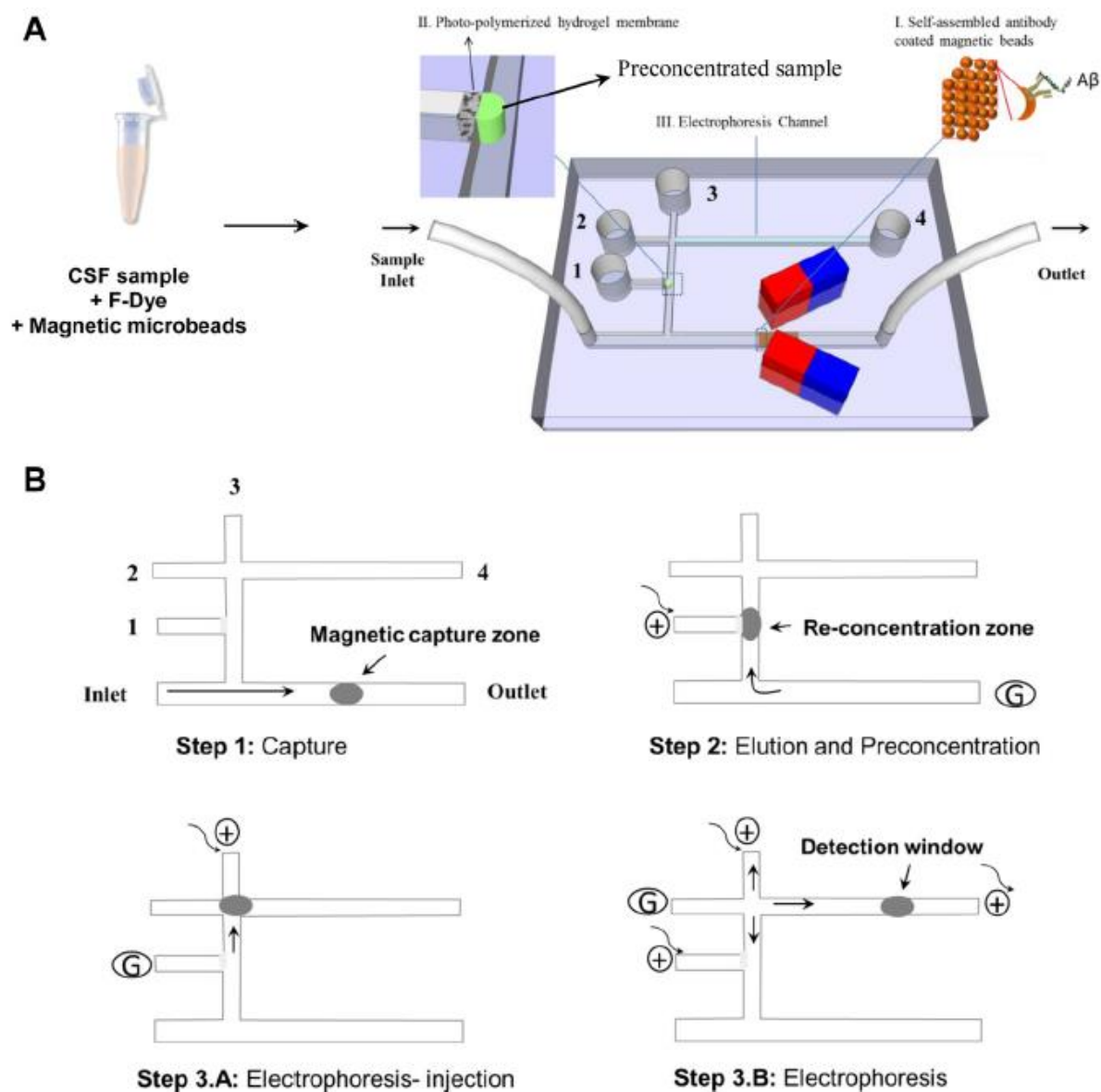


Fig. 1. Scheme of microsystem developed for $A\beta$ peptides capturing. Off-line sample preparation was based on analytes labeling with fluorescent dye and immunocapturing on magnetic microspheres. The mixture was next injected into the microchip where magnetic beads were efficiently retained due to the application magnetic tweezers. Eluted peptides were subsequently preconcentrated using *in-situ* synthesized polymeric membrane. Concentrated plug of analytes was finally delivered to separation channel and particular compounds were resolved using μ CE. Reproduced with permission from [34].

Kinetics of low abundant proteins immunocapture is known to be diffusion dependent and is usually considered as a main limiting factor for ample enrichment of targets on solid supports [36]. To overcome this difficulty, Teste and coworkers developed a method based on the dispersion of magnetic core-shell nanoparticles (NPs) in sample solution [37]. Large surface and liquid mixing caused by Brownian motions facilitated binding of analyte to antibodies immobilized on NPs surface. The mixture was incubated in simple straight channel chip followed by NPs retention using external magnet and ferromagnetic particles to enhance magnetic field strength. Quantification of anti- α -lactalbumin IgE could have been performed in human serum samples in low ng/mL level. Another approach toward kinetics of binding improvement was provided by Mai and coworkers [38]. They have

successfully combined magnetic extraction from human cerebrospinal fluid samples and fluorescent labeling of A β peptides prior to CE-LIF analysis. In this work bio-functionalized magnetic beads (diameter, 2.8 μm) allow an enrichment factor of 100. This immunocapture of A β peptides was implemented in a conical shaped chamber using microfluidized bed. Magnetic beads were subjected to the influence of two counter-driven forces – pressure-driven hydrodynamic and magnetic attraction forces. This lead to a continuous recirculation of the magnetic beads [39]. This strategy not only allowed efficient A β -targeted capture but also enabled labeling of retained peptides with fluorescent dye. Despite the presented research was only a proof of concept, it carry a great potential as it can be easily automated and integrated with various other operations.

2.2 Droplet microfluidics

Recently, magnetic beads-based immunoassays have been performed in confined droplets [40,41]. Droplet microfluidic system in the configuration presented by Ali-Cherif and coworkers enabled selective capturing of TSH from plasma samples followed by ELISA conductance in only 10 min [40]. After extraction of TSH the beads were retained in microchannel using magnetic tweezers which enabled their washing and reagents exchange for ELISA test with subsequently delivered droplets (Figure 2). The enzymatic assay provided sufficient sensitivity (40 pM) for efficient diagnosis of congenital hypothyroidism in newborns. Later, the same group presented high throughput (300 assays per hour) immuno-agglutination test using similar design of microsystem [41]. Immunobeads were firstly dispersed in sample solution which promoted rapid mass transfer between aqueous phase and beads surface. Next, the suspension in form of a droplet was injected into tubing and passed between magnetic tweezers which initiated immuno-aggregation in a presence of antigen. The degree of aggregation monitoring after magnetic gate enabled to quantify down to 100 pM biotinylated phosphatase alkaline (model analyte) without any sophisticated detector.

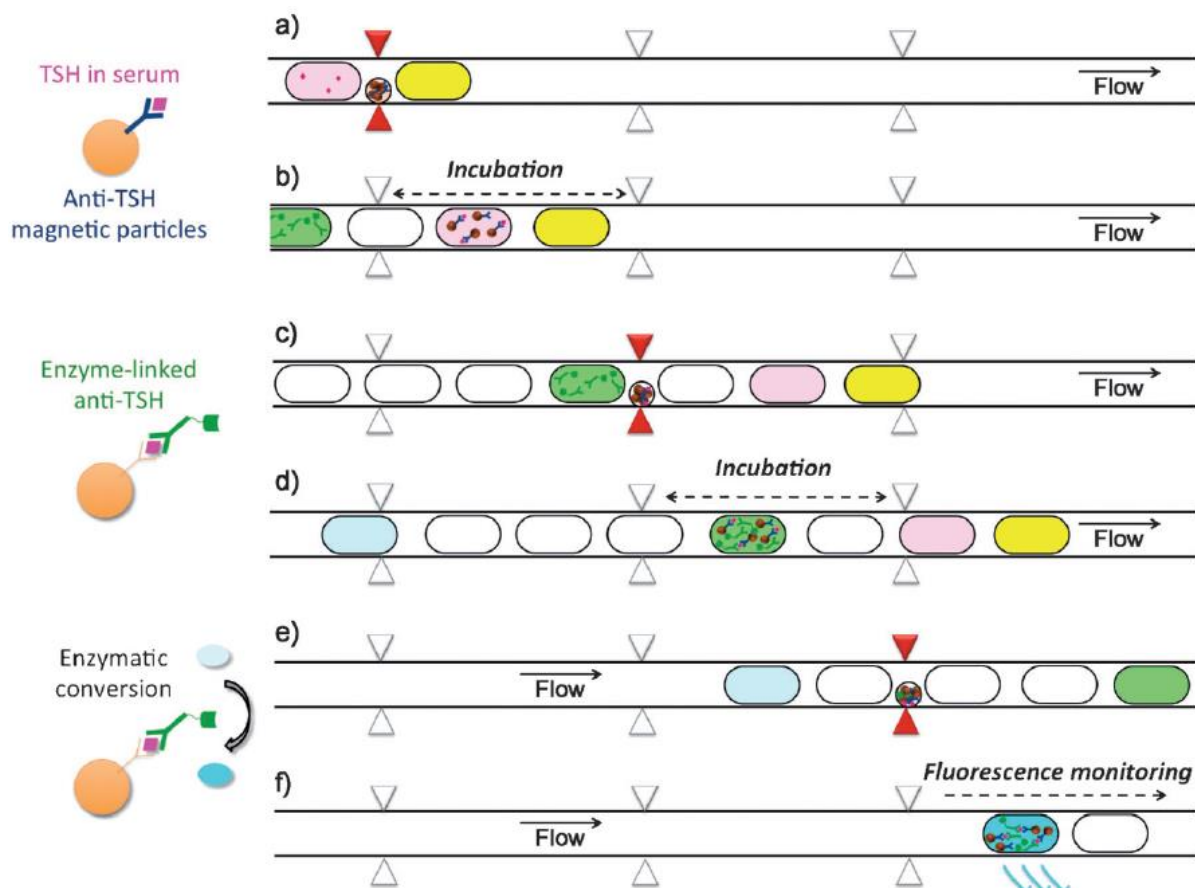


Fig. 2. Scheme of the ELISA test performed in digital microfluidic system. (a) Magnetic immunobeads suspension was introduced into the capillary and retained using external magnet. (b) Subsequently introduced serum sample was delivered to immobilized bed and the external magnet was turned off which enabled the incubation of beads with sample. (c,d) Beads with captured targets were retained using second magnet. The beds were washed with buffer and the secondary antibodies were delivered and incubated with beads. (e) The bed was again immobilized using third magnet, washed and (f) resuspended in fluorogenic reagent solution which enabled detection and quantification of TSH. Reproduced with permission from [40].

2.2 Digital microfluidics

Digital microfluidics (DMF) are currently the most developed alternative to channel-based chips. In contrary to the latter approach, liquid handling in DMF is not limited by the channel geometry and it is based on droplets actuation on a flat surface using e.g. magnetic field, dielectrophoresis or electrowetting-on-dielectric phenomenon [42]. Extraction of proteins and peptides in DMF could have been reached by the application of miniaturized beds suspended in handled liquid. Although various solid supports could have been used for this approach like monolithic discs [43] or gels [44], magnetic microbeads seems to be advantageous due to their tunability, commercial availability and magnetic properties [45]. The most convenient strategy is based on immunocapture of compounds of interest on beads followed by washing procedure and elution or direct ELISA test. These steps can be easily performed through immobilization of deposit using magnetic force and subsequent actuation of droplets over the bed (Figure 3). Both competitive and noncompetitive assays could have been performed using this workflow [46]. It is worth to underline that, for the present state of art, utilization of DMF for multiple analytes determination is strongly

dependent on the number of immunobeads types used which also limits this technique to targeted analysis. Even though some preliminary studies have been presented for sample fractionation using C18-coated magnetic beads [47], comprehensive proteomic or peptidomic analysis of complex biological fluids can be rather challenging. Nevertheless, simultaneous application of beads modified with multiple antibodies [48] and the possibility to perform few assays simultaneously [49] makes this technique extremely attractive. Moreover, DMF devices are universal platforms where various assays can be performed depending on the beads used [50–52].

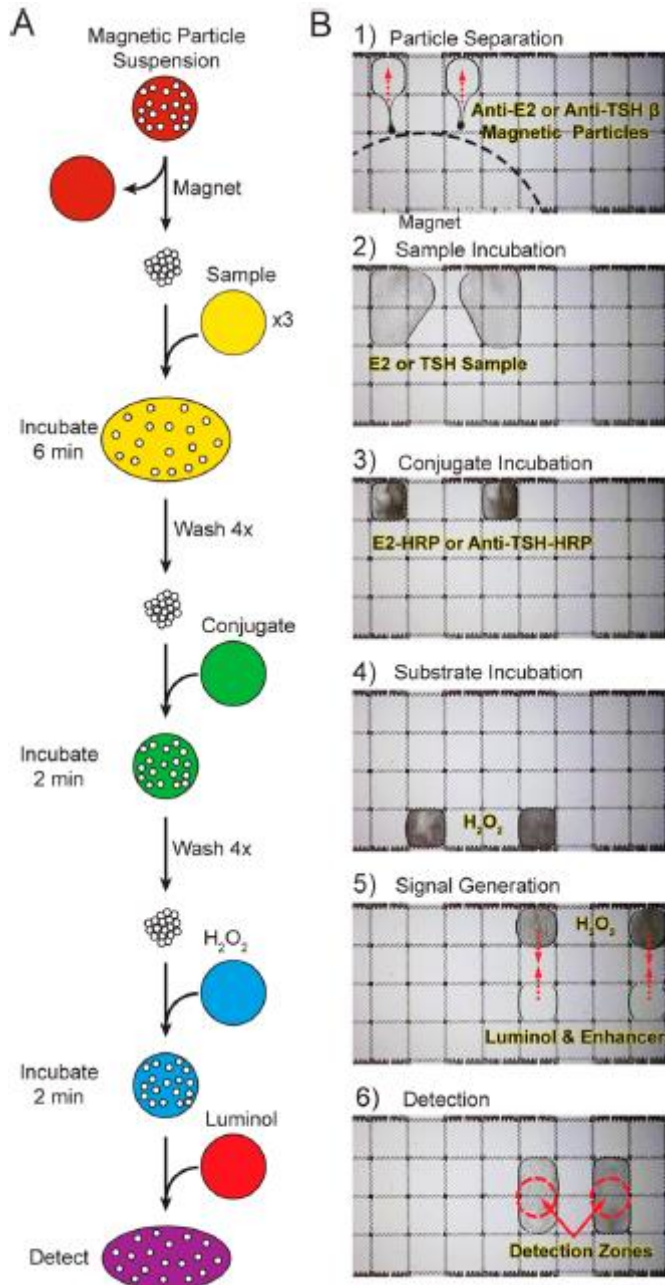


Fig. 3. (A) Scheme and (B) photographs of immunoassay performed in DMF chip. (1) Magnetic immunobeads separation from suspension liquid. (2) Beads incubation with sample. (3) Washing and incubation with secondary antibodies. (4) Reconstitution of beads in H_2O_2 solution. (5) Mixing with luminol and (6) detection of chemiluminescence. Reproduced with permission from [46].

Table 1. Summary of publication on proteins or peptides extraction and preconcentration in microfluidics using beads. *Detection type together with LLOD value (in case LLOD was not estimated, the lowest detectable concentration presented was given).

Beads type	Target molecule	Extraction/preconcentration time	Detection*	Comment	Ref.
Immobilized bed					
C8 and C18 magnetic beads	Synthetic peptides, Bradykinin, Insulin chain B	About 20 min	ESI-MS (10 nM)	Gradient elution of peptides enabled to separate them before MS detection. Plasma samples were analyzed after OFFGEL prefractionation.	[32]
Packed immunobeads	Staphylococcal Enterotoxin B in milk	20 min	Fluorescence (1 fM)	Combination of displacement immunoassay and elektrokinetic sample staging resulted in six orders of magnitude sensitivity enhancement.	[27]
Packed aptamer-coated beads	CEA in human serum	About 35 min	Off-line MALDI-MS (400 ng/mL)	The beads were packed against micropillars. The sensitivity was found insufficient to quantify the CEA on satisfactory level.	[35]
Magnetic immunobeads	A β peptides	135 min	Off-line CE-LIF (60 nM)	Derivatization of peptides was conducted on-line after immunocapture.	[38]
Magnetic immunobeads	A β peptides	---	Off-line μ CE and MALDI-MS	The procedure enabled to detect the most abundant A β peptide in human CSF samples	[33,53]
Magnetic immunobeads/polymeric membrane	A β peptides	180 min	μ CE (250 ng/mL)	Analytes were first immunocaptured on immobilized magnetic beads followed by on-line preconcentration of the eluate using polymeric membrane and μ CE analysis.	[34]
Aptamer-coated microbeads	Arginine vasopressin	8 h	Off-line MALDI-MS (1 pM)	Despite the relatively long time was required for the efficient immunocapture, the significant improvement was found in comparison to standard immunotest (up to 11 days).	[26]
Antigen-coated magnetic microbeads	IgE in human serum samples	20 min	Spectrophotometric (1 ng/mL)	The developed method featured improved binding kinetics which resulted in shortening of assay time and five orders of magnitude sensitivity enhancement.	[37]
HLB microbeads	CytC digest, angiotensin II, leu-enkephalin, LHRH	About 20 min	ESI-MS (100 nM)	The elaborated system integrated on-chip protein digestion, digest extraction and preconcentration on a separate bed and on-line sample separation and MS detection.	[29]
C18 microbeads	Human blood samples	35 min	---	The bed was used as a precleaner for human whole blood most abundant proteins featuring about 70% efficiency.	[30]
Fe ³⁺ -IMAC beads	β -caseine digest	About 30 min	Off-line CE and LC-MS (1 mg/mL)	The presented system incorporated samples digestion followed by on-line eluate retention and preconcentration using IMAC bed.	[28]
Droplet microfluidics					
Magnetic immunobeads	TSH in human plasma	10 min	Fluorescence (40 pM)	Application of microfluidics enabled to perform ELISA assay in less than 10 min using 1000 times smaller volume of reagents and sample in comparison to standard assay.	[40]
Magnetic immunobeads	Phosphatase alkaline	High sample throughput (300 samples per hour).	Digital camera (100 pM)	The assay was based on agglutination test.	[41]
Digital microfluidics					
Magnetic immunobeads	TSH standard	About 10 min	Chemiluminescence 0.15 uIU/mL	Design of experiment enabled to shorten the analysis time and improve the method parameters like precision and sensitivity.	[49]
C18 magnetic beads	Angiotensin I standard	About 12 min	Off-line ESI-MS (50 μ g/mL)	The efficiency was comparable to C18 ZipTip extraction. Sequential elution enabled separation of angiotensin from sitamaquine.	[47]
Magnetic immunobeads	HSA, IgG	10 min	Off-line MALDI-MS	Developed method enabled to remove up to 95% of most abundant proteins from human serum samples.	[48]
Magnetic immunobeads	TSH standard	6 min	Chemiluminescence (0.83 μ IU/mL)	In-chip performed ELISA test was 10 times faster and 100 times less reagents were consumed in comparison to typical assay.	[46]
Magnetic immunobeads	Cardiac troponin I in whole blood	8 min	Chemiluminescence (5 ng/mL)	The versatility of the developed device was presented also for other application like PCR analysis.	[50]
Magnetic immunobeads	IL-6 and Insulin	7 min	Chemiluminescence (1.5 pg/mL and 7 pM, respectively)	High extraction efficiency was observed for standards (about 100%).	[51]
Magnetic immunobeads	IgE standard	---	Fluorescence (150 nM)	---	[52]

3. Monoliths

The word monolith is derived from the Ancient Greek word monolithos with monos meaning “single” and lithos, the “stone.” In the context of functional materials meant for analytical sciences, the term monolith describes a continuous single rod with porous structure made of mesopores and macropores [54–56]. The macropores (> 50 nm) work as flow-through channels for solvents transport through the monolithic material, whereas mesopores (2-50 nm) provide high surface area for the efficient interaction with (macro)molecular analytes [57,58]. Furthermore, chemical nature of the monolith pore surface can be tuned in terms of hydrophobic/hydrophilic balance and/or charged state, providing selectivity of the interaction mechanism. High permeability, low backpressure and fast mass transfer are three distinguishing characteristics of such monolithic structures.

Pionner works, conducted independently by Hjerten et al. [59] and Svec and Fréchet [60] on organic monoliths and further supplemented by the contributions of Tanaka et al. [61] on silica-based monoliths have revolutionized the field of columns technology [62]. To date the range of monolith-related applications has encompassed all the fields of analytical chemistry and has even been extended to chemical and biochemical synthesis applications. Monolithic stationary phases are indeed available for reversed-phase [63,64], normal [65], charge transfer [66], hydrophilic interaction [66–69], ion-exchange [65,70], size exclusion [71] and chiral [72–74] (electro)chromatography allowing the separation of low molecular weight analytes, such as amino acids as well as dimers, peptides and (bio)macromolecules [75–81].

Although monoliths have been initially designed as chromatographic media, they have been used for solid-phase-extraction (SPE) purposes since over 15 years [82–84]. [54,85,86] have reviewed the use of monoliths for SPE and preconcentration purposes in 2006 and 2008, respectively.

Monolith-based microreactors have also been considered and their performances evaluated towards ester hydrolysis [87], enzymatic degradation of polynucleotide [88], high throughput tryptic digestion [89–91], solid phase peptide synthesis [92,93], reduction of nitro-arenes into amino-arenes [94,95] and Fe(III) to Fe(II) [96], oxidation of Nicotinamide adenine dinucleotide [97].

Despite the profusion of the monolith-related literature currently being generated, it is worth mentioning herein that developments in the context of microfluidics were done in the last few years. Indeed, the first microdevice integrating a polymeric monolithic stationary phase was reported by Ericson et al. in the early 2000s [98]. In this work, an acrylamide-based monolith was prepared *in-situ*, i.e. through polymerization within the channels of a quartz microdevice. Local immobilization of wall-anchored monolith was achieved within channel pretreated with 3-(methacryloxy)propyl trimethoxysilane. Separation of alkyl phenols, antidepressant drugs and proteins by electrochromatography and anion-exchange chromatography was demonstrated. Since then, extensive research efforts have been devoted to developing monolithic stationary phases and integrating them into microfluidic systems.

Although this critical review is dedicated to in-chip application of monolith for extraction and pre-concentration purposes, we wish briefly mentioning that monoliths have also been

applied in microfluidics for other purposes. Photopatterned porous monoliths have indeed served as flexible retaining elements for common HPLC particle materials [25], as nanoelectrospray emitters for direct coupling to mass spectrometry [99,100], as flow control devices for valving technology allowing potential integration of HPLC within microsystem [101], as micromixers enhancing for instance the mixing efficiency for on-chip labeling reactions in plastic microfluidic chip [102,103] and as enzymatic microreactors for the short digestion time of proteins [104] and as chemical reactor for Pd-catalyzed C-C coupling reactions [105].

It is also worth mentioning that on-chip solid phase extraction using monolithic concentrators has also concerned all types of molecules other than proteins and peptides. In 2005, Craighead and coll. described the design of cyclo-olefin polymer chip with dual functionality [106]. Solid phase extraction monolith was coupled to mass spectrometry via an on-chip electrospray tip. Mass spectrometry served for the monitoring of both adsorption and elution of imipramine to and from the on-chip SPE monolith element. Sample cleanup potential of the approach was fully evidenced as concentration factor over 200 was obtained for imipramine spiked in human urine. Recently, Vazquez and Paull reviewed the applications of monoliths in microfluidic devices [24].

3.1 Short survey of monolith synthesis

Monoliths can be broadly classified into two main groups depending on the chemical nature –*organic or inorganic* – of the precursor materials used for the preparation; i.e. of the monolithic skeleton. The corresponding materials are commonly referred to as polymer and silica porous monoliths, respectively. Comprehensive reviews have been published to describe both the formation and characteristics of the said monoliths [54–56,107–109]. It should be also mentioned that although less common, organic-inorganic hybrid monoliths have gained interest over the last years in the context of microscale analysis [110–113]. Of particular interest, such hybrid structures can be easily synthesized within microchannel through original synthetic methods combining the chemical reactivity of both organic and inorganic structures [114].

In the light of the here-above mentioned contributions, the objective of this section is not to provide additional thorough discussion about synthesis of monoliths but rather to highlight the important features inherent to their preparation process. In this respect, it should be mainly considered as a discussion of general interest for the community of analytical chemists.

3.2 Polymer porous monoliths

The underlying concept of designing organic polymeric monoliths relies on the free radical polymerization of a homogeneous mixture containing monomers, cross-linkers, radical initiator and porogens. Both thermal and photochemical initiation methods have proved efficient, although the photodriven approach, to our point of view, ensures a number of advantages such as short reaction time and easy site-specific immobilization and surface-functionalization of monolith within and along micro-channels using photomask technology [115,116].

Short after initiation, nuclei made of growing polymer chains are formed leading, *in-fine*, to the formation of the so-called microglobules. The choice of the experimental conditions

is crucial in determining the size of the nuclei and consequently, size of pores. Indeed, porous properties are often controlled by the composition of the polymerization mixture and the initiation rate of polymerization. After the polymerization is completed, porogens and unreacted compounds can be simply removed through extensive washing giving rise to a monolithic structure consisting of small globuli fused together into spheres of about 1 ± 0.3 micron in size and forming a highly porous scaffold with, in-between, tortuous porous channel network with high flow-through permeability. Preparation can be performed through either unique polymerization step or a multi-step process involving the post-polymerization modification of the polymeric monolith surface [117,118]. The former approach implies the use of functional monomers bearing a functional side group able to act as ligand providing specific interaction with the (macro)molecular targets. The latter approach has been largely applied to the grafting through photografting, nucleophilic substitution, ring opening nucleophilic addition as well as radical- and and cyclo-addition click reactions [69,72,119,120].

Both porous features and surface anchoring of the monolith on the inner wall of the channel are key parameters to be well-adjusted towards this aim. Deviation from bulk porous structure is often observed when monoliths are prepared within the confines of micro-sized geometries [121]. Such an effect is usually observed when the confining dimensions are within a factor of 5–10 of the pore size of bulk monolith. Micro-sized channels exhibit intrinsically large surface-to-volume ratios favouring enhancement of surface-dominated effects. These can be detrimental to the *in-situ* monolith synthesis depending on the chemical compatibility between the containers with hydrophilic or hydrophobic surface characteristics for glass- or plastic-based materials, respectively, and the reactive solution that is, in most cases, apolar owing to the nature (alkanes and/or high molecular weight alcohols) of the porogens. As such, surface derivatization of the channel inner wall is often a prerequisite to the successful *in-situ* synthesis of monolith [115,122,123]. Glass chip technology has largely taken advantage of the knowledge in surface derivatization of fused-silica capillaries through implementation of silane chemistry while for thermoplastic microfluidic chips which are considered today as highly competitive alternatives because notably to the ease and cost-effectiveness of their design, new and original procedures had to be developed [115,122–124].

PDMS microsystems have been surface-derivatized *via* photografting either directly onto the native polysiloxane surface [99], or subsequently to a prior step of benzophenone adsorption [125–128], oxidation and subsequent silanization [129] and modification by intertwining monomers within the PDMS matrix [130]. Stachowiak et al. discussed the photografting in the presence of benzophenone of a thin polymer layer bearing pendent C=C double bonds on the wall of cyclic olefin copolymer (COC) channel using a mixture of ethylene diacrylate (EDA) and methyl methacrylate (MMA) [115]. The pendent double bands served as efficient anchoring sites for the monolith in the course of its preparation by UV-induced polymerization. Recently, the group of K. Faure has reported on the dual use of 2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) acting simultaneously as type I and type II photoinitiator for the generation of free radicals during monolith synthesis and the abstraction of hydrogen from the plastic chip surface [131]. The approach was developed to hydrophilize the surface of COC chip through the efficient photografting of poly(ethylene glycol) methacrylate and was extended to the use benzoin methyl ether ascertaining the versatility of the type I initiator-mediated process. SEM observations evidenced the beneficial role of type I photoinitiators to synthesize and anchor a monolith inside COC microchannels.

More recently, some of us have reported on a new strategy for the simultaneous synthesis and efficient anchorage of methacrylate-based monoliths in native PDMS microchips [132]. To establish the method, a truly type II photoinitiator, namely 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propiophenone, was used in the polymerization mixture allowing the simultaneous free radical polymerization and on-wall anchoring of monolith with potential phosphopeptides preconcentration ability.

A solvent-assisted process was described by the group of DeVoe as a unique strategy for the integration of pre-fabricated and pre-functionalized monoliths within thermoplastic microfluidic devices (Figure 4)[31]. Monoliths incorporating glycidyl methacrylate (GMA) or butyl methacrylate were photopolymerization within a molding microchannel milled in a COC substrate and capped with PDMS layer or electrical tape. Omission of COC channel walls treatment for the surface-attachement of the monolith allowed easy de-molding by simply peeling away the tape layer. GMA-monolith were further functionalized by grafting protein and fluorescent dye (bovine serum albumin, rhodamine B) prior to reintegration within COC chip. A solvent bonding strategy was applied by exposure of the COC channel and capping layer to an ethanolic solution of decahydronaphthalene allowing both softening, without any distortion, of the channel. Such a treatment ensured anchoring and fluidic sealing of the reintegrated monoliths. For the authors, the process allows circumventing traditional limits as homogeneity and chemical compatibility with the microfluidic substrate inherent to the *in-situ* photopolymerization of monoliths. The approach was extended to the capture of nucleic acid in microfluidic chip [133].

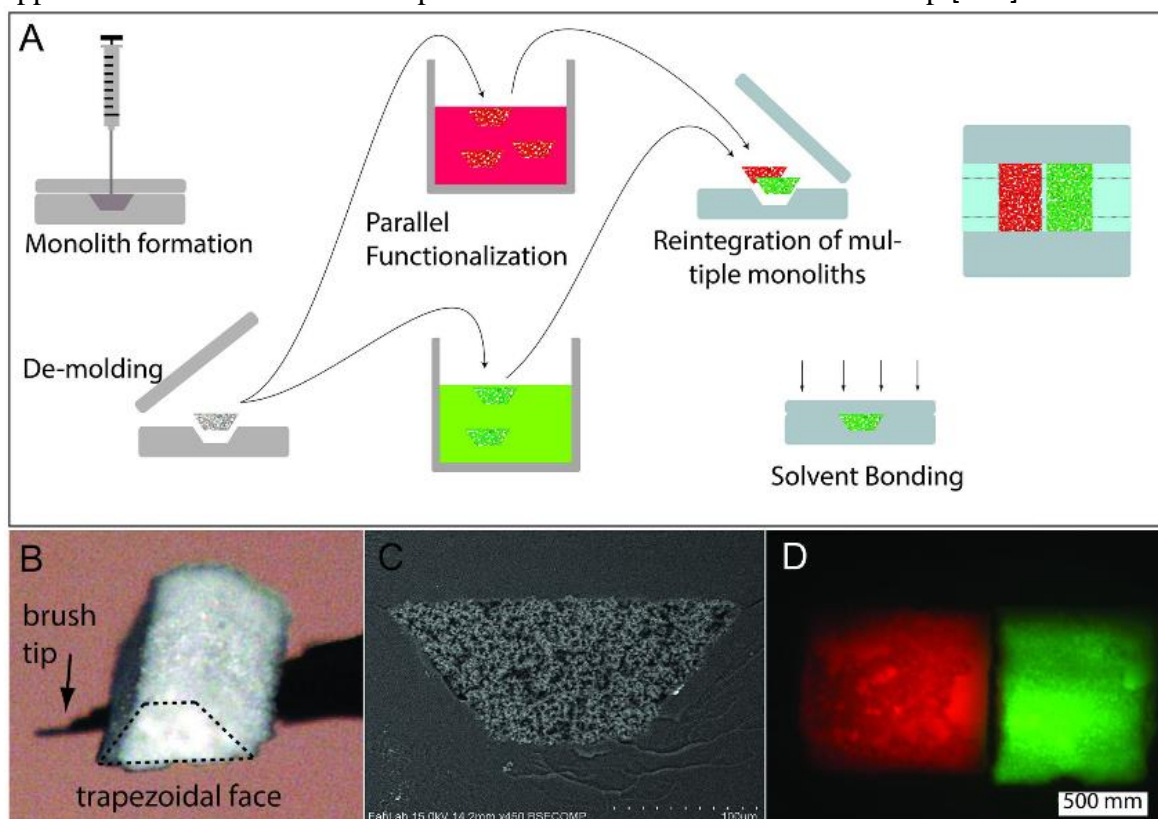


Fig. 4. (A) A scheme of off-line synthesis and functionalization of polymeric monolith followed by its assembly in plastic chip. (B) Photograph of prepared monolith (about 200 μm wide and 400 μm long). (C) SEM photograph of monolith immobilized in chip channel. (D) Two monoliths in chip channel stained with fluorescent dyes. Reproduced with permission from [31].

3.3 Silica porous monoliths

Silica-based monoliths with a well-defined bicontinuous structure are commonly prepared by a sol-gel process. The first sol-gel reaction with phase separation for the preparation of silica-based monoliths was reported by Nakanishi and Soga in the early 1990s [134]. The basic sol-gel process involves the preparation of siloxane (Si–O–Si) network by the sequential hydrolysis and polycondensation of a silane compound or a mixture of such compounds as tetramethoxysilane (TMOS), tetraethoxysilane (TEOS) or methyltrimethoxysilane (MTSM) under acidic (acetic acid) or basic conditions (urea) in the presence of a porogenic agent such as poly(ethylene) glycol. Figure 5 shows the chemical structure of a sol-gel silica network obtained *via* sol-gel process using mixed alkoxy silanes (TMOS and MTSM)[56]. In the course of the polycondensation process, the reaction product becomes insoluble and precipitates. Depending on the experimental conditions, the polysiloxane network can precipitates either as particles or as monolithic mass with large pores where the porogen and additives remain located. After phase separation, the as-obtained gel is aged and a mesopore network is observed to grow at a moderately alkaline pH [135,136]. After drying and heating treatments of the gel, the last step in preparing a silica-based monolithic column is the derivatization of the pore surface according to the envisioned applications. Grafting of alkyl-, amino-, cyano- or hydroxyl-containing selectors can be easily done through siloxane bond linkage formation using conventional silane chemistry [137]. One of the most widely reported functionalization involves the surface grafting of octadecyldimethyl-(N,N-diethylamino) silane to obtain hydrophobic stationary phase for RP chromatography [135].

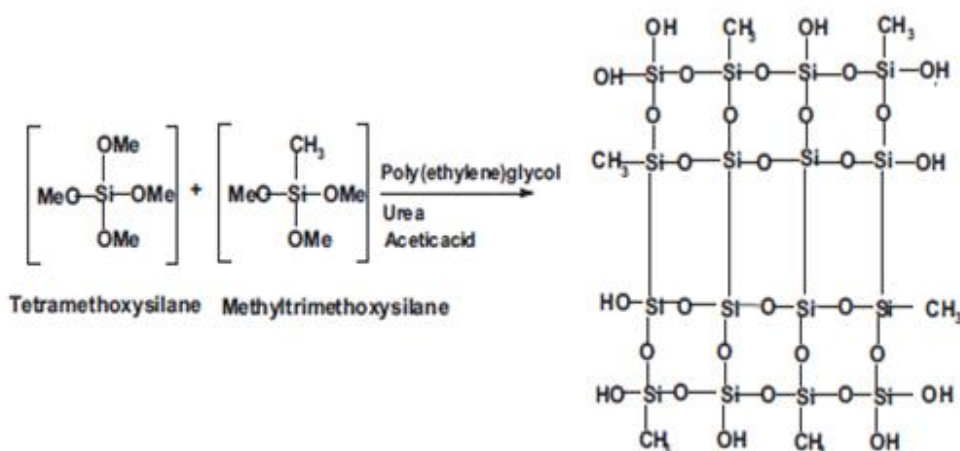


Fig. 5. Silica monolith preparation using mixed monomer via sol-gel method. Reproduced with permission from [56].

The sol-gel method was then further improved by [135,138], [139,140] and [141] and adapted to create silica-based monolithic materials for high performance liquid chromatography (HPLC), capillary electrochromatography (CEC) and gas chromatography (GC) [141,142]. In parallel to all these developments, silica monoliths have been used as immobilized enzymatic reactors [143] and as sorbents in solid phase extraction [84]. Exhaustive and comprehensive reviews have also been previously published on preparation and application of silica-based monolith columns and the readers are cordially invited to refer to references [56,144–146].

Although sol-gel monoliths can offer high permeability and excellent mechanical stability as they are not affected by organic solvents as polymer-based monoliths, their preparation is laborious, especially when performed *in-situ* and often results in drawbacks such as cracks formation and poor reproducibility [55,147]. Moreover, thermal treatments associated with silica monoliths preparation make the literature on fused-silica capillaries difficult to be transferred to the microfluidic chip format, since the stationary phase needs to be localized. Photoinduced polymerization has been proposed for the preparation of silica-containing monoliths as an alternative approach of thermally induced polymerization. Such monoliths can be formed by sol-gel radical polymerization of a mixture made of silica monomers, an acid catalyst, a porogen, and a photoinitiator. The Zare's group introduced photopolymerized sol-gel (PSG) monoliths in the early 2000s for use in CEC separations [148,149] and preconcentration [150,151]. The same group introduced, for the first time, a silica-based monolith in microchips by using PSG technology [152]. The authors used a 3-trimethoxysilylpropylmethacrylate (MPTMOS) as monomer, an acid catalyst, a porogen (toluene), and a photoinitiator (Irgacure 1800) to fabricate a 4.7 cm long PSG monolith in a borosilicate glass microchip by using photomasks. The PSG monolith was strongly anchored to the channel walls even if the channel was not chemically treated. The chromatographic performance of PSG monolith was demonstrated by the separation of two neutral Coumarin dyes.

However, only a limited panel of the available chemistries that have been developed in capillary have been adapted to the microfluidic chip format [144,153,154].

3.4 Applications

Application of silica-based monoliths in microchips has considerably grown during the last 10 years. Initial research investigations have been primarily focused on small molecules analysis [155,156] and DNA purification [157,158]. In fact, only a few recent articles have described the use of silica-based monoliths as solid supports for protein extraction and preconcentration in microchips.

Alzahrani and Welham prepared an octadecylated silica monolith by sol-gel process inside glass microchip for extraction and preconcentration of milk proteins [159,160]. Figure 6 shows a schematic illustration of the chip design together with scanning and transmission electron microscopy images of the extraction chamber containing the monolith. Combination of both microscopies evidences the hierarchical structural morphology of silica monolith. The authors designed a circular extraction chamber (2 mm depth and 6.5 mm width) rather than a channel to get a faster flow, which allowed decreasing analysis time while ensuring robust contact between the monolith (the sorbent bed) and the sample solution. The prepared monolith was found to have a surface area of $154.29 \pm 5.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ with a mean pore diameter of $12 \pm 4.2 \text{ nm}$ [159]. Performance of the microchip was evaluated for the extraction of insulin, cytochrome C, lysozyme, myoglobin, β -lactoglobulin, hemoglobin and for the preconcentration of milk proteins. The octadecylated silica monolith achieved high extraction recovery of the six proteins (94.8–99.7%) as compared to conventional octadecylated silica particles (48.3–91.3%) with a good reproducibility (RSD 2-6%). After MALDI-TOF-MS analysis, the signal intensities measured for the milk proteins preconcentrated using the octadecylated monolith were significantly increased (around 2 to 10 fold) as compared to those obtained using conventional extraction method using a DSC-18 cartridge.

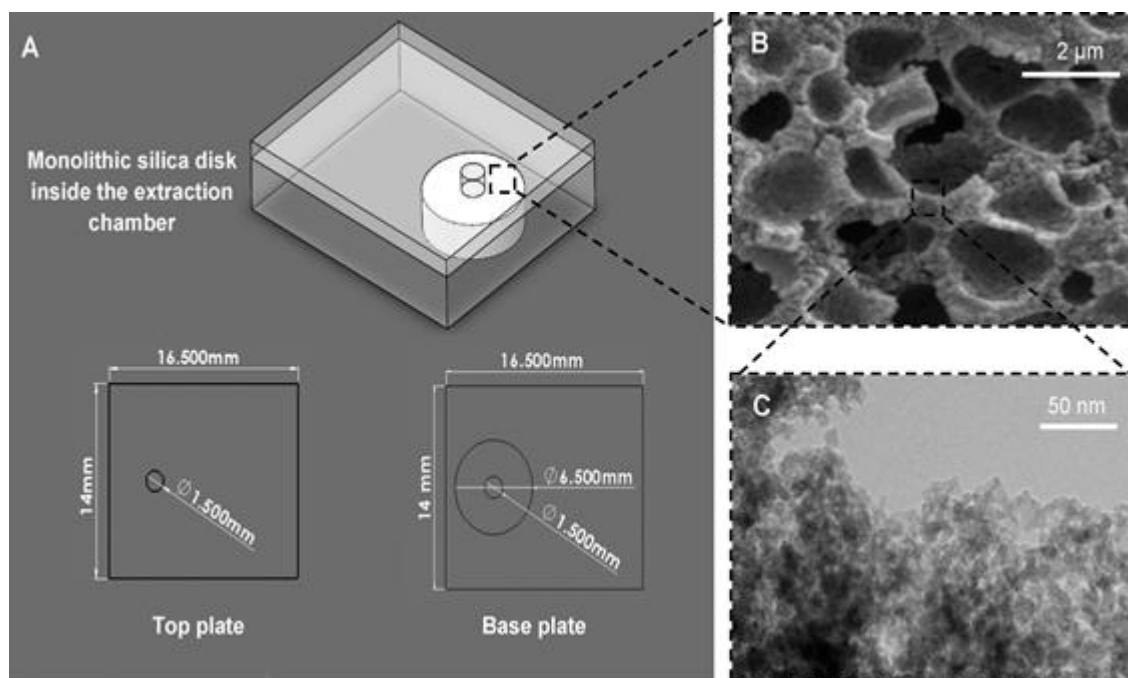


Fig. 6. (A) Schematic diagram of the glass microchip used for milk proteins preconcentration, (B) a close-up of the octadecylated silica monolithic structure as seen using Scanning Electron Microscope (SEM), and (C) image of the meso structured silica monolith that was obtained with Transmission Electron Microscope (TEM). The sol-gel precursors were 2.256 ml TMOS, 0.282 g PEO, 2.537 ml of 1 M HNO₃ and 0.291 ml of distilled H₂O. Reproduced with permission from [160].

Levy et al. developed a PSG monolith in PDMS-based microchips (using 3-trimethoxysilylpropylmethacrylate (MPTMOS) and glycidyoxypropyltrimethoxysilane (GPTMOS) as monomers and Irgacure 1800 and ethylene glycol diglycidyl ether (EDGE) as photoinitiator and porogen agent, respectively (Figure 7)[156,161]. Attachment of the monolith was achieved by adsorbing the photoinitiator onto the channel walls prior to introduction of the sol-gel solution into the channel. Surface of the monolith was further functionalized with boronic acid ligands through on-chip reaction with an aqueous solution of aminophenylboronic acid.

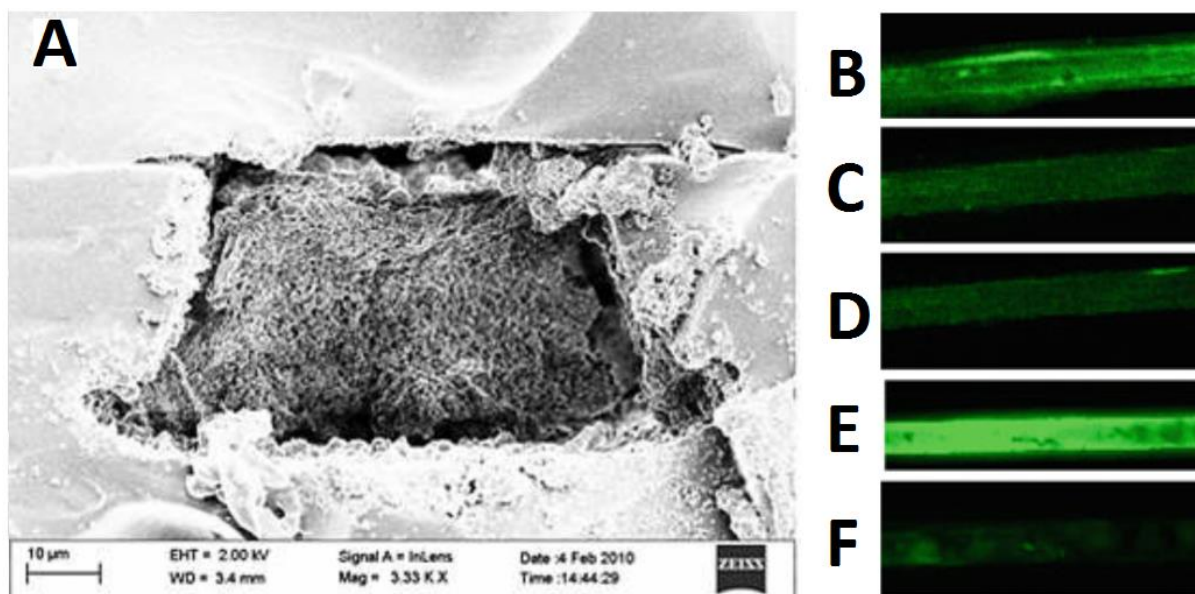


Fig. 7. (A) Representative SEM micrograph of boronic acid functionalized monolith formed in PDMS microfluidic chip (3300 X magnification)[161]. (B-F) Images of fluorescence in the chip after: (B) loading with conalbumin (buffer pH 8.3); (C) washing (buffer pH 8.3) ; (D) elution (buffer pH 3.8); (E) loading with nalbumin (buffer pH 8.3); (F) washing (buffer pH 8.3) steps [156].

The authors first demonstrated that PSG monoliths functionalized with boronic acid can be efficiently used for the extraction of conalbumin, selected as model glycoprotein, the detection of which was achieved by fluorescence measurements. As shown in Figure 7B-F, conalbumin can be eluted from the boronic acid-functionalized monolith only under acidic (pH 3.8) elution conditions. When native monolith was used, conalbumin was removed during the washing step at pH 8.3. This finding evidences the strong interaction between conalbumin and the surface-grafted boronic acid units acting as driving force for the preconcentration mechanism. The relatively low capacity (30 %) observed for conalbumin was attributed to the mesopore size (3.22 nm) which hinders diffusion of large proteins within the pore structure and consequently limits interfacial interactions [156]. After this proof of concept for solid phase extraction of proteins, the authors envisioned the extraction of glycoproteins and glycopeptides from a tryptic digest of horseradish peroxidase on the same monolith. The MALDI-MS results proved that the glycopeptides were retained on monoliths with boronic acid functionalities and that the interaction could be disrupted by lowering the pH of the buffer solution leading to purification of the said proteins. In contrast, when no boronic acid moieties were present on the monolith surface, no qualitative differences were noticed between the fractions collected at various stages of the extraction process. This confirmed undoubtedly the occurrence of interaction between the boronic acid of the monolith and the sugar units of the glycopeptides.

The Group of Svec introduced the first photopolymerized monolith for on-chip SPE enrichment of peptides and proteins in glass microfluidic devices [10]. Microfluidic chip integrating a simple straight microchannel (100 μm wide, 40 μm deep, and 6 cm long) was prepared at the microfabrication laboratory of the University of California at Berkeley from glass wafers. Monoliths were prepared by photo-triggered copolymerization of butyl methacrylate with ethylene dimethacrylate, or 2-hydroxyethyl methacrylate and [2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethyl ammonium chloride with ethylene dimethacrylate. Prior to the photopolymerization, the inner wall of the microchannel was vinylized to ensure

covalent attachment of the polymer. Fine control of porous properties and surface chemistry – *hydrophobic or ionizable* – of the monolith enables high flow rate (up to 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) and enrichment of a hydrophobic tetrapeptide (Phe-Gly-Phe-Gly) and a green fluorescent protein. Increase in concentration by a factor as high as 10^3 was achieved.

PMMA microdevices integrating an immunoaffinity pretreatment coupled with on-line capillary electrophoresis separation were developed for the extraction/separation of FITC-tagged proteins (immunoglobulin G and human serum albumin) from a contaminant (recombinant green fluorescent protein) protein [162]. A 2 mm long monolithic section with epoxy side groups was locally synthesized by direct *in-situ* photopolymerization of glycidyl methacrylate allowing the grafting of antibody, namely antifuorescein isothiocyanate. The authors claimed an elution efficiency of 92% was for FITC-HSA, combined to a fast separation of the eluted protein. Another key development of this contribution was the incorporation of two processes – *extraction and separation* – within unique automated and miniaturized platform.

1-mm long on-chip monolithic columns incorporating cationic charge were synthesized in glass microfluidic devices for solid phase extraction coupled to electrospray mass spectrometry [163]. Butyl methacrylate was copolymerized with [2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride and ethylene glycol dimethacrylate by exposure under UV irradiation. Specific location of the monolith section was successfully achieved using a transparency mask. Of particular interest, the cationic charge of the monolith enabled electro-osmotic flow generation and was found to be compatible with the use of a polycationic surface coating for the subsequent channel section. This was beneficial to the development of an electrokinetically-driven on-chip SPE of proteins as the positive charge state of the overall chip inner-wall surface provided a high quality solid phase extraction bed together with a robust coating preventing non-desired proteins adsorption.

In another implementation, design of disc-shaped porous polymer monoliths was achieved by dispensing monomer droplets onto designated spots on a digital microfluidic (DMF) device followed by photopolymerisation [43]. The authors reported solid phase extraction efficiencies for fluorescamine-labeled angiotensin IV up to 93% that is comparable to those usually observed for commercially available ZipTips. Moreover, the combination of porous polymer monolith and digital microfluidic is compatible with straightforward sample extraction and recovery.

Table 2. Summary of publication on proteins or peptides extraction/preconcentration in microfluidics using monoliths . *Detection type together with LLOD value (in case LLOD was not estimated, the lowest detectable concentration presented was given).

Support	Target molecule	Enrichment factor	Detection*	Comment	Ref.
Monoliths					
Octadecylated silica	Insulin, cytochrome C, lysozyme, myoglobin, β -lactoglobulin, hemoglobin	Extraction recovery 94.8–99.7%	HPLC-UV MALDI-TOF-MS	Glass microchip for extraction and preconcentration of milk proteins.	[159, 160]
Boronic acid functionalized hybrid monolith (photoinduced sol-gel polymerization)	Conalbumin, BSA	-	Fluorescence MALDI-MS	PDMS-based microchips extraction of glycoproteins and glycopeptides from a tryptic digest of horseradish peroxidase.	[156, 161]
Apolar and cationic organic monoliths (photo-triggered copolymerization)	Hydrophobic tetrapeptide (Phe-Gly-Phe-Gly), GFP	10^3 enrichment	Fluorescence	On-chip SPE enrichment of peptides and proteins in glass microfluidic devices.	[10]
Glycidyl methacrylate with surface-grafted antibody	IgG and HSA standards	About 2-fold	Fluorescence (20 μ g/mL)	PMMA microdevices for on-line protein extraction and capillary electrophoresis. Selective immunocapture was proved.	[162]
Buthyl methacrylate reversed-phase monolith	HSP90 and BSA standards	6-11-fold	Fluorescence (100 ng/mL)	The extraction was followed by on-chip labeling with fluorescent agents.	[164]
Buthyl methacrylate reversed-phase monolith	BSA tryptic digest	150-fold	Fluorescence	The system was composed of separation channel filled with hydrophobic monolithic for on-chip LC and short (1 cm) pre-column for sample enrichment.	[165]
Buthyl methacrylate reversed-phase monolith coated with cationic polymer	Carbonic anhydrase, chymotrypsinogen, ribonuclease A, CytC, lysozyme	105-fold (calculated for BODIPY dye)	CE-UV	Monolith coating was performed with a PolyE-323. Protein digestion was performed on-bed.	[163]
Hydrophobic polymeric disc	Angiotensin standard	9-fold	Off-line ESI-MS	Polymeric disc was synthesized <i>in-situ</i> in the DMF device. Extraction efficiency similar to commercial ZipTips.	[43]

4. Membranes

Membranes are among the most commonly used solid supports for analytes preconcentration in microfluidics. This large success is mainly due to both the wide applicability towards small molecules as well as biopolymers and large variety of membranes. The latter feature makes difficult providing unambiguous definition of “membrane”. In the context of chip technology, the most suitable definition was proposed by de Jong and coworkers describing a membrane material as a ‘semi-permeable barrier’ [21]. This universal concept is applicable to every structure discussed in this section regardless its nature and specificity in the preconcentration mechanism.

First reports on microfluidics and membranes coupling concerned desalination of biological samples using dialysis in ‘cartridges’ and ‘dialysis devices’ [166–168]. Soon later, the first microdialysis and electrokinetic enrichment of DNA on porous silicate layer in typical chip format were presented by Xiang et al. [169] and Khandurina et al. [11], respectively. Pioneer works in this field have been reviewed elsewhere and will not be described herein [21].

Key milestone in on-chip membrane technology was the successful *in situ* photochemically-assisted synthesis of short polymer plugs in microchannel [12] together with

application of membranes for electrophoretic preconcentration of DNA and proteins as described in the aforementioned papers [11,12]. This proof of concept resulted in a rapid growth of research interest in applying membranes in microfluidic devices.

4.1 Mechanism of preconcentration

Neutral porous membranes exhibit typical mechanism of retention of compounds with molecular weight larger than the molecular weight cut-off (MWCO) characteristic of the said membrane. In other words, preconcentration on neutral membrane is mainly driven by size-exclusion effects. Interestingly, a two fold increase in the enrichment factor was obtained for DNA molecules using neutral membranes compared to the ones reported for charged membrane [170]. However, lack of repulsion between analytes and solid supports leads to only partial penetration of analyte into or through the membrane [170,171] that may result in carryover effects and repeatability deterioration. These drawbacks have contributed significantly to the widespread use of charged membranes. The mechanism of preconcentration using charged membranes is more complex.

To date, most of the reported studies on charged membranes dealt with negative ones [16,17]. Accordingly we discussed here-below the mechanism of preconcentration for membranes with negative surface-functionality (Figure 8). Membranes can be considered as either a single or multiple nanochannel(s) at the interface of two microchannels (Figure 8A). Assuming inner diameter of nanopores in a range of 10 to 100 nm, overlapping of the electric double layer (EDL) formed onto the inner walls of the nanochannel may be observed (Figure 8C) [172]. Efficient repulsion of anions by the EDL is obtained while applying a voltage, resulting in cation-selective transport through the pores (Figure 8C). This induces the formation of a zone with net negative charge on the anodic side of the membrane leading to the migration of anionic species toward the positive electrode to preserve the electroneutrality of the solution. Thus local decrease in ionic species concentration on the anodic side (depletion zone) is accompanied with increase in ionic strength on the opposite site (ions-enriched zone) of the membrane (Figure 8B). Difference in ions concentration on both sides of the membrane is called concentration polarization (CP) effect [170,173].

Ions enrichment on cathodic side of the membrane is limited by the number of ions transported through the membrane and reaches a saturation plateau when the ions concentration in the depleted zone reaches zero. Electron carriers-depleted zone exhibits significantly higher electric field strength and increased zeta potential on channel walls in comparison to other compartments of the microsystem [172]. Due to this fact, up to two orders of magnitude higher (than typical) velocity of electroosmotic flow (EOF) is observed [174,175]. Such high flow rate acts as a driving force for ongoing high speed accumulation on the anodic side of the membrane (preconcentration zone in Figure 8B). This enrichment process can be efficiently performed even for a few hours [174] as EOF continuously pumps fresh sample from the anodic reservoir to the preconcentration system. This EOF features parabolic profile across the channel (atypical for electrophoresis) which can be observed in the characteristic boat-like shape of preconcentrated zone [176].

Preconcentration using CP phenomenon is a complex non-equilibrium process and the above discussion presents only a basic features. Detailed description can be found in an excellent review by Han and coworkers presenting theoretical aspects of preconcentration using CP effect [17]. Comprehensive insight into the mechanism was provided in a number

of mathematical approaches and computer simulations [16,170,173,177–181]. It was proved that the most pronounced fluctuations concern ionic strength and pH values along the channels [16,180,182]. It should be kept in mind while handling with CP concentration polarization that ionic strength and pH values directly influence the efficiency of on-line processes conducted simultaneously with CP preconcentration e.g. immunocapture of analyte [183].

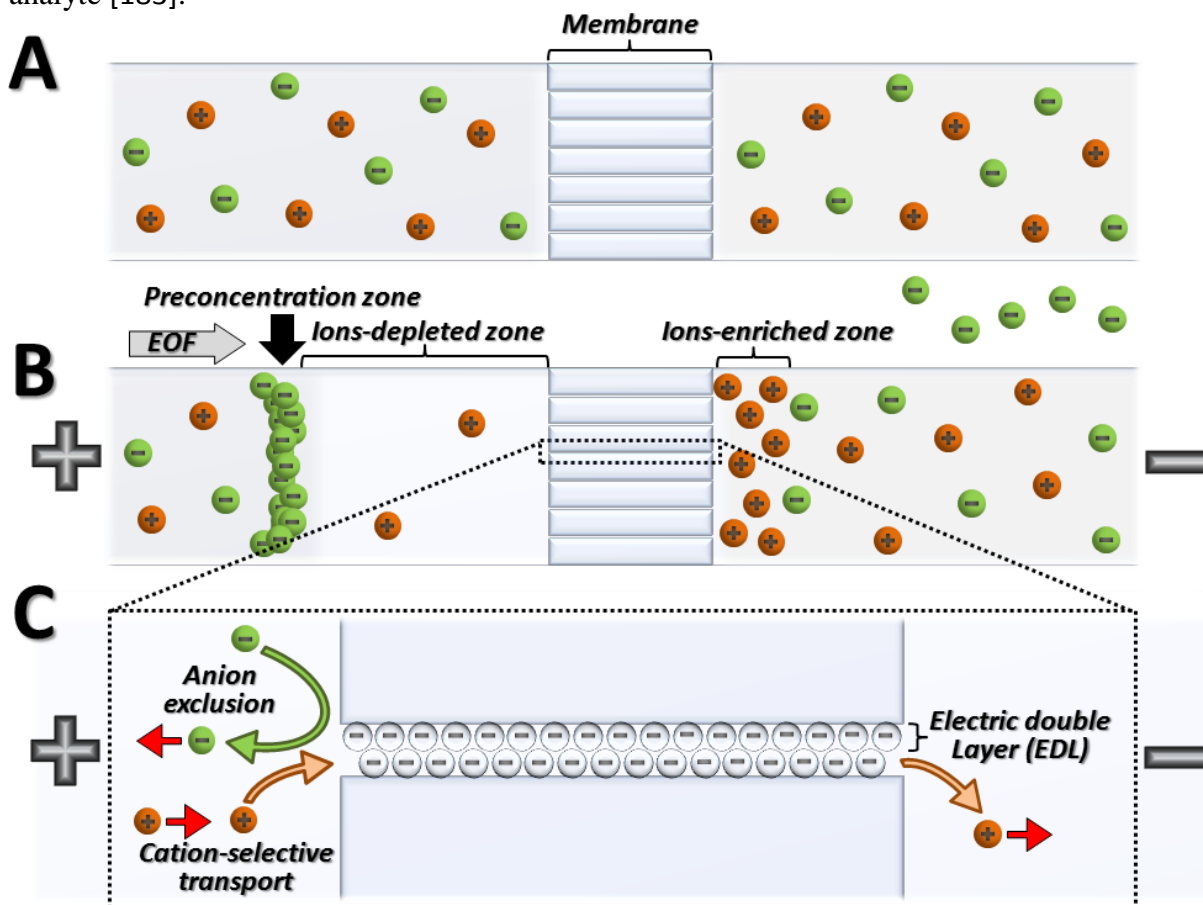


Fig. 8. Scheme of preconcentration of ionic species using negatively charged membrane. (A) Microchannel is filled with a solution containing cationic (⊕) and anionic (⊖) molecules. (B, C) Application of voltage results in electrophoretic migration of each species toward the proper electrode. Repulsion between anions and EDL in nanopores leads to cation-selective transport through the membrane. In consequence, CP phenomenon is observed. Red arrows indicate direction of effective migration for a given ion.

4.2 Fabrication of membrane-assembled microdevices

Preparation of nanostructured membrane in microdevices can still be considered as a challenging task. A number of solutions has been proposed to date. Depending on the membrane nature, three distinct subsections were extracted: in situ synthesized polymers, commercially available membranes and nanostructures (nanochannels and nanogaps).

4.2.1 In situ synthesis

Preparation of polymer- or gel-based membranes directly in microfluidic channels is the most widely used approach. Short (30-80 μm) monolithic plugs can be obtained by a photodriven process through the irradiation of a channel filled with the polymerization mixture [12,184,185]. Photomasks or laser beams are commonly utilized to restrict the

irradiated area. Moreover, addition of low concentration of polymerization inhibitors, like hydroquinone, helps to overcome free radicals diffusion during synthesis [186] and thus, providing clear limitation of the plug to the irradiated zone. Preparation of longer plugs (about 500 μm in length) from multiple shorter ones by repetition of the whole synthesis process was also reported [187]. Pros and cons of photo-driven preparation in microdevices are discussed in ‘monoliths’ section and the reader is referred to this chapter.

Synthesis of inorganic [188] or hybrid [189] membranes by implementing typical sol-gel approach was less commonly reported. Moreover, and to the best of our knowledge, no application of inorganic membranes for peptides or proteins preconcentration was described to date.

4.2.2 Commercial membranes

Undoubtedly, one the major advantages of using commercially available membranes is the absence of tedious optimization step of constructed membrane. They are also insensitive to swelling and shrinking behaviors, which are typical for gel-based materials. Moreover, some membranes like Nafion® exhibit much higher ions conductivity allowing stabilization of the depletion/enrichment zones observed in CP phenomenon [190–192].

The main challenging task to be considered in this case, is the assembling of membranes in microchannels. A number of solutions has been proposed in the literature to address this problem. A straightforward approach has been initially presented by Xiang and coworkers [169]. Two cellulose filters were directly sandwiched with clamps between three polycarbonate molds beforehand patterning within microchannels. Similar “sandwiching” approach was used for PDMS chips [193] based on the protocol of Chueh and coworkers [194]. Polycarbonate membrane (10 nm of pores diameter) was irreversibly mounted using PDMS prepolymer as glue (Figure 9A). Specially designed reservoirs have also been used for membranes assembling [190,195]. In this case, the membrane was placed between the chip and the interior side of the reservoir. Interestingly enough, this method does not require chip design modifications or reconstruction.

Nafion® membranes have gained special attention due to its small pores diameters and high charge density on its surface resulting in excellent permselectivity for cations. Han’s team took advantage of the possible introduction of such material into microchannels in the form of dispersion in lower aliphatic alcohols followed by thermal curing on glass or PDMS slides [191,192,196]. The as-obtained nanometer-thick membrane can be used to create a junction between separate channels (Figure 9B). Versatility of Nafion® is evidenced by the fact that CP effects can be even obtained in single channel device with a membrane attached to the channel wall [183]. Application of single membrane for integration of 10 separate devices into an array or multiplexed device composed of up to 128 units was presented [183,191,196]. For detailed description of the fabrication process the reader is kindly referred to comprehensive review by Kim et al. [17].

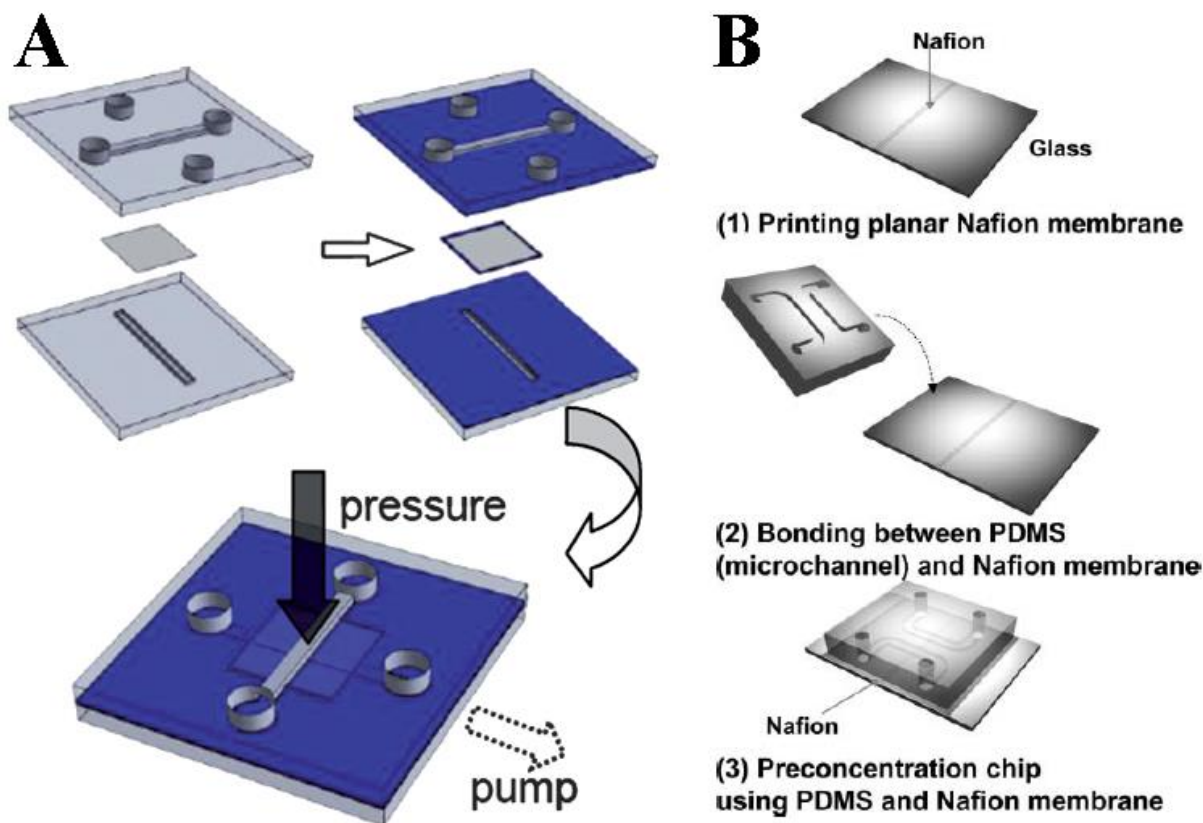


Fig. 9. Schematic assemble of commercially available membranes into microchips. (A) Integration of a polycarbonate membrane between two PDMS molds using PDMS prepolymer (indicated with blue color) as a glue. (B) Integration of a Nafion® membrane in form of a strip connecting two separate channels. Reproduced with permission from (A) [193] and (B) [191].

4.2.3 Nanochannels and nanogaps

Occurrence of CP is conditioned by the presence of ion-selective structure between both sides of the electric potential. The role of such membrane can be ensured by a nanometer-wide junction between microchannels. Moreover, nanochannel permeability for ionic species (similarly to nanopores in ‘typical’ membranes) can be controlled by both nature and concentration of the buffer solution, as these parameters have a direct impact on the electric double layer thickness on channel walls.

In the early work on this topic, Wang and coworkers used an etching technique to form a 40 nm deep connection between two channels [174]. The as-designed device was applied to the preconcentration of GFP providing enrichment up to seven orders of magnitude in 1 hour.

Recently, Sung and coworkers have developed fast and efficient microdevice using similar layout [197]. Utilization of multiple nanochannels improved the preconcentration speed ($>10^5$ -fold in 5 min) for fluorescently labelled mouse IgG. Moreover, by adjusting the voltage applied to the microchannel after preconcentration process, it was possible to move the analyte band within the channel to a desired position for downstream processes with a limited loss of efficiency.

Kim and coworkers observed that proteins pre-concentration can be conducted in a PDMS-glass microchip device using a 20 μm gap (Figure 10)[198]. It was found that reversible bonding of these two materials using air plasma treatment provides a nanoscale slot which can act as a nanochannel. Up to 10^6 fold enrichment of fluorescently tagged BSA and OVA have been performed within 30 min. Moreover, it was possible to separate analytes right after focusing using the same device.

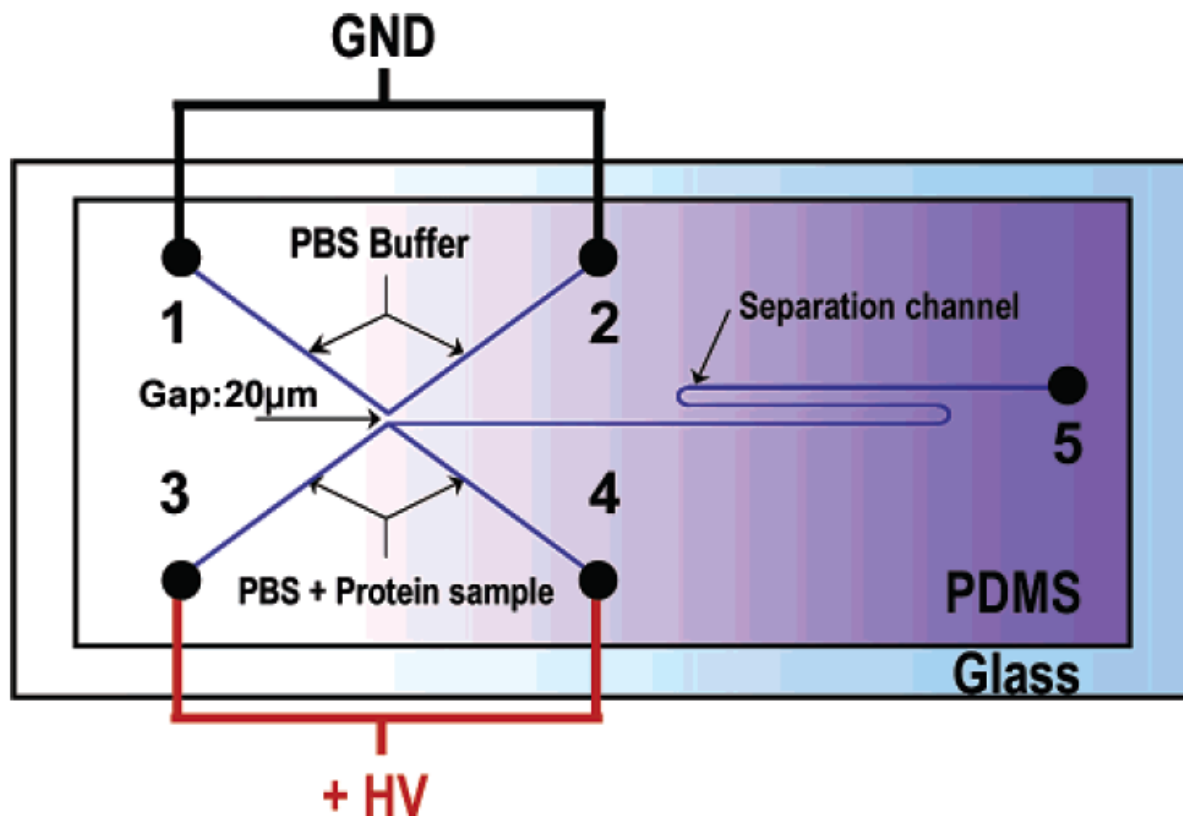
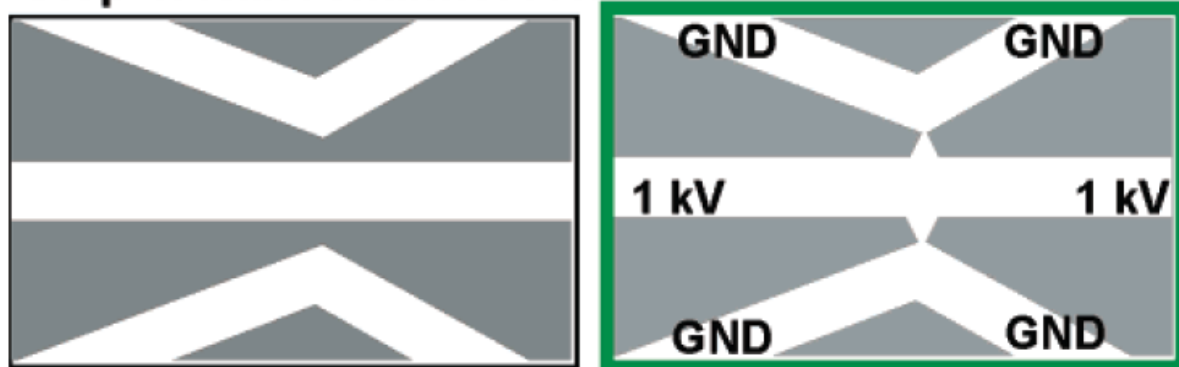


Fig. 10. Scheme of microchip designed for pre-concentration and on-line separation of proteins. The enrichment effect was achieved due to the nanochannels formed in the gap between channels 1-2 and 3-4 (more details in text). Sample CP-based pre-concentration was followed by μCE separation of enriched analytes. Reproduced with permission from [198].

Preparation of junction gap between three microchannels in PDMS microdevices was presented by Lee and coworkers [199]. The nanochannel was formed by applying a voltage value exceeding the dielectric strength of the PDMS material (junction gap breakdown) (Figure 11). On the basis of current measurements, the authors proved the reproducible preparation ($\text{CV} < 6\%$; $n=5$) of channels depth. The authors further reported on a 4 orders of magnitude pre-concentration of β -phycoerythrin in 60 min.

Step 1. Nanochannel formation



Step 2. Preconcentration

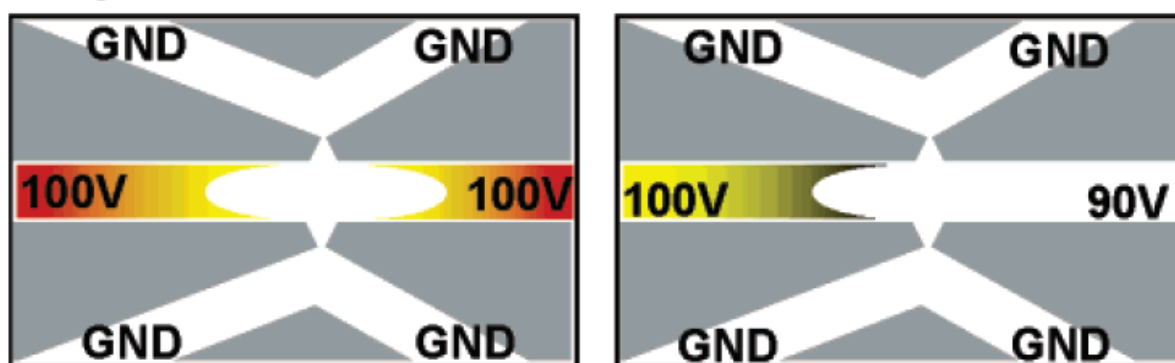


Fig. 11. Schemes of (1) nanochannel formation using electric breakdown and (2) application of the formed nanochannel for analytes preconcentration using CP effect. Description in text. Reproduced with permission from [199].

Preparation of membrane in PDMS-glass microdevices using electric breakdown method can be improved by the deposition of gold nanoparticles on the junction gap before molds sealing [200,201]. This approach requires not only lower voltage for electric breakdown of PDMS material but also leads to the formation of a larger number of nanopores which is advantageous to preconcentration efficiency.

A low cost device for proteins preconcentration was presented by Yu and coworkers [202]. The channels were printed on a transparable PET (poly(ethyleneterephthalate)) sheet using laser printer. Two V-shaped mirror-imaged channels were separated with a 100 μm thick toner gap. Application of electric breakdown caused the formation of nanofissures between these two channels that were further used for enrichment process.

Kwok and coworkers have reported on the precise formation of nanochannels using electric breakdown [203]. The authors have observed that highly localized current leakage through the semiconductor (or conductor) leads to nanopore formation which is strongly dependent on concentration and pH of the electrolyte. It was pointed out that this technology can, in future, enable to design extremely precise micro-nano junctions for analytical applications.

4.3 Application

Most of studies dealing with the use of membrane technology reported on 10^2 - 10^5 -fold sample enrichment in less than 10 min (Table 3). High enrichment factors and accumulation rate clearly evidence the potential of the “membrane” approach for proteomic analysis in microsystems, although the method is generally considered to provide medium or even low selectivity. Application of CP has been dedicated to a rather broad range of species like fluorescent dyes, peptides and proteins [174,187]. Preconcentration of a unique specie from a more complex mixture can be obtained in a various ways.

Enrichment and subsequent separation of concentrated molecules can be considered as a classical approach in CE systems [204]. μ CE separation in tandem with nanochannel-based preconcentrator was originally presented by the team of J. Han [174]. Later, Kim and coworkers used similar strategy for OVA and BSA proteins enrichment in a glass/PDMS chip using electric breakdown-formed channel [198]. Another group reported on the photochemical synthesis of polymeric membrane in the side arm of standard cross-channel chip [187]. The monolith was localized near the cross-section channels. Exemplary application was presented for α_1 -glycoprotein and bovine fetuin digest analysis with 200- and 50-fold sample enrichment, respectively, together with subsequent μ CE separation. Similar design was used by Nge and coworkers [205]. 10-fold preconcentration of fluorescently labeled α -fetoprotein and HSP90 was shown. However, in all these publications, only model molecules were tested and the authors did not consider complex matrices such as real biological samples.

Singh team described the use of fluorescently tagged antibodies that were loaded against gel membrane (Figure 12)[206]. This step was followed by sample introduction from a separate reservoir resulting in simultaneous mixing with the previously introduced antibodies and enrichment. The obtained mixture was subsequently separated using a sieving gel. To eliminate signals broadening and irreproducibility inherent to CP effects, separation was conducted using freshly prepared buffers localized in two additional on-chip reservoirs [184]. The use of fluorescently tagged aptamers instead of antibodies was also discussed using similar system [171]. Analysis of saliva and serum with minimal sample pretreatment (dilution) was successfully achieved for the quantification at low pM level of various proteins including toxins like ricine, Shiga toxin I and Staphylococcal enterotoxin B using a semi-automated system for POC assays [171,206,207].

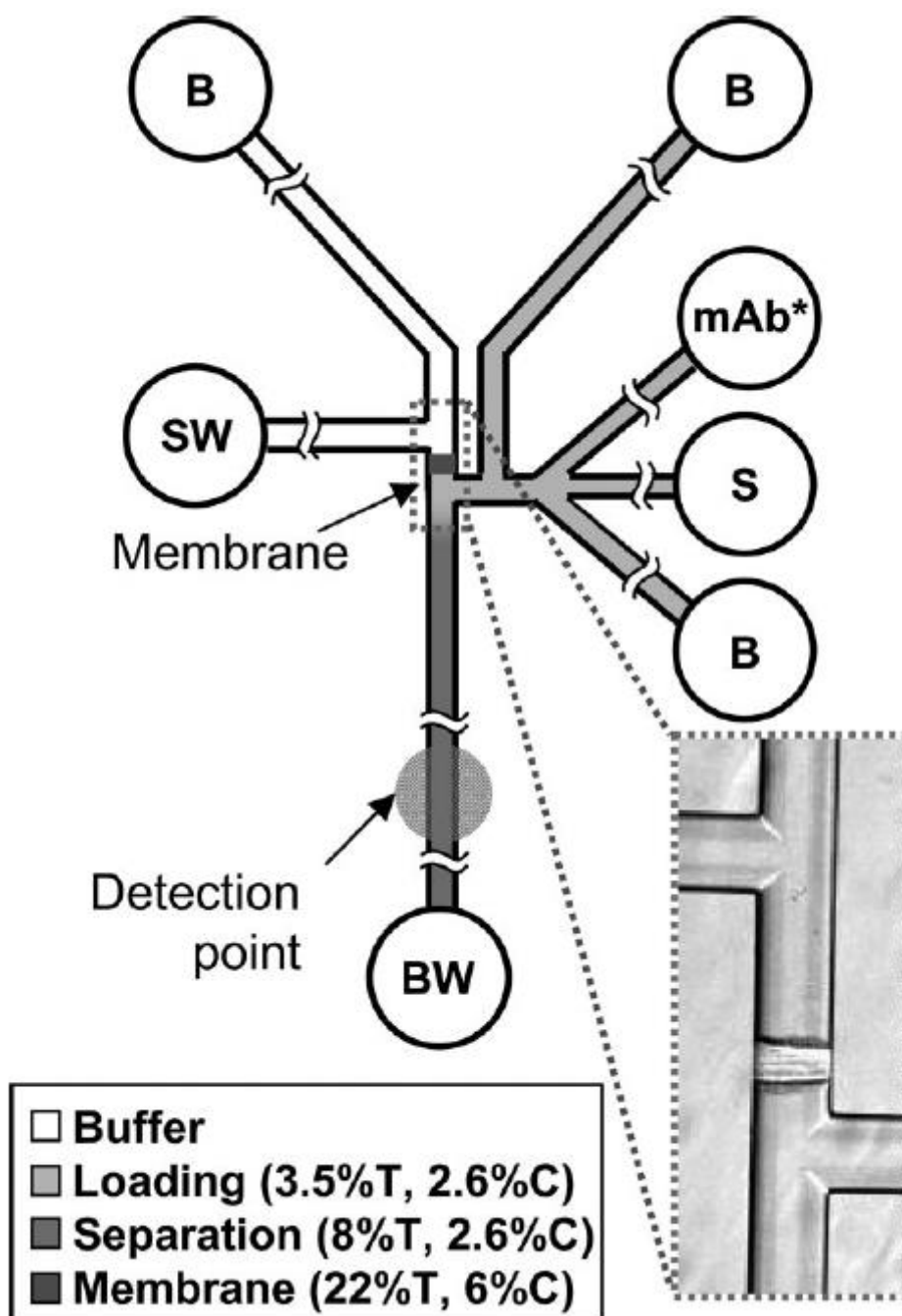


Fig. 12. A scheme of microchip developed for MMP-8 determination in saliva samples. Sample was electrokinetically loaded against a membrane, preconcentrated and mixed with fluorescently labeled antibodies. Next, the electrophoretic separation was conducted in the polyacrylamide gel. Abbreviations of reservoirs: B – buffer; BW – buffer waste; S – sample; SW – sample waste; mAB* – fluorescently labeled antibodies. Reproduced with permission from [206].

Coupling of the separation process with other manipulations increases the complexity of the whole design. Moreover, detection of targeted compounds is limited by the peak capacity. As such, straightforward detection seems to be the more favorable strategy. Utilization of CP effect for local increase of target concentration meant for immunoassay was proposed by Wang and Han (Figure 13)[208]. Antibodies-coated microbeads were incubated in the sample preconcentrated zone and further used to improve assay sensitivity

up to 500 times and extend linearity range by two orders of magnitude. Similar results were obtained with antibodies immobilized on the inner surface of microfluidic channel or on the surface of spotted gold dots using Nafion® [209,210] or polymeric membrane [211]. The said systems found practical applications under saline conditions (isotonic PBS buffer). Moreover, the beads-based approach can be parallelized allowing increase of the sample volume and construction of calibration curve in a single run [196]. It is worth mentioning that the beads-based approach can be parallelized allowing increase in the sample volume and construction of calibration curve in a single run

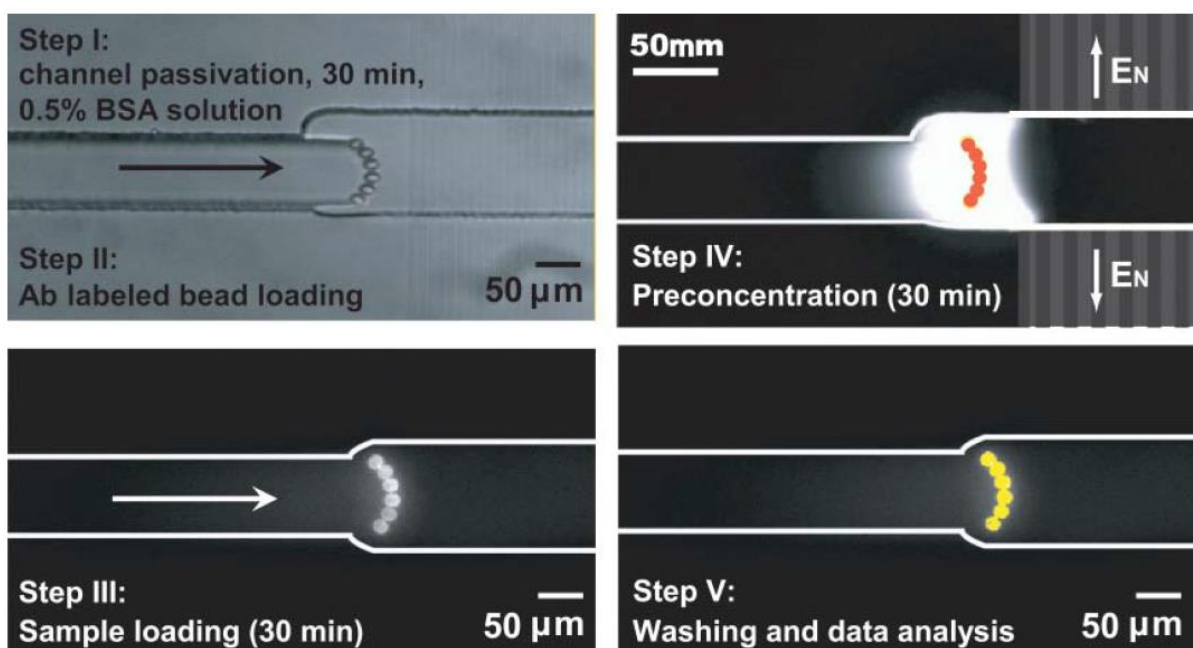


Fig. 13. Immunosensing of proteins (GFP or PE) using antibodies-coated beads and targets preconcentration on membrane. Reproduced with permission from [208].

Jen and coworkers used immunosensing electrode for the specific detection of BSA [201]. The analyte was preconcentrated using nanogap-based membrane while electrochemical detection enabled quantitative probing of biological target down to 1 nM.

Another group proposed a strategy based on the off-line displacement test [212]. In the assay, elution of fluoresceine-labeled biotin on magnetic beads surface occurred in the presence of untagged molecules. Then, the sample was preconcentrated using microfluidic system with two polymeric membranes and the fluorescence intensity was recorded on the focused zone.

On chip monitoring of enzymatic reaction can be also improved with CP effect [213,214]. This approach enables increased sensitivity and speed of the enzymatic reaction. The reaction can be monitored directly in the microfluidic channel [213,214] or in droplet microreactor [215,216]. For the latter, preconcentrated enzyme plug was transported by a hydrodynamic flow to the mixing chamber where fluorescently tagged substrate was delivered. The mixture was subsequently encapsulated with lipophilic envelope. Progress of the reaction was simply monitored by direct observation with the help of a fluorescence microscope inside each single droplet. The major drawback was the 5-fold loss of sensitivity during transport of enriched sample in the microfluidic channel.

Applications of membranes assembled within microfluidic devices for simultaneous sample pre-fractionation and pre-concentration were also reported. For instance, a continuous-flow microdevice was developed for proteins and cells pre-concentration [217]. The PDMS device had Y-shaped channel design. One side arm had significantly lower diameter compared to the other two ones and was used for collecting the enriched retentate. Proteins could be successfully enriched by two orders of magnitude using this system.

Sommer and coworkers reported on microfluidic device for molecules fractionation according to their isoelectric points (Figure 14)[218]. The prototype system contained three membranes. After initial sample pre-cleaning on neutral membrane, the analytes were isolated using membranes prepared with different immobilines ratios. The biological targets were simultaneously pre-concentrated on excluding membrane due to CP effect.

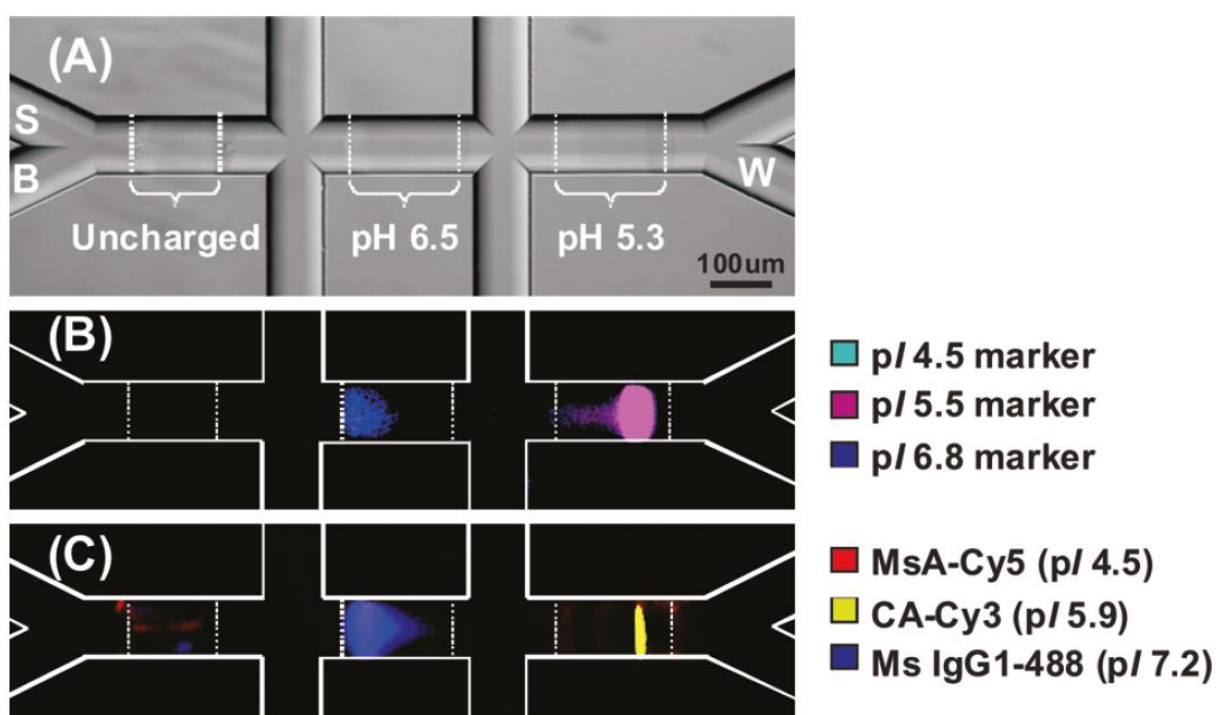


Fig. 15. Preconcentration and fractionation of proteins due to their isoelectric points using photopolymerized membranes sensitive to pH. (A) A photograph of channel with indicated membranes and their pH cut-off values. (B,C) Exemplary separation of proteins standards mixtures. Abbreviations: S – sample reservoir; B – buffer reservoir; W – waste reservoir; MsA-Cy5 – fluorescently labeled mouse serum albumins; CA-Cy3 – fluorescently labeled carbonic anhydrase; Ms IgG1-488 – fluorescently labeled mouse IgG. Reproduced with permission from [218].

In the vast majority of recent reports, on-chip membrane techniques are focused on CP-based samples pre-concentration methods. Only a few papers consider the application of neutral membranes for peptides and proteins analysis. Long and coworkers described the use of a commercially available hydrophilic nucleopore membrane sandwiched between two PDMS layers [219]. Due to the 10 nm-sized pores, the membrane served as filter selective towards small molecules allowing direct analysis of complex biological samples or biopolymers pre-concentration according to a sieving effect. Determination of glutathione in human plasma and red blood cells lysate was presented in the assay.

Wu and Steckl developed a nanofiltrating protein accumulator [193]. Polycarbonate membrane with pores of 10 nm in diameter and coated with polyvinylpyrrolidone was sandwiched between two PDMS layers. Despite the membrane was expected to exhibit neutral surface, neither migration of FITC-HSA selected as test analyte through the membrane nor membrane clogging were observed suggesting a weak negative charge of the membrane surface. The highest ever reported-speed of accumulation (10^5 - 10^6 -fold in 200 s) for FITC-BSA protein was reached in the cross-section zone using 100 mM TBE buffer (tris-borate-EDTA, pH 8.3) and double side injection method. This high enrichment rate was assigned to the high electric field ($\approx 800\text{V/cm}$) applied across the membrane which is more than 10 times higher than usually applied electric field in CP-based methods.

4.4 Summary

The number of papers published over the last 10 years highlights the continuously growing importance of membrane technology for preconcentration of peptides and proteins purposes. Among the various designs, CP-based techniques are the most widely utilized. Undoubtedly advantages of these techniques are the easiness of the coupling with other manipulations as well as versatile membranes assembling. Additionally, low energy consumption associated with this technique makes it a perfect candidate as sub unit of POC and μTAS devices [207].

A major disadvantage of CP-based preconcentrators relies on its mechanism complexity. A large number of factors impacts enrichment efficiency. These include nature of the membrane surface, pores diameter [174,183,197], concentration and pH of the buffer solution [199,220], applied voltage [220], membrane charge density [183,185] and channel geometry [221], to name but a few... Moreover, the preconcentration efficiency is strongly dependent on electrophoretic mobility of analytes. Consequently, in the case of proteins significantly lower enhancement of detection sensitivity was achieved in comparison to what was obtained for small molecules like fluorescent dyes [174,181,187]. This may lead to overestimation of preconcentration capacity of reported systems in comparative studies. Nevertheless, membrane technology is a powerful tool for chip applications that enables obtaining up to 6 orders of magnitude improvement of the sensitivity for proteins in less than 5 min (Table 3). Despite various solutions proposed for the detection of preconcentrated targets, no coupling to mass spectrometry has been presented yet. Implementation of selective or specific upstream extraction process followed by analytes preconcentration on membrane might also simplify the detection process. While nowadays used microchip membrane devices are mostly cation-selective, further developments of anion-selective systems might also widen the scope of possible applications in near future [17,222].

Table 3. Summary of publication on proteins or peptides preconcentration in microfluidics using membranes. *Detection type together with LLOD value (in case LLOD was not estimated, the lowest detectable concentration presented was given).

Support	Target molecule	Preconcentration time and enrichment factor	Detection*	Comment	Ref.
Polymeric membranes					
Anionic polymer membrane	Parvalbumin, Trypsin inhibitor, Ovalbumin, BSA	5000 in 5 min 10,000 in 30 min	Fluorescence (50 fM)	Integrated system for preconcentration and subsequent SDS-PAGE separation.	[184]
Neutral hydrogel Anionic hydrogel	BSA	400 in 16 min 130 in 16 min	Fluorescence	Study supported by numerical simulation.	[173]
Zwitterionic polymer membrane	BSA Phosphorylase b	10^2 in 100 s	Fluorescence	First publication on efficient preconcentration of proteins using membranes and CP effect in microfluidics.	[12]

Anionic polymer membrane	MMP-8	5 min	Fluorescence (100 ng/mL)	Integrated system for preconcentration and subsequent SDS-PAGE separation. Analyte was conjugated on-line with fluorescently labelled antibody.	[206]
Anionic polymer membrane	Staphylococcal enterotoxin B	10 ² in 10 min	Fluorescence (10 pM)	Integrated system for preconcentration and subsequent SDS-PAGE separation. A portable system for test performance was presented.	[207]
Anionic polymer membrane	BSA	10 ² in 5 min	Fluorescence (100 nM)	High conductivity of AMPS-based polymer enabled efficient preconcentration of protein in buffer featuring medium ionic strength (20 mM phosphate in 45 mM KCl).	[185]
Anionic polymer membrane	α_1 -acid glycoprotein, BSF digest	50-200 in 2 min	Fluorescence	Sample was on-line separated after preconcentration.	[187]
Anionic polymer membrane	IgE, NF- κ B	3 min	Fluorescence (0.25-2 nM)	Preliminary study presenting application of fluorescently tagged aptamers for specific determination of proteins in human serum.	[171]
Anionic polymer membrane	AFP, HSP90	10 ¹ in 1 min	Fluorescence (60-600 pM)	Preconcentrated sample was subsequently on-line separated.	[205]
Anionic polymer membrane	CA 19-9	10 ² in 30 min	Fluorescence (30 pg/mL)	Preconcentration improved the sensitivity of ELISA test.	[211]
Anionic polymer membrane	MSA, Hb, mouse serum IgG, CA	5-25 in 1 min	Fluorescence	Fractionation of analytes based on their pI was shown.	[218]
Commercial membranes					
PC membrane (10 nm pore diameter)	Glutathione	2 s injection provided sufficient detectability of analyte in plasma samples	Fluorescence	Analyte was selectively injected to separation channel directly from sample compartment.	[219]
PC membrane (10 nm pore diameter)	HSA	10 ⁵ -10 ⁶ in 200 s	Fluorescence (0.3 pM)	The fastest accumulation speed published up to date.	[193]
Nafion [®]	β -PE	10 ⁴ in 5 min	Fluorescence (40 pM)	Integration of 10 single devices into an array was presented.	[213]
Nafion [®]	BSA	10 ⁴ in 7 min	Fluorescence (60 pM)	Study supported by numerical simulation.	[175]
Nafion [®]	R-PE	500 in 30 min	Fluorescence (100 fM)	Preconcentration device was used for ELISA test improvement in means of sensitivity and dynamic range.	[208]
Nafion [®]	β -PE	10 ⁴ in 7 min	Fluorescence (16.7 pM)	The preconcentration speed was enhanced with external pressure which resulted in fluid flow and faster sample delivery to enrichment zone.	[192]
Nafion [®]	Trypsin activity	10 ²	Fluorescence (10 pg/mL)	Preconcentration on membrane improved the kinetics of enzyme assay in terms of time and sensitivity.	[213]
Nafion [®]	MK2 and PKA activity	65	Fluorescence	Preconcentration on membrane improved the kinetics of enzyme assay in terms of time, sensitivity and volume of sample needed.	[214]
Nafion [®]	R-PE	10 ² in 30 min	Fluorescence (10 pg/mL)	Elaborated system was able to efficiently work even with a use PBS. Additional hydrodynamic flow was applied to enhance the speed of analyte accumulation.	[209]
Nafion [®]	MMP-9 activity	10 ² in 30 min	Fluorescence (0.2 nM)	Preconcentration on membrane improved the kinetics of enzyme assay in terms of time, sensitivity and volume of sample needed.	[215]
Nafion [®]	CRP	10 ³ in 30 min	Fluorescence (1 ng/mL)	Preconcentration improved the ELISA test sensitivity performed on the channel surface.	[183]
Nafion [®]	hCG	500 in 10 min	Fluorescence (2.73 nM)	Preconcentration was efficient in PBS buffer. Sensitivity improvement of on-chip ELISA test was obtained.	[210]
Nanostructures					
Nanochannel	GFP	10 ⁷ in 40 min	Fluorescence (33 fM)	It was possible to extend the preconcentration time to obtain even 10 ⁵ -fold enrichment	[174]
Nanofissures	DSA	10 ³ -10 ⁵ in 10 min	Fluorescence (100 pM)	The preconcentration was conducted in a chip printed on PET substrate. Nanochannel was formed by electric breakdown.	[202]
Nanogap	β -PE	10 ⁴ in 60 min	Fluorescence (100 pM)	Nanogap was formed in a PDMS chip using electric breakdown. System design enabled separation of analytes after preconcentration step.	[199]
Nanogap	BSA, OVA	10 ³ -10 ⁶ in 30 min	Fluorescence (1 pM)	Nanogap was formed in a hybrid PDMS/glass chip using electric breakdown. System design enabled separation of compounds after preconcentration step.	[198]
Nanogap	BSA	10 ⁴ in 60 min	Fluorescence (1 nM)	Nanogap formation was assisted by gold nanoparticles deposited at the junction gap.	[223]
Nanochannel	Albumin	---	Fluorescence (1 μ M)	The EOF in chip was reversed using various polymers (polyE-323 was found the most advantageous). Analytes were preconcentrated in cationic form.	[222]
Nanogap	BSA	10 ⁴ in 30 min	Electrochemical (1 nM)	Nanogap formation was assisted by gold nanoparticles deposited at the junction gap.	[201]
Nanochannels	IgG	10 ⁵ in 5 min	Fluorescence (100 pg/mL)	Application of multiple nanochannels improved the efficiency of preconcentration and enabled to translocate the enriched analyte plug in channel.	[197]

5 Conclusion and future perspectives

Microchip technology allows integrating a number of processes in a single device. This feature is especially advantageous in the field of proteomics where target quantification or detection is usually preceded by complex steps like enzymatic digestion [29] or cells culturing [224]. Microscaling the space in which whole procedure is undergoing carries great benefits as well as problems to face with. On the one hand, unprecedentedly low (in a pL range) sample and reagents/solvents consumption enables to significantly reduce the general cost of experiment and wastes production [18,42]. It is also advantageous in case of limited availability of sample (e.g. biological fluids like cerebrospinal fluid or blood in small mammals). Moreover, analyses conducted on-chip are usually much faster and more automated in comparison to classical methods [208,213,215]. On the other hand, low sample volumes used and microchip format influence the detection sensitivity and the preconcentration step is usually obligatory for on-chip bioassays. As it was shown in the above sections of the manuscript, use of solid supports is a suitable way to overcome this problem. Due to the high surface area, application of packed or monolithic beads readily provides two orders of magnitude enrichment of targeted compounds (Table 1 and 2, respectively) while their chemical modifications enable to obtain the desired selectivity. Higher preconcentration factors can be reached using membranes. However, utilization of membranes is burdened with lower selectivity which can be improved by direct coupling with immunoassay [35,196,208] or application of membrane as a downstream preconcentrator for extracting bed [34]. However, owing to the great enrichment power of membranes, we can anticipate that future system will combine membranes with other more specific techniques of enrichment. Formation of extraction beds is one of the major concerns of chip technology. Magnetic microbeads became the most widely applied supports in DMF. Due to the magnetic properties, these beads can be easily manipulated inside the microdevice which broaden the applicability and possible architecture of microsystems. In contrary, beads packing in chip channels is found problematic. It requires not only the fabrication of wier-like structures to retain physically beads but also suffers from relatively long preparation time of the bed [27]. Moreover, packed beds create resistance to flowing fluid and application of high pressure pumps is usually necessary. Similar situation is also observed in the case of monolithic beds. However, these structures can be precisely fabricated using *in-situ* synthesis methods with UV beam for instance [12,34]. This creates not only a possibility to construct structures of particular properties by choosing the composition of polymerization mixtures but also enables to define the dimension and to localize the support in every position of microfluidic system. Despite the clear advantages of organic monoliths over their silica-based counterparts in terms of easyness and versatility of integration within microfluidic channels, they suffer from a low surface area limiting interfacial interactions with biomolecular targets. Recently some authors reported on the use of gold-nanoparticles decorated monoliths for in-capillary capture applications taking advantage of the strong and spontaneous interaction between Au⁰ and cysteine-containing peptides [225]. Such original approach based on the use of nanostructures monoliths when extended to microchips technology may open new avenues for on-line solid phase extraction. Moreover, the use of other nanoparticles such as metal-oxides or polymer-based ones may enlarge the panel of possible surface interaction for preconcentration. Monolithic materials can also be deposited in chip channel in the form of open-tubular bed [226]. This approach enables to process larger sample volumes than typically used in chips which might improve the sensitivity of the assay but probably at the expenses of the enrichment factor. Unfortunately, application of 'permanent' beds creates a risk of carry-over effect and special attention should be paid to this aspect during method

optimization. On the other hand, utilization of a low cost disposable device also guarantees the lack of the carry-over and the research works will be probably focused on such solutions.

Another issue is the limited capacity of sorptive materials which confines the application of microchips in exhaustive and comprehensive studies (especially in case of non-selective beds). The same feature makes the microchip technology ideal for analysis of trace amounts of specific molecules using immunosorbents [27,46,50], aptamers [26,35] or other selective materials [28,227]. More comprehensive analyses can be performed through parallelization of extraction processes using different beds [31] or use of mixed antibodies grafted on a single support [226,228]. The possibility to perform more complex analyses in a single run will increase the potential of microfluidics as candidates for real applications and will accelerate the commercialization of this kind of complementary platforms.

The enrichment potential of membranes was shown in a number of papers (Table 3). The versatility of membrane (from polymeric structures to nanogaps between channels) provides many possibilities. Especially the feasibility of Nafion® membranes is worth to highlight [191,196]. Utilization of a single Nafion® strip for up to 128 channels significantly simplifies the parallelization of on-chip microprocesses [191,196]. The great advantage of Nafion® is its commercial availability which is not without significance for beginners in the field of microchip technology. The technological limitations like microstructures fabrication or functionalization inside the chips are also considered as the main restraints of progress in on-chip extraction and preconcentration technology. Thus, every effort made to simplify the preparation process of solid supports is of particular importance. Moreover, the tendency was observed of downscaling the dimensions of supports design from micro- to nanometric scale. This challenging trend is caused by a rapid progress in microchip technology and other branches like nanotechnology or microelectronics. This trend is especially visible in precise fabrication of nanopores for membranes formation [203,229]. Further developments in other micro- and nanotechniques will directly influence the progress of solid supports usage for on-chip extraction and preconcentration.

Among the detection techniques, fluorescence-based methods are definitely the most widely used (Tables 1-3). High sensitivity was also reached in DMF using chemiluminescence [46,49-51]. In contrary, a discrepancy between microfluidic preconcentration of proteins and peptides using membranes in coupling with MS detection was discussed [174,191]. Despite the minute liquid volumes used in microfluidics are considered advantageous for MS analysis [230], the volumes of concentrate obtained with CP-based techniques were found far too low [174,191]. The fact is that no MS coupling with on-chip analyte CP-based preconcentration steps has been presented so far. However, recent developments have been addressed to solve this problem [191,220] and we assume that it will succeed in near future. These difficulties were not met in the case of monolithic or packed beds [29,32]. Moreover, employment of MS was found highly compatible to on-chip extraction techniques like application of MALDI-MS with DMF chip [231]. A rapid development of chip-MS systems is projected [230,232]. Microchip technology is a relatively new and rapidly developing field with many promises and problems to solve. Solid supports are undoubtedly important part of this progress which is reflected in the number of papers published every year on this topic. Next to the enrichment and isolation

of analytes from complex matrices, the application of solid supports in chips enable to perform additional manipulations like liquid mixing [233], target transfer in chip [233] and direct detection on sorptive structure [234]. Due to these all advantages more innovations in microfluidics technology is expected in near future.

6 References

- [1] A. Arora, G. Simone, G.B. Salieb-Beugelaar, J.T. Kim, A. Manz, Latest Developments in Micro Total Analysis Systems, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4830–4847. doi:10.1021/ac100969k.
- [2] M.L. Kovarik, D.M. Ornoff, A.T. Melvin, N.C. Dobes, Y. Wang, A.J. Dickinson, et al., Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Applications in the Laboratory, Clinic, and Field, *Anal. Chem.* 85 (2013) 451–472. doi:10.1021/ac3031543.
- [3] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettinger, A. Paulus, H. Lüdi, et al., Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems: Capillary electrophoresis on a chip, *J. Chromatogr. A.* 593 (1992) 253–258. doi:10.1016/0021-9673(92)80293-4.
- [4] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sens. Actuators B Chem.* 1 (1990) 244–248. doi:10.1016/0925-4005(90)80209-1.
- [5] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D.R. Reyes, A. Manz, Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2637–2652.
- [6] N. Assmann, A. Ładosz, P. Rudolf von Rohr, Continuous Micro Liquid-Liquid Extraction, *Chem. Eng. Technol.* 36 (2013) 921–936. doi:10.1002/ceat.201200557.
- [7] C.-C. Lin, J.-L. Hsu, G.-B. Lee, Sample preconcentration in microfluidic devices, *Microfluid. Nanofluidics.* 10 (2010) 481–511. doi:10.1007/s10404-010-0661-9.
- [8] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S.J. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review, *Anal. Chim. Acta.* 718 (2012) 11–24. doi:10.1016/j.aca.2011.12.050.
- [9] R.D. Oleschuk, L.L. Shultz-Lockyear, Y. Ning, D.J. Harrison, Trapping of Bead-Based Reagents within Microfluidic Systems: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 585–590. doi:10.1021/ac990751n.
- [10] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096. doi:10.1021/ac0106288.
- [11] J. Khandurina, S.C. Jacobson, L.C. Waters, R.S. Foote, J.M. Ramsey, Microfabricated Porous Membrane Structure for Sample Concentration and Electrophoretic Analysis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1815–1819. doi:10.1021/ac981161c.
- [12] S. Song, A.K. Singh, B.J. Kirby, Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4589–4592. doi:10.1021/ac0497151.
- [13] L.A. Christel, K. Petersen, W. McMillan, M.A. Northrup, Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration, *J. Biomech. Eng.* 121 (1999) 22–27.
- [14] W. Cao, C.J. Easley, J.P. Ferrance, J.P. Landers, Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7222–7228. doi:10.1021/ac060391l.
- [15] S.M. Hanash, S.J. Pitteri, V.M. Faca, Mining the plasma proteome for cancer biomarkers, *Nature.* 452 (2008) 571–579. doi:10.1038/nature06916.
- [16] T.A. Zangle, A. Mani, J.G. Santiago, Theory and experiments of concentration polarization and ion focusing at microchannel and nanochannel interfaces, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1014. doi:10.1039/b902074h.
- [17] S.J. Kim, Y.-A. Song, J. Han, Nanofluidic concentration devices for biomolecules utilizing ion concentration polarization: theory, fabrication, and applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 912–922. doi:10.1039/B822556G.

- [18] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, A.P. Lee, Droplet microfluidics, *Lab. Chip.* 8 (2008) 198–220. doi:10.1039/B715524G.
- [19] S.L.S. Freire, A.R. Wheeler, Proteome-on-a-chip: mirage, or on the horizon?, *Lab. Chip.* 6 (2006) 1415–1423. doi:10.1039/b609871a.
- [20] D.S. Peterson, Solid supports for micro analytical systems, *Lab. Chip.* 5 (2005) 132–139. doi:10.1039/b405311g.
- [21] J. de Jong, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, Membranes and microfluidics: a review, *Lab. Chip.* 6 (2006) 1125. doi:10.1039/b603275c.
- [22] Á. Ríos, Á. Ríos, M. Zougagh, M. Zougagh, Sample preparation for micro total analytical systems (μ -TASs), *TrAC Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 174–188. doi:10.1016/j.trac.2012.12.009.
- [23] P.N. Nge, C.I. Rogers, A.T. Woolley, Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications, *Chem. Rev.* 113 (2013) 2550–2583. doi:10.1021/cr300337x.
- [24] M. Vázquez, B. Paull, Review on recent and advanced applications of monoliths and related porous polymer gels in micro-fluidic devices, *Anal. Chim. Acta.* 668 (2010) 100–113. doi:10.1016/j.aca.2010.04.033.
- [25] T. S, M. L, H. C, B. D, High-performance liquid chromatography on glass chips using precisely defined porous polymer monoliths as particle retaining elements., *J. Chromatogr. A.* 1370 (2014) 33–39.
- [26] T. Nguyen, R. Pei, D.W. Landry, M.N. Stojanovic, Q. Lin, Microfluidic aptameric affinity sensing of vasopressin for clinical diagnostic and therapeutic applications, *Sens. Actuators B Chem.* 154 (2011) 59–66. doi:10.1016/j.snb.2009.10.032.
- [27] A.J. Haes, A. Terray, G.E. Collins, Bead-assisted displacement immunoassay for staphylococcal enterotoxin B on a microchip, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8412–8420. doi:10.1021/ac061057s.
- [28] G.E. Yue, M.G. Roper, C. Balchunas, A. Pulsipher, J.J. Coon, J. Shabanowitz, et al., Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a glass microchip, *Anal. Chim. Acta.* 564 (2006) 116–122. doi:10.1016/j.aca.2005.11.003.
- [29] C. Wang, A.B. Jemere, D.J. Harrison, Multifunctional protein processing chip with integrated digestion, solid-phase extraction, separation and electrospray, *Electrophoresis.* 31 (2010) 3703–3710. doi:10.1002/elps.201000317.
- [30] J. Wen, C. Guillo, J.P. Ferrance, J.P. Landers, Microfluidic chip-based protein capture from human whole blood using octadecyl (C18) silica beads for nucleic acid analysis from large volume samples, *J. Chromatogr. A.* 1171 (2007) 29–36. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.057.
- [31] E.L. Kendall, E. Wienhold, O.D. Rahmanian, D.L. DeVoe, Ex Situ Integration of Multifunctional Porous Polymer Monoliths into Thermoplastic Microfluidic Chips, *Sens. Actuators B Chem.* 202 (2014) 866–872. doi:10.1016/j.snb.2014.06.023.
- [32] N. Gasilova, L. Qiao, D. Momotenko, M.R. Pourhaghighi, H.H. Girault, Microchip Emitter for Solid-Phase Extraction–Gradient Elution–Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6254–6263. doi:10.1021/ac400171e.
- [33] M.R. Mohamadi, Z. Svobodova, R. Verpillot, H. Esselmann, J. Wiltfang, M. Otto, et al., Microchip electrophoresis profiling of A β peptides in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7611–7617. doi:10.1021/ac101337n.
- [34] R.M. Mohamadi, Z. Svobodova, Z. Bilkova, M. Otto, M. Taverna, S. Descroix, et al., An integrated microfluidic chip for immunocapture, preconcentration and separation of β -amyloid peptides, *Biomicrofluidics.* 9 (2015) 054117. doi:10.1063/1.4931394.
- [35] Y. Koh, B.-R. Lee, H.-J. Yoon, Y.-H. Jang, Y.-S. Lee, Y.-K. Kim, et al., Bead affinity chromatography in a temperature-controllable microsystem for biomarker detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2267–2275. doi:10.1007/s00216-012-6380-1.
- [36] W. Kusnezow, Y.V. Syagailo, S. Ruffer, K. Klenin, W. Sebald, J.D. Hoheisel, et al., Kinetics of antigen binding to antibody microspots: strong limitation by mass transport to the surface, *Proteomics.* 6 (2006) 794–803. doi:10.1002/pmic.200500149.
- [37] B. Teste, F. Malloggi, J.-M. Siaugue, A. Varenne, F. Kanoufi, S. Descroix, Microchip integrating magnetic nanoparticles for allergy diagnosis, *Lab. Chip.* 11 (2011) 4207–4213. doi:10.1039/c1lc20809h.

- [38] T.D. Mai, I. Pereiro, M. Hiraoui, J.-L. Viovy, S. Descroix, M. Taverna, et al., Magneto-immunocapture with on-bead fluorescent labeling of amyloid- β peptides: towards a microfluidized-bed-based operation, *The Analyst*. 140 (2015) 5891–5900. doi:10.1039/c5an01179e.
- [39] S. Tabnaoui, I. Pereiro, M. Fermigier, S. Descroix, J.L. Viovy, L. Malaquin, Magnetic fluidized bed in microfluidics: hydrodynamic characterization and validation to immunocapture, 17th Int. Conf. Miniaturized Syst. Chem. Life Sci. Freibg. Ger. (2013) 1394–1396.
- [40] A. Ali-Cherif, S. Begolo, S. Descroix, J.-L. Viovy, L. Malaquin, Programmable Magnetic Tweezers and Droplet Microfluidic Device for High-Throughput Nanoliter Multi-Step Assays, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (2012) 10765–10769. doi:10.1002/anie.201203862.
- [41] B. Teste, A. Ali-Cherif, J.L. Viovy, L. Malaquin, A low cost and high throughput magnetic bead-based immuno-agglutination assay in confined droplets, *Lab. Chip*. 13 (2013) 2344–2349. doi:10.1039/c3lc50353d.
- [42] K. Choi, A.H.C. Ng, R. Fobel, A.R. Wheeler, Digital Microfluidics, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 5 (2012) 413–440. doi:10.1146/annurev-anchem-062011-143028.
- [43] H. Yang, J.M. Mudrik, M.J. Jebrail, A.R. Wheeler, A Digital Microfluidic Method for in Situ Formation of Porous Polymer Monoliths with Application to Solid-Phase Extraction, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3824–3830. doi:10.1021/ac2002388.
- [44] L.K. Fiddes, V.N. Luk, S.H. Au, A.H.C. Ng, V. Luk, E. Kumacheva, et al., Hydrogel discs for digital microfluidics, *Biomicrofluidics*. 6 (2012) 014112–014112–11. doi:10.1063/1.3687381.
- [45] U. Lehmann, S. Hadjidj, V.K. Parashar, C. Vandevyver, A. Rida, M.A.M. Gijs, Two-dimensional magnetic manipulation of microdroplets on a chip as a platform for bioanalytical applications, *Sens. Actuators B Chem.* 117 (2006) 457–463. doi:10.1016/j.snb.2005.12.053.
- [46] A.H.C. Ng, K. Choi, R.P. Luoma, J.M. Robinson, A.R. Wheeler, Digital microfluidic magnetic separation for particle-based immunoassays, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8805–8812. doi:10.1021/ac3020627.
- [47] N.M. Lafrenière, J.M. Mudrik, A.H.C. Ng, B. Seale, N. Spooner, A.R. Wheeler, Attractive Design: An Elution Solvent Optimization Platform for Magnetic-Bead-based Fractionation Using Digital Microfluidics and Design of Experiments, *Anal. Chem.* 87 (2015) 3902–3910. doi:10.1021/ac504697r.
- [48] N. Mei, B. Seale, A.H.C. Ng, A.R. Wheeler, R. Oleschuk, Digital Microfluidic Platform for Human Plasma Protein Depletion, *Anal. Chem.* 86 (2014) 8466–8472. doi:10.1021/ac5022198.
- [49] K. Choi, A.H.C. Ng, R. Fobel, D.A. Chang-Yen, L.E. Yarnell, E.L. Pearson, et al., Automated Digital Microfluidic Platform for Magnetic-Particle-Based Immunoassays with Optimization by Design of Experiments, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9638–9646. doi:10.1021/ac401847x.
- [50] R. Sista, Z. Hua, P. Thwar, A. Sudarsan, V. Srinivasan, A. Eckhardt, et al., Development of a digital microfluidic platform for point of care testing, *Lab. Chip*. 8 (2008) 2091–2104. doi:10.1039/b814922d.
- [51] R.S. Sista, A.E. Eckhardt, V. Srinivasan, M.G. Pollack, S. Palanki, V.K. Pamula, Heterogeneous immunoassays using magnetic beads on a digital microfluidic platform, *Lab. Chip*. 8 (2008) 2188–2196. doi:10.1039/b807855f.
- [52] N. Vergauwe, D. Witters, F. Ceysens, S. Vermeir, B. Verbruggen, R. Puers, et al., A versatile electrowetting-based digital microfluidic platform for quantitative homogeneous and heterogeneous bio-assays, *J. Micromechanics Microengineering*. 21 (2011) 054026. doi:10.1088/0960-1317/21/5/054026.
- [53] Z. Svobodova, M. Reza Mohamadi, B. Jankovicova, H. Esselmann, R. Verpillot, M. Otto, et al., Development of a magnetic immunosorbent for on-chip preconcentration of amyloid β isoforms: Representatives of Alzheimer’s disease biomarkers, *Biomicrofluidics*. 6 (2012) 24126–2412612. doi:10.1063/1.4722588.

- [54] O.G. Potter, E.F. Hilder, Porous polymer monoliths for extraction: diverse applications and platforms, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1881–1906. doi:10.1002/jssc.200800116.
- [55] F. Svec, Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 902–924. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073.
- [56] T. Nema, E.C.Y. Chan, P.C. Ho, Applications of monolithic materials for sample preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 130–141. doi:10.1016/j.jpba.2013.05.036.
- [57] D. Lubda, W. Lindner, M. Quaglia, C. du F. von Hohenesche, K.K. Unger, Comprehensive pore structure characterization of silica monoliths with controlled mesopore size and macropore size by nitrogen sorption, mercury porosimetry, transmission electron microscopy and inverse size exclusion chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1083 (2005) 14–22. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.033.
- [58] H. Aoki, N. Tanaka, T. Kubo, K. Hosoya, Polymer-based monolithic columns in capillary format tailored by using controlled in situ polymerization, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 341–358. doi:10.1002/jssc.200800508.
- [59] S. Hjertén, J.-L. Liao, R. Zhang, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds, *J. Chromatogr. A.* 473 (1989) 273–275. doi:10.1016/S0021-9673(00)91309-8.
- [60] F. Svec, J.M.J. Frechet, Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820–822. doi:10.1021/ac00031a022.
- [61] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3498–3501. doi:10.1021/ac960281m.
- [62] Y. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, Recent advances in monolithic columns for protein and peptide separation by capillary liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2012) 2095–2106. doi:10.1007/s00216-012-6570-x.
- [63] D. Allen, Z. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic silica column: I. Preparation of silica monoliths having surface-bound octadecyl moieties and their chromatographic characterization and applications to the separation of neutral and charged species, *Electrophoresis.* 24 (2003) 408–420. doi:10.1002/elps.200390051.
- [64] M. Guerrouache, B. Carbonnier, C. Vidal-Madjar, M.-C. Millot, In situ functionalization of N-acryloxysuccinimide-based monolith for reversed-phase electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1149 (2007) 368–376. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.039.
- [65] M. Lämmerhofer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, W. Lindner, Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases, *J. Chromatogr. A.* 925 (2001) 265–277. doi:10.1016/S0021-9673(01)01034-2.
- [66] M. Guerrouache, A. Pantazaki, M.-C. Millot, B. Carbonnier, Zwitterionic polymeric monoliths for HILIC/RP mixed mode for CEC separation applications, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 787–792. doi:10.1002/jssc.200900681.
- [67] M.E.A. Ibrahim, C.A. Lucy, Mixed mode HILIC/anion exchange separations on latex coated silica monoliths, *Talanta.* 100 (2012) 313–319. doi:10.1016/j.talanta.2012.07.069.
- [68] Z. Jiang, N.W. Smith, P.D. Ferguson, M.R. Taylor, Hydrophilic Interaction Chromatography Using Methacrylate-Based Monolithic Capillary Column for the Separation of Polar Analytes, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1243–1250. doi:10.1021/ac061871f.
- [69] I. Tjunelyte, J. Babinot, M. Guerrouache, G. Valincius, B. Carbonnier, Hydrophilic monolith with ethylene glycol-based grafts prepared via surface confined thiol-ene click photoaddition, *Polymer.* 53 (2012) 29–36. doi:10.1016/j.polymer.2011.11.014.
- [70] Y. Li, B. Gu, H.D. Tolley, M.L. Lee, Preparation of polymeric monoliths by copolymerization of acrylate monomers with amine functionalities for anion-exchange capillary liquid chromatography of proteins, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5525–5532. doi:10.1016/j.chroma.2009.05.037.
- [71] Y. Li, H.D. Tolley, M.L. Lee, Preparation of Polymer Monoliths That Exhibit Size Exclusion Properties for Proteins and Peptides, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4406–4413. doi:10.1021/ac900364d.

- [72] M. Guerrouache, M.-C. Millot, B. Carbonnier, Functionalization of Macroporous Organic Polymer Monolith Based on Succinimide Ester Reactivity for Chiral Capillary Chromatography: A Cyclodextrin Click Approach, *Macromol. Rapid Commun.* 30 (2009) 109–113. doi:10.1002/marc.200800584.
- [73] M.-L. Hsieh, L.-K. Chau, Y.-S. Hon, Single-step approach for fabrication of vancomycin-bonded silica monolith as chiral stationary phase, *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 208–216. doi:10.1016/j.chroma.2014.07.003.
- [74] D. Wistuba, Chiral silica-based monoliths in chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 941–952. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.079.
- [75] S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, C. Horváth, Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith, *J. Chromatogr. A.* 887 (2000) 465–477. doi:10.1016/S0021-9673(00)00250-8.
- [76] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Shielded Stationary Phases Based on Porous Polymer Monoliths for the Capillary Electrochromatography of Highly Basic Biomolecules, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3887–3892. doi:10.1021/ac049732q.
- [77] C. Viklund, F. Svec, J.M. Fréchet, K. Irgum, Fast ion-exchange HPLC of proteins using porous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monoliths grafted with poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid), *Biotechnol. Prog.* 13 (1997) 597–600. doi:10.1021/bp9700667.
- [78] B. Carbonnier, M. Guerrouache, R. Denoyel, M.-C. Millot, CEC separation of aromatic compounds and proteins on hexylamine-functionalized N-acryloxysuccinimide monoliths, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3000–3010. doi:10.1002/jssc.200700384.
- [79] M. Guerrouache, A.M. Khalil, S. Kebe, B. Le Droumaguet, S. Mahouche-Chergui, B. Carbonnier, Monoliths bearing hydrophilic surfaces for in vitro biomedical samples analysis, *Surf. Innov.* 3 (2015) 84–102. doi:10.1680/sufi.14.00011.
- [80] B. Gu, Y. Li, M.L. Lee, Polymer Monoliths with Low Hydrophobicity for Strong Cation-Exchange Capillary Liquid Chromatography of Peptides and Proteins, *Anal. Chem.* 79 (2007) 5848–5855. doi:10.1021/ac0623585.
- [81] F.M. Okanda, Z. El Rassi, Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases. 4. Preparation of neutral stearyl-acrylate monoliths and their evaluation in capillary electrochromatography of neutral and charged small species as well as peptides and proteins, *Electrophoresis.* 26 (2005) 1988–1995. doi:10.1002/elps.200500073.
- [82] S. Xie, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Porous Polymer Monoliths: Preparation of Sorbent Materials with High-Surface Areas and Controlled Surface Chemistry for High-Throughput, Online, Solid-Phase Extraction of Polar Organic Compounds, *Chem. Mater.* 10 (1998) 4072–4078. doi:10.1021/cm9804867.
- [83] M.-M. Zheng, G.-D. Ruan, Y.-Q. Feng, Hybrid organic-inorganic silica monolith with hydrophobic/strong cation-exchange functional groups as a sorbent for micro-solid phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7739–7746. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.085.
- [84] T. Nema, E.C.Y. Chan, P.C. Ho, Application of silica-based monolith as solid phase extraction cartridge for extracting polar compounds from urine, *Talanta.* 82 (2010) 488–494. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.063.
- [85] J.R.E. Thabano, M.C. Breadmore, J.P. Hutchinson, C. Johns, P.R. Haddad, Silica nanoparticle-templated methacrylic acid monoliths for in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis of basic analytes, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4933–4940. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.012.
- [86] F. Svec, Less common applications of monoliths: preconcentration and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 841 (2006) 52–64. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.055.
- [87] S.J. Pierre, J.C. Thies, A. Dureault, N.R. Cameron, J.C.M. van Hest, N. Carette, et al., Covalent Enzyme Immobilization onto Photopolymerized Highly Porous Monoliths, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1822–1826. doi:10.1002/adma.200600293.

- [88] M.V. Volokitina, E.G. Vlakh, G.A. Platonova, D.O. Vinokhodov, T.B. Tennikova, Polymer monoliths as efficient solid phases for enzymatic polynucleotide degradation followed by fast HPLC analysis, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2793–2805. doi:10.1002/jssc.201300406.
- [89] S. Wu, L. Zhang, K. Yang, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, Preparing a metal-ion chelated immobilized enzyme reactor based on the polyacrylamide monolith grafted with polyethylenimine for a facile regeneration and high throughput tryptic digestion in proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 703–710. doi:10.1007/s00216-011-5501-6.
- [90] J. Duan, Z. Liang, C. Yang, J. Zhang, L. Zhang, W. Zhang, et al., Rapid protein identification using monolithic enzymatic microreactor and LC-ESI-MS/MS, *Proteomics*. 6 (2006) 412–419. doi:10.1002/pmic.200500234.
- [91] J. Krenkova, F. Svec, Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 706–718. doi:10.1002/jssc.200800641.
- [92] R. Zhang, Q. Li, Y. Huang, L. Zhao, P. Ye, G. Ma, et al., Preparation of PEGA grafted poly(chloromethylstyrene-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith for high-efficiency solid phase peptide synthesis under continuous flow techniques, *Polymer*. 61 (2015) 115–122. doi:10.1016/j.polymer.2015.01.071.
- [93] E. Vlakh, A. Novikov, G. Vlasov, T. Tennikova, Solid phase peptide synthesis on epoxy-bearing methacrylate monoliths, *J. Pept. Sci.* 10 (2004) 719–730. doi:10.1002/psc.584.
- [94] A.M. Khalil, V. Georgiadou, M. Guerrouache, S. Mahouche-Chergui, C. Dendrinou-Samara, M.M. Chehimi, et al., Gold-decorated polymeric monoliths: In-situ vs ex-situ immobilization strategies and flow through catalytic applications towards nitrophenols reduction, *Polymer*. 77 (2015) 218–226. doi:10.1016/j.polymer.2015.09.040.
- [95] R. Poupart, B. Le Droumaguet, M. Guerrouache, B. Carbonnier, Copper nanoparticles supported on permeable monolith with carboxylic acid surface functionality: Stability and catalytic properties under reductive conditions, *Mater. Chem. Phys.* 163 (2015) 446–452. doi:10.1016/j.matchemphys.2015.07.064.
- [96] P. Floris, B. Twamley, P.N. Nesterenko, B. Paull, D. Connolly, Fabrication and characterisation of gold nano-particle modified polymer monoliths for flow-through catalytic reactions and their application in the reduction of hexacyanoferrate, *Microchim. Acta.* 181 (2013) 249–256. doi:10.1007/s00604-013-1108-2.
- [97] P. Floris, B. Twamley, P.N. Nesterenko, B. Paull, D. Connolly, Agglomerated polymer monoliths with bimetallic nano-particles as flow-through micro-reactors, *Microchim. Acta.* 179 (2012) 149–156. doi:10.1007/s00604-012-0865-7.
- [98] C. Ericson, J. Holm, T. Ericson, S. Hjertén, Electroosmosis- and pressure-driven chromatography in chips using continuous beds, *Anal. Chem.* 72 (2000) 81–87.
- [99] M.F. Bedair, R.D. Oleschuk, Fabrication of Porous Polymer Monoliths in Polymeric Microfluidic Chips as an Electrospray Emitter for Direct Coupling to Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1130–1138. doi:10.1021/ac0514570.
- [100] T. Koerner, R.D. Oleschuk, Porous polymer monolith assisted electrospray from a glass microdevice, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3279–3286. doi:10.1002/rcm.2181.
- [101] Hasselbrink Ernest F., T.J. Shepodd, J.E. Rehm, High-Pressure Microfluidic Control in Lab-on-a-Chip Devices Using Mobile Polymer Monoliths, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4913–4918. doi:10.1021/ac025761u.
- [102] D.A. Mair, T.R. Schwei, T.S. Dinio, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Use of photopatterned porous polymer monoliths as passive micromixers to enhance mixing efficiency for on-chip labeling reactions, *Lab. Chip* 9 (2009) 877–883. doi:10.1039/B816521A.
- [103] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Porous polymer monoliths: Simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips, *Electrophoresis*. 22 (2001) 3959–3967. doi:10.1002/1522-2683(200110)
- [104] D.S. Peterson, T. Rohr, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Enzymatic Microreactor-on-a-Chip: Protein Mapping Using Trypsin Immobilized on Porous Polymer Monoliths Molded in Channels of Microfluidic Devices, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4081–4088. doi:10.1021/ac020180q.

- [105] J.A. Deverell, T. Rodemann, J.A. Smith, A.J. Canty, R.M. Guijt, UV initiated formation of polymer monoliths in glass and polymer microreactors, *Sens. Actuators B Chem.* 155 (2011) 388–396. doi:10.1016/j.snb.2010.11.020.
- [106] Y. Yang, C. Li, K.H. Lee, H.G. Craighead, Coupling on-chip solid-phase extraction to electrospray mass spectrometry through an integrated electrospray tip, *Electrophoresis*. 26 (2005) 3622–3630. doi:10.1002/elps.200500121.
- [107] I. Nischang, Porous polymer monoliths: Morphology, porous properties, polymer nanoscale gel structure and their impact on chromatographic performance, *J. Chromatogr. A*. 1287 (2013) 39–58. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.016.
- [108] M.R. Buchmeiser, R. Bandari, A. Prager-Duschke, A. Löber, W. Knolle, Polymeric Monolithic Media: Synthesis, Pore Size Selective Functionalization and Applications, *Macromol. Symp.* 287 (2010) 107–110. doi:10.1002/masy.201050115.
- [109] F. Svec, Y. Lv, Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 250–273. doi:10.1021/ac504059c.
- [110] M.-L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, B.-F. Yuan, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, Facile preparation of organic-silica hybrid monolith for capillary hydrophilic liquid chromatography based on “thiol-ene” click chemistry, *J. Chromatogr. A*. 1284 (2013) 118–125. doi:10.1016/j.chroma.2013.02.008.
- [111] K. Nakanishi, K. Kanamori, Organic–inorganic hybrid poly(silsesquioxane) monoliths with controlled macro- and mesopores, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3776. doi:10.1039/b508415f.
- [112] R. Meinius, K. Hormann, R. Hakim, U. Tallarek, B.M. Smarsly, Synthesis and morphological characterization of phenyl-modified macroporous–mesoporous hybrid silica monoliths, *RSC Adv.* 5 (2015) 20283–20294. doi:10.1039/C4RA16519E.
- [113] H. Lin, J. Ou, Z. Liu, H. Wang, J. Dong, H. Zou, Facile construction of macroporous hybrid monoliths via thiol-methacrylate Michael addition click reaction for capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1379 (2015) 34–42. doi:10.1016/j.chroma.2014.12.031.
- [114] H. Lin, L. Chen, J. Ou, Z. Liu, H. Wang, J. Dong, et al., Preparation of well-controlled three-dimensional skeletal hybrid monoliths via thiol-epoxy click polymerization for highly efficient separation of small molecules in capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*. 1416 (2015) 74–82. doi:10.1016/j.chroma.2015.09.011.
- [115] T.B. Stachowiak, T. Rohr, E.F. Hilder, D.S. Peterson, M. Yi, F. Svec, et al., Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic microdevices, *Electrophoresis*. 24 (2003) 3689–3693. doi:10.1002/elps.200305536.
- [116] M. Guerrouache, S. Mahouche-Chergui, M.M. Chehimi, B. Carbonnier, Site-specific immobilisation of gold nanoparticles on a porous monolith surface by using a thiol–yne click photopatterning approach, *Chem. Commun.* 48 (2012) 7486–7488. doi:10.1039/C2CC33134A.
- [117] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3646–3649. doi:10.1021/ac970377w.
- [118] E.C. Peters, M. Petro, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography. 1. Fine Control of Porous Properties and Surface Chemistry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2288–2295. doi:10.1021/ac9713518.
- [119] B. Preinerstorfer, W. Bicker, W. Lindner, M. Lämmerhofer, Development of reactive thiol-modified monolithic capillaries and in-column surface functionalization by radical addition of a chromatographic ligand for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A*. 1044 (2004) 187–199. doi:10.1016/j.chroma.2004.04.078.
- [120] A. Salwiński, V. Roy, L.A. Agrofoglio, R. Delépée, In Situ One-Step Method for Synthesis of “Click”-Functionalized Monolithic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography, *Macromol. Chem. Phys.* 212 (2011) 2700–2707. doi:10.1002/macp.201100526.
- [121] I. Nischang, O. Brüeggemann, F. Svec, Advances in the preparation of porous polymer monoliths in capillaries and microfluidic chips with focus on morphological aspects, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 953–960. doi:10.1007/s00216-010-3550-x.

- [122] K.W. Ro, J. Liu, D.R. Knapp, Plastic microchip liquid chromatography-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using monolithic columns, *J. Chromatogr. A.* 1111 (2006) 40–47. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.105.
- [123] J. Liu, K.-W. Ro, R. Nayak, D.R. Knapp, Monolithic column plastic microfluidic device for peptide analysis using electrospray from a channel opening on the edge of the device, *Int. J. Mass Spectrom.* 259 (2007) 65–72. doi:10.1016/j.ijms.2006.08.017.
- [124] G.T.T. Gibson, S.M. Mugo, R.D. Oleschuk, Surface-mediated effects on porous polymer monolith formation within capillaries, *Polymer.* 49 (2008) 3084–3090. doi:10.1016/j.polymer.2008.05.014.
- [125] Q.-S. Kang, Y. Li, J.-Q. Xu, L.-J. Su, Y.-T. Li, W.-H. Huang, Polymer monolith-integrated multilayer poly(dimethylsiloxane) microchip for online microextraction and capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 31 (2010) 3028–3034. doi:10.1002/elps.201000210.
- [126] K. Faure, M. Blas, O. Yassine, N. Delaunay, G. Crétier, M. Albert, et al., Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases, *Electrophoresis.* 28 (2007) 1668–1673. doi:10.1002/elps.200600566.
- [127] Q.-S. Kang, X.-F. Shen, N.-N. Hu, M.-J. Hu, H. Liao, H.-Z. Wang, et al., A 3D porous polymer monolith-based platform integrated in poly(dimethylsiloxane) microchips for immunoassay, *The Analyst.* 138 (2013) 2613–2619. doi:10.1039/c3an36744d.
- [128] Y. Xu, W. Zhang, P. Zeng, Q. Cao, A Butyl Methacrylate Monolithic Column Prepared In-Situ on a Microfluidic Chip and its Applications, *Sensors.* 9 (2009) 3437–3446. doi:10.3390/s90503437.
- [129] H.-L. Zeng, H.-F. Li, X. Wang, J.-M. Lin, Development of a gel monolithic column polydimethylsiloxane microfluidic device for rapid electrophoresis separation, *Talanta.* 69 (2006) 226–231. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.030.
- [130] J.M. Burke, E. Smela, A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane), *Biomicrofluidics.* 6 (2012) 16506–1650610. doi:10.1063/1.3693589.
- [131] Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, V. Dugas, J. Randon, K. Faure, New “one-step” method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels, *Lab. Chip.* 12 (2012) 1680–1685. doi:10.1039/C2LC21211K.
- [132] M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, F. Bayle, M. Guerrouache, I. Ayed, et al., A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips, *Polymer.* 66 (2015) 249–258. doi:10.1016/j.polymer.2015.04.039.
- [133] E.L. Kendall, E. Wienhold, D.L. DeVoe, A chitosan coated monolith for nucleic acid capture in a thermoplastic microfluidic chip, *Biomicrofluidics.* 8 (2014) 044109. doi:10.1063/1.4891100.
- [134] K. Nakanishi, N. Soga, Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition, *J. Non-Cryst. Solids.* 139 (1992) 1–13. doi:10.1016/S0022-3093(05)80800-2.
- [135] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Tanaka, Designing monolithic double-pore silica for high-speed liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 797 (1998) 133–137. doi:10.1016/S0021-9673(97)01202-8.
- [136] L. Rieux, H. Niederländer, E. Verpoorte, R. Bischoff, Silica monolithic columns: synthesis, characterisation and applications to the analysis of biological molecules, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1628–1641.
- [137] P.K. Jal, S. Patel, B.K. Mishra, Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions, *Talanta.* 62 (2004) 1005–1028. doi:10.1016/j.talanta.2003.10.028.
- [138] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, et al., Performance of a Monolithic Silica Column in a Capillary under Pressure-Driven and Electrodriven Conditions, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1275–1280. doi:10.1021/ac990942q.
- [139] M. Motokawa, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, H. Jinnai, et al., Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary

- liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 961 (2002) 53–63. doi:10.1016/S0021-9673(02)00133-4.
- [140] M. Motokawa, M. Ohira, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Tanaka, Short communication performance of octadecylsilylated monolithic silica capillary columns of 530 microm inner diameter in HPLC, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2471–2477.
- [141] T. Hara, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Nakanishi, N. Tanaka, Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7632–7642. doi:10.1021/ac060770e.
- [142] T. Adam, K.K. Unger, M.M. Dittmann, G.P. Rozing, Towards the column bed stabilization of columns in capillary electroendosmotic chromatography, *J. Chromatogr. A.* 887 (2000) 327–337. doi:10.1016/S0021-9673(99)01330-8.
- [143] S. Ota, S. Miyazaki, H. Matsuoka, K. Morisato, Y. Shintani, K. Nakanishi, High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized monolithic silica with pipette-tip formula, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 57–62. doi:10.1016/j.jbbm.2006.10.005.
- [144] R. Wu, L. Hu, F. Wang, M. Ye, H. Zou, Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 369–392. doi:10.1016/j.chroma.2007.09.022.
- [145] I. Ali, V.D. Gaitonde, H.Y. Aboul-Enein, Monolithic silica stationary phases in liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 432–442.
- [146] A. Namera, A. Nakamoto, T. Saito, S. Miyazaki, Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 901–924. doi:10.1002/jssc.201000795.
- [147] Z. Lin, F. Yang, X. He, X. Zhao, Y. Zhang, Preparation and evaluation of a macroporous molecularly imprinted hybrid silica monolithic column for recognition of proteins by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8612–8622. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.025.
- [148] M.T. Dulay, J.P. Quirino, B.D. Bennett, R.N. Zare, Bonded-phase photopolymerized sol-gel monoliths for reversed phase capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 3–9. doi:10.1002/1615-9314(20020101)25:1/2<3::AID-JSSC3>3.0.CO;2-L.
- [149] M.T. Dulay, J.P. Quirino, R.N. Zare, Toward sol-gel electrochromatographic separations on a chip, *J Sep Sci.* 25 (2002) 1226–1230.
- [150] J.P. Quirino, M.T. Dulay, B.D. Bennett, R.N. Zare, Strategy for On-Line Preconcentration in Chromatographic Separations, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5539–5543. doi:10.1021/ac015522r.
- [151] J.P. Quirino, M.T. Dulay, R.N. Zare, On-line preconcentration in capillary electrochromatography using a porous monolith together with solvent gradient and sample stacking, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5557–5563.
- [152] K. Morishima, B.D. Bennett, M.T. Dulay, J.P. Quirino, R.N. Zare, Toward sol-gel electrochromatographic separations on a chip, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1226–1230. doi:10.1002/1615-9314(20021101)25:15/17<1226::AID-JSSC1226>3.0.CO;2-G.
- [153] M.C. Breadmore, S. Shrinivasan, K.A. Wolfe, M.E. Power, J.P. Ferrance, B. Hosticka, et al., Towards a microchip-based chromatographic platform. Part 1: Evaluation of sol-gel phases for capillary electrochromatography, *ELECTROPHORESIS.* 23 (2002) 3487–3495. doi:10.1002/1522-2683(200210)23:20<3487::AID-ELPS3487>3.0.CO;2-5.
- [154] B.C. Giordano, A. Terray, G.E. Collins, Microchip-based CEC of nitroaromatic and nitramine explosives using silica-based sol-gel stationary phases from methyl- and ethyl-trimethoxysilane precursors, *Electrophoresis.* 27 (2006) 4295–4302. doi:10.1002/elps.200600254.
- [155] W. Chang, T. Komazu, T. Korenaga, Fabrication of Monolithic Silica in Microchannel as an Adsorbent for Preconcentration of VOCs, *Anal. Lett.* 41 (2008) 1468–1476. doi:10.1080/00032710802119616.
- [156] M.H. Levy, S. Goswami, J. Plawsky, S.M. Cramer, Parameters Governing the Formation of Photopolymerized Silica Sol-Gel Monoliths in PDMS Microfluidic Chips, *Chromatographia.* 76 (2013) 993–1002. doi:10.1007/s10337-013-2493-8.

- [157] M. Karwa, D. Hahn, S. Mitra, A sol–gel immobilization of nano and micron size sorbents in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microchannels for microscale solid phase extraction (SPE), *Anal. Chim. Acta.* 546 (2005) 22–29. doi:10.1016/j.aca.2005.05.029.
- [158] R. Zhong, D. Liu, L. Yu, N. Ye, Z. Dai, J. Qin, et al., Fabrication of two-weir structure-based packed columns for on-chip solid-phase extraction of DNA, *ELECTROPHORESIS.* 28 (2007) 2920–2926. doi:10.1002/elps.200600604.
- [159] E. Alzahrani, K. Welham, Fabrication of an octadecylated silica monolith inside a glass microchip for protein enrichment, *The Analyst.* 137 (2012) 4751–4759. doi:10.1039/c2an16018h.
- [160] E. Alzahrani, K. Welham, Preconcentration of milk proteins using octadecylated monolithic silica microchip, *Anal. Chim. Acta.* 798 (2013) 40–47. doi:10.1016/j.aca.2013.08.035.
- [161] M.H. Levy, J. Plawsky, S.M. Cramer, Photopolymerized sol-gel monoliths for separations of glycosylated proteins and peptides in microfluidic chips, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2358–2365. doi:10.1002/jssc.201200990.
- [162] X. Sun, W. Yang, T. Pan, A.T. Woolley, Affinity monolith-integrated poly(methyl methacrylate) microchips for on-line protein extraction and capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 80 (2008) 5126–5130. doi:10.1021/ac800322f.
- [163] Y. Hua, A.B. Jemere, D.J. Harrison, On-chip solid phase extraction and enzyme digestion using cationic PolyE-323 coatings and porous polymer monoliths coupled to electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4039–4044. doi:10.1016/j.chroma.2011.04.027.
- [164] P.N. Nge, J.V. Pagaduan, M. Yu, A.T. Woolley, Microfluidic chips with reversed-phase monoliths for solid phase extraction and on-chip labeling, *J. Chromatogr. A.* 1261 (2012) 129–135. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.095.
- [165] J. Liu, C.-F. Chen, C.-W. Tsao, C.-C. Chang, C.-C. Chu, D.L. DeVoe, Polymer Microchips Integrating Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Polymethacrylate Monoliths, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2545–2554. doi:10.1021/ac802359e.
- [166] J. Wu, J. Pawliszyn, A Capillary Cartridge with an Online Desalting Device That Allows Fast Sampling for Capillary Isoelectric Focusing, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2010–2014. doi:10.1021/ac00109a017.
- [167] M.H. Lamoree, U.R. Tjaden, J. van der Greef, Use of microdialysis for the on-line coupling of capillary isoelectric focusing with electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 777 (1997) 31–39. doi:10.1016/S0021-9673(97)00430-5.
- [168] N. Xu, Y. Lin, S.A. Hofstadler, D. Matson, C.J. Call, R.D. Smith, A microfabricated dialysis device for sample cleanup in electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3553–3556.
- [169] F. Xiang, Y. Lin, J. Wen, D.W. Matson, R.D. Smith, An Integrated Microfabricated Device for Dual Microdialysis and On-Line ESI-Ion Trap Mass Spectrometry for Analysis of Complex Biological Samples, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1485–1490. doi:10.1021/ac981400w.
- [170] R. Dhopeswarkar, L. Sun, R.M. Crooks, Electrokinetic concentration enrichment within a microfluidic device using a hydrogel microplug, *Lab. Chip.* 5 (2005) 1148–1154. doi:10.1039/b509063f.
- [171] A.H. Hecht, G.J. Sommer, R.H. Durland, X. Yang, A.K. Singh, A.V. Hatch, Aptamers as Affinity Reagents in an Integrated Electrophoretic Lab-on-a-Chip Platform, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8813–8820. doi:10.1021/ac101106m.
- [172] S.J. Kim, L.D. Li, J. Han, Amplified electrokinetic response by concentration polarization near nanofluidic channel, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 25 (2009) 7759–7765. doi:10.1021/la900332v.
- [173] D. Hlushkou, R. Dhopeswarkar, R.M. Crooks, U. Tallarek, The influence of membrane ion-permselectivity on electrokinetic concentration enrichment in membrane-based preconcentration units, *Lab. Chip.* 8 (2008) 1153–1162. doi:10.1039/b800549d.
- [174] Y.-C. Wang, A.L. Stevens, J. Han, Million-fold Preconcentration of Proteins and Peptides by Nanofluidic Filter, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4293–4299. doi:10.1021/ac050321z.

- [175] M. Shen, H. Yang, V. Sivagnanam, M. a. M. Gijs, Microfluidic protein preconcentrator using a microchannel-integrated nafion strip: experiment and modeling, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9989–9997. doi:10.1021/ac102149f.
- [176] K.-D. Huang, R.-J. Yang, A nanochannel-based concentrator utilizing the concentration polarization effect, *Electrophoresis.* 29 (2008) 4862–4870. doi:10.1002/elps.200800392.
- [177] R. Dhopeswarkar, R.M. Crooks, D. Hlushkou, U. Tallarek, Transient Effects on Microchannel Electrokinetic Filtering with an Ion-Permselective Membrane, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1039–1048. doi:10.1021/ac7019927.
- [178] L. van Oeffelen, W. Van Roy, H. Idrissi, D. Charlier, L. Lagae, G. Borghs, Ion Current Rectification, Limiting and Overlimiting Conductances in Nanopores, *PLoS ONE.* 10 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0124171.
- [179] G. Li, S. Wang, C.K. Byun, X. Wang, S. Liu, A quantitative model to evaluate the ion-enrichment and ion-depletion effect at microchannel-nanochannel junctions, *Anal. Chim. Acta.* 650 (2009) 214–220. doi:10.1016/j.aca.2009.07.044.
- [180] M.B. Andersen, D.M. Rogers, J. Mai, B. Schudel, A.V. Hatch, S.B. Rempe, et al., Spatiotemporal pH dynamics in concentration polarization near ion-selective membranes, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids.* 30 (2014) 7902–7912. doi:10.1021/la5014297.
- [181] A. Plecis, C. Nanteuil, A.-M. Haghiri-Gosnet, Y. Chen, Electropreconcentration with Charge-Selective Nanochannels, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9542–9550. doi:10.1021/ac8017907.
- [182] J. Mai, H. Miller, A.V. Hatch, Spatiotemporal Mapping of Concentration Polarization Induced pH Changes at Nanoconstrictions, *ACS Nano.* 6 (2012) 10206–10215. doi:10.1021/nn304005p.
- [183] S.H. Ko, Y.-A. Song, S.J. Kim, M. Kim, J. Han, K.H. Kang, Nanofluidic preconcentration device in a straight microchannel using ion concentration polarization, *Lab. Chip.* 12 (2012) 4472–4482. doi:10.1039/C2LC21238B.
- [184] A.V. Hatch, A.E. Herr, D.J. Throckmorton, J.S. Brennan, A.K. Singh, Integrated preconcentration SDS-PAGE of proteins in microchips using photopatterned cross-linked polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4976–4984. doi:10.1021/ac0600454.
- [185] H. Chun, T.D. Chung, J.M. Ramsey, High Yield Sample Preconcentration Using a Highly Ion-Conductive Charge-Selective Polymer, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6287–6292. doi:10.1021/ac101297t.
- [186] S. Song, A.K. Singh, T.J. Shepodd, B.J. Kirby, Microchip dialysis of proteins using in situ photopatterned nanoporous polymer membranes, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2367–2373. doi:10.1021/ac035290r.
- [187] S. Yamamoto, S. Hirakawa, S. Suzuki, In situ fabrication of ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for capillary electrophoresis of anionic compounds, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8224–8230. doi:10.1021/ac801245n.
- [188] K.W. Hoeman, J.J. Lange, G.T. Roman, D.A. Higgins, C.T. Culbertson, Electrokinetic trapping using titania nanoporous membranes fabricated using sol-gel chemistry on microfluidic devices, *Electrophoresis.* 30 (2009) 3160–3167. doi:10.1002/elps.200900027.
- [189] G.M. Toh, N. Yanagisawa, R.C. Corcoran, D. Dutta, A low molecular weight cut-off polymer–silicate membrane for microfluidic applications, *Microfluid. Nanofluidics.* 9 (2010) 1135–1141. doi:10.1007/s10404-010-0634-z.
- [190] S.A. Miller, K.C. Kelly, A.T. Timperman, Ionic current rectification at a nanofluidic/microfluidic interface with an asymmetric microfluidic system, *Lab. Chip.* 8 (2008) 1729–1732. doi:10.1039/b808179d.
- [191] J.H. Lee, Y.-A. Song, J. Han, Multiplexed proteomic sample preconcentration device using surface-patterned ion-selective membrane, *Lab. Chip.* 8 (2008) 596–601. doi:10.1039/b717900f.
- [192] S.J. Kim, J. Han, Self-Sealed Vertical Polymeric Nanoporous-Junctions for High-Throughput Nanofluidic Applications, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3507–3511. doi:10.1021/ac800157q.

- [193] D. Wu, A.J. Steckl, High speed nanofluidic protein accumulator, *Lab. Chip.* 9 (2009) 1890–1896. doi:10.1039/b823409d.
- [194] B. Chueh, D. Huh, C.R. Kyrtos, T. Houssin, N. Futai, S. Takayama, Leakage-free bonding of porous membranes into layered microfluidic array systems, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3504–3508. doi:10.1021/ac062118p.
- [195] K.C. Kelly, S.A. Miller, A.T. Timperman, Investigation of Zone Migration in a Current Rectifying Nanofluidic/Microfluidic Analyte Concentrator, *Anal. Chem.* 81 (2009) 732–738. doi:10.1021/ac802209e.
- [196] S.H. Ko, S.J. Kim, L.F. Cheow, L.D. Li, K.H. Kang, J. Han, Massively parallel concentration device for multiplexed immunoassays, *Lab. Chip.* 11 (2011) 1351–1358. doi:10.1039/c0lc00349b.
- [197] K.-B. Sung, K.-P. Liao, Y.-L. Liu, W.-C. Tian, Development of a nanofluidic preconcentrator with precise sample positioning and multi-channel preconcentration, *Microfluid. Nanofluidics.* 14 (2012) 645–655. doi:10.1007/s10404-012-1084-6.
- [198] S.M. Kim, M.A. Burns, E.F. Hasselbrink, Electrokinetic Protein Preconcentration Using a Simple Glass/Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Chip, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4779–4785. doi:10.1021/ac060031y.
- [199] J.H. Lee, S. Chung, S.J. Kim, J. Han, Poly(dimethylsiloxane)-Based Protein Preconcentration Using a Nanogap Generated by Junction Gap Breakdown, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6868–6873. doi:10.1021/ac071162h.
- [200] C.-P. Jen, T.G. Amstislavskaya, C.-C. Kuo, Y.-H. Chen, Protein Preconcentration Using Nanofractures Generated by Nanoparticle-Assisted Electric Breakdown at Junction Gaps, *PLoS ONE.* 9 (2014) e102050. doi:10.1371/journal.pone.0102050.
- [201] C.-P. Jen, T.G. Amstislavskaya, K.-F. Chen, Y.-H. Chen, Sample Preconcentration Utilizing Nanofractures Generated by Junction Gap Breakdown Assisted by Self-Assembled Monolayer of Gold Nanoparticles, *PLoS ONE.* 10 (2015) e0126641. doi:10.1371/journal.pone.0126641.
- [202] H. Yu, Y. Lu, Y. Zhou, F. Wang, F. He, X. Xia, A simple, disposable microfluidic device for rapid protein concentration and purification via direct-printing, *Lab. Chip.* 8 (2008) 1496–1501. doi:10.1039/b802778a.
- [203] H. Kwok, K. Briggs, V. Tabard-Cossa, Nanopore Fabrication by Controlled Dielectric Breakdown, *PLoS ONE.* 9 (2014) e92880. doi:10.1371/journal.pone.0092880.
- [204] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2011-2013, *Electrophoresis.* 35 (2014) 128–137. doi:10.1002/elps.201300335.
- [205] P.N. Nge, W. Yang, J.V. Pagaduan, A.T. Woolley, Ion-permeable membrane for on-chip preconcentration and separation of cancer marker proteins, *Electrophoresis.* 32 (2011) 1133–1140. doi:10.1002/elps.201000698.
- [206] A.E. Herr, A.V. Hatch, D.J. Throckmorton, H.M. Tran, J.S. Brennan, W.V. Giannobile, et al., Microfluidic immunoassays as rapid saliva-based clinical diagnostics, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 5268–5273. doi:10.1073/pnas.0607254104.
- [207] R.J. Meagher, A.V. Hatch, R.F. Renzi, A.K. Singh, An integrated microfluidic platform for sensitive and rapid detection of biological toxins, *Lab. Chip.* 8 (2008) 2046–2053. doi:10.1039/b815152k.
- [208] Y.-C. Wang, J. Han, Pre-binding dynamic range and sensitivity enhancement for immuno-sensors using nanofluidic preconcentrator, *Lab. Chip.* 8 (2008) 392–394. doi:10.1039/b717220f.
- [209] V. Liu, Y.-A. Song, J. Han, Capillary-valve-based fabrication of ion-selective membrane junction for electrokinetic sample preconcentration in PDMS chip, *Lab. Chip.* 10 (2010) 1485–1490. doi:10.1039/b923214a.
- [210] J.H. Lee, J. Han, Concentration-enhanced rapid detection of human chorionic gonadotropin (hCG) on a Au surface using a nanofluidic preconcentrator, *Microfluid. Nanofluidics.* 9 (2010) 973–979. doi:10.1007/s10404-010-0598-z.

- [211] N. Yanagisawa, D. Dutta, Enhancement in the sensitivity of microfluidic enzyme-linked immunosorbent assays through analyte preconcentration, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7029–7036. doi:10.1021/ac3011632.
- [212] D. Han, K.B. Kim, Y.-R. Kim, S. Kim, H.C. Kim, J. Lee, et al., Electrokinetic concentration on a microfluidic chip using polyelectrolytic gel plugs for small molecule immunoassay, *Electrochimica Acta.* 110 (2013) 164–171. doi:10.1016/j.electacta.2013.02.005.
- [213] J.H. Lee, Y.-A. Song, S.R. Tannenbaum, J. Han, Increase of reaction rate and sensitivity of low-abundance enzyme assay using micro/nanofluidic preconcentration chip, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3198–3204. doi:10.1021/ac800362e.
- [214] J.H. Lee, B.D. Cosgrove, D.A. Lauffenburger, J. Han, Microfluidic Concentration-Enhanced Cellular Kinase Activity Assay, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 10340–10341. doi:10.1021/ja902594f.
- [215] C.-H. Chen, A. Sarkar, Y.-A. Song, M.A. Miller, S.J. Kim, L.G. Griffith, et al., Enhancing Protease Activity Assay in Droplet-Based Microfluidics Using a Biomolecule Concentrator, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 10368–10371. doi:10.1021/ja2036628.
- [216] A. Sarkar, J. Han, Non-linear and linear enhancement of enzymatic reaction kinetics using a biomolecule concentrator, *Lab. Chip.* 11 (2011) 2569–2576. doi:10.1039/c0lc00588f.
- [217] R. Kwak, S.J. Kim, J. Han, Continuous-Flow Biomolecule and Cell Concentrator by Ion Concentration Polarization, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7348–7355. doi:10.1021/ac2012619.
- [218] G.J. Sommer, J. Mai, A.K. Singh, A.V. Hatch, Microscale isoelectric fractionation using photopolymerized membranes, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3120–3125. doi:10.1021/ac200073p.
- [219] Z. Long, D. Liu, N. Ye, J. Qin, B. Lin, Integration of nanoporous membranes for sample filtration/preconcentration in microchip electrophoresis, *Electrophoresis.* 27 (2006) 4927–4934. doi:10.1002/elps.200600252.
- [220] X. Yuan, L. Renaud, M.-C. Audry, P. Kleimann, Electrokinetic biomolecule preconcentration using xurography-based micro-nano-micro fluidic devices, *Anal. Chem.* 87 (2015) 8695–8701. doi:10.1021/acs.analchem.5b01352.
- [221] C.-L. Chen, R.-J. Yang, Effects of microchannel geometry on preconcentration intensity in microfluidic chips with straight or convergent-divergent microchannels, *Electrophoresis.* 33 (2012) 751–757. doi:10.1002/elps.201100493.
- [222] I.H. Shin, K.-J. Kim, J. Kim, H.C. Kim, H. Chun, Cation-selective electropreconcentration, *Lab. Chip.* 14 (2014) 1811–1815. doi:10.1039/c4lc00024b.
- [223] P.-J. Chiang, C.-C. Kuo, T.N. Zamay, A.S. Zamay, C.-P. Jen, Quantitative evaluation of the depletion efficiency of nanofractures generated by nanoparticle-assisted junction gap breakdown for protein concentration, *Microelectron. Eng.* 115 (2014) 39–45. doi:10.1016/j.mee.2013.10.024.
- [224] A.H.C. Ng, M. Dean Chamberlain, H. Situ, V. Lee, A.R. Wheeler, Digital microfluidic immunocytochemistry in single cells, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7513. doi:10.1038/ncomms8513.
- [225] Y. Xu, Q. Cao, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Porous Polymer Monolithic Column with Surface-Bound Gold Nanoparticles for the Capture and Separation of Cysteine-Containing Peptides, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3352–3358. doi:10.1021/ac1002646.
- [226] W. Yang, M. Yu, X. Sun, A.T. Woolley, Microdevices integrating affinity columns and capillary electrophoresis for multi-biomarker analysis in human serum, *Lab. Chip.* 10 (2010) 2527–2533. doi:10.1039/c005288d.
- [227] L. Xu, W. Wang, Z. Zhang, P. Yang, H. Fan, J. Kong, Microchip-based strategy for enrichment of acetylated proteins, *Microchim. Acta.* 180 (2013) 613–618. doi:10.1007/s00604-013-0950-6.
- [228] T.M. Phillips, E. Wellner, Measurement of neuropeptides in clinical samples using chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1111 (2006) 106–111. doi:10.1016/j.chroma.2006.01.102.
- [229] T. Jain, R.J.S. Guerrero, C.A. Aguilar, R. Karnik, Integration of solid-state nanopores in microfluidic networks via transfer printing of suspended membranes, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3871–3878. doi:10.1021/ac302972c.

- [230] A. Oedit, P. Vulto, R. Ramautar, P.W. Lindenburg, T. Hankemeier, Lab-on-a-Chip hyphenation with mass spectrometry: strategies for bioanalytical applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 31 (2015) 79–85. doi:10.1016/j.copbio.2014.08.009.
- [231] H. Moon, A.R. Wheeler, R.L. Garrell, J.A. Loo, C.-J.C. Kim, An integrated digital microfluidic chip for multiplexed proteomic sample preparation and analysis by MALDI-MS, *Lab. Chip.* 6 (2006) 1213–1219. doi:10.1039/b601954d.
- [232] X. Feng, B.-F. Liu, J. Li, X. Liu, Advances in coupling microfluidic chips to mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 34 (2015) 535–557. doi:10.1002/mas.21417.
- [233] J. Pipper, M. Inoue, L.F.-P. Ng, P. Neuzil, Y. Zhang, L. Novak, Catching bird flu in a droplet, *Nat. Med.* 13 (2007) 1259–1263. doi:10.1038/nm1634.
- [234] L. Lin, Z. Gao, H. Wei, H. Li, F. Wang, J.-M. Lin, Fabrication of a gel particle array in a microfluidic device for bioassays of protein and glucose in human urine samples, *Biomicrofluidics.* 5 (2011) 034112. doi:10.1063/1.3623412.

2.2 Conclusion

Les laboratoires sur puce sont des dispositifs émergents offrant de hautes performances pour l'analyse des échantillons biologiques complexes. La possibilité d'y intégrer un module de préconcentration se révèle primordial non seulement pour augmenter la sensibilité de l'analyse en raison des faibles volumes analysés mais aussi pour éliminer les éléments interférents présents dans les échantillons complexes. Leur utilisation est particulièrement avantageuse dans le domaine de la protéomique où la quantification des molécules d'intérêt très peu abondantes dans des échantillons biologiques nécessite la plupart du temps la mise en œuvre d'une étape d'extraction sélective afin d'extraire uniquement les molécules cibles de l'échantillon. L'atout principal des supports solides en microsysteme pour l'extraction/ préconcentration des protéines et peptides réside dans la diversité des matériaux disponibles. Il en résulte de cette étude bibliographique sur ces différents supports que la versatilité des membranes allant des membranes polymériques aux nanostructures permettait de nombreuses possibilités, notamment par l'utilisation des membranes Nafion[®] commerciales. Cependant, les applications à la préconcentration de protéines sont limitées en raison des difficultés technologiques rencontrées dans la microfabrication de ces supports qui nécessitent un réel besoin de développement de méthodes de préparation plus simples. Quant aux billes, leur introduction dans les microsystemes est difficile à mettre en œuvre car l'utilisation de frittés, de nanofiltres ou de micro-pilliers pour les maintenir dans le microcanal nécessite une géométrie et une technologie complexes. En revanche, les billes magnétiques sont largement utilisées car en plus d'être commercialisées, elles sont facilement contrôlables et manipulables en présence d'aimants ou de microbobines grâce à leurs propriétés magnétiques. Elles ont également été exploitées pour le développement de quelques plateformes microfluidiques digitales et en gouttelettes. Finalement, les monolithes semblent être très avantageux, en particulier, les monolithes organiques qui peuvent être facilement synthétisés par UV irradiation '*in situ*' et précisément localisés au sein d'un canal de microsysteme. De plus, ce support offre une surface spécifique particulièrement importante pour la préconcentration. La sensibilité des techniques basées sur les supports monolithiques pourrait être davantage améliorée en fonctionnalisant les monolithes par des nanoparticules métalliques (or ou argent) ou d'oxyde métallique (TiO₂ par exemple) afin d'augmenter leur surface spécifique.

SYNTHESE DE MONOLITHES ORGANIQUES EN MICROSYSTEME

3.1 Introduction

Les monolithes sont synthétisés à partir d'un mélange réactionnel constitué de trois principaux composants : des monomères dont un agent réticulant, des solvants porogènes et un amorceur de la polymérisation. La synthèse d'un monolithe peut se faire selon plusieurs modes tels que la polycondensation, la métathèse et ouverture de cycles et la polymérisation en chaîne [150,151]. Dans une polymérisation en chaîne, une chaîne macromoléculaire est formée par additions successives de molécules de monomère (M) à une espèce active ou centre actif qui est porté par l'extrémité de la chaîne [152]. Les polymérisations en chaîne se différencient selon la nature du centre actif, qui est soit un radical, soit une espèce ionique. La polymérisation radicalaire en chaîne est la méthode la plus répandue pour la synthèse de monolithe que ce soit par voie thermique ou photochimique.

La synthèse initiée par voie thermique est plus simple à mettre en oeuvre. Cependant, c'est une réaction lente (de plusieurs heures) et il est très difficile de localiser surtout dans le cas des microsystèmes. Par contre, la synthèse initiée par voie photochimique (le plus souvent par irradiation Ultra-Violet (UV)) présente plusieurs avantages pratiques par rapport à la polymérisation thermiquement induite. Ce mode d'amorçage offre la possibilité de limiter la production des radicaux à une portion d'un canal dans un microsystème. En effet, les autres parties peuvent être cachées à l'aide d'un masque qui empêche les irradiations UV d'y pénétrer. Cependant, la synthèse est limitée à l'utilisation de matériaux transparents aux irradiations UV, et de faible épaisseur [152,153].

Dans la totalité des travaux présentés dans ce manuscrit, les monolithes ont été préparés par polymérisation radicalaire en chaîne initiée par voie photochimique. Au cours de ce

chapitre, nous présentons tout d'abord la description théorique de la polymérisation radicalaire intervenant dans la synthèse des monolithes organiques par voie photochimique. Puis, nous présentons les prétraitements existants pour fonctionnaliser les parois des microcanaux. En effet, la synthèse de monolithe dans un microsystème nécessite au préalable de la polymérisation une étape de prétraitement qui dépend du type de matériau utilisé pour la fabrication de microsystème qui dépend du type de matériau utilisé pour la fabrication du microsystème et qui est essentiel pour l'ancrage du monolithe aux parois du canal lors de la polymérisation. Parmi les prétraitements décrits dans la littérature, nous citons ici que le prétraitement de silanisation pour le verre et les différentes stratégies développées jusqu'à ce jour pour réussir la synthèse et l'ancrage de monolithe dans des puces en poly (diméthyl siloxane) (PDMS) car ces deux matériaux ont été utilisés lors de nos travaux expérimentaux.

3.2 Polymérisation radicalaire en chaîne sous irradiation UV

La polymérisation radicalaire sous irradiation UV fait intervenir des espèces chimiques très réactives appelées radicaux. La formation de ces centres actifs est généralement initiée en présence d'un amorceur. Le mécanisme de la polymérisation radicalaire en chaîne comprend trois étapes principales : l'amorçage, la propagation et la terminaison [152–155]. Ces trois réactions se produisent successivement au cours de la formation d'une molécule de polymère et seront décrites par la suite.

3.2.1 L'amorçage

L'amorçage est la première étape de la polymérisation radicalaire, elle est composée de deux réactions. La première réaction consiste à la formation des radicaux libres générés par la décomposition de l'amorceur. La deuxième réaction est celle de l'activation des monomères. Ainsi, les radicaux formés s'additionnent sur les monomères formant des radicaux monomères réactifs.

La formation des radicaux nécessite une énergie d'activation importante apportée par l'irradiation UV [153–155]. L'absorption d'énergie UV par un amorceur déclenche une série de processus énergétiques. Initialement cet amorceur passe d'un état fondamental (S_0) à un état excité singulet (S_1) de plus grande énergie par l'absorption d'un photon UV. Par conversion inter-système (intersystem crossing) cet état singulet est converti en état triplet (T_3) plus stable de moindre énergie (Fig. 9). Les radicaux libres sont ainsi générés à partir

de l'état triplet. En général, la durée de vie de ces états excités est très courte, elle ne dépasse pas 10^{-6} s [155]. Les radicaux libres sont espèces instables et vont réagir rapidement avec des monomères lors de l'étape de propagation et terminaison. Leur concentration est de l'ordre de 10^{-8} mol. L⁻¹ [152,154] et leur durée de vie varie entre 0,1 et 10s. Après la formation des radicaux par amorçage de l'amorceur, ces derniers sont capables, durant ce laps de temps très court, d'effectuer un très grand nombre de réactions chimiques (10^3 à 10^4) puis de disparaître par réaction mutuelle avec un autre radical [154]. Il y a également plusieurs processus qui peuvent se produire à partir des états excités et les principaux sont également présentés dans la Fig. 9. En l'absence de monomères, l'amorceur à l'état singulet (S₁) retourne à l'état fondamental (S₀) par conversion interne en émettant de la fluorescence. L'amorceur à l'état triplet (T₃) peut être désactivé au contact de la molécule de dioxygène présente dans l'air en perdant sa capacité de produire des radicaux [155].

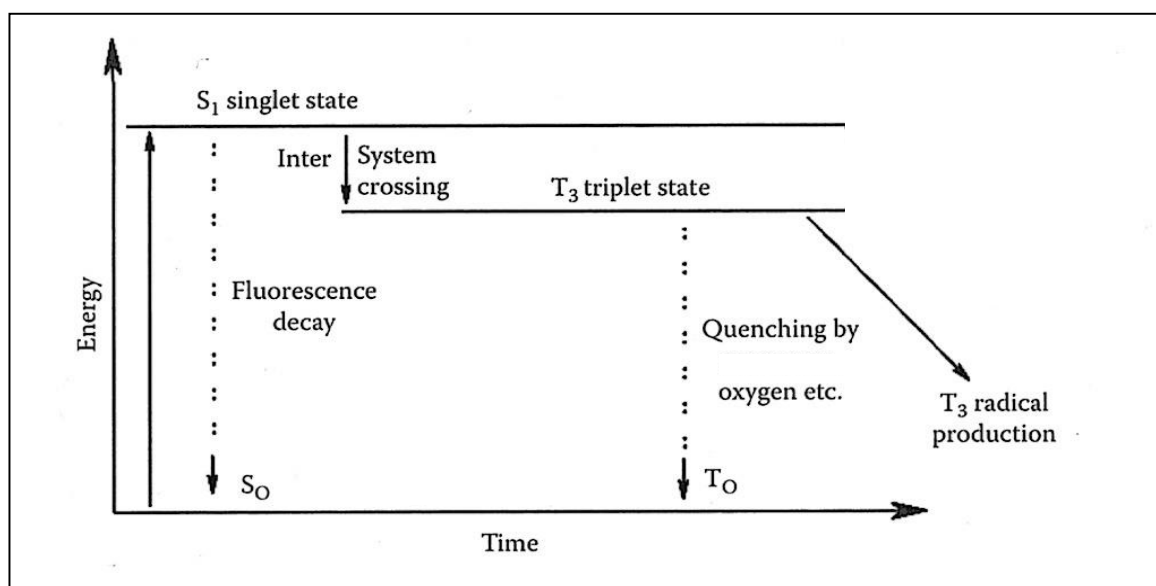


Figure 9. Diagramme Jablonski montrant le processus d'absorption d'énergie UV par l'amorceur [155]. S₀ (état fondamental), S₁ (état singulet), T₃ (état triplet).

Les radicaux sont produits selon 2 types de mécanismes selon la nature de l'amorceur : mécanisme de Type I et mécanisme de Type II qui seront détaillés par la suite.

3.2.1.1 Mécanisme de Type I : Processus de rupture homolytique

Il existe 5 grandes familles d'amorceurs Type I : les acétophénones, les composés à base de benzoin éther, les benzyl ketals, les oxydes de phosphine et les azonitriles. Quelques exemples de chaque famille sont donnés dans le Tableau 1. Ils absorbent l'énergie UV sur un large spectre de longueur d'onde (250-400 nm). Le composé azonitrile, comme le 2,2'-azobisisobutyronitrile ou AIBN a d'abord été utilisé comme amorceur thermique mais il est également utilisé en tant qu'amorceur photochimique [156,157].

Tableau 1. Amorceurs de Type I.

ACETOPHENONES			BENZAIN ETHERS	BENZYL KETALS	PHOSPHINE OXIDES	AZO COMPOUNDS
α -Hydroxy-acetophenones	α -Alkylamino-acetophenones	α -Dialkoxy-acetophenones				
2-Hydroxy-2-methyl-1-phenyl-1-propanone 2-Hydroxy-2-methyl-propiofenone (Darocur 1173 TM)	2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propiofenone (Irgacure 907 TM)	Diethoxyacetophenone DEA, DEAP	Benzoin Methyl ether (BME)	Benzyl dimethyl ketal (BDK), or 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) or (Irgacure 651 TM)	Phosphine oxide, phenyl bis (2,4,6-trimethyl benzoyl) BAPO Darocur TPO TM (Irgacure 819 TM)	2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile) AIBN
1-Hydroxy-cyclohexyl-phenylketone (Irgacure 184 TM)	2-Benzyl-2-(dimethylamino)-1-[4-(4-morpholinyl)phenyl]-1-butanone (Irgacure 369 TM)		Benzoin ethyl ether		Dphenyl- (2,4,6-trimethyl benzoyl)-phosphine oxide Darocur TPO TM	1,1'-Azobis(cyclohexane carbonitrile) ACHN VAZO TM
2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxyphenyl)-2-methyl-1-propanone] (Irgacure 2959 TM)			Benzoin isobutyl ether			2,2'-Azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride AAHP

Source : [155].

Les amorceurs de Type I possèdent au moins une liaison chimique labile susceptible de générer par rupture homolytique des radicaux libres. La Figure 10 représente le schéma typique de la décomposition photochimique d'un amorceur de Type I, le 2,2-diméthyle-2-hydroxyacetophenone (Darocure 1173). Lors de l'irradiation, le Darocure 1173 absorbe une quantité d'énergie UV et passe à l'état triplet excité caractérisé par le passage d'un électron sur une orbitale d'énergie supérieure. Ainsi, deux radicaux sont générés par rupture de la liaison intramoléculaire CO-C (en anglais connue comme 'scission on α -carbon' ou Norrish Type I reaction, de l'ordre de 65-70 kcal/mol), soit un radical benzoyle et un radical alkyle, tous les deux très réactifs. La lumière UV peut fournir un niveau

d'énergie suffisant (70-80 kcal/mol) pour générer la rupture homolytique de l'amorceur [155].

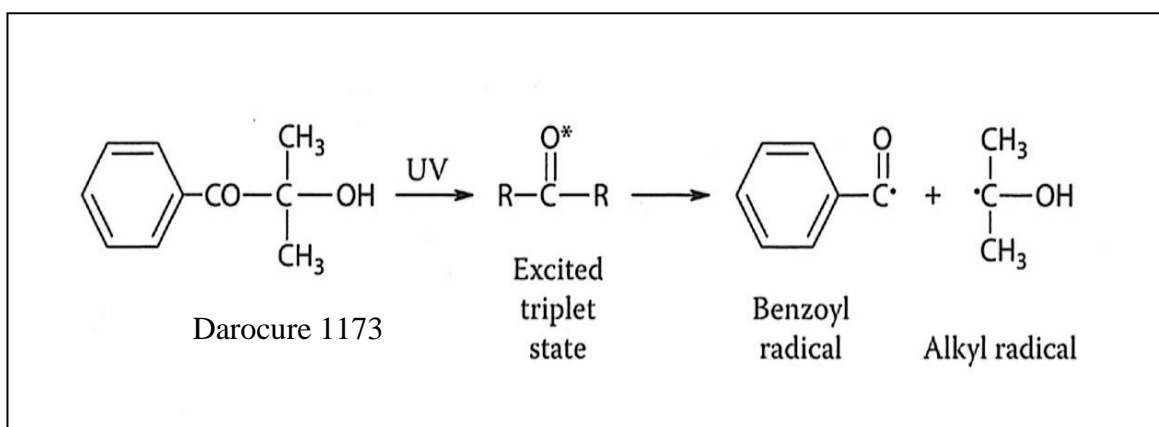


Figure 10. Schéma de la rupture homolytique d'un amorceur de Type I (Darocure 1173) sous irradiation UV [155].

En général, la rupture homolytique sur liaison CO-C est le principal mécanisme des amorceurs de Type I pour générer des radicaux libres. Cependant, certains amorceurs peuvent subir une deuxième rupture dans une moindre mesure appelée 'β-scission' conduisant à la formation de différents radicaux avec des réactivités différentes (Fig. 11). Tel est le cas de l'Irgacure 907 de la famille d'α-alkylamino-acétophénone que nous avons utilisé pour la préparation des monolithes dans des puces en PDMS comme il sera décrit plus tard dans ce manuscrit.

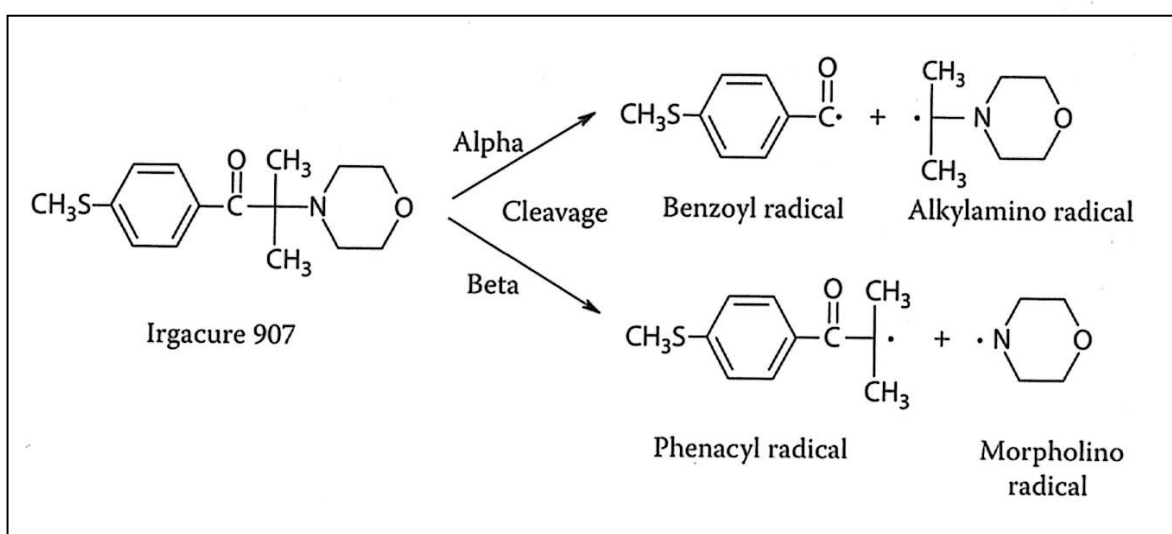


Figure 11. Schéma de la rupture homolytique de l'Irgacure 907 sous irradiation UV [155].

Selon l'amorceur, il est important de noter qu'une partie des radicaux générés est impliquée dans des réactions secondaires donnant naissance à des sous produits inactifs ne participant pas à l'amorçage de la polymérisation.

3.2.1.2 Mécanisme de Type II : Processus d'abstraction d'hydrogène

Les amorceurs de Type II tels que la benzophénone et les dérivés de la benzophénone, les thioxanones et les anthraquinones sont des cétones polycycliques aromatiques qui ne subissent pas la rupture homolytique mais abstraient un hydrogène sur une molécule donneuse d'hydrogène tels que les amines tertiaires, les alcools, les éthers, les esters ou les thiols pour former des radicaux libres. Le mécanisme photochimique de la benzophénone a été largement étudié dans la littérature [154,155,158,159] (Fig. 12). Lors de son irradiation, la benzophénone absorbe une quantité d'énergie UV permettant le passage à un état d'énergie triplet excité par conversion inter-système (Fig. 9). La molécule reste dans cet état jusqu'à ce qu'elle puisse réagir avec un donneur d'hydrogène pour former un radical ketyl et un radical alkyl du donneur. Le radical alkyl du donneur peut amorcer ensuite une réaction de polymérisation en chaîne tandis que le radical ketyl ayant une faible réactivité n'initie pas la polymérisation. Il peut cependant se recombinaison pour former le composé benzopinacol [159].

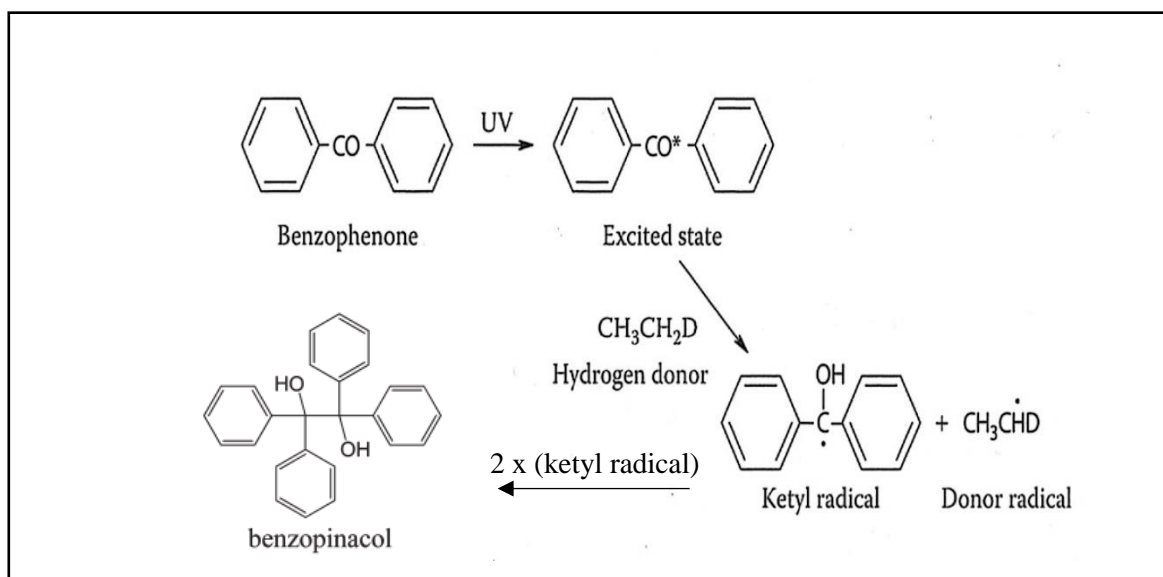


Figure 12. Schéma du mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la benzophénone à partir d'un donneur d'hydrogène ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{D}$) [155].

La production des radicaux libres se fait à partir de l'état triplet de l'amorceur. En général, la durée de vie moyenne de cet état est plus courte (<0.1 à 30 ns) pour les amorceurs de Type I que pour les amorceurs de Type II (150-800 ns), ce qui les empêche de réagir avec de l'oxygène (inhibiteur de la polymérisation) et les rend plus efficaces pour déclencher la polymérisation [155]. Les amorceurs de Type I sont d'ailleurs les plus utilisés pour la synthèse des monolithes organiques comparativement aux amorceurs de Type II où peu de travaux ont été publiés [148].

3.2.1.3 Cinétique de l'amorçage

D'un point de vue cinétique, il est possible de décrire l'étape d'amorçage pour les amorceurs de Type I de la manière suivante :

- Une réaction de décomposition homolytique de l'amorceur (I) en une paire de radicaux ($\text{R}\cdot$) suivant la constante de vitesse de dissociation de l'amorceur (k_d).



- Suite à l'homolyse de l'amorceur, ces radicaux $\text{R}\cdot$ réagissent avec le monomère (M) pour former un nouveau radical ($\text{RM}\cdot$) qui agit comme un centre actif primaire pour la suite de la réaction en chaîne avec une constante de vitesse d'amorçage (k_i) et une vitesse d'amorçage R_i .



La vitesse d'amorçage R_i est la vitesse de formation des centres actifs radicalaires et dépend des vitesses des réactions (Eq.1) et (Eq. 2). La vitesse de la réaction (Eq.1) est beaucoup plus faible que celle de la réaction (Eq.2), par conséquent la réaction (Eq.1) détermine la vitesse globale d'amorçage, qui est donnée par la relation suivante :

$$R_i = \frac{d[RM\cdot]}{dt} = 2k_d[I] \quad (\text{Eq.3})$$

Une partie seulement des radicaux attaque effectivement le monomère et va initier des chaînes polymériques. La proportion des radicaux actifs est appelée efficacité, f , [152] dont la valeur est inférieure à 1. Donc, la vitesse d'amorçage devient alors :

$$R_i = 2k_d f [I] \quad (\text{Eq.4})$$

Le facteur 2 s'applique par convention en considérant que les amorceurs se décomposent en 2 radicaux [154].

3.2.2 La Propagation

Après l'amorçage, c'est l'étape de propagation qui a lieu. Il se forme une chaîne polymérique par l'addition de monomères à la chaîne porteuse du radical. Cette étape est rapide et ne nécessite que peu d'énergie. Pour les amorceurs de Type I, la cinétique est donnée par les réactions et équations décrites ci-dessous. La croissance de $RM_1\cdot$ provoque la formation d'un radical de même nature mais avec une chaîne plus longue d'une unité à chaque addition avec une constante de vitesse de propagation (k_p) qui est considérée pratiquement indépendante du degré de polymérisation [154]. La chaîne cinétique se poursuit donc par un grand nombre de réactions de cette nature.



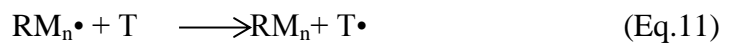
La vitesse de disparition des monomères lors de la propagation (R_p) est décrite par la relation suivante :

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_p[M][RM_n \cdot] \quad (\text{Eq.8})$$

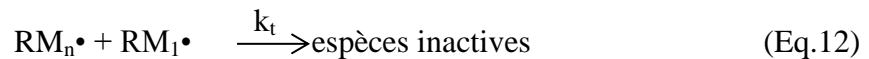
Avec $[M]$ la concentration en monomère et $[RM_n \cdot]$ la concentration en radicaux.

3.2.3 La Terminaison

Enfin, lorsque les chaînes ne croissent plus ou se désactivent, la phase de terminaison est atteinte. Ce sont des réactions de destruction des centres actifs par réaction des radicaux entre eux. Cette étape peut se produire soit lors de la réaction entre deux chaînes porteuses de radicaux qui vont s'associer ou se désactiver par transfert d'hydrogène (Eq.9), soit par la réaction d'une chaîne porteuse avec un radical (Eq.10). En effet, une partie des radicaux permettant d'initier des réactions de polymérisation vont aussi participer à des réactions de terminaison et ainsi limiter le degré de polymérisation. La terminaison peut aussi se produire par quelques réactions de transfert (Eq.11) : soit par le transfert du radical à une autre molécule (T) telle qu'un monomère, une impureté présente dans les solvants et les monomères utilisés, ou des agents inhibiteurs comme l'oxygène.



D'un point de vue cinétique, on considère l'arrêt de la croissance de la chaîne de polymérisation par la relation générale (Eq. 13), avec une constante de vitesse de terminaison (k_t) et une vitesse de terminaison R_t :



$$R_t = 2k_t[RM \cdot]^2 \quad (\text{Eq.13})$$

3.3 Vitesse globale de polymérisation radicalaire en chaîne

La vitesse globale de polymérisation est essentiellement la vitesse de disparition des monomères soit la vitesse de propagation, puisque la consommation du monomère par d'autres réactions (amorçage ou transfert) est négligeable, étant donné le très grand nombre d'étapes de propagation. Afin d'estimer cette vitesse, on fait appel à l'hypothèse du régime stationnaire [152,154]. Celle-ci implique que la concentration en radicaux reste stationnaire (valeur constante) tout au long de la croissance d'une chaîne et que la vitesse de production des radicaux actifs (vitesse d'amorçage (R_i)) soit égale à la vitesse de destruction de ces radicaux actifs (vitesse de terminaison (R_t)). S'il en était autrement, on assisterait, soit à l'arrêt de la polymérisation (si $R_i < R_t$) ou, au contraire, à une accélération continue de la polymérisation ($R_t < R_i$) [152]. Il convient de remarquer que la durée de la croissance d'une chaîne polymérique, entre l'amorçage et la terminaison, est extrêmement petite, de l'ordre de la milliseconde et rarement la seconde justifiant ainsi l'hypothèse du régime stationnaire [152,154]. On peut donc écrire :

$$R_i = 2k_d f [I] = R_t = 2k_t [RM \cdot]^2 \quad (\text{Eq.14})$$

$$\text{D'où : } [RM \cdot] = (k_d f \frac{[I]}{k_t})^{1/2} \quad (\text{Eq.15})$$

En combinant les équations (8) et (15) la vitesse de polymérisation peut s'exprimer par :

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = k_p [M] (k_d f \frac{[I]}{k_t})^{1/2} \quad (\text{Eq.16})$$

Cette équation décrit le cas plus général d'une réaction en chaîne. Il faut noter cependant que la vitesse globale de polymérisation dépend de l'évolution de la concentration en amorceur qui, tout comme le monomère, se consume au fur et à mesure de la progression du processus de polymérisation. La Fig. 13 montre une courbe typique de la cinétique de polymérisation en fonction du temps pour un monomère diméthyleacrylate [160]. On distingue 3 étapes successives : (i) une augmentation rapide de R_p correspondant à une augmentation de la concentration de radicaux (traduit par une augmentation de la viscosité du milieu), (ii) un maximum de consommation du monomère (R_{pmax}), (iii) un ralentissement de la vitesse de polymérisation à cause de la diminution de la concentration du monomère et de l'amorceur (viscosité du milieu diminuant la mobilité des espèces réactives).

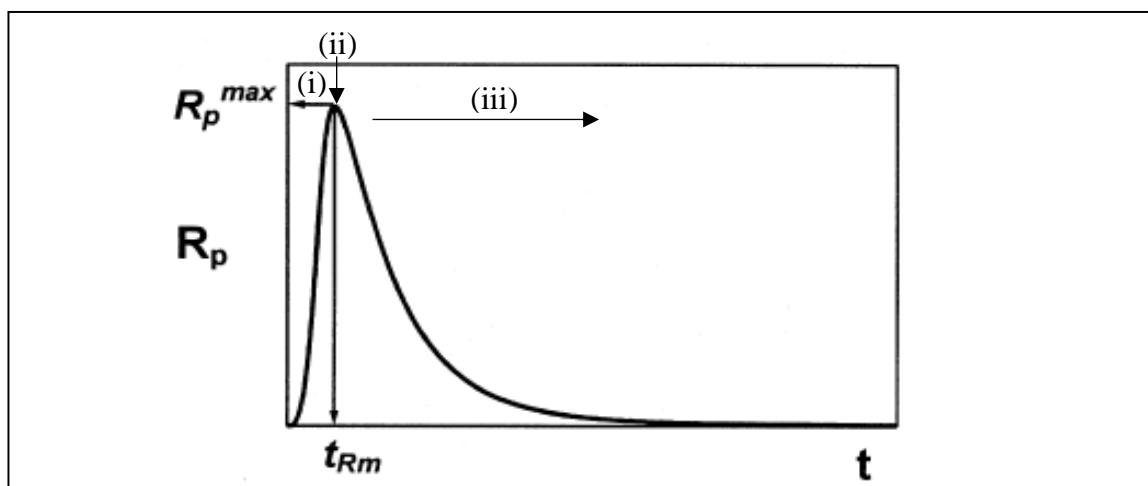


Figure 13. Courbe typique de la cinétique de polymérisation pour un monomère diméthylacrylate[160] (R_p = vitesse de polymérisation, R_{pmax} = vitesse maximale (maximum consommation de monomère), t =temps).

3.3.1 Vitesse et facteurs qui influencent la photopolymérisation

Dans le cas de la photopolymérisation, l'équation de la vitesse d'amorçage prend en compte les caractéristiques du rayonnement UV. Ainsi, la vitesse de formation des radicaux permettant l'amorçage du processus est proportionnelle à l'intensité du rayonnement absorbé par la molécule subissant la photolyse [154]. La vitesse d'amorçage peut alors s'écrire :

$$R_i = 2 \Phi I_a \quad (\text{Eq.17})$$

où, I_a est l'intensité du rayonnement UV et Φ le rendement quantique en radicaux libres pour l'amorçage. Le facteur 2 ne s'applique que pour les amorceurs se décomposant en deux radicaux, s'il n'y a qu'un seul radical de formé par molécule d'amorceur, alors il faut appliquer un facteur 1. La valeur maximale de Φ est 1 pour tous les systèmes photoinduits. On obtient l'expression de I_a par la loi de Beer Lambert :

$$I_a = I_0 e^{(-\epsilon[I]l)} \quad (\text{Eq.18})$$

où, I_0 est l'intensité du rayonnement incident, ϵ est le coefficient d'extinction molaire de l'amorceur à la longueur d'onde employée, $[I]$ la concentration de l'amorceur et l , l'épaisseur du mélange réactionnel subissant l'irradiation. Pour la plupart des

photopolymérisations, la quantité de lumière absorbée ne peut être négligée et I_0 et I_a , (intensité absorbée par l'amorceur), dépendront de l'épaisseur du matériau. L'intensité absorbée par le système réactionnel devient alors :

$$I_a = I_0 [1 - e^{(-\varepsilon[I]l)}] \quad (\text{Eq.19})$$

Pour estimer la vitesse de photopolymérisation (R_{pp}), on considère que la concentration en radicaux est supposée atteindre une valeur constante (régime stationnaire) ce qui engendre une vitesse d'amorçage (R_i) égale à la vitesse de terminaison (R_t). Ainsi, en combinant les équations (8), (13), (17) et (19) on obtient l'équation de la vitesse de photopolymérisation :

$$R_{pp} = k_p[M] (\Phi I_0 [1 - e^{(-\varepsilon[I]l)}) / k_t)^{1/2} \quad (\text{Eq.20})$$

Cette expression met en évidence les facteurs influençant la vitesse de photopolymérisation :

- la concentration $[I]$ et la réactivité à travers les paramètres Φ et ε de l'amorceur [156,161]. Ainsi, pour être efficace et induire une vitesse d'amorçage rapide, un amorceur doit satisfaire certaines conditions : avoir un maximum d'absorbance à la longueur d'onde d'irradiation, un coefficient d'extinction molaire (ε) et un rendement quantique élevés (Φ) pour produire un maximum de radicaux par photon absorbé, et résister à la désactivation par l'oxygène.
- la concentration $[M]$ et nature et réactivité à travers la constante de vitesse k_p et k_t des monomères. Le monomère est le facteur principal d'un système photoinduit de par la réactivité ou les propriétés chimiques et physiques qu'il présente. Il a été souligné que la réactivité des acrylates est plus élevée que celle des méthacrylates [153].
- l'énergie d'irradiation apportée à travers l'intensité du rayonnement I_0 . La source lumineuse doit être adaptée au type d'amorceur choisi. L'intensité lumineuse et une longueur d'onde d'illumination doivent correspondre au maximum d'absorbance de l'amorceur pour permettre une rupture homolytique optimale [161].

3.4 Méthodes d'ancrage de monolithe en microsystemes

Parmi les nombreuses approches d'enrichissement d'échantillon développées (décrites dans l'étude bibliographique), les monolithes organiques offrant une perméabilité et une surface spécifique élevées sont largement utilisés. Leur possibilité d'être synthétisé *in situ* par voie photochimique, les rend très attractifs en tant que support solide pour réaliser une préconcentration en microsysteme. Toutefois, la synthèse des monolithes *in situ* dans des microcanaux présente certains inconvénients car elle requiert un prétraitement de la surface de ces canaux comme dans les cas des capillaires. Ce prétraitement dépend du type de matériau utilisé pour la fabrication des microsystemes. Les principaux matériaux sont des verres (silice fondue, quartz, verre de borosilicate...) et des polymères (PDMS, PMMA, COC...) [141,162,163]. Dans le cas des microsystemes en verre, une réaction de silanisation similaire à celle utilisée pour la synthèse de monolithe en capillaires est nécessaire pour fonctionnaliser les parois des canaux lors de la synthèse de monolithe. Dans le cas des microsystemes polymériques, le traitement de surface qui est un inconvénient majeur dépend du type de polymère utilisé pour la microfabrication puisque l'ancrage du monolithe est souvent difficile à réaliser. Dans cette partie, nous décrivons les différentes méthodes employées pour le traitement de surface seulement pour le verre et le PDMS car ces matériaux ont été utilisés lors de nos travaux expérimentaux.

3.4.1 Traitement des canaux en verre

En premier lieu des étapes de rinçage sont nécessaires lors de la réaction de silanisation afin d'activer la surface du canal. La première étape consiste en un traitement en milieu basique afin de dissoudre partiellement le réseau de silice permettant d'augmenter le nombre de groupements silanol ionisés. Cette étape est suivie d'un rinçage à l'eau MilliQ puis d'un rinçage en milieu acide pour obtenir des groupements silanol intervenant dans la réaction de silanisation. La réaction de silanisation fait intervenir un agent silanisant ou promoteur d'adhésion. Il existe divers agents silanisants qui possèdent des fonctions vinyloxy variées en fonction du monolithe à synthétiser. Le plus répandu est le 3-(triméthoxysilyl) propyl méthacrylate (γ -MAPS) dont Hjerten et al. [164] ont été parmi les premiers à l'utiliser. Cet agent réagit d'une part via ses groupements méthoxy avec les groupements silanols de la surface du canal pour former des pont siloxanes et d'autre part avec le monolithe en croissance dans le canal sous l'effet de l'irradiation UV (Fig. 14). Cette étape de prétraitement est indispensable afin de lier le monolithe à la paroi du microsysteme de façon covalente et uniforme et éviter tout détachement du monolithe lors

des étapes ultérieures de rinçage sous pression ou encore lors des analyses sous champ électrique.

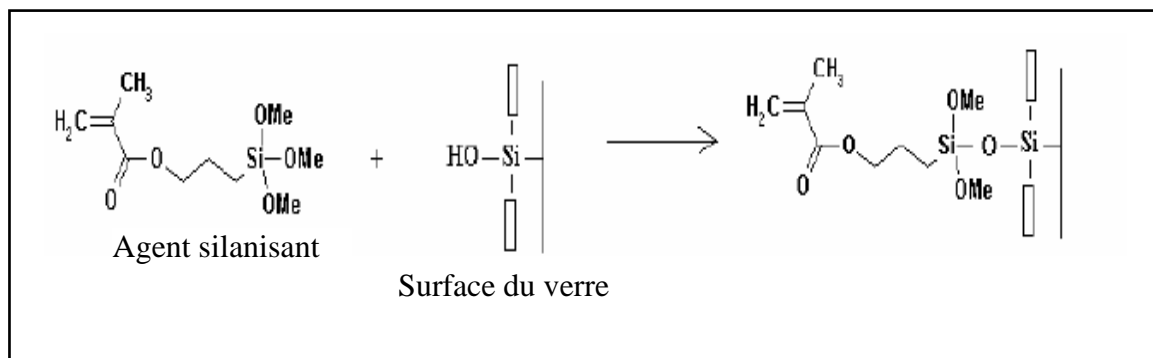


Figure 14. Schéma de la réaction de silanisation [166].

Après les travaux de Hjerten et al.[164], de nombreuses variantes du protocole permettant de préparer la surface ont été décrites dans la littérature dans des capillaires et des microsystèmes en verre [85,148,165–168]. La plus grande différence se situe surtout au niveau de la concentration en γ -MAPS, du solvant et du temps de réaction. Le verre est le matériau le plus utilisé pour intégrer un support solide de préconcentration, ce qui peut être expliqué par le traitement de surface avec du γ -MAPS qui est relativement simple à mettre en œuvre.

3.4.2 Traitement des canaux en PDMS

La synthèse de monolithe dans les microcanaux en PDMS natif reste toujours un défi majeur en raison de la forte absorption des monomères et des porogènes à la surface du matériau qui est très hydrophobe. Cela entraîne une mauvaise répétabilité de la synthèse du monolithe. De plus, le PDMS est très perméable à l'oxygène qui inhibe la polymérisation [169]. A ce jour, seuls quelques travaux ont décrit la photopolymérisation de monolithe à l'intérieur des canaux en PDMS [169–173]. Pour éviter ces problèmes, il est nécessaire de modifier la surface du matériau. Ainsi, plusieurs stratégies permettant la fonctionnalisation de la surface des canaux en PDMS ont été reportées et discutées dans plusieurs revues dans la littérature : Makama et al. [174] , Wong et Ho [175] et Zou et al. [176]. Parmi eux, quatre approches essentielles ont été proposées afin de rendre possible la synthèse et l'ancrage du monolithe dans des puces en PDMS.

La première approche est basée sur la réaction de silanisation généralement utilisée pour la synthèse de monolithe dans des puces en verre. Pour obtenir des groupements silanols

actifs, la surface du PDMS doit être préalablement oxydée. Une fois oxydé, le PDMS est alors prêt à être silanisé par des alcoxysilanes qui possèdent des fonctions vinyloxy susceptibles de participer à la réaction de polymérisation du monolithe. Zeng et al. [177] ont synthétisé *in situ* un monolithe à base de gel de polyacrylamide pour la séparation d'énantiomères des acides aminés dont les parois du canal en PDMS ont été auparavant oxydées par irradiation UV et fonctionnalisées par le γ -MAPS [178] ont modifié la surface du PDMS par un rinçage avec du NaOH et un traitement au γ -MAPS. Ils ont ensuite synthétisé un monolithe à base de butyl méthacrylate pour la préconcentration de prométhazine. Bien que le traitement par plasma d'oxygène n'ait pas été évoqué dans la littérature des monolithes, il peut également être utilisé pour oxyder la surface du PDMS.

La deuxième approche est basée sur la modification de surface du PDMS par voie photochimique ou 'photografting'. Il s'agit de générer des radicaux libres à la surface du matériau. Ces radicaux libres peuvent ensuite réagir avec des monomères pour créer un film ou couche polymérique à la surface du matériau. Le greffage photochimique de polymère grâce au mécanisme d'abstraction d'hydrogène par la benzophénone a été développé initialement par Ranby et al. [179] sur des surfaces en COC. Cette méthode a été largement étudiée dans la littérature en milieu ouvert sur des plaques ou en milieu fermé dans des microcanaux en polymère [159,180–182]. Le groupe de Fréchet a été l'un des premiers à utiliser ce mécanisme pour ancrer un monolithe organique à base de butyl méthacrylate dans des puces en COC [183].

Le greffage photochimique des monomères hydrophiles tels que l'acide acrylique (ACA), l'acrylamide (AA), le diméthyle acrylamide (DMA), le 2-hydroxy éthyleacrylate (HEA) et le poly (éthylène glycol) monométhoxyle acrylate (PEG) à la surface du PDMS a été réalisé la première fois par le groupe d'Albritton [184] (Fig. 15). Le taux de greffage a été suivi par la mesure de l'angle de contact (plus le liquide s'étale sur une surface plus l'angle de contact est faible (caractère hydrophile)). Ainsi, la surface du PDMS greffée avec du ACA a donné les meilleurs résultats avec un angle de contact de 45° contrairement au PDMS natif qui présentait un angle de contact de 109° suggérant un caractère hydrophobe [184]. Ce même groupe a proposé ensuite une méthode en deux étapes pour modifier la surface des microcanaux en PDMS. La première étape était la pré-absorption de la benzophénone dans le canal suivi par l'introduction d'une solution composée de monomères (ACA, PEG, diPEG), de periodate de sodium (NaIO_4) et de l'alcool

benzylique. La deuxième étape est l'exposition au rayonnement UV à 254 nm. Ainsi, les fonctions acrylates libres des monomères bifonctionnels ancrés à la surface du PDMS peuvent ensuite réagir dans une troisième étape avec les monomères du mélange de polymérisation permettant ainsi l'ancrage du monolithe par voie radicalaire. Cette étape de fonctionnalisation permet donc à la fois de limiter l'absorption des monomères/porogènes et d'ancrer le monolithe à la surface du PDMS. Ce protocole est l'un des plus évoqué dans la littérature pour réussir la synthèse et l'ancrage de monolithe organique dans des puces en PDMS. En utilisant ce protocole Bedair et Oleschuck[169] ont synthétisé un monolithe organique à base de méthyle acrylamide (MA)-éthylène glycol diméthylacrylate (EGDMA) qui a été utilisé comme émetteur d'électrospray pour le couplage de la puce avec la spectrométrie de masse. Faure et al.[170] ont synthétisé un monolithe à base d'hexyl acrylate et de 1,3 butanediol diacrylate pour la séparation électrochromatographique de deux catécholamines. Kang et al.[171] ont synthétisé un monolithe poly (acide méthacrylique (MAA)-EGDMA) pour la préconcentration de dopamine. Le même groupe a ensuite synthétisé ce monolithe au sein d'un canal en PDMS pour l'immunocapture d'immunoglobulines (IgG) et du virus de l'influenza (H1N1) [172].

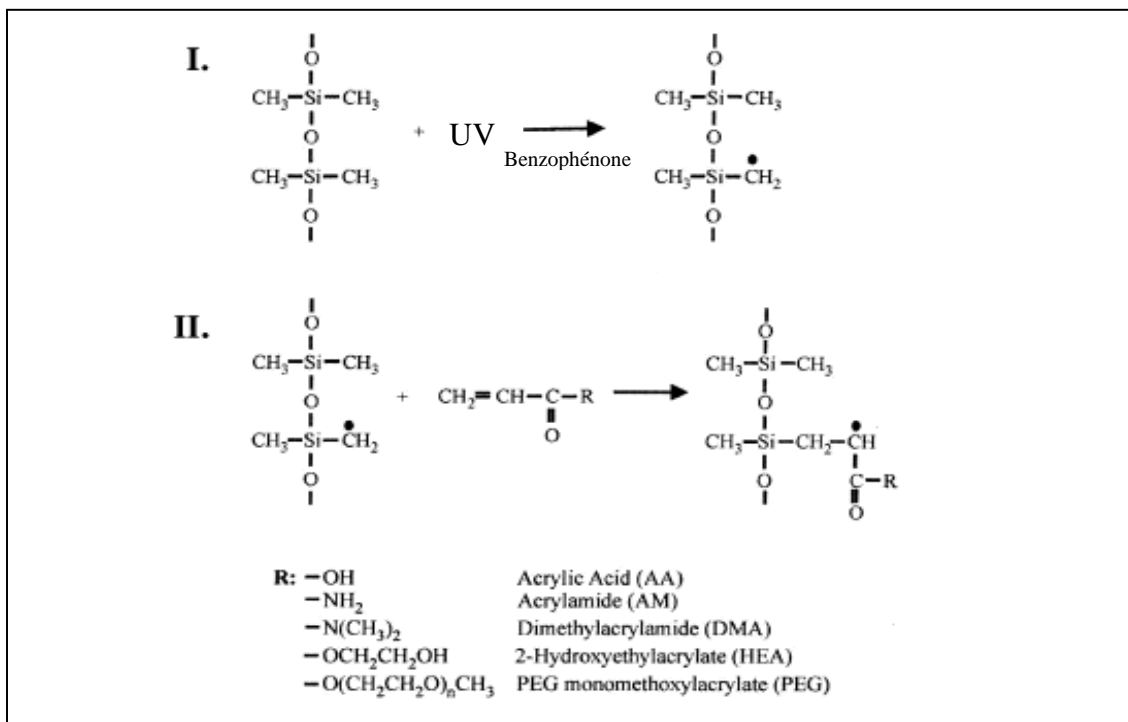


Figure 15. Schéma sur le greffage photochimique des monomères hydrophiles sur la surface du PDMS par l'utilisation de le benzophénone [184].

I. Formation des radicaux à la surface du PDMS sous irradiation UV.

II. Etape d'amorçage de la réaction de polymérisation sur la surface du PDMS.

Burke et Smela [173] ont proposé une autre méthode pour l'ancrage de monolithe basée sur la pré-absorption du photoinitiateur 2,2-dimethoxy-2-phenyl-acetophenone (DMPA) dans le canal en PDMS suivi par l'introduction du mélange de polymérisation. Ce mélange a été laissé quelques minutes dans le canal pour permettre à une partie des composés de diffuser dans le PDMS avant d'être irradié à 365 nm. Avec ce protocole les auteurs ont réussi à synthétiser et ancrer un monolithe à base de butyl méthacrylate pour la préconcentration de cellules de lymphocytes B. Cette procédure n'est pas du photografting car aucune couche de polymère n'a été greffée sur la surface du PDMS de façon covalente. La polymérisation du monolithe débute plutôt entre les chaînes du PDMS car une partie de la solution a été absorbée, ce qui a permis un ancrage efficace aux parois du canal.

Très récemment, dans notre laboratoire nous avons développé une nouvelle stratégie pour la synthèse et l'ancrage simultanés du monolithe organique à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et bisacrylamide (BAA) via le processus d'abstraction d'hydrogène par l'amorceur 2-méthyle-4'-(méthylthio)-2-morpholino-propiofenone (Irgacure 907) (Araya-Farias et al. [185]). Ces travaux sont décrits plus en détail dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre bibliographique, la synthèse d'un monolithe organique à l'intérieur d'un microsystème est décrite en exposant particulièrement son mode de synthèse par polymérisation radicalaire sous irradiation UV. C'est une voie simple pour obtenir en quelques minutes une phase solide monolithique dans un microcanal.

Grâce au prétraitement au γ -MAPS, il est possible d'ancrer de façon covalente un monolithe aux parois d'un microsystème en verre. L'approche de greffage photochimique ou photografting reste la plus utilisée pour réussir la synthèse et l'ancrage du monolithe aux parois d'un canal de microsystèmes en PDMS.

Ainsi, dans le cadre de mon sujet de thèse, nous avons choisi cette voie de photopolymérisation pour la synthèse du monolithe organique à base d'EGMP destinée à servir de support solide à la préconcentration de phosphopeptides par chromatographie de type IMAC en microsystèmes. L'interprétation de cette étude approfondie réalisée ici sur la

cinétique de la polymérisation radicalaire nous a permis de déterminer les facteurs les plus critiques impactant la synthèse de monolithes organiques dans des microcanaux, à savoir la concentration et la nature de l'amorceur, la concentration et la nature du monomère, l'intensité lumineuse incidente et la durée de l'irradiation.

Références

- [1] P. Cohen, The role of protein phosphorylation in human health and disease., *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 5001–5010.
- [2] R. Raggiaschi, S. Gotta, G.C. Terstappen, Phosphoproteome analysis, *Biosci. Rep.* 25 (2005) 33–44. doi:10.1007/s10540-005-2846-0.
- [3] J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, et al., Global, In Vivo, and Site-Specific Phosphorylation Dynamics in Signaling Networks, *Cell.* 127 (2006) 635–648. doi:10.1016/j.cell.2006.09.026.
- [4] M. Mann, S.-E. Ong, M. Grønborg, H. Steen, O.N. Jensen, A. Pandey, Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 261–268. doi:10.1016/S0167-7799(02)01944-3.
- [5] G. Burnett, E.P. Kennedy, The enzymatic phosphorylation of proteins, *J Biol Chem.* 211 (1954) 969–980.
- [6] G. Han, M. Ye, H. Zou, Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis, *The Analyst.* 133 (2008) 1128. doi:10.1039/b806775a.
- [7] A. Sickmann, M. Mreyen, H.E. Meyer, Identification of modified proteins by mass spectrometry, *IUBMB Life.* 54 (2002) 51–57. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/15216540214314/full>.
- [8] T. Hunter, B.M. Sefton, Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77 (1980) 1311–1315.
- [9] T. Hunter, Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell.* 80 (1995) 225–236. doi:10.1016/0092-8674(95)90405-0.
- [10] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, et al., Protein tyrosine phosphatases in the human genome, *Cell.* 117 (2004) 699–711.
- [11] R. Roskoski, ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation, *Pharmacol. Res.* 66 (2012) 105–143. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005.
- [12] E.K. Kim, E.-J. Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1802 (2010) 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
- [13] M. de Graauw, P. Hensbergen, B. van de Water, Phospho-proteomic analysis of cellular signaling, *ELECTROPHORESIS.* 27 (2006) 2676–2686. doi:10.1002/elps.200600018.
- [14] B. Zhou, Z.-Y. Zhang, The Activity of the Extracellular Signal-regulated Kinase 2 Is Regulated by Differential Phosphorylation in the Activation Loop, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 13889–13899. doi:10.1074/jbc.M200377200.
- [15] A.S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, W. Kolch, MAP kinase signalling pathways in cancer, *Oncogene.* 26 (2007) 3279–3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421.
- [16] C.T. Chu, D.J. Levinthal, S.M. Kulich, E.M. Chalovich, D.B. DeFranco, Oxidative neuronal injury: The dark side of ERK1/2, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2060–2066. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04132.x.
- [17] P.R. Cutillas, C. Jørgensen, Biological signalling activity measurements using mass spectrometry, *Biochem. J.* 434 (2011) 189–199. doi:10.1042/BJ20101974.
- [18] X. Zhu, H. Lee, A.K. Raina, G. Perry, M.A. Smith, The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer’s Disease, *Neurosignals.* 11 (2002) 270–281. doi:10.1159/000067426.
- [19] J.-J. Pei, H. Braak, W.-L. An, B. Winblad, R.F. Cowburn, K. Iqbal, et al., Up-regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and MEK1/2 is associated with the progression of neurofibrillary degeneration in Alzheimer’s disease, *Mol. Brain Res.* 109 (2002) 45–55.
- [20] H. Klafki. Responsable du LVR-Hospital Essen, Département de Psychiatrie and Psychothérapie, Faculté de Médecine, Université de DuisburgEssen, Essen, Germany. Communication personnelle (2011).
- [21] A. Lièvre, P. Laurent-Puig, La voie de signalisation RAS/MAPK, *Cancéro Dig. II* (2010). doi:10.4267/2042/30747.

- [22] S. Duhamel, J. Hebert, L. Gaboury, A. Bouchard, R. Simon, G. Sauter, et al., Sef Downregulation by Ras Causes MEK1/2 to Become Aberrantly Nuclear Localized Leading to Polyploidy and Neoplastic Transformation, *Cancer Res.* 72 (2012) 626–635. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2126.
- [23] X. Deschênes-Simard, F. Kottakis, S. Meloche, G. Ferbeyre, ERKs in Cancer: Friends or Foes?, *Cancer Res.* 74 (2014) 412–419. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2381.
- [24] Da Silveira S. Les biomarqueurs ouvrent de nouvelles perspectives de diagnostic. *Rapport Biotechs* 20 (2011), 1-2.
- [25] J. Wiltfang, P. Lewczuk, P. Riederer, E. Grünblatt, C. Hock, P. Scheltens, et al., Consensus Paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers of Dementia: The role of CSF and blood analysis in the early and differential diagnosis of dementia, *World J. Biol. Psychiatry.* 6 (2005) 69–84. doi:10.1080/15622970510029786.
- [26] J. Wiltfang, H. Esselmann, P. Cupers, M. Neumann, H. Kretzschmar, M. Beyermann, et al., Elevation of β -Amyloid Peptide 2–42 in Sporadic and Familial Alzheimer’s Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42645–42657. doi:10.1074/jbc.M102790200.
- [27] J.B. Toledo, H. Zetterberg, A.C. van Harten, L. Glodzik, P. Martinez-Lage, L. Bocchio-Chiavetto, et al., Alzheimer’s disease cerebrospinal fluid biomarker in cognitively normal subjects, *Brain.* 138 (2015) 2701–2715. doi:10.1093/brain/awv199.
- [28] E.-M. Mandelkow, E. Mandelkow, *Biochemistry and Cell Biology of Tau Protein in Neurofibrillary Degeneration*, Cold Spring Harb. *Perspect. Med.* 2 (2012). doi:10.1101/cshperspect.a006247.
- [29] L. Buée, L. Troquier, S. Burnouf, K. Belarbi, A. Van der Jeugd, T. Ahmed, et al., From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death?: Figure 1, *Biochem. Soc. Trans.* 38 (2010) 967–972. doi:10.1042/BST0380967.
- [30] K. Iqbal, I.G. Iqbal, T.Zaidi, P.A. Merz, G.Y. Wen, P.A.Merz, G.Y., Wen, S.S.Shaiki, H.M Wisniewski. Defective Brain microtubule assembly in Alzheimers Disease.. *The Lancet*, 23 (1986), 421-426.
- [31] G. Šimić, M. Babić Leko, S. Wray, C. Harrington, I. Delalle, N. Jovanov-Milošević, et al., Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer’s Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies, *Biomolecules.* 6 (2016) 6. doi:10.3390/biom6010006.
- [32] D.S. Himmelstein, S.M. Ward, J.K. Lancia, K.R. Patterson, L.I. Binder, Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease, *Pharmacol. Ther.* 136 (2012) 8–22. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.07.001.
- [33] S.P. Braithwaite, J.B. Stock, M.M. Mouradian, α -Synuclein phosphorylation as a therapeutic target in Parkinson’s disease, *Rev. Neurosci.* 23 (2012). doi:10.1515/revneuro-2011-0067.
- [34] H. Fujiwara, M. Hasegawa, N. Dohmae, A. Kawashima, E. Masliah, M.S. Goldberg, et al., α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions, *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 160–164. doi:10.1038/ncb748.
- [35] J.P. Anderson, D.E. Walker, J.M. Goldstein, R. de Laat, K. Banducci, R.J. Caccavello, et al., Phosphorylation of Ser-129 Is the Dominant Pathological Modification of α -Synuclein in Familial and Sporadic Lewy Body Disease, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29739–29752. doi:10.1074/jbc.M600933200.
- [36] K.E. Paleologou, A. Oueslati, G. Shakked, C.C. Rospigliosi, H.-Y. Kim, G.R. Lamberto, et al., Phosphorylation at S87 Is Enhanced in Synucleinopathies, Inhibits α -Synuclein Oligomerization, and Influences Synuclein-Membrane Interactions, *J. Neurosci.* 30 (2010) 3184–3198. doi:10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010.
- [37] M. Hejjaoui, S. Butterfield, B. Fauvet, F. Vercruyse, J. Cui, I. Dikiy, et al., Elucidating the Role of C-Terminal Post-Translational Modifications Using Protein Semisynthesis Strategies: α -Synuclein Phosphorylation at Tyrosine 125, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5196–5210. doi:10.1021/ja210866j.
- [38] Y. Xu, Y. Deng, H. Qing, The phosphorylation of α -synuclein: development and implication for the mechanism and therapy of the Parkinson’s disease, *J. Neurochem.* (2015) n/a–n/a. doi:10.1111/jnc.13234.

- [39] S.R. Schmidt, F. Schweikart, M.E. Andersson, Current methods for phosphoprotein isolation and enrichment, *J. Chromatogr. B.* 849 (2007) 154–162. doi:10.1016/j.jchromb.2006.09.016.
- [40] T.E. Thingholm, O.N. Jensen, M.R. Larsen, Analytical strategies for phosphoproteomics, *PROTEOMICS*. 9 (2009) 1451–1468. doi:10.1002/pmic.200800454.
- [41] A. Leitner, Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 177–185. doi:10.1016/j.trac.2009.08.007.
- [42] J.D. Dunn, G.E. Reid, M.L. Bruening, Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 29–54. doi:10.1002/mas.20219.
- [43] L. Beltran, P.R. Cutillas, Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics, *Amino Acids*. 43 (2012) 1009–1024. doi:10.1007/s00726-012-1288-9.
- [44] B. Eyrich, A. Sickmann, R.P. Zahedi, Catch me if you can: Mass spectrometry-based phosphoproteomics and quantification strategies, *Proteomics*. 11 (2011) 554–570. doi:10.1002/pmic.201000489.
- [45] J. Fíla, D. Honys, Enrichment techniques employed in phosphoproteomics, *Amino Acids*. 43 (2012) 1025–1047. doi:10.1007/s00726-011-1111-z.
- [46] E. Kanshin, S. Michnick, P. Thibault, Sample preparation and analytical strategies for large-scale phosphoproteomics experiments, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2012) 843–853. doi:10.1016/j.semcdb.2012.05.005.
- [47] C. Yang, X. Zhong, L. Li, Recent advances in enrichment and separation strategies for mass spectrometry-based phosphoproteomics, *Electrophoresis*. 35 (2014) 3418–3429. doi:10.1002/elps.201400017.
- [48] J. Li, C. Silva-Sanchez, T. Zhang, S. Chen, H. Li, Phosphoproteomics technologies and applications in plant biology research, *Front. Plant Sci.* 6 (2015). doi:10.3389/fpls.2015.00430.
- [49] D. Edbauer, D. Cheng, M.N. Batterton, C.-F. Wang, D.M. Duong, M.B. Yaffe, et al., Identification and Characterization of Neuronal Mitogen-activated Protein Kinase Substrates Using a Specific Phosphomotif Antibody, *Mol. Cell. Proteomics*. 8 (2009) 681–695. doi:10.1074/mcp.M800233-MCP200.
- [50] K. Rikova, A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, et al., Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer, *Cell*. 131 (2007) 1190–1203. doi:10.1016/j.cell.2007.11.025.
- [51] G.S. Chaga, Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future, *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49 (2001) 313–334. doi:10.1016/S0165-022X(01)00206-8.
- [52] V. Gaberc-Porekar, V. Menart, Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *J. Biochem. Biophys. Methods*. 49 (2001) 335–360.
- [53] E.K.M. Ueda, P.W. Gout, L. Morganti, Current and prospective applications of metal ion–protein binding, *J. Chromatogr. A*. 988 (2003) 1–23. doi:10.1016/S0021-9673(02)02057-5.
- [54] R.C.F. Cheung, J.H. Wong, T.B. Ng, Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1411–1420. doi:10.1007/s00253-012-4507-0.
- [55] J. Porath. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258 (1975), 598-599.
- [56] L. Andersson, J. Porath, Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 250–254. doi:10.1016/0003-2697(86)90523-3.
- [57] E. Sulkowski, The saga of IMAC and MIT, *BioEssays*. 10 (1989) 170–175. doi:10.1002/bies.950100508.
- [58] Z.-G. Wang, N. Lv, W.-Z. Bi, J.-L. Zhang, J.-Z. Ni, Development of the Affinity Materials for Phosphorylated Proteins/Peptides Enrichment in Phosphoproteomics Analysis, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 8377–8392. doi:10.1021/acsami.5b01254.
- [59] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: Fundamental principles, *J. Chem. Educ.* 45 (1968) 581.

- [60] L. Andersson, J. Porath, Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography, *Anal. Biochem.* 154 (1986) 250–254. doi:10.1016/0003-2697(86)90523-3.
- [61] M.C. Posewitz, P. Tempst, Immobilized Gallium(III) Affinity Chromatography of Phosphopeptides, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2883–2892. doi:10.1021/ac981409y.
- [62] G. Muszyńska, G. Dobrowolska, A. Medin, A. Medin, P. Ekman, J.O. Porath, Model studies on iron(III) ion affinity chromatography: II. ☆ Interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins, *J. Chromatogr. A.* 604 (1992) 19–28. doi:10.1016/0021-9673(92)85524-W.
- [63] H. Zhou, S. Xu, M. Ye, S. Feng, C. Pan, X. Jiang, et al., Zirconium Phosphonate-Modified Porous Silicon for Highly Specific Capture of Phosphopeptides and MALDI-TOF MS Analysis, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2431–2437. doi:10.1021/pr060162f.
- [64] J. Dong, H. Zhou, R. Wu, M. Ye, H. Zou, Specific capture of phosphopeptides by Zr⁴⁺-modified monolithic capillary column, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2917–2923. doi:10.1002/jssc.200700350.
- [65] S. Feng, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, X. Jiang, H. Zou, et al., Immobilized Zirconium Ion Affinity Chromatography for Specific Enrichment of Phosphopeptides in Phosphoproteome Analysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 1656–1665. doi:10.1074/mcp.T600071-MCP200.
- [66] A.C.-Y. Lai, C.-F. Tsai, C.-C. Hsu, Y.-N. Sun, Y.-J. Chen, Complementary Fe³⁺- and Ti⁴⁺-immobilized metal ion affinity chromatography for purification of acidic and basic phosphopeptides: Purification of acidic and basic phosphopeptides by IMAC, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2186–2194. doi:10.1002/rcm.6327.
- [67] Y. Li, D. Qi, C. Deng, P. Yang, X. Zhang, Cerium Ion-Chelated Magnetic Silica Microspheres for Enrichment and Direct Determination of Phosphopeptides by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1767–1777. doi:10.1021/pr070385l.
- [68] P.L. Stanghellini, E. Boccaleri, E. Diana, G. Alberti, R. Vivani, Vibrational Study of Some Layered Structures Based on Titanium and Zirconium Phosphates, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 5698–5703. doi:10.1021/ic049565c.
- [69] F. Birger Anspach, Silica-based metal chelate affinity sorbents I. Preparation and characterization of iminodiacetic acid affinity sorbents prepared via different immobilization techniques, *J. Chromatogr. A.* 672 (1994) 35–49. doi:10.1016/0021-9673(94)80592-X.
- [70] Z. Horváth, G. Nagydiósi, Imino-diacetic-acid-ethyl-cellulose and its chelate forming behaviour—I, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 37 (1975) 767–769. doi:10.1016/0022-1902(75)80536-7.
- [71] S. Li, C. Dass, Iron(III)-Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography and Mass Spectrometry for the Purification and Characterization of Synthetic Phosphopeptides, *Anal. Biochem.* 270 (1999) 9–14. doi:10.1006/abio.1999.4060.
- [72] J. Ye, X. Zhang, C. Young, X. Zhao, Q. Hao, L. Cheng, et al., Optimized IMAC–IMAC Protocol for Phosphopeptide Recovery from Complex Biological Samples, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3561–3573. doi:10.1021/pr100075x.
- [73] J.D. Dunn, J.T. Watson, M.L. Bruening, Detection of Phosphopeptides Using Fe(III)–Nitritriacetate Complexes Immobilized on a MALDI Plate, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1574–1580. doi:10.1021/ac0515982.
- [74] C.-F. Tsai, Y.-T. Wang, Y.-R. Chen, C.-Y. Lai, P.-Y. Lin, K.-T. Pan, et al., Immobilized Metal Affinity Chromatography Revisited: pH/Acid Control toward High Selectivity in Phosphoproteomics, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4058–4069. doi:10.1021/pr800364d.
- [75] Q. Hu, S. Hu, Z. Zhang, X. Zhou, S. Yang, Y. Zhang, et al., Fe³⁺-immobilized nanoparticle-modified capillary for capillary electrophoretic separation of phosphoproteins and non-phosphoproteins, *Electrophoresis.* 32 (2011) 2867–2873. doi:10.1002/elps.201100138.
- [76] H. Block, B. Maertens, A. Spiestersbach, N. Brinker, J. Kubicek, R. Fabis, et al., Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review, in: Richard R. Burgess and Murray P. Deutscher (Ed.), *Methods Enzymol.*, Academic Press, 2009: pp. 439–473. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909630275>.

- [77] X.-S. Li, L.-D. Xu, G.-T. Zhu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Zirconium arsenate-modified magnetic nanoparticles: preparation, characterization and application to the enrichment of phosphopeptides, *Analyst*. 137 (2012) 959–967. doi:10.1039/C2AN15985F.
- [78] L. Zhang, Q. Zhao, Z. Liang, K. Yang, L. Sun, L. Zhang, et al., Synthesis of adenosine functionalized metal immobilized magnetic nanoparticles for highly selective and sensitive enrichment of phosphopeptides, *Chem. Commun.* 48 (2012) 6274–6276. doi:10.1039/C2CC31641B.
- [79] Y. Yan, Z. Zheng, C. Deng, X. Zhang, P. Yang, Facile synthesis of Ti⁴⁺-immobilized Fe₃O₄@polydopamine core-shell microspheres for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Chem. Commun.* 49 (2013) 5055–5057. doi:10.1039/C3CC41330F.
- [80] L. Zhao, H. Qin, Z. Hu, Y. Zhang, R. Wu, H. Zou, A poly(ethylene glycol)-brush decorated magnetic polymer for highly specific enrichment of phosphopeptides, *Chem. Sci.* 3 (2012) 2828–2838. doi:10.1039/C2SC20363D.
- [81] Y. Shen, L. Qi, L. Mao, Macroporous polymer monoliths with a well-defined three dimensional skeletal morphology derived from a novel phase separator for HPLC, *Polymer*. 53 (2012) 4128–4134. doi:10.1016/j.polymer.2012.07.019.
- [82] Z. Xiong, L. Zhang, C. Fang, Q. Zhang, Y. Ji, Z. Zhang, et al., Ti⁴⁺-immobilized multilayer polysaccharide coated magnetic nanoparticles for highly selective enrichment of phosphopeptides, *J. Mater. Chem. B*. 2 (2014) 4473. doi:10.1039/c4tb00479e.
- [83] J. Lu, Y. Li, C. Deng, Facile synthesis of zirconium phosphonate-functionalized magnetic mesoporous silica microspheres designed for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Nanoscale*. 3 (2011) 1225–1233. doi:10.1039/C0NR00896F.
- [84] P. Wang, L. Zhao, R. Wu, H. Zhong, H. Zou, J. Yang, et al., Phosphonic Acid Functionalized Periodic Mesoporous Organosilicas and Their Potential Applications in Selective Enrichment of Phosphopeptides, *J. Phys. Chem. C*. 113 (2009) 1359–1366. doi:10.1021/jp8093534.
- [85] H. Zhou, M. Ye, J. Dong, G. Han, X. Jiang, R. Wu, et al., Specific Phosphopeptide Enrichment with Immobilized Titanium Ion Affinity Chromatography Adsorbent for Phosphoproteome Analysis, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3957–3967. doi:10.1021/pr800223m.
- [86] W. Ma, Y. Zhang, L. Li, Y. Zhang, M. Yu, J. Guo, et al., Ti⁴⁺-Immobilized Magnetic Composite Microspheres for Highly Selective Enrichment of Phosphopeptides, *Adv. Funct. Mater.* 23 (2013) 107–115. doi:10.1002/adfm.201201364.
- [87] L. Negroni, S. Claverol, J. Rosenbaum, E. Chevet, M. Bonneau, J.-M. Schmitter, Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography, *J. Chromatogr. B*. 891-892 (2012) 109–112. doi:10.1016/j.jchromb.2012.02.028.
- [88] M. Kokubu, Y. Ishihama, T. Sato, T. Nagasu, Y. Oda, Specificity of Immobilized Metal Affinity-Based IMAC/C18 Tip Enrichment of Phosphopeptides for Protein Phosphorylation Analysis, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5144–5154. doi:10.1021/ac050404f.
- [89] I.I. Stewart, T. Thomson, D. Figeys, 18O Labeling: a tool for proteomics, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2456–2465. doi:10.1002/rcm.525.
- [90] T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P.J. Robinson, M.R. Larsen, SIMAC (Sequential Elution from IMAC), a Phosphoproteomics Strategy for the Rapid Separation of Monophosphorylated from Multiply Phosphorylated Peptides, *Mol. Cell. Proteomics*. 7 (2008) 661–671. doi:10.1074/mcp.M700362-MCP200.
- [91] T.-T. Yip, Y. Nakagawa, J. Porath, Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography, *Anal. Biochem.* 183 (1989) 159–171. doi:10.1016/0003-2697(89)90184-X.
- [92] H. Zhou, M. Ye, J. Dong, E. Corradini, A. Cristobal, A.J.R. Heck, et al., Robust phosphoproteome enrichment using monodisperse microsphere-based immobilized titanium (IV) ion affinity chromatography, *Nat. Protoc.* 8 (2013) 461–480. doi:10.1038/nprot.2013.010.
- [93] P.A. Connor, A.J. McQuillan, Phosphate Adsorption onto TiO₂ from Aqueous Solutions: An in Situ Internal Reflection Infrared Spectroscopic Study, *Langmuir*. 15 (1999) 2916–2921. doi:10.1021/la980894p.

- [94] K.D. Dobson, A.J. McQuillan, In situ infrared spectroscopic analysis of the adsorption of aromatic carboxylic acids to TiO₂, ZrO₂, Al₂O₃, and Ta₂O₅ from aqueous solutions, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 56 (2000) 557–565.
- [95] J.A. Blackwell, P.W. Carr, Fluoride-modified zirconium oxide as a biocompatible stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 549 (1991) 59–75. doi:10.1016/S0021-9673(00)91418-3.
- [96] M.W.H. Pinkse, P.M. Uitto, M.J. Hilhorst, B. Ooms, A.J.R. Heck, Selective Isolation at the Femtomole Level of Phosphopeptides from Proteolytic Digests Using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and Titanium Oxide Precolumns, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3935–3943. doi:10.1021/ac0498617.
- [97] M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, T.J.D. Jørgensen, Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns, *Mol. Cell. Proteomics.* 4 (2005) 873–886. doi:10.1074/mcp.T500007-MCP200.
- [98] H.K. Kweon, K. Håkansson, Selective Zirconium Dioxide-Based Enrichment of Phosphorylated Peptides for Mass Spectrometric Analysis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1743–1749. doi:10.1021/ac0522355.
- [99] N. Sugiyama, T. Masuda, K. Shinoda, A. Nakamura, M. Tomita, Y. Ishihama, Phosphopeptide Enrichment by Aliphatic Hydroxy Acid-modified Metal Oxide Chromatography for Nano-LC-MS/MS in Proteomics Applications, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 1103–1109. doi:10.1074/mcp.T600060-MCP200.
- [100] H. Zhou, R. Tian, M. Ye, S. Xu, S. Feng, C. Pan, et al., Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis, *ELECTROPHORESIS.* 28 (2007) 2201–2215. doi:10.1002/elps.200600718.
- [101] U.K. Aryal, A.R.S. Ross, Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 219–231. doi:10.1002/rcm.4377.
- [102] J. Wu, P. Warren, Q. Shakey, E. Sousa, A. Hill, T.E. Ryan, et al., Integrating titania enrichment, iTRAQ labeling, and Orbitrap CID-HCD for global identification and quantitative analysis of phosphopeptides, *Proteomics.* 10 (2010) 2224–2234. doi:10.1002/pmic.200900788.
- [103] J. Wu, Q. Shakey, W. Liu, A. Schuller, M.T. Follettie, Global Profiling of Phosphopeptides by Titania Affinity Enrichment, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 4684–4689. doi:10.1021/pr070481m.
- [104] I. Fukuda, Y. Hirabayashi-Ishioka, I. Sakikawa, T. Ota, M. Yokoyama, T. Uchiumi, et al., Optimization of Enrichment Conditions on TiO₂ Chromatography Using Glycerol As an Additive Reagent for Effective Phosphoproteomic Analysis, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 5587–5597. doi:10.1021/pr400546u.
- [105] Q. Li, Z. Ning, J. Tang, S. Nie, R. Zeng, Effect of Peptide-to-TiO₂ Beads Ratio on Phosphopeptide Enrichment Selectivity, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 5375–5381. doi:10.1021/pr900659n.
- [106] G. Han, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, S. Feng, X. Jiang, et al., Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography, *Proteomics.* 8 (2008) 1346–1361. doi:10.1002/pmic.200700884.
- [107] M. Sturm, A. Leitner, J.-H. Smått, M. Lindén, W. Lindner, Tin Dioxide Microspheres as a Promising Material for Phosphopeptide Enrichment Prior to Liquid Chromatography-(Tandem) Mass Spectrometry Analysis, *Adv. Funct. Mater.* 18 (2008) 2381–2389. doi:10.1002/adfm.200800215.
- [108] S.B. Ficarro, J.R. Parikh, N.C. Blank, J.A. Marto, Niobium(V) Oxide (Nb₂O₅): Application to Phosphoproteomics, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4606–4613. doi:10.1021/ac800564h.
- [109] D. Qi, J. Lu, C. Deng, X. Zhang, Development of core-shell structure Fe₃O₄@Ta₂O₅ microspheres for selective enrichment of phosphopeptides for mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5533–5539. doi:10.1016/j.chroma.2009.05.049.

- [110] J.G. Rivera, Y.S. Choi, S. Vujcic, T.D. Wood, L.A. Colón, Enrichment/isolation of phosphorylated peptides on hafnium oxide prior to mass spectrometric analysis, *The Analyst*. 134 (2009) 31–33. doi:10.1039/B813162G.
- [111] F. Wolschin, S. Wienkoop, W. Weckwerth, Enrichment of phosphorylated proteins and peptides from complex mixtures using metal oxide/hydroxide affinity chromatography (MOAC), *Proteomics*. 5 (2005) 4389–4397. doi:10.1002/pmic.200402049.
- [112] Y. Li, H. Lin, C. Deng, P. Yang, X. Zhang, Highly selective and rapid enrichment of phosphorylated peptides using gallium oxide-coated magnetic microspheres for MALDI-TOF-MS and nano-LC-ESI-MS/MS/MS analysis, *Proteomics*. 8 (2008) 238–249. doi:10.1002/pmic.200700454.
- [113] W.-Y. Chen, Y.-C. Chen, Functional Fe₃O₄@ZnO magnetic nanoparticle-assisted enrichment and enzymatic digestion of phosphoproteins from saliva, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2049–2057. doi:10.1007/s00216-010-4174-x.
- [114] H. Wang, X. Dong, M. Yang, Development of separation materials using controlled/living radical polymerization, *TrAC Trends Anal. Chem.* 31 (2012) 96–108. doi:10.1016/j.trac.2011.07.012.
- [115] J. Krenkova, F. Foret, Iron oxide nanoparticle coating of organic polymer-based monolithic columns for phosphopeptide enrichment, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2106–2112. doi:10.1002/jssc.201100256.
- [116] Y.Y. Zeng, H.-J. Chen, K.J. Shiau, S.-U. Hung, Y.-S. Wang, C.-C. Wu, Efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic TiO₂-coated carbon-encapsulated iron nanoparticles, *PROTEOMICS*. 12 (2012) 380–390. doi:10.1002/pmic.201000726.
- [117] S. Mohammed, K. Kraiczek, M.W.H. Pinkse, S. Lemeer, J.J. Benschop, A.J.R. Heck, Chip-Based Enrichment and NanoLC-MS/MS Analysis of Phosphopeptides from Whole Lysates, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1565–1571. doi:10.1021/pr700635a.
- [118] J. Shen, T. Ahmed, A. Vogt, J. Wang, J. Severin, R. Smith, et al., Preparation and characterization of nitrilotriacetic-acid-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins and peptides, *Anal. Biochem.* 345 (2005) 258–269. doi:10.1016/j.ab.2005.07.009.
- [119] G.R. Blacken, M. Volný, M. Diener, K.E. Jackson, P. Ranjitkar, D.J. Maly, et al., Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopeptide enrichment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 915–926. doi:10.1016/j.jasms.2009.01.006.
- [120] A. Leitner, M. Sturm, W. Lindner, Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: A review, *Anal. Chim. Acta.* 703 (2011) 19–30. doi:10.1016/j.aca.2011.07.012.
- [121] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A.* 1028 (2004) 1–30. doi:10.1016/j.chroma.2003.11.052.
- [122] Q. Xia, D. Cheng, D.M. Duong, M. Gearing, J.J. Lah, A.I. Levey, et al., Phosphoproteomic Analysis of Human Brain by Calcium Phosphate Precipitation and Mass Spectrometry, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 2845–2851. doi:10.1021/pr8000496.
- [123] M.R. Mirza, M. Rainer, C.B. Messner, Y. Güzel, D. Schemeth, T. Stasyk, et al., A new type of metal chelate affinity chromatography using trivalent lanthanide ions for phosphopeptide enrichment, *The Analyst*. 138 (2013) 2995. doi:10.1039/c3an36853j.
- [124] Y. Güzel, M. Rainer, M.R. Mirza, C.B. Messner, G.K. Bonn, Highly selective recovery of phosphopeptides using trypsin-assisted digestion of precipitated lanthanide–phosphoprotein complexes, *The Analyst*. 138 (2013) 2897. doi:10.1039/c3an00066d.
- [125] G. Mamone, G. Picariello, P. Ferranti, F. Addeo, Hydroxyapatite affinity chromatography for the highly selective enrichment of mono- and multi-phosphorylated peptides in phosphoproteome analysis, *Proteomics*. 10 (2010) 380–393. doi:10.1002/pmic.200800710.
- [126] M. Rainer, G.K. Bonn, Enrichment of phosphorylated peptides and proteins by selective precipitation methods, *Bioanalysis*. 7 (2015) 243–252. doi:10.4155/bio.14.281.

- [127] S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villén, J. Li, et al., Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 12130–12135.
- [128] D.E. McNulty, R.S. Annan, Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection, *Mol. Cell. Proteomics.* 7 (2008) 971–980.
- [129] C.S. Gan, T. Guo, H. Zhang, S.K. Lim, S.K. Sze, A Comparative Study of Electrostatic Repulsion-Hydrophilic Interaction Chromatography (ERLIC) versus SCX-IMAC-Based Methods for Phosphopeptide Isolation/Enrichment, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 4869–4877. doi:10.1021/pr800473j.
- [130] S. Nie, J. Dai, Z.-B. Ning, X.-J. Cao, Q.-H. Sheng, R. Zeng, Comprehensive Profiling of Phosphopeptides Based on Anion Exchange Followed by Flow-Through Enrichment with Titanium Dioxide (AFET), *J. Proteome Res.* 9 (2010) 4585–4594. doi:10.1021/pr100632h.
- [131] M. Alcolea, P. Cutillas. In-Depth Analysis of Protein Phosphorylation by Multidimensional Ion Exchange Chromatography and Mass Spectrometry. *Methods Mol. Biol.*, 658 (2010), 111-126.
- [132] I.L. Batalha, C.R. Lowe, A.C.A. Roque, Platforms for enrichment of phosphorylated proteins and peptides in proteomics, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 100–110. doi:10.1016/j.tibtech.2011.07.004.
- [133] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, *Sens. Actuators B Chem.* 1 (1990) 244–248. doi:10.1016/0925-4005(90)80209-I.
- [134] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S.J. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review, *Anal. Chim. Acta.* 718 (2012) 11–24. doi:10.1016/j.aca.2011.12.050.
- [135] D.S. Peterson, Solid supports for micro analytical systems, *Lab. Chip.* 5 (2005) 132–139. doi:10.1039/B405311G.
- [136] R.D. Oleschuk, L.L. Shultz-Lockyear, Y. Ning, D.J. Harrison, Trapping of Bead-Based Reagents within Microfluidic Systems: On-Chip Solid-Phase Extraction and Electrochromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 585–590. doi:10.1021/ac990751n.
- [137] A. Namera, T. Saito, Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 182–196. doi:10.1016/j.trac.2012.10.017.
- [138] S. Song, A.K. Singh, B.J. Kirby, Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4589–4592. doi:10.1021/ac0497151.
- [139] J. de Jong, R.G.H. Lammertink, M. Wessling, Membranes and microfluidics: a review, *Lab. Chip.* 6 (2006) 1125. doi:10.1039/b603275c.
- [140] Á. Ríos, Á. Ríos, M. Zougagh, M. Zougagh, Sample preparation for micro total analytical systems (μ -TASs), *TrAC Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 174–188. doi:10.1016/j.trac.2012.12.009.
- [141] P.N. Nge, C.I. Rogers, A.T. Woolley, Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications, *Chem. Rev.* 113 (2013) 2550–2583. doi:10.1021/cr300337x.
- [142] M. Vazquez, B. Paull, Review on recent and advanced applications of monoliths and related porous polymer gels in micro-fluidic devices, *Anal. Chim. Acta.* 668 (2010) 100–113. doi:10.1016/j.aca.2010.04.033.
- [143] S.J. Kim, Y.-A. Song, J. Han, Nanofluidic concentration devices for biomolecules utilizing ion concentration polarization: theory, fabrication, and applications, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 912. doi:10.1039/b822556g.
- [144] T.A. Zangle, A. Mani, J.G. Santiago, Theory and experiments of concentration polarization and ion focusing at microchannel and nanochannel interfaces, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1014. doi:10.1039/b902074h.
- [145] S.M. Hanash, S.J. Pitteri, V.M. Faca, Mining the plasma proteome for cancer biomarkers, *Nature.* 452 (2008) 571–579. doi:10.1038/nature06916.

- [146] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Frechet, Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096. doi:10.1021/ac0106288.
- [147] G.E. Yue, M.G. Roper, C. Balchunas, A. Pulsipher, J.J. Coon, J. Shabanowitz, et al., Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a glass microchip, *Anal. Chim. Acta.* 564 (2006) 116–122. doi:10.1016/j.aca.2005.11.003.
- [148] H. Wang, J. Duan, H. Xu, L. Zhao, Y. Liang, Y. Shan, et al., Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2113–2121. doi:10.1002/jssc.201100168.
- [149] Z. Svobodova, M.R. Mohamadi, B. Jankovicova, H. Esselmann, R. Verpillot, M. Otto, et al., Development of a magnetic immunosorbent for on-chip preconcentration of amyloid β isoforms: Representatives of Alzheimer's disease biomarkers, *Biomicrofluidics.* 6 (2012) 024126. doi:10.1063/1.4722588.
- [150] F. Svec, Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 902–924. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073.
- [151] T. Nema, E.C.Y. Chan, P.C. Ho, Applications of monolithic materials for sample preparation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 130–141. doi:10.1016/j.jpba.2013.05.036.
- [152] A. Guyot. Polymérisation. *Technique de l'ingénieur.* J5830 (2000) 2-24.
- [153] C. Decker. Photoinitiated crosslinking polymerisation. *Prog. Polym. Sci.*, 21(1996) 593-650.
- [154] G.G. Odian, Principles of polymerization, 4th ed, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J, 2004.
- [155] W.A. Green, Industrial photoinitiators: a technical guide, CRC Press, Boca Raton, 2010.
- [156] A. Ledwith, Photoinitiation of polymerisation, *Pure Appl. Chem.* 49 (1977). doi:10.1351/pac197749040431.
- [157] V. Bernabé-Zafón, M. Beneito-Cambra, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3231–3237. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.075.
- [158] T. Goda, T. Konno, M. Takai, T. Moro, K. Ishihara, Biomimetic phosphorylcholine polymer grafting from polydimethylsiloxane surface using photo-induced polymerization, *Biomaterials.* 27 (2006) 5151–5160. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.05.046.
- [159] M.H. Schneider, Y. Tran, P. Tabeling, Benzophenone Absorption and Diffusion in Poly(dimethylsiloxane) and Its Role in Graft Photo-polymerization for Surface Modification, *Langmuir.* 27 (2011) 1232–1240. doi:10.1021/la103345k.
- [160] E. Andrzejewska, Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers, *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 605–665. doi:10.1016/S0079-6700(01)00004-1.
- [161] T. Scherzer, U. Decker, Kinetic investigations on the UV-induced photopolymerization of a diacrylate by time-resolved FTIR spectroscopy: the influence of photoinitiator concentration, light intensity and temperature, *Radiat. Phys. Chem.* 55 (1999) 615–619.
- [162] H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 89–111. doi:10.1007/s00216-007-1692-2.
- [163] K. Ren, J. Zhou, H. Wu, Materials for Microfluidic Chip Fabrication, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 2396–2406. doi:10.1021/ar300314s.
- [164] Y.M. Li, J.L. Lao, K. Nakazato, J. Mohammad, L. Terenius, S. Hjerten. Continuous beds for microchromatography : Cation-exchange Chromatography. *Anal. Biochem.*, 223 (1994), 153-158.
- [165] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, T.J. Shepodd, Conduct-as-Cast Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography, *Anal. Chem.* 73 (2001) 849–856. doi:10.1021/ac000839x.
- [166] V. Augustin, A. Jardy, P. Gareil, M.-C. Hennion, In situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separations: Study of polymerization conditions, *J. Chromatogr. A.* 1119 (2006) 80–87. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.057.
- [167] V. Augustin, G. Proczek, J. Dugay, S. Descroix, M.-C. Hennion, Online preconcentration using monoliths in electrochromatography capillary format and microchips, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2858–2865. doi:10.1002/jssc.200700387.

- [168] G. Proczek, V. Augustin, S. Descroix, M.-C. Hennion, Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography, *Electrophoresis*. 30 (2009) 515–524. doi:10.1002/elps.200800308.
- [169] M.F. Bedair, R.D. Oleschuk, Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1130–1138. doi:10.1021/ac0514570.
- [170] K. Faure, M. Bias, O. Yassine, N. Delaunay, G. Cretier, M. Albert, et al., Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases, *Electrophoresis*. 28 (2007) 1668–1673. doi:10.1002/elps.200600566.
- [171] Q.-S. Kang, Y. Li, J.-Q. Xu, L.-J. Su, Y.-T. Li, W.-H. Huang, Polymer monolith-integrated multilayer poly(dimethylsiloxane) microchip for online microextraction and capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 31 (2010) 3028–3034. doi:10.1002/elps.201000210.
- [172] Q.-S. Kang, X.-F. Shen, N.-N. Hu, M.-J. Hu, H. Liao, H.-Z. Wang, et al., A 3D porous polymer monolith-based platform integrated in poly(dimethylsiloxane) microchips for immunoassay, *Analyst*. 138 (2013) 2613–2619. doi:10.1039/c3an36744d.
- [173] J.M. Burke, E. Smela, A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane), *Biomicrofluidics*. 6 (2012) 16506–1650610. doi:10.1063/1.3693589.
- [174] H. Makamba, J.H. Kim, K. Lim, N. Park, J.H. Hahn, Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels, *Electrophoresis*. 24 (2003) 3607–3619. doi:10.1002/elps.200305627.
- [175] I. Wong, C.-M. Ho, Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices, *Microfluid. Nanofluidics*. 7 (2009) 291–306. doi:10.1007/s10404-009-0443-4.
- [176] J. Zhou, A.V. Ellis, N.H. Voelcker, Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices, *Electrophoresis*. 31 (2010) 2–16. doi:10.1002/elps.200900475.
- [177] H.L. Zeng, H.F. Li, X. Wang, J.M. Lin, Development of a gel monolithic column polydimethylsiloxane microfluidic device for rapid electrophoresis separation, *Talanta*. 69 (2006) 226–231. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.030.
- [178] Y. Xu, W. Zhang, P. Zeng, Q. Cao, A Butyl Methacrylate Monolithic Column Prepared In-Situ on a Microfluidic Chip and its Applications, *Sensors*. 9 (2009) 3437–3446. doi:10.3390/s90503437.
- [179] W. Yang, B. Rånby, Radical living graft polymerization on the surface of polymeric materials, *Macromolecules*. 29 (1996) 3308–3310.
- [180] T. Rohr, D. f. Ogletree, F. Svec, J. m. j. Fréchet, Surface Functionalization of Thermoplastic Polymers for the Fabrication of Microfluidic Devices by Photoinitiated Grafting, *Adv. Funct. Mater.* 13 (2003) 264–270. doi:10.1002/adfm.200304229.
- [181] S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C.E. Sims, G.P. Li, N.L. Allbritton, Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1865–1870. doi:10.1021/ac049937z.
- [182] M.H. Schneider, H. Willaime, Y. Tran, F. Rezgui, P. Tabeling, Wettability Patterning by UV-Initiated Graft Polymerization of Poly(acrylic acid) in Closed Microfluidic Systems of Complex Geometry, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8848–8855. doi:10.1021/ac101345m.
- [183] T.B. Stachowiak, T. Rohr, E.F. Hilder, D.S. Peterson, M. Yi, F. Svec, et al., Fabrication of porous polymer monoliths covalently attached to the walls of channels in plastic microdevices, *Electrophoresis*. 24 (2003) 3689–3693. doi:10.1002/elps.200305536.
- [184] S. Hu, X. Ren, M. Bachman, C.E. Sims, G.P. Li, N. Allbritton, Surface Modification of Poly(dimethylsiloxane) Microfluidic Devices by Ultraviolet Polymer Grafting, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4117–4123. doi:10.1021/ac025700w.
- [185] M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, F. Bayle, M. Guerrouache, I. Ayed, et al., A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips, *Polymer*. 66 (2015) 249–258. doi:10.1016/j.polymer.2015.04.039.

PARTIE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

La revue bibliographique de ce manuscrit a permis de souligner le rôle important de la phosphorylation des protéines dans divers processus cellulaires et pathologiques. En effet, plusieurs phosphoprotéines ont été identifiées comme étant impliquées dans le processus physiopathologiques de maladies neurodégénératives ou cancéreuses d'où l'intérêt de les analyser. Cependant, cette tâche reste difficile en raison de l'hétérogénéité et la faible abondance des phosphoprotéines dans les échantillons biologiques. Ainsi, l'enrichissement est une condition nécessaire avant l'analyse. Parmi les méthodes de préconcentration, l'IMAC et le MOAC sont les méthodes les plus étudiées et développées pour la préconcentration de phosphopeptides. D'autre part, les laboratoires sur puce qui permettent d'intégrer plusieurs étapes analytiques au sein d'un même dispositif s'imposent aujourd'hui comme des outils performants et offrent de nouvelles perspectives en matière d'analyse des biomarqueurs protéiques. La préconcentration en ligne est cependant une étape essentielle dans la conception d'un tel dispositif miniaturisé pour être compétitif face aux techniques de séparation traditionnelles en termes de sensibilité. L'extraction sur phase solide (SPE) reste une technique particulièrement attractive pour la préconcentration de protéines et de peptides en microsysteme. Le principal avantage des supports solides se trouve dans le grand choix de matériaux tels que les billes, les membranes, les nanocanaux ou encore les monolithes organiques ou à base de silice.

Cette thèse s'intègre dans cette thématique globale et a pour objectif le développement d'un laboratoire sur puce pour l'enrichissement et la séparation de phosphopeptides. Ces travaux contribueront à l'avenir à l'élaboration d'un dispositif miniaturisé d'analyse totale pour le diagnostic de maladies neurodégénératives basé sur l'analyse des biomarqueurs phosphorylés.

La partie expérimentale de cette thèse présente les travaux réalisés pour répondre cet objectif. Cette partie expérimentale se décline en trois grands chapitres. Le premier chapitre est consacré à la synthèse '*in situ*' du monolithe organique à base d'éthylène glycol méthacrylate phosphate (EGMP) et de bisacrylamide (BAA). Les monolithes organiques constituent une option intéressante pour la SPE en microsysteme grâce à leur synthèse '*in situ*' par voie photochimique et leur grande surface spécifique qui est particulièrement importante pour garantir des rendements d'extraction/préconcentration élevés. Deux approches de synthèse par voie photochimique en microsysteme en verre et en PDMS sont présentées dans ce chapitre. Le second chapitre porte sur le développement d'une méthode de séparation électrocinétique sur puce en verre des phosphopeptides. Notre choix s'est porté sur l'électrophorèse sur puce qui est une technique simple à mettre en œuvre permettant d'obtenir des séparations rapides. Les phosphopeptides fluorescents modèles choisis correspondent à un fragment de la protéine ERK2. Enfin, le troisième et dernier chapitre est dédié au couplage en ligne de modules de préconcentration, de séparation par électrophorèse et de détection par fluorescence des phosphopeptides ce qui a permis d'obtenir un laboratoire sur puce intégrant toute ces étapes. L'IMAC étant une des méthodes les plus versatiles et souples à développer en microsysteme a été choisie pour la préconcentration des phosphopeptides. D'après l'étude bibliographique, l'immobilisation des ions métalliques tels que le Zr^{4+} et Ti^{4+} sur des supports monolithiques a donné des résultats très satisfaisants pour un enrichissement de type IMAC des phosphopeptides. Pour ces raisons, la stratégie IMAC- Zr^{4+} sur support monolithique à base d'EGMP a été retenue pour la conception du module de préconcentration.

Les travaux réalisés pendant cette thèse sont le fruit d'une collaboration entre l'Institut Galien Paris-Sud à Châtenay-Malabry (UMR CNRS 8612), notamment l'équipe de Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), l'Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay (UMR CNRS 8622) et l'Institut de Chimie et des Matériaux de Paris-Est (UMR CNRS 7182) à Thiais.

SYNTHESE PAR VOIE PHOTOCHEMIQUE D'UN MONOLITHE A BASE D'ETHYLENE METHACRYLATE PHOSPHATE (EGMP) EN MICROSYSTEME

1.1 Introduction

La synthèse d'un monolithe organique se fait par copolymérisation d'un ou plusieurs monomères dont un agent réticulant en présence des porogènes et d'un amorceur. La polymérisation radicalaire par voie photochimique est la méthode la plus répandue et la plus efficace pour la synthèse de monolithe en microsysteme. Ce mode d'initiation, généralement réalisé sous irradiation UV à 365 nm, permet la synthèse localisée du monolithe dans un microcanal via l'utilisation d'un masque. Récemment, notre laboratoire s'est intéressé à la synthèse en puce sous irradiation UV d'un monolithe à base d'EGMP et BAA [1]. Ce monolithe a été initialement développé par le groupe de Zou et al.[2], mais par initiation thermique et dans des capillaires de silice. Le choix de ce monolithe particulier repose sur la présence des groupements phosphates dans la matrice capables de former des liaisons de coordination avec des ions métalliques pour former un support de préconcentration des phosphopeptides par IMAC. Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous envisageons d'exploiter ses propriétés dans le but de l'utiliser comme support de préconcentration de phosphopeptides par la méthode IMAC. Ainsi, l'objectif premier consiste à synthétiser '*in situ*' le monolithe poly (EGMP-co-BAA) dans un canal de microsysteme. Deux études de synthèse par voie photochimique sont présentées dans ce chapitre.

La première partie traite de la synthèse du monolithe dans des canaux en verre à l'aide d'un microscope à épifluorescence est présentée. Ce travail est présenté sous la forme d'une 'short communication' intitulée : « Microscope-assisted UV-induced synthesis of

well-defined phosphate monolithic plugs in glass chips for peptide preconcentration » qui sera soumise au journal *Analytica Chimica Acta*. L'effet du grossissement de l'objectif du microscope sur la longueur du monolithe formé ainsi que le rôle d'inhibiteurs de la polymérisation radicalaire tels que l'hydroquinone sur « l'effet de bord » du monolithe sont détaillés et discutés. La capacité de ce monolithe à capturer des phosphopeptides est aussi évaluée. La deuxième partie de ce chapitre, nous présentons une nouvelle stratégie de synthèse et d'ancrage du monolithe poly (EGMP-co-BAA) dans des microsystèmes en polydiméthylsiloxane (PDMS) sous la forme d'une publication scientifique. En effet, cette approche innovante a fait l'objet d'une publication en 2015 dans le journal 'Polymer' (Vol 66, pp 249-258) intitulée : « A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips ». La synthèse du monolithe poly (EGMP-co-BAA) dans des canaux en PDMS a constitué un des défis majeurs de ce travail de thèse. En effet, la polymérisation de monolithe organique en PDMS a été très rarement décrite dans la littérature [3–5] , principalement en raison des propriétés du PDMS à absorber les molécules hydrophobes (entrant dans la composition du mélange réactionnel de synthèse), et à être perméable à l'oxygène (qui est un inhibiteur de la polymérisation radicalaire). Afin de surmonter ces problèmes, plusieurs stratégies visant à rendre hydrophile la surface du PDMS ont été testées dans une étude précédente réalisée par notre équipe mais ces modifications de surface n'ont pas permis de synthétiser in-situ le monolithe. Nous avons donc choisi de tester de nouvelles alternatives pour rendre possible l'ancrage du monolithe aux parois d'une puce en PDMS. Ainsi, le travail expérimental a été orienté tout d'abord vers la mise en évidence de l'impact de la nature et de la concentration de différents amorceurs sur la formation du monolithe dans des canaux en PDMS. Ensuite, l'effet de la dimension du canal et de l'intensité lumineuse sur le taux de remplissage du monolithe dans le canal a été étudié. La stratégie proposée dans cette publication consiste à réaliser en une seule étape, grâce aux propriétés photochimiques de d'un nouvel amorceur (le 2-methyl-4'-(méthylthio)-2-morpholino-propiofenone (Irgacure 907), la synthèse et l'ancrage du monolithe aux parois de la puce en PDMS sans prétraitement préalable des canaux. Ce photoamorceur n'avait encore jamais été utilisé pour la synthèse de monolithe organique. Grâce à cette étude, la polymérisation du monolithe à base d'EGMP a pu être réalisée pour la première fois dans des microsystèmes en PDMS natif.

Short communicate

Microscope-assisted UV-induced synthesis of well-defined phosphate monolithic plugs in glass chips for peptide preconcentration

Szymon Dziomba^{a,b}, Monica Araya-Farias^b, Mohamed Guerrouache^a, Myriam Taverna^b, Benjamin Carbonnier^a, N. Thuy Tran^{b*}

^a*Université Paris-Est, ICMPE (UMR7182), CNRS, UPEC, Thiais, 94320, France*

^b*Institut Galien Paris Sud, UMR8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

**Corresponding author: thuy.tran-maignan@u-psud.fr*

Abstract

Herein, highly defined monolithic beds were prepared in glass microchips by photopolymerization of ethylene glycol methacrylate phosphate, acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide using an inverted epifluorescence microscope as UV-irradiation source. Such an easy and elegant method allowed precise control of (i) the edge shape (ii) the location along the microchannel and (iii) the length dimension of the monolithic plugs. Of utmost interest, it is shown that the addition of a controlled amount of hydroquinone, a well-known polymerization inhibitor, to the prepolymerization mixture is beneficial for achieving sharp edges of the monolith segments whose preparation is strictly restricted to the irradiation area. The monolith length was easily controlled through simple change in the magnification objective. Indeed, photopolymerization achieved with the 40× and 63× objectives led to the formation of 400 μm and 160 μm long monolith-filled sections, respectively. Using optimized conditions, the synthesis of monoliths was found repeatable with relative standard deviation (RSD) values for monoliths length in the range of 0.4-4.6% and below 7.5% for intra- and inter-chip investigations. Potential application for on-chip monolith-assisted solid phase extraction is demonstrated for a model fluorescently-labelled peptide. Both binding and subsequent elution behaviors were found to fully agreeing with a cation-exchange mechanism in concordance with the phosphate nature of the monolith surface.

Key words: microscope-assisted photopolymerization, on-chip monolithic plugs, glass microchips, phosphopeptide, monolith solid phase extraction, preconcentration

1 Introduction

Photopolymerization is one of the most widespread technique for the on-surface and in-channel preparation of porous polymer monoliths [1]. In contrast to thermal or red-ox initiation processes, photo-triggered approaches allow site localized both synthesis and surface functionalization of discrete polymeric sections within fused-silica capillary or microfluidic chip. The concept of monolith photopolymerization in microchips was initially presented by Yu and coworkers for solid phase extraction purposes [2] and was short after, extended to the preparation of microreactors for enzymatic reactions [3], electrospray emitters for coupling to mass spectrometry (MS) [4] and mixers [5]. Song and coworkers introduced for the first time the use of a laser beam modulated with spherical and cylindrical lens to synthesize polymeric membranes between silica microposts for dialysis [6] and electrokinetic preconcentration of proteins [7]. The utilization of lasers became a convenient strategy for the precise in situ microfabrication of short polymeric materials like membranes [6–9] or frits [10]. The preparation of longer fragments (>100 μm) usually requires the sequential synthesis of short fragments one next to another which can be detrimental to the material homogeneity [10,11]. The use of automatized microscope stage may help to overcome this inconvenience [10], however, it increases the complexity of the whole procedure and implies the use of a costly equipment, typically not present in every analytical lab. Abele *et al.* reported on an elegant and easy method how to create monolith within plastic chip channels through photopolymerization using 255 nm and 370 nm UV-light emitting diodes[12]. The as-designed 5 mm long monoliths were applied as an on-chip electro-osmotic micropump. A single step synthesis of about 400 μm long hydrogel membranes using a fluorescence microscope was demonstrated by Dhopeshwarkar et al. [13]. Also Nordman and coworkers have recently presented the preparation of a shape-anchored monolith (about 500 μm in length) in the cross section of a cross-channel glass microchip using an epifluorescence microscope equipped with a UV laser [14]. A successful application for small molecules extraction followed by an electrophoretic separation coupled to MS detection was shown.

In most of the reported studies only a fragmentary discussion on the preparation process of polymeric supports was provided. This motivated us to thoroughly investigate the photopolymerization conditions, in terms of prepolymerization solution treatment, for obtaining well-defined short organic polymer monolithic plugs in glass microchannels

using a commercially available inverted epifluorescence microscope as irradiation source. For this purpose, we performed the synthesis of the ethylene glycol methacrylate phosphate-co-bisacrylamide (poly (EGMP-co-BAA)) monolith initially developed by Zou's group for its strong cation exchange property[15] or its capacity for IMAC-based preconcentration of phosphopeptides [16] but in silica capillaries and under thermal polymerization. Otherwise, we have previously developed the synthesis of this monolith under UV polymerization in an oven in PDMS [17] and in glass (manuscript in preparation) microchannels. In this work, we showed that the monolith length can be tuned in the hundreds of micrometer range by a simple replacement of the objective magnification. Furthermore, the beneficial role of degassing steps and addition of a controlled amount of polymerization inhibitors (hydroquinone, HQ) in the formation of precisely localized polymer plugs with homogeneous structure and sharp-ends was studied. Finally, an attractive application for the microscope-assisted photopolymerized monolith was demonstrated for on-chip retention and efficient preconcentration of a model synthetic peptide.

2. Experimental

2.1 Materials and reagents

Ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP) was bought from ESSCHEM (Europe Seaham, United Kingdom). γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilane (γ -MAPS), mixture of acrylamide/ *N,N'*-methylenebisacrylamide (AA / BAA) : 19:1, boric acid, dimethylsulfoxide (DMSO), dodecan-1-ol, *N,N'*-dimethylformamide (DMF), 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN), formic acid (>95%) and ammonium (28%) solutions were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydroquinone, sodium hydroxide (1 M) and hydrochloric acid (1 M) solutions, acetone, methanol and acetonitrile (all of HPLC grade) were obtained from VWR International (Paris, France). In all the described experiments, ultrapure Milli-Q® water (18.2 M Ω -cm⁻¹) was used (Direct-Q 3, Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

A short diphosphorylated peptide (DHTGFL_pTE_pYVATR; MW=2026.2; pI=3.7), labelled with Hylite-488 fluorophore dye and synthesized by Tebu-bio (Le Perray en Yvelines, France), was prepared in the loading solution at 0.1 μ g/mL. The loading buffer was composed of 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile while the elution buffer was alkaline and consisted of 25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5).

All the experiments were performed with cross-channel glass microchips (Micralyne Inc., Edmonton, Canada). The channels were 20 μ m deep and 50 μ m wide. The separation channel length was 80.89 mm and the length of each side arm was 4.82 mm. PEEK Nanoport reservoirs from Upchurch (model 10-32 Coned, IL, USA) were first bonded to the microfluidic chip using Adhesive Rings (Upchurch) and then thermally cured at 190°C for 1 hour in an oven according to manufacturer's instructions. In a next step, the reservoirs were additionally glued to the chip surface using an epoxy adhesive (Loctite EA 3430, Henkel, Dusseldorf, Germany).

2.2 Instrumentation

Photopolymerization experiments were performed using a Axio Observer.A1 epifluorescence microscope (Carl Zeiss AG, Le Pecq, France) or a UV oven (Bio-link cross-linker, BLX-E365, Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). The microscope was coupled to an illuminator HXP 120C equipped with a mercury lamp (Carl Zeiss AG, Le

Pecq, France). Images were recorded using a CDD Hamamatsu digital camera (model Orca-03G02 Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan).

SEM images of monoliths were obtained with scanning electron using a LEO 1530 microscope equipped with a high-vacuum (10 mmHg) Gemini Column. The accelerating tension was 5 kV, and two detectors (InLens and Secondary Electron) were used.

The rinsing of microchannels was performed using a vacuum pump (at -30 mbar) (MZ 2C NT, Vacuubrand, Epinay-sur-Orge, France) or a Nanobaume (Western Fluids Engineering, Wildomar, CA, USA) under nitrogen pressure (2 bars). The interface of nanobaume and chip reservoir was composed of 75 μm (inner diameter) fused silica capillary (Composite Metal Service, UK) and a compatible fitting connector (Upchurch).

2.3 Monolith preparation procedure

To anchor the monolith to the channel wall, the glass channel was vinylized prior to the *in situ* polymerization [18]. Native microchannels were first filled with 1 M NaOH solution and were allowed to react at room temperature for 30 min for glass surface activation. The microchip was then rinsed with water (15 min under vacuum) and the activation/rinsing procedure was repeated using 0.1 M HCl solution. Such treated channels were dried in an oven (120 °C for 1 hour) under nitrogen stream. Finally, the microchip was filled with 50% (v/v) γ -MAPS solution in acetone, reservoirs were sealed with caps and microchips were kept in a dark place for a whole night at room temperature. On the following day the chip was rinsed with acetone (15 min at 2 bars) and dried under nitrogen stream for one hour.

The composition of the polymerization mixture was adapted from the protocol previously reported by Dong and coworkers [16]. The mixture was composed of AIBN (2 mg), AA:BAA mixture (19:1 molar ratio, 100 mg) and EGMP (130 mg) dissolved in a ternary porogens solution made of DMSO (650 μL), dodecanol (500 μL) and DMF (125 μL). Eventually, 60 μg of hydroquinone (0.25 mg/mL solution in DMSO) was added to the polymerization mixture. The mixture was tightly closed in an amber vial and sonicated for 20 min to completely dissolve all the reactants. The solution was subsequently degassed for 10 min in ultrasonic bath to remove oxygen which is known to inhibit free radical polymerization. Under the optimized conditions, additional degassing step was achieved by nitrogen purging (30 min at 3 bars pressure). Finally, the reaction medium was introduced

into microchannels using Nanobaume and the monolith was prepared by photopolymerization using a microscope or a UV oven. The polymerization with the microscope was conducted using three different magnifications of objective (20-, 40- and 63-fold) that influenced the irradiated area. The microchip was placed on the microscope stage and was left for 15 min to allow the fluid stabilization. Then, the objective was positioned directly below the channel at a distance (< 2.2 mm) of the microfluidic chip for which the focused image appeared sharp under the microscope. The synthesis was performed by exposing the microchannel to UV irradiation for 10 min through a Zeiss microscope filter with 365 nm excitation wavelength.

The polymerization with UV oven was conducted through the irradiation of a 4 mm long section of the channel using black tape as photomask. The microchannel was irradiated at 365 nm for 25 min. The distance between the chip and the light source was 15 cm and the light intensity was 1.5 mW/cm^2 .

2.4 On chip peptide preconcentration

The monolith was prepared with the 63x objective and its length was measured to be about $174 \mu\text{m}$. The chip was conditioned for 30 min with the loading buffer. Next, the synthetic peptide (DHTGFLpTEpYVATR) was loaded into the monolith-filled microchannel for 30 min followed by thorough rinsing with the loading buffer for 60 min. Finally, the elution step was performed within 15 min using the alkaline elution buffer. All the conditioning loading, rinsing and elution steps were performed under pressure (2 bars).

3. Results and discussion

The *in situ* free radical photopolymerization is a convenient and fast way to locally integrate monolithic supports in microfluidic devices. The combination of conventional photomasks and UV oven usually enables obtaining down to 1 mm long polymeric structures. The fabrication of shorter plugs can be achieved using a sophisticated technology such as focused UV beam [6–11,13,14]. In the present work, the photopolymerization with the help of a standard inverted epifluorescent microscope was investigated for the preparation of poly (EGMP-co-BAA) monolithic plugs with the ion-exchange ability for the on-chip retention and further controlled elution of peptide.

3.1 Role of polymerization inhibitors on the length of homogeneous monolith

The control of the quantity of oxygen dissolved in the polymerization mixture, which is known to act as radical inhibitor, is a key step towards the efficient synthesis of monolith in microchip. The well-known and easy method for degassing the polymerization mixture relies on gas purging with nitrogen or argon, or ultrasound treatment. With the aim to develop simple and fast preparation methods, our investigations dealt first with only one degassing step of the polymerization solution. Based on our proper expertise of in-microchannel monolith synthesis, the initial probing of the monolith homogeneity along the microchannel was evaluated through optical microscopic observations. Using solely ultrasound, results were found to be not reproducible as both homogeneous and inhomogeneous monolith sections were observed along the microchannel. Moreover, the ends on the monolith sections exhibited rugged edges (Figure 1A). In some cases, no monolith was formed even through prolonged UV irradiation (up to 20 min). This latter phenomenon clearly indicated inhibition of the free radical-mediated photopolymerization which was mostly assigned to uncomplete oxygen depletion. Therefore, optimization of the oxygen removal protocol was envisioned by adding a nitrogen purging step (from 5 to 30 min at 3 bars).

Additional purging of the polymerization mixture with nitrogen (5 min, 3 bars) after ultrasound degassing provided repeatable conditions for monolith preparation along the microchannel. Using these conditions, inhomogeneity was only observed at the edges of the monolithic structures (Figure 1B). However, when applying pressure during the channel rinsing, a detachment from the channel walls of poorly defined and inhomogeneous monolith sections initially localized at the plug borders was observed, leading to the microchannel clogging (Figure 1C). Interestingly enough, the central part of the monolith was always found homogeneous and its length of about 400 μm (for 40 \times objective) or 160 μm (for 63 \times objective) didn't differ significantly (RSD < 11%; n=9). The inhomogeneity of the monolithic edges was assumed to arise from the diffusion of free radicals during the synthesis process. Extending the purging time of the polymerization mixture with nitrogen to 30 min (3 bars) proved these conjectures (Figure 1D) as much longer zone of inhomogeneous polymer was obtained (up to about 300 μm on each end). Longer time was not tested as assumption was made that it will only prolong the whole procedure with no or very little visible effect.

Controlling both the oxygen concentration and the free radical diffusion in the course of polymerization process within confined geometries remains a challenging task. Alternatively, Song and coworkers suggested the addition of a known amount of one polymerization inhibitor, namely hydroquinone into the reaction mixture [6,7]. The inhibitor concentration must be maintained low enough to enable the polymerization through a free radical mechanism in the irradiated zone and sufficiently high to neutralize the free radical diffusion in the shadowed zone of the channel. The polymerization mixture was thus enriched with 60 μg of HQ which is about 22-fold smaller quantity (in respect to molar ratio) than the amount of initiator (AIBN). As it can be noted in Figure 1E and F, highly defined monoliths, in terms of monolith length, homogeneity and edge sharpness, were obtained using this approach with no inhomogeneity of the monolithic structure at the plug edges.

To better emphasize the beneficial effect of each additional step, namely nitrogen purging and HQ addition, a quantitative comparison of the length of homogeneous and inhomogeneous monolith sections as-obtained with various procedures is presented in Figure 2. The so-labelled homogeneous and inhomogeneous zones were determined on the basis of careful microscopic observations of the monolith segments. The results clearly illustrated the effect of each treatment. Interestingly enough, nitrogen purging did not reduce the inhomogeneity at the monolith ends although it was expected to contribute positively to the removal of dissolved oxygen. The latter, when present in large amount was detrimental to free radical polymerization as attested by the observations made when only degassing was applied. Although additional nitrogen purging enabled formation of in-channel monolithic structures, it was found to induce the formation of inhomogeneous borders, the length of which was related to the purging time. Indeed, the less favorable conditions were observed for 10 min ultrasound degassing combined to 30 min nitrogen purging. To our point of view, these conditions provided an extended removal of dissolved oxygen from the polymerization mixture. That diffusion of free radicals resulting from the photo-initiation process was not anymore hindered, leading to the formation of polymeric chains besides the irradiation area. The dissolved oxygen plays a dual role as radical scavenger depending on its concentration. The HQ addition enabled the synthesis of highly defined beds with homogenous structure. Indeed, the inhomogeneity in the side zone were kept lower than 10 % of the homogene zone. These conditions were considered as optimal and selected for further investigations such as morphological study by scanning electron

microscopy and preconcentration applications. It is also worth highlighting that the length of homogeneous compartment in polymer plugs prepared with microscope was very similar regardless the polymerization mixture purging time. Of utmost importance, the results in Figure 2 show that the inhomogeneity effects were not inherent to the use of microscope UV-source. Indeed, polymerization conducted in a UV-oven with the use of photomask to define a 4mm long polymerization zone is also accompanied with border effects. For the said case, inhomogeneous zone represented up to 36% of the homogeneous monolith part.

The inhomogeneity of monolith borders has not been thoroughly reported by other groups [8–11,13]. This is probably partly due to the higher intensity of lasers and, consequently, the short time required for synthesis (usually below 1 min). Under these conditions, diffusion of free radicals in the course of the polymerization is significantly limited, affording monolithic plugs strictly constrained to the irradiated zone [8–11]. Dhopeswarkar and coworkers discussed the use of UV lamp with a 200-fold higher intensity than the one used in the present study together with [13] Irgacure as a photoinitiator exhibiting high molar extinction coefficient[17]. This combination allowed relatively fast polymerization (3 min) for which no visible inhomogeneity as observed on the of monolith edges [16]. Taking into account the above considerations, we assumed that the inhomogeneity observed in our case arised from the relatively long polymerization process (10 min) requiring the addition of inhibitors to the polymerization mixture.

3.2 Repeatability investigation

Obviously, the length of the monolith-filled section channel is strictly dependent on the irradiation area that can be easily modulated by simple change of the objective. Under the optimized conditions (10 min ultrasound, 30 min nitrogen purging and in the presence of HQ in the polymerization mixture), three objectives were tested: 20-, 40- and 63-fold for the UV-polymerization experiments, providing in-channel monolithic structure with about 900, 400 and 160 μm length, respectively. In case of 40- and 63-fold objectives magnification, the as-obtained monoliths exhibited homogeneous optical appearance along the whole monolithic section (Figure 1E and F). In contrast, the 20-fold objective led to a polymeric structure with a higher density on the sides in comparison to the central part. This finding may result from uneven intensity distribution of the light source over the exposed area and may account for the major limitation of the presented method. However,

such irregularity effects were not observed in case of higher magnifications due to the more focused irradiation beam. The precise control of the distance from the chip to the objective is a crucial parameter for a repeatable synthesis. In our case, it was simply adjusted prior to each photopolymerization by focusing the microscopic images. A high reproducibility of the technique was validated for both tested objectives. The results are summarized in Table 1. Intra-chip repeatability did not exceed 2% and 5% for 40x and 63x objective, respectively. Inter-chip reproducibility featured higher variation with RSD values lower than 3.4% and 7.5% for 40x and 63x objective, respectively.

3.3 Characterization of the monolith

Figure 3 shows SEM images of the poly(EGMP-co-BAA) monolith prepared within the microchip channel by microscope-assisted photopolymerization under the optimized conditions and using the 63x objective. The monolithic structure was found to homogeneously fill the whole cross section of the channel. Channel-like pores with averaged size of about 800 ± 200 nm were observed. Inset in figure 3 clearly evidenced the robust anchoring of the monolithic polymer onto the inner wall of the glass channel, confirming the success of both the vinylization step and the on-wall anchoring in the course of the free radical photopolymerization. Such morphological details are the key parameters for on-chip flow-through applications as they ensure mechanical strength of the monolith during pressure-driven rinsing/loading steps while combining high permeability and surface area to favor more efficient binding capacity.

3.4 Application

To test the peptide retention and elution abilities of the microscope-assisted photopolymerized poly (EGMP-co-BAA) monolith, a fluorescently labeled peptide was loaded on the said-monolith under acidic conditions. Binding of the peptide was conveniently monitored by simple epifluorescent microscopic observations. As expected, no fluorescence signal was detected after rinsing the chip with the acidic loading buffer (Figure 4A). In contrast, when the peptide-containing solution was loaded through the monolith, intense fluorescence emission was observed on the monolith as clearly evidenced in (Figure 4B). This suggests the binding of the positively charged peptide onto the monolith most likely due to ionic interactions with the surface phosphate groups of the poly (EGMP-co- BAA) monolith [15]. It is worth mentioning that the peptide concentration ($0.1 \mu\text{g/mL}$) was low enough, so that no fluorescence was observed along

the channel once it was filled with the fluorescent loading sample. This finding suggests the high enrichment ability of the poly (EGMP-co- BAA) monolith plug. Extensive washing of the monolith with the loading buffer did not induce a visible change in the fluorescence intensity, indicating the strong interaction between the peptide and the monolith surface (Figure 4C). In contrary, 15 min flushing with the alkaline elution buffer, the complete removal of the peptide from the monolith surface was obtained as ascertained by the significant decrease in the fluorescence signal in Figure 3D. Such pH-driven binding/elution behavior suggests the occurrence of a cation-exchange mechanism as previously reported by Wang and coworkers [17]. Moreover, it was observed that the monolith remained robustly anchored onto channel walls and no visible differences in the monolith structure were noticed.

4. Conclusion

To conclude, we have herein described the synthesis of well-defined polymeric monolith plugs, in terms of location along the channel, length and edge shape, through the judicious choice of the preparation conditions of the pre-polymerization mixture. Indeed, it is shown that performing successively *(i)* ultrasound degassing, *(ii)* nitrogen purging and *(iii)* radical inhibitor addition in a one order of magnitude lower amount as compared to polymerization initiator constitutes the optimal combination. The mercury lamp of epifluorescence microscope was used as UV-irradiation source for initiating the free radical copolymerization of ethylene glycol methacrylate phosphate, acrylamide and N,N'-methylenebisacrylamide affording direct control over the irradiated zone through changing the magnification objective, the irradiation distance corresponding simply to the focus distance. Moreover, it is undoubtedly demonstrated that the successful confinement of polymerization process to the microchannel irradiated zone relies on a delicate balance between the remaining amount of radical inhibitor and diffusion of the radical bearing growing chains. It is also shown that such as-photopolymerized monolithic plug may act as functional element of microfluidic device for peptide preconcentration. We anticipate that the here-described study may provide a versatile an easy approach to analytical scientists to integrate monolith materials within microfluidic devices for extraction, separation and detection purposes.

5 References

- [1] F. Svec, Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *Journal of Chromatography A*. 1217 (2010) 902–924. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073.
- [2] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096. doi:10.1021/ac0106288.
- [3] F. Svec, Less common applications of monoliths: I. Microscale protein mapping with proteolytic enzymes immobilized on monolithic supports, *Electrophoresis*. 27 (2006) 947–961. doi:10.1002/elps.200500661.
- [4] M.F. Bedair, R.D. Oleschuk, Fabrication of Porous Polymer Monoliths in Polymeric Microfluidic Chips as an Electrospray Emitter for Direct Coupling to Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1130–1138. doi:10.1021/ac0514570.
- [5] T. Rohr, C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Porous polymer monoliths: Simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips, *Electrophoresis*. 22 (2001) 3959–3967. doi:10.1002/1522-2683(200110)22:18<3959.
- [6] S. Song, A.K. Singh, T.J. Shepodd, B.J. Kirby, Microchip Dialysis of Proteins Using in Situ Photopatterned Nanoporous Polymer Membranes, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2367–2373. doi:10.1021/ac035290r.
- [7] S. Song, A.K. Singh, B.J. Kirby, Electrophoretic Concentration of Proteins at Laser-Patterned Nanoporous Membranes in Microchips, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4589–4592. doi:10.1021/ac0497151.
- [8] A.H. Hecht, G.J. Sommer, R.H. Durland, X. Yang, A.K. Singh, A.V. Hatch, Aptamers as Affinity Reagents in an Integrated Electrophoretic Lab-on-a-Chip Platform, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8813–8820. doi:10.1021/ac101106m.
- [9] A.V. Hatch, A.E. Herr, D.J. Throckmorton, J.S. Brennan, A.K. Singh, Integrated preconcentration SDS-PAGE of proteins in microchips using photopatterned cross-linked polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4976–4984. doi:10.1021/ac0600454.
- [10] S. Thurmann, L. Mauritz, C. Heck, D. Belder, High-performance liquid chromatography on glass chips using precisely defined porous polymer monoliths as particle retaining elements, *Journal of Chromatography A*. 1370 (2014) 33–39. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.008.
- [11] S. Yamamoto, S. Hirakawa, S. Suzuki, In situ fabrication of ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for capillary electrophoresis of anionic compounds, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8224–8230. doi:10.1021/ac801245n.
- [12] S. Abele, F.-Q. Nie, F. Foret, B. Paull, M. Macka, UV-LED photopolymerised monoliths, *The Analyst*. 133 (2008) 864. doi:10.1039/b802693a.
- [13] R. Dhopeswarkar, L. Sun, R.M. Crooks, Electrokinetic concentration enrichment within a microfluidic device using a hydrogel microplug, *Lab on a Chip*. 5 (2005) 1148. doi:10.1039/b509063f.
- [14] N. Nordman, B. Barrios-Lopez, S. Laurén, P. Suvanto, T. Kotiaho, S. Franssila, et al., Shape-anchored porous polymer monoliths for integrated online solid-phase extraction-microchip electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*. 36 (2015) 428–432. doi:10.1002/elps.201400278.
- [15] F. Wang, J. Dong, X. Jiang, M. Ye, H. Zou, Capillary Trap Column with Strong Cation-Exchange Monolith for Automated Shotgun Proteome Analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6599–6606. doi:10.1021/ac070736f.
- [16] J. Dong, H. Zhou, R. Wu, M. Ye, H. Zou, Specific capture of phosphopeptides by Zr⁴⁺-modified monolithic capillary column, *J. Sep. Science*. 30 (2007) 2917–2923. doi:10.1002/jssc.200700350.
- [17] M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, F. Bayle, M. Guerrouache, I. Ayed, et al., A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips, *Polymer*. 66 (2015) 249–258. doi:10.1016/j.polymer.2015.04.039.

[18] H. Wang, J. Duan, H. Xu, L. Zhao, Y. Liang, Y. Shan, et al., Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides, *Journal of Separation Science*. 34 (2011) 2113–2121. doi:10.1002/jssc.201100168.

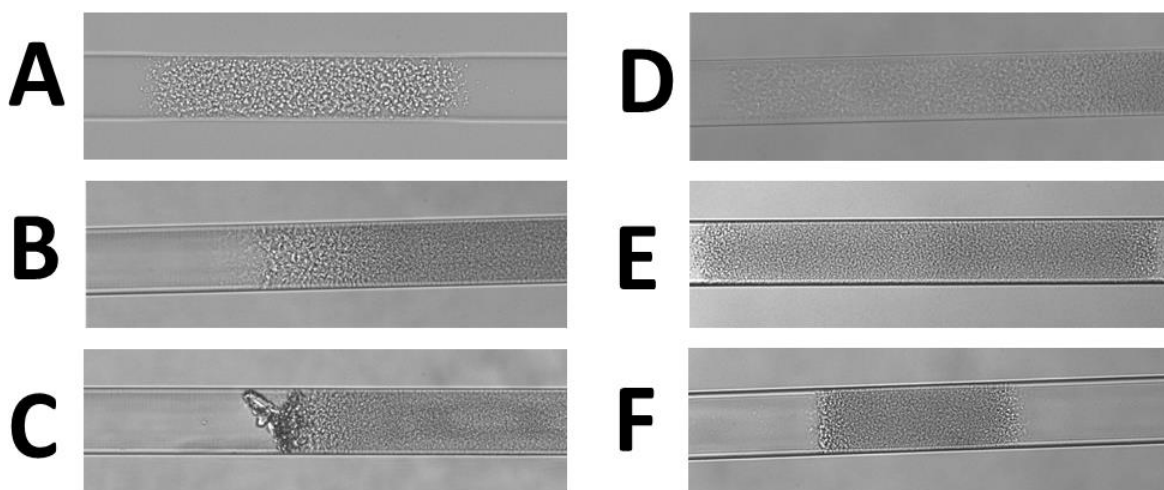


Figure 1. Microscopic photos of the poly(EGMP-BAA) monolith obtained with different oxygen removing procedures, containing or not HQ. Monolith obtained with (A) 10 min ultrasound degassing; (B, C) 10 min ultrasound degassing followed by 5 min nitrogen purging but after rinsing with methanol for several hours under pressure for (C); (D) 10 min ultrasound degassing followed by 30 min nitrogen purging, (E, F) 10 min ultrasound degassing followed by 30 min nitrogen purging in the presence of HQ. Monoliths in A-E were obtained with 40x objective magnification while Figure F was obtained with 63x objective magnification. Other conditions were thoroughly described in Experimental Section.

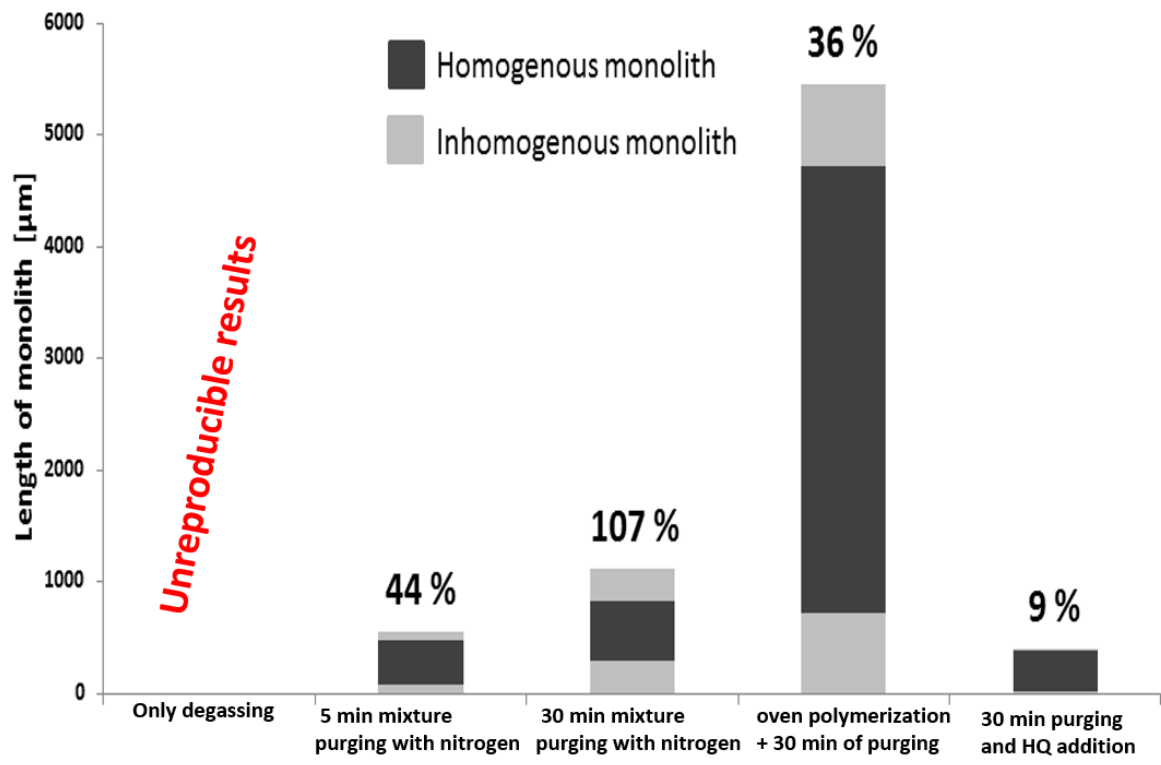


Figure 2. Comparison of homogenous and inhomogenous monolith lengths within a fabricated plugs under the given conditions. All beds were obtained with 40x objective magnification unless otherwise stated. The percentage values above each bar express the ratio of inhomogenous to homogenous monolith zone length.

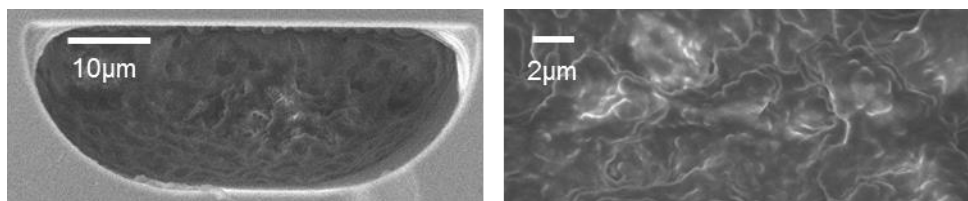


Figure 3. SEM micrographs of the poly(EGMP-BAA) monolith prepared inside a microchip channel by microscope-assisted UV induces synthesis.

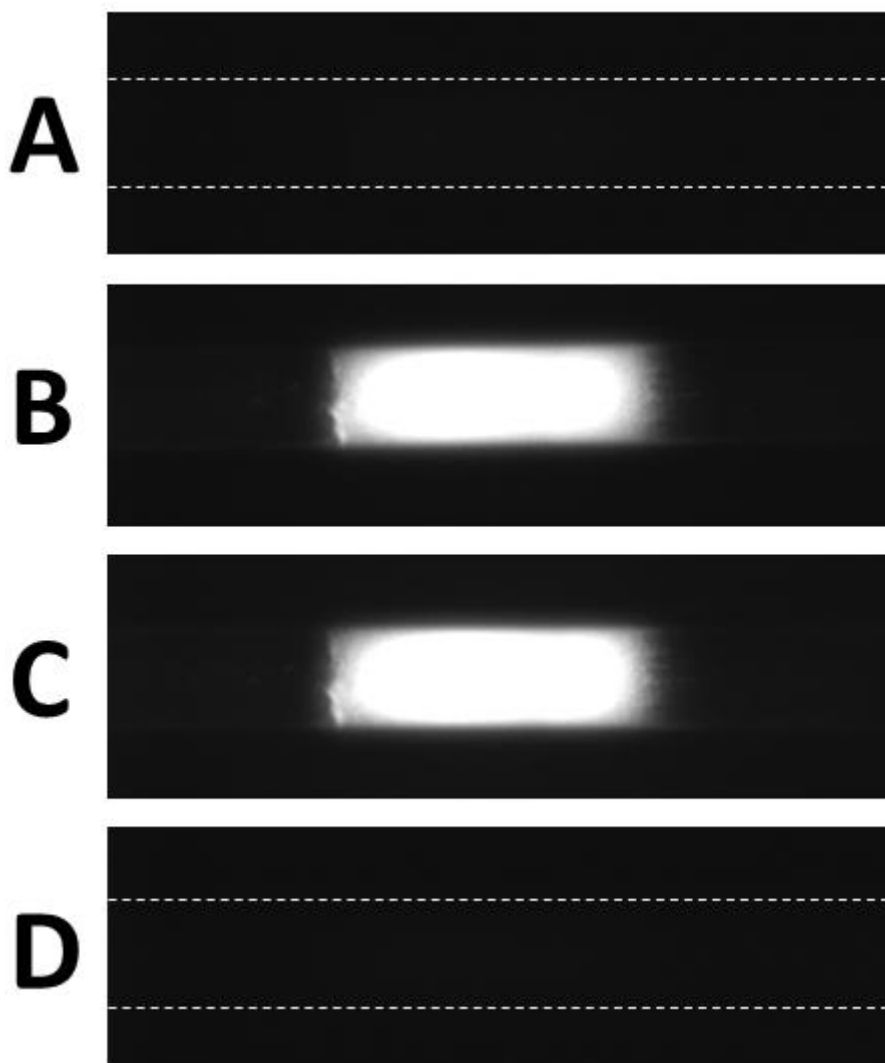


Figure 4. Evaluation of the binding and elution behavior of the (EGMP-BAA) monolith prepared by photopolymerization under microscope towards a fluorescently labelled peptide (DHTGFLpTEpYVATR). The microscopic images correspond to the monolith-filled channel (A) rinsed with the loading buffer, (B) after the loading of the peptide (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in loading buffer), (C) after extensive chip rinsing with the loading buffer and (D) after rinsing with the elution buffer. Detailed description of each step can be found in the Experimental Section.

Table 1. Intra- and Inter-day repeatability of photosynthesized monolithic plugs using microscope. Intra-chip results were given as an average \pm standard deviation [μm] for 3 consecutive polymerizations performed in the same chip.

Objective	Intra-chip [n=3]			Inter-chip [n=9]
	1st	2nd	3rd	CV [%]
40x	402.1 \pm 6.6	410 \pm 1.7	381.2 \pm 3.6	3.4
63x	163.7 \pm 1.7	174.2 \pm 8.0	148.0 \pm 2.1	7.5

Publication

POLYMER 66 (2015): 249-259

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386115003651>

**A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of
polymer monoliths in native PDMS microchips**

Monica Araya-Farias^a, Myriam Taverna^a, Marion Woytasik^b, Fabien Bayle^b, Mohamed
Guerrouache^c, Ichraf Ayed^a, Ha H.Cao^b, Benjamin Carbonnier^c, N. Thuy Tran^{a*}

^a*Institut Galien Paris Sud, UMR8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS,
Univ. Paris-Sud, Sud, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

^b*Univ. Paris-Sud, CNRS UMR 8622, IEF, 91405, Orsay, France*

^c*Univ. Paris-Est, ICMPE (UMR7182), CNRS, UPEC, Thiais, 94320, France*

*Corresponding authors : * thuy.tran-maignan@u-psud.fr*

Abstract

We report here a one-pot approach to achieve, for the first time, the simultaneous synthesis/anchorage of polymer monoliths in native PDMS channels. Monoliths consisting of ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP) and N,N'-methylene-bis-acrylamide (BAA) were synthesized within PDMS microchips through a photo-driven process. The EGMP monomer has never been employed for this purpose. To achieve this method, both the chemical nature of the photoinitiator and irradiation conditions were investigated. The main result was that the use of 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propiophenone, as photoinitiator, allowed simultaneous polymerization and anchorage of the resulting monolithic structure onto the PDMS channel. Morphology of the monolith revealed a compact structure composed of uniform nodules (135 ± 30 nm) and small pores (10-200 nm). The high specific surface area ($66 \text{ m}^2/\text{g}$) and the sufficient permeability ($14.35 \times 10^{-14} \text{ m}^2$) obtained make the monolith particularly interesting for preconcentration. Such free radical-mediated method open new perspectives for preconcentration and electrophoretic separation in PDMS microsystems.

Key words: polymer monolith, PDMS microchip, photoinitiator, photopolymerization

1. Introduction

Microfluidic systems offer numerous advantages including fast analysis times, minimal sample and the possibility to integrate different and successive analytical steps (preconcentration, separation, mixing, detection) into a unique microdevice [1–3]. Online preconcentration is an essential step to overcome the low sensitivity due to the small sample amounts injected in microdevices and to enhance selectivity of complex mixtures analyses such as biological fluids through elimination of interferents. Solid phase extraction (SPE) is the most common extraction/preconcentration method applied on microfluidic devices [4–6]. Numerous solid supports have been developed including beads, silica particles, membranes, gels, molecularly imprinted polymer and monoliths (MN) [5,7,8]. Specifically MN provide practical advantages when used in microchips due to their flexibility and ease of preparation [5,9]. In addition, well-controlled morphology and high permeabilities as well as excellent surface properties for functionalization can be obtained with MN making them good candidates for preconcentration [5,7,10–13]. Two main types of MN (silica and organic polymer) are generally exploited for analytical purposes [14]. However, the laborious and expensive synthesis of inorganic MN and the difficulty to localize them into microchannels have considerably slowed down their development in microsystem as compared to organic ones [15,16].

To date, a variety of microfluidic systems integrating porous polymer monoliths functioning as separation columns, solid phase extractors and preconcentrators, enzymatic reactors, microvalves and electrospray emitters [4,17–27] within microchips made of rigid materials such as glass, poly (methyl methacrylate) (PMMA), polycarbonate (PC) or cyclic olefin copolymer (COC) have been reported. The formation of MN in poly(dimethyl)siloxane (PDMS) microchips, is very attractive due to its biocompatibility, easy fabrication by soft lithography, optical transparency and low-cost manufacturing. Despite the extended use of PDMS, only a few PDMS microsystems integrating polymer MN have been reported up to now [28–34]. Most of them relied on hybrid PDMS/Glass systems [29,30,32,34]. Only three MN have been obtained on real PDMS/PDMS systems [28,31,33]. This low number of publications is likely due to the intrinsic properties of PDMS such as its high permeability to oxygen (polymerization inhibitor) and extreme hydrophobicity inducing the adsorption of monomers and porogen solvents present in the polymerization mixture. To overcome those problems, various approaches relying on the

surface modification of PDMS/PDMS systems such as photografting [28], oxidation and silanization [33] or modification by intertwining monomers within the PDMS matrix [31] have been proposed to achieve successful MN synthesis and anchorage. Photografting with preadsorption of benzophenone (BP) has been up to now the most common strategy [35] to anchor the MN in PDMS/glass microsystems [29,30,32,34] but this method is long entailing numerous polymerization and rinsing steps and not suitable for an industrial application. Alternative methods of anchorage of MN should therefore be considered to overcome these major drawbacks and to allow further development in the field of monolith-based analytical microsystems.

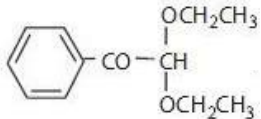
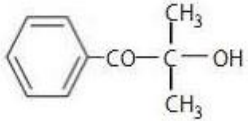
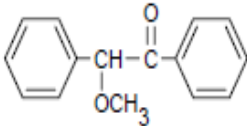
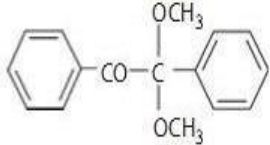
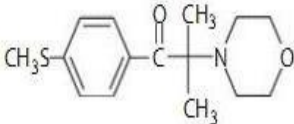
UV-induced free radical polymerization constitutes the easiest way to synthesize polymer MN with a controlled localization within defined zones along microchannels using photomasks. One critical component of the polymerization mixture (composed of monomers, porogens, photoinitiator and crosslinker) is the photoinitiator (PI). In fact, the generation of free radicals by the PI is the first step of UV polymerization, following either a Type I (scission process) or Type II (hydrogen abstraction process) mechanism [36]. In both cases, PI are excited into a singlet state and then converted to a triplet state to produce radicals. The triplet state can easily be deactivated by oxygen inhibiting thereby the ability of PI to produce radicals. This quenching effect depends on the lifetime of the triplet state which is influenced not only by the medium but also significantly by the nature of the PI. A large quantity of radicals produced at the initiation stage of the polymerization reaction is generally required to obtain high polymerization rate and thus circumventing oxygen inhibition. Also, an efficient PI (presenting maximum of UV absorption at the emitted light, high quantum yield, high molar extinction coefficient) can induce a fast polymerization, contributing to reduce the risk of monomer adsorption into the PDMS.

To the best of our knowledge, only one work has reported the role of PI on the synthesis of a lauryl-methacrylate MN in silica capillaries [37]. The authors demonstrated that the type and photoinitiator concentration had an effect on the final globule size of the MN. Until now, no work has been devoted to the investigation of the role of PI on the efficiency of monolith polymerization in PDMS microchannels. However, from a point of view of MN anchoring, Ladner *et al* .[38] demonstrated that Type I photoinitiators such as benzoin methyl ether and AIBN, could also act as Type II photoinitiators and abstract hydrogen

from a plastic surface. These properties allowed the simultaneous synthesis and anchorage of hexyl and glycidyl acrylate MN inside COC microchannels.

This state of art stimulated us to investigate the impact of the nature and concentration of PI on polymer MN synthesis in native PDMS microchannels. An ethylene glycol methacrylate phosphate-co-bis-acrylamide (poly (EGMP-co-BAA)) MN was used in this study with the aim to exploit, in the future, its negative phosphated surface for phosphopeptide enrichment. The same MN was previously synthesized by Dong *et al.* [39] but thermally and in silica capillaries. In this work, we have compared the ability of the most representative molecules of the five main class of Type I photoinitiators (Table 1) to produce homogenous MN inside PDMS channels by studying the effect of PI concentration and irradiation time. Among them, 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propiophenone (IRG) has never been reported in the literature for MN synthesis. After selection of the most efficient PI, the effect of UV intensity and channel dimensions were then investigated. A one-pot approach to achieve the simultaneous synthesis and anchorage of poly (EGMP-co-BAA) MN in native PDMS channels without preliminary surface treatment was reported. The MN was characterized by scanning electron microscopy (SEM), mercury intrusion porosimetry (MIP), nitrogen adsorption (BET) and permeability measurements.

Table 1. Chemical structures and photochemical data of Type I photoinitiators^a.

Photoinitiators	Class	Absorption λ_{\max}	Molar Extinction Coefficients ϵ_{\max} ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)	Quantum yield ϕ	Chemical Structures
2,2-dietoxyacetophenone (DEA)	α -DIALKOXY ACETOPHENONES	335 nm	72	0.81	
2,2-dimethyl-2- hydroxyacetophenone (DARO)	α -HYDROXY ACETOPHENONES	330 nm	100	1.00	
Benzoin methyl ether (BME)	BENZOIN ETHER	341 nm	215	1.48	
2,2-dimethoxy-2- phenylacetophenone (DMPA)	BENZYL KETAL	343 nm	242	1.71	
2-methyl-4'-(methylthio)- 2-morpholino- propiophenone (IRG)	α -ALKYLAMINO ACETOPHENONES	303 nm	18600	0.88	

^aData were obtained from Green et al.[36] Fouassier and Rabek [40] and Ledwith [41].

2. Experimental

2.1 Materials

Ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP) monomer and cross-linking agent Bis-acrylamide (BAA) were obtained from ESSCHEM (Europe Seaham, United Kingdom) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectively. Porogen solvents such as dimethylsulfoxide (DMSO), 1-dodecanol (DDC) and *N,N'*-dimethylformamide (DMF) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and photoinitiators (2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN), 2,2-dietoxyacetophenone (DEA), 2,2-dimethyl-2-hydroxyacetophenone (DARO), benzoin methyl ether (BME), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) and 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propiofenone (IRG)), were also purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol was obtained from VWR International (Paris, France). Sylgard 184 prepolymer and curing agent were purchased from Dow Corning Corp. (Midland, MI, USA). Borosilicate wafers (BK7 discs) were obtained from ACM (Villiers, Saint Frédéric, France).

2.2 Equipment

A double-sided alignment lithography system (Model EVG 620, St-Florian, Austria) was used to fabricate the SU-8 master molds and a plasma cleaner system (Model PICO, Diener Electronic, Detroit, USA) to oxidize the PDMS surface. The UV polymerization of poly (EGMP-co-BAA) MN was performed in a UV oven (Bio-link cross-linker, BLX-E365, Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). Images of the MN containing channels were obtained using an optical inverted microscope (Model ZEISS AXIO Observer.A1, Le Pecq, France) and a scanning electron microscope (Model Hitachi SU8000 type III high resolution, Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 2kV. The pressure tests were carried out on a nano pump (Model G2226A, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and the MIP measurements on an Autopore mercury porosimeter (Model IV9500, Micrometrics, Norcross, USA). The structural properties of the MN were determined from the nitrogen adsorption/desorption isotherms measured with a Micromeritics instrument (Model ASAP 2020, Micromeritics, Georgia, USA).

2.3 Fabrication of PDMS microchips

PDMS microchips with 3 parallel channels were fabricated with standard soft lithography. A 50 μm deep, 250, 150, 100 or 50 μm wide and 3 cm long mold in SU-8 3050 photoresist

was shaped on a silicon wafer: a SU-8 layer up to 50 μm was spin-coated on a silicon wafer and then soft-baked on a hotplate at 95°C for 15 minutes. Subsequently, the SU-8 layer was exposed to UV light by using an optical lithography system at 250 mJ/cm^2 and then post-baked at 65°C for 1 minute and 95°C for 4 minutes. Finally, the SU-8 layer was developed in SU-8 developer solution for 5 minutes and then rinsed with isopropyl alcohol and dried under nitrogen flow.

Sylgard 184 PDMS prepolymer and curing agent were mixed at a ratio of 10:1(w/w). After blending, the mixture was degassed in a vacuum desiccator for 1h. Then, the PDMS prepolymer mixture was poured onto the SU-8 master mold and cured in an oven at 75°C for 2 hours. The cured PDMS cap was released from the master mold and cut into the suitable shape. The channel inlet and outlet (2 mm of internal diameter) were drilled using a PDMS tool kit. A fluidic layer (20 μm) was formed by spin-coating 2 ml of pre-polymer mixture on a borosilicate wafer which was cured at 75°C for 1h. Finally, the cured PDMS cap and the borosilicate wafer were then oxidized in the plasma cleaner for 1 min (160 W, 0.4mBar), laid on top of each other, and cured for 1h at 75°C to form an irreversible bonding.

2.4 Monolith preparation and optimization

The first set of experiments was conducted to evaluate the effect of photoinitiators with different chemical structure and polymerization conditions on the MN synthesis. These experiments were performed in native PDMS channels of 250 μm (in width). The UV polymerization of poly (EGMP-co-BAA) MN was adapted from the protocol previously reported by Dong *et al.* [39] which used thermal polymerization. The reaction mixture was composed of EGMP (13% w/w) and BAA (10% w/w) monomers, porogen solvents (77% w/w) including DMSO (52% v/v), DDC (38% v/v) and DMF (10 % v/v) and one photoinitiator. Five different photoinitiators (DEA DARO, BME, DMPA, IRG) and one thermal initiator (AIBN) at several concentrations (0, 0.32, 0.64, 1.3 and 1.8 % w/w) were tested. The MN mixture was placed in a glass amber vial, homogenised by ultrasonication for 25 min at 23 \pm 2°C and degassed for 10 min. The mixture was then introduced inside microchannels of 250 μm using a manual syringe. The microchannels were irradiated at 365 nm at different irradiation times (0, 5, 10, 15, 20 and 30 min) and at a light intensity of 1.5 mW/cm^2 . After UV exposure, the monolithic channel was flushed with methanol and

water to remove the remaining monomers and porogens and stored in water at 4°C. The experiments were repeated twice.

The percentage of channel filling by the MN (PF) was used to evaluate the efficiency of the MN synthesis in PDMS channels. This parameter was estimated from optical images by virtually dividing the channel in three zones of 1 cm long. For each zone, the length (L_{MN}) and the width (W_{MN}) of the MN zone were measured and the MN surface (A_{MN}) was calculated. Assuming that the MN is homogeneously growing in the channel depth, the PF value was based on the total MN surface along the channel (A_{MN-tot}) (Fig.1).

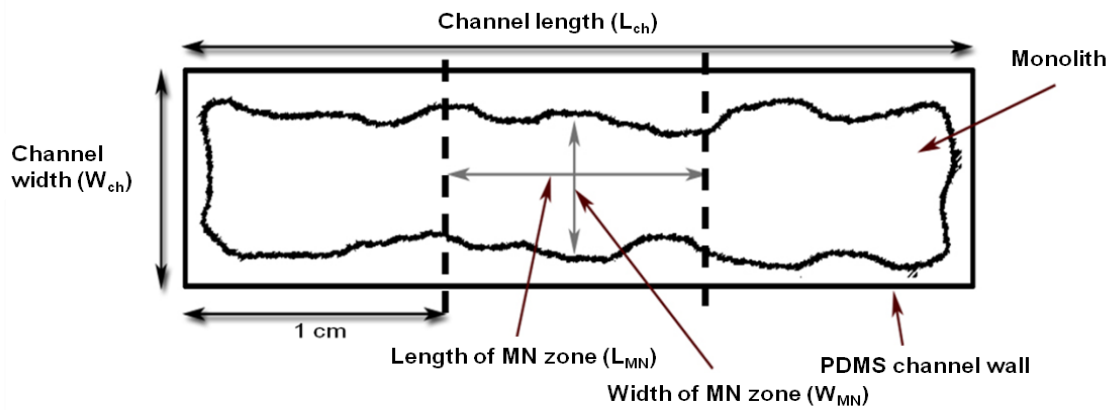


Fig.1. Scheme of the optical image of PDMS channel with growing MN detailing the method used to estimate the percentage of the channel filling by the MN.

The PF value was determined using the following equation:

$$PF = \frac{A_{MN-tot}}{A_{ch}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

where A_{MN-tot} is the sum of A_{MN} of the three zones, and A_{MN} is the product of L_{MN} multiplied by W_{MN} .

$A_{ch} = L_{ch} \times W_{ch}$, where A_{ch} is the surface of the channel, L_{ch} the channel length and W_{ch} the channel width.

The PF values were plotted against the irradiation time (y) and the PI concentration (x). Data obtained were analyzed by SIGMAPLOT 12.0 software (Systat Software, San Jose, USA) and fitted to a quadratic equation:

$$f = y_0 + ax + by + cx^2 + dy^2 \quad (\text{Eq.2})$$

where a , b , c and d are constants.

In the second set of experiments, the effect of light intensity and channel dimension on the monolith formation was investigated using the best PI. The channel widths were changed to 150, 100 and 50 μm . UV irradiation with different light intensities (3.0, 2.0 and 1.5 mW/cm^2) were employed.

2.5 Procedure for synthesis and anchorage of monolith to PDMS channel walls

The anchoring procedure was a one-step method providing simultaneous synthesis and anchorage of MN to PDMS channel walls. The MN was synthesized with IRG (1.8 % w/w) for 15 min in a PDMS channel of 50 μm at 2.0 mW/cm^2 .

2.6. Monolith characterization

2.6.1 Pressure tests

Pressure tests were carried out in order to evaluate the mechanical stability of the MN. The experiments were performed on MN of 1 cm in length synthesized according to the MN synthesis and anchoring procedure in a PDMS channel of 50 μm (wide). The PDMS device was connected to the nano pump and water was pumped through the MN at various flow rates varying from 1 to 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. The resulting backpressure was recorded and plotted against the water velocity to deduce the permeability B which was calculated according to the Darcy's law:

$$B = \frac{\eta Lu}{\Delta P} \quad (\text{Eq.3})$$

where η is the viscosity of water, L is the MN length, u is the water velocity and ΔP is the back pressure.

2.6.2 Monolith morphology

The morphology of the MN was characterized by SEM and MIP. For SEM observation, the PDMS microchannel were carefully removed from the microchip and cooled in liquid N_2 for 40 min to harden the PDMS. Pieces of PDMS of 10 mm long were prepared by cutting a cross-section of the channel with a surgical scalpel. Gold-platinum was sputtered onto the samples prior to SEM observation. SEM images were analyzed by Image J software (Cambridge, UK) to estimate the nodule size and pore shape. To characterize the pore structure, a total of 18 images were recorded at 3 different regions of 2 different sections and from 3 MN. Pixels were converted to microns and then to a binary black and white

format. The pores were recognized by the software as black regions. A total of 100 nodules were examined from SEM images. The binary images were superimposed on the original picture to check the accuracy of the measurements.

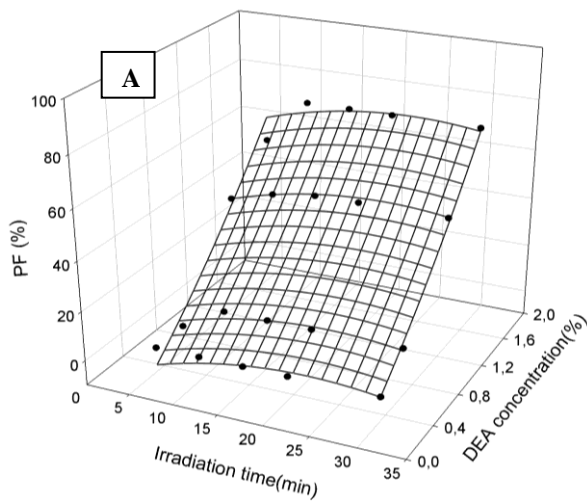
Quantitative information such as median pore size, pore size distribution, porosity and total pore volume were obtained from MIP measurements. The MN samples were synthesized in a vial (200 μL of MN mixture) with IRG (1.8% w/w) for 15 min. The porogens were removed with methanol using a Soxhlet extractor for at least 12 h. All samples were dried in a vacuum oven at 25°C for at least 8h to evaporate residual solvents. The MIP characterization was performed on 120 mg of MN obtained after Soxhlet extraction. The specific surface area was obtained by the BET (Brunauer-Emmet-Teller) method in the relative pressure range (P/P_0) of 0.05–0.35, the total pore volume was computed from the amount of gas adsorbed at $P/P_0 = 0.99$.

3. Results and discussions

3.1 Monolith formation

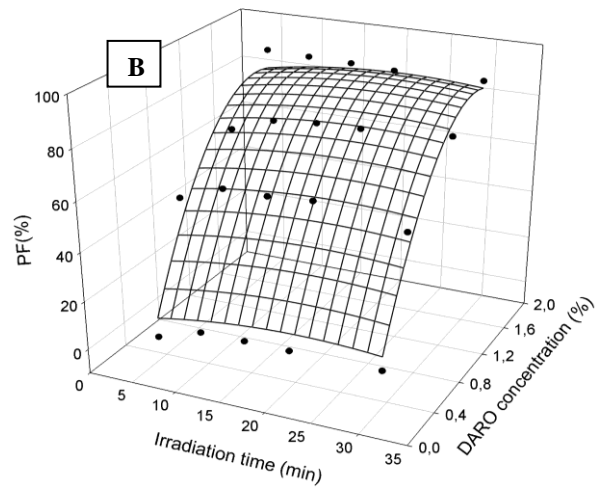
With the aim to develop one synthesis method allowing integrating inner wall-anchored poly (EGMP-co-BAA) MN within fully PDMS-based microchip device, the effect of different Type I photoinitiators (DEA, DARO, BME, DMPA or IRG) on the MN formation was studied and the results were compared to those obtained using AIBN. The percentage of channel filling by the MN (PF) was used as a direct indicator of the efficiency of the polymerization and to determine the best conditions for each PI.

Figure 2 shows the 3D curves representing the evolution of PF as a function of PI concentrations and irradiation times, together with the corresponding equations and R^2 values that were obtained for each PI. The experimental values fitted the quadratic model with high agreement ($R^2 > 0.90$). Absolute values of a and c coefficients related to PI concentration were very high as compared to b and d coefficients related to irradiation time, indicating that the PI concentration was the most impacting parameter on PF for each PI.



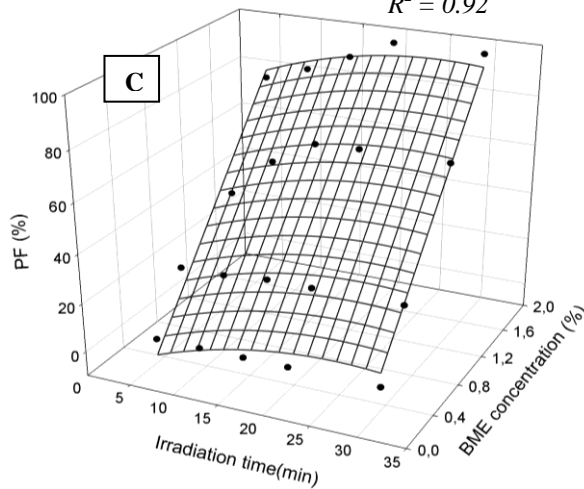
$$f = -24.4 + 32.18x + 1.40y + 6.73x^2 - 0.03y^2$$

$$R^2 = 0.98$$



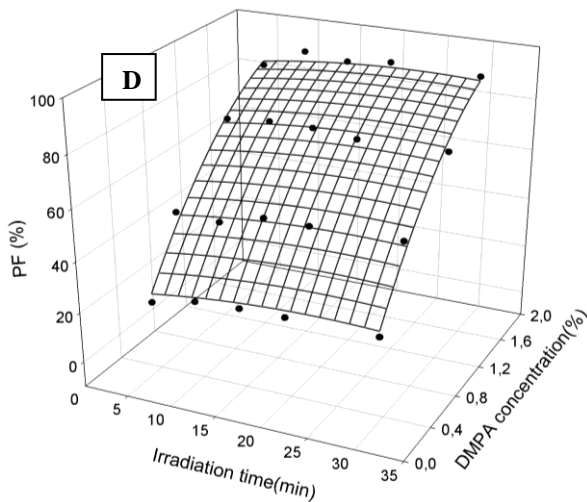
$$f = -35.75 + 138.68x + 0.83y - 42.25x^2 - 0.02y^2$$

$$R^2 = 0.92$$



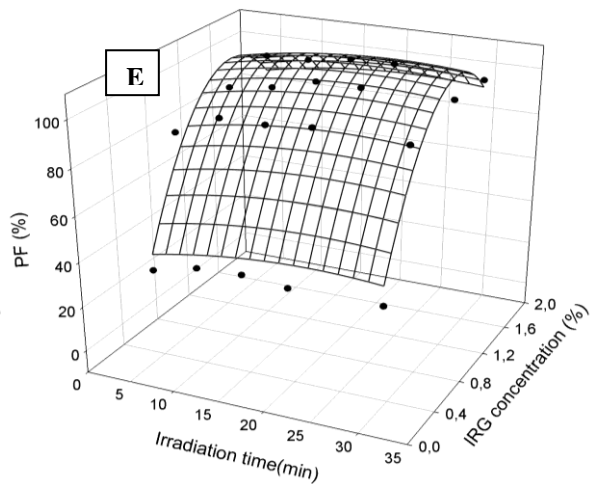
$$f = -33.22 + 58.89x + 1.69y - 0.11x^2 - 0.03y^2$$

$$R^2 = 0.98$$



$$f = -3.25 + 77.31x + 0.62y - 16.7x^2 - 0.01y^2$$

$$R^2 = 0.98$$



$$f = -12.91 + 166.52x + 1.03y - 62.76x^2 - 0.02y^2$$

$$R^2 = 0.91$$

Fig.2. Evolution of the percentage of channel filling by the MN (PF) as a function of irradiation times and photoinitiator concentrations using either A) DEA, B) DARO, C) BME, D) DMPA and E) IRG as photoinitiators.

The optimal conditions obtained with each PI and the corresponding PF are summarized in Table 2. The highest PF were obtained with IRG (97%), BME (93%) and DMPA (88 %) whereas DARO and DEA lead to the lowest values. Except for IRG (1.3% w/w), the same concentration of 1.8% (w/w) for all other PI was found to be optimal to get the highest PF. Those optimal PF values were obtained for UV irradiation duration between 12 and 21 min.

Table 2. Percentage of PDMS channel filling by the MN with different photoinitiators.

Photoinitiators	Optimal conditions (concentration, irradiation time)	Percentage of channel filling by the MN (%)
DEA	1.8 %, 21 min	71%
DARO	1.8 %, 14 min	85 %
BME	1.8 %, 21 min	93 %
DMPA	1.8 %, 12 min	88 %
IRG	1.3 %, 15 min	97 %

These results reveal clearly that the nature of the PI impacts strongly on PF. We deduced that IRG, BME and DMPA were the most efficient PI for the synthesis of poly (EGMP-co-BAA) MN in PDMS channels. Those 3 PI exhibit the highest extinction coefficients (ϵ), high quantum yields (Φ), extremely short triplet lifetimes (in the range of 0.1ns) and very fast rates of cleavage (in the range of $10 \text{ K}^{-9} \text{ s}^{-1}$) (Table 1). This makes them very efficient to start the initiation step of the radical polymerization process in the presence of quenchers such as oxygen. The lower efficiency of DARO and DEA for the synthesis of poly (EGMP-co-BAA) MN may be explained by differences in ϵ and Φ . On the other hand, the efficiency of DARO could be more affected by the presence of oxygen due to its longer triplet lifetimes (30 ns) and lower rate of cleavage ($0.7 \text{ K}^{-9} \text{ s}^{-1}$) to produce radicals [36].

More specifically the superiority of IRG can also be due to the presence of nitrogen on its chemical structure (Table 1). According to Green [36], this heteroatom provides a higher electron density on the α -carbon atom making the scission process more efficient. Conversely, the lowest efficiency of DEA could be explained by its ether structure that can undergo an intramolecular hydrogen abstraction process, in competition with α -cleavage one producing a less efficient biradical to start the polymerization reaction. Although DMPA has also a similar ether structure to DEA, it produces a methyl radical that is probably more efficient than that generated by DEA [36].

No monolith synthesis was observed in native PDMS channel using AIBN as an initiator even after 30 min of irradiation. AIBN is considered as a thermal initiator but still is often employed for MN preparation through photopolymerization [41]. However, this PI presents slow photoreactivity ($\epsilon=11.9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and low initiating efficiency ($\Phi=0.50$). This enhances the risk of strong adsorption of the synthesis solution by PDMS either before the photoinitiation step or during the MN formation. It is worth mentioning that other groups have described the synthesis of MN in PDMS microchannels using AIBN as initiator, but in all cases the polymerization was performed on a hybrid PDMS/Glass system and a preliminary surface treatment was necessary prior to the polymerization making tedious and time-consuming the overall MN fabrication process [30,34].

To gain more insight into the effect of the PI, the morphology of the different MN formed under the optimal conditions (Table 2) was investigated. As expected, all monoliths exhibited a matrix of interconnected-nodules as shown in SEM images (Fig. 3). However, monoliths prepared with DEA and DARO showed large agglomerated nodules while small globules and a high number of micropores were observed in the case of IRG, BME and DMPA. This morphology difference can be explained by a faster initiation and therefore a faster polymerization rate with IRG, BME and DMPA, leading to the formation of smaller nodules. This is in agreement with the study of Bernabé-Zafon et al. [37] who reported that monoliths photoinitiated using DMPA showed smaller globule sizes than those synthesised using AIBN. As such, synthesizing poly (EGMP-co-BAA) MN in PDMS channels without any surface modification remains highly challenging due to oxygen permeability and absorption ability of PDMS[29–32,34]. However, our results demonstrate undoubtedly that the faster synthesis afforded by IRG, BME or DMPA reduces the risk of monomer and porogen absorption into PDMS channels.

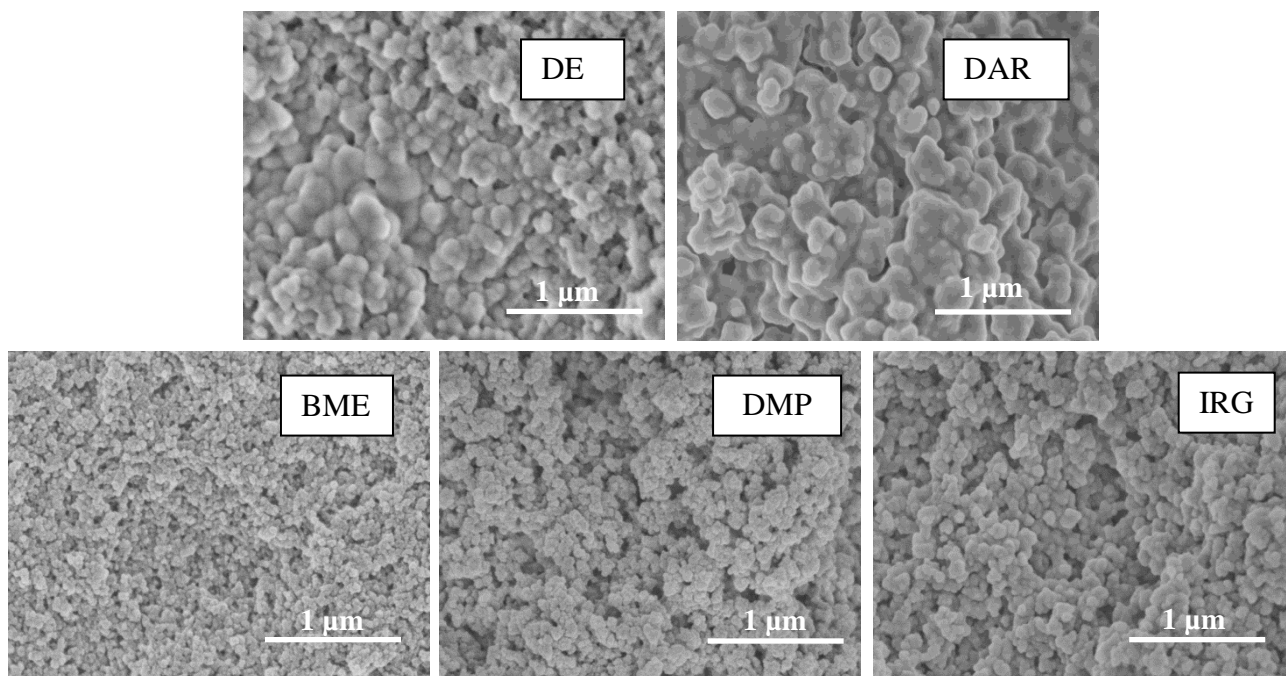


Fig.3. SEM images of poly (EGMP-co-BAA) MN synthesized in native PDMS channels (250 μm) using different photoinitiators as indicated in insets.

3.2 Effect of channel dimensions and light intensity on the monolith formation

The MN synthesis with IRG showed the highest PF value (97%) and this PI was therefore used for the next set of experiments. Despite achievement of a nearly complete channel filling, the MN was not anchored onto the 250 μm -sized channel (Fig.4a). Indeed, a gap can be observed between the MN and the channel wall, presumably due to the adsorption of polymerization mixture and the diffusion of oxygen into the channel. Additional experiments were carried out to further optimize the MN filling in the channel evaluating the effect of light intensity (varying from 1.5 to 3.0 mW/cm^2) and channel width (50-150 μm) on the MN formation. The structure of MN prepared by photopolymerization at 3.0 mW/cm^2 was very compact without visible throughpores. This light intensity was certainly too high provoking the collapse of the MN structure [42]. Fig. 4b shows an optical image of MN in 50 μm width PDMS channel which fitted closely the lace shape of the channel. In addition, we observed that the MN (in 50 μm channel) exhibited a homogenous structure not only radially but also along the channel. The MN synthesized in the 100 μm width channel was also fitted the channel wall but did not fill along the whole channel (data not shown). The results indicated that the MN was successfully synthesized in 50 μm microchannels at different light intensities within 15 min. The best results in terms of channel filling were obtained with 50 μm width channel using 2 mW/cm^2 .

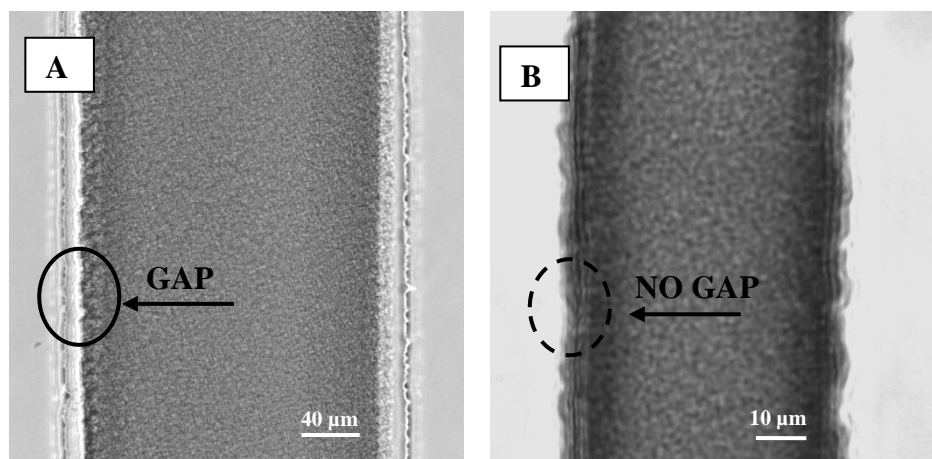


Fig.4. Optical images of poly (EGMP-co-BAA) MN synthesized in PDMS channels using IRG (1.3 w/w%) for 15 min. A) 250 μm width channel, a gap (solid circle) is observed between the MN and the channel wall, and B) 50 μm width channel, the MN fits closely the lace shape of the channel (dashed circle), no gap is observed.

3.3 Simultaneous synthesis and anchorage of the monolith to the PDMS channel walls

As described in the section 3.2, we noticed that the poly (EGMP-co-BAA) MN prepared with IRG (1.3 w/w %) at 2.0 mW/cm^2 (in 50 μm width channel) exhibited a homogenous structure but fitted less to the channel wall after its rinsing with methanol. We also observed that methanol circulated not only through the MN channel-like pores but also along the channel wall. This result suggested that the MN was not firmly attached to the channel wall. To overcome this problem, an alternative and easier approach to anchor the poly (EGMP-co-BAA) MN to PDMS channel walls simultaneously to the polymerization initiation was considered by investigating the dual ability of IRG photoinitiator to abstract hydrogen and initiate the radical polymerization. The IRG concentration was then further optimized. When the PI concentration reached to 1.8 (w/w %) a robust anchorage of the MN within the square-like PDMS microchannel was achieved within 15 min (Fig. 5). As such, this is the first time, one method allows the simultaneous synthesis and *anchorage* of a poly (EGMP-co-BAA) MN into and onto native PDMS channels without additional pretreatment of the PDMS surface before the polymerization step. In order to explain the efficiency of IRG and the attachment of MN to the channel wall, some hypotheses can be pointed out. IRG belongs to the aminoalkylated acetophenone class of PI which are considered as more efficient in producing radicals than other types of acetophenone PI [36]. In addition, IRG can produce radicals by two mechanisms (α and in a minor degree β

scissions) [36]. Alpha-cleavage produces substituted benzoyl and alkylamino radicals. Both are very reactive to initiate polymerization. Beta-cleavage produces rather phenacyl and morpholino radicals with different properties, even if both are reactive. However, according to Allen et al. [43] and Green [36], benzoyl and substituted benzoyl radicals can also abstract a hydrogen atom from an appropriate hydrogen donor. We can speculate that the high efficiency of IRG in the synthesis of poly (EGMP-co-BAA) MN might result from both numerous and different radicals produced. Some of these substituted benzoyl radicals could also abstract, to a lower extent, a hydrogen from methyl groups present at the surface of the PDMS chip to create anchoring sites onto channel walls and leading thereby to an efficient attachment of the MN concomitantly to its polymerization.

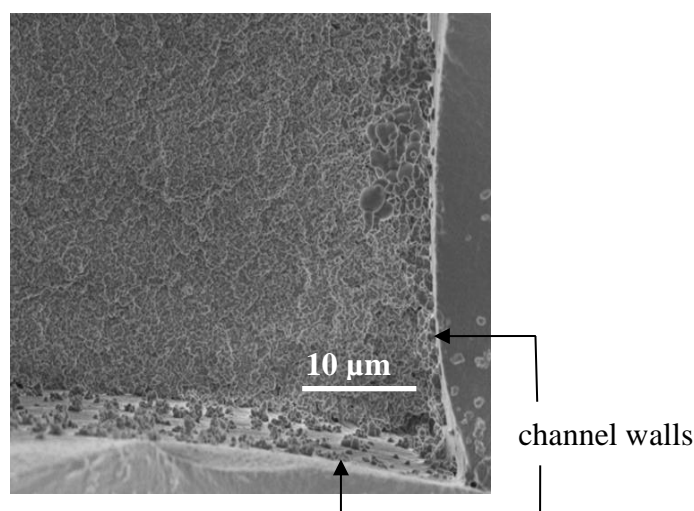


Fig.5. SEM image of a cross section of one square-like PDMS channel (50 μm) filled with poly (EGMP-co-BAA) MN synthesized using IRG (1.8 w/w%) for 15 min.

3.4 Characterization of in-microchip anchored monolith

We focused then on the characterization of the phosphate-containing MN prepared *via* the new one-step polymerization-anchoring procedure relying on the IRG as PI. Morphology, porosity, mechanical stability and flow-through properties of poly (EGMP-co-BAA) MN were investigated by a combination of complementary experimental methods including SEM, BET, MIP and permeability measurements. Morphology of MN examined by SEM images revealed uniform nodules with an estimated size of 135 ± 30 nm forming a porous scaffold typical of a monolithic-like material (Fig. 6A). The pore structure of poly (EGMP-co-BAA) MN was further characterized in terms of pore shape using SEM micrograph analysis. The SEM images were converted into a binary image using a thresholding

process where the pores were recognized as black regions and the nodules of MN as white ones (Fig. 6B). This approach allowed visualization of the pore shape and their distribution in the monolithic network. Fig. 6B shows a low number of void spaces in the structure of the MN synthesized with IRG suggesting a rather compact morphology. Such structural details could be related to the fast polymerization rate generating a larger number of nuclei and small nodules. This imaging-based method could be used as an alternative to the TEM-or SEM-based methods that have been developed to reconstruct and characterize the organic MN which present either additional steps like embedding of the MN or some technical limitations [44,45].

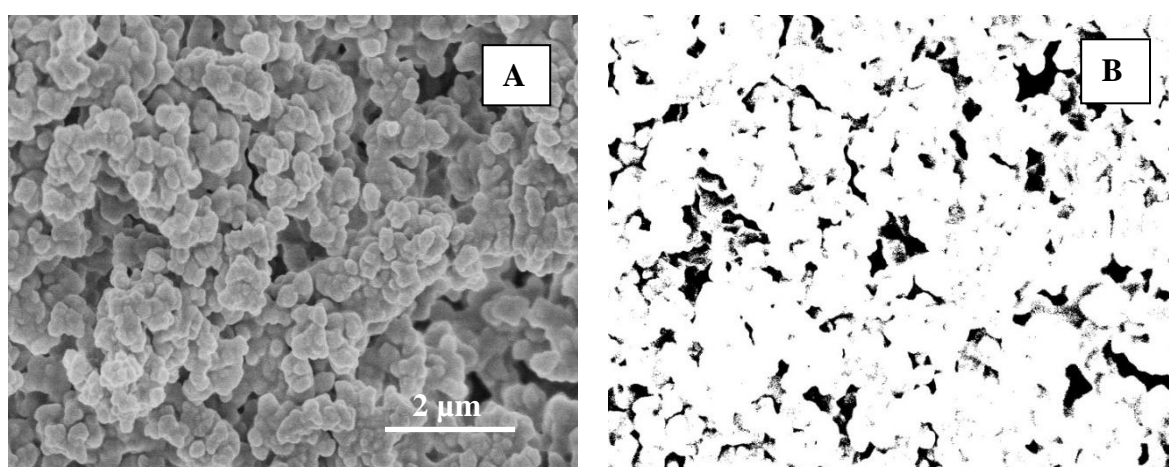


Fig.6. (A) SEM and (B) corresponding binary images of poly (EGMP-co-BAA) MN synthesized through UV-irradiation (15 min, 2mW/cm², 365 nm) in the presence of IRG (1.8 w/w%) within native PDMS microchannel (50 μm).

From the permeability measurement, a linear relationship between backpressure and linear flow velocity was obtained in the pressure range from 5 to 17.5 bars (Fig. 7). This linear dependence together with the absence of cracks formation and microchannel wall-detachment of the MN suggest that our developed method yields MN with homogenous pore structure, and structural stability compatible with PDMS-based microchip technology applications. The permeability of poly (EGMP-co-BAA) MN under water flow was determined to be $14.35 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ according to the Darcy's law.

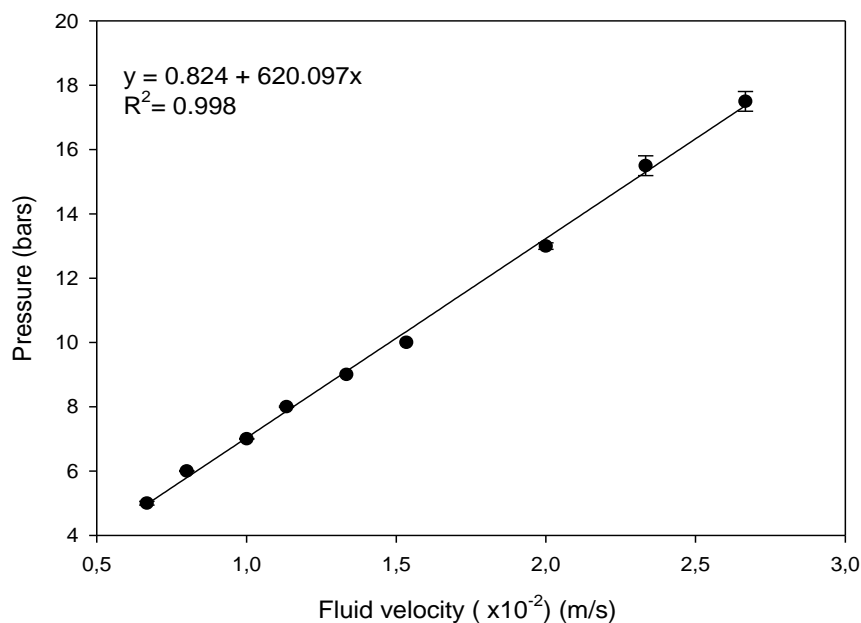


Fig.7. Dependence of backpressure on fluid velocity of 1 cm long poly (EGMP-co-BAA) MN synthesized through UV-irradiation (15 min, 2 mW/cm², 365 nm) in the presence of IRG (1.8 w/w%) within native PDMS microchannel (50 μm).

Specific surface area of poly (EGMP-co-BAA) MN was determined to be 66 m²/g by BET analysis. The latter indicated that the EGMP-based MN contained no pores with size lower than 2 nm. MIP measurements confirmed to a large extent SEM and BET data. The pore size distribution showed that the MN exhibits a broad monomodal distribution with a majority of pores in the size range from 10 to 200 nm with a maximum at about 65 nm with contributions to the pore volume of 68% (0.63 cm³/g) and 32% (0.29 cm³/g) for macropores and mesopores, respectively (Fig. 8). Total pore volume and porosity of poly (EGMP-co-BAA) MN were calculated to be 0.92 cm³/g and 52%, respectively.

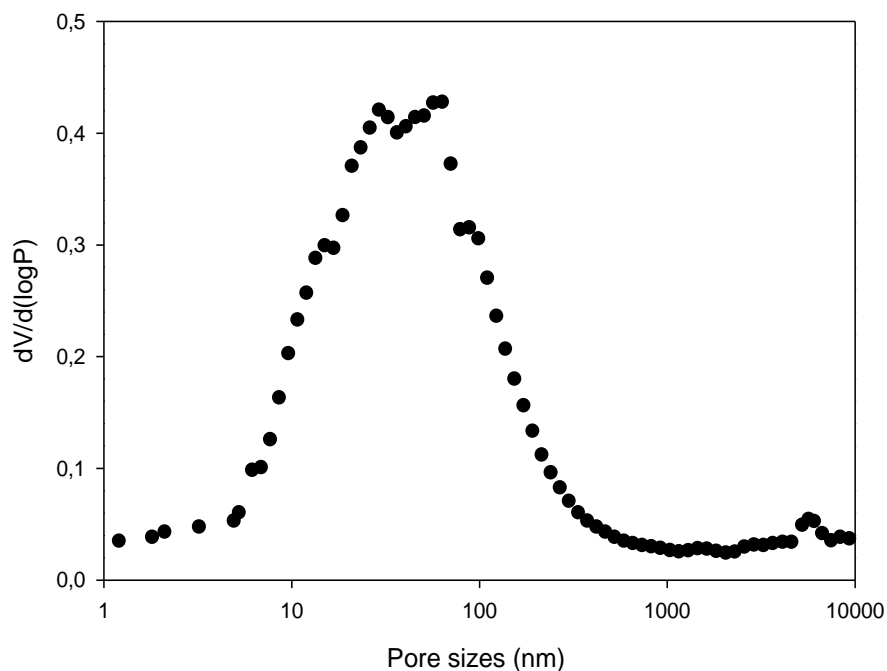


Fig.8. Pore size distribution determined for poly (EGMP-co-BAA) MN bulk sample by mercury intrusion porosimetry.

To sum up, the poly (EGMP-co-BAA) MN exhibits a compact structure composed of pores with an average size smaller than most of the values reported in the literature for monoliths dedicated to preconcentration and electrochromatographic separation purposes [31,32,46–48]. Consequently, the specific surface area is relatively higher than those reported in the literature for EGMP-related MN synthesized in either glass microchips or fused silica capillaries which are ranging from 13.7 to 49.0 m²/g [39,46]. In another study, specific surface areas of organic MN from 0.4 to 110.5 m²/g were reported, and the authors demonstrated that monoliths with the smallest pore sizes had the highest surface area [49]. Our results are fully consistent with this observation. Presence of small pore size contributes greatly to increase the surface area. This is particularly interesting for preconcentration. Of particular importance, the permeability of poly (EGMP-co-BAA) MN is comparable to those reported in the literature and ranging from 26.4 to 31.6 x 10⁻¹⁴ m² for EGMP-containing MN synthesized in capillaries columns [49,50,51].

4. Conclusions

This study introduced a one-step method for synthesis and anchorage of poly(EGMP-co-BAA) MN inside native PDMS microchannels. It is clearly demonstrated that nature and concentration of the PI together with UV irradiation time and intensity are critical parameters to allow such a successful synthesis strategy. IRG from α -alkylaminoacetophenone class was demonstrated as the most efficient PI allowing at a given concentration (1.8% w/w) not only initiation of the free radical polymerization process but also efficient H-abstraction for anchorage onto PDMS channel walls. We anticipate that this method offers great promise for the controlled design of PDMS microdevices integrating (meth) acrylate-based functional MN for separation and concentration purposes. Furthermore, our proposed imaging method for pore size and shape study could be used as a complementary method to the traditional MIP and BET techniques to give a realistic visualization of pore structure since SEM images are fully-representative of the *in-situ* synthesized MN. Indeed, although BET and MIP are well-established techniques routinely used for characterizing pore size distribution, they are mostly, if not exclusively, applied to bulk samples—out microchannel synthesized MN. Further investigations will focus on the study of chelating properties of poly (EGMP-co-BAA) MN towards phosphopeptides or/and phosphorylated disease biomarkers with the aim at designing an on line preconcentration monolithic module *via* immobilized metal ion affinity chromatography strategy.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for the financial support and DIM Analytics of France for post-doctoral scholarship. A special thank to Dr. Karine Faure for very fruitful discussions.

References

- [1] Yang W, Woolley AT. Integrated Multiprocess Microfluidic Systems for Automating Analysis. *Jala* 2010;15:198–209. doi:10.1016/j.jala.2010.01.008.
- [2] Ohno K, Tachikawa K, Manz A. Microfluidics: Applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry. *Electrophoresis* 2008;29:4443–53. doi:10.1002/elps.200800121.
- [3] West J, Becker M, Tombrink S, Manz A. Micro Total Analysis Systems: Latest Achievements. *Anal Chem* 2008;80:4403–19. doi:10.1021/ac800680j.
- [4] Svec F. Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Life Sci* 2006;841:52–64. doi:10.1016/j.jchromb.2006.03.055.
- [5] Giordano BC, Burgi DS, Hart SJ, Terray A. On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review. *Anal Chim Acta* 2012;718:11–24. doi:10.1016/j.aca.2011.12.050.
- [6] Lin C-C, Hsu J-L, Lee G-B. Sample preconcentration in microfluidic devices. *Microfluid Nanofluidics* 2011;10:481–511. doi:10.1007/s10404-010-0661-9.
- [7] Wu Q, Bienvenue JM, Hassan BJ, Kwok YC, Giordano BC, Norris PM, et al. Microchip-Based Macroporous Silica Sol–Gel Monolith for Efficient Isolation of DNA from Clinical Samples. *Anal Chem* 2006;78:5704–10. doi:10.1021/ac060390t.
- [8] Peterson DS. Solid supports for micro analytical systems. *Lab Chip* 2005;5:132–9. doi:10.1039/B405311G.
- [9] Svec F. Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation. *J Chromatogr A* 2010;1217:902–24. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073.
- [10] Saunders KC, Ghanem A, Boon Hon W, Hilder EF, Haddad PR. Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. *Anal Chim Acta* 2009;652:22–31. doi:10.1016/j.aca.2009.05.043.
- [11] Svec F. Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography. *J Sep Sci* 2005;28:729–45. doi:10.1002/jssc.200400086.
- [12] El-Debs R, Dugas V, Demesmay C. Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques. *J Sep Sci* 2013;36:993–1001. doi:10.1002/jssc.201200878.
- [13] Namera A, Nakamoto A, Saito T, Miyazaki S. Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications. *J Sep Sci* 2011;34:901–24. doi:10.1002/jssc.201000795.
- [14] Nema T, Chan ECY, Ho PC. Applications of monolithic materials for sample preparation. *J Pharm Biomed Anal* n.d. doi:10.1016/j.jpba.2013.05.036.

- [15] Ishida A, Yoshikawa T, Natsume M, Kamidate T. Reversed-phase liquid chromatography on a microchip with sample injector and monolithic silica column. *J Chromatogr A* 2006;1132:90–8. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.025.
- [16] Giordano BC, Terray A, Collins GE. Microchip-based CEC of nitroaromatic and nitramine explosives using silica-based sol–gel stationary phases from methyl- and ethyl-trimethoxysilane precursors. *Electrophoresis* 2006;27:4295–302. doi:10.1002/elps.200600254.
- [17] Vazquez M, Paull B. Review on recent and advanced applications of monoliths and related porous polymer gels in micro-fluidic devices. *Anal Chim Acta* 2010;668:100–13. doi:10.1016/j.aca.2010.04.033.
- [18] Ro KW, Nayak R, Knapp DR. Monolithic media in microfluidic devices for proteomics. *Electrophoresis* 2006;27:3547–58. doi:10.1002/elps.200600058.
- [19] Bhattacharyya A, Klapperich CM. Thermoplastic microfluidic device for on-chip purification of nucleic acids for disposable diagnostics. *Anal Chem* 2006;78:788–92. doi:10.1021/ac051449j.
- [20] Yang W, Sun X, Pan T, Woolley AT. Affinity monolith preconcentrators for polymer microchip capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2008;29:3429–35. doi:10.1002/elps.200700704.
- [21] Koster S, Verpoorte E. A decade of microfluidic analysis coupled with electrospray mass spectrometry: An overview. *Lab Chip* 2007;7:1394–412. doi:10.1039/B709706A.
- [22] Rohr T, Yu C, Davey MH, Svec F, Fréchet JMJ. Porous polymer monoliths: Simple and efficient mixers prepared by direct polymerization in the channels of microfluidic chips. *Electrophoresis* 2001;22:3959–67. doi:10.1002/1522-2683(200110)22:18<3959::AID-ELPS3959>3.0.CO;2-5.
- [23] Krenkova J, Svec F. Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology. *J Sep Sci* 2009;32:706–18. doi:10.1002/jssc.200800641.
- [24] Pumera M. Microchip-based electrochromatography: designs and applications. *Talanta* 2005;66:1048–62. doi:10.1016/j.talanta.2005.01.006.
- [25] Breadmore MC, Thabano JRE, Dawod M, Kazarian AA, Quirino JP, Guijt RM. Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2006–2008). *Electrophoresis* 2009;30:230–48. doi:10.1002/elps.200800435.
- [26] Potter OG, Hilder EF. Porous polymer monoliths for extraction: Diverse applications and platforms. *J Sep Sci* 2008;31:1881–906. doi:10.1002/jssc.200800116.
- [27] Hisamoto H, Funano S, Terabe S. Integration of Valving and Sensing on a Capillary-Assembled Microchip. *Anal Chem* 2005;77:2266–71. doi:10.1021/ac0484528.

- [28] Bedair MF, Oleschuk RD. Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:1130–8. doi:10.1021/ac0514570.
- [29] Kang Q-S, Li Y, Xu J-Q, Su L-J, Li Y-T, Huang W-H. Polymer monolith-integrated multilayer poly(dimethylsiloxane) microchip for online microextraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2010;31:3028–34. doi:10.1002/elps.201000210.
- [30] Faure K, Bias M, Yassine O, Delaunay N, Cretier G, Albert M, et al. Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases. *Electrophoresis* 2007;28:1668–73. doi:10.1002/elps.200600566.
- [31] Burke JM, Smela E. A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane). *Biomicrofluidics* 2012;6:16506–1650610. doi:10.1063/1.3693589.
- [32] Kang Q-S, Shen X-F, Hu N-N, Hu M-J, Liao H, Wang H-Z, et al. A 3D porous polymer monolith-based platform integrated in poly(dimethylsiloxane) microchips for immunoassay. *Analyst* 2013;138:2613–9. doi:10.1039/c3an36744d.
- [33] Zeng H-L, Li H-F, Wang X, Lin J-M. Development of a gel monolithic column polydimethylsiloxane microfluidic device for rapid electrophoresis separation. *Talanta* 2006;69:226–31. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.030.
- [34] Xu Y, Zhang W, Zeng P, Cao Q. A Butyl Methacrylate Monolithic Column Prepared In-Situ on a Microfluidic Chip and its Applications. *Sensors* 2009;9:3437–46. doi:10.3390/s90503437.
- [35] Hu S, Ren X, Bachman M, Sims CE, Li GP, Allbritton NL. Surface-Directed, Graft Polymerization within Microfluidic Channels. *Anal Chem* 2004;76:1865–70. doi:10.1021/ac049937z.
- [36] Green WA. *Industrial photoinitiators: a technical guide*. Boca Raton: CRC Press; 2010.
- [37] Bernabe-Zafon V, Beneito-Cambra M, Simo-Alfonso EF, Herrero-Martinez JM. Comparison on photo-initiators for the preparation of methacrylate monolithic columns for capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 2010;1217:3231–7. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.075.
- [38] Ladner Y, Bruchet A, Cretier G, Dugas V, Randon J, Faure K. New “one-step” method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels. *Lab Chip* 2012;12:1680–5. doi:10.1039/c2lc21211k.
- [39] Dong J, Zhou H, Wu R, Ye M, Zou H. Specific capture of phosphopeptides by Zr⁴⁺-modified monolithic capillary column. *J Sep Sci* 2007;30:2917–23. doi:10.1002/jssc.200700350.
- [40] Fouassier J-P, Rabek JF. *Radiation Curing in Polymer Science and Technology: Fundamentals and Methods*. Springer; 1993.

- [41] Ledwith A. Photoinitiation of polymerisation. *Pure Appl Chem* 1977;49. doi:10.1351/pac197749040431.
- [42] 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;1119:80–7. doi:10.1016/j.chroma.2006.02.057.
- [43] Allen NS, Catalina F, Green PN, Green WA. Photochemistry of carbonyl photoinitiators. Photopolymerisation, flash photolysis and spectroscopic study. *Eur Polym J* 1986;22:49–56. doi:10.1016/0014-3057(86)90212-0.
- [44] Courtois J, Szumski M, Georgsson F, Irgum K. Assessing the Macroporous Structure of Monolithic Columns by Transmission Electron Microscopy. *Anal Chem* 2007;79:335–44. doi:10.1021/ac0614902.
- [45] Müllner T, Zankel A, Mayrhofer C, Reingruber H, Höltzel A, Lv Y, et al. Reconstruction and Characterization of a Polymer-Based Monolithic Stationary phase using Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy. *Langmuir* 2012;28:16733–7. doi:10.1021/la3038395.
- [46] Wang H, Duan J, Xu H, Zhao L, Liang Y, Shan Y, et al. Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides. *J Sep Sci* 2011;34:2113–21. doi:10.1002/jssc.201100168.
- [47] Yu C, Svec F, Fréchet JMJ. Towards stationary phases for chromatography on a microchip: Molded porous polymer monoliths prepared in capillaries by photoinitiated in situ polymerization as separation media for electrochromatography. *Electrophoresis* 2000;21:120–7. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<120::AID-ELPS120>3.0.CO;2-H.
- [48] Ladner Y, Crétier G, Faure K. Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips: A step towards field portable analysis. *J Chromatogr A* 2010;1217:8001–8. doi:10.1016/j.chroma.2010.07.076.
- [49] Yu C, Xu M, Svec F, Fréchet JMJ. Preparation of monolithic polymers with controlled porous properties for microfluidic chip applications using photoinitiated free-radical polymerization. *J Polym Sci Part Polym Chem* 2002;40:755–69. doi:10.1002/pola.10155.
- [50] Wang F, Dong J, Jiang X, Ye M, Zou H. Capillary Trap Column with Strong Cation-Exchange Monolith for Automated Shotgun Proteome Analysis. *Anal Chem* 2007;79:6599–606. doi:10.1021/ac070736f.
- [51] Ayed I. Développement d'une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce. Paris 11; 2012.

1.4 Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons développé 2 approches innovantes qui ont permis de synthétiser pour la première fois le monolithe poly (EGMP-co-BAA) par voie photochimique dans des microsystèmes en verre et en PDMS.

Dans la première approche, nous avons montré que la photopolymérisation à l'aide d'un microscope à épifluorescence est une méthode, alternative aux méthodes traditionnelles (utilisant un four UV et des photomasques) ou plus élégante (utilisant des lasers ou des DELs), qui permet de contrôler (i) la localisation des monolithes dans des microcanaux en verre, (ii) leur dimension et (iii) leur homogénéité sur toute la longueur de la section monolithique avec notamment des extrémités clairement définies/limitées. Nous avons mis en évidence l'importance de la préparation du mélange de polymérisation, en particulier au niveau de l'étape de dégazage (par ultrasons et/ou purge à l'azote) pour éliminer l'oxygène (connu comme inhibiteur de la polymérisation radicalaire) dissous dans le mélange réactionnel qui est l'étape clé de la synthèse d'un monolithe organique dans des microcanaux. Finalement, un dégazage inefficace (trop d'oxygène reste dans le mélange réactionnel) inhibe la polymérisation et génère l'inhomogénéité du monolithe à ses extrémités. Cependant, l'absence totale d'oxygène, résultant d'un dégazage excessif, facilite la diffusion des radicaux libres qui conduit à la formation de chaînes polymériques en dehors de la zone d'irradiation, provoquant alors le même phénomène d'inhomogénéité. La quantité d'oxygène difficile à contrôler, l'ajout d'une quantité d'hydroquinone (inhibiteur de la polymérisation), maîtrisée mais faible par rapport à la quantité de l'initiateur, dans le mélange de polymérisation a permis de neutraliser cette diffusion et de favoriser ainsi la formation de monolithes avec des extrémités bien définies. Cette technique a l'avantage de permettre l'ajustement de la longueur du monolithe formé par un simple changement de l'objectif utilisé. Les conditions optimisées ont permis d'obtenir des monolithes de 160 μm et 400 μm de longueur en utilisant les grossissements de 63x et 40x, respectivement avec une bonne répétabilité intra puce ($\text{CV} < 5\%$) et inter-puces ($\text{CV} < 7.5\%$). Enfin, les résultats ont montré non seulement l'ancrage du monolithe sur les parois de la puce en verre et son homogénéité mais également sa stabilité face à des pressions élevées appliquées lors des étapes de chargement d'échantillon, de rinçage et d'élution. Ceci a permis de mettre en évidence sa capacité à capturer un peptide modèle

selon un mécanisme d'échange de cations en accord avec sa nature anionique (présence de groupements phosphates).

La deuxième approche que nous avons développée a permis de relever un défi majeur dans le domaine de la synthèse de monolithes organiques par polymérisation radicalaire dans des microsystèmes en PDMS. Sa perméabilité importante à l'oxygène et sa forte hydrophobie sont deux propriétés (assimilés plutôt à des inconvénients) du PDMS que l'on devait absolument contrecarrer pour synthétiser avec succès un monolithe polymérique tel que le poly (EGMP-co-BAA). Nous avons ainsi développé une stratégie basée sur l'exploitation des propriétés photochimiques des amorceurs possédant des mécanismes d'action différents et jamais utilisés pour la synthèse de monolithe. Nous avons montré l'impact important de la nature et de la concentration de l'amorceur sur le déclenchement de la polymérisation elle-même mais également sur sa cinétique ainsi que sur la morphologie du monolithe formé. Nous avons démontré que l'IRG qui possède les plus élevés coefficient d'extinction molaire et rendement quantique permettait d'initier rapidement la photopolymérisation avant que les réactifs du mélange réactionnel ne soient absorbés par le PDMS. De plus, sa capacité à abstraire l'hydrogène a été un élément majeur pour l'ancrage du monolithe sur les parois du canal en PDMS. Cette méthode que nous avons développée a permis pour la première fois de synthétiser et ancrer le monolithe poly(EGMP-co-BAA) dans les canaux en PDMS en une seule étape et sans aucun traitement de surface du PDMS au préalable.

Les deux stratégies de synthèse du monolithe poly(EGMP-co-BAA) dans des microsystèmes présentées dans ce chapitre sont faciles à mettre en œuvre, efficaces et présentent un grand potentiel à venir pour le développement de microsystèmes intégrant des supports solides monolithiques qui pourront être utilisés pour des préconcentrations/extractions ou séparations de biomolécules.

Pour la suite des travaux, nous nous sommes tout d'abord concentrés sur le développement d'une méthode de séparation électrocinétique de phosphopeptides sur puce en verre qui fait l'objet du chapitre suivant. Dans un deuxième temps, le couplage en ligne de cette méthode de séparation optimisée avec le module de préconcentration de phosphopeptides réalisée sur phase monolithique basée sur la technique IMAC pour la conception d'un laboratoire sur puce sera présenté dans le chapitre 3.

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE SEPARATION DE PHOSHOPEPTIDES PAR ELECTROPHORESE SUR PUCE EN VERRE

2.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, ont été présentés la synthèse et la caractérisation du monolithe à base d'EGMP et de BAA dans des microsystèmes en verre et en PDMS dans le but de développer un module de préconcentration de phosphopeptides. Dans ce chapitre, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation d'une méthode de séparation électrophorétique de phosphopeptides dans des microsystèmes en verre. Le but ultime du projet de thèse est de réaliser un couplage en ligne entre ces deux modules de préconcentration et de séparation (présenté dans le chapitre suivant), ce qui permettra l'obtention d'un microsystème d'analyse totale de phosphopeptides.

Après quelques notions générales sur les microsystèmes séparatifs, le développement d'une méthode de séparation électrophorétique couplée à une détection fluorescence sur puce en verre est présenté. Les paramètres électriques d'injection et de séparation ainsi que l'électrolyte de séparation ont été optimisés pour l'analyse d'un mélange de peptides phosphorylés et nonphosphorylés fluorescents modèles. La performance de cette méthode a été évaluée en termes de répétabilité, linéarité et limite de détection.

2.2 Quelques notions générales sur les microsystemes séparatifs

Un microsysteme séparatif est une structure de quelques centimètres carrés comportant des canaux dont les dimensions sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, au sein desquels des séparations chromatographiques ou électrophorétiques (majoritairement) incluant les étapes d'injection, de séparation et de détection sont mises en œuvre [6].

Les tous premiers microsystemes séparatifs étaient fabriqués en silicium [6,7] qui a cependant été très rapidement remplacé par le verre. En effet, étant un matériau semi-conducteur et présentant des propriétés d'absorption dans les domaines de l'UV et du visible, le silicium ne peut être utilisé sous champs électriques élevés appliqués lors de séparations électrocinétiques, et n'est pas compatible avec les systèmes de détection optique. Les supports en verre (quartz, silice fondue, verre de borosilicate...) sont des matériaux particulièrement intéressants pour la conception de microsystemes séparatifs de par leur résistance chimique mais également leur transparence qui autorise un mode de détection optique et facilite leur intégration dans les systèmes miniaturisés. De plus, la présence de groupements silanols ionisables à leur surface permettent de générer un flux électroosmotique utile pour les séparations électrocinétiques[8] et les rend facilement fonctionnalisables notamment pour mettre en place des revêtements de surface afin de limiter l'adsorption des analytes/protéines [9]. Bien que la technologie du verre soit bien maîtrisée, elle est très spécifique et nécessite des équipements particuliers qui rendent sa fabrication coûteuse. Quelques sociétés commercialisent des microsystemes en verre mais à un prix unitaire de l'ordre de 200€ pour certaines et pour la plus récente, la technologie est encore à améliorer (Micralyne, Micronit, Kleria). Ainsi, les polymères (PMMA, PDMS, COC, thiolène, tétrafluoroéthylène hexafluoropropylène fluorure de vinylidène (THV)...) sont aujourd'hui des matériaux de choix pour la conception de microsystemes pour leur résistance chimique, leur transparence aux UV, la simplicité de leur processus de fabrication simple et moins onéreux, permettant d'envisager des microsystemes « faits maison » mais également à usage unique. Des informations complémentaires sur les techniques de microfabrication et les types de géométries des canaux sont disponibles dans la littérature [8,10–12].

Nous présentons à la Fig. 16 un exemple de microsysteme de géométrie simple dont celui doté d'une croix (utilisé lors de nos études) qui est composé de deux microcanaux perpendiculaires formant une intersection et 4 réservoirs (un réservoir (S) contenant

l'échantillon, un réservoir (SW) poubelle de l'échantillon, un réservoir contenant l'électrolyte de séparation (B) et un réservoir poubelle de l'électrolyte (BW). La géométrie des canaux peut varier selon la nature des matériaux utilisés, la technologie de microfabrication [8] ou le domaine d'application.

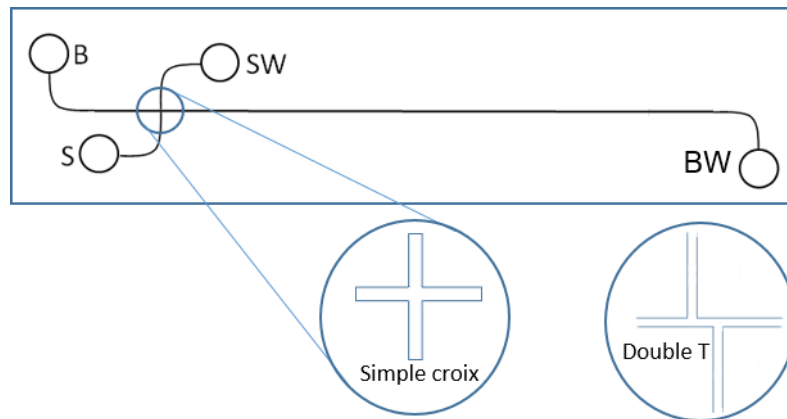


Figure 16. Représentation schématique d'un microsystème en simple croix (ou double-T) comportant deux microcanaux perpendiculaires et 4 réservoirs identifiés par les lettres S (échantillon), SW (poubelle de l'échantillon), B (électrolyte) et BW (poubelle de l'électrolyte) [8].

L'étape d'injection dans les microsystèmes est une étape cruciale pour l'obtention de séparations sensibles et efficaces. Bien que le mode d'injection hydrodynamique peut être employé, il reste plus difficile à mettre en œuvre car l'utilisation de valves et de pompes nécessite souvent l'emploi d'appareillage supplémentaire. Le mode d'injection électrocinétique est généralement utilisé en raison de sa facilité de mise en œuvre requérant un simple générateur de tension. Le plus petit canal sert au chargement de l'échantillon et le plus long à la séparation des analytes. La zone d'intersection des deux canaux forme la 'chambre d'injection'. Les chambres d'injection en forme de croix ou de double-T sont les plus connues, le double-T permettant un volume d'injection plus important [13,14]. Les deux modes d'injection électrocinétique les plus couramment utilisés en microsystème sont le mode 'pincé' (pinched) et le mode dit 'par portée' (gated), tous deux développés par l'équipe de Ramsey [15–17] et modélisés par Blas et al. [6,8]. Seule l'injection en mode 'pincé', utilisée lors du développement du module de séparation électrocinétique de phosphopeptides décrit dans ce chapitre, est détaillée ici. Ce mode 'pincé' comprend deux

phases (Fig.17). Dans une première phase (Fig. 17A), l'échantillon est introduit dans le petit canal par l'application d'une différence de potentiel entre le réservoir (S) et le réservoir (SW), remplissant ainsi la chambre d'injection. Simultanément, deux potentiels sont appliqués aux deux réservoirs (B et BW) afin de 'confiner' autrement dit 'pincer' l'échantillon et éviter ainsi sa diffusion dans le canal de séparation [8,18]. L'optimisation des potentiels appliqués aux 4 réservoirs est cruciale pour que ce pincement soit efficace. Dans une deuxième phase (Fig. 17C), une différence de potentiel est appliquée entre les réservoirs B et BW pour envoyer le volume d'échantillon présent dans la chambre d'injection vers le plus long canal tandis que l'échantillon restant dans les branches du canal court migre vers les réservoirs (S) et (SW). Puis, les composés sont séparés et détectés à une distance choisie.

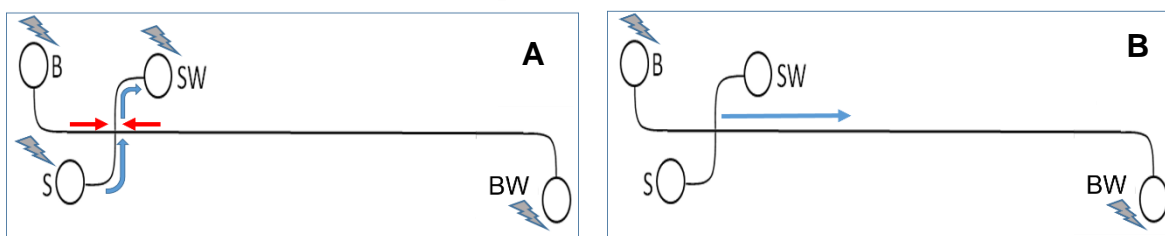


Figure 17. Représentation schématique d'un mode d'injection électrocinétique en mode 'pincé'. Phase A : pincement, Phase B : Séparation (S: échantillon, SW : poubelle de l'échantillon ; B : électrolyte de séparation, BW (poubelle de l'électrolyte) [6].

Étant donné les faibles volumes d'échantillon injectés en microsystème, un mode de détection très sensible est donc essentiel pour atteindre les limites de quantification imposées par la miniaturisation. Les modes de détection mis en oeuvre en microsystème ont été décrits dans certaines revues [19,20]. La détection UV est envisageable en microsystème mais son utilisation reste limitée en raison du chemin optique qui correspond à peu près au diamètre du canal selon la loi de Beer-Lambert D'autres types de détection sont possibles, telles que la détection par fluorescence, majoritairement utilisée du fait de sa grande sensibilité. La fluorescence peut être induite par laser (LIF) mais également par des lampes à mercure (ou à xénon) qui, combinées à des filtres, permettent de travailler dans la zone des longueurs d'ondes d'intérêt. La détection électrochimique par conductimétrie, potentiométrie ou encore ampérométrie est également très sensible mais très difficilement intégrable en microsystème [21]. Enfin, la spectrométrie de masse (SM) est un outil indispensable pour la détection en microsystème étant donné son universalité et

sa spécificité [20]. Elle est particulièrement intéressante pour l'analyse de molécules biologiques telles que les peptides ou les protéines [3,22,23]. Cependant, à ce jour, le couplage microsystème/SM (ESI ou MALDI) présente des difficultés de mise en œuvre au niveau de l'interface entre la source d'ionisation et le microsystème. En résumé, les trois étapes de l'analyse (injection, séparation et détection) sont illustrées par la Fig.18.

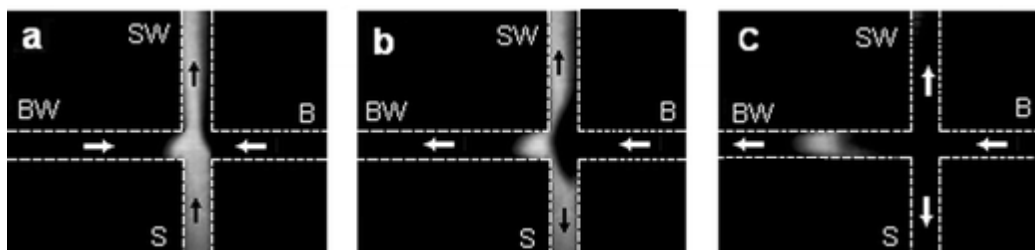


Figure 18. Images obtenues par microscopie par fluorescence représentant une vue de la simple croix d'un microsystème en verre lors des étapes de (a) remplissage du petit canal d'injection, (b) d'injection de l'échantillon contenu dans la chambre d'injection et (c) de séparation et de détection d'un échantillon contenant des composés fluorescents [24].

De nombreuses revues présentent les développements pour l'analyse de biomolécules en microsystèmes analytiques reposant sur des séparations électrophorétiques ou chromatographiques [9][25].

2.3. Matériels et Instrumentation

2.3.1 Matériels

Réactifs : Les différents réactifs tels que le γ -methacryloxypropyltriméthoxysilane (γ -MAPS), la solution d'hydroxyde d'ammonium (28%), l'acide formique (>95%), l'acide borique ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Etats-Unis) ainsi que les solutions d'hydroxyde de sodium 1M, d'acide chlorhydrique 1M, d'acétone, d'acétonitrile ont été obtenus chez VWR International (Paris, France). Toutes les solutions et tampons ont été préparés dans l'eau ultrapure (Milli-Q® de résistivité $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) (Direct-Q3, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne).

Peptides. Des peptides modèles fluorescents marqués par le fluorophore Hylite-488 ont été obtenus chez Tebu-bio S.A.S (Le Perray en Yvelines, France). Tous les peptides ont la

même séquence en acides aminés mais ils possèdent différents sites et degrés de phosphorylation (Table 2). Après leur réception, tous les peptides ont été solubilisés dans l'eau et à une concentration de 1 mg/mL. Les solutions ont été ensuite aliquotées (20µL) et stockées à -20°C. Lors de leur utilisation, une solution mère de chaque 4 peptide est préparée à 20 µg/mL dans dans le tampon de chargement. Ensuite, elles sont diluées dans l'électrolyte pour atteindre la concentration désirée.

Tableau 2. Caractéristiques des peptides modèles utilisés pour le développement de la méthode de séparation.

Séquence peptidique	Point Isoélectrique (pI)	Masse Moléculaire (Da)
DHTGFLTEYVATR (NP)	5.3	1866.2
DHTGFLpTEYVATR (pT)	4.3	1945.8
DHTGFLTEpYVATR (pY)	4.3	1945.8
DHTGFLpTEpYVATR (pTpY)	3.7	2026.2

p : groupement phosphate ; NP : peptide non phosphorylé.

Solutions. Un tampon borate de force ionique 100 mM et pH 9.3 a été préparé en mélangeant 18.5 mL d'une solution d'acide borique 500 mM, 5 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium 1M et 26.5 mL d'eau Milli Q. Ce tampon a été ensuite dilué 4 fois pour préparer l'électrolyte. Le tampon de chargement est composé d'acétonitrile à 50% (v/v) et d'acide formique à 3%. L'électrolyte est composé de 2.8% d'hydroxyde d'ammonium et de 25mM de tampon borate. Le pH de cette solution était de 11.5. Le pH du tampon a été contrôlé à l'aide d'un pHmètre (VWR International, Paris, France).

Microsystèmes. Les microsystèmes en verre utilisés sont commercialisés par Micralyne Inc. [23](Edmonton, Canada). Ils possèdent deux canaux perpendiculaires leur conférant une géométrie en croix et quatre réservoirs tel qu'illustré à la Fig 16. Les longueurs des branches entre la croix et les différents réservoirs sont les suivantes : les branches S et SW mesurent 4.82 mm tandis que la branche B mesure 9.39 mm et la longueur de la branche de séparation BW est de 80.89 mm. Les canaux ont une largeur de 50 µm et une profondeur de 20 µm. Les réservoirs PEEK Nanoport (modèle 10-32 coned), les anneaux adhésifs et les joints ont été obtenus chez Upchurch (Oak Harbor, WA, Etats-Unis). Les réservoirs ont

d'abord été collés à la puce en utilisant les anneaux adhésifs et ensuite durcis thermiquement à 190°C pendant 1 heure dans un four selon les instructions du fabricant. Ensuite, de la colle époxy (Loctite EA 3430, Henkel, Düsseldorf, Allemagne) a été ajoutée à la base de chaque réservoir pour assurer une bonne étanchéité.

2.3.2 Instrumentation

La séparation des phosphopeptides par électrophorèse en microsysteme a été effectuée sur un poste à puce. Le montage utilisé est composé d'un microscope inversé à épifluorescence (modèle ZEISS AXIO Observer.A1, Le Pecq, France) équipé d'une lampe à vapeur de mercure (HXP 120 C, Carl Zeiss AG, Le Pecq, France) et muni d'une caméra CCD Hamamatsu (modèle Orca-03G02 Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japon). La détection par fluorescence a été réalisée à l'aide d'un filtre Plan-Neofluar 20x/ouverture numérique 0.5 (excitation (λ_{exc} = 475-495 nm) et émission (λ_{emi} = 505-555 nm)). Un générateur de haute tension (modèle HVS 448 600 D, Labsmith, CA, Etats-Unis) a été utilisé pour l'application des potentiels nécessaires aux étapes d'injection et de séparation. Ce générateur est relié à 8 électrodes permettant de travailler entre -3000 V et 3000 V. Le logiciel HCImage (Hamamatsu, Japon) a été utilisé pour régler les images et l'intensité lumineuse et enregistrer la fluorescence de la zone de détection lors de l'analyse. Le logiciel Azur d'acquisition et de traitement de résultats (Datalys, St Martin D'Herès, France) a été utilisé pour convertir les données fournies par la caméra CCD (niveaux de gris en fonction du temps) en électrophérogrammes. Une station de travail (Hewlett Packard Z 800) permet de contrôler le générateur de tension et le traitement des données avec Azur.

Les microsystemes sont rincés à l'aide d'une pompe à membrane (-30 mbar) ou d'un système NanoBaume (Western Fluids Engineering, Wildomar, CA, Etats-Unis) sous pression d'azote à 2 bars et selon les besoins. Un capillaire en silice fondue de 75 μ m de diamètre et environ 35 cm de long (Composite Metal Service, Royaume-Uni) a été utilisé pour relier la puce au NanoBaume à l'aide des connecteurs appropriés (Upchurch, WA, Etats-Unis).

2.4. Méthodes

2.4.1 Traitement de surface des canaux en verre

Ce prétraitement a été réalisé avant d'effectuer les séparations électrocinétiques en suivant le protocole décrit par [23]. Tout d'abord, le microcanal de la puce en verre est rempli avec une solution de 1M NaOH à l'aide d'une pompe à membrane et laissé à température ambiante pendant 30 minutes pour l'activation de la paroi du canal. Le microcanal est ensuite rincé avec de l'eau pendant 15 min à l'aide de la pompe à membrane. La même procédure est répétée avec une solution de 0.1 M HCL. Le microcanal est ensuite séché dans une étuve à 120°C pendant 1h sous flux d'azote puis rempli avec une solution de 50 % (v/v) de γ -MAPS dissous dans l'acétone. Les réservoirs sont bouchés par des embouts en caoutchouc et la puce est conservée à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant toute une nuit. Enfin, un rinçage avec de l'acétone est réalisé durant 15 min puis suivi d'un séchage sous flux d'azote pendant 1 heure.

2.4.2 Séparation des phosphopeptides par électrophorèse sur puce

Les séparations par électrophorèse des peptides phosphorylés et non phosphorylés tels que présentés dans le Tableau 1 ont été réalisées sur des puces en verre dotées d'une géométrie en croix en utilisant une injection en mode pincé. Les potentiels électriques appliqués lors de l'injection et de la séparation sont décrits dans le Tableau 3. La détection est effectuée par fluorescence. Une échelle gravée parallèlement au canal de séparation permet d'établir un point de détection à une distance fixe et connue. Les mêmes paramètres de caméra ont été conservés d'une analyse à l'autre afin faciliter la comparaison entre les électrophérogrammes.

Tableau 3. Potentiels électriques appliqués lors de la séparation de phosphopeptides par électrophorèse sur puce.

Réservoirs	Injection (V)	Séparation (V)
S	0	-250
SW	-300	-250
B	20	100
BW	500	-2000

2.5 Résultats et Discussions

2.5.1 Optimisation des conditions d'analyse

La première étape du développement de la méthode de séparation de phosphopeptides a consisté à optimiser les potentiels électriques d'injection en mode « pincé » et de séparation. Nous avons retenu ce mode d'injection généralement utilisé en puce en croix et qui présente une bonne reproductibilité du volume d'échantillon injecté. Les potentiels appliqués lors de l'injection en mode pincé ont été choisis après des réglages successifs pour éviter la diffusion de l'échantillon au niveau de la chambre d'injection vers le canal de séparation. Lors de l'étape de séparation, les potentiels ont été ajustés de manière à injecter un volume d'échantillon bien défini dans le canal de séparation et éviter une injection continue de l'échantillon, ce qui entraînerait des élargissements de pics et une mauvaise séparation. Dans le cas d'une puce en verre, la possibilité d'appliquer un potentiel élevé permet une analyse rapide (ce n'est pas le cas des puces en plastique qui résistent moins bien aux fortes tensions). Nous avons obtenu les conditions pour une injection optimale comme le montre la Fig.19

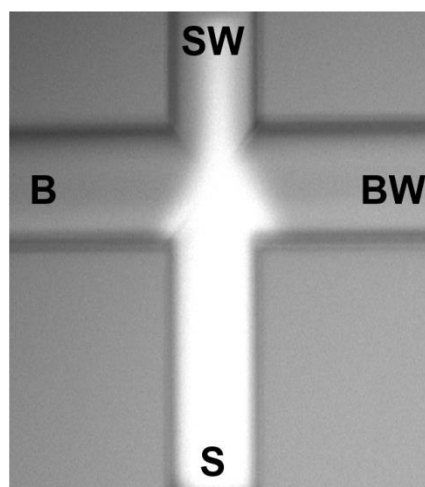


Figure 19. Image obtenue par microscopie par fluorescence représentant une vue de la simple croix d'une puce en verre lors de l'étape de d'injection en mode pincé d'un mélange de 4 phosphopeptides fluorescents.

Lors de la deuxième étape d'optimisation, nous avons étudié l'influence du tampon de séparation sur la résolution. Cependant, cette optimisation n'est pas exhaustive et ne repose pas sur la variation de la nature, du pH et de la force ionique de l'électrolyte comme

habituellement réalisée. Nous sommes limités par le tampon d'éluion de l'étape de préconcentration des phosphopeptides par IMAC. En effet, dans la conception d'un laboratoire sur puce intégrant une étape de préconcentration en amont d'une étape de séparation, le tampon d'éluion idéal doit permettre non seulement une éluion efficace mais également une séparation des phosphopeptides avec une bonne résolution. Dans cette optique, nous avons réalisé une synthèse et analyse des principaux protocoles décrits dans la littérature et avons retenu deux éléments importants. Une solution d'hydroxyde d'ammonium à pH compris entre 9 et 12 a souvent été démontré comme un éluant efficace des phosphopeptides retenus (capturés) sur une matrice IMAC ou MOAC [2,23,26–28]. Un tampon borate à pH compris entre 8 et 9 a été utilisé pour la séparation de substrats peptidiques d'enzymes kinases, notamment de la protéine ERK2, et de phosphopeptides par électrophorèse capillaire de zone [29,30]. Cependant, la solution d'hydroxyde d'ammonium est volatile, il n'est donc pas envisageable de réaliser une séparation électrocinétique en microsystème avec une telle solution à cause des phénomènes d'échauffement. Pour éviter ces inconvénients mais tout en gardant à l'esprit ses propriétés éluantes, nous avons préparé un électrolyte composé de 2.8% d'hydroxyde d'ammonium et de 25mM de tampon borate, (pH 11.5). Le point de détection a été fixé à 3 cm de la croix en imposant les potentiels électriques décrits dans le Tableau 3. Nous avons évalué la performance de ce tampon pour la séparation d'un mélange de 4 peptides modèles dont les caractéristiques sont données dans le Tableau 2. L'électrophérogramme obtenu est présenté à la Fig. 20A. Les séparations sont réalisées en moins de 2 min. Chaque peptide a été injecté séparément pour leur identification. Dans les conditions alcalines utilisées, le flux électroosmotique est cathodique et tous les peptides sont chargés négativement. Le peptide diphosphorylé pTpY qui est le plus chargé négativement migre en dernier tandis que le peptide non phosphorylé NP qui est le moins chargé négativement migre en premier. Les peptides monophosphorylés ont des mobilités électrophorétiques intermédiaires.

La séparation des quatre peptides est satisfaisante bien que les deux peptides monophosphorylés pT et pY qui ne diffèrent que par leur site de phosphorylation ne sont pas suffisamment résolus (Fig.20A). Afin d'améliorer l'efficacité de la méthode, nous avons augmenté la longueur effective de la séparation en positionnant la détection à 4 cm de la croix ce qui a permis d'améliorer significativement la résolution (Fig.20B) entre les deux pics pT et pY ($R= 3.08$) ainsi qu'une bonne efficacité (275000 et 625000 pL/m) a été obtenue. La méthode développée est hautement performante puisqu'elle permet de séparer

aussi bien les peptides non phosphorylés des phosphopeptides ne différant uniquement par leur de site et degré de phosphorylation.

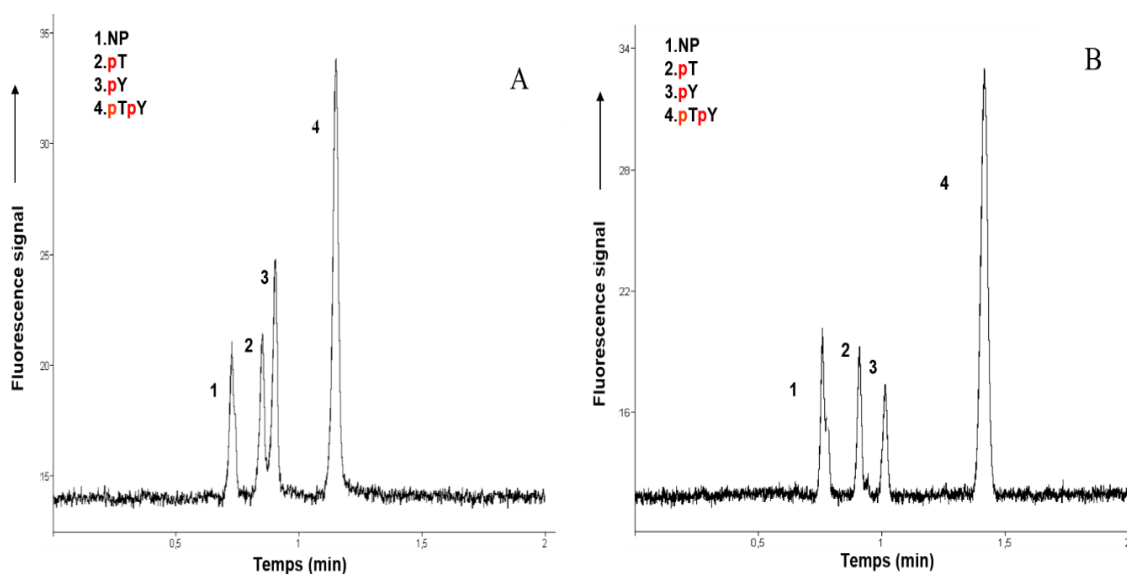


Figure 20. Electrophérogrammes obtenus pour injection en mode pincé d'un mélange de 4 peptides fluorescents modèles à A) 3 cm et B) 4 cm de la croix sur puce en verre. Détection par fluorescence ($\lambda = 475-495$ nm). Electrolyte de séparation (pH 11.5) : 2.8% d'hydroxyde d'ammonium et 25mM de tampon borate.

La méthode a ensuite été évaluée en termes de répétabilité, de linéarité et des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ). Ces études ont été réalisées simultanément en analysant une solution de 4 peptides à six concentrations comprises dans la gamme de 0.08 à 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Chaque analyse a été répétée trois fois. La gamme de concentrations est exprimée en concentration nanomolaire (nM) dans le Tableau 4.

Tableau 4. Concentrations de peptides utilisées pour l'évaluation de la méthode de séparation électrocinétique.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration (nM)			
	NP	pT	pY	pTpY
0.08	42,87	41,11	41,11	39,48
0.15	80,38	77,09	77,09	74,03
0.31	166,11	159,32	159,32	153,00
0.63	337,58	323,77	323,77	310,93
1.25	669,81	642,41	642,41	616,92
2.50	1339,62	1284,82	1284,82	1233,84

NP : peptide non phosphorylé, pT et pY : peptides monophosphorylés, pTpY : peptide diphosphorylé.

Les électrophérogrammes obtenus sont présentés à la Fig 21. Les résultats ont montré que la méthode développée est répétable en termes de temps de migration (CV <7%) (Tableau 5).

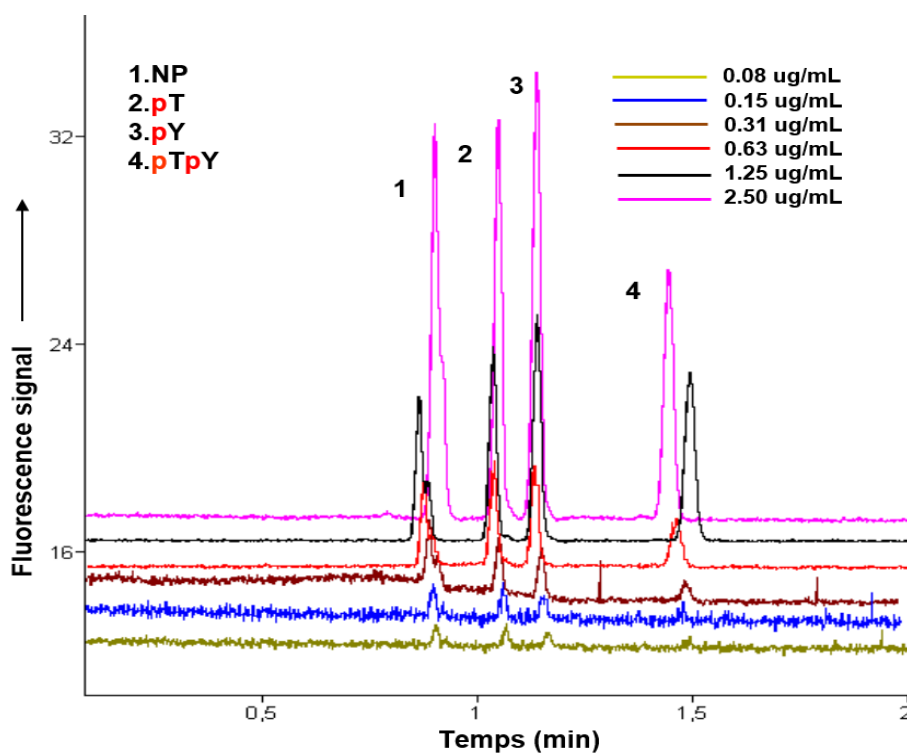


Figure 21. Electrophérogrammes obtenus pour injection en mode pincé d'un mélange de 4 peptides fluorescents modèles à différentes concentrations sur puce en verre. Détection par fluorescence ($\lambda = 475-495$ nm) à 4 cm de la croix. Electrolyte de séparation (pH 11.5) : 2.8% d'hydroxyde d'ammonium et 25mM de tampon borate.

La linéarité de détection a été ensuite obtenue mais dans une gamme de concentrations allant de 0.08 à 1.25 $\mu\text{g/mL}$ car après cette valeur la variation n'est plus linéaire. L'aire du pic a été reportée en fonction de la concentration du peptide (Fig.22). Une droite de régression caractérisée par un coefficient de détermination ($R^2 > 0.94$) a été établie prouvant la linéarité de la méthode sur la gamme de concentrations étudiées.

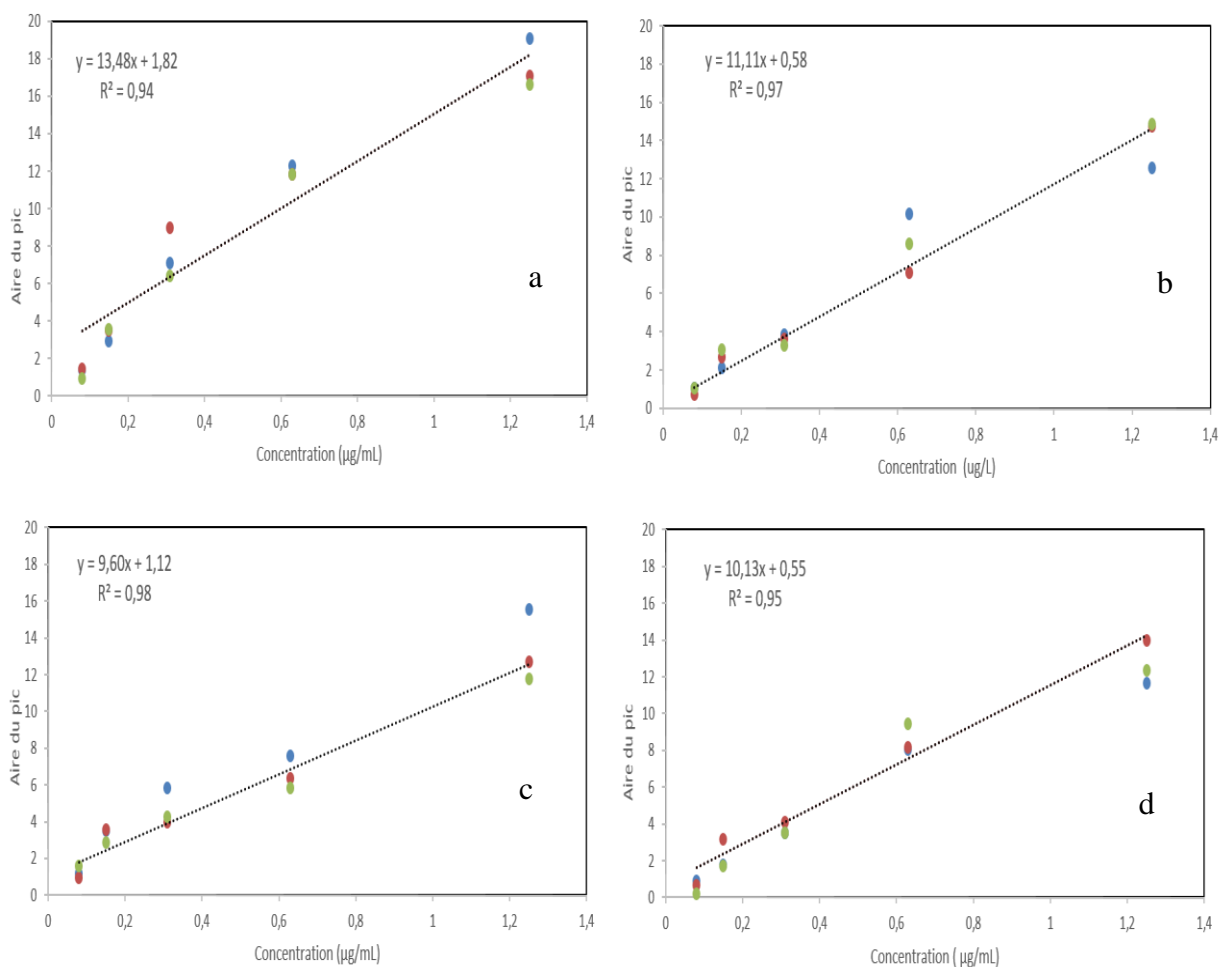


Figure 22. Evolution de l'aire du pic en fonction de la concentration du peptide. a) NP, b) pT, c) pY et d) pTpY.

Enfin, les résultats obtenus nous ont également permis de déterminer la limite de détection (LOD) avec un rapport signal/bruit (S/B) de 3 et la limite de quantification (LOQ) déterminée à partir de LOD ($LOQ = 3.3LOD$) (Tableau 5).

Tableau 5. Temps de migration et valeur de LOD et LOQ pour les peptides analysés

Peptides	Temps de migration		LOD (nM)	LOQ (nM)
	min	CV % (n=3)		
NP	0,89	6,47	42,87	141,46
pT	1,04	5,25	41,11	135,68
pY	1,13	4,91	41,11	135,68
pTpY	1,42	5,08	74,03	244,30

2.6 Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre ont permis de démontrer le grand potentiel de l'électrophorèse pour la séparation de mélange de peptides phosphorylés et non phosphorylés en microsysteme. Les résultats ont montré qu'une optimisation des potentiels appliqués et la longueur effective de la séparation ont un impact majeur sur la qualité de la séparation. La puissance de la technique a permis de séparer avec d'excellentes résolutions le peptide non phosphorylé des phosphopeptides mais le fait le plus marquant concerne la séparation des deux phosphopeptides qui ne diffèrent que par leur site de phosphorylation. Avec un électrolyte composé de 2.8% d'hydroxyde d'ammonium et de 25mM de tampon borate, (pH 11.5) avec une détection à 4 cm de la croix, nous avons obtenu des séparations rapides en moins de 2 minutes avec une efficacité satisfaisante (275000 à 625000 pL/m).

La performance de la méthode a été évaluée en termes de linéarité, répétabilité et limites de détection et de quantification. Nous avons obtenu une linéarité dans une gamme de concentrations allant de 0.08 à 1.25 µg/mL avec des coefficients de détermination satisfaisants ($R^2 > 0.94$). Les coefficients de variation (CV < 7%) obtenus pour le temps de migration des peptides confirment la répétabilité de la méthode. Les valeurs les plus faibles de LOD et LOQ ont été obtenues pour les phosphopeptides pT et pY (41.11 et 135.68 nM, respectivement).

Ainsi, nous avons couplé en ligne cette méthode avec le module de préconcentration monolithique basé sur l'IMAC pour l'analyse de phosphopeptides. Ces travaux sont présentés dans le chapitre qui suit.

DEVELOPPEMENT D'UN LABORATOIRE SUR PUCE EN VERRE : PRECONCENTRATION DE TYPE IMAC SUR SUPPORT MONOLITHIQUE ET SEPARATION ELECTROPHORETIQUE DE PHOSHOPEPTIDES

3.1 Introduction

La miniaturisation des systèmes séparatifs a été l'un des principaux développements en sciences analytiques ces dernières années [6]. Afin de répondre à cette demande croissante, les 'laboratoire sur puce' (Lab on a Chip) ou les systèmes intégrés pour l'analyse totale appelés 'MicroTAS' (Micro Total Analysis System) ont été développés. Ces systèmes présentent un intérêt particulier notamment dans le cadre d'analyse d'échantillons biologiques où les composés d'intérêt peuvent se trouver à l'état de traces. De nombreuses études menées sur les laboratoires sur puce sont dédiées à l'analyse de macromolécules biologiques tels que l'ADN, les protéines ou les peptides issus d'échantillon complexe.

Ce sont les microsystèmes séparatifs intégrant les étapes de séparation et de détection qui ont été les plus décrites dans la littérature, notamment les techniques de séparation électrophorétiques en raison de leur facilité de mise en œuvre en comparaison des techniques hydrodynamiques [12,19]. La fluorescence est le mode de détection le plus répandu en microsystème car facilement adaptable et compatible sur les microscopes et pourvu une grande sensibilité. Malgré leurs nombreux avantages, une des principales limitations des microsystèmes est le manque de sensibilité dû aux faibles volumes d'échantillon injectés. Cela peut être un facteur critique pour la détection des composés à l'état de traces. La préconcentration est donc une étape essentielle dans la conception d'un tel dispositif miniaturisé pour améliorer la sensibilité de l'analyse. Il existe plusieurs

techniques permettant de préconcentrer un échantillon en microsysteme en exploitant soit les phénomènes électrocinétiques soit des supports solides. Un module d'extraction/enrichissement sur support solide est généralement situé en amont du module de séparation tandis qu'une préconcentration électrocinétique est réalisée simultanément à l'étape analyse. Les dernières avancées relatives aux différents types de supports solides intégrables en microsysteme et utilisés pour la préconcentration de protéines et peptides ont été décrits dans la revue « *Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices : A review* » du chapitre 2 de la partie bibliographique. Malgré les avantages reconnus des billes, des membranes ou des nanostructures, notre interprétation bibliographique nous a davantage dirigés vers l'avenir prometteur des monolithes en raison de leurs propriétés intéressantes dont une surface spécifique élevée, une porosité contrôlée et une polymérisation *in situ* et localisables dans des microcanaux [31]. Ainsi, dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés au développement d'une méthode d'enrichissement sur support monolithique.

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle des protéines jouant un rôle critique dans plusieurs processus cellulaires et pathologiques. Certaines phosphoprotéines ont été identifiées comme biomarqueurs potentiels de maladies neurodégénératives et peuvent être la molécule d'intérêt dans le développement de nouveaux outils de diagnostic miniaturisés. Parmi les différentes techniques permettant d'enrichir les phosphopeptides décrites dans le chapitre 1 de la partie bibliographique, l'efficacité de la chromatographie d'affinité de type IMAC a été largement démontrée.

L'objectif ultime de ce projet de thèse est développé dans ce chapitre qui décrit le développement d'un dispositif miniaturisé pour l'analyse de phosphopeptides intégrant une étape de pré-concentration par IMAC sur support monolithique en amont d'une étape de séparation électrophorétique couplée à une détection par fluorescence. Cette section est rédigée sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis au journal '*Lab on a Chip*'. Le monolithe poly (EGMP-co-BAA) d'intérêt a été en partie optimisée au laboratoire lors de travaux précédents cette thèse [1]. Ce monolithe confiné dans un microsysteme a présenté néanmoins des propriétés adéquates en termes de surface spécifique et de porosité pour être utilisé comme support solide de préconcentration. Ainsi, au cours de cette thèse, nous avons cherché à améliorer la reproductibilité de la synthèse du monolithe dans des puces en verre puis optimisé les différentes étapes IMAC ainsi que la séparation par

électrophorèse sur puce d'un mélange de phosphopeptides (présenté au chapitre 2 de la partie expérimentale) pour aboutir à l'élaboration d'un microsystème d'analyse totale pour les phosphopeptides. Au cours de ce chapitre, nous présentons en premier lieu la synthèse localisée du monolithe poly (EGMP-co-BAA) par irradiation UV et au sein d'un microcanal en verre ainsi que sa caractérisation en termes de surface spécifique et de taille des pores. Ensuite, nous détaillons l'optimisation du module de préconcentration par IMAC réalisé à partir de l'immobilisation des ions Zr^{4+} sur les groupements phosphates présents sur la surface du monolithe via des liaisons de coordination. Puis, nous avons couplé en ligne ce module de préconcentration de phosphopeptides avec une étape de séparation électrophorétique avec une détection par fluorescence. Nous avons finalement démontré la performance de ce laboratoire sur puce en analysant un mélange de peptide non phosphorylé et phosphopeptides fluorescents modèles qui sont un fragment de protéine kinase ERK2 décrite comme biomarqueur potentiel de la maladie d'Alzheimer.

Lab-on-a-chip for polymer monolith-based preconcentration and separation of phosphopeptides

Monica Araya-Farias^a, Szymon Dziomba^{a,b}, Benjamin Carbonnier^b, Mohamed Guerrouache^b, Ichraf Ayed^a, Nacera Aboud^a, Myriam Taverna^a,
N. Thuy Tran^{a*}

^a*Institut Galien Paris Sud, UMR 8612, Protein and Nanotechnology in Analytical Science (PNAS), CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France*

^b*Univ. Paris-Est, ICMPE UMR7182 CNRS, UPEC, Thiais, 94320, France*

*Corresponding author : * thuy.tran-maignan@u-psud.fr*

Abstract

A monolith-integrated microdevice by combining online preconcentration and separation of phosphopeptides was developed. An ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP) and bisacrylamide (BAA)-based monolith was synthesized within glass microchannels through a photo-driven process. The obtained bed was used for preparation of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support after immobilization of Zr^{4+} ions on the phosphate groups containing monolith surface. The poly(EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} showed a great capacity to capture phosphopeptides. The performance of the IMAC monolith-integrated microdevice was demonstrated for the preconcentration and separation of a mixture of peptides differing by their phosphorylation degree and sites. The signal enhancement factors (SEF) between 340 to 910 were achieved within 7 min of preconcentration. The phosphorylated compounds were successfully preconcentrated and on line separated microchip electrophoresis. This integrated microdevice represents a novel approach for phosphoproteomic applications.

Keywords: polymer monolith, IMAC, glass microchip, phosphopeptides, μ TAS, integrated microdevice, microchip electrophoresis

1 Introduction

Protein phosphorylation is one important post-translational modification (PTM) in living cells controlled by a balanced activity of protein kinases (PK) and phosphatases (PP) [1–3]. The extracellular signal regulated kinases (ERK1 and ERK2) of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) family, play a fundamental role in regulating a variety of cell processes such as proliferation, differentiation and apoptosis [2,4]. Disregulation of MAPK signaling pathways has been commonly associated with neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [5] and several cancers [6] such as breast cancer [7], pancreatic cancer [8] or lung cancer [9]. Klafki's group reported an elevated ERKs level in CSF of AD patients compared to that of non demented controls. A small percentage of ERKs was found to be in the doubly phosphorylated (activated) state [10]. Abnormal hyperphosphorylation of Tau protein and pathological phosphorylation of Tau on some identified amino acids have also been observed in neurofibrillary tangles in AD patients. Quantification of total Tau and pTau-181 in human cerebrospinal fluid (CSF) by Elisa is one of the tests performed in AD diagnosis [11]. Moreover, some phosphoproteins have been identified as potential biomarkers such as ERK1/2, Tau protein or α -synuclein in AD and PD. Based upon these evidences, it would be highly interesting to develop analytical techniques for separation and sensitive detection of phosphorylated forms of proteins.

However, the analysis of protein phosphorylation has been recognized as one of the most challenging analytical tasks. Since many phosphoproteins are low abundant in biological fluids, their analysis requires extraction and preconcentration methods not only to improve the detection sensitivity but also to decrease the complexity of samples [12–14]. Enrichment of phosphopeptides can be achieved by several methods. Chromatographic mechanisms-based strategies including immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), metal oxide affinity chromatography (MOAC), ion-exchange chromatography (strong cationic ion-exchange chromatography (SCX); strong anionic exchange chromatography (SAX)) and hydrophilic-interaction chromatography (HILIC) were generally used. While retention mechanism of SCX, SAX and HILIC is based on more common molecule properties (ionization and hydrophilicity, respectively), capturing on IMAC and MOAC beds is more specific to phosphocompounds [13,15]. Also, the latter ones are the most selective to phosphopeptides and can be considered as superior to former

adsorbents. Among them, IMAC is the most frequently applied for phosphopeptide enrichment [16–20]. Other strategies including selective chemical bonding of phosphate groups and immunocapture of targeted molecules have been proposed. However, covalent bonding of peptides suffers from relatively poor extraction recovery [13]. In turn, usefulness of antibodies against phosphotyrosine or phosphoserine/phosphothreonine was questioned in large scale analysis and its application was recommended only in case of phosphotyrosine containing peptide analysis as these PTM is the least abundant among phosphoproteins [14].

Recently, chip-based systems have emerged as a promising tool for phosphoprotein analysis due to the numerous advantages including minimal sample consumption, short analysis time, and the possibility to integrate different and successive analytical steps into a unique microdevice [21]. Among the different analytical steps performed on chip, separation has been widely investigated in the literature. The performance of several separation methods have demonstrated in microdevices such as capillary zone electrophoresis [22,23], electrochromatography [24,25] or isoelectrical focusing [26]. Solid phase extraction (SPE) have been used in integrated sample processing including extraction and preconcentration[27–30]. Several microfluidic devices have been developed by coupling off-line phosphopeptide enrichment with CZE separation [20] or HPLC/M [31,32] for protein digest analysis. In those papers, the phosphopeptide enrichment was performed on functionalized nanoparticles such as TiO₂ or IMAC beads packed into microchannels. However, such packing process is a hard and time-consuming task due to required presence of frits to maintain the particles into the channel. Porous polymer monoliths are an interesting alternative to commonly used packed beads not only thanks to their easy in situ polymerization and localisation in microchannels but also because frits are not necessary[29] Moreover, high specific surface area and controlled porosity render these materials as good candidates for extraction and preconcentration of phosphopeptides [33,34]. Indeed, polymer monoliths have been successfully used as solid supports for affinity chromatography including IMAC technique for phosphopeptide enrichment [17,35–37]. Zou's group developed an ethylene glycol methacrylate phosphate-co-bisacrylamide (poly (EGMP-co-BAA)) monolith on which Zr⁴⁺ or Ti⁴⁺ ions have been immobilized through coordinate bond with phosphate groups. This IMAC system was used for enrichment of low abundant phosphopeptides from a protein digest of α -casein and β -casein [17,29–31]. However, this monolith was prepared by thermal polymerization in

silica capillaries. The high specificity and efficiency of this phosphated monolith for IMAC-based preconcentration of phosphopeptides make this SPE method attractive for online coupling to CZE into microdevices. To the best of our knowledge, only one work reported the phosphopeptide enrichment by monolith-based IMAC technique in glass microchannels. However, only the preconcentration step was performed in the microchannel, the eluant collected from IMAC was lyophilized before a MS analysis [38]. Until now, no work integrating a polymer monolith in microchannels for online preconcentration and separation of phosphopeptides has been reported.

In this work, we developed a lab-on-a-chip for on-line IMAC-based extraction/preconcentration and separation of a set of peptides differing by their phosphorylation degree and sites. For this purpose, we synthesized a poly (EGMP-co-BAA) monolith within glass microchips through a photo-driven process. The monolith mixture was adapted with minor modifications from a study reported by Dong et al [17], but in silica capillaries and under thermal conditions. The Zr^{4+} immobilization step onto the monolith, the sample loading, rinsing and elution steps were optimized before applying this IMAC- support to the specific capture of phosphopeptides. A microchip electrophoresis method to separate the three phosphopeptides from the non phosphorylated peptide was developed. The monolith was characterized by scanning electron microscopy (SEM), mercury intrusion porosimetry (MIP) and nitrogen adsorption (BET). This work will contribute to the development of a micrototal analysis system for phosphopeptides and phosphorylated disease biomarkers.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Ethylene glycol methacrylate phosphate (EGMP) was bought from ESSCHEM (Europe Seaham, United Kingdom). γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane (γ -MAPS), acrylamide: bisacrylamide (AA:BAA, mixture ratio 19:1), dimethylsulfoxide (DMSO), dodecan-1-ol, N,N'-dimethylformamide (DMF), 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN), formic acid (>95%) and ammonium hydroxide (28%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 1 M sodium hydroxide and 1 M hydrochloric acid solutions, acetone, methanol and acetonitrile (all of HPLC grade) were obtained from VWR International (Paris, France). Acetone, methanol and acetonitrile (all of HPLC grade) were also provided by VWR International. Formic acid (>95%) and ammonium (28%) solutions were also purchased from Sigma. In all the described experiments, ultrapure Milli-Q® water (18.2 M Ω ·cm⁻¹) was used (Direct-Q 3, Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

Three synthetic phosphorylated peptides differing by their phosphorylation sites and degree as well as a nonphosphorylated one (NP) were provided by Tebu-bio S.A.S (Le Perray en Yvelines, France). All of them were labelled with Hylite-488 fluor dye (Table 1). Upon reception, the samples were dissolved in water at a concentration of 1 mg/mL and then they were aliquoted (20 μ L) and stored à -20°C.

Table 1. Physico-chemical parameters of peptides.

Peptide Sequence	Isoelectric Point (pI)	Molecular Weight (MW)
DHTGFLTEYVATR (NP)	5.3	1866.2
DHTGFLpTEYVATR (pT)	4.3	1945.8
DHTGFLTEpYVATR (pY)	4.3	1945.8
DHTGFLpTEpYVATR (pTpY)	3.7	2026.2

p: phosphate group ; NP : Non Phosphorylated.

All the experiments were performed in cross-channel glass microchips (Micralyne Inc., Edmonton, Canada). The channels were 20 μ m deep and 50 μ m wide. The separation channel length was 80.89 mm and the length of each side arm was 4.82 mm. PEEK Nanoport reservoirs from Upchurch (model 10-32 Coned, IL, USA) were first bonded to

the chip using Adhesive Rings (Upchurch) and then thermally cured at 190°C for 1 hour in an oven according to manufacturer's instructions. In a next step, the reservoirs were additionally glued to the chip surface using epoxy adhesive (Loctite EA 3430, Henkel, Dusseldorf, Germany).

2.2 Buffers and sample solutions

The loading and rinsing buffers were composed of 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile while the elution buffer was alkaline and consisted of 25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5). The fluorescent diphosphopeptide (pTpY) solution at 310 nM was prepared in the loading buffer.

2.3 Equipment

The photopolymerization of the poly (EGMP-co-BAA) monolith was performed in a UV oven (Bio-link cross-linker, BLX-E365, Vilbert Lourmat, Marne La Vallée, France). An external HVS448 6000 D power supply from Labsmith (Livermore, CA, USA) controlled by a workstation was used. Platinum electrodes providing electrical contact from this power supply were inserted into reservoirs containing solutions for loading, rinsing and elution steps of the enrichment procedure and also for microchip electrophoresis experiments. To detect in real-time fluorescently labelled peptides, an optical inverted fluorescence microscope (Model ZEISS AXIO Observer.A1, Le Pecq, France) equipped with a 20X objective lens and coupled to an Illuminator HXP 120C mercury lamp (Carl Zeiss AG, Le Pecq, France) was used. The fluorescent detection was performed with green filters (excitation 455-490 nm and emission 505-555 nm). A CDD Orca-03G02 digital camera (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) was used to capture images of the detection zone. Azur software (DATALYS, France) was used to convert the mean grey scale from CCD images as a function of time into electropherograms.

SEM images of monoliths were obtained with scanning electron using a LEO 1530 microscope equipped with a high-vacuum (10 mmHg) Gemini Column. The accelerating tension was 5 kV, and two detectors (InLens and Secondary Electron) were used. The Mercury MIP measurements were carried out on an Autopore mercury porosimeter (Model IV9500, Micromeritics, Norcross, USA). The structural properties of the monolith were determined from the nitrogen adsorption/desorption isotherms measured with a Micromeritics instrument (Model ASAP 2020, Micromeritics, Georgia, USA).

If needed, the microchannels were rinsed using a vacuum pump (-30 mbar) or the Nanobaume (Western Fluids Engineering, Wildomar, CA, USA) under nitrogen pressure (2 bars). The Nanobaume and chip reservoirs interface was composed of fused silica capillary (75 μm of inner diameter; Composite Metal Service, UK) and a compatible fitting connectors (Upchurch, IL, USA).

2.4 Preparation of the poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺ in glass microchips

Microchip surface pretreatment. To anchor the monolith to the channel wall, the glass channel was vinylized prior to the in situ polymerization [38]. Briefly, native channels were first filled with 1 M NaOH solution and were allowed to react at room temperature for 30 min for glass surface activation. The microchip was then rinsed with water (15 min under vacuum). The same procedure was repeated using 0.1 M HCl solution. Such treated channels were dried in oven (120 °C for 1 hour) under nitrogen stream. Finally, the microchip was filled with 50% (v/v) γ -MAPS solution in acetone, the reservoirs were sealed with caps and the microchips were kept in dark place for a whole night at room temperature. After rinsing with acetone (15 min at 2 bars), the channel was dried under nitrogen stream for one hour.

Monolith synthesis. The composition of the polymerization mixture was adapted from the protocol previously reported by Dong and co-workers [17]. The mixture was composed of AIBN (2 mg), AA:BAA mixture (19:1 molar ratio, 100 mg) and EGMP (130 mg) dissolved in a ternary porogen solution made of DMSO (650 μL), dodecanol (500 μL) and DMF (125 μL). The monolith mixture was placed in a glass amber vial, homogenised and degassed by ultrasonication at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for 20 min and 10 min, respectively. The reaction mixture was then introduced into microchannels using Nanobaume. A 4 mm section of the separation channel using black tape as a photomask was irradiated in a UV oven at 365 nm with a light intensity of $1.5 \text{ mW}/\text{cm}^2$ for 25 min. The distance between the chip and the light source was 15 cm. After photopolymerization, the monolith was rinsed with methanol for 2 hours in order to efficiently remove the unreacted methacrylate monomers and then with water.

Immobilization of Zr⁴⁺ ions and monolith preconditioning. After the monolith synthesis, the immobilization of Zr⁴⁺ ions was carried out by rinsing the monolith with 100 mM ZrOCl₂ solution for 1 hour. Reservoirs were sealed with caps and the microchip was kept

in the dark at 8°C overnight according to the procedure of Zhou et al. [39]. The monolith was then rinsed with water for 1 hour to remove residual Zr^{4+} ions. Finally, the monolith was rinsed with the loading solution composed of 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile/water solution for 15 minutes. All the rinsing steps were performed at 2 bars using Nanobaume. The poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} was then ready to use.

2.5. Evaluation of the performance of the poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} for phosphopeptide enrichment

A layout of the enrichment procedure cross-channel microchip with the integrated poly(EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} is shown in Fig. 1. The four reservoirs on the chip are indicated by R1 to R4. The 4 mm long monolith was localized in the separation channel at 1 cm from the cross-section. During the loading step, reservoir R1 was filled with 50 μ L of the diphosphopeptide (pTpY) solution (PS) and reservoirs R2 to R4 with the loading buffer (LB). The fluorescent sample solution (in green) was loaded on the monolith for 15 min by applying -2.0kV to reservoir R4 and grounding reservoir R1 (Fig.1A). The solutions of reservoirs R1 and R4 was then replaced by the loading buffer which was also used as the rinsing buffer. The rinsing step was then performed for 15 min by applying the same voltages as in loading step to keep on the monolith only the phosphopeptides and to wash out the molecules non-specifically adsorbed (Fig.1B). For the elution step, the loading buffer in reservoirs R1 and R4 was replaced with the alkaline elution buffer (EB). The captured peptide was then eluted out of the monolith in the same way as in the loading and rinsing steps. (Fig.1C).

The first set of experiments was performed to demonstrate the performance of the developed poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} for the IMAC-based enrichment of phosphopeptides. The experiments were repeated three times and using three different monolith-integrated glass microchips. Their capture on the poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} was evaluated by measuring the background noise-subtracted fluorescent intensity ($\lambda = 475-495$ nm) on the monolith and recording images of the monolith after sample loading and elution with an optical inverted epifluorescence microscope equipped with CCD camera detection. The collected fluorescence data and CDD images were then analysed with HImage software (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Those fluorescence data were also used to evaluate the elution efficiency (%) on monolith which was determined using the following equation

$$\text{Elution efficiency} = \left(\frac{\text{Fluorescence after loading/rinsing} - \text{Fluorescence after elution}}{\text{Fluorescence after loading/rinsing}} \right) \times 100$$

The stability of the poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺ was then investigated by monitoring the fluorescence intensity after running two consecutive times the loading/ rinsing/ elution steps on the same monolith without regenerating the Zr⁴⁺ immobilization step. The loading, rinsing and elution step were performed as above described.

The second set of experiments was carried out to determine the loading and the elution times. For those experiments, the same diphosphopeptide solution (pTpY at 310nM) was utilized and driven through the monolith by applying the same voltages as previously mentioned. The fluorescence intensity was continuously recorded during 15 min at a fixed point noted **(a)** after the monolith plug (Fig 1A) or **(b)** directly on the monolith (Fig 1C) and plotted against time to determine the loading and the elution times, respectively. The loading time, defined as the time necessary to saturate the monolith with phosphopeptides which was considered as the time when the increase of fluorescence intensity attained a plateau. On the contrary, the elution time, considered as the time required to elute all the phosphopeptides bound to the monolith, was determined when a plateau was attained after the decrease of the fluorescence intensity. Between the loading and elution steps, a rinsing step was performed during 15 min.

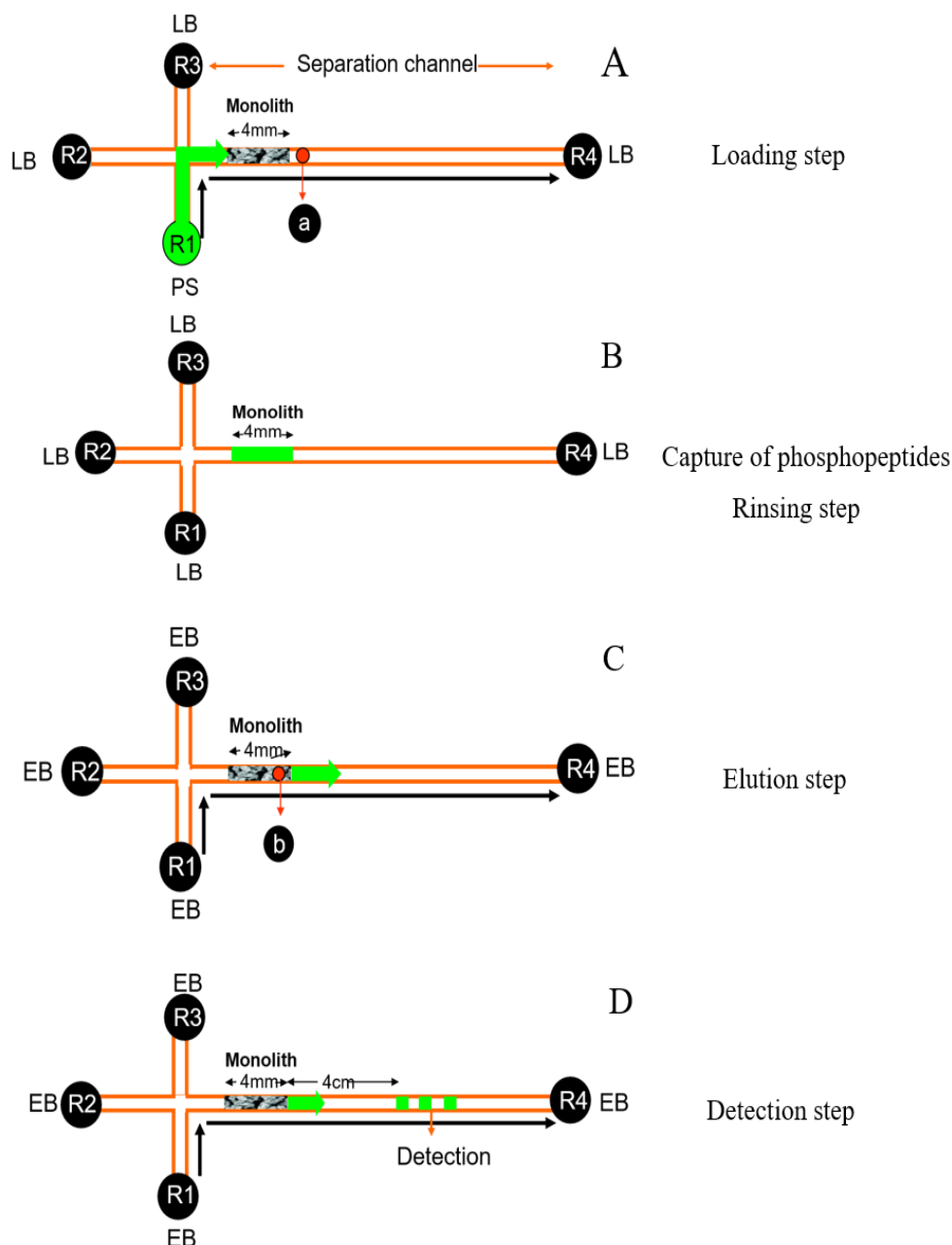


Fig. 1. Microchip layout of the enrichment procedure cross-channel microchip with the integrated poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} . A) Loading, B) Rinsing, C) Elution and D) Detection. All solutions were driven through the monolith and channel by applying -2.0kV to R4 and grounding R1. A) For loading step, the reservoirs R2 to R3 were filled with loading buffer (LB) and R1 was filled with peptide solution (PS). The PS was driven through the monolith. B) For rinsing step, the reservoirs were filled with LB. The phosphopeptide are then captured on the monolith. C) For elution step, all reservoirs were filled with EB and the phosphopeptide is eluted from monolith. D) The phosphopeptides were separated and detected ($\lambda = 475-495$ nm) at 4 cm from the monolith plug. The fluorescence detection point was positioned after the monolith plug (a), or directly on the monolith (b) to determine the loading and elution times, respectively. The solution flow direction is indicated by the black arrows. Peptide solution: pTpY at 310nM, LB : 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile, EB : 25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5).

2.6. Online IMAC-based preconcentration and microchip electrophoresis of phosphopeptide mixture

Experiments coupling online loading, rinsing, elution and separation steps of a phosphopeptide mixture prepared at 15 nM were carried out under conditions previously optimized. To test the selectivity and specificity of the IMAC-monolith prepared, the sample mixture was composed of three phosphopeptides (pT, pY and pTpY) and a non-phosphorylated peptide (NP). A 4 mm long poly(EGMP-co-BAA) monolith Zr^{4+} was localized in the separation channel at 1 cm from the cross-section. During the preconcentration step, the sample solution was loaded for 7 min on the IMAC-monolith which was then rinsed with the loading buffer for 15 min under the same electrical conditions described above. The captured peptides were finally eluted from the monolith and separated by electrophoresis by applying a -2.0kV to reservoir R4 and grounding reservoir R1. The fluorescence detection ($\lambda = 475-495$ nm) was set at 4 cm from the end of the monolith plug as shown in Fig.1D. This effective length was chosen according to CZE method that was previously developed by our group. All device operation steps were performed in the same manner as described in section 2.5. A CCD camera was used to capture images and fluorescence of the detection zone. HImage software was used for data acquisition and processing. Azur software was used to convert the CCD images as a function of time into electropherograms.

The preconcentration effect was measured by the signal enrichment factor (SEF) which was defined as the ratio of the signal obtained after the preconcentration step to the response without preconcentration. It was determined using the ratio of peak areas as follows :

$$SEF = A/A_0 \quad (Eq.1)$$

where, A is the peak area obtained after preconcentration and A_0 the peak area obtained by direct pinched injection mode without preconcentration. Corrected areas (ratio of the peak area to the migration time of analyte) were used for the SEF determination in order to take into account the electroosmotic flow variations during the analysis.

2.7 Monolith characterization

2.7.1 Monolith morphology

The morphology of the monolith was characterized by SEM and MIP. Prior to SEM analyses, monoliths were coated with a Pd/Au alloy (4 nm thickness) in a Cressington 208 HR sputter-coater. Quantitative information such as median pore size, pore size distribution, porosity and total pore volume were obtained from MIP measurements. The monolith samples were synthesized in a vial (200 μ L of monolith mixture) at 365 nm for 25 min. The porogens were removed with methanol using a Soxhlet extractor for at least 24 h. All samples were dried in a vacuum oven at 25°C for at least 8h to evaporate residual solvents. The MIP characterization was performed on 120 mg of monolith obtained after Soxhlet extraction. The specific surface area was obtained by the BET (Brunauer-Emmet-Teller) method in the relative pressure range (P/P_0) of 0.05–0.35, the total pore volume was computed from the amount of gas adsorbed at $P/P_0 = 0.99$.

3. Results and discussions

3.1 Monolith characterization

The repeatability of photopolymerization process was evaluated by measuring the monolith length using an optical microscope. Relative standard deviation (RSD) values were less than 8% (n=6) for a 4 mm expected monolith plug. However, inhomogeneous monolith at the borders of prepared plug was observed which was probably due to the diffusion of free radicals out of the irradiation zone during the synthesis process. Nevertheless, no negative influence on experiment performance was observed.

The morphology of the poly (EGMP-co-BAA) monolith was examined by SEM images. Fig. 2A reveals a homogenous structure forming a porous scaffold typical of a monolithic-like material. The holes observed on the SEM pictures may be due to the monolith detachment occurred during the sample cutting process. Fig.2B clearly evidences the robust anchoring of the monolithic polymer onto the inner wall of the glass channel. Uniform nodules with averaged size of about 0.8 μ m were observed (Fig.2C).

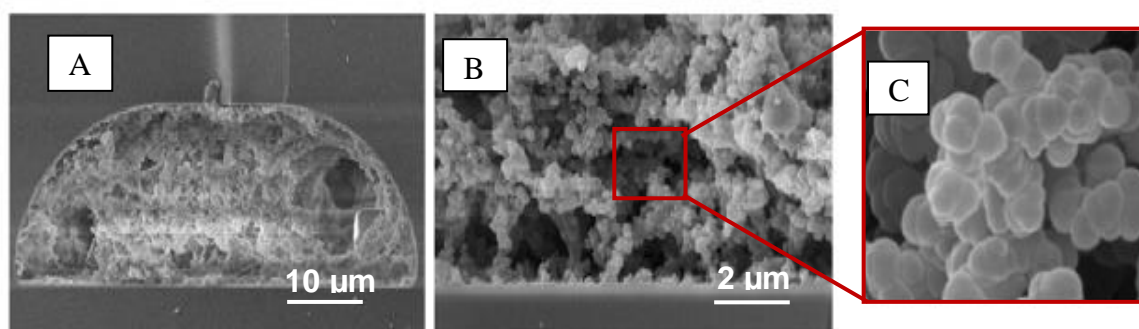


Fig.2. SEM images of the poly (EGMP-co-BAA) monolith synthesized through UV irradiation (365 nm, 1.5 mW/cm²) in microchannels (50 μ m in length). A) 200x magnification, B) 1300x magnification and C) 5000 x magnification.

From MIP measurements, the pore size distribution showed that the monolith exhibits a broad monomodal distribution with a majority of pores in the size range from 0.1 to 1.1 μ m with a maximum at about 0.3 μ m with contributions to the pore volume of 89% (0.62 cm³/g) and 11% (0.07cm³/g) for macropores and mesopores, respectively (Fig. 3). Such macropores would provide good permeability for the monolith, allowing rapid mass transfer with low backpressure[40]. Total pore volume and porosity of poly (EGMP-co-BAA).

The specific surface area of the poly (EGMP-co-BAA) monolith was determined to be 34.08 m²/g using BET experiments. This is particularly interesting for preconcentration. Indeed, Svec [41] stipulated that monoliths exhibiting surface areas in the range of 5-20 m²/g would be too small to be useful in SPE. Moreover, the specific surface area measured is fully consistent with those reported in the literature for EGMP-based monoliths which are ranging from 13.7 to 49.0 m²/g [42]. To sum up, our results are comparable to those of some other polymer monoliths reported in the literature for preconcentration and electrochromatographic separation purposes [43–46]. We can consider that the poly (EGMP-co-BAA) monolith fabricated has appropriate properties for phosphopeptide enrichment.

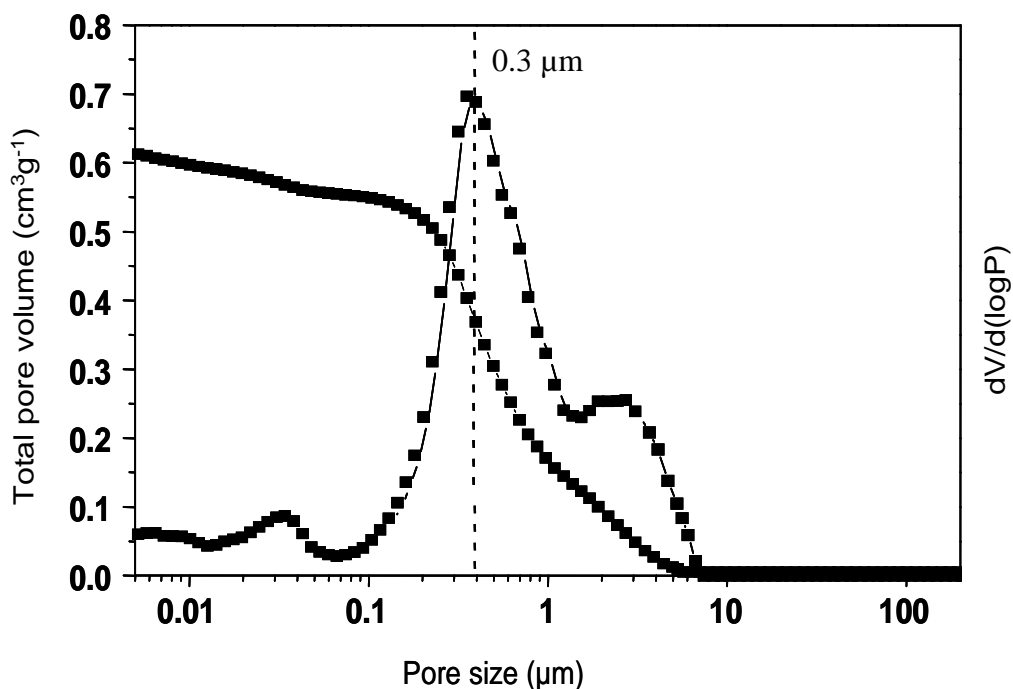


Fig. 3. Pore size distribution determined for poly (EGMP-co-BAA) monolith bulk sample by mercury intrusion porosimetry.

3.2 Performance of the poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺ for phosphopeptide enrichment

The performance of our IMAC-based monolith for phosphopeptide enrichment was first tested with the fluorescent diphosphopeptide (pTpY) as a model. The peptide sorption on the monolith was directly monitored by measuring the fluorescence intensity and recording the images with an epifluorescent microscope. After the Zr⁴⁺ immobilization and the monolith preconditioning (section 2.4), no significant fluorescence was detected on the monolith (Fig. 5A). After the sample loading and a subsequent extensive rinsing (15 min) with the loading buffer to remove any remained fluorescent solution in the channel or molecule non-specifically bound to the monolith, a high fluorescence intensity was observed on the monolith (Fig.4B). This clearly demonstrated the capture of phosphopeptide pTpY via strong interactions between their phosphate groups and the Zr⁴⁺ immobilized on the monolith (Fig.4B). Indeed, the IMAC-based binding is favoured under acidic conditions as carboxyl groups of phosphopeptides are protonated while phosphate groups are negatively charged. In contrary, only 15 min of rinsing with the elution buffer led to a clear decrease of the fluorescent intensity (Fig.4C), demonstrating the efficient elution of the phosphopeptide retained on the monolith through the IMAC mechanism. In fact, the elution efficiency was determined to be 92 % (n=3, RSD = 2.9 %). The presence of a strong chelating agent like ammonium in the buffer which competes with phosphate groups facilitates the elution of the captured phosphopeptide. However, a residual fluorescence can still be detected on the monolith, probably due to the nonspecific adsorption of the phosphopeptide on the monolith but it was too low to observe any visible difference on the image (Fig.4C). We conclude that the preparation of our monolith-integrated microdevice is reproducible in terms of both monolith length as stated above and extraction efficiency.

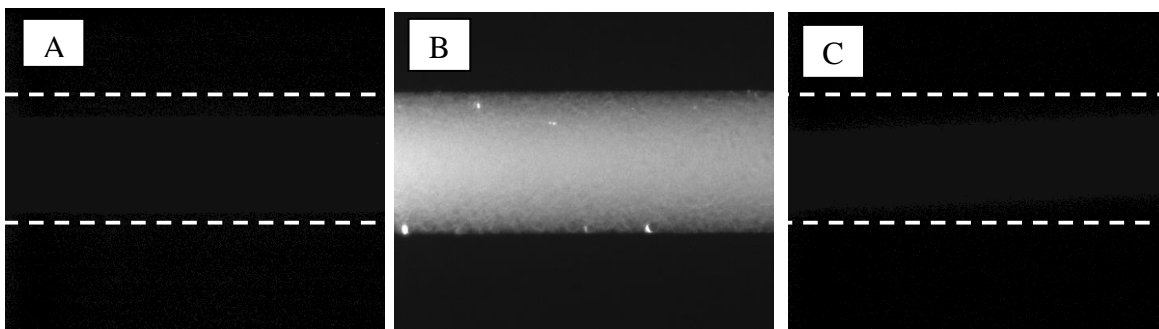


Fig. 4. Optical images of the poly (EGMP-co-BAA)-monolith Zr^{4+} : (A) Channel with monolith and peptide loading, (B) Monolith after peptide loading (pTpY at 310nM) and rinsing with loading buffer (LB) and (C) Monolith after rinsing with elution buffer (EB). Fluorescence detection ($\lambda = 475-495$ nm). LB : 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile. EB : 25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5) in a glass microchannel (50 μ m in width).

It is important to evaluate the stability of the poly (EGMP-co-BAA)-monolith Zr^{4+} . Indeed, the enrichment capacity of the poly (EGMP-co-BAA)-monolith Zr^{4+} is dependent on the amount of immobilized metal ions and a loss of Zr^{4+} may be a potential drawback. Only a few works have reported this kind of problem [38]. This stability was investigated by running two consecutive runs of loading, rinsing and elution steps on the same monolith. The Zr^{4+} ions were immobilized only once. After sample loading and rinsing, the fluorescence intensity (black chart) on monolith was dramatically reduced by a factor of 2 after the second run (Fig.5). This indicates a loss of loading efficiency around 50%. The reason could be attributed to the repetitive washings with acidic and alkaline buffers which implied the removal of Zr^{4+} ions from the monolith. This is consistent with the observations of Wang and co-workers [38], who explained that rinsing and elution buffers may continually introduce Lewis base that is harder than phosphate groups considered as Lewis base, resulting in the break of the bonding between metal ions and the phosphate groups containing monolith surface. This is an inherent disadvantage in case of non-permanent binding methods such as IMAC. To overcome this problem, we thus regenerated the Zr^{4+} immobilization step on the monolith using a $ZrOCl_2$ solution between each IMAC run. Otherwise, a loss of elution efficiency around 10% was observed after the second run of successive acidic and alkaline rinsings.

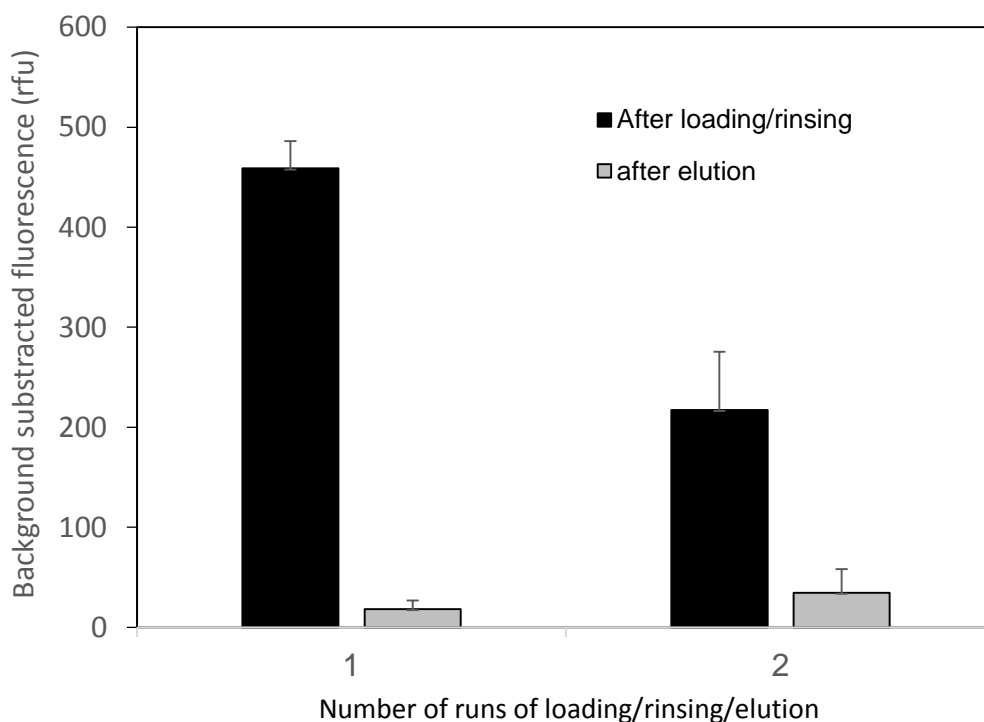


Fig.5. Mean of the background-substracted fluorescence intensity on the poly(EGMP-co-BAA) monolith with diphosphopeptide pTpY (310 nM) after two consecutive runs of loading/washing/elution steps. The Zr^{4+} ions were immobilized only once. Error bars represent standard deviation for 2 experiments. Fluorescence detection ($\lambda = 475-495$ nm). LB : 3 % (v/v) formic acid in 50 % (v/v) acetonitrile. EB : 25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5) in a glass microchannel (50 μ m in width).

3.3 Determination of the sample loading and elution time on poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺

The loading and elution times were optimized since these parameters affect the capture and release of phosphopeptides on monolith impacting thus on the enrichment efficiency. The optimization of these two parameters is crucial for the on-line coupling of the enrichment procedure to the separation. The experiments were performed using the same solution of pTpY peptide as above described. Fig.6A shows the loading profile of the fluorescent phosphopeptide as a function of time. The loading time was considered as the time necessary to saturate the monolith with the phosphopeptide. After 3 min of sample loading, we can observe a sharp increase of the fluorescence which reached a plateau after 7 min, indicating the monolith saturation. Thus, the average loading time was set at 7.5 min with an acceptable reproducibility (n=3, RSD =9.4%). After sample loading and a 15 min rinsing step with loading buffer to remove the remained fluorescent solution in the channel, the elution step was performed. Fig.6B shows the elution profile of fluorescent peptide. As it can be noted, no significant change in fluorescence was observed within 10 min from which the fluorescence decreased more sharply reaching a plateau at around 13 min indicating an efficient elution of the phosphopeptide. Thus, the average elution time was estimated at 11 min (n=3, RSD =12.8%).

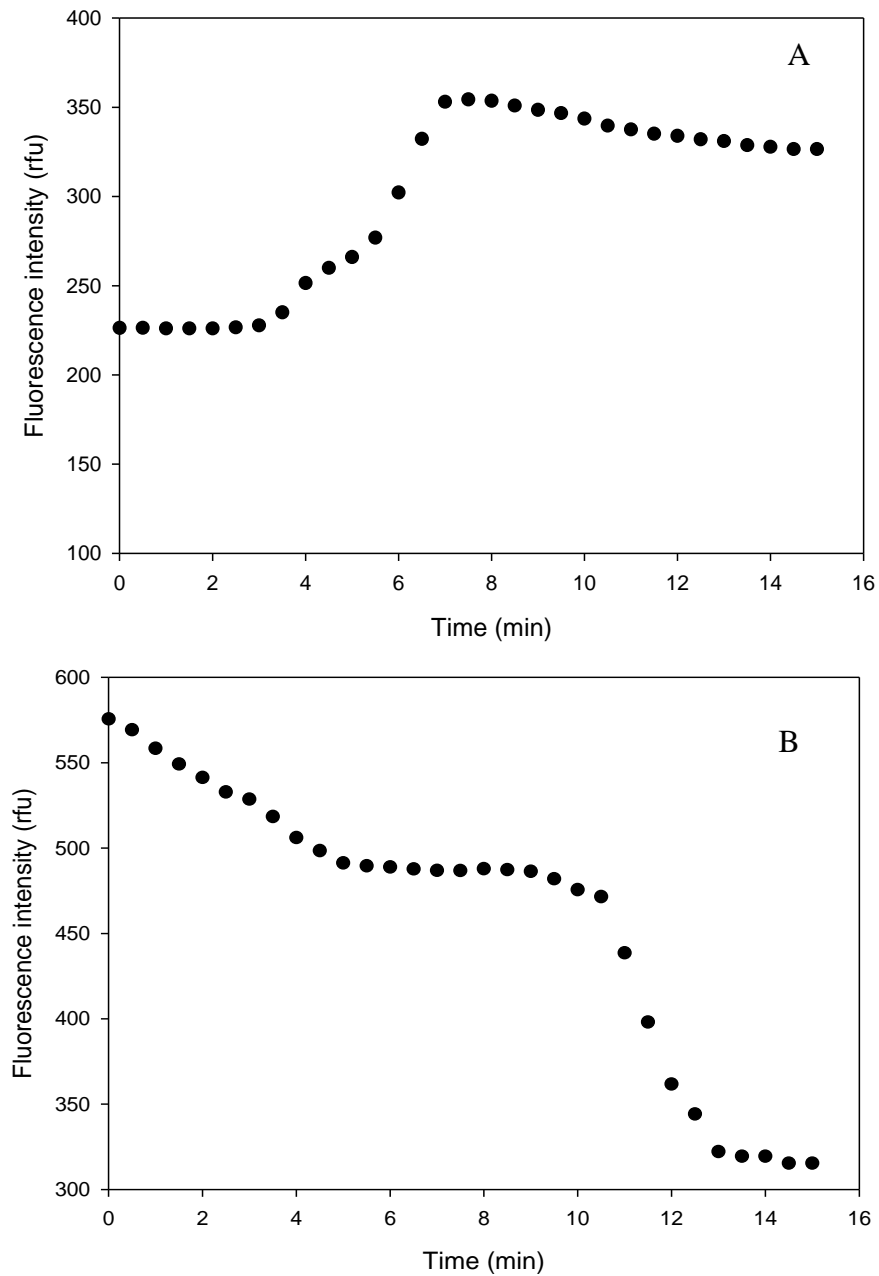


Fig. 6. Evolution of fluorescence intensity on the monolith as a function of loading A) and B) elution times. The fluorescence was recorded ($\lambda = 475-495$ nm) after and on the monolith plug. To determine the loading and elution time, respectively. Peptide solution: pTpY at 310nM.

3.4 Online IMAC-based preconcentration and microchip electrophoresis of phosphopeptide mixture

Since the preparation of poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} as well as the capture and elution of peptides were optimized, the following step was to demonstrate the potential to preconcentrate and separate the phosphopeptides in an online-chip process. A mixture of fluorescent phosphorylated and non-phosphorylated peptides each one at 15nM was used. Fig. 7A shows the electropherogram obtained after online elution. Only the peaks of phosphorylated peptides were detected indicating that either the non phosphopeptide was not retained on the poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} or it was removed from the monolith during the rinsing step due to its weak interaction with the Zr^{4+} . This clearly demonstrates that the retention of phosphopeptides is based on the interaction between the phosphate groups of phosphopeptides and Zr^{4+} ions and confirms the specificity of the poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} for phosphopeptide IMAC-based enrichment.

Although the efficiency of separation was relatively low due to the well-known band broadening generally occurred during online preconcentration and elution [47], this method showed satisfying resolutions ($R > 1.6$) as two phosphopeptides differing only by their phosphorylation site (pT from pY) or degree (pT and pY from pTpY) were separated and discriminated. As the diphosphopeptide is more negatively charged it migrates after the monophosphopeptides. The peak width can be significantly influenced by the length of the enriched monolith which affect the volume of eluted peptides. Taking into account the great enrichment capacity of the monolith, the preconcentration time (7 min) used in this study was probably too long and another cause of the peak broadening. To elute the captured phosphopeptides with much better efficiency the preconcentration time should be kept to a minimum and the monolith length should be reduced.

To evaluate the signal enhancement factor (SEF) that can be reached, the phosphopeptide mixture (15nM) was analyzed after pinched direct injection without preconcentration (Fig 7B). No signal was observed, that is consistent with the method previously developed in our lab for which the evaluated LOD was 41 nM (data not shown). Considering the peak area obtained for a microchip electrophoresis separation of a phosphopeptide mixture at 41nM, the SEF would be estimated higher than 910, 340 and 840 for the peptides pT, pY and pTpY, respectively. The results obtained indicated that fluorescent phosphopeptides can be on line captured, enriched, eluted and separated, providing an automated way for

the extraction, purification or enrichment of complex samples. The high IMAC-based enrichment capacity of the poly (EGMP-co-BAA) monolith- Zr^{4+} improves the detection sensitivity of low abundant phosphopeptides that could not be detected when using standard analysis in microsystems without preconcentration step.

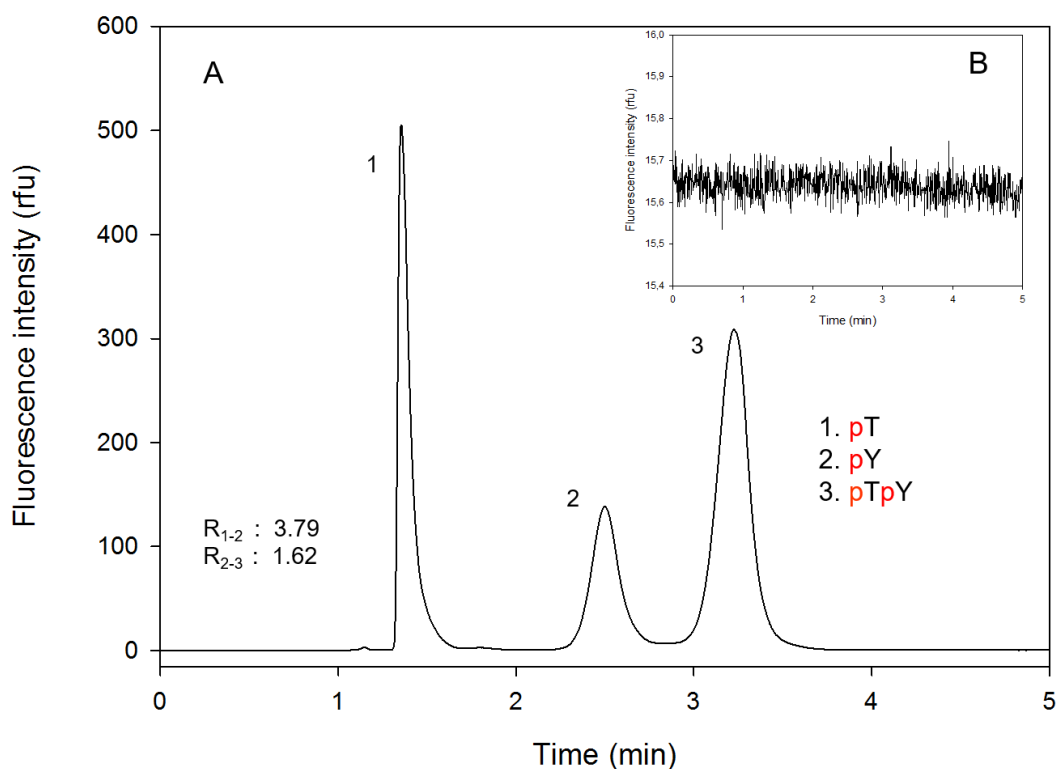


Fig.7. (A) Online preconcentration and microchip electrophoresis separation of a phosphopeptide mixture differing by their position and number of phosphorylation sites and (B) Electrophoregram corresponding to the pinched injection of the phosphopeptide mixture without preconcentration. Concentration of the phosphopeptide solution was 15nM. Fluorescence detection ($\lambda = 475-495$ nm). Abbreviations: R: Resolution, p: phosphate group.

4 Conclusion

This is the first work applying an online SPE-MCE for the analysis of a mixture of phosphorylated and non phosphorylated peptides by integrating a poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺ within glass microchips. The enrichment of phosphorylated peptides was successfully achieved and the elution buffer (25 mM borate buffer and 2.8 % ammonium solution (pH 11.5) used in this study was very effective to either elute and separate the phosphopeptides with a good resolution. The high retention of poly (EGMP-co-BAA) monolith-Zr⁴⁺ towards phosphopeptides combined to their superior specificity allowed a significant enrichment of retained compounds. Although the results obtained in this study are promising and the integrated microsystem developed opens new perspectives for phosphorylation studies, additional improvements of the device should be required to fully optimize this system. This work will contribute to the development of a micrototal analysis system for phosphorylated biomarkers of neurodegenerative diseases.

5 References

- [1] T. Hunter, Signaling—2000 and Beyond, *Cell*. 100 (2000) 113–127. doi:10.1016/S0092-8674(00)81688-8.
- [2] P. Cohen, The role of protein phosphorylation in human health and disease., *Eur. J. Biochem*. 268 (2001) 5001–5010. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02473.x.
- [3] M. Mann, S.-E. Ong, M. Grønborg, H. Steen, O.N. Jensen, A. Pandey, Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome, *Trends Biotechnol*. 20 (2002) 261–268. doi:10.1016/S0167-7799(02)01944-3.
- [4] P.R. Cutillas, C. Jørgensen, Biological signalling activity measurements using mass spectrometry, *Biochem. J*. 434 (2011) 189–199. doi:10.1042/BJ20101974.
- [5] E.K. Kim, E.-J. Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis*. 1802 (2010) 396–405. doi:10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
- [6] X. Deschênes-Simard, F. Kottakis, S. Meloche, G. Ferbeyre, ERKs in Cancer: Friends or Foes?, *Cancer Res*. 74 (2014) 412–419. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2381.
- [7] V.S. Sivaraman, H. Wang, G.J. Nuovo, C.C. Malbon, Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer., *J. Clin. Invest*. 99 (1997) 1478–1483.
- [8] H.C. Harsha, A. Jimeno, H. Molina, A.B. Mihalas, M.G. Goggins, R.H. Hruban, et al., Activated Epidermal Growth Factor Receptor as a Novel Target in Pancreatic Cancer Therapy, *J. Proteome Res*. 7 (2008) 4651–4658. doi:10.1021/pr800139r.
- [9] A. Lièvre, P. Laurent-Puig, La voie de signalisation RAS/MAPK, *Cancéro Dig. II* (2010). doi:10.4267/2042/30747.
- [10] .H. Klafki. Responsable du LVR-Hospital Essen, Département of Psychiatry and Psychotherapy, Faculté de Médecine, Université de DuisburgEssen, Essen, Germany. Communication personnelle (2011)..
- [11] K. Blennow, Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease, *NeuroRx*. 1 (2004) 213–225.
- [12] L. Beltran, P.R. Cutillas, Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics, *Amino Acids*. 43 (2012) 1009–1024. doi:10.1007/s00726-012-1288-9.

- [13] J.D. Dunn, G.E. Reid, M.L. Bruening, Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 29–54. doi:10.1002/mas.20219.
- [14] J. Fila, D. Honys, Enrichment techniques employed in phosphoproteomics, *Amino Acids*. 43 (2012) 1025–1047. doi:10.1007/s00726-011-1111-z.
- [15] G. Han, M. Ye, H. Zou, Development of phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteome analysis, *The Analyst*. 133 (2008) 1128. doi:10.1039/b806775a.
- [16] T.E. Thingholm, O.N. Jensen, M.R. Larsen, Analytical strategies for phosphoproteomics, *PROTEOMICS*. 9 (2009) 1451–1468. doi:10.1002/pmic.200800454.
- [17] J. Dong, H. Zhou, R. Wu, M. Ye, H. Zou, Specific capture of phosphopeptides by Zr⁴⁺-modified monolithic capillary column, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2917–2923. doi:10.1002/jssc.200700350.
- [18] L. Negroni, S. Claverol, J. Rosenbaum, E. Chevet, M. Bonneau, J.-M. Schmitter, Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography, *J. Chromatogr. B*. 891-892 (2012) 109–112. doi:10.1016/j.jchromb.2012.02.028.
- [19] K.N. Barnouin, S.R. Hart, A.J. Thompson, M. Okuyama, M. Waterfield, R. Cramer, Enhanced phosphopeptide isolation by Fe(III)-IMAC using 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol, *Proteomics*. 5 (2005) 4376–4388. doi:10.1002/pmic.200401323.
- [20] G.E. Yue, M.G. Roper, C. Balchunas, A. Pulsipher, J.J. Coon, J. Shabanowitz, et al., Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a glass microchip, *Anal. Chim. Acta*. 564 (2006) 116–122. doi:10.1016/j.aca.2005.11.003.
- [21] P.N. Nge, C.I. Rogers, A.T. Woolley, *Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications*, *Chem. Rev.* 113 (2013) 2550–2583. doi:10.1021/cr300337x.
- [22] B. Ma, X. Zhou, G. Wang, H. Huang, Z. Dai, J. Qin, et al., Integrated isotachophoretic preconcentration with zone electrophoresis separation on a quartz microchip for UV detection of flavonoids, *ELECTROPHORESIS*. 27 (2006) 4904–4909. doi:10.1002/elps.200600392.
- [23] C.F. Duffy, B. MacCraith, D. Diamond, R. O’Kennedy, E.A. Arriaga, Fast electrophoretic analysis of individual mitochondria using microchip capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection, *Lab. Chip*. 6 (2006) 1007. doi:10.1039/b601896c.
- [24] K. Faure, M. Bias, O. Yassine, N. Delaunay, G. Cretier, M. Albert, et al., Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases, *Electrophoresis*. 28 (2007) 1668–1673. doi:10.1002/elps.200600566.
- [25] G. Proczek, V. Augustin, S. Descroix, M.-C. Hennion, Integrated microdevice for preconcentration and separation of a wide variety of compounds by electrochromatography, *Electrophoresis*. 30 (2009) 515–524. doi:10.1002/elps.200800308.
- [26] X. Huang, J. Ren, On-line chemiluminescence detection for isoelectric focusing of heme proteins on microchips, *Electrophoresis*. 26 (2005) 3595–3601. doi:10.1002/elps.200500076.
- [27] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S.J. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: A review, *Anal. Chim. Acta*. 718 (2012) 11–24. doi:10.1016/j.aca.2011.12.050.
- [28] P.N. Nge, J.V. Pagaduan, M. Yu, A.T. Woolley, Microfluidic chips with reversed-phase monoliths for solid phase extraction and on-chip labeling, *J. Chromatogr. A*. 1261 (2012) 129–135. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.095.
- [29] D.S. Peterson, Solid supports for micro analytical systems, *Lab. Chip*. 5 (2005) 132–139. doi:10.1039/B405311G.
- [30] V. Augustin, G. Proczek, J. Dugay, S. Descroix, M.-C. Hennion, Online preconcentration using monoliths in electrochromatography capillary format and microchips, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2858–2865. doi:10.1002/jssc.200700387.
- [31] S. Mohammed, K. Kraiczek, M.W.H. Pinkse, S. Lemeer, J.J. Benschop, A.J.R. Heck, Chip-Based Enrichment and NanoLC–MS/MS Analysis of Phosphopeptides from Whole Lysates, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 1565–1571. doi:10.1021/pr700635a.
- [32] R. Raijmakers, K. Kraiczek, A.P. de Jong, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Exploring the Human Leukocyte Phosphoproteome Using a Microfluidic Reversed-Phase–TiO₂–Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Phosphochip Coupled to a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* 82 (2010) 824–832. doi:10.1021/ac901764g.

- [33] J. Krenkova, F. Svec, Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 706–718. doi:10.1002/jssc.200800641.
- [34] A. Namera, A. Nakamoto, T. Saito, S. Miyazaki, Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 901–924. doi:10.1002/jssc.201000795.
- [35] S. Feng, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, X. Jiang, H. Zou, et al., Immobilized Zirconium Ion Affinity Chromatography for Specific Enrichment of Phosphopeptides in Phosphoproteome Analysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 1656–1665. doi:10.1074/mcp.T600071-MCP200.
- [36] G. Han, M. Ye, H. Zhou, X. Jiang, S. Feng, X. Jiang, et al., Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography, *Proteomics.* 8 (2008) 1346–1361. doi:10.1002/pmic.200700884.
- [37] H. Zhou, S. Xu, M. Ye, S. Feng, C. Pan, X. Jiang, et al., Zirconium Phosphonate-Modified Porous Silicon for Highly Specific Capture of Phosphopeptides and MALDI-TOF MS Analysis, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 2431–2437. doi:10.1021/pr060162f.
- [38] H. Wang, J. Duan, H. Xu, L. Zhao, Y. Liang, Y. Shan, et al., Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2113–2121. doi:10.1002/jssc.201100168.
- [39] H. Zhou, M. Ye, J. Dong, G. Han, X. Jiang, R. Wu, et al., Specific Phosphopeptide Enrichment with Immobilized Titanium Ion Affinity Chromatography Adsorbent for Phosphoproteome Analysis, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 3957–3967. doi:10.1021/pr800223m.
- [40] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Monolithic porous polymer for on-chip solid-phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096. doi:10.1021/ac0106288.
- [41] F. Svec, Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 902–924. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.073.
- [42] F. Wang, J. Dong, X. Jiang, M. Ye, H. Zou, Capillary Trap Column with Strong Cation-Exchange Monolith for Automated Shotgun Proteome Analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6599–6606. doi:10.1021/ac070736f.
- [43] C. Yu, M.H. Davey, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Monolithic Porous Polymer for On-Chip Solid-Phase Extraction and Preconcentration Prepared by Photoinitiated in Situ Polymerization within a Microfluidic Device, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5088–5096. doi:10.1021/ac0106288.
- [44] Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips: A step towards field portable analysis, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 8001–8008. doi:10.1016/j.chroma.2010.07.076.
- [45] J.M. Burke, E. Smela, A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane)., *Biomicrofluidics.* 6 (2012) 16506–1650610. doi:10.1063/1.3693589.
- [46] Q.-S. Kang, X.-F. Shen, N.-N. Hu, M.-J. Hu, H. Liao, H.-Z. Wang, et al., A 3D porous polymer monolith-based platform integrated in poly(dimethylsiloxane) microchips for immunoassay, *Analyst.* 138 (2013) 2613–2619. doi:10.1039/c3an36744d.
- [47] V. Augustin, G. Proczek, J. Dugay, S. Descroix, M.-C. Hennion, Online preconcentration using monoliths in electrochromatography capillary format and microchips, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2858–2865. doi:10.1002/jssc.200700387.

3.3 Conclusion

Au cours de ce chapitre, un laboratoire sur puce a été développé en intégrant un module de préconcentration à base de monolithe et utilisant l'IMAC pour la préconcentration de phosphopeptides en amont d'une étape de séparation électrophorétique et d'une détection par fluorescence. Son potentiel à servir comme dispositif d'analyse totale a été démontré pour des peptides phosphorylés fluorescents modèles.

Nous avons montré que le support monolithique poly (EGMP-co-BAA)-Zr⁴⁺ est une matrice efficace et spécifique pour l'enrichissement de peptides phosphorylés. L'efficacité de l'étape d'élution a été démontrée par une réduction de 92% de la fluorescence générée par les phosphopeptides fluorescents sur le monolithe, en utilisant une solution (pH 11.5) composée d'hydroxyde d'ammonium (2.8%) et de tampon borate (25mM). Ce 'tampon' d'élution est efficace non seulement pour éluer les phosphopeptides du monolithe mais aussi pour les séparer électrocinétiquement avec une résolution satisfaisante ($R > 1.6$). Cette matrice de préconcentration IMAC a permis de détecter des composés phosphorylés se trouvant à des concentrations en dessous de la limite de détection de la méthode de séparation (41 nM). La performance de ce microsysteme intégré a été démontrée par l'obtention de facteurs d'enrichissement atteignant 340 à 910 pour les phosphopeptides modèles testés. Toutefois, l'élargissement des pics observé lors de la séparation limite l'obtention de facteurs d'enrichissement plus élevés. La réduction du temps de chargement ou de la longueur du monolithe sont deux solutions envisageables pour résoudre ce problème.

Bien que ces résultats soient encourageants, de nouvelles optimisations notamment au niveau de l'étape de chargement et de la géométrie de la puce sont nécessaires pour mieux gérer l'ensemble des étapes. Ces travaux contribueront au développement d'un futur dispositif de diagnostic basé sur l'analyse des biomarqueurs phosphorylés.

Références

- [1] I. Ayed, Développement d'une méthode de préconcentration de phosphopeptides sur phase monolithique en puce, Paris 11, 2012. <http://www.theses.fr/2012PA112196> (accessed December 18, 2014).
- [2] J. Dong, H. Zhou, R. Wu, M. Ye, H. Zou, Specific capture of phosphopeptides by Zr⁴⁺-modified monolithic capillary column, *J. Sep. Science.* 30 (2007) 2917–2923. doi:10.1002/jssc.200700350.
- [3] M.F. Bedair, R.D. Oleschuk, Fabrication of porous polymer monoliths in polymeric microfluidic chips as an electrospray emitter for direct coupling to mass spectrometry, *Analytical Chemistry.* 78 (2006) 1130–1138. doi:10.1021/ac0514570.
- [4] K. Faure, M. Bias, O. Yassine, N. Delaunay, G. Cretier, M. Albert, et al., Electrochromatography in poly(dimethyl)siloxane microchips using organic monolithic stationary phases, *Electrophoresis.* 28 (2007) 1668–1673. doi:10.1002/elps.200600566.
- [5] J.M. Burke, E. Smela, A novel surface modification technique for forming porous polymer monoliths in poly(dimethylsiloxane)., *Biomicrofluidics.* 6 (2012) 16506–1650610. doi:10.1063/1.3693589.
- [6] M. Blas, M. Delaunay, N. Rocca, J.L. Microsystèmes lab on a chip et séparations de type chromatographique. *Spec. Analyse* 246 (2005) 17-27 .
- [7] D.R. Reyes, D. Iossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology,* *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623–2636. doi:10.1021/ac0202435.
- [8] M. Blas, N. Delaunay, J.-L. Rocca, Electrokinetic-based injection modes for separative microsystems, *Electrophoresis.* 29 (2008) 20–32. doi:10.1002/elps.200700389.
- [9] K.K.R. Tetala, M.A. Vijayalakshmi, A review on recent developments for biomolecule separation at analytical scale using microfluidic devices, *Analytica Chimica Acta.* 906 (2016) 7–21. doi:10.1016/j.aca.2015.11.037.
- [10] H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems, *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 390 (2008) 89–111. doi:10.1007/s00216-007-1692-2.
- [11] O. Rötting, W. Röpke, H. Becker, C. Gärtner, Polymer microfabrication technologies, *Microsystem Technologies.* 8 (2002) 32–36. doi:10.1007/s00542-002-0106-9.
- [12] D. Wu, J. Qin, B. Lin, Electrophoretic separations on microfluidic chips, *Journal of Chromatography A.* 1184 (2008) 542–559. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.119.
- [13] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, Glass chips for high-speed capillary electrophoresis separations with submicrometer plate heights, *Analytical Chemistry.* 65 (1993) 2637–2642.
- [14] Z.H. Fan, D.J. Harrison, Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections, *Analytical Chemistry.* 66 (1994) 177–184.
- [15] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices, *Analytical Chemistry.* 66 (1994) 1107–1113.
- [16] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, High-speed separations on a microchip, *Analytical Chemistry.* 66 (1994) 1114–1118.

- [17] S.V. Ermakov, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Computer Simulations of Electrokinetic Injection Techniques in Microfluidic Devices, *Analytical Chemistry*. 72 (2000) 3512–3517. doi:10.1021/ac991474n.
- [18] J.M. Karlinsey, Sample introduction techniques for microchip electrophoresis: A review, *Analytica Chimica Acta*. 725 (2012) 1–13. doi:10.1016/j.aca.2012.02.052.
- [19] V. Dolník, S. Liu, S. Jovanovich, others, Capillary electrophoresis on microchip, *Electrophoresis*. 21 (2000) 41–54.
- [20] K.B. Mogensen, H. Klank, J.P. Kutter, Recent developments in detection for microfluidic systems, *Electrophoresis*. 25 (2004) 3498–3512. doi:10.1002/elps.200406108.
- [21] W.R. Vandaveer, S.A. Pisas-Farmer, D.J. Fischer, C.N. Frankenfeld, S.M. Lunte, Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis, *ELECTROPHORESIS*. 25 (2004) 3528–3549. doi:10.1002/elps.200406115.
- [22] G.E. Yue, M.G. Roper, C. Balchunas, A. Pulsipher, J.J. Coon, J. Shabanowitz, et al., Protein digestion and phosphopeptide enrichment on a glass microchip, *Analytica Chimica Acta*. 564 (2006) 116–122. doi:10.1016/j.aca.2005.11.003.
- [23] H. Wang, J. Duan, H. Xu, L. Zhao, Y. Liang, Y. Shan, et al., Monoliths with immobilized zirconium ions for selective enrichment of phosphopeptides, *Journal of Separation Science*. 34 (2011) 2113–2121. doi:10.1002/jssc.201100168.
- [24] L. Zhang, X. Yin, Z. Fang, Negative pressure pinched sample injection for microchip-based electrophoresis, *Lab on a Chip*. 6 (2006) 258. doi:10.1039/b511924c.
- [25] N.T. Tran, I. Ayed, A. Pallandre, M. Taverna, Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods: An update, *Electrophoresis*. 31 (2010) 147–173. doi:10.1002/elps.200900465.
- [26] M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, T.J.D. Jørgensen, Highly Selective Enrichment of Phosphorylated Peptides from Peptide Mixtures Using Titanium Dioxide Microcolumns, *Mol Cell Proteomics*. 4 (2005) 873–886. doi:10.1074/mcp.T500007-MCP200.
- [27] H. Zhou, M. Ye, J. Dong, G. Han, X. Jiang, R. Wu, et al., Specific Phosphopeptide Enrichment with Immobilized Titanium Ion Affinity Chromatography Adsorbent for Phosphoproteome Analysis, *Journal of Proteome Research*. 7 (2008) 3957–3967. doi:10.1021/pr800223m.
- [28] T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P.J. Robinson, M.R. Larsen, SIMAC (Sequential Elution from IMAC), a Phosphoproteomics Strategy for the Rapid Separation of Monophosphorylated from Multiply Phosphorylated Peptides, *Mol Cell Proteomics*. 7 (2008) 661–671. doi:10.1074/mcp.M700362-MCP200.
- [29] D.E. Starkey, Y. Abdelaziez, C.H. Ahn, J. Tu, L. Anderson, K.R. Wehmeyer, et al., Determination of endogenous extracellular signal-regulated protein kinase by microchip capillary electrophoresis, *Analytical Biochemistry*. 316 (2003) 181–191. doi:10.1016/S0003-2697(03)00058-7.
- [30] W.-S. Wu, J.-L. Tsai, Analysis of src kinase and protein kinase c activity by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence, *Analytical Biochemistry*. 269 (1999) 423–425.
- [31] A. Namera, A. Nakamoto, T. Saito, S. Miyazaki, Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications, *J. Sep. Science*. 34 (2011) 901–924. doi:10.1002/jssc.201000795.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Tirer profit des nombreux avantages qu'offrent les systèmes miniaturisés en termes d'analyse dans l'optique de concevoir un laboratoire sur puce pour l'enrichissement et la séparation en ligne de phosphopeptides a constitué l'objectif principal de ce travail de thèse. Le but ultime d'un tel dispositif miniaturisé est de servir d'outil de diagnostic de certaines maladies neurodégénératives ou certains cancers pour lesquelles la phosphorylation est impliquée dans le processus physiopathologique.

Pour répondre à cet objectif, le développement de ce dispositif miniaturisé a été basé sur 3 parties : (i) une étude de la synthèse d'un monolithe organique par voie photochimique en microsystemes en PDMS et en verre, (ii) le développement d'un module de préconcentration de phosphopeptides basé sur la technologie des monolithes et la méthode IMAC et d'une méthode de séparation électrophorétique et (iii) l'intégration en ligne de ces modules au sein d'un microsysteme afin d'aboutir à la conception d'un laboratoire sur puce.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur deux études liées à la synthèse d'un monolithe à base d'EGMP et de BAA par voie photochimique dans des microsystemes. La première étude a concerné la synthèse localisée du monolithe dans des microcanaux en verre par photopolymérisation à l'aide d'un microscope à épifluorescence. La principale caractéristique de cette méthode réside dans la formation de monolithes avec des extrémités nettement définies en présence d'une faible quantité d'hydroquinone (60 µg) dans le mélange de polymérisation. Nous avons démontré que cet inhibiteur de la polymérisation empêchait la diffusion des radicaux libres en dehors de la zone irradiée. Cette technique permet également d'ajuster la longueur du monolithe formé par un simple

changement de l'objectif utilisé. Des monolithes d'une très faible longueur (160 μm) ont été obtenus en utilisant un grossissement de 63x. La deuxième étude a porté sur la photopolymérisation du monolithe organique dans un microcanal en PDMS. Ceci représente un défi majeur dans ce domaine en raison de la forte hydrophobie du matériel et de sa perméabilité importante à l'oxygène qui inhibe la polymérisation radicalaire. Nous avons développé une nouvelle stratégie de synthèse en exploitant les propriétés photochimiques d'amorceurs de différente nature. Ainsi, les amorceurs tels que le 2-méthyl-4'-(methylthio)-2-morpholino-propionophénone (IRG), le benzoin méthyl éther (BME) et le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA), possédant des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques élevés, ont permis d'initier rapidement la photopolymérisation avant que les réactifs du mélange réactionnel ne soient absorbés par le PDMS. Parmi eux, l'IRG qui n'a jamais été mentionné dans la littérature pour la synthèse de monolithe, présente une autre capacité de grande importance, celle d'ancrer le monolithe aux parois du canal. Nous avons ainsi développé une méthode simple et réalisable en une seule étape pour la synthèse et l'ancrage du monolithe à base d'EGMP dans des canaux en PDMS. C'est le résultat le plus innovant puisque la polymérisation de monolithe en PDMS a été très rarement décrite dans la littérature et c'est la première fois que le monolithe à base d'EGMP a été synthétisé dans des microcanaux.

Dans un deuxième temps, nous avons consacré une partie du travail à développer une méthode de séparation de phosphopeptides par électrophorèse sur puce en verre. Cette méthode a conduit à une séparation hautement résolutive ($R > 3$), rapide (moins de 2 min) et répétable d'un mélange de 4 peptides phosphorylés et non phosphorylés fluorescents modèles. La linéarité de la méthode a été démontrée dans une gamme de concentrations allant de 40 à 1330 nM. La limite de détection de l'ordre de 40-74 nM a été déterminée. Nous avons ainsi développé pour la première fois une méthode électrophorétique sur puce capable de séparer des phosphopeptides différant uniquement par leur site de phosphorylation, sans utilisation d'anticorps.

Enfin dans un troisième temps, nous nous sommes intéressés au couplage en ligne des modules de préconcentration sur support monolithique et de séparation/détection en microsystèmes en verre. Nous avons immobilisé des ions Zr^{4+} sur le monolithe à base d'EGMP pour former une matrice IMAC parfaitement efficace et spécifique pour l'enrichissement de peptides phosphorylés. Des performances élevées ont été atteintes avec

des facteurs d'enrichissement de 340 à 910 pour les phosphopeptides testés. Ce laboratoire sur puce a permis non seulement la détection de composés phosphorylés présents à des concentrations non détectables lors d'une séparation électrophorétique en microsysteme sans préconcentration mais également une séparation satisfaisante de composés de structures très proches. Cependant, l'élargissement des pics constaté lors de la séparation en ligne reste une entrave à l'obtention d'un facteur d'enrichissement plus élevé. D'autres optimisations telles que la réduction du temps de chargement ou la longueur du monolithe restent à élaborer afin d'améliorer l'efficacité des pics.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis de contribuer au développement de dispositifs miniaturisés intégrant différentes étapes de la chaîne analytique. Avec quelques optimisations supplémentaires, notamment en termes de géométrie du dispositif, le système conçu pourrait être utilisé comme outil de diagnostic pour l'analyse de biomarqueurs phosphorylés de certaines pathologies humaines.

Production Scientifique**Publications**

M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, F. Bayle, M. Guerrouache, C.H. Ha, B. Carbonnier, N. T. Tran. A new strategy for simultaneous synthesis and efficient anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchips. 2015, *Polymer* 66, 249-258.

S. Dziomba, M. Araya-Farias, C. Smadja, M. Taverna, B. Carbonnier, N. T. Tran. Solid supports for extraction and preconcentration of proteins and peptides in microfluidic devices: A review. En préparation, pour soumission au journal *Analytica Chimica Acta*.

S. Dziomba, M. Araya-Farias, M. Guerrouache, M. Taverna, B. Carbonnier, N. T. Tran. Short Communicate : Microscope-assisted UV-induced synthesis of well-defined phosphate monolithic plugs in glass chips for peptide preconcentration. En préparation, pour soumission au journal *Analytica Chimica Acta*.

M. Araya-Farias, S. Dziomba, B. Carbonnier, M. Guerrouache, I. Ayed, N. Aboud, M. Taverna, N. T. Tran. Lab-on-chip for polymer monolith-based preconcentration and separation of phosphopeptides. En préparation, pour soumission au journal *Lab on- a-chip*.

Communications orales

M. Araya-Farias, S. Dziomba, F. Bayle, M. Guerrouache, M. Woytasik, H. Cao, B. Carbonnier, M. Taverna, **T. Tran-Maignan**. Lab-on-a-chip for monolith-based preconcentration and separation of phosphopeptides. PacifChem 2, Hawaii, États-Unis, 15 – 20 décembre, 2015.

S. Dziomba, M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Tran. Online extraction and separation of phosphopeptides in glass microchips. Journée des doctorants de l'UMR 8612, Orsay, 1 juin, 2015.

M. Araya-Farias, M. Taverna, I. Ayed, M. Woytasik, C.H. Ha, F. Bayle, M. Guerrouache, B. Carbonnier, N.T. Tran. Développement d'un dispositif miniaturisé pour la préconcentration de phosphopeptides. AFSEP 2015, 11^e Congrès Francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages. Paris, 31 avril-2 mai, 2015.

M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, F. Bayle, M. Guerrouache, C. H. Ha, B. Carbonnier, N. T. Tran. A new strategy for simultaneous synthesis and anchorage of polymer monoliths in native PDMS microchannels: Towards a miniaturized enrichment

module for phosphopeptides. MSB2015, 31ST International Symposium on Microscale Bioseparations and Bioanalyses, Shanghai, China, 26-29 avril, 2015.

M. Araya-Farias. Optimization of critical parameters affecting the photopolymerization of monoliths in PDMS microchannels. Doc & post-doc day UMR CNRS 8612, Orsay, 16 juin, 2014.

Communications par affiche

S. Dziomba, M. Araya-Farias, M. Taverna, T. Tran. Online extraction and separation of phosphopeptides in glass microchips. Journée Recherche de l'UFR de Pharmacie, 120 novembre, 2015.

M. Araya-Farias, M. Taverna, M. Woytasik, E. Martincic, E. Dufour-Gergam, C.H. Ha, N.T. Tran. Parameters Governing The photopolymerization of Monolith in PDMS Microchannels. Journées de l'Ecole Doctorale Chimie de Paris Sud, Orsay, 1-2 octobre, 2014.

M. Araya-Farias. Synthesis of monoliths in PDMS Microchannels: Optimization of critical polymerization parameters. 8th International Summer School Nanosciences, Etolles, 22-27 Juin, 2014.

M. Araya-Farias, I. Ayed, M. Taverna, M. Couty, E. Dufour-Gergam, N.T. Tran. Synthèse de monolithe A base de méthylacrylate en microcanaux en PDMS pour l'enrichissement de phosphopeptides. Journées de l'Ecole Doctorale de Chimie de Paris-Sud, Orsay, 18 et 19 Septembre, 2013

M. Araya-Farias, N.T. Tran, M. Couty, E. Dufour-Gergam, C.H. Ha, I. Ayed, M. Taverna. Successful synthesis of monoliths in PDMS microchannels: towards an enrichment module for phosphopeptides ITP 2013, 20th International Symposium on Electro and Liquid Phase-Separation Techniques. Tenerife, Espagne, 6-9 octobre 2013.

M. Araya-Farias, I. Ayed, M. Taverna, M. Couty, E. Dufour-Gergam, N.T. Tran. Développement de phases stationnaires monolithiques en microsystèmes thermoplastiques pour la préconcentration de phosphopeptides. AFSEP 2013, 10^e Congrès Francophone de l'AFSEP sur les sciences séparatives et les couplages, Paris, 4-7 juin, 2013.