

**ÉCOLE DOCTORALE Des Sciences Chimiques (ED222)**  
**UMR 7199**

**THÈSE** présentée par :

**Robin DUFOSSEZ**

soutenue le : **08 Décembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**  
Discipline/ Spécialité : Chimie Biologique et Therapeutique

**Conception et synthèse de  
fluorotensioactifs pour des applications  
en microfluidique en gouttes**

**THÈSE dirigée par :**

**WAGNER Alain**

Docteur, Université de Strasbourg

**CHAUBET Guilhem**

Docteur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**GRIFFITHS Andrew**

Professeur, ESPCI, Université PSL

**ROMIEU Anthony**

Professeur, ICMUB, Université de Bourgogne

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**TAVERNA Myriam**

Professeur, institut Galien, Université de Paris-Saclay

**CONTINO-PEPIN Christine**

Professeur, UFR-ip STS, Université d'Avignon

---

**MEMBRE SCIENTIFIQUE INVITE :**

**MELNYK Patricia**

Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Lille



## Remerciements

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'équipe de Chimie Biofonctionnelle (BFC) de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg grâce à un financement de l'Ecole Doctorale des sciences Chimiques (ED222).

Je remercie le Pr. Andrew Griffiths, le Pr. Anthony Romieu, le Pr. Myriam Taverna et le Pr. Christine Pepin pour avoir accepté d'évaluer ces travaux. Je remercie également le Pr. Michael Ryckelynck et le Dr. Marie-Pierre Krafft pour avoir participé au suivi de cette thèse.

Je tiens à remercier Alain pour son accueil au sein de l'équipe, pour m'avoir confié ce projet et permis de découvrir ce domaine de la microfluidique en goutte. Merci pour ton suivi, et pour m'avoir permis d'apprendre et de progresser à chaque fois que je venais te voir pour discuter de mes petits problèmes.

Merci à toi Guilhem, pour m'avoir écouté pendant trois ans parler de mes éternelles synthèses de PEG et de tensioactifs, et pour avoir toujours été disponible pour répondre à mes quelques questions inopinées.

Et enfin, un gigantesque merci à toi Sylvain, pour m'avoir encadré, guidé, soutenu, corrigé, tout au long de ces trois ans, pour les travaux de thèse, la rédaction des articles et la rédaction de ce manuscrit. Merci de m'avoir aidé et écouté dans mes moments de doutes et dans mes moments de joie. Je n'en serais pas à rédiger ces remerciements sans ton investissement colossal.

Merci également aux membres de l'équipe de Michael, en particulier Michael et Stef, et à Marie-Pierre Krafft, pour m'avoir aidé au cours de mes travaux et pour votre aide précieuse au cours de nos collaborations.

Je remercie le Pr. Patricia Melnyk, qui m'a encouragé dès le début de mon parcours universitaire à faire de la recherche, qui m'a guidé, encadré, soutenu dans mes démarches tout au long de la dernière décennie. Merci de m'avoir guidé vers cette opportunité de thèse à Strasbourg, qui m'a permis de découvrir un nouvel univers de recherche.

Je voudrais également remercier l'Ecole de l'INSERM Liliane Bettencourt, sans qui je n'aurais jamais réalisé ce double cursus universitaire et cette thèse, ainsi que l'équipe pédagogique de

la faculté de pharmacie de Lille qui a accepté d'adapter mon cursus pour que je puisse profiter de cette opportunité, et j'en profite pour remercier les différentes équipes qui m'ont accueilli tout au long de mon parcours de recherche, ainsi que mes différents encadrants : Jamal et Patricia ; Damien et Pr. Depez.

Je tiens à remercier tous les membres de mon équipe à BFC, pour leur présence, conseils, aides, amusements partagés au cours de ces trois ans. Je commence par les plus anciens : Charlotte, pour ton accueil, ton délire, ton sourire permanent, qui m'a mis dans l'ambiance dès les premiers jours. Victor, pour m'avoir encouragé dans ma consommation de sucreries, pour ta grande paillasse, et pour m'avoir fait découvrir l'intérêt d'acheter des bouteilles de Fisher, juste pour les bouchons refermables.

Et bien sûr, Tony ! Merci pour tout, pour nos discussions, scientifiques ou non, pour m'avoir « pris sous ton aile », aidé, soutenu, appris tant de nouvelles choses. Merci pour avoir partagé ton amour de la bière, fait découvrir les bars de Strasbourg, Franchi, et leur chantilly. Ton amour de la science fait chaud au cœur, et elle te le rend bien, et j'espère que tu continueras à t'épanouir toujours autant dans la recherche et à continuer à t'amuser. J'en profite pour remercier également Laurène et la petite princesse, pour votre accueil, gentillesse, et délire et permis d'avoir un peu du Nord dans l'Est.

Au tour de la flopée de thésards et membres de l'équipe : Julien, Enes, Valentine, Ilias, Lorenzo, avec qui j'ai pu passer des moments de détente et des moments de travail dans la bonne humeur, de qui j'ai pu apprendre un peu de turc, de grec et d'italien, et de nouveaux jeux de cartes ! Je remercie également la nouvelle génération : Indrèalie et Louis pour votre petit vent de fraîcheur, et je vous souhaite de vous épanouir pendant vos trois ans de thèse. Safae, merci d'avoir été là avec moi sur le projet, de m'avoir écouté pester en direct sur mes tensioactifs, de m'avoir aidé quand j'en avais besoin, et pour nos échanges scientifiques autour de nos travaux.

Et bien sûr, merci à toi Ketty, pour m'avoir formé en flu, avoir toujours répondu présente lorsque j'avais des questions, sans oublier tes supers gâteaux ! Merci également à tous les permanents et semi-permanents du labo : Michel, pour tes conseils, tes synthèses industrielles de PEG, tes purifications 2.0 et ta caisse à outils. Fanny, pour ton petit sourire permanent, et nos discussions au cours des pauses midi. Et bien sûr, Marc, Isabelle, pour votre

présence et nos discussions. Et sans oublier Françoise, sans qui le service ne tournerait pas, votre présence m'a été indispensable pour solutionner mes innombrables problèmes de gestion.

Il me reste deux personnes de l'équipe à remercier (non, je ne vous ai pas oublié !). Héloïse : ta présence au laboratoire a été un soutien continu tout au long de ma thèse. Merci pour m'avoir conseillé, aidé, toujours soutenu ; merci pour m'avoir écouté parler parler et encore parler, merci pour tes petits cadeaux, les moments café/thé pour se remonter le moral, et tellement d'autres choses. Merci d'être toi.

Et bien sûr, Jessica ! On a commencé ensemble cette aventure, matché très rapidement, et on a eu des hauts et de bas mais on a toujours continué à avancer ensemble. Je n'ai pas les mots pour dire à quel point tu as marqué ma thèse, et je n'aime pas trop m'épancher dans un document public, mais j'espère que tu sais à quel point tu comptes pour moi, et on aura pas mal d'occasions de se revoir dans le Nord.

J'aimerais remercier mes amis, ceux qui m'ont accompagné au long de mes péripéties : Nina, Raph, Camille, sans qui je n'aurais jamais vécu de telles études de pharmacie, merci infiniment pour les soirées, les week-ends, les fêtes, les vacances, et pour tout le bonheur que vous m'avez apporté par votre présence.

Merci à Iva et Bastien pour nos petits moments crêpes, repas, bière/vin et nos discussions tranquilles avec vos petites boules d'amour, Merci à Pauline et Nico pour tous ces bons moments de détente et de fun chaque fois que je remontais reprendre une bouffée d'air du Nord.

Merci à toi Alex, qui avec qui j'ai pu partager tellement de bons moments depuis tant d'années, et qui m'a vu dans toutes les conditions possibles et a toujours été là pour moi. Ce n'est que le début, on a encore beaucoup de bons moments qui nous attendent !! Merci fréro !

Merci enfin à ma famille, sans qui je n'en serais pas là, à mes parents, à Camille, ton soutien et ta présence tout au long de nos études communes, Clara, qui va bientôt comprendre ma peine, et Kévin, qui partage mon amour de la bière et de la lecture. Et bien sûr les autres membres de la famille : James, Inday, Dodo, Arthur et Mila, nos petites boules d'amour au quotidien.



## Liste des abréviations

µm	Micro mètre
AA	Acide aminé, Amino acid
Ab	Antibody
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
Ar	Argon
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
attoM	Attomolaire
BARAC	Biaryl-azacyclooctynone
BCN	Bicyclononyne
BOC	<i>tert</i> -Butoxycarbonyle
BSA	Bovine Serum Albumine
CDD	Charge-coupled device
C.V	Coefficient de variation
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CITE-seq	Cellular Indexing of Transcriptomes and Epitopes
CMC	Concentration Micellaire Critique
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
CRP	C reactive Protein
Cter	C-terminal
CuAAC	Copper catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
Cy3/5	Cyanine 3/5
Da	Dalton
DBCO	DiBenzocyclooctyne
DCM	Dichlorométhane
ddELISA	Droplet digital ELISA
ddPCR	Droplet digital PCR

DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMF	<i>N, N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOC	Degree of Conjugation
DVS	Divinyl sulfone
Drop-seq	Droplet-Sequencing
dTG	Dendritic Triglycerol
E. Coli	Escherichia coli
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide, <i>N</i> -Ethyl- <i>N'</i> -(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELISA	Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
EtOAc	Acétate d'éthyle
Fab	Antigen-binding fragment
Fc	Crystallizable fragment
FCS	Fetal calf serum
femtoM	Femtomolaire
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
HATU	hexafluorophosphate de (diméthylamino)- <i>N,N</i> -diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium
HFE	Hydrofluoroéthers
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HLD	Hydrophilic-lipophilic deviation
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometer
IgG	Immunoglobuline G
IVT	<i>In-vitro</i> transcription

IDG	Linear diglycerol
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LCMS	Liquid chromatography mass spectrometry
LRMS	Low resolution mass spectrometry
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight
MeOH	Methanol
MMP-9	Matrix-metalloprotéase 9
Mp	Melting point
MsCl	Mesyl chloride
N <sub>3</sub>	Azoture
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
nm	Nanomètre
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NMR	Nuclear magnetic resonance
NTA	nitrolacétate
NTA-Ni	Nitrolacétate complexé à un Nickel
OD <sub>600</sub>	Optical density measured at 600 nm
OCT	Cyclooctyne
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDMS	Polydiméthylsiloxane
Pd/C	Palladium sur charbon
PEG	Polyéthylèneglycol
PFAS	<i>Per</i> -Fluoroalkyles
PFPE	Perfluoropolyéther
pL	Picolitre
PMT	Photomultiplier tube
PPG	Polypropylène glycol
REAP-seq	RNA expression and protein sequencing
RGD	Arginine-Glycine-Acide aspartique
RI ou R.I	Relocation Index/Index de relocalisation

RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SIMOA	Single molecule array
SPAAC	Strain promoted azide-alkyne cycloaddition
SPPS	Solide-phase peptid synthesis
SVF	Sérum de veau foetal
TAMRA	Tetraméthylthodamine
TFA	Acide trifluoroacétique, Trifluoroacetic acid
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
TLC	Thin layer chromatography
TMP	2,4,6-triméthylpyridine
TMTH	3,3,6,6-tetraméthylthiacyclohéptyne
TSCI	Température de solution critique inférieure
TsCl	Tosyl chloride
W/O	Water in Oil

## I) Préambule

Au fil des dernières décennies, la microfluidique en gouttes s'est développée. Cette méthode de miniaturisation, dans laquelle deux phases non miscibles (eau/huile) sont utilisées pour former des gouttes, est utilisée pour l'analyse et la détection de molécules et biomolécules. Elle a ainsi émergé en tant que technologie d'intérêt en biologie, notamment pour l'étude de la génomique et de la transcriptomique, et pour l'observation de cellules isolées dans des gouttes d'eau dans une phase huileuse, permettant d'identifier des variations au sein d'ensembles de cellules d'une même population. Cette technique présente également un intérêt important pour l'étude des protéines et de la sécrétion cellulaire, l'encapsulation en gouttes formant un milieu clos permettant d'accumuler facilement les molécules sécrétées. L'ensemble des applications développées nécessitent la formation de gouttes de même taille et stables dans le temps. Cela est permis par l'utilisation de tensioactifs, qui vont se placer à l'interface huile/eau des gouttes. Ces tensioactifs présentent un potentiel encore peu exploité, en effet leur présence à l'interface des gouttes forme une surface exploitable pour interagir de manière sélective avec le contenu encapsulé.

Les travaux décrits dans cette thèse ont porté sur le développement de fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés pour transformer l'interface interne des gouttes en surface fonctionnalisée capable d'interagir avec le contenu des gouttes, pour développer ainsi des applications en microfluidique en gouttes. Plus précisément, les travaux vont décrire la synthèse, caractérisation chimique et physique de nouveaux tensioactifs portant des azotures sur leur têtes hydrophiles. L'étude de leurs capacités à former des interfaces fonctionnalisées par des anticorps a été adressée et une nouvelle méthode d'immunoessai à l'interface huile/eau des gouttes a ainsi été développée.

Ce manuscrit de thèse est divisé en plusieurs parties. L'introduction générale va présenter les concepts sur lesquels les travaux de cette thèse ont été développés : tout d'abord, la microfluidique en gouttes et ses applications principales, suivi de diverses méthodes de détections de protéines en gouttes. Ensuite, les tensioactifs sont définis et ceux couramment utilisés en microfluidiques en gouttes sont décrits. Enfin les diverses stratégies utilisées en microfluidique en gouttes pour fonctionnaliser l'interface des gouttes sont présentées. Après cette introduction, les objectifs définis de thèse sont expliqués, puis les

travaux réalisés sont discutés en deux parties différentes. La première partie décrit la mise en place d'une nouvelle méthode d'immunoessai en goutte reposant sur l'utilisation de tensioactifs pré-fonctionnalisés pour transformer la surface interne des gouttes en surface de capture d'analyte. Puis la deuxième partie va discuter du développement d'une nouvelle famille de tensioactifs et d'anticorps conjugués afin de déterminer les paramètres structuraux impliqués dans la capacité à fonctionnaliser la surface des gouttes et à produire des émulsions stables. Enfin le bilan des travaux de cette thèse est réalisé dans la conclusion générale.

## Table des matières

Remerciements .....	3
Liste des abréviations .....	7
I) Préambule .....	11
Table des matières .....	13
II) Introduction.....	17
1. La microfluidique en gouttes.....	17
1.1. Généralités .....	17
1.2. Formation de gouttes.....	18
1.2.1. Concept.....	18
1.2.2. Géométries de production : .....	19
1.3. Manipulation des gouttes .....	20
1.3.1. Principales méthodes utilisées pour manipuler les gouttes .....	21
1.3.2. Pico-injection des gouttes .....	22
1.3.3. Encapsulation, incubation et immobilisation des gouttes .....	22
1.4. Détection et tri des gouttes.....	24
1.4.1. Détection optique.....	24
1.4.2. Méthode de détection non optique .....	24
1.4.3. Tri.....	24
1.5. Applications de la microfluidique en gouttes.....	26
1.5.1. Chimie.....	26
1.5.2. Biologie .....	26
2. Détection de protéines en microfluidique en gouttes .....	29
2.1. Introduction à la détection de protéines .....	29
2.2. Analyse des protéines par amplification d'oligonucléotides .....	30
2.3. Détection de protéines par activité enzymatique.....	31
2.3.1. Détection directe.....	31
2.3.2. Détection indirecte.....	32
2.4. Les Immunoessais et leurs applications en microfluidique en gouttes.....	32
2.4.1. Contexte et principe .....	32
2.4.2. Développement des immunoessais en gouttes avec détection par fluorescence....	34
2.4.3. Immunoessais digitaux en gouttes.....	42
3. Les tensioactifs en microfluidique en gouttes.....	43
3.1. Rôle des tensioactifs dans la stabilité des émulsions et la dispersité de taille des gouttes	43
3.2. Évaluations des propriétés des tensioactifs .....	45

3.2.1.	Paramètres généraux .....	45
3.2.2.	Tension superficielle.....	45
3.2.3.	Biocompatibilité .....	46
3.3.	Composition des tensioactifs fluorés en microfluidique en gouttes.....	47
3.3.1.	Influence de la phase continue sur la composition des tensioactifs.....	47
3.3.2.	Structure des tensioactifs courants.....	47
3.3.3.	Nouvelles structures de têtes hydrophiles (non fonctionnalisées).....	50
3.3.4.	Tensioactifs modifiables par stimulus externe.....	53
3.4.	Tensioactifs fluorés et rétention de molécules dans les gouttes.....	54
4.	Fonctionnalisation de l'interface huile/eau en microfluidique en goutte .....	56
4.1.	Fonctionnalisation par des composés non fluorés.....	56
4.2.	Utilisation de fluorotensioactifs fonctionnalisés et pré-fonctionnalisés .....	58
4.3.	Utilisation de fluorotensioactifs chargés.....	61
4.4.	Fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés par groupement chimique click.....	62
4.4.1.	La cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne tendu (SPAAC) .....	63
4.4.2.	Synthèse de fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés pour des SPAAC en gouttes .....	64
III)	Objectifs des travaux de Thèse .....	67
IV)	Développement d'un immunoessai en surface de gouttes par relocalisation de fluorescence	69
1.	Préambule .....	69
2.	Introduction et travaux de notre équipe antérieurs à la thèse.....	69
2.1.	Utilisation de la surface des gouttes comme surface fonctionnalisée.....	69
2.2.	Fonctionnalisation de surface .....	71
3.	Synthèse des têtes hydrophiles pré-fonctionnalisées.....	72
3.1.	Structure générale des tensioactifs.....	72
3.2.	Synthèse de la partie terminale azotures des têtes hydrophiles .....	73
3.3.	Synthèse des têtes hydrophiles.....	74
3.3.1.	Tête hydrophile PEG <sub>4</sub> -diN <sub>3</sub> .....	74
3.3.2.	Tête hydrophile Ethyle-triazine-tetraN <sub>3</sub> .....	75
4.	Synthèse et caractérisation chimique des fluorotensioactifs .....	76
4.1.	Protocoles de synthèse des tensioactif dibloc .....	76
4.2.	Synthèse des tensioactifs pré-fonctionnalisés .....	77
4.3.	Caractérisation chimique des tensioactifs .....	77
4.3.1.	Spectrométrie Infrarouge.....	78
4.3.2.	RMN du Fluor .....	79
4.3.3.	Comparaison des deux méthodes : IR et RMN <sup>19</sup> F .....	81
5.	Fonctionnalisation de la surface des gouttes par des anticorps.....	84

5.1.	Bioconjugaison d'anticorps .....	84
5.2.	Bioconjugaison de Trastuzumab par du BCN et des fluorophores.....	85
5.3.	Validation de la SPAAC à la surface des gouttes .....	86
6.	Développement d'un immunoessai en surface de gouttes .....	89
6.1.	Bioconjugaison des anticorps de l'immunoessai.....	89
6.2.	Validation de la SPAAC avec les anticorps de capture .....	90
6.3.	Validation de l'immunoessai en gouttes .....	92
7.	Immunoessai avec pico-injection de la GFP .....	95
8.	Gamme de détection de l'immunoessai .....	97
9.	Sensibilité de détection de l'immunoessai :.....	100
10.	Détection de protéines dans un milieu complexe de lyse cellulaire.....	101
11.	Conclusion et perspectives.....	103
V)	Etude de l'influence de la structure de l'alcyne et de la tête hydrophile des tensioactifs sur la fonctionnalisation et stabilisation d'émulsions en microfluidique en gouttes.....	107
1.	Préambule .....	107
2.	Introduction.....	107
3.	Etude de la relation entre la structure des réactifs de la SPAAC et le greffage en gouttes....	108
3.1.	Etude de l'influence de l'alcyne tendu sur la fonctionnalisation de surface des gouttes	108
3.1.1.	Effet de la nature et du DOC moyen d'alcyne tendu des anticorps sur la SPAAC en gouttes	108
3.1.2.	Effet de la nature de l'alcyne tendu sur le greffage en condition de culture cellulaire	112
3.2.	Etude de l'influence du nombre d'azotures des têtes hydrophiles sur la saturation de surface des gouttes .....	113
3.2.1.	Saturation de la surface des gouttes avec des anticorps-DBCO .....	113
3.2.2.	Saturation de la surface des gouttes avec des sondes moléculaire DBCO.....	115
3.3.	Etude de l'influence de la structure des têtes hydrophiles des tensioactifs sur la fonctionnalisation de surface.....	118
3.3.1.	Structure générale des tensioactifs synthétisés.....	118
3.3.2.	Synthèse des têtes hydrophiles à connecteurs PEGs .....	120
3.3.3.	Synthèse des têtes hydrophiles à connecteurs hydrophobes.....	121
3.3.4.	Synthèse de la tête hydrophile Sulfone-diN <sub>3</sub> .....	123
3.3.5.	Synthèse de la tête hydrophile (PEG <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -diN <sub>3</sub> .....	124
3.3.6.	Synthèse des tensioactifs .....	125
3.4.	Etude de l'influence du connecteur sur l'efficacité de la SPAAC en surface de gouttes.	127
4.	Etude Structure-stabilité des gouttes.....	131
4.1.	Etude de l'influence des têtes hydrophiles sur la stabilité des gouttes .....	131

4.1.1.	Méthodes d'études de la stabilité des émulsions .....	131
4.1.2.	Mesure de la baisse de tension superficielle induite par les tensioactifs .....	132
4.1.3.	Mesure de la stabilité mécanique des émulsions .....	135
4.1.4.	Expériences supplémentaires de déstabilisation .....	138
4.1.5.	Liens entre stabilité mécanique et baisse de tension superficielle .....	139
4.2.	Impact du greffage d'anticorps en surface de gouttes sur la stabilité des émulsions ....	141
5.	Etude des liens entre les paramètres structuraux des tensioactifs leur permettant de fonctionnaliser la surface des gouttes et ceux leur permettant de stabiliser les émulsions.....	143
6.	Conclusion et perspectives.....	145
VI)	Conclusion générale .....	147
VII)	Annexes .....	149
VIII)	Partie expérimentale .....	163
	Bibliographie.....	237

## II) Introduction

### 1. La microfluidique en gouttes

#### 1.1. Généralités

La microfluidique est une science qui étudie le comportement de fluides dans des canaux à l'échelle micrométrique. Un de ses sous-domaines est la microfluidique en gouttes, dans lequel deux phases non miscibles sont utilisées pour produire des gouttes du femtolitre au microlitre dans des canaux de puces microfluidiques.<sup>1,2</sup> L'émulsion formée est composée d'une phase encapsulée ou disperse (dans les gouttes) entourée d'une phase continue (autour des gouttes). Généralement, et notamment pour les applications biologiques, la phase disperse est une phase aqueuse, et la phase continue une phase huileuse (Figure 1).<sup>1,3,4</sup>

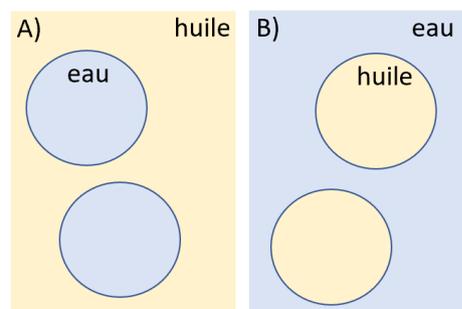


Figure 1: Exemples d'émulsions. A) Eau dans Huile ; B) Huile dans Eau

Utiliser la microfluidique en gouttes dans les applications biologiques permet notamment :

- L'utilisation de faibles volumes d'échantillons, et un contrôle fin du volume des gouttes. Cela permet une quantité restreinte de réactifs en goutte et la concentration des événements à observer dans ces volumes faibles
- Un haut débit de production et d'analyse des gouttes
- Un ratio surface/volume des gouttes important
- Favoriser le mélange de plusieurs phases miscibles, contrairement aux systèmes microfluidiques classiques en flux continu, et également de diminuer les risques de contamination inter-expériences, grâce à l'utilisation d'une phase continue<sup>4,5</sup>
- Séparer des réactifs, réactions ou espèces chimiques ou biologiques et d'effectuer simultanément de nombreux essais et analyses<sup>2</sup>

Les gouttes formées peuvent également être manipulées après production, par exemple pour y ajouter des réactifs, par fusion avec une autre goutte ou pico-injection d'une

phase miscible.<sup>5,6</sup> Les gouttes peuvent également être fragmentées, subdivisant leur contenu, ou encore observées et triées, pour isoler des sous-population de gouttes.<sup>3,5</sup> Pour la plupart des applications, un élément central est nécessaire : une monodispersité de la taille/volume des gouttes.<sup>7</sup>

## 1.2. Formation de gouttes

### 1.2.1. Concept

La formation de gouttes en microfluidique est permise par la rencontre de deux phases non miscibles, générant une tension de surface/tension superficielle ( $\gamma$ ). Cette force exprimée en  $\text{mN.m}^{-1}$  (force par unité de longueur) quantifie le coût énergétique de création d'une interface. Pour réduire la tension superficielle, la phase disperse se déforme et se segmente en gouttes dans la phase continue, la forme sphérique des gouttes permettant de minimiser la surface de contact entre les phases.<sup>8</sup>

Dans les systèmes microfluidiques, la formation des gouttes peut être caractérisée par le nombre capillaire ( $Ca$ ) (sans unité), selon l'équation :

$$Ca = \frac{\mu V}{\gamma}$$

Avec  $\mu$  la viscosité dynamique de la phase continue ( $\text{Pa.s}$  ou  $\text{N.s.m}^{-2}$ ),  $V$  la vitesse de l'écoulement ( $\text{m.s}^{-1}$ ), et  $\gamma$  la tension superficielle ( $\text{N.m}^{-1}$ ). Le nombre capillaire représente donc le rapport entre les forces visqueuses et les forces de surface (tension superficielle) entre les phases. Lorsque le nombre capillaire est faible ( $< 0.01$ ), l'effet de tension domine sur les forces de viscosité et favorise la formation de gouttes contrôlée par la géométrie des canaux microfluidique immédiatement lors du contact des deux phases.<sup>4,9,10</sup> En revanche un nombre capillaire élevé signifie que la force de viscosité domine, défavorisant la formation de gouttes bien définies et monodisperses, en favorisant l'étirement puis le cisaillement de la phase disperse au contact de la phase continue.<sup>9,11</sup> Le nombre capillaire et le débit des phases sont deux éléments importants pour définir la fréquence de production des gouttes et leur taille.<sup>12</sup>

Les techniques manuelles d'agitation et de mixage des phases non miscibles conduisent à l'obtention d'émulsions polydisperses, tandis que l'utilisation de systèmes de canaux microfluidiques peut permettre d'aboutir à la production d'émulsions formées de gouttes homogènes monodisperses. La mono ou polydispersité des gouttes est définie par le

calcul du coefficient de variation (C.V) du volume des gouttes, obtenu en divisant l'écart-type de la distribution du diamètre ou volume des gouttes par le diamètre ou volume moyen des gouttes. Les émulsions produites par des systèmes de microfluidique en gouttes ont généralement un C.V bas, inférieur à 5%.<sup>13</sup>

Parmi les méthodes utilisables pour obtenir des gouttes, on retrouve les systèmes de production passifs et actifs. Ces systèmes de production de gouttes monodisperses sont souvent associés à l'utilisation de tensioactifs ou de nanoparticules solides, pour diminuer la tension de surface entre les phases, permettant de réduire le risque de fusion des gouttes (coalescence).<sup>14,15</sup>

Les systèmes de productions passifs reposent sur le débit des phases et la géométrie et structure des canaux microfluidiques pour former des gouttes.<sup>16</sup> Parmi les géométries de canaux les plus courantes se trouve la jonction en T, le co-flow, ou le flow-focusing (Figure 2). Les systèmes de productions actifs ajoutent aux géométries employées dans les méthodes passives l'utilisation d'un stimulus externe : électrique, magnétique, vibrationnel, thermique, permettant de varier facilement la taille des gouttes durant la production sans toucher aux débits des deux phases.<sup>11</sup>

Plusieurs autres paramètres vont également influencer la formation des gouttes, comme la mouillabilité de la phase continue sur les parois des canaux ou encore la concentration de tensioactifs.<sup>17</sup>

### 1.2.2. Géométries de production :

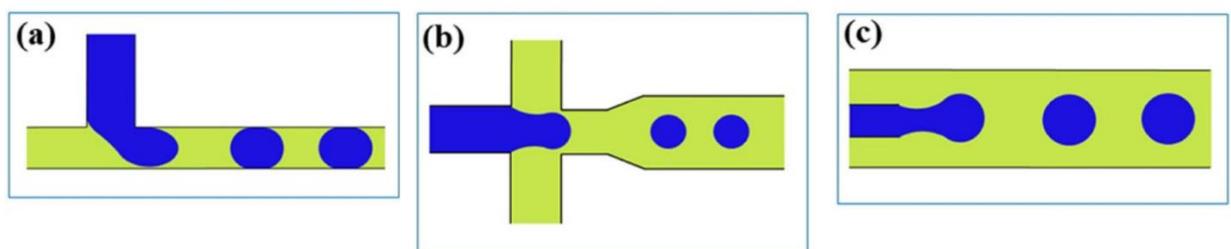


Figure 2: Principales géométries de production de gouttes utilisées : (a) : Jonction en T ; (b) Flow-focusing ; (c) : Co-flow. Adapté de <sup>4</sup>

Dans les **systèmes en jonction en T** (Figure 2, A) les deux phases se rencontrent à une jonction avec un angle de contact à 90°. Les **systèmes flow-focusing** (Figure 2, B) séparent la phase continue en deux, qui vont entourer et compresser la phase dispersée arrivant en

perpendiculaire. Enfin, dans la **géométrie co-flow** (Figure 2, C) le canal de phase disperse est inséré dans le canal de phase continue, et la phase disperse est injectée dans la phase continue.<sup>4,11,18</sup>

Dans ces trois géométries de canaux, la formation des gouttes peut se faire selon trois régimes : « squeezing », « dripping » ou « jetting », en fonction de la valeur du nombre capillaire et du débit des phases.<sup>11,12,19–22</sup> Un nombre capillaire faible conduit lors de la rencontre des deux phases à l'accumulation de la phase disperse à l'embouchure des canaux, puis à l'isolement d'une goutte (de la largeur des canaux) causée par un effet de pression et de tension superficielle (« squeezing »). Un nombre capillaire plus élevé conduit à la formation d'un filament de phase disperse dans la phase continue, et à la formation de gouttes plus petites que les canaux par cisaillement du filament (« dripping », « jetting »).<sup>22</sup>

Chaque géométrie a ses avantages et inconvénients, notamment sur la facilité de design des canaux, la taille du motif, ou la dispersion des gouttes formées. Les géométries en jonction en T et en flow-focusing vont par exemple permettre de produire des émulsions avec des gouttes monodisperses, tandis que le système co-flow va favoriser le « jetting », qui complexifie la production de gouttes homogènes.<sup>4</sup> Nous avons utilisé dans nos travaux une géométrie en flow-focusing, qui est une des géométries les plus communes permettant un bon contrôle de l'uniformité de volume des gouttes. De plus, le même motif peut permettre de produire des gouttes de différents volumes (toujours monodisperses), selon les paramètres de production employés.<sup>4,23</sup>

### 1.3. Manipulation des gouttes

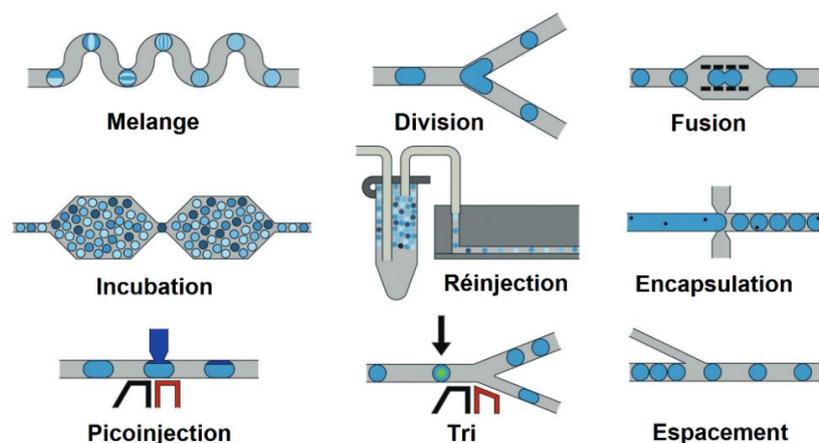


Figure 3: Méthodes employables pour manipuler les gouttes. Adapté de <sup>5</sup>

### 1.3.1. Principales méthodes utilisées pour manipuler les gouttes

Le tableau suivant décrit les principales méthodes utilisées pour manipuler et observer les gouttes après production (Figure 3, Tableau 1). Plusieurs méthodes, telles que la pico-injection, l'encapsulation de cellules dans des gouttes, ou encore la détection dans les gouttes ont été utilisées au cours de mes travaux de thèse, et vont être détaillées dans les paragraphes suivants.

Tableau 1 : Méthodes de manipulation de gouttes après production

Procédé	Application(s) et Méthode(s)
Mélange	L'homogénéité des gouttes est nécessaire pour avoir des émulsions uniformes. Or les flux laminaires en microfluidique ne favorisent pas l'homogénéisation du contenu des gouttes, lors de la production ou après fusion ou pico-injection par exemple. L'homogénéisation du contenu des gouttes peut être favorisée par méthode passive (géométrie de canaux (serpentins, Figure 3) <sup>24</sup> ) ou par mélange actif (chauffage, ondes acoustiques...) <sup>11,25,26</sup>
Division	Le volume des gouttes peut être réduit après production, en divisant des gouttes mères en gouttes filles (Figure 3). Cette division peut permettre d'extraire une partie du contenu des gouttes pour analyse ou observation, ou pour augmenter le nombre de gouttes afin d'effectuer différents essais ou analyses. La division peut être faite de manière passive, en réinjectant des gouttes dans une jonction en T, la vitesse des gouttes et la géométrie des canaux entraînant une division. <sup>27</sup> Les gouttes peuvent également être divisées via une méthode active (par exemple avec des ondes acoustiques) <sup>28</sup>
Fusion/coalescence contrôlée	Le volume des gouttes peut être augmenté après production, par fusion de plusieurs gouttes (Figure 3). Cette opération peut permettre d'initier des réactions par la mise en contact du contenu de deux types de gouttes différentes, ou être utilisée pour diluer le contenu des gouttes. La fusion peut être réalisée de manière passive, avec le contact physique de deux gouttes suivies de leur fusion (au moment du contact ou au moment de la séparation des deux gouttes). <sup>2,11,29-31</sup> La coalescence contrôlée peut-être inefficace lors de l'utilisation de tensioactifs. Des méthodes de coalescences actives existent pour cela, en déstabilisant l'interface de gouttes proches pour entraîner leurs fusion (potentiel électrique, <sup>32,33</sup> ondes acoustiques, chauffage localisé) <sup>34,35</sup>

### 1.3.2. Pico-injection des gouttes

Un autre moyen pour ajouter du contenu à une goutte déjà formée est la pico-injection (Figure 4). Cette méthode repose sur le même principe que la fusion active par électrocontrôle. Des gouttes sont réinjectées, et lorsqu'une goutte passe devant le pico-injecteur, un champ électrique est appliqué, déstabilisant l'interface, en même temps qu'une phase aqueuse arrive à son contact, par une jonction en T, permettant l'entrée de la phase aqueuse dans la goutte. Cette méthode ne permet d'injecter dans la goutte qu'un volume limité, mais évite de devoir recourir à la production de différentes gouttes pour leur fusion.<sup>6,36</sup>

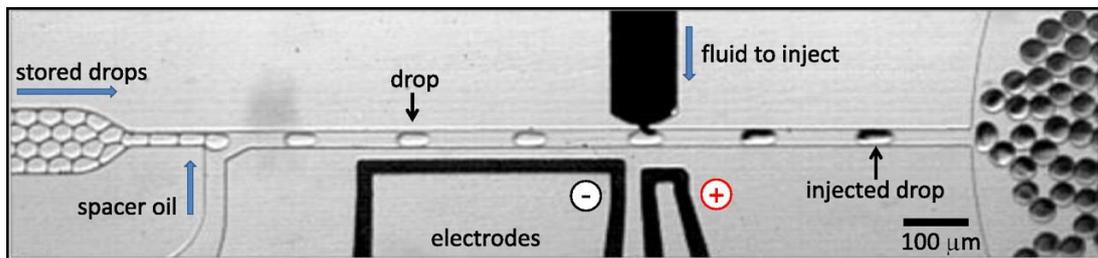


Figure 4: Pico-injection de gouttes. Adapté de <sup>6</sup>

### 1.3.3. Encapsulation, incubation et immobilisation des gouttes

La microfluidique en gouttes est particulièrement adaptée pour l'étude de cellules uniques permettant d'identifier des hétérogénéités au sein de populations cellulaires. Pour cela, chaque cellule doit être observée indépendamment, il est donc nécessaire de pouvoir encapsuler dans les gouttes une seule cellule. L'encapsulation cellulaire est généralement faite de manière passive, avec les cellules dispersées arbitrairement dans la phase aqueuse (Figure 5). La distribution des cellules dans les gouttes est déterminée par la loi de Poisson :

$$p(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

Avec  $k$  le nombre de cellules dans la goutte, et  $\lambda$  le nombre moyen théorique de cellules par gouttes.<sup>37,38</sup> Le facteur  $\lambda$  dépend de la concentration de cellules dans la phase aqueuse avant encapsulation et du volume moyen des gouttes. Par exemple, pour  $\lambda = 1$ , c'est-à-dire pour un nombre moyen théorique de 1 cellule par goutte, la répartition d'occupation des gouttes donne environ 58% de gouttes vides, ~37% de gouttes contenant une cellule, et ~26% de gouttes contenant deux cellules ou plus. Généralement, le taux d'encapsulation est calculé afin d'obtenir uniquement des gouttes vides ou contenant une seule cellule ( $\lambda < 0,1$ ). Cela

résulte néanmoins en la production d'un grand nombre de gouttes vides, ce qui diminue le débit des analyses.<sup>39</sup>

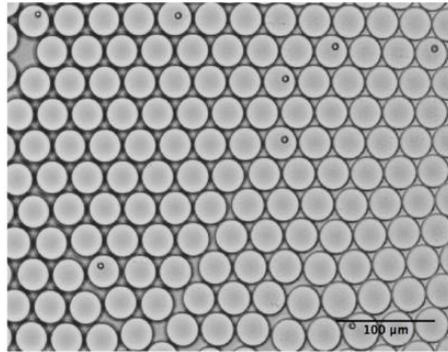


Figure 5 : Encapsulation de cellules suivant une distribution de Poisson. Pour éviter plus d'une cellule par goutte, le facteur  $\lambda$  est fixé à 0,1, résultant à environ 10% de gouttes occupées. Adapté de <sup>39</sup>

Différentes autres méthodes passives et actives ont été mises au point pour augmenter le nombre de gouttes contenant des cellules sans pour autant augmenter le taux de multi-encapsulation. Par exemple, il est possible d'ordonner les cellules avant la formation des gouttes, permettant de réduire fortement les gouttes vides ou contenant plusieurs cellules, avec jusqu'à 80% de gouttes occupées par une seule cellule.<sup>37,40,41</sup> Ces systèmes nécessitent cependant un débit suffisamment rapide et des canaux suffisamment longs pour l'alignement des cellules ainsi que des concentrations élevées de cellules dans la phase aqueuse.

D'autres méthodes sont utilisables pour permettre l'encapsulation mono cellulaire, comme la division de gouttes pour passer d'une encapsulation multi-cellules à mono-cellules, ou l'utilisation de méthodes d'encapsulation actives, dans lesquels les gouttes se forment lors de la détection d'une cellule.<sup>37,42-44</sup> L'encapsulation passive peut également être couplée avec un tri de gouttes, pour isoler les gouttes contenant une cellule et éliminer les autres.<sup>45</sup>

Après une encapsulation ou une production de gouttes, l'observation de ce qui se passe dans leur contenu nécessite souvent plusieurs minutes, heures voire jours. Pour cela les gouttes peuvent être collectées lors de la production et incubées en dehors d'une puce de microfluidique, puis réinjectées dans une autre puce ou être utilisées pour d'autres tests.<sup>46-48</sup> Il est également possible d'utiliser des puces contenant des lignes de délais permettant de contenir les gouttes, d'incorporer des réservoirs de gouttes dans les puces ou encore d'inclure dans les puces des pièges, qui permettent un suivi individuel des gouttes.<sup>2,11,49,50</sup>

#### 1.4. Détection et tri des gouttes

Après production, les gouttes peuvent être analysées et potentiellement triées. Les méthodes d'analyse doivent être rapides afin d'être compatibles avec le haut débit offert par la microfluidique en gouttes. La majorité des méthodes employées en routine sont des méthodes de détection optique, mais il existe également des méthodes non optiques, comme l'électrochimie, la spectrométrie de masse, ou la résonance magnétique nucléaire (RMN).<sup>11</sup>

##### 1.4.1. Détection optique

Les gouttes peuvent être directement observées par microscopie optique en champ clair. Cela permet notamment d'observer leur taille, couleur, apparence, permettant de suivre des réactions ou des phénomènes colorimétriques ou d'ajuster les paramètres de production.<sup>51</sup> Cependant, la méthode la plus classique d'analyse des gouttes est la microscopie par fluorescence, qui permet une lecture rapide et sensible du contenu des gouttes, adaptée au criblage à haut débit.<sup>52-57</sup> D'autres méthodes de détection optique ne reposant pas sur la présence de molécules fluorescentes ou absorbantes sont utilisables, comme la spectroscopie Raman, ou la spectroscopie Raman exaltée par effet de surface, qui sont des techniques dans lesquelles l'échantillon est excité par une longueur d'onde d'excitation et la lumière diffusée est analysée.<sup>58</sup>

##### 1.4.2. Méthode de détection non optique

En dehors des systèmes de détection optique, d'autres méthodes d'analyse sont possibles, comme la spectrométrie de masse, permettant l'ionisation et la fragmentation d'analytes pour leur analyse, et sont utilisables sur des molécules organiques comme sur des biomolécules de haut poids moléculaire.<sup>59</sup> Il est également possible d'utiliser des méthodes de détection par RMN ou par électrochimie, l'interaction entre la goutte et une électrode générant un signal électrique détectable et variable selon la taille, vitesse et contenu de la goutte.<sup>60-62</sup>

##### 1.4.3. Tri

Les gouttes peuvent également être triées, pour isoler des sous-populations de gouttes d'intérêt. Le tri peut se faire de manière passive ou active et va se faire dans des puces possédant plusieurs canaux de sortie pour séparer les gouttes. Le tri passif va dépendre de la géométrie des canaux de la puce de tri (taille, positionnement), ou des propriétés des gouttes

(taille, tension de surface, viscosité).<sup>63-66</sup> Les méthodes actives de tri sont plus diverses, et plusieurs types de forces externes sont utilisables : ondes acoustiques, champs magnétiques, électriques, variation thermique ou de pression (Figure 6).<sup>10</sup> De manière générale, le tri se fait dans une puce possédant une fourche en Y, avec deux canaux de dimension différents. Par défaut, les gouttes vont passer par le canal présentant la résistance hydraulique la plus faible. Lorsqu'une force extérieure est appliquée, la goutte ciblée va être poussée dans le deuxième canal et isolée.<sup>67</sup>

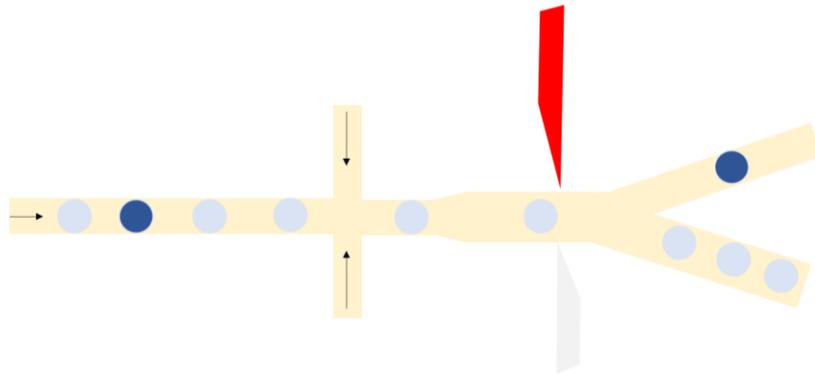


Figure 6: Schéma d'un tri de gouttes. Les gouttes sont réinjectées, espacées, analysées dans des canaux à géométrie en Y. En cas d'absence de tri, les gouttes se dirigent vers le canal présentant la résistance hydraulique la plus faible (gouttes bleu clair). En cas de gouttes « positive » (ici en bleu marine), une force extérieure (électrique, magnétique, acoustique ...) est appliquée, entraînant la goutte vers le second canal, le canal de tri.

## 1.5. Applications de la microfluidique en gouttes

### 1.5.1. Chimie

La microfluidique en gouttes peut être utilisée pour effectuer des réactions chimiques, chaque goutte pouvant être considérée comme un réacteur individuel. Cela permet un contrôle fin de nombreux paramètres expérimentaux :

- Concentration en réactifs
- Volume expérimental
- Température et échanges thermiques
- Durée de la réaction et mise en contact contrôlée des réactifs.

De plus, les gouttes offrent un rapport surface sur volume important, permettant si nécessaire de maximiser les interactions avec l'interface. La compartimentalisation permet également de favoriser les phénomènes de diffusion dans la goutte par rapport à une réaction en ballon réactionnel classique.<sup>2,68</sup> Ces avantages ont été exploités en synthèse organique,<sup>69-72</sup> pour effectuer du criblage de conditions réactionnelles en consommant peu de matériel,<sup>73</sup> ou encore pour la synthèse de nano et microparticules.<sup>4,74-76</sup>

### 1.5.2. Biologie

La microfluidique en gouttes a également de nombreuses applications en biologie, tels que :

- L'étude de la génomique et de la transcriptomique <sup>77,78</sup>
- L'étude du métabolisme cellulaire <sup>79</sup>
- L'étude et la détection de protéines <sup>4,77</sup>
- L'évolution dirigée d'enzymes <sup>4,5,11,16</sup>
- La détection de métabolites ou le dosage de petites molécules <sup>68,80-83</sup>
- Le criblage de molécules actives (par des tests de toxicité par exemple) <sup>84,85</sup>

Il s'agit également d'une technique parfaitement adaptée pour l'étude de cellules isolées par sa capacité de compartimentalisation. Les principales applications existantes sont présentées ci-dessous, de manière non exhaustive.

### 1.5.2.1. Etude des acides nucléiques

La détection et la quantification d'ADN et d'ARN sont très largement utilisées en recherche, et également pour des techniques de diagnostic, comme illustré ces dernières années avec le COVID. Une méthode incontournable pour l'étude de l'ADN est la réaction de polymérase en chaîne (PCR), développée dans les années 1980.<sup>86</sup> Cette méthode permet l'amplification de l'ADN permettant sa détection et quantification. L'ARN peut également être étudié de la même façon par RT-PCR, l'ARN étant pris en charge par une rétrotranscriptase pour donner un brin d'ADN complémentaire (ADNc), puis le processus de PCR classique est appliqué.<sup>87</sup>

Cette technique a été interfacée avec la microfluidique en goutte sous forme de PCR en goutte, et sous forme de PCR numérique en goutte (ddPCR, droplet digital PCR). L'échantillon est ainsi fractionné en millions de gouttes, permettant de passer d'une réaction dans un contenant à plusieurs millions de réactions en parallèle. Le fractionnement peut être effectué de telle manière que statistiquement, les gouttes sont vides ou contiennent un seul exemplaire d'ADN, résultant à la fin de l'expérience en des gouttes non fluorescentes ou fluorescentes. La fraction de gouttes fluorescentes par rapport aux gouttes non fluorescentes permet de quantifier la quantité initiale d'ADN, en se passant de courbe d'étalonnage, et permet la détection de séquences rares ou de mutations grâce à sa sensibilité.<sup>88,89</sup> Cette technique de ddPCR a été développée par la suite pour pouvoir effectuer des analyses multiplexées, c'est-à-dire l'analyse simultanée de différents gènes/mutations/brins d'ADN à partir du même échantillon, en utilisant des panels de sondes fluorescentes spécifiques à chaque séquences à amplifier.<sup>47,90,91</sup> Cette technologie est disponible commercialement, chez BioRad ou Stilla Technologies.<sup>5,92,93</sup>

L'étude de l'expression de l'ADN et de l'ARN par PCR peut également se faire directement à partir de cellules isolées permettant d'observer l'hétérogénéité d'expression de gènes au sein de population cellulaire, d'identifier des sous-types et des marqueurs spécifiques, ou encore des mutations rares. Dans ce cas, les cellules sont encapsulées puis lysées dans les gouttes, libérant le génome et le transcriptome, qui vont ensuite pouvoir être amplifiés. Cependant, les réactifs de lyse cellulaire, le lysat et les protéines libérées peuvent inhiber les réactions de PCR.<sup>94-96</sup> Pour contrer cela, il est possible de diluer le contenu des gouttes,

d'utiliser un tampon de lyse alcalin, ou d'utiliser des protéases pour digérer le lysat, puis les inactiver par chauffage avant la PCR.<sup>94,95</sup>

Enfin, la PCR peut être également utilisée pour effectuer le séquençage complet du transcriptome de cellules isolées. Ces techniques sont décrites en détails dans la littérature, et reposent sur la co-encapsulation dans les gouttes de billes portant des oligonucléotides barre-codés ayant une séquence de capture poly-Thymidine (poly-T). Lors de la lyse cellulaire et libération des ARNm, ceux-ci vont s'hybrider sur les oligonucléotides barre-codés par leur queues poly-Adénosines (poly-A). Après séquençage, le barre-codage permet d'individualiser chaque ARNm amplifié et attribuer le transcriptome à chaque cellule individuelle. Deux grandes techniques existent pour cela : InDrop et DropSeq.<sup>78,97,98</sup> Ces procédés sont commercialisés par 1CellBio et Dolomite Bio, et une technique mixte de ces deux méthodes a été commercialisée par 10X Genomics.<sup>96</sup>

#### 1.5.2.2. Etude du métabolisme cellulaire

Le métabolisme cellulaire peut aussi être étudié sur cellules isolées en gouttes, permettant par exemple d'identifier des cellules cancéreuses au sein d'une population. Del Ben et collaborateurs ont développé un système dans lequel des cellules sont encapsulées dans des gouttes avec du glucose et un fluorophore pH dépendant. La consommation du glucose entraîne la sécrétion de lactate, acidifiant les gouttes, diminuant le pH et entraînant un signal de fluorescence permettant d'identifier et de trier les gouttes contenant des cellules cancéreuses.<sup>79</sup>

#### 1.5.2.3. Etude des protéines

La microfluidique en gouttes a également été utilisée pour l'étude des protéines, notamment :

- La cristallisation de protéines, en criblant des conditions pour faciliter la formation de cristaux<sup>99</sup>
- L'expression et la synthèse de protéines, en encapsulant des mélanges de transcription et traduction avec des plasmides ou des ADNc<sup>100,101</sup>
- L'étude de l'activité d'enzymes en encapsulant les enzymes et leur substrats à différentes concentrations<sup>92,102,103</sup>
- L'évolution dirigée d'enzyme

L'objectif de l'évolution dirigée d'enzymes est de faire muter le gène d'une enzyme d'intérêt afin d'améliorer ou modifier ses propriétés, puis de sélectionner les variants d'intérêts.<sup>104</sup> L'utilisation de la microfluidique en goutte pour ces tests permet d'avoir un haut débit d'analyse et de conserver ensemble le gène et la protéine produite, de l'encapsulation à l'isolement des variants.<sup>54,105</sup>

En plus de ces différentes applications, la détection de protéines s'est largement développée en microfluidique en gouttes.

## 2. Détection de protéines en microfluidique en gouttes

### 2.1. Introduction à la détection de protéines

La détection des protéines présente plusieurs difficultés : les protéines n'ont pas de motifs universels, contrairement aux ARNm et leurs queues poly-A, ce qui complique la mise au point d'une méthode générale de détection ou de capture. De plus, il n'est pas possible de les amplifier directement, contrairement au transcriptome et au génome, ce qui rend leur détection plus difficile, notamment pour les protéines faiblement exprimées.<sup>106–109</sup> Cependant, contrairement aux ARNm, une partie des protéines (protéines membranaires et sécrétées) peuvent être étudiées sans nécessité de lyser des cellules.<sup>106</sup>

De nombreuses techniques existent pour l'analyse de protéines, comme par exemple les immunoessais, l'électrophorèse en gel, la cytométrie ou la spectrométrie de masse.<sup>110–113</sup> Cependant l'étude de protéines au sein d'échantillons complexes s'avère limitée, en termes de sensibilité, spécificité, volume d'échantillon, difficultés techniques.<sup>114,115</sup> De plus, pour l'étude de protéines issues de cellules, les techniques usuelles vont généralement nécessiter un ensemble de cellules et vont mesurer l'expression protéique sur une population globale, rendant invisible l'hétérogénéité au sein de cette population, et ne permettant pas de détecter les cellules et protéines rares. L'analyse de l'expression protéique sur cellule isolée est donc nécessaire pour identifier des cellules rares pouvant avoir des rôles importants dans les mécanismes physiopathologiques.<sup>116,117</sup>

L'inconvénient principal pour l'étude des protéines sur cellule isolée, ou la détection spécifique de protéines au sein d'un échantillon biologique est que les protéines d'intérêt peuvent avoir une abondance faible. Il est donc nécessaire d'avoir des outils sensibles, une capacité de travail à haut débit et la capacité de reconnaître spécifiquement une variété de

protéines.<sup>118</sup> De plus, une partie des protéines produites par les cellules sont sécrétées, et peuvent avoir des rôles majeurs, par exemple dans la signalisation et prolifération cellulaire, dans l'immunité ou encore comme biomarqueur de pathologies.<sup>119-122</sup> Les méthodes classiques d'analyse de protéines découplent les protéines sécrétées des cellules sécrétrices. Utiliser des méthodes d'analyse sur cellule isolée en gouttes permet de réassocier protéine sécrétée et cellule.<sup>123</sup>

La microfluidique en goutte présente ainsi plusieurs avantages pour la détection de protéines, issues de cellules isolées ou de divers milieux : haut débit d'analyse, miniaturisation des échantillons, sensibilité de détection. De plus, pour l'analyse de protéines sécrétées, l'encapsulation de cellules en gouttes permet également d'avoir un milieu clos et isolé, dans lequel une incubation peut avoir lieu, entraînant l'accumulation des protéines. L'effet de miniaturisation et d'accumulation des protéines permet ainsi aux analytes d'atteindre un seuil de détection impossible à atteindre en analyse sur gros échantillons.<sup>96,124</sup> La microfluidique peut également permettre d'avoir un lien direct entre génome, transcriptome et protéome sur cellules isolées.<sup>96</sup>

Différentes méthodes sont utilisables pour la détection de protéines en gouttes, dont :

- La détection par amplification d'oligonucléotides
- La détection par l'activité de la protéine cible
- Les immunoessais en gouttes

## 2.2. Analyse des protéines par amplification d'oligonucléotides

Des techniques utilisant les bases de la cytométrie en flux (liaisons d'anticorps marqués à des protéines membranaires)<sup>125</sup> et de la transcriptomique en gouttes ont été développées pour permettre l'étude de l'expression de protéines de surface cellulaire (Figure 7). Ces méthodes permettent d'associer la détection de protéines (détection ciblée) avec l'étude du transcriptome (non ciblée) des cellules. Stoeckius *et al.*, Peterson *et al.* ou encore Shahi *et al.* ont publié en 2017 des techniques (CITE-Seq, REAP-Seq, Abseq) dans lesquelles l'analyse du transcriptome est couplée à de la détection de protéines en utilisant des anticorps spécifiques des protéines ciblées fonctionnalisés par des étiquettes ADN (Figure 7). Ainsi chaque anticorps est identifié par une séquence d'ADN spécifique.<sup>107,126,127</sup> Ces anticorps vont marquer les cellules en se liant aux protéines de surface qu'ils ciblent. Ensuite, les cellules sont encapsulées

en gouttes avec des billes portant des oligonucléotides barre-codés. Après lyse des cellules, les ARNm et les étiquettes ADN (couplés aux anticorps) sont libérés dans les gouttes et sont capturés par les oligonucléotides barre-codés et amplifiés par PCR. Ainsi la présence des protéines cibles est détectée par le séquençage des étiquettes ADN qui étaient liées aux anticorps spécifiques. Ces techniques permettent d'avoir au final, pour chaque cellule, la détection de différentes protéines (multiplexage) et simultanément une analyse du transcriptome cellulaire. Ce type de technique est également disponible et distribué commercialement, par 10X Genomics par exemple.<sup>96</sup> Pour toutes ces méthodes, le facteur limitant pour la détection simultanée de plusieurs protéines membranaires est la nécessité d'avoir des anticorps capable de se lier aux protéines ciblées. De plus, seules les protéines membranaires sont détectables, et le marquage des protéines a lieu avant l'encapsulation en gouttes. Ces méthodes ont cependant l'avantage de ne pas être limitées par le nombre de cibles simultanément détectables, contrairement à la cytométrie.

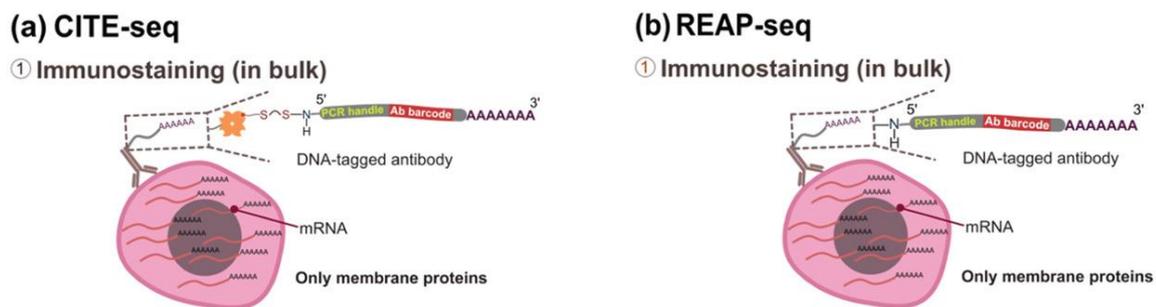


Figure 7: Illustration du marquage des protéines de surface par les techniques CITE-seq et REAP-seq. Un anticorps ciblant la protéine de surface est conjugué à un brin d'ADN portant un barre-code, un site pour PCR, et une queue polyA. Après marquage et lavage du milieu pour éliminer les anticorps résiduels, les cellules sont encapsulées individuellement dans des gouttes avec des billes barre-codées, comme dans les analyses en gouttes de séquençage du transcriptome. L'amplification du brin d'ADN liée à l'anticorps permet d'identifier la présence de la protéine membranaire sur la cellule. Ces techniques permettent d'associer l'analyse du transcriptome et des protéines de surface cellulaire. Adapté de <sup>96</sup>

## 2.3. Détection de protéines par activité enzymatique

### 2.3.1. Détection directe

La détection et le dosage de certaines protéines comme les enzymes peuvent également se faire en suivant leur activité enzymatique. Par exemple, Yu *et al.*<sup>128</sup> ont développé en 2017 une méthode de détection de métalloprotéase (MMP-9), une protéase extracellulaire, en cellule isolée avec un peptide FRET (portant un couple de molécules

fluorophore/quencher).<sup>129–131</sup> En cas de sécrétion de MMP-9 par les cellules en gouttes, les métalloprotéases vont cliver le peptide, séparant le fluorophore et le quencher, entraînant l'apparition d'un signal de fluorescence quantifiable. Cette technique permet ainsi d'observer la sécrétion de chaque cellule individuellement et de manière rapide (en 30 minutes), avec une limite de détection inférieure autour de 4 nM (17 attomoles par goutte de 4.2 nL).

### 2.3.2. Détection indirecte

Le suivi de l'activité catalytique d'enzymes a également été utilisé pour l'isolement d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux inhibant une enzyme cible. El Debs *et al.* ont développé en 2012 un système dans lequel des hybridomes sont encapsulés et incubés en gouttes avec l'enzyme ciblée par les anticorps sécrétés. Après incubation les gouttes ont été fusionnées avec des gouttes contenant le substrat peptidique pro-fluorescent de l'enzyme. En cas de sécrétion de l'anticorps par les hybridomes, l'activité catalytique de l'enzyme est bloquée, empêchant le clivage du substrat et l'apparition d'un signal de fluorescence. Les gouttes présentant donc une faible fluorescence sont ainsi les gouttes « positives » pour la sécrétion des anticorps. Leur méthode a conduit au tri des gouttes et donc des cellules selon l'intensité de leur signal de fluorescence, pour isoler les hybridomes sécrétant d'intérêt.<sup>132</sup> Cette méthode a permis de détecter des sécrétions à partir de 20 µg/mL d'anticorps (soit environ 130 nM, environ 100 attomoles par goutte de 685 pL).

Ces méthodes de détection en gouttes par suivi de l'activité enzymatique permettent ainsi l'analyse de la sécrétion de chaque cellule individuellement, contrairement aux méthodes équivalentes en microplaques. De plus, ces méthodes nécessitent un nombre restreint de réactifs, par rapport aux autres méthodes de détection (amplification d'oligonucléotides, immunoessais). Cependant la molécule de détection utilisée, le peptide clivable pro-fluorescent, doit être spécifique de l'enzyme à détecter.

## 2.4. Les Immunoessais et leurs applications en microfluidique en gouttes

### 2.4.1. Contexte et principe

Les immunoessais, et notamment les ELISAs (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) et ses dérivés sont des méthodes extrêmement utilisées pour la détection de protéines depuis les années 1950s.<sup>133,134</sup> Ces méthodes sont considérées comme le gold-standard de la détection de protéines,<sup>135</sup> et reposent sur l'utilisation d'anticorps (Ab), qui vont se lier de

manière sélective et spécifique à leur cible par interaction paratope (Ab)/épitope (Ag). Les immunoessais peuvent être utilisés pour détecter la présence d'anticorps (Ab) et/ou d'antigènes (Ag) spécifiques.<sup>136</sup> Parmi les immunoessais existants, l'un des plus spécifiques est l'immunoessai avec formation d'un immunosandwich ou immunocomplexe (Figure 8).<sup>137,138</sup> Dans ce type d'immunoessai, un antigène est reconnu au niveau de deux épitopes différents par deux anticorps, l'un de capture l'autre de détection résultant en un « sandwich » Ab/Ag/Ab. Cette technique est la plus utilisée pour la détection de protéines, et est considérée comme la plus sensible. Elle nécessite néanmoins d'avoir deux anticorps capables de cibler deux antigènes différents sur la protéine cible.<sup>137</sup> Un système rapporteur attaché à l'anticorps de détection permet de détecter la formation du complexe immun et donc la présence de l'analyte cible.<sup>137</sup> Cette méthodologie peut également être adaptée en remplaçant l'anticorps de capture par un antigène, qui va être reconnu par un anticorps (l'analyte dans cette situation), et un deuxième anticorps (anticorps de détection) reconnaissant l'analyte va former le complexe immun.<sup>138</sup>

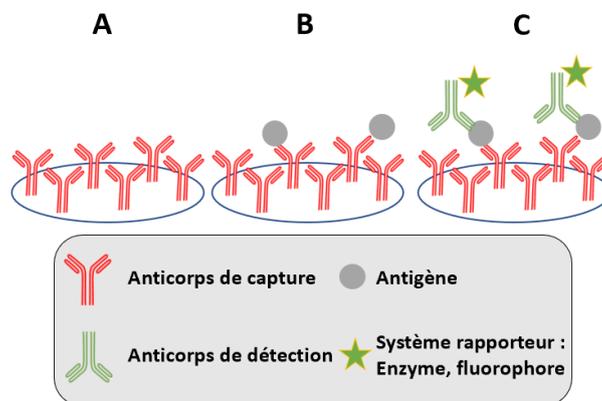


Figure 8: Immunoessai sandwich. A) Une surface est recouverte d'anticorps de capture ciblant un épitope d'un antigène cible. B) L'épitope de l'antigène ciblé est détecté par les anticorps de capture, liant l'antigène à l'anticorps en surface. C) Un anticorps de détection, reconnaissant un autre épitope de l'antigène ciblé, se lie à l'antigène, formant un immunocomplexe Ab/Ag/Ab. L'anticorps de détection est fonctionnalisé par un système rapporteur, permettant de détecter la formation de l'immunosandwich sur la surface de capture.

Le système rapporteur présent dans les ELISAs est une enzyme, liée à l'anticorps de détection. Après liaisons des anticorps à leur cibles, l'ajout du substrat de cette enzyme dans le milieu entraîne sa consommation et la formation d'un signal détectable, souvent fluorescent ou colorimétrique.<sup>137,139</sup> Le système rapporteur des immunoessais a depuis évolué, et les anticorps de détection sont souvent directement conjugués à un fluorophore. Il est également possible d'effectuer des immunoessais sans surface de capture ; dans ces cas

le complexe formé va pouvoir être détecté en séparant les complexes et les réactifs libres par électrophorèse ou à travers une membrane.<sup>136</sup>

Les immunoessais et les ELISAs sont des méthodes de détection de protéines hautement spécifiques et assez sensibles pour la détection de protéines (> pM) sauf celles de très faible abondance (< pM). Ils nécessitent néanmoins des volumes d'échantillons et de réactifs importants (50-100  $\mu$ L),<sup>140</sup> et des étapes de lavages nécessaires pour éviter un bruit de fond causé par la présence d'anticorps de détection non liés, augmentant ainsi la durée de l'analyse.<sup>139</sup> La miniaturisation des immunoessais offre de nombreux avantages pour la détection de protéines, que ce soit au sein d'un échantillon biologique, d'un échantillon provenant d'un ensemble de cellules, ou pour la détection de protéines sur cellule isolée.<sup>141</sup> La miniaturisation des essais permet notamment de réduire les volumes de réactifs utilisés. Passer de puits contenant des dizaines de microlitres à des puits ou gouttes de l'ordre du nano, pico ou femtolitre permet de pouvoir amplifier la sensibilité et ainsi détecter le signal de l'anticorps de détection en cas de présence de l'analyte.<sup>140</sup> La miniaturisation permet également de diminuer la durée des essais et d'augmenter les débits d'analyses. De plus, réduire les volumes permet d'améliorer le ratio surface de capture / volume d'échantillon, augmentant ainsi la sensibilité et la limite de détection de la méthode.

En parallèle de la miniaturisation des volumes, des billes fonctionnalisées ont été développées comme surface de capture remplaçant la fonctionnalisation de surface des puits de microplaques ou des puces microfluidiques. Cela permet selon le nombre de billes utilisées un contrôle du nombre d'anticorps de capture et une augmentation importante du ratio surface de capture/volume, et donc la sensibilité des essais.<sup>142,143</sup>

#### *2.4.2. Développement des immunoessais en gouttes avec détection par fluorescence*

##### *2.4.2.1. Détection de protéines isolées*

La combinaison de la microfluidique en goutte et des immunoessais sur billes fonctionnalisées a permis la miniaturisation et simplification de la détection de protéines. L'immunoessai peut se faire en une seule étape, directement dans les gouttes (Figure 9).

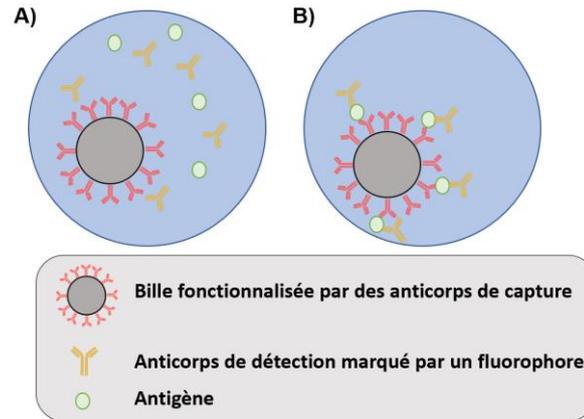


Figure 9 : Principe de l'immunoessai en gouttes : A) Une bille fonctionnalisée par des anticorps de capture est encapsulée dans une goutte contenant l'antigène cible et des anticorps de détection fluorescent ciblant également l'antigène. B) L'antigène est capturé par les anticorps de capture et se relocalise sur la bille. L'anticorps de détection reconnaît aussi l'antigène et se relocalise également, formant un spot de fluorescence intense sur la bille.

Tang *et al.* ont décrit en 2016 une méthodologie d'immunoessai permettant la détection d'une protéine, la protéine C réactive (CRP), en encapsulant dans des gouttes une bille fonctionnalisée (~10  $\mu\text{m}$ ) par des anticorps de capture, un analyte cible (CRP) et des anticorps secondaires fluorescents. Après incubation les gouttes sont analysées à un débit de 500 Hz. En cas de présence de l'analyte, celui-ci se relocalise sur les billes, et entraîne la relocalisation de l'anticorps fluorescent, formant un spot fluorescent plus intense que la fluorescence basale dans les gouttes. De plus, l'intensité de fluorescence sur la bille varie en fonction de la concentration en analyte.<sup>144</sup> Leur test en goutte a mis en évidence une limite de détection basse et une gamme dynamique dans la centaine de pM avant que le signal de détection ne diminue. Cela est causée par l'effet postzone, qui indique un excès d'analyte par rapport aux anticorps de capture, et donc une saturation des anticorps de capture sur la bille.

Cette méthode présente ainsi plusieurs avantages par rapport à un immunoessai classique en microplaque :

- Diminution du volume d'échantillon et de réactifs (1/10 par rapport à un ELISA classique),
- Eviter des étapes de lavage
- Accélérer la vitesse du test (par deux, 1 h d'incubation avant que le signal de fluorescence soit stable contre 2 h en moyenne en plaque) du fait du volume réduit et donc de la diffusion de l'analyte dans le milieu plus faible
- Sensibilité dix fois plus élevée qu'un test en plaque et une fréquence d'analyse plus importante, de 500 Hz.

De plus l'analyse ne dépend plus que de la relocalisation de l'analyte et de l'anticorps fluorescent, et ne nécessite plus un temps supplémentaire de clivage de substrat fluorogénique par une enzyme. L'absence d'étape de lavage peut toutefois être également considérée comme un inconvénient, car elle résulte en un bruit de fond des anticorps de détection non liés. Il est donc nécessaire d'avoir suffisamment d'analyte cible et de relocalisation des anticorps de détection sur la surface de capture pour distinguer un signal positif. De plus l'intensité du signal de fluorescence peut varier selon la localisation de la bille dans la goutte par rapport au plan focal du laser de détection.<sup>124</sup>

#### 2.4.2.2. Détection de protéines sécrétées

- **Utilisation de billes fonctionnalisées**

Les immunoessais en gouttes ont également été développés pour identifier des cellules sécrétrices. Comme évoqué précédemment, les gouttes forment des milieux clos dans lesquels des protéines sécrétées peuvent s'accumuler et atteindre rapidement un seuil de détection, permettant d'associer cellule et protéines sécrétés et ainsi de trier, isoler et récupérer des cellules sécrétrices, offrant une alternative aux méthodes de cytométrie de flux et aux techniques de dilution limites.<sup>145</sup>

Konry *et al.* ont par exemple décrit une méthode en 2011 pour la détection d'interleukine sécrétée<sup>146</sup> et Mazutis *et al.* en 2013 ont publié une méthodologie pour la détection et le tri d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux (anticorps de souris) (Figure 10). Dans leur stratégie, les débits et les taux d'encapsulation sont réglés pour produire des gouttes de 50 pL et encapsuler un maximum d'une cellule et une bille par goutte. La bille (6  $\mu\text{m}$ ) est utilisée comme surface de capture et pour cela elle est fonctionnalisée par des anticorps (anti-Fc de souris) capturant ainsi les anticorps sécrétés. La capture est détectée par des anticorps secondaires (anti-Fab de souris) marqués par un fluorophore et présents en solution, qui vont se lier à l'immunocomplexe sur la bille, formant ainsi un spot de fluorescence dans la goutte au niveau de la bille. Une fois incubées les gouttes sont réinjectées et triées selon leurs signaux de fluorescence à une fréquence de 200 Hz.<sup>145</sup> Dans cette méthode, la bille fonctionnalisée peut se lier à un maximum théorique de 100-150 nM d'anticorps de capture (5-7.5 attomoles), et environ 220 nM d'anticorps de détection sont utilisés (11 attomoles), permettant la détection d'une concentration d'anticorps sécrétés de 20 nM (1 attomole).

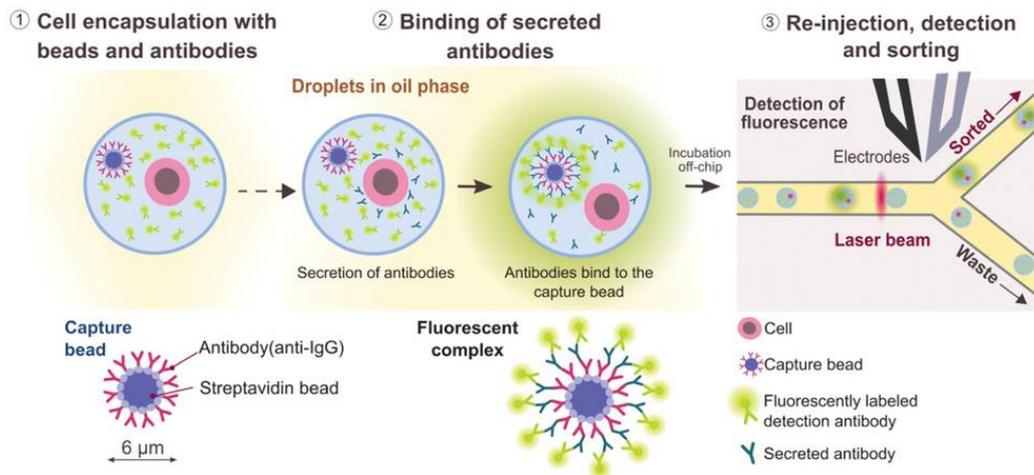


Figure 10: Identification de cellules sécrétant selon la technique développée par Mazutis et al. Des gouttes sont formées contenant une cellule sécrétant, une bille fonctionnalisée par des anticorps, et des anticorps secondaires fluorescents dans le milieu. En cas de sécrétion d'anticorps par la cellule, ceux-ci sont capturés sur la bille et entraînent la relocalisation des anticorps fluorescents sur la bille, formant un spot de fluorescence. Les gouttes sont ensuite triées selon leur fluorescence. Adapté de <sup>96</sup>

Ding et al. ont par la suite en 2020 utilisé le même système pour la détection d'anticorps anti-TNF $\alpha$ , avec des gouttes de 40 pL en utilisant pour la détection l'antigène marquée spécifique des anticorps sécrétés. En cas de sécrétion d'anticorps, ceux-ci vont être capturés par les anticorps sur la bille fonctionnalisée, et être détectés par l'antigène marqué qui va se relocaliser sur la bille.<sup>147</sup> Les gouttes ont ensuite été triées avec un débit de 100 Hz. La concentration d'antigène de détection a été fixée à 1.7  $\mu$ M (68 attomoles), car les cellules sont incubées plus longtemps, et l'estimation de la sécrétion maximale d'anticorps est donc plus élevée, 1.7  $\mu$ M.

Ces méthodes en une étape permettent de grandement simplifier les immunoessais, en évitant la nécessité de fusion de gouttes ou de pico-injection pour amener les anticorps de détection. Comme évoqué précédemment, il n'y a pas de lavage possible dans les gouttes, et les anticorps fluorescents sont présents dès le début : une concentration minimale d'analyte est donc nécessaire pour distinguer le signal de relocalisation de la fluorescence du bruit de fond.<sup>124</sup> Dans le cas d'analyte sécrété, la durée d'incubation est importante : si l'incubation est trop courte, les gouttes positives ne seront pas distinguables ; si le temps d'incubation est trop long, il risque d'y avoir compétition entre les analytes capturés sur la/les billes et les analytes en solution dans la goutte, et donc perte de la relocalisation du signal de fluorescence (effet crochet, ou effet postzone).<sup>148</sup> Cette méthodologie utilisant une ou des particules co-encapsulées présente également d'autres inconvénients :

- Surface de capture dépendante du diamètre et du nombre de particules
- Quantité d'anticorps de capture sur les billes mal caractérisée
- Hétérogénéité de la distribution des particules générant différentes limites de détection inter-gouttes ainsi que des gouttes ne contenant pas de particules
- Mouvement et localisation des particules aléatoires dans les gouttes entraînant une disparité des signaux de détection selon la localisation et un risque d'absence de détection

- **Utilisation de nanoparticules fonctionnalisées**

L'utilisation d'un ensemble de petites particules à la place d'une seule plus grande a permis de répondre à plusieurs de ces problématiques, en augmentant les surfaces de contact avec le contenu des gouttes, et donc le ratio de surface/volume (selon le nombre de particules encapsulées), et en diminuant le nombre de gouttes sans particules. En effet, la distribution des particules dans les gouttes suit une loi de Poisson. Ainsi l'encapsulation simultanée d'une cellule et d'une bille par goutte va suivre une double statistique de Poisson, complexifiant les dilutions, et augmentant le nombre de gouttes vides, ou ne contenant qu'une cellule ou qu'une bille. En revanche, viser une encapsulation multiple de particules réduit le nombre de gouttes sans particules et augmente le nombre de cellules pouvant être analysées. La nature des particules peut également faciliter l'analyse : l'utilisation de particules magnétiques permet d'appliquer un champ magnétique avant analyse, ce qui permet d'aligner les particules, assurant ainsi un positionnement optimal et uniforme dans les gouttes facilitant la lecture du signal de détection.<sup>132,149</sup>

Par exemple, la technologie DropMap a été développée en 2017 (Figure 11).<sup>149</sup> Dans cette méthode, les cellules sont encapsulées avec ~1300 nanoparticules magnétiques fonctionnalisées (surfaces de capture), des anticorps de détection fluorescents et des antigènes marqués par fluorescence, dans des gouttes de 40 pL. Les gouttes sont immobilisées dans une chambre d'incubation, et observées par microscopie de fluorescence. Les anticorps sécrétés vont être capturés sur les nanoparticules, et être reconnus par les anticorps fluorescents, entraînant leur relocalisation sur les nanoparticules. L'utilisation de multiples particules magnétiques permet d'augmenter la surface totale de capture (par rapport à une seule bille plus grosse), et leurs mouvements permettent de faciliter la rencontre entre les

particules et les protéines sécrétées. De plus, la nature des particules permet d'induire leur alignement par un champ magnétique, permettant de facilement observer les signaux de fluorescence, d'augmenter la sensibilité de détection ainsi que de réduire le risque d'avoir les surfaces de capture en dehors du plan focal du laser. Selon le taux de sécrétion des anticorps par la cellule, la fluorescence observée sur les particules va varier, permettant ainsi d'observer l'hétérogénéité de sécrétion des cellules. La présence dans les gouttes de l'antigène marqué de l'anticorps sécrété permet également de déterminer l'affinité anticorps-antigène. Cela permet de valider que l'anticorps sécrété par les cellules est bien l'anticorps souhaité. Cette stratégie utilise environ 150 nM d'anticorps de capture sur les billes (6 attomoles), et 75 nM d'anticorps de détection (3 attomoles), avec une gamme de sensibilité de détection d'analyte du nM à 75 nM (0.01 – 3 attomoles). Gerard *et al.* ont par la suite ajouté avec CelliGo en 2020 une étape de tri des gouttes permettant d'isoler celles contenant les cellules sécrétant d'intérêt à une fréquence allant jusqu'à 600 Hz.<sup>150</sup>

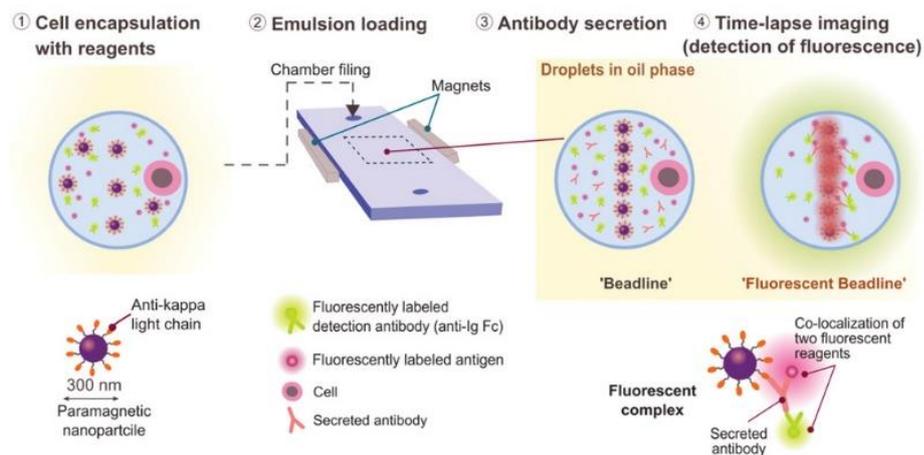


Figure 11 : Technique DropMap. Adapté de <sup>96</sup>

- **Utilisation de cellules comme surface de capture**

Gerard et collaborateurs ont également développé un immunoessai dépendant de l'affinité de l'anticorps sécrété pour une protéine de surface, en encapsulant dans une même goutte de 80 pL une cellule sécrétrice et une cellule rapportrice exprimant la protéine membranaire, avec des anticorps de détection fluorescents. Après incubation les gouttes sont triées selon leur signal de fluorescence. Si la cellule sécrète les anticorps ciblant la protéine membranaire, les anticorps sécrétés se relocalisent à la surface de la cellule rapportrice, et sont détectés par l'anticorps fluorescent, entraînant la formation d'un immunocomplexe à la surface de la cellule. La cellule rapportrice sert ainsi de surface de capture.<sup>150</sup> Cette stratégie a

également été appliquée en 2018 par Shembekar *et al.*<sup>151</sup> Dans leur étude, des gouttes de 660 pL co-encapsulent un hybridome et une cellule exprimant les récepteurs membranaires ciblés par les anticorps sécrétés de l'hybridome. Un anticorps de détection fluorescent ciblant l'anticorps sécrété est ajouté pour permettre la formation d'immunosandwich. Après une incubation les gouttes sont analysées et triées. Les anticorps de détection ont été utilisés à une concentration de 8 nM (5.3 attomoles), et cette méthode permet la détection d'anticorps sécrétés dès 0.3 nM d'analyte (0.2 attomole), avec une saturation des récepteurs de la cellule servant de surface de capture à 5 nM d'analyte (3.3 attomoles).

La détection de protéines en gouttes par immunoessais en goutte s'est ainsi développée ces dernières années, et permet des analyses sur petit volume, très sensibles, rapides, et à haut-débits. Ces immunoessais en gouttes peuvent également servir à isoler des sous-populations de cellules selon leur sécrétion d'analyte, pour ensuite faire des analyses génotypiques ou transcriptomiques supplémentaires.<sup>123,147,150,152</sup> Plusieurs limitations ont également été identifiées et des stratégies ont été développées pour répondre à ces inconvénients, avec par exemple l'utilisation de nanoparticules magnétiques. La plupart des systèmes développés nécessitent cependant des équipements spécialisés.<sup>152</sup>

Un autre point de difficulté relevé lors de l'étude de la littérature sur les immunoessais en gouttes est la très grande variabilité de :

- Taille de gouttes
- Type et taille de surface de capture
- Quantité d'anticorps de capture et d'anticorps de détection utilisés
- Durée d'incubation

Tous ces éléments jouent sur les sensibilités de détection (tableau 2). Cela complexifie l'identification de paramètres optimaux pour le développement de nouveaux immunoessais.

Tableau 2 : Comparaison de différentes conditions d'immunoessais en gouttes. N.i : non indiqué

Taille des gouttes	Surface de capture	Ab/Ag de capture	Ab/Ag de détection	Gamme dynamique de sensibilité	Source
n.i	Bille, 10 µm	n.i	20-30 nM	80-700 pM	Tang <i>et al.</i> <sup>144</sup>
50 pL	Bille, 6 µm	n.i, maximum de 100-150 nM 5-7.5 attomoles	220 nM 11 attomoles	n.i, minima : 20 nM 0.9 attomole	Mazuti <i>et al.</i> <sup>145</sup>
40 pL	Bille, 6 µm	n.i	1.7 µM 68 attomoles	n.i	Ding <i>et al.</i> <sup>147</sup>
40 pL	~1300 Nanobilles de 300 nm	150 nM 6 attomoles	37.5-75 nM 1.5-3 attomoles	0.3-75 nM 0.01-3 attomoles	Eyer <i>et al.</i> et Gerard <i>et al.</i> <sup>149,150</sup>
660 pL	Cellule rapportrice	n.i	8 nM 5.3 attomoles	0.3-5 nM 0.2-3.3 attomoles	Shembekar <i>et al.</i> <sup>151</sup>

- **Autres stratégies d'immunoessais en gouttes**

De nouvelles stratégies pour la détection de protéines en gouttes par immunoessais en se passant de co-particules se sont développées, comme celle proposée en 2022 par Rutkauskaite *et al.* pour détecter des anticorps sécrétés par l'utilisation d'un couple de fluorophore FRET. Les fluorophores sont conjugués sur l'antigène cible et sur un anticorps ciblant l'anticorps sécrété. La formation des immunosandwichs rapproche les deux fluorophores générant ainsi un signal de détection.<sup>153</sup> Mes travaux de thèse ont également porté sur le développement d'une alternative à l'utilisation de particules fonctionnalisées, par

l'exploitation de la surface offerte par l'interface eau/huile des gouttes. Cette méthode nécessite de fonctionnaliser les têtes hydrophiles des tensioactifs afin de former des surfaces de capture *in situ*, directement dans les gouttes. Cette stratégie a pour but de répondre aux limitations des surfaces de captures co-encapsulées, d'avoir une homogénéité entre les gouttes, et la formation d'immunosandwichs en surface de goutte permet d'avoir une relocalisation du signal de fluorescence caractéristique et facile à identifier.

#### 2.4.3. Immunoessais digitaux en gouttes

La microfluidique en gouttes associée aux immunoessais a également été utilisée dans le développement de méthode ultra-sensible de détection de protéines, avec l'immunoessai digital en gouttes.<sup>154</sup> Cette technique est dérivée de l'étude monomoléculaire de l'activité enzymatique (Single Molecule Array, SIMOA).<sup>155</sup> Cette technique repose sur l'utilisation d'un large excès de billes fonctionnalisées par rapport à la protéine cible, permettant de n'avoir qu'une seule protéine capturée par bille. Chaque bille est ensuite individualisée, et la détection effectuée en formant des immunosandwichs pour détecter les billes ayant capturées la cible, permettant une limite de détection de l'ordre du femtomolaire à l'attomolaire.<sup>140,156</sup> L'immunoessai digital nécessite cependant d'être en mesure d'individualiser les billes fonctionnalisées et de pouvoir toutes les observer, chaque bille non individualisée ou non observée diminuant la sensibilité de l'analyse.<sup>156</sup> La microfluidique en goutte peut être associée à l'immunoessai digital en facilitant le fractionnement de l'échantillon en gouttes, permettant l'individualisation rapide, homogène, efficace et à haut débit des billes, augmentant ainsi le nombre de billes observables par analyse. De plus, l'utilisation de gouttes à la place de micropuits diminue le coût de matériel. Dans cette approche, chaque goutte va servir de puit individuel dans lesquels l'amplification du signal de fluorescence a lieu.<sup>156,157</sup> Ces méthodes permettent de détecter des protéines très peu abondantes au sein d'échantillons complexes.

Afin de pouvoir développer toutes ces applications, il est cependant nécessaire de produire des gouttes stables dans le temps. Pour cela, l'utilisation de tensioactifs est nécessaire.

### 3. Les tensioactifs en microfluidique en gouttes

#### 3.1. Rôle des tensioactifs dans la stabilité des émulsions et la dispersité de taille des gouttes

Les émulsions ne sont pas des systèmes thermodynamiques favorables, leur vieillissement conduit à une séparation des deux phases, par le biais de différents mécanismes : crémage ou sédimentation, floculation, mûrissement d'Ostwald ou encore coalescence des gouttes.<sup>158</sup> L'utilisation de tensioactifs permet de maintenir l'homogénéité des gouttes et réduire le risque de coalescence des émulsions.<sup>14</sup>

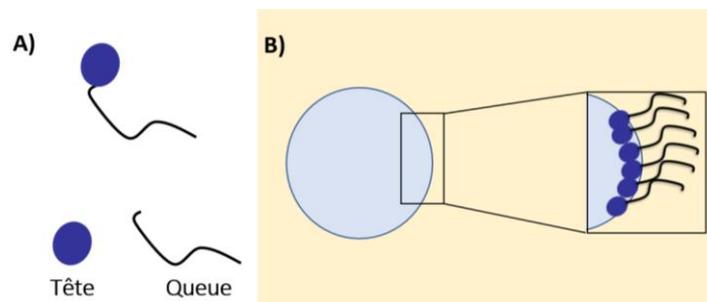


Figure 12 : A) Structure générale d'un tensioactif. B) Positionnement des tensioactifs à l'interface de gouttes eau/huile

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de plusieurs parties compatibles avec différentes phases non miscibles, par exemple de l'eau et de l'huile. Ces parties sont souvent appelées « tête(s) » et « queue(s) » (Figure 12, A). Leurs propriétés leur permettent de se placer à l'interface de deux phases et d'abaisser la tension superficielle (Figure 12, B), ce qui permet de diminuer le risque de fusion des gouttes et donc de coalescence des émulsions. En effet, la situation la plus stabilisante lorsque deux phases non miscibles sont en contact est de diminuer le plus possible la surface de contact, pour diminuer la tension de surface. Or lorsque deux gouttes de volume égal ( $V_1$ ) et aire égale ( $A_1$ ) fusionnent, le volume de la goutte formée est la somme ( $V_2 = 2V_1$ ) du volume des deux gouttes initiales, mais l'aire ( $A_2$ ) de la nouvelle goutte est plus faible que la somme des aires ( $A_1$ ) des deux gouttes initiales ( $A_2 < 2A_1$ ) (Figure 13). Ainsi, la fusion des gouttes entraîne une diminution de la surface de contact entre les deux phases. Abaisser la tension de surface entre les phases par l'adsorption de tensioactifs à l'interface permet donc de diminuer le risque de coalescence.<sup>29,159,160</sup> Plus les tensioactifs s'adsorbent à l'interface, plus la tension superficielle diminue, jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Ce plateau est causé par l'atteinte de la concentration micellaire critique (CMC). Cette concentration est la concentration en solution au-delà de

laquelle les tensioactifs vont s'agglomérer entre eux en formant des micelles ou des micelles inverses, et ne sont donc plus disponibles pour s'adsorber à l'interface.<sup>161</sup>

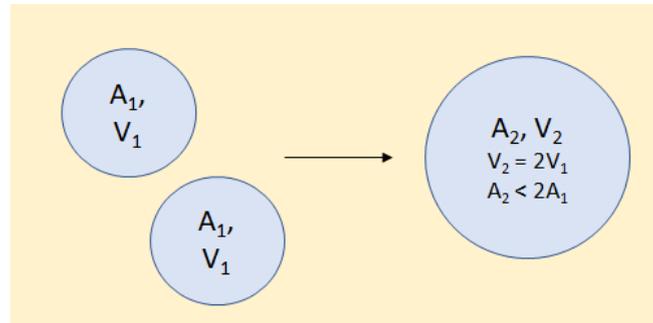


Figure 13: Coalescence de gouttes. Deux gouttes d'aire ( $A_1$ ) et de Volume ( $V_1$ ) peuvent fusionner pour former une goutte de volume ( $V_2$ ) qui est la somme des volumes des deux gouttes mères, et d'aire ( $A_2$ ) inférieure à la somme des deux aires des gouttes mères. La fusion des gouttes permet donc de diminuer la surface de contact entre les deux phases.

La morphologie des gouttes, leur déformation, compression, fusion va également impacter la tension superficielle, en modifiant la concentration de tensioactifs à la surface. De plus, la répartition de tensioactifs à la surface des gouttes n'est pas homogène dû au flux de la phase continue entourant les gouttes. Les tensioactifs en surface sont poussés à l'arrière des gouttes, appauvrissant l'avant, créant un gradient de tension de surface. Cela entraîne une rigidification de l'interface et l'apparition d'un effet de Marangoni (déplacement de fluide d'une zone à basse tension superficielle vers une zone à haute tension superficielle) s'opposant au flux de la phase continue.<sup>14</sup>

En plus de la diminution de la tension de surface, les tensioactifs jouent d'autres rôles pour éviter la coalescence des émulsions. Ils vont notamment limiter les contacts entre les gouttes, en entraînant un phénomène de répulsion stérique, éloignant les gouttes les unes des autres. De plus l'effet de Marangoni créé par la répartition hétérogène des tensioactifs va également contribuer à limiter les contacts entre gouttes. Lorsque deux gouttes se rapprochent, la phase continue entre les deux gouttes est drainée, mais cette fuite est contrebalancée par l'effet de Marangoni, limitant le drainage de la phase entre les gouttes et évitant ainsi leur contact forcé.<sup>14,162</sup>

En plus de la coalescence, d'autres mécanismes de déstabilisation des émulsions sont importants à considérer, comme le mûrissement d'Ostwald lié à la pression interne des gouttes. Plus les gouttes sont petites, plus leur pression interne est élevée. Cela conduit à la formation de micelles par les petites gouttes qui vont se dissoudre dans des gouttes plus

grandes, et conduit à la formation d'une polydispersité de l'émulsion et à l'augmentation de taille des gouttes au fil du temps.<sup>163</sup> D'autres mécanismes comme la floculation (agrégation de gouttes ensemble) et le crémage et/ou sédimentation (regroupement des gouttes en raison de la différence de densité entre les phases) contribuent à la déstabilisation des émulsions.<sup>164</sup>

### 3.2. Évaluations des propriétés des tensioactifs

#### 3.2.1. Paramètres généraux

Les tensioactifs sont caractérisables par plusieurs paramètres physico-chimiques. Parmi ces paramètres, on retrouve la balance hydrophile/lipophile (HLB),<sup>165,166</sup> qui calcule le ratio de poids moléculaire de la partie hydrophile sur le poids moléculaire totale du tensioactif, permettant de déterminer si le tensioactif est de nature plus hydrophile ou plus hydrophobe. La concentration micellaire critique (CMC) d'un tensioactif est également un paramètre caractéristique, car au-delà de cette concentration l'excès de tensioactifs va former des micelles pouvant influencer les propriétés des émulsions et favoriser les échanges entre les gouttes.<sup>161,167,168</sup> La CMC peut être déterminée par plusieurs méthodes : mesure de tension superficielle, diffusion de lumière dans la phase continue, la RMN, ou encore par spectrophotométrie UV/visible. En effet, une fois la CMC atteinte la diminution de tension de surface atteint un plateau, et des micelles se forment en solution, ce que ces différentes méthodes peuvent détecter.<sup>167,169-172</sup> Il est également possible de déterminer l'aire occupée par un tensioactif à l'interface des gouttes, pour évaluer l'encombrement d'un tensioactif et le nombre maximale de molécules pouvant se placer à l'interface.<sup>173,174</sup>

#### 3.2.2. Tension superficielle

La mesure de la tension superficielle à la surface de gouttes peut se mesurer de différentes façons, dont la méthode de la goutte pendante/montante, que nous avons utilisée dans nos travaux.<sup>175-177</sup> La méthode de la goutte pendante (ou montante) est une des plus utilisées pour déterminer la diminution de tension superficielle induite par un tensioactif.<sup>177</sup> Dans cette technique, une goutte se forme au bout d'un capillaire et pend ou monte, soit dans l'air, soit dans une phase non miscible, et le profil de la goutte (taille, volume, forme) est imagé par une caméra. La forme d'une goutte pendante peut également être modélisée par la résolution mathématique d'équations dérivés de l'équation de Young-Laplace :

$$\Delta P = P_i - P_o = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Avec  $\Delta P$  la différence de pression à l'interface (Pa, N.m<sup>-2</sup>),  $P_i$  la pression dans la goutte (Pa),  $P_o$  la pression à l'extérieur de la goutte (Pa),  $\gamma$  la tension superficielle (N.m<sup>-1</sup>),  $R_1$  et  $R_2$  deux rayons de courbure de la goutte à un point  $x$  à la surface de la goutte (m). Cette équation va relier la différence de pression entre l'extérieur et l'intérieur de la goutte avec la courbe de sa surface et la tension de surface.

La tension superficielle est ensuite déterminée en faisant correspondre le profil théorique d'une goutte obtenu par la résolution numérique de l'équation de Young-Laplace et le profil réel de la goutte formée prise en photo.

### 3.2.3. Biocompatibilité

Les tensioactifs peuvent être utilisés pour stabiliser des gouttes contenant du matériel biologique (cellules, biomolécules). Il est donc nécessaire pour ces tensioactifs d'être biocompatibles, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas causer d'effets néfastes pour les cellules (toxicité, inhibition de leur prolifération, ...), ni interagir avec les biomolécules, entraînant leur dégradation ou leur adsorption à l'interface. La biocompatibilité d'un tensioactif peut se vérifier à plusieurs niveaux, sur protéines et sur cellules.

L'interaction avec des biomolécules peut s'évaluer en marquant d'un fluorophore une protéine, et en regardant sa localisation dans les gouttes. En cas d'adsorption à l'interface, la fluorescence sera localisée en surface, et ne sera pas homogène dans le contenu.<sup>178</sup> Il est aussi possible de vérifier l'activité des biomolécules en gouttes par des tests d'activité enzymatique, tel que de la PCR en gouttes ou de la traduction in vitro (IVT)<sup>179-181</sup> Ces tests ne permettent cependant pas forcément de dire si il y a eu une absence totale d'interactions avec le contenu des gouttes.

Pour l'étude de la biocompatibilité avec des cellules, il est possible d'effectuer de la culture de cellules et des études de cytotoxicité en plaque.<sup>179,182</sup> La viabilité et prolifération cellulaire peut aussi être évaluée directement en gouttes après l'encapsulation de cellules, en évaluant la prolifération ou lyse des cellules.<sup>2,181,183</sup> Cette stratégie permet également d'évaluer l'effet de l'encapsulation en milieu clôt sur les cellules.

### 3.3. Composition des tensioactifs fluorés en microfluidique en gouttes

#### 3.3.1. *Influence de la phase continue sur la composition des tensioactifs*

Les tensioactifs doivent avoir une structure compatible avec la phase continue.<sup>10,184</sup> Or pour les applications biologiques, la plupart des systèmes de microfluidiques en gouttes vont utiliser une phase huileuse fluorée, qui possèdent plusieurs avantages, présentés dans cette partie. Les autres systèmes utilisant des tensioactifs avec des huiles minérales et des huiles silicones ne sont pas développés dans cette thèse.<sup>14</sup>

Les huiles fluorées sont composées de molécules *perfluorées*, dont les liaisons C-H sont remplacées par des liaisons C-F, et peuvent contenir des groupements fonctionnels (amine, éthoxy, méthoxy).<sup>184</sup> Les différences entre les hydrocarbures et les fluorocarbures sont principalement dues aux propriétés (taille, masse, électronégativité) des atomes de fluors, qui rendent les chaînes *perfluorées* plus grosses, lourdes, encombrantes, rigides et moins polarisables que les chaînes hydrocarbonées. Leurs propriétés rendent les huiles fluorées à la fois hydrophobes et oléophobes,<sup>184-188</sup> ce qui les rend d'autant plus intéressantes dans le cadre d'émulsions pour limiter les échanges entre les gouttes et la fuite de composés organiques dans la phase continue huileuse. Ces huiles sont également biocompatibles et permettent également la solubilisation de gaz, rendant ce système attractif pour des émulsions utilisant du matériel biologique vivant (cellules, bactéries...).<sup>14,181,186</sup> Enfin ces huiles fluorées sont compatibles avec les matériaux de prototypage utilisés pour la fabrication des canaux microfluidiques, comme le PolyDiMethylSiloxane (PDMS), contrairement aux hydrocarbures et huiles silicones.<sup>14,184</sup>

L'ensemble de ces propriétés : hydrophobicité, lipophobicité, perméabilité aux gaz, biocompatibilité, compatibilité avec les matériaux de prototypage microfluidique, font des huiles fluorées un système de choix pour les applications de microfluidique en gouttes.

#### 3.3.2. *Structure des tensioactifs courants*

Les premiers tensioactifs fluorés, des *per-fluoroalkyles* (PFAS) composés d'une courte chaîne fluorée (8-10 carbones) tel que le perfluorooctanol ou decanol ne suffisaient pas pour stabiliser les émulsions à long-terme, et pouvait également entraîner une perte de biocompatibilité avec l'adsorption de molécules à la surface des gouttes.<sup>178,189,190</sup> De plus longues chaînes *perfluorées*, les PerFluoroPolyEthers (PFPE) (composés de motifs

perfluoroalkyles joint par des liaisons éthers) ont ensuite été utilisées. Ces chaînes peuvent former une couche épaisse à l'extérieur des gouttes apportant une meilleure stabilité des émulsions formées.<sup>181</sup> Cependant ce type de queues fluorées est commercialisée avec un acide carboxylique terminal (Krytox), et ce groupement est connu pour interagir avec les biomolécules des gouttes entraînant leur adsorption à l'interface.<sup>48,178,180,191</sup> Le couplage de ces queues fluorées avec des têtes hydrophiles inertes vis-à-vis du matériel biologique encapsulé a donc été exploré, afin d'obtenir des tensioactifs efficaces et biocompatibles. Différents motifs polaires linéaires et cycliques ont été testés sur des queues fluorées,<sup>173,192</sup> et l'utilisation de motifs éthylène glycols linéaires s'est développée. Les polyéthylène glycols (PEG) sont largement utilisés en tant que connecteurs hydrophiles pour la fonctionnalisation de biomolécules tel que des protéines,<sup>193</sup> et sont utilisés en tant que revêtement de surface pour empêcher l'adsorption de protéines.<sup>194-196</sup> Les longueurs de chaînes PEG jouent également sur leur capacité à rendre une surface inerte vis-à-vis de biomolécules, et joue sur leur structure et repliement dans l'espace. Ainsi de longues chaînes PEG vont pouvoir former des couches épaisses couvrant toute la surface fonctionalisée.<sup>197,198</sup> L'utilisation de motifs PEG en tant que têtes hydrophiles de tensioactifs est donc compatible avec les critères d'hydrophilie et de biocompatibilité souhaités.

Holtze *et al.* en 2008 et Etienne *et al.* en 2017 ont étudié l'effet de la nature et longueur des têtes hydrophiles sur la stabilité de tensioactifs dibloc (deux parties, une fluorophile et une hydrophile) et tribloc (trois parties, deux fluorophiles et une hydrophile). Les tensioactifs ainsi développés sont composés de queue(s) PFPE et de têtes polaires PEG et Jeffamine®, contenant des motifs PEG et polypropylène glycols (PPG), moins hydrophiles (Figure 14).<sup>174,181,199,200</sup>

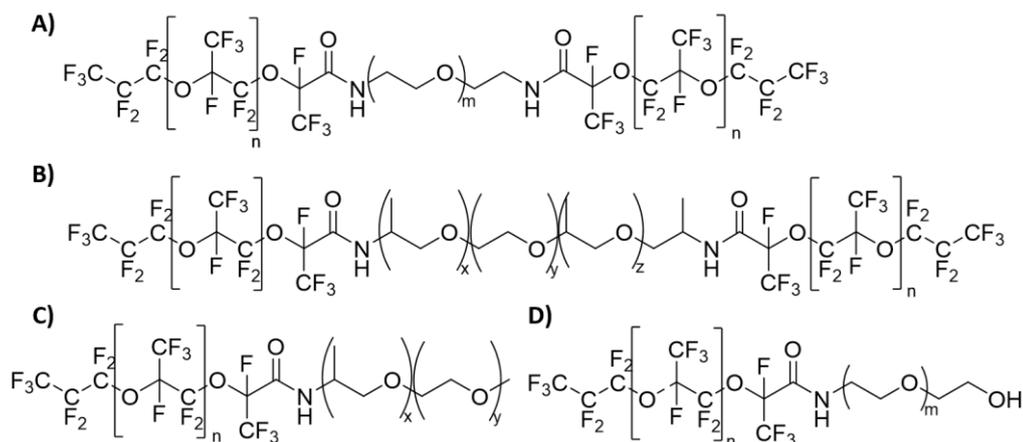


Figure 14: Exemples de structure générale de fluorotensioactifs ; A) Tribloc PFPE-PEG-PFPE ; B) Tribloc PFPE-(PPG/PEG)-PFPE ; C) Dibloc PFPE-(PPG/PEG) ; D) Dibloc PFPE-PEG.<sup>174</sup>

Leurs travaux sur les tensioactifs tribloc ont montré que la taille de la partie PEG par rapport aux chaînes PFPE est importante pour la stabilité des gouttes, avec un ratio optimal de masse molaire estimé à environ 6000/600/6000 g.mol<sup>-1</sup> (PFPE-PEG-PFPE = (PFPE)<sub>2</sub>-PEG) (Figure 14, A). L'ajout d'autres motifs dans les têtes hydrophiles semble pouvoir améliorer la stabilité des gouttes, à condition de conserver le ratio PEG/PFPE. Ainsi l'utilisation d'une tête hydrophile Jeffamine® (Figure 14, B), ayant une partie PEG de 600 g.mol<sup>-1</sup> et une masse molaire totale de 900 g.mol<sup>-1</sup> permet l'obtention d'un tensioactif abaissant plus la tension de surface et stabilisant plus les gouttes. En revanche, l'utilisation d'une tête hydrophile de même structure mixte (PEG/PPG) et de masse molaire totale de 600 g.mol<sup>-1</sup>, dont la partie PEG est ainsi plus petite, forme un tensioactif moins stabilisant. Ces résultats semblent ainsi indiquer que l'équilibre du ratio PFPE/PEG est crucial afin d'optimiser la stabilité induite par les tensioactifs, et que la longueur/masse molaire de PEG va être plus importante que la longueur ou masse molaire totale de la tête hydrophile.

Concernant les tensioactifs dibloc, ces travaux ainsi que les travaux de Lucio *et al.*<sup>201</sup> montrent également un effet de ratio PEG/PFPE, avec une meilleure stabilité des émulsions quand la longueur du PEG augmente.

Un autre aspect à considérer pour la stabilisation des émulsions est la nature de la phase aqueuse.<sup>174</sup> Selon la salinité de la phase aqueuse, la solubilité des PEG et des têtes hydrophiles peut diminuer, modifiant leurs propriétés (structures, repliements) et diminuant leur capacité à stabiliser les émulsions.<sup>202</sup> Cela peut entraîner un effet stabilisant promu par le nombre de

molécules de tensioactifs à l'interface, et donc une stabilité favorisée par l'utilisation de dibloc.<sup>174</sup>

Ces travaux ont conduit à l'utilisation en routine de tensioactifs tribloc composés de queues PFPE (Krytox FSH) et d'une tête hydrophile PEG, ou mixte PEG/PPG (Figure 14, A, B).<sup>174,180,200</sup> Ces tensioactifs sont commercialement disponibles.<sup>169,183,203</sup> Cependant les tensioactifs PFPE avec des têtes hydrophiles PEG ou PEG-PPG offrent peu de possibilités de variété structurale et les tribloc peuvent présenter des variations de qualité inter-lots.<sup>183</sup>

D'autres types de têtes hydrophiles ont été développés, afin de permettre de plus facilement varier la structure et d'aboutir à des tensioactifs tribloc et dibloc performants pour stabiliser les gouttes et/ou pour limiter la fuite de molécules organiques des gouttes. De nouvelles têtes hydrophiles ont également été conçues pour apporter des groupements fonctionnalisables aux tensioactifs, ou pour pouvoir contrôler la stabilisation et déstabilisation (coalescence) des gouttes par le biais de stimulus externes. Enfin des têtes hydrophiles fonctionnalisées et pré-fonctionnalisées ont également été développées afin d'effectuer des interactions spécifiques entre le contenu des gouttes et l'interface huile/eau. Ces nouveaux tensioactifs vont être décrits dans les prochaines parties.

### *3.3.3. Nouvelles structures de têtes hydrophiles (non fonctionnalisées)*

Une première stratégie, développée par Wagner *et al.* en 2015 a consisté à travailler sur des tensioactifs tribloc en remplaçant la tête hydrophile PEG de référence par un dérivé polyglycérol linéaire (LPG) de même longueur, qui est également hydrophile et biocompatible (Figure 15).<sup>169</sup> Cette nouvelle structure apporte la possibilité d'introduire des modifications sur les chaînes latérales de la tête hydrophile, par exemple par la formation d'éthers méthyliques. Ces nouveaux tensioactifs tribloc ont été capable de diminuer la tension superficielle entre la phase aqueuse et la phase fluorée et de produire des gouttes monodisperses. Cependant les tensioactifs portant une tête hydrophile très polaire hydroxy-LPG **11** n'ont pas permis de maintenir l'intégrité des gouttes après à un stress mécanique, contrairement au tensioactif méthoxy-LPG **12**.<sup>169</sup>

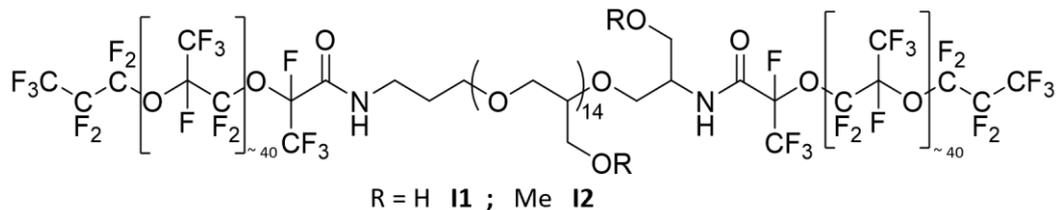


Figure 15 : Structure des tensioactifs polyglycérols linéaires (LPG).<sup>169</sup>

Chowdhury *et al.* de 2019 à 2021 ont appliqués une stratégie similaire, en travaillant sur des tensioactifs dibloc glycérols, portant soit une tête monoglycérol (**G I3**), soit une tête triglycérol dendritique (dTG **I4**) couplés à des PFPE de longueurs différentes (Figure 16, A, B).<sup>183,204,205</sup>

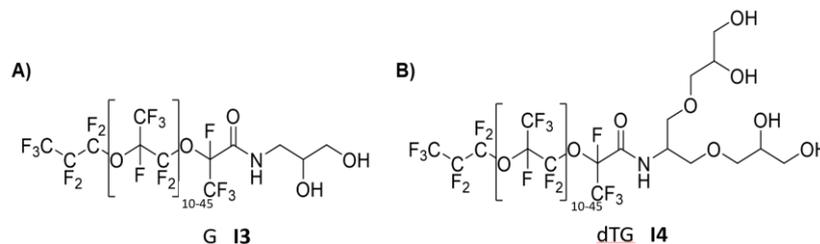


Figure 16 : Structures générale des tensioactifs A) glycérol (G) et B) triglycérols dendritique (dTG).<sup>183,204</sup>

Tous les tensioactifs testés ont permis la formation de gouttes monodisperses, et un maintien des émulsions intactes pendant sept jours pour les tensioactifs portant une tête polaire monoglycérol **I3** ou trente jours pour ceux portant des têtes polaires triglycérols (dTG **I4**). La stabilité thermique des émulsions a montré des résultats similaires : les tensioactifs avec des têtes polaires triglycérols (triglycérols dendritique, dTG **I4**) sont plus stabilisants que les tensioactifs avec une tête polaire monoglycérol (**G I3**) (émulsion totalement coalescée) quel que soit la longueur de la queue fluorée, et peuvent même maintenir les gouttes monodisperses. De plus, le tensioactif dTG, quel que soit la longueur de la partie PFPE, égale ou excède la stabilité thermique induite par le tensioactif commercial de référence, le tribloc PEG-PFPE<sub>2</sub> (RAN Biotechnologies), qui induit une fusion partielle de gouttes. Au vu des différences de structures, il est probable que l'effet stabilisant soit lié à la taille et au poids moléculaire : plus la tête hydrophile est longue, plus l'effet stabilisant semble important.<sup>173,183</sup>

Afin d'évaluer l'influence de la structure spatiale de la tête hydrophile, le tensioactif triglycérol dendritique (PFPE-dTG **I4**) a été comparé à un équivalent linéaire de même composition **I5**, ainsi qu'à un diglycérol linéaire (IDG, **I6**) (Figure 17, A, B).<sup>204</sup>



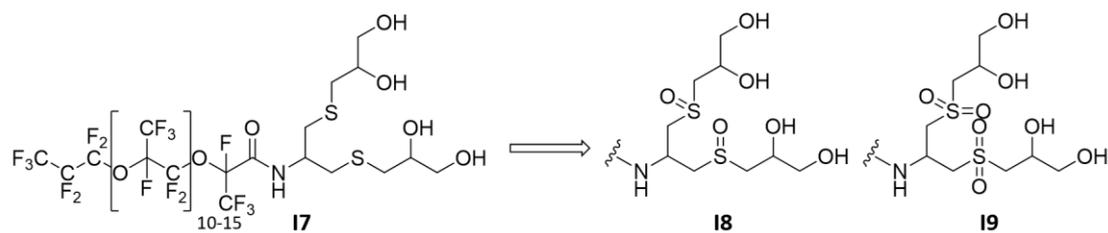


Figure 17 : Structure des tensioactifs organosulfurés <sup>210</sup>

Pour résumer, de nouvelles têtes hydrophiles ont donc été développées, remplaçant les motifs PEG classiques par des nouveaux groupements et permettant l'obtention de tensioactifs performants, avec des groupements accessibles et fonctionnalisables. La capacité des tensioactifs à stabiliser des émulsions semble également dépendre de la longueur et de la géométrie spatiale des têtes hydrophiles.

#### 3.3.4. Tensioactifs modifiables par stimulus externe

D'autres équipes ont travaillé sur le développement de têtes hydrophiles capables de modifier les propriétés des tensioactifs suite à un stimulus extérieur, notamment pour permettre de contrôler la coalescence des émulsions. L'objectif de ces nouveaux tensioactifs est de pouvoir faire de la fusion de gouttes, ou de pouvoir récupérer le contenu des gouttes facilement après les expériences, sans avoir à utiliser de déstabilisation chimique (par ajout de perfluorooctanol par exemple). Dunkel *et al.* ont par exemple travaillé en 2016 sur des tensioactifs PFPE portant des têtes hydrophiles pegylées photoclivables permettant la coalescence contrôlée de gouttes proches spatialement les unes des autres après irradiation (Figure 18, A).<sup>206</sup> Cependant le clivage irréversible des têtes hydrophiles de ces tensioactifs après exposition à la lumière nécessite des précautions importantes pour la manipulation des tensioactifs et des gouttes. An *et al.* en 2021 ont également contribué à cette stratégie en développant des tensioactifs dibloc constitué d'une queue PFPE et de tête hydrophiles formés à partir de polymères thermosensibles : poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM, **I13**) (Figure 18, B) ou poly(2-éthyl-2-oxazoline) (pEtOx, **I14**) (Figure 18, C).<sup>207</sup> Quand la température dépasse la température de solution critique inférieure (TSCI) des polymères, ceux-ci changent de conformation, deviennent hydrophobes, non miscible à la phase aqueuse, entraînant une déstabilisation des gouttes. Dans les deux stratégies, les tensioactifs ont montré une capacité à stabiliser les émulsions pendant plusieurs jours sans fusion de gouttes, et une déstabilisation rapide en quelques minutes après stimuli externe (irradiation ou température).

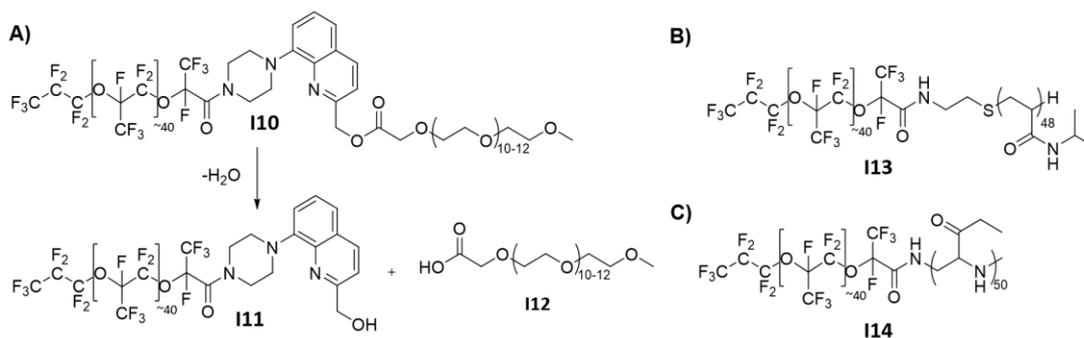


Figure 18 : Structure des tensioactifs photosensibles (A) et thermosensibles (B, C).<sup>206,207</sup>

L'ensemble de ces travaux indique qu'il est possible de développer de nouvelles têtes hydrophiles pour former des tensioactifs fluorés tribloc ou dibloc, qui forment des gouttes aussi stables ou plus stables que les tensioactifs tribloc commerciaux de référence. Ces nouvelles têtes hydrophiles peuvent présenter des groupements disponibles pour des fonctionnalisations ultérieures, ou être conçus pour simplifier les opérations de manipulation des gouttes (coalescence contrôlée, récupération du contenu des gouttes). Un autre point d'intérêt contribuant à la recherche et au développement de nouveaux tensioactifs est le transport moléculaire entre les gouttes, détaillé dans la prochaine partie.

### 3.4. Tensioactifs fluorés et rétention de molécules dans les gouttes

Les tensioactifs sont impliqués dans un autre phénomène important dans les émulsions : la rétention de molécules dans les gouttes. L'absence de rétention peut entraîner des échanges entre les gouttes, qui conduit à homogénéiser la concentration de molécules entre les gouttes. Ce phénomène n'est pas souhaitable pour certaines applications en microfluidique en gouttes, car il conduit à de la contamination inter-gouttes.

Le transport moléculaire, ou cross-talk, peut se faire par deux mécanismes : la diffusion passive du composé dans la phase huileuse continue, et l'échange du composé entre les gouttes par micelles inverses.<sup>208</sup>

L'utilisation d'une phase huileuse fluorée va permettre de réduire la solubilité des composés dans la phase continue, et limiter leur diffusion. La nature des composés (hydrophile/hydrophobe) influe également directement sur leur capacité à être retenues dans les gouttes. Par exemple, les composés très hydrophiles ( $\log D < -4$ ) vont très faiblement

diffuser dans la phase fluorée. Ainsi passer d'une 7-amino-4-méthylcoumarine, un fluorophore ayant un LogD proche de 1 à son dérivé l'acide 7-aminocoumarine-4-méthanesulfonique (ACMS), de LogD proche -5, augmente la rétention en gouttes du fluorophore de quelques secondes à plusieurs jours (Figure 19).<sup>208</sup> De plus, la nature et le contenu de la phase aqueuse va influencer sur la rétention des molécules. L'utilisation de sels va faciliter la diffusion des composés en diminuant leur solvatation, tandis que des additifs comme l'albumine de sérum bovin (BSA) vont se lier aux composés et augmenter leur rétention.<sup>168,208-210</sup>

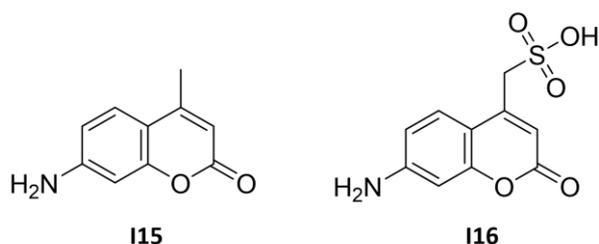


Figure 19 : Structures de la 7-amino-4-méthylcoumarine (**I15**) et de son dérivé l'acide 7-aminocoumarine-4-méthanesulfonique (**I16**)

En plus de la nature des composés et de la phase aqueuse, la nature et concentration des tensioactifs va également participer aux mécanismes de transport moléculaires. Plus la concentration en tensioactifs est élevée, plus le transport inter-gouttes et le transport de molécules dans la phase continue sont favorisés. De même, les tensioactifs chargés, comme par exemple les tensioactifs PFPE avec une tête hydrophile acide carboxylique, peuvent interagir avec des molécules organiques et faciliter leurs extractions dans la phase continue.<sup>168</sup> Le type de tensioactif : dibloc ou tribloc peut également influencer sur la rétention de molécules, les tensioactifs dibloc pouvant se compacter plus à l'interface et donc présenter une couche de têtes hydrophiles plus dense que des tensioactifs tribloc, réduisant la fuite.<sup>209</sup> Les travaux de Chowdhury *et al.* ont quant à eux montré qu'à la fois la longueur et la structure spatiale des têtes hydrophiles et des queues fluorées impactent la rétention moléculaire. Ainsi dans leur série de tensioactifs, plus la longueur linéaire de la tête hydrophile et de la queue fluorée augmente, plus la fuite est limitée.<sup>183,204</sup> Leurs travaux ont également montré que le tensioactif le plus stabilisant ne réduisait pas le plus le transport moléculaire, indiquant la nécessité d'un compromis sur la structure des tensioactifs pour avoir des gouttes stables tout en limitant les échanges. L'ensemble de ces éléments montrent que pour limiter le transport

moléculaire, l'utilisation de tensioactifs dibloc, non chargés, avec une longue queue fluorée et une tête hydrophile linéaire est favorable.

#### 4. Fonctionnalisation de l'interface huile/eau en microfluidique en goutte

Bien que dans la plupart des applications utilisant des tensioactifs l'objectif est d'éviter toute interaction entre les tensioactifs et la phase encapsulée, plusieurs groupes ont travaillé sur le développement d'interfaces fonctionnalisés conçues afin d'effectuer une interaction spécifique avec le contenu des gouttes. Cette stratégie permet d'exploiter le ratio surface/volume important de l'interface, et de se passer ainsi de la co-encapsulation de particules fonctionnalisées décrite dans la partie II) 2.4.2. Développement des immunoessais en gouttes avec détection par fluorescence).

Dans cette partie seront décrit les travaux effectués sur la fonctionnalisation de l'interface de gouttes huile fluorée/phase aqueuse en microfluidique en goutte.

##### 4.1. Fonctionnalisation par des composés non fluorés

Plusieurs groupes se sont intéressés à la fonctionnalisation de l'interface huile/eau en utilisant des tensioactifs non fluorés fonctionnalisés ou des molécules fonctionnalisées diffusants à la surface de gouttes stabilisées par des tensioactifs fluorés.

Jahnke *et al.*<sup>211</sup>, en 2019, ont par exemple utilisé des dérivés de cholestérol pour fonctionnaliser des gouttes stabilisées par des tensioactifs fluorés. Les molécules de cholestérols, liées à des oligonucléotides (ADN), ont montré une interaction et adsorption stable à l'interface huile/eau des gouttes. Cela permet de pré-fonctionnaliser la surface des gouttes avec de l'ADN, formant un système « universel ». En effet, l'ADN à la surface peut s'hybrider avec un ADN complémentaire lié à une molécule ou biomolécule qui sera alors relocalisée à l'interface. Différents composés ont ainsi pu être relocalisés à la surface des gouttes : des fluorophores, des complexes d'ADN, et des protéines (filaments d'actine) par hybridation de deux brins complémentaires, des microbilles, ou encore des cellules (Figure 20).

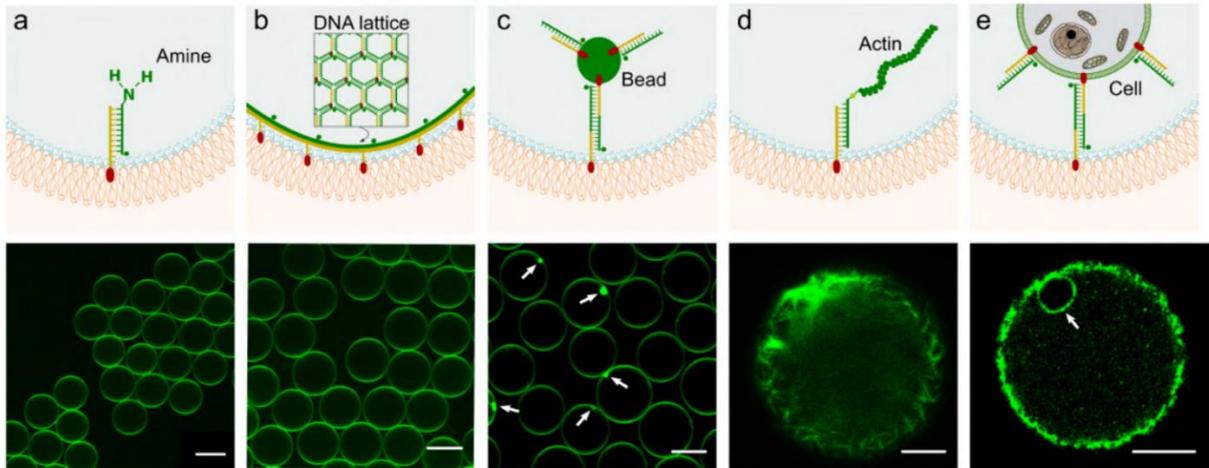


Figure 20 : Fonctionnalisation de surface de gouttes par de l'ADN-cholestérol avec relocalisation de différents composés par interactions ADN/ADN. A) relocalisation d'ADN-amine, fonctionnalisé par un fluorophore ; B) relocalisation de complexes interconnectés d'ADN ; C) relocalisation de microbilles de polystyrène fonctionnalisées par de l'ADN cholestérol avec utilisation d'un brin d'ADN complémentaire faisant le lien entre les oligonucléotides ; D) relocalisation de filaments d'actine-fluorophore ; E) relocalisation de cellules. Barre d'échelle : A) et B) 30  $\mu\text{m}$  ; C) et E) 20  $\mu\text{m}$  ; D) 5  $\mu\text{m}$ . Adapté de <sup>211</sup>

L'hybridation de deux brins d'ADN étant température dépendante, la fonctionnalisation de surface est thermosensible et réversible. Cette méthodologie permet ainsi une pré-fonctionnalisation de l'interface des gouttes et la relocalisation à la surface d'un panel de molécules ou biomolécules.

Lucio *et al.* et Li *et al.* ont également montré en 2017 la fonctionnalisation de la surface de gouttes stabilisées par des tensioactifs fluorés, en utilisant des tensioactifs non fluorés pré-fonctionnalisés qui vont se placer à l'interface (Figure 21).<sup>212,213</sup> Dans la stratégie de Lucio *et al.* les tensioactifs pré-fonctionnalisés sont conçues à partir d'une queue lipidique et d'une tête portant une biotine, formant un autre système « universel ». La biotine est en effet une molécule ayant une très forte affinité pour la streptavidine (protéine de 70 kDa). Le couple streptavidine/biotine est ainsi couramment utilisé pour isoler, analyser ou lier deux molécules ou biomolécules *via* leur interaction.<sup>214</sup> Cette stratégie permet donc de fonctionnaliser la surface des gouttes avec des composés liés à une streptavidine. Les gouttes d'huile ont ainsi été fonctionnalisées avec des ligands peptidiques Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD), qui interagissent avec les intégrines membranaires de cellules, les accrochant à la surface des gouttes.

Dans une stratégie similaire décrite par Li *et al.*,<sup>213</sup> les tensioactifs non fluorés, composés de dérivés de Pluronic F127 (PEG/PPG/PEG), sont pré-fonctionnalisés par différents groupements chimiques. Ces groupements peuvent être des amines, des acides carboxyliques, des

maléimides, des esters *N*-hydroxysuccinimide (NHS), ainsi que des groupements biotines. Cette stratégie a conduit à l'obtention d'interfaces de gouttes pouvant être fonctionnalisées par des composés liés à des groupements complémentaires. Cette fonctionnalisation se fait de manière covalente ou non covalente selon les groupements positionnés en surface de gouttes. Cela forme ainsi un autre système « universel » pouvant fonctionnaliser de manière non covalente (amine/acide) ou covalente l'interface des gouttes (par exemple par la réaction entre des esters de NHS et des amines, décrite dans la partie IV) 5.1).

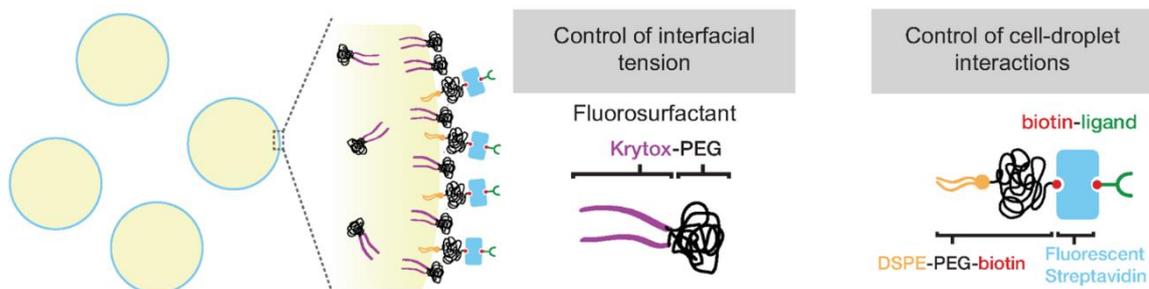


Figure 21 : Illustration du mélange de fluorotensioactifs non fonctionnalisés et de tensioactifs lipidique-biotine. Adapté de <sup>212</sup>

Ces stratégies ont ainsi montré le développement de différentes méthodes pour la fonctionnalisation de la surface des gouttes en microfluidique. Ces méthodes utilisent des interactions bien définies : ADN/ADN, biotine/streptavidine, groupements chimiques, pour former des interfaces pré-fonctionnalisées, et reposent sur l'utilisation de composés non fluorés se positionnant à la surface des gouttes.

D'autres travaux ont porté sur l'utilisation de composés fluorés pour fonctionnaliser l'interface.

#### 4.2. Utilisation de fluorotensioactifs fonctionnalisés et pré-fonctionnalisés

Plusieurs groupes ont travaillé sur la synthèse de fluorotensioactifs portant des groupements capables d'interagir avec le contenu des gouttes.

Les fluorotensioactifs fonctionnalisés ont notamment été exploités pour transformer l'interface interne des gouttes en surface catalytique pour des réactions chimiques. Par exemple, Theberge *et al.* ont synthétisé en 2009 un fluorotensioactif composé d'une queue fluorooctane et d'une tête guanidine **I17** (Figure 22, A), pouvant se complexer à de l'acétate de palladium, pour former une tête hydrophile servant de catalyseur à une réaction de Suzuki-Miyaura en gouttes.<sup>69</sup> Les tensioactifs fonctionnalisés ont également pu servir pour isoler des

protéines. Kreutz *et al.* ont développé en 2009 un fluorotensioactif fonctionnalisé **I18** synthétisé à partir d'un fluorosurfactant fluorooctane-PEG, sur lequel un groupement nitriloacétate (NTA) a été conjugué (Figure 22, B). Ce groupement peut chelater un cation nickel divalent ( $Ni^{2+}$ ). La présence de ce groupement avec le Nickel (NTA-Ni) permet de lier le tensioactif avec des protéines HisTag, une étiquette composée de six résidus histidines fréquemment retrouvée pour la purification de protéines.<sup>215</sup> Ce tensioactif a été utilisé pour faciliter la cristallisation de protéines en gouttes, en augmentant localement leur concentration à l'interface. L'utilisation de solvants et tensioactif fluoré non miscibles avec des composés organiques permet également de limiter les interférences de détergents organiques présents dans la phase aqueuse.<sup>216</sup> Ces tensioactifs sont cependant limités à une seule application.

Par la suite, en 2013, Platzman *et al.* ont travaillé sur des tensioactifs PFPE dibloc, portant une tête hydrophile PEG liée à une nanoparticule d'or **I19** (Figure 22, C).<sup>217</sup> A partir de ce tensioactif mère, plusieurs applications ont pu être développées, en fonctionnalisant la particule d'or. Le couplage de rhodamines sur les particules d'or a par exemple permis de produire des tensioactifs portant des fluorophores. Ces tensioactifs ont ensuite été utilisés pour former des gouttes et marquer leurs interfaces. De même, la fonctionnalisation des nanoparticules d'or par des peptides cycliques arginine-glycine-acide aspartique (RGD) par liaison thiol a permis l'obtention de tensioactifs qui, après leur utilisation pour produire des gouttes, peuvent interagir avec les intégrines de lymphocytes T.<sup>218</sup> Cela permet ainsi de fixer ces cellules à la surface interne des gouttes, et de mimer en goutte une adhésion cellulaire. Enfin, l'addition d'un groupement NTA-Ni sur les particules d'or par le biais d'un connecteur thiol directement dans les gouttes a permis de relocaliser à l'interface des gouttes des protéines HisTag (GFP-HisTag), de manière similaire aux travaux de Kreutz *et al.* présentés précédemment. Ces travaux représentent les premiers essais de tensioactif fluoré « universel », avec un tensioactif unique utilisable pour diverses applications selon sa fonctionnalisation, qui peut avoir lieu avant ou après formation des gouttes. Dans ces travaux, les gouttes formées sont cependant polydisperses, et ce malgré l'ajout de tensioactif tribloc non fonctionnalisé pour stabiliser les gouttes.

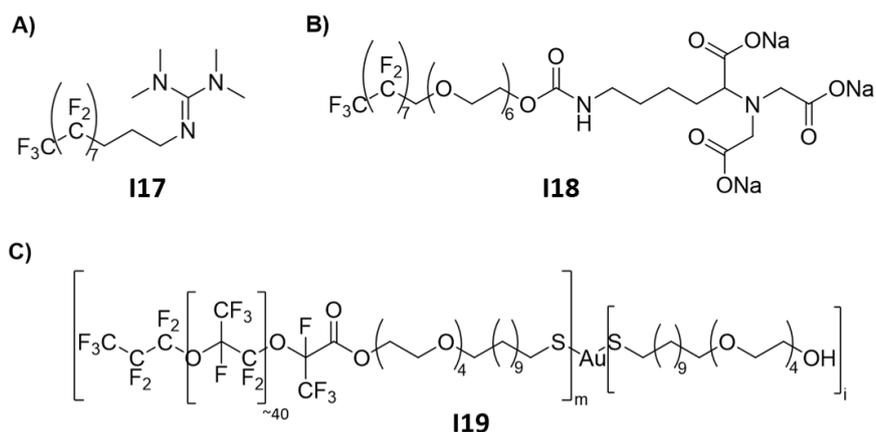


Figure 22 : Illustration de fluorotensioactifs fonctionnalisés. A) Tensioactif produit par Theberge et al.<sup>69</sup> B) Tensioactif produit par Kreutz et al.<sup>215</sup> C) Tensioactif synthétisé par Platzman et al.<sup>217</sup>

Koprowski *et al.*<sup>203</sup> en 2018 ont quant à eux appliqué une stratégie similaire, et développé des fluorotensioactifs basés sur la structure des tensioactifs retrouvés commercialement (PFPE-Jeffamine-PFPE). Ils ont utilisé la tête hydrophile Jeffamine-ED600, portant deux amines terminales à chaque extrémité, pour former des tensioactifs dibloc, rendant ainsi une des deux amines terminales disponible pour être fonctionnalisée (Figure 23, A). Cette stratégie a permis la synthèse de deux fluorotensioactifs portant des fluorophores sur leur têtes hydrophiles : un PFPE-Jeffamine-FITC (Isothiocyanate de fluorescéine) et un PFPE-Jeffamine-sulforhodamine 101 (Figure 23, B, C), pouvant être utilisés pour caractériser le pH<sup>219</sup> ou la température<sup>220</sup> dans les gouttes. Un troisième tensioactif a été synthétisé avec un motif biotine sur sa tête hydrophile (PFPE-Jeffamine-Biotine), afin d'obtenir un tensioactif pré-fonctionnalisé, « universel », (Figure 23, D).<sup>214</sup> Ce tensioactif peut par la suite réagir avec des molécules liées au groupement complémentaire streptavidine (par exemple des FITC-streptavidine). Ces travaux montrent un autre design de tensioactif fluoré « universel », dont les applications vont dépendre des biomolécules fonctionnalisées par la streptavidine.

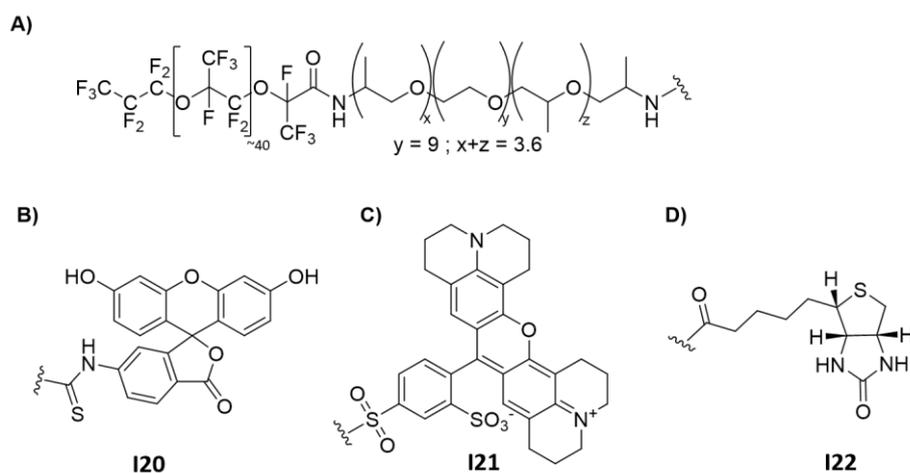


Figure 23 : Structure des tensioactifs fonctionnalisés de Koprowski *et al.* A) squelette commun : PFPE-Jeffamine ; fonctionnalisé par une : B) FITC C) Sulforhodamine ; C) Biotine

Ces travaux présentent ainsi le développement de fluorotensioactifs ayant une tête hydrophile « fonctionnalisée », permettant de modifier l'interface de gouttes pour une application spécifique. En parallèle, des tensioactifs fluorés pré-fonctionnalisés, « universels », ont été développés. Ces tensioactifs sont formés à partir d'un tensioactif « mère » dont la tête hydrophile peut être ainsi fonctionnalisée avant ou après formation des gouttes pour obtenir des interfaces fonctionnelles, par le biais de nanoparticules d'or ou de groupements biotine, suivant un cahier des charges défini.

#### 4.3. Utilisation de fluorotensioactifs chargés

Plusieurs équipes ont également utilisé des fluorotensioactif ayant des têtes polaires chargées afin de fonctionnaliser les gouttes, par exemple en utilisant la charge négative retrouvée sur la queue PFPE (sous forme d'ion carboxylate à pH physiologique) pour former une interface chargée négativement.

Haller *et al.* en 2018 ont ainsi développer un système dans lequel les tensioactifs chargés négativement relocalisent en surface de gouttes des cations (magnésium,  $Mg^{2+}$ ), qui eux-mêmes permettent la relocalisation en surface de lipides (chargés négativement).<sup>221</sup> Sheshachala *et al.* plus récemment, en 2023, ont appliqué une stratégie similaire, en utilisant le Krytox carboxylate pour fonctionnaliser la surface interne de gouttes avec des nanoparticules fonctionnalisées par de l'ADN (anionique) en utilisant la présence de cations dans la phase aqueuse comme intermédiaires. Ils ont également synthétisé un tensioactif tribloc portant deux amines protonables sur sa tête hydrophile (charges positives), et ainsi

capable de fonctionnaliser la surface de gouttes avec les nanoparticules couvertes d'ADN sans nécessité de cations intermédiaires.<sup>222</sup>

Les méthodes présentées ci-dessus reposent ainsi soit sur une fonctionnalisation spécifique de l'interface des gouttes pour une application donnée, soit sur le développement de tensioactifs « universels ». Cette stratégie permet d'avoir une interface pré-fonctionnalisée, ouvrant la voie à de nombreuses applications, mais nécessite souvent des groupements encombrants ou des liaisons non covalentes et/ou réversibles.

Une autre stratégie plus récente consiste à produire des tensioactifs « universels » contenant des groupements chimiques définis qui peuvent former par réaction bioorthogonale des liaisons covalentes, irréversible et rapide avec un groupement complémentaire apportée par une molécule ou biomolécule fonctionnalisée dans la phase aqueuse.

#### 4.4. Fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés par groupement chimique click

Plusieurs laboratoires ont travaillé sur la synthèse de fluorotensioactifs pouvant réagir par chimie click bioorthogonale, des réactions utilisant des groupements réactifs inertes vis-à-vis des fonctions chimiques retrouvées au sein des systèmes biologiques. Cela permet à ces réactions de pouvoir être utilisées au sein de milieux biologiques complexes sans interférer ni interagir avec les processus biologiques et biochimiques naturels.<sup>223,224</sup>

Suivant ce principe, les tensioactifs peuvent ainsi incorporer un des groupements réactifs sur leurs têtes hydrophiles, et une fois les gouttes formées, vont pouvoir réagir avec des molécules ou biomolécules fonctionnalisées par le groupement complémentaire et former une liaison covalente. Cette stratégie permet de conserver l'aspect pré-fonctionnalisé des tensioactifs développés dans les paragraphes précédents, en rajoutant plusieurs avantages :

- Fonctions chimiques bioorthogonales
- Groupements chimiques de bas poids moléculaire facilement incorporables sur les tensioactifs et sur les biomolécules
- Versatilité des motifs introduits

Parmi les différentes réactions bioorthogonales existantes, la Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne tendu (Strained Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition, SPAAC) a été utilisée pour la fonctionnalisation de la surface de gouttes.<sup>204,205,225</sup>

#### 4.4.1. La cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne tendu (SPAAC)

La SPAAC est une réaction de chimie bioorthogonale dans laquelle un azoture et un alcyne tendu réagissent pour former un triazole (Figure 24).<sup>226,227</sup>

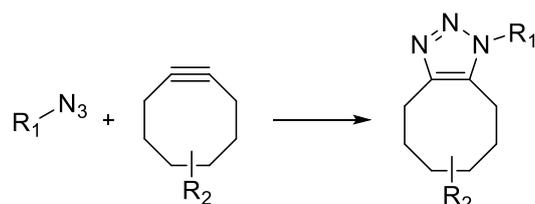


Figure 24 : Schéma de la réaction de SPAAC

La cinétique de la SPAAC va être dépendante de la réactivité de l'alcyne utilisé, ce qui a conduit au développement de différents alcynes tendus. Ainsi la cinétique réactionnelle du cyclooctyne (OCT) est de  $10^{-3} M^{-1}.s^{-1}$ , alors que celle du bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) est de  $0.14 M^{-1}.s^{-1}$  et celle du dibenzacyclooctyne (DBCO) est deux fois plus rapide, à  $0.31 M^{-1}.s^{-1}$  (Figure 25).<sup>227,228</sup>

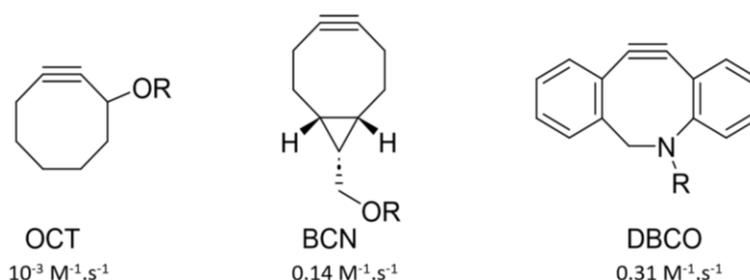


Figure 25 : Exemples d'alcynes tendus et leur cinétique réactionnelle

La SPAAC présente toutefois quelques limitations : sa cinétique est notamment plus lente que d'autres réactions bioorthogonales comme la Diels-Alder à demande électronique inverse. Les alcynes tendus peuvent réagir de manière non spécifique avec les fonctions thiols, et la structure des alcynes tendus, encombrante et plus ou moins hydrophobe selon leur structure, peut impacter l'hydrophilie et la solubilité de biomolécules fonctionnalisées par ces alcynes.<sup>229-231</sup>

#### 4.4.2. Synthèse de fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés pour des SPAAC en gouttes

Des tensioactifs pré-fonctionnalisés portant des azotures pouvant réagir avec des molécules liées à des alcynes tendus BCN ou DBCO, deux alcynes tendus couramment utilisés, ont ainsi été développés. Les têtes hydrophiles ont été conçues en utilisant des structures pegyées et dérivés de glycérols précédemment décrites (parties II) 3.3.2 et II) 3.3.3).

Chowdhury *et al.* ont publié récemment, en 2021, la synthèse de fluorotensioactifs PFPE (Krytox FSL) portant des azotures, à partir des tensioactifs glycérols présentés dans la partie 3.3.3. (Figure 26).<sup>204,205</sup>

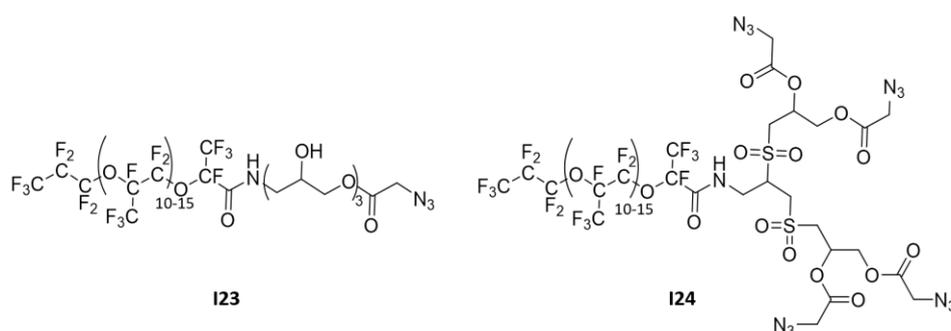


Figure 26 : Structure des tensioactifs monoazoture et tétraazotures développés par Chowdhury *et al.*<sup>204,205</sup>

Ces tensioactifs ont été utilisés pour fonctionnaliser la surface interne de gouttes en réalisant une SPAAC en goutte avec des sondes biotine-PEG-DBCO, permettant de fixer à la surface des composés streptavidine-fluorophore (Cyanine5) par affinité avec la biotine (Figure 27). La relocalisation est visible par microscopie confocale, avec la formation d'un anneau de fluorescence et un contenu de goutte sans fluorescence (Figure 27).

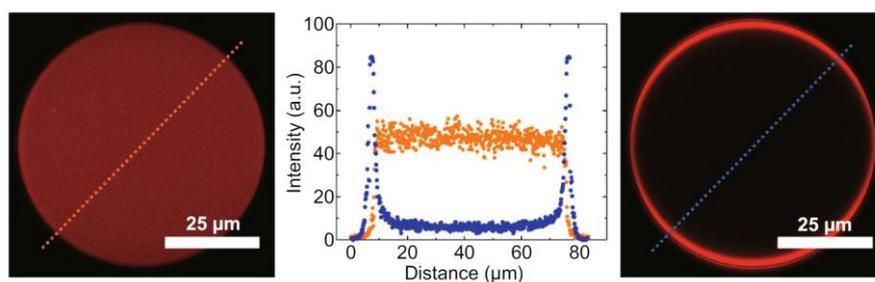


Figure 27 : SPAAC à la surface de gouttes stabilisées par des tensioactifs sans (gauche) ou avec (droite) des azotures. Adapté de<sup>205</sup>

Au sein de notre équipe, Ursuegui *et al.*, dès 2016, ont synthétisé un tensioactif dibloc composé d'une queue PFPE (Krytox FSH) et d'une tête hydrophile PEG, terminée par un azoture (Figure 28).<sup>225</sup>

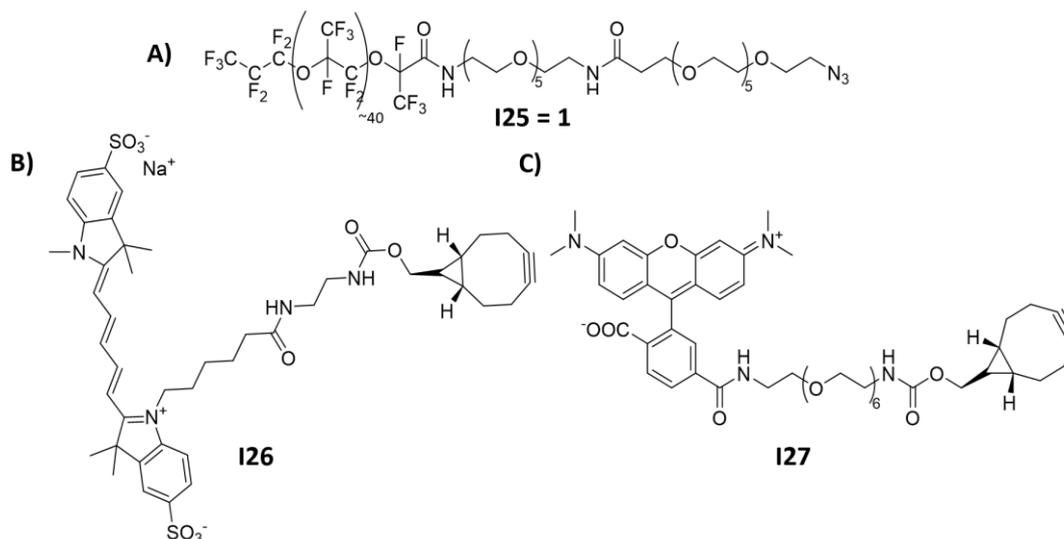


Figure 28 : Couples azoture/alcyne tendus utilisés pour fonctionnaliser la surface de gouttes par SPAAC. Adapté de <sup>225</sup>

Ce tensioactif a montré sa capacité à produire des gouttes stables, avec une surface fonctionnalisable de manière spécifique par des fluorophores conjugués à des alcynes tendus (BCN) (sulfoCyanine5-BCN, Figure 28, B et TAMRA-BCN, Figure 28, C). La réaction de SPAAC en surface des gouttes entraîne une relocalisation des fluorophores, visibles par microscopie confocale (Figure 29, a, b, c), avec une fluorescence en surface de gouttes et un contenu de goutte vide, noir. La relocalisation des fluorophores est également visible en réinjectant les gouttes dans une puce de microfluidique, avec un signal de fluorescence passant d'une forme convexe (homogénéité de fluorescence dans les gouttes) à une forme concave (fluorescence relocalisée en surface de gouttes). Cette fonctionnalisation de la surface de gouttes par une réaction de SPAAC, détectable en réinjection sur une puce de microfluidique, ouvre ainsi la possibilité d'utiliser cette méthodologie pour du tri de gouttes. La suite de ces travaux a été réalisé durant ma thèse, et va être présentée dans les prochains chapitres.

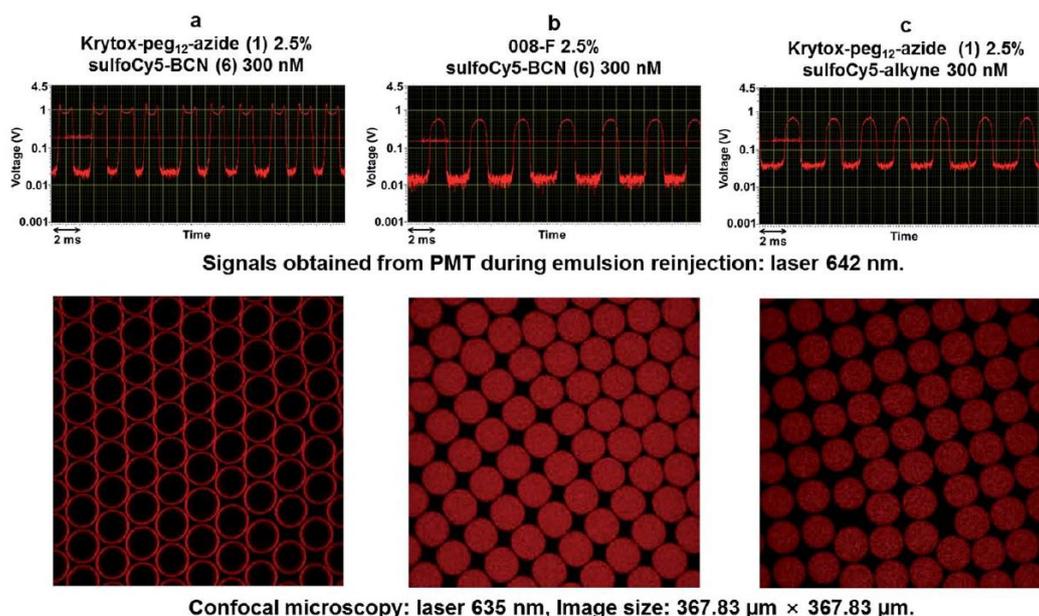


Figure 29 : Fonctionnalisation de surface de gouttes par réaction de SPAAC. A) SPAAC entre les tensioactifs monoazoture et des sondes fluorophore-BCN ; B) Contrôle négatif de SPAAC, absence de réaction entre des fluorotensioactifs commerciaux et des sondes fluorophore-BCN ; C) Contrôle négatif de SPAAC : absence de réaction entre les fluorotensioactifs monoazoture et des sondes fluorophore-alkyne vrai. Adapté de <sup>225</sup>

Ces différents tensioactifs exposent ainsi un nouveau système permettant l'obtention d'interfaces fonctionnalisées de gouttes en microfluidique, utilisant une réaction de chimie click bioorthogonale permettant une fonctionnalisation irréversible, spécifique, et utilisant des groupements chimiques de bas poids moléculaire. L'ensemble des travaux présentés dans cette partie témoignent du développement de stratégies permettant l'obtention d'interfaces fonctionnalisées et exploitables pour différentes applications en gouttes.

### III) Objectifs des travaux de Thèse

L'introduction présentée ci-dessus a montré l'important potentiel de la microfluidique en gouttes et son utilisation pour de nombreuses applications dont l'étude de la sécrétion cellulaire et la détection de protéines. Le rôle et l'importance des tensioactifs, nécessaires pour la stabilité et la manipulation des émulsions ont été présentés. De plus la surface formée par ces tensioactifs, constamment en contact avec le contenu des gouttes, est encore peu exploitée. L'objectif de mes travaux a été de synthétiser des tensioactifs capables de transformer la surface interne des gouttes en surface pré-fonctionnalisée par l'utilisation de têtes polaires chimiquement réactives. La surface ainsi formée devait pouvoir être modifiée en fonction des besoins, notamment par le greffage d'anticorps. Les tensioactifs synthétisés ont ainsi été étudiés afin d'optimiser la stabilisation et la fonctionnalisation de surface des gouttes.

#### **Projet 1 : Développement d'un immunoessai en surface de gouttes par relocalisation de fluorescence**

Le premier projet a eu pour but le développement d'un immunoessai en surface de gouttes grâce à la synthèse de tensioactifs portant des azotures sur leur tête polaires. Après production des gouttes, nous avons évalué la capacité de ces tensioactifs à effectuer une SPAAC avec des anticorps conjugués à des alcynes tendus. Ensuite, nous avons testé la capacité des anticorps fixés en surface de gouttes à capturer leur protéine cible et entraîner la formation d'immunosandwichs avec des anticorps de détection.

#### **Projet 2 : Etude de l'influence de la tête hydrophile des tensioactifs portant des azotures et des anticorps conjugués à des alcynes tendus sur la capacité à fonctionnaliser et stabiliser les émulsions en microfluidique en gouttes**

Nous avons souhaité étudier les éléments structuraux impliqués dans la capacité des tensioactifs à réagir et relocaliser les anticorps conjugués à des alcynes tendus à la surface des gouttes. Pour cela, une famille de tensioactifs portant des azotures a été synthétisée. L'ensemble des tensioactifs produits ont par la suite été comparés par rapport à leur capacité à stabiliser des émulsions et à fonctionnaliser la surface interne des gouttes avec des anticorps.



## IV) Développement d'un immunoessai en surface de gouttes par relocalisation de fluorescence

### 1. Préambule

Ce chapitre présente le développement de tensioactifs capables de fonctionnaliser la surface interne de gouttes *via* une réaction de SPAAC avec des anticorps-alcynes tendus, formant ainsi une surface de capture pour des analytes cibles. Ces travaux ont donc tout d'abord consisté à mettre au point la réaction de fonctionnalisation de surface avec des anticorps, puis nous avons mis au point un immunoessai dans les gouttes permettant la détection de protéine cible.

Ce chapitre est adapté de l'article « **Droplet Surface Immunoassay by Relocation (D-SIRE) for High-Throughput Analysis of Cytosolic Proteins at the Single-Cell Level** », publié en Février 2023 dans ACS Analytical Chemistry., volume 95, pages 4470-4478. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05168>

### 2. Introduction et travaux de notre équipe antérieurs à la thèse

#### 2.1. Utilisation de la surface des gouttes comme surface fonctionnalisée

La détection et l'analyse de cellules uniques, notamment par analyse de leur protéome et sécrétome, est une des applications de la microfluidique en gouttes présentant un intérêt majeur pour l'identification, l'isolement et l'enrichissement de sous-populations de cellules.<sup>68,77,84,132,149,232-234</sup> Différentes méthodologies d'immunoessais, comprenant notamment la formation d'immunocomplexes/immunosandwichs détectés par fluorescence, ont été décrites. Cependant, les méthodes mises au point nécessitent l'encapsulation de particules dans les gouttes (Figure 30, A), et présentent plusieurs inconvénients, expliqués dans l'introduction : qualité et quantité de surface de capture hétérogène, difficulté de co-encapsulation de cellules et particules, mobilité de la surface de capture... Une stratégie pour réduire ces inconvénients est d'exploiter la surface de contact naturellement offerte par les gouttes : l'interface huile/eau (Figure 30, B). Utiliser cette surface comme surface de capture dans des immunoessais apporte plusieurs avantages :

- Augmentation de la surface de contact offerte

- Eviter l'utilisation de co-particules, facilitant les calculs d'encapsulation des cellules si nécessaire, et permettant d'éviter le recours à des géométries de canaux complexes, des systèmes de dilution, ou des puces à multiples entrées
- Produire des gouttes avec une quantité homogène de surface de capture
- Obtention d'un signal de détection homogène facilement identifiable et localisable : le signal de l'immunoessai est visible sous la forme d'une fluorescence homogènement répartie à l'interface des gouttes, facilement localisable, permettant de s'affranchir de la problématique de localisation du signal dans les gouttes

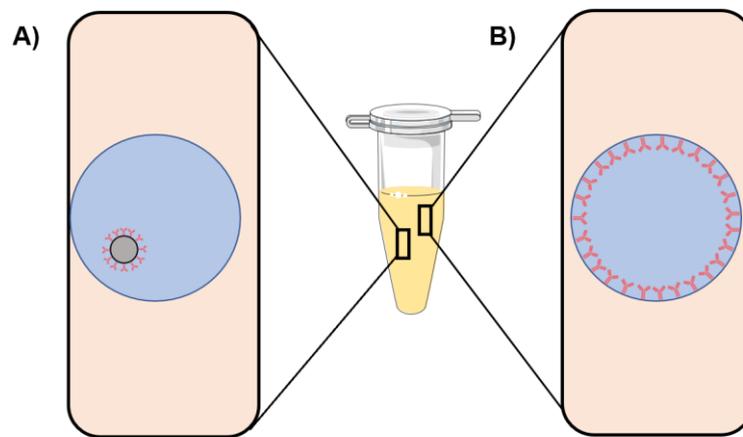


Figure 30: Représentation de surface de capture en gouttes. A) encapsulation d'une bille fonctionnalisée par des anticorps afin de capturer des analytes dans la goutte. B) Fonctionnalisation de l'interface interne des gouttes afin de capturer des analytes.

La surface de contact est calculable par l'équation :

$$S = 4 \times \pi \times r^2$$

Avec S la surface en mètre carré (m<sup>2</sup>), et le rayon en mètre (m).

Par exemple, l'encapsulation d'une bille fonctionnalisée de 6 µm de diamètre dans une goutte de 45 µL donne une surface de capture de 113 µm<sup>2</sup> ;<sup>145,147</sup> tandis que le passage à 1300 nanoparticules de 300 nm de diamètre permet d'augmenter la surface de contact à 370 µm<sup>2</sup>.<sup>149</sup> Dans le cas de l'utilisation de l'interface comme surface fonctionnalisée, la superficie va dépendre de la taille des gouttes. Si on prend pour exemple des gouttes de 45 µL, le rayon des gouttes est obtenable par l'équation :

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$$

Avec V le volume de goutte en mètre cube (m<sup>3</sup>) et r le rayon de goutte en mètre (m).

Une goutte de 45 µL à un rayon d'environ 22 µm, et une surface de 6120 µm<sup>2</sup>, soit 17 fois plus de surface de contact que lors de l'utilisation de 1300 nanoparticules fonctionnalisées de 0.3 µm, et 54 fois la surface de contact d'une bille de 6 µm. Ainsi, à volume de goutte égal, utiliser la surface des gouttes à la place de particules co-encapsulées augmente fortement la surface de contact et de capture disponible.

## 2.2. Fonctionnalisation de surface

Pour exploiter la surface des gouttes, il est nécessaire de disposer de tensioactifs pré-fonctionnalisés capables d'interagir avec le contenu des gouttes de manière spécifique, tout en conservant une bonne biocompatibilité et une stabilisation efficace des émulsions. L'introduction (partie 4. Fonctionnalisation de l'interface huile/eau en microfluidique en goutte) a traité des différents tensioactifs fonctionnalisés et pré-fonctionnalisés publiés dans la littérature, et a montré le développement de tensioactifs « universels » portant des groupements réactifs permettant la fonctionnalisation *in situ* des gouttes.

La stratégie de fonctionnalisation développée au sein de notre laboratoire repose sur l'utilisation de la réaction de SPAAC, avec l'incorporation de groupement azoture sur les têtes hydrophiles des tensioactifs et l'incorporation de groupements complémentaires, des alcynes tendus, sur les molécules ou biomolécules à relocaliser à la surface des gouttes. Les travaux initiaux de ce projet ont été publiés par Sylvain Ursuegui en 2016,<sup>225</sup> avec la synthèse d'un premier tensioactif, composé d'une queue PFPE (Krytox FSH, ~7000 g/mol) et d'une tête polaire PEG de 640 g/mol portant un azoture (Figure 31). Ce tensioactif a permis de greffer en surface de gouttes des fluorophores (TAMRA et sulfoCyanine5) fonctionnalisés par l'alcyne tendu bicyclononyne (BCN) (voir partie II) 4.4.2). Cependant, lors des essais de SPAAC avec des biomolécules tels que des anticorps, aucune relocalisation de fluorescence n'a été observée.

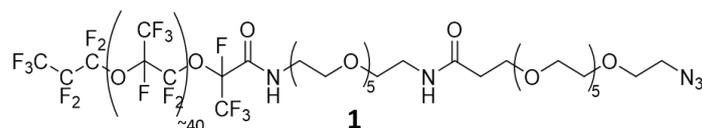


Figure 31 : Structure du tensioactif Krytox-monoN<sub>3</sub> 1

La synthèse de nouveaux tensioactifs pré-fonctionnalisés est donc nécessaire pour permettre la réaction de SPAAC en gouttes avec des anticorps (Figure 32).

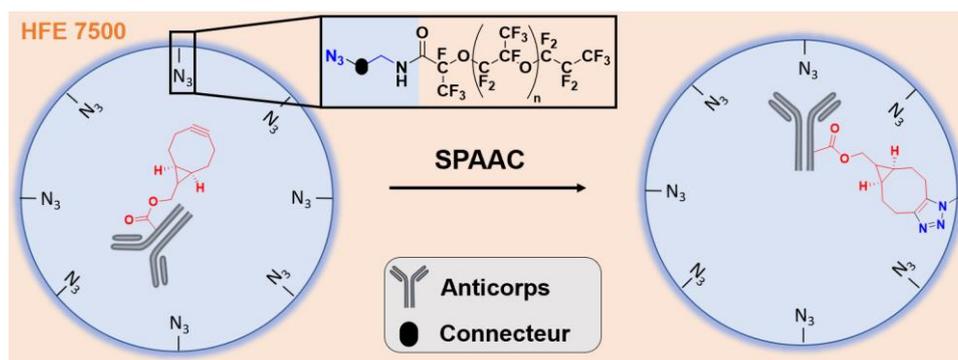


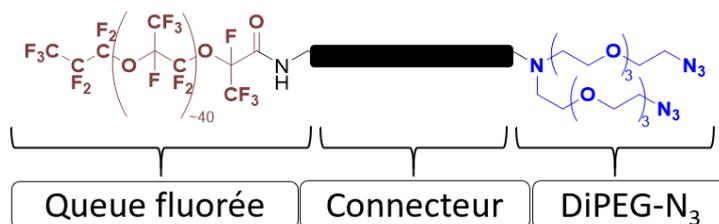
Figure 32: Schéma de la SPAAC en surface de gouttes entre un tensioactif azoture(s) et un anticorps fonctionnalisé par un alcyne tendu (BCN)

### 3. Synthèse des têtes hydrophiles pré-fonctionnalisées

#### 3.1. Structure générale des tensioactifs

L'hypothèse posée au début de ce projet a été que la SPAAC entre le tensioactif mono-azoture **1** et les anticorps-alcyne tendus n'a pas lieu en raison d'une cinétique réactionnelle trop lente avec de grosses molécules. Pour y remédier, la stratégie choisie a été d'augmenter le nombre d'azotures sur les têtes polaires des tensioactifs, et d'augmenter le nombre d'alcyne tendus sur les anticorps. Deux nouveaux tensioactifs pré-fonctionnalisés, portant deux et quatre groupements azotures sur leur têtes hydrophiles ont été synthétisés (Figure 33). Ces tensioactifs sont composés de trois parties : la queue fluorophile (Krytox FSH), un connecteur portant une amine pour effectuer un couplage avec la queue fluorée, et un ou deux groupements di-PEG azoture (Figure 33). Le premier connecteur utilisé pour générer un tensioactif diazotures **2** a été un PEG<sub>4</sub> portant à ses deux extrémités un acide carboxylique et une amine primaire. L'acide carboxylique permet le couplage avec le diPEG-azoture et l'amine primaire permet le couplage avec la queue fluorée. Dans son ensemble, la tête polaire contient un nombre total d'unités PEGs (10 unités) et un poids moléculaire (~660 g/mol) proche du premier tensioactif pré-fonctionnalisé. Le deuxième connecteur, « ethyle-triazine », a été utilisé pour former un tensioactif tétraazotures **3**. Pour cela une triazine a été disubstituée par deux groupements diPEG azoture et monosubstituée par un court bras éthylène diamine pour apporter une amine primaire nécessaire au couplage à la partie fluorée (Figure 33). Le choix de ce motif triazine comme plateforme trivalente est lié à la réactivité de ce type de motif, détaillé dans la partie de synthèse (partie IV) 3.3.2). La tête hydrophile formée est également composée d'un nombre total d'unités PEG proche des deux autres tensioactifs (dix à douze unités selon les têtes polaires).

A)



B)

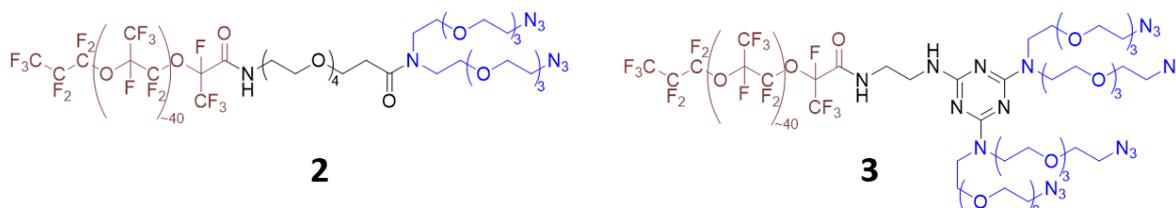


Figure 33: A) Structure générale des tensioactifs pré-fonctionnalisés ; B) Structure des tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3**

### 3.2. Synthèse de la partie terminale azotures des têtes hydrophiles

Afin de synthétiser des têtes hydrophiles portant plusieurs fonctions azotures, la méthodologie publiée en 2018 par Ursuegui *et al.* a été utilisée, pour obtenir par dimérisation réductive de PEG-azoture des synthons amino-diPEG-azoture (= diPEG-azoture, diPEG-N<sub>3</sub>) pouvant facilement être introduits par le biais de leur amine secondaire centrale.<sup>235</sup>

Un premier intermédiaire **6** (PEG-N<sub>3</sub>) a été formé par monotosylation d'un tétraéthylène glycol, formant l'intermédiaire **5**, suivi d'une monosubstitution du groupement tosyloxy par un azoture. Ces étapes ont permis d'obtenir le composé **6** avec un rendement de 63% (Figure 34).

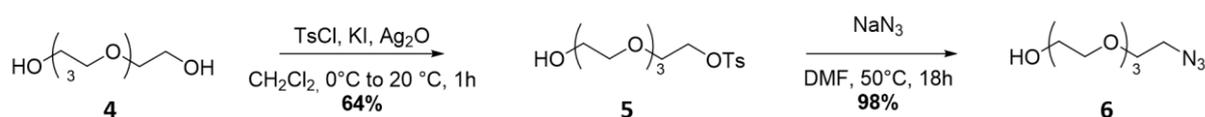


Figure 34: Synthèse de l'intermédiaire PEG-N<sub>3</sub>

Le PEG-N<sub>3</sub> **6** a ensuite été soumis à une hydrogénation catalytique en milieu concentré (0.75 M), permettant d'obtenir en produit majoritaire un dimère diPEG avec une amine centrale **7**. Cette amine a par la suite été protégée par un groupement *tert*-butoxycarbone (Boc), permettant l'obtention de l'intermédiaire **8** avec un rendement d'environ 50% sur deux étapes. Puis après ditosylation, disubstitution par l'azoture de sodium et déprotection Boc, le

composé diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> **11** a été obtenu avec un rendement cumulé sur cinq étapes d'environ 40% (Figure 35). Ce synthon diPEG-azoture **11** a ensuite été couplé par liaison peptidique à des connecteurs pour synthétiser les têtes hydrophiles di et tétra-azotures.

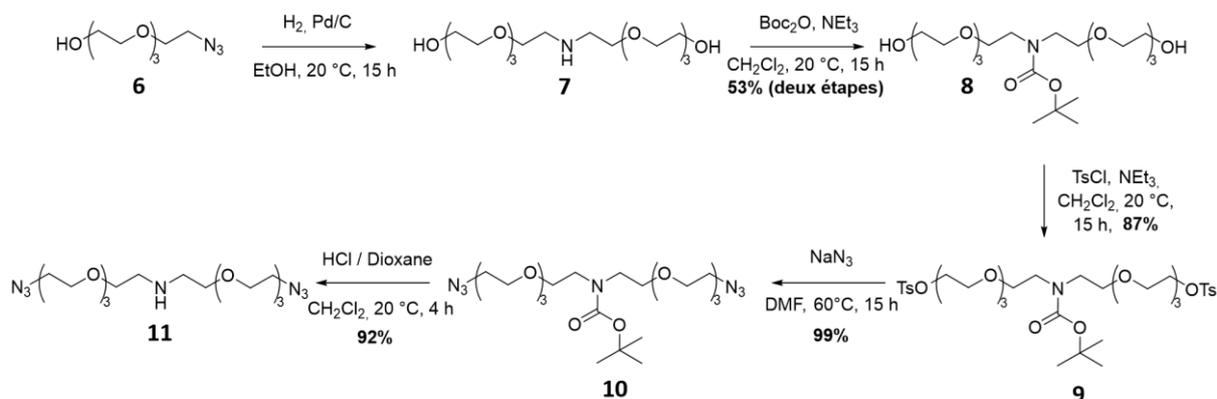


Figure 35 : Synthèse du synthon amine-diPEG-N<sub>3</sub> **11**

### 3.3. Synthèse des têtes hydrophiles

Deux connecteurs ont été utilisés, un PEG<sub>4</sub> et une éthyle-triazine, pour produire deux têtes hydrophiles portant deux et quatre azotures respectivement.

#### 3.3.1. Tête hydrophile PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub>

La synthèse de la tête hydrophile avec un connecteur PEG<sub>4</sub> **17** a commencé à partir de l'intermédiaire **6** (Figure 36). Une première étape d'addition d'*oxa*-Michael avec un acrylate de *tert*-butyle a permis l'obtention de l'intermédiaire **12** avec un rendement de 40%. Puis l'azoture terminal a été réduit en amine primaire par hydrogénation catalytique. Cette amine a ensuite été protégée par un groupement Boc, et l'ester *tert*-butylique a été clivé en condition basique dans un mélange méthanol/eau pour obtenir l'acide carboxylique correspondant. Le connecteur PEG<sub>4</sub> **15** a ainsi été obtenu avec un rendement de 22% sur quatre étapes. Ce connecteur a ensuite été couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**, suivi de la *N*-déprotection de l'amine pour obtenir la tête hydrophile **17**, avec un rendement global de 15% sur six étapes.

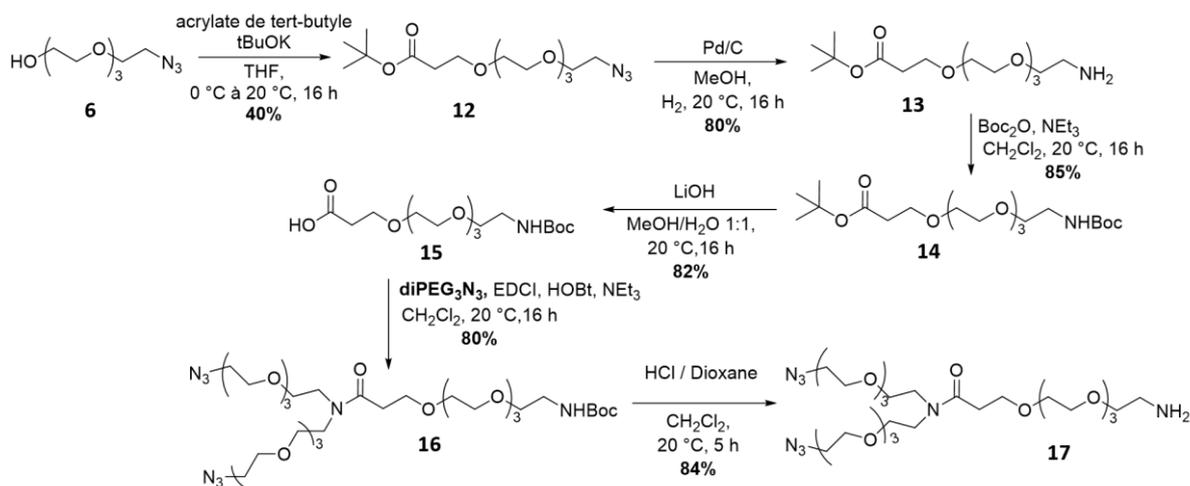


Figure 36: Schéma de synthèse de la tête hydrophile PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **17**

### 3.3.2. Tête hydrophile Ethyle-triazine-tetraN<sub>3</sub>

La synthèse de la tête hydrophile avec un connecteur Ethyle-triazine **20** a été effectuée comme décrit par Ursuegui *et al.*<sup>235</sup> Une trichlorotriazine **18** a été doublement substituée par deux synthons diPEG-N<sub>3</sub> **11** pour former l'intermédiaire **19**. Le dernier chlore a ensuite été substitué par un court connecteur éthylène diamine, afin d'obtenir la tête hydrophile **20** avec un rendement sur deux étapes de 69% (Figure 37). La trichlorotriazine présente l'intérêt de permettre un contrôle thermique des réactions de substitutions, la perte séquentielle des chlores diminuant la réactivité du cycle.<sup>236,237(A-B)</sup> Ainsi les deux premières substitutions de la trichlorotriazine ont lieu à température ambiante, tandis la substitution du dernier chlore de la trichlorotriazine nécessite que le milieu réactionnel soit chauffé pour être effectué. Cela permet de favoriser la disubstitution lors de la première étape, et d'éviter l'obtention d'un mélange mono/di/trisubstitué.

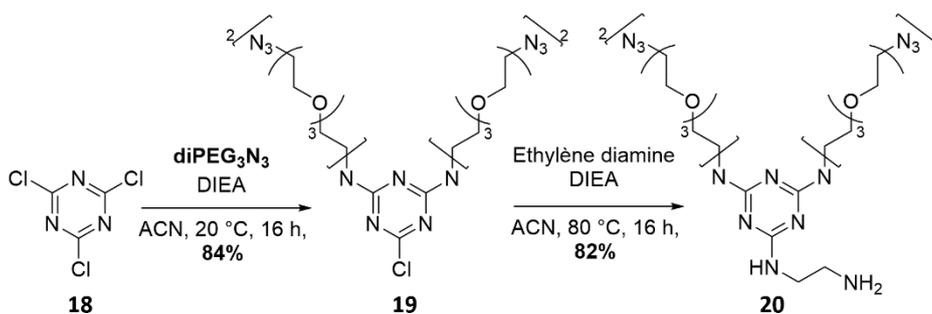


Figure 37: Schéma de synthèse de la tête hydrophile Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **20**

## 4. Synthèse et caractérisation chimique des fluorotensioactifs

### 4.1. Protocoles de synthèse des tensioactif dibloc

La synthèse des fluorotensioactifs est basée sur le couplage d'une tête hydrophile et d'une queue fluorophile. Différentes voies de synthèse se trouvent dans la littérature pour obtenir des tensioactifs, telles que des étherifications ou des additions de Michael.<sup>238</sup> Dans le cas des tensioactifs PFPE, la présence d'un acide carboxylique en bout de chaîne permet un couplage par l'activation de l'acide carboxylique **21** sous forme de chlorure d'acyle **22**, puis de le coupler à une tête hydrophile portant une amine, par la formation d'un amide **23** (Figure 38).<sup>179,181,205,225,239</sup>

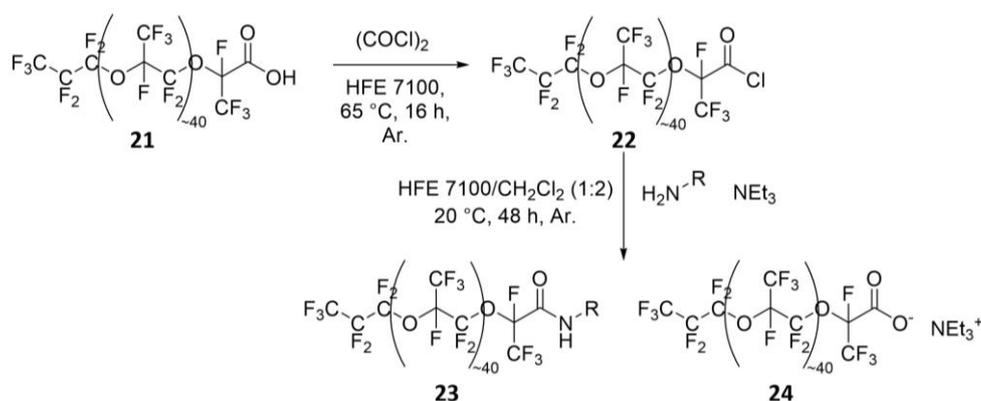


Figure 38 : Protocole de synthèse des tensioactifs dibloc

Selon les types de tensioactifs synthétisés, le protocole de synthèse varie. Pour la synthèse de tensioactifs dibloc, la tête hydrophile amine utilisée peut être utilisée en excès par rapport à la queue fluorée, afin de favoriser la réaction de couplage. Après réaction et traitement, le tensioactif peut ensuite être caractérisé. Deux produits sont possibles dans cette réaction : le tensioactif **23**, et la forme carboxylate de la queue fluorée **24**, obtenue par hydrolyse du chlorure d'acide.<sup>179,181,204,225,239</sup> Ces deux produits ne sont pas séparables, d'où l'importance de favoriser la réaction de couplage pour éviter la formation du produit d'hydrolyse.

Des méthodes de synthèse alternatives existent, principalement conçues pour limiter l'obtention du produit secondaire de la réaction (carboxylate). Par exemple, Scanga *et al.* ont récemment (2018) développé une voie de synthèse dans laquelle le Krytox est activé et couplé avec une petite molécule propargylamine, mise en excès.<sup>179</sup> L'intermédiaire obtenu présente un alcyne terminal pouvant réagir par CuAAC avec une tête hydrophile portant un ou plusieurs

azotures. Cette stratégie permet d'effectuer l'étape de couplage avec un large excès de réactif commercial, et donc de forcer un couplage complet, et éviter la formation de carboxylate. L'intermédiaire formé étant stable, il peut être manipulé avec moins de précautions que l'acide activé. Bien que ces méthodes permettent de limiter la présence de queue fluorée sous forme de carboxylate, elles nécessitent de faire des réactions sur des larges molécules fluorées, ce qui est limitant pour les réactions, le suivi réactionnel, le traitement, la purification et l'analyse des composés par rapport à la stratégie de couplage d'une tête hydrophile complète sur la queue fluorée.

#### 4.2. Synthèse des tensioactifs pré-fonctionnalisés

Pour la synthèse des tensioactifs, nous avons suivi un protocole adapté de Ursuegui *et al.*<sup>225</sup>, et publié dans Dufosse *et al.*<sup>239</sup> Le couplage final a ainsi été effectué en activant 1 équivalent molaire de queue PFPE (Krytox 157 FSH, DuPont, masse molaire ~6500 g/mol) en utilisant un large excès de chlorure d'oxalyle à reflux. Une fois l'activation de l'acide carboxylique en chlorure d'acide effectué, la queue fluorée a été couplée avec un excès (2.0 à 3.0 équivalents molaires) de tête hydrophile dans un mélange Novec7100/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NEt<sub>3</sub>. Le tensioactif a ensuite été purifié pour éliminer l'excès de base et de tête hydrophile. Pour éliminer les résidus de produits organiques, le brut obtenu a été lavé selon une procédure protégée par la start-up MicroOmix. Le tensioactif a ensuite été analysé pour déterminer le ratio de tensioactif et de queue fluorée carboxylate. Ce ratio est appelé efficacité de couplage (C.E), exprimé en pourcentage. Plus l'efficacité de couplage est élevée, plus la proportion de queues fluorées ayant réagi avec les têtes hydrophiles est importante, et plus la proportion de queue fluorée hydrolysée (queue fluorée carboxylate) est faible. Ainsi une efficacité de couplage de 100% indique que la totalité des queues fluorées ont réagi avec les têtes hydrophiles, et qu'il n'y a pas de détection de produit secondaire (queue fluorée carboxylate). La synthèse des deux tensioactifs (PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3**) a été répétée plusieurs fois, avec une efficacité de couplage entre 90 et 100% (déterminée par RMN du fluor, cf partie IV) 4.3.2).

#### 4.3. Caractérisation chimique des tensioactifs

La caractérisation des fluorotensioactifs peut se faire de plusieurs façons. Les méthodes les plus courantes sont la spectrométrie IR et la RMN.<sup>168,174,180,181</sup> Ces analyses ont pour but de prouver que la réaction s'est effectuée, par apparition de signaux correspondant

aux produits, ou disparition de signaux correspondant aux réactifs. Ces analyses peuvent également être utilisées pour déterminer la composition du lot de tensioactif : déterminer s'il reste du composé de départ, et déterminer la fraction de queue fluorée carboxylate s'il y en a.

#### 4.3.1. Spectrométrie Infrarouge

Les tensioactifs peuvent être caractérisés par spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Figure 39). Les signaux d'intérêts pour suivre la réaction et la composition du produit sont ceux du (C=O) de la queue fluorée. Le Krytox acide carboxylique (O=C-OH, noir) possède un pic caractéristique à 1775-1780  $\text{cm}^{-1}$ . Le passage sous forme d'ion carboxylate (O=C-O<sup>-</sup>, bleu) déplace ce pic à 1690  $\text{cm}^{-1}$ ; tandis que l'obtention d'un amide secondaire (*N*-monosubstitué, O=C-NH-R, rouge) fait apparaître un pic entre 1710 et 1740  $\text{cm}^{-1}$  et la formation d'un amide tertiaire (*N,N*-disubstitué, O=C-NR'R''), fait apparaître un pic à 1680  $\text{cm}^{-1}$ . L'utilisation des spectres IR permet donc de valider que la réaction de couplage a eu lieu, mais également de déterminer s'il reste du réactif de départ et si du produit carboxylate s'est formé.

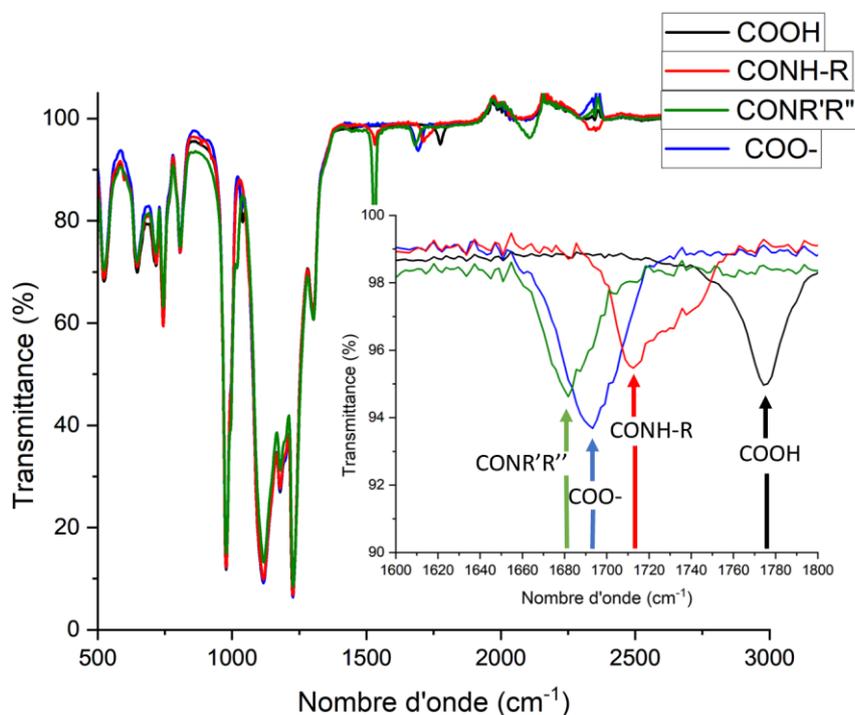


Figure 39 : Spectres IR du Krytox sous forme d'acide carboxylique (noir), de carboxylate (bleu) et couplé avec une amine primaire (rouge) ou secondaire (vert). Zoom entre 1600 et 1800  $\text{cm}^{-1}$  des spectres IR du Krytox sous forme d'acide carboxylique (noir, pic à 1775  $\text{cm}^{-1}$ ), carboxylate (bleu, pic à 1690  $\text{cm}^{-1}$ ) et amide (rouge, pic à 1720  $\text{cm}^{-1}$ ; vert, pic à 1680  $\text{cm}^{-1}$ ).

### 4.3.2. RMN du Fluor

La RMN du fluor peut également être utilisée pour la détermination de la qualité du tensioactif. Cette méthode permet de déterminer la structure et masse moléculaire moyenne de la queue PFPE en intégrant les signaux des fluors, comme montré par Holtze *et al.*<sup>181</sup> Le spectre RMN présente plusieurs massifs (Figure 40) : les trois massifs de -80 à -85 ppm sont attribués aux fluors des CF<sub>3</sub> et CF<sub>2</sub> de la queue fluorée et de l'unité répétitive (signaux gris et jaunes). Le signal central, autour de -131 ppm correspond à un CF<sub>2</sub> en bout de la chaîne fluorée (signal orange). Ce signal permet de calibrer les intégrations. Enfin le signal autour de -145 ppm correspond au CF de l'unité répétitive (signal marron) : son intégration permet de déterminer le nombre moyen d'unités répétitives, et ainsi la masse moyenne du polymère.

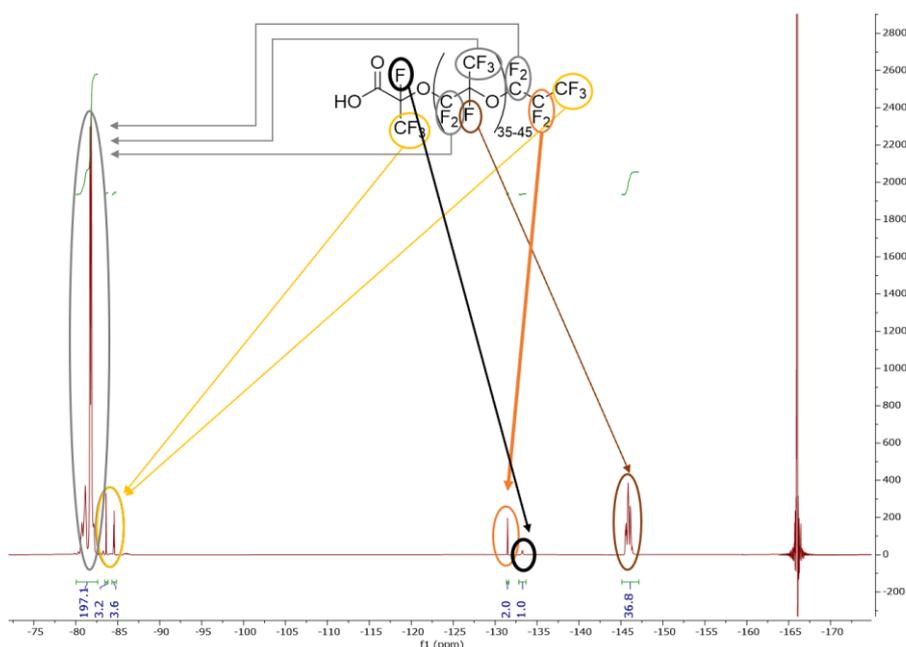


Figure 40 : Spectre RMN du Krytox COOH

Afin de déterminer si la réaction s'est effectuée et quelle est la proportion de tensioactif, le signal à suivre est le signal du fluor en alpha du carbonyle (Figure 40, signal noir). Selon la nature du composé : acide carboxylique, chlorure d'acide, carboxylate, amide secondaire ou amide tertiaire, le signal va se déplacer, permettant de déterminer l'espèce présente (Figure 41). Le signal du fluor correspondant à l'espèce acide carboxylique forme un massif entre -133 et -134 ppm (signal rouge). Une fois l'acide carboxylique activé en chlorure d'acide, le pic du fluor bouge vers -126.5 ppm (signal vert sombre). Après la réaction de couplage, plusieurs signaux sont possibles : le signal de l'espèce carboxylate forme un massif entre -127 et -128

ppm (signal vert clair); le signal correspondant à la formation d'un amide secondaire est un massif vers -133.5 ppm (signal bleu), et le signal pour un amide tertiaire est un massif plus éloigné, vers -125 ppm (signal violet). De plus, la calibration du signal à -131 ppm (signal orange, correspondant aux deux fluors du CF<sub>2</sub> en bout de chaîne) permet l'intégration du/des signaux du fluor en alpha du carbonyle et donc de déterminer les fractions des différentes espèces présentes et la pureté du produit (proportion de tensioactif (amide) et de queue fluorée libre (carboxylate)).

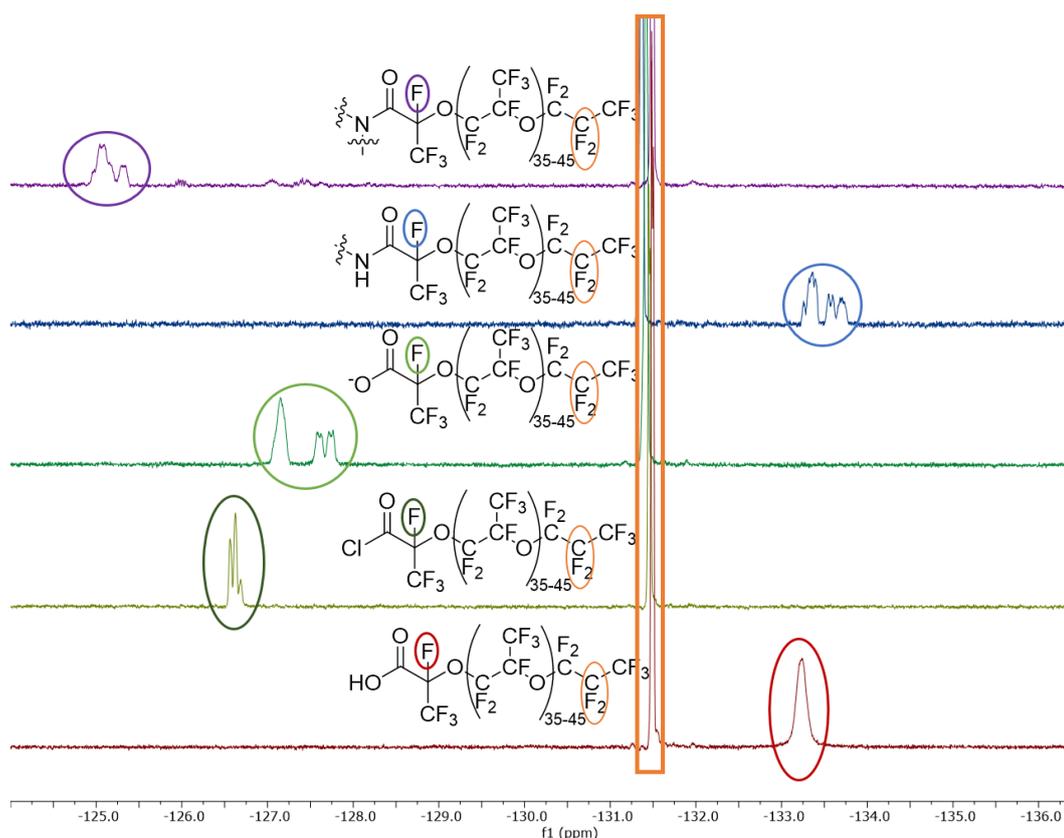


Figure 41 : zoom des spectres RMN <sup>19</sup>F des différentes espèces de queue fluorée possible. De bas en haut : acide carboxylique, chlorure d'acide, carboxylate, amide secondaire (N-monosubstitué), amide tertiaire (N,N-disubstitué).

La caractérisation par RMN du fluor présente donc plusieurs intérêts : détermination de la masse molaire moyenne du polymère, validation de la réaction, et identification des espèces fluorées présentes en intégrant le ou les signaux des fluors en alpha du carbonyle. En cas de mélange d'espèces, la somme des intégrations des signaux de ce fluor est égale à 1. Le ratio de ces signaux, par exemple le signal du carboxylate sur le signal de l'amide permet donc de déterminer la quantité relative de queue fluorée carboxylate contaminante dans les lots de tensioactif (efficacité de couplage, C.E).

### 4.3.3. Comparaison des deux méthodes : IR et RMN <sup>19</sup>F

Afin de déterminer quelle méthode est la plus adaptée pour déterminer la composition des lots de tensioactifs synthétisés, un lot de tensioactif a été produit (PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub>) pour lequel l'efficacité de couplage déterminée par RMN était de 100%. Ce tensioactif a été mélangé avec du Krytox carboxylate de triéthylammonium (le produit secondaire de couplage) (masse/masse), afin d'avoir une série de tensioactifs avec une efficacité de couplage théorique (C.E) de 0, 20, 40, 60, 80, 90 et 100%. Ces différents lots ont ensuite été analysés, tout d'abord par spectrométrie IR. En IR (Figure 42), le signal du carboxylate est entre 1690-1700 cm<sup>-1</sup> (flèche bleue), tandis que le signal de l'amide est à 1710-1720 cm<sup>-1</sup> (flèche rouge).

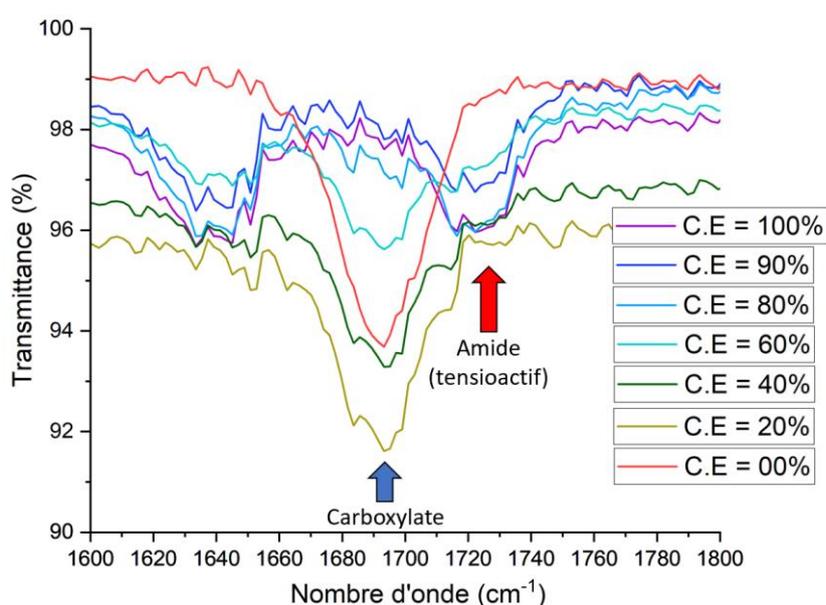


Figure 42 : zoom entre 1600 et 1850 cm<sup>-1</sup> des spectres IR d'une gamme de tensioactif/Krytox carboxylate

Les spectres IR montrent une diminution du signal correspondant à l'espèce carboxylate (flèche bleue, 1690 cm<sup>-1</sup>) et une apparition du signal correspondant à l'amide (flèche rouge, 1710-1740 cm<sup>-1</sup>) lorsque le taux de couplage augmente de 0% à 100% (Figure 42, signal rouge à signal violet). Cependant, pour une C.E de 0 à 60% (signal rouge à signal bleu cyan), le signal correspondant à l'amide de couplage n'est pas visible (flèche rouge), tandis que le signal du carboxylate est présent (flèche bleue). De plus, à partir d'une C.E de 80% (20-0% de carboxylate résiduel, signal bleu azure, bleu marine, violet), le signal du carboxylate n'est plus visible (flèche bleue). Ces résultats montrent que la caractérisation par IR permet d'identifier qu'un amide est bien présent, mais n'est pas sensible à des taux de couplage

faibles, et ne permet pas de différencier des lots de tensioactifs présentant plus de 80% d'amide formé.

Ces mêmes lots de tensioactifs ont été analysés par RMN <sup>19</sup>F. Les spectres de ces lots montrent quant à eux une progression d'intensité des signaux, avec diminution de l'intégration du signal du fluor en alpha du carboxylate et augmentation de l'intégration du signal du fluor en alpha de l'amide avec l'augmentation du C.E (donc avec l'augmentation de la proportion de queue fluorée couplée à une tête hydrophile par un amide) (Figure 43). De plus les rapports d'intégration de ces signaux correspondent au pourcentage théorique de chaque composant (Figure 44). Le signal de l'amide est discernable et quantifiable même avec 20% de couplage, et au-delà de 80% de couplage, le signal de carboxylate est toujours présent et quantifiable, permettant de distinguer les lots contenant 80, 90 et 100% de tensioactif.

La caractérisation par RMN du fluor montre donc une sensibilité supérieure à l'analyse IR pour déterminer si un couplage a eu lieu et le ratio entre les différentes espèces présente dans les lots des tensioactifs, permettant de quantifier la composition des lots. Cette méthode d'analyse a donc été utilisée pour la caractérisation des tensioactifs pré-fonctionnalisés produits au cours de mes travaux de thèse.

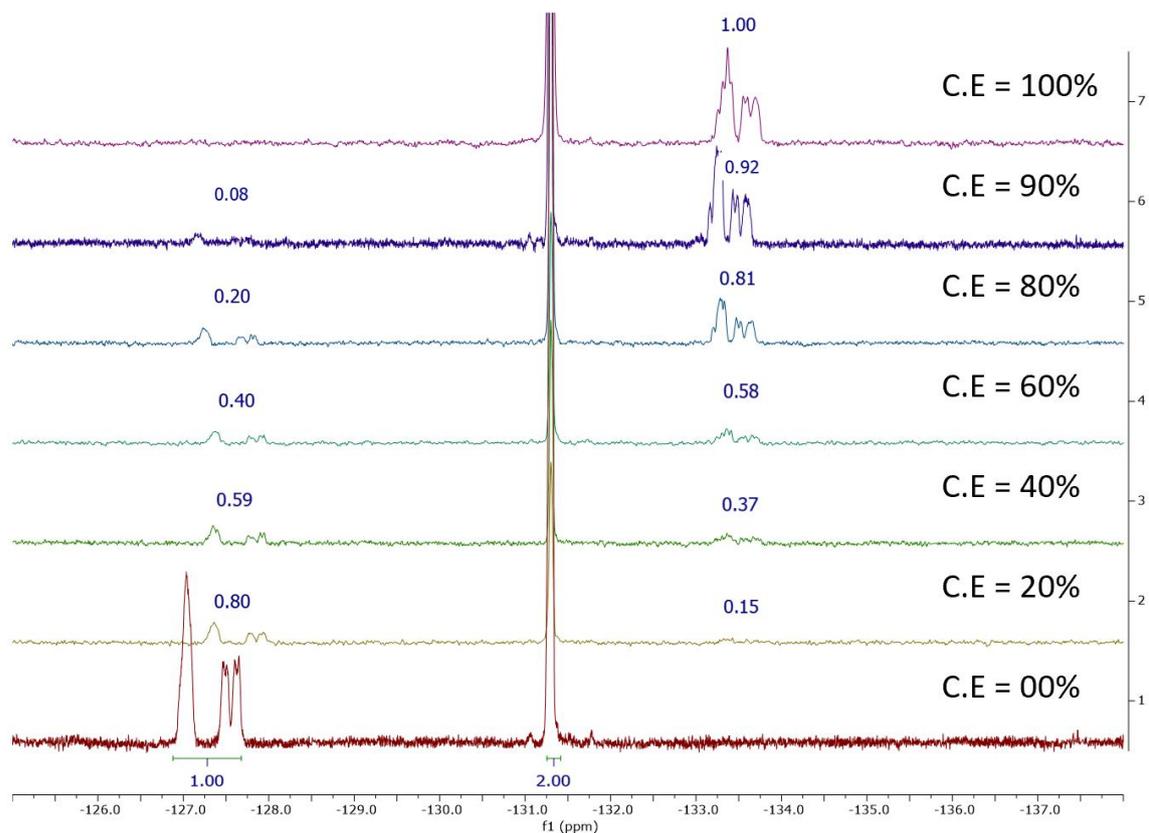


Figure 43: Signaux RMN 19F du Fluor en alpha du carbonyle au sein de mélanges de tensioactifs et krytox carboxylate à différents ratios

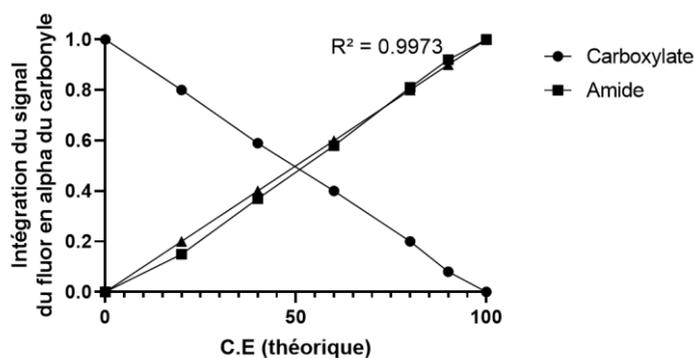


Figure 44 : Corrélation entre les valeurs d'intégration des signaux des fluor en alpha du carbonyle de la queue fluorée et le taux de couplage théorique. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Prism.

Ces méthodes de caractérisation présentent cependant des limitations. Dans le cas de la synthèse de tribloc, il est possible de déterminer le ratio d'amide/carboxylate, mais le signal du fluor en alpha de l'amide est identique selon que la molécule ait un ou deux amides formés. C'est-à-dire que ces méthodes de caractérisation ne permettent pas de distinguer si un tribloc ou un dibloc a été produit.

## 5. Fonctionnalisation de la surface des gouttes par des anticorps

### 5.1. Bioconjugaison d'anticorps

Afin de pouvoir être utilisés les anticorps doivent être fonctionnalisés, pour y ajouter des groupements détectables (comme des fluorophores) et/ou des groupements pour les accrocher sur des surfaces (comme des alcynes tendus). Un panel de réactions existe afin d'attacher des molécules chimiques aux chaînes latérales des acides aminés de protéines, dont les réactions chimiosélectives qui vont cibler les chaînes latérales d'un type spécifique d'acide aminé (tel que les amines des lysines, les thiols des cystéines ...). Parmi l'ensemble des acides aminés, l'un des plus utilisés pour les fonctionnalisations de protéines est la lysine.<sup>240,241</sup> Les lysines font partie des acides aminés les plus fréquents, avec plus de 80 résidus de lysine retrouvés dans la structure des anticorps par exemple.<sup>240,242</sup> Le groupement amine en bout de chaîne latérale possède une bonne nucléophilie, capable de réagir avec un électrophile tel qu'un acide carboxylique activé, comme l'ester de *N*-hydroxysuccinimide (NHS), pour former un amide.<sup>240</sup> Ces réactifs NHS sont faciles à synthétiser, commercialement disponibles, réagissent rapidement, et forme une liaison covalente très stable. De plus la réaction est possible dans un large panel de conditions (température, tampon, pH), bien que ces conditions peuvent influencer sur la stabilité du réactif ester de NHS. En effet les réactions de conjugaison de protéines se déroulent en milieu aqueux, et les réactifs NHS sont sensibles à l'hydrolyse, avec une demi-vie dépendante de la température et du pH du milieu. A pH = 7 et température de 4 °C, la demi-vie des esters de NHS est de 4 à 5 h. A pH = 8.6, la demi-vie est d'environ 10 minutes. De plus, ce type de réaction entraîne une hétérogénéité des conjugués formés, n'ayant pas de sélectivité envers des lysines en particulier. Enfin, la chaîne latérale des lysines participe à la charge globale des protéines, les amines apportant une charge positive. Le passage d'une amine protonable à un amide fait disparaître cette charge, entraînant un risque de modification des propriétés des protéines.<sup>241</sup> La bioconjugaison lysine par le biais d'esters activés reste cependant l'une des méthodes les plus simples et efficaces à mettre en œuvre, raison pour laquelle elle est couramment utilisée pour la production des anticorps conjugués commercialement disponibles pour les applications en laboratoire, dont les immunoessais.<sup>243</sup>

## 5.2. Bioconjugaison de Trastuzumab par du BCN et des fluorophores

L'étape de fonctionnalisation de la surface interne des gouttes par des anticorps a été appelée étape de « greffage ». Pour évaluer la capacité des tensioactifs et des anticorps à effectuer une réaction de SPAAC, des anticorps ont été conjugués à des alcynes tendus (BCN-PEG<sub>4</sub>). Pour cela un réactif BCN-PEG<sub>4</sub>-ester de NHS **28** a été utilisé pour réagir de manière stochastique avec les amines terminales des lysines. En plus de la conjugaison avec des alcynes tendus, les anticorps ont également été conjugués à des fluorophores (sulfoCy3 ou sulfoCy5) par la même méthode (conjugaison sur les lysines), afin de pouvoir les visualiser et les localiser au sein des gouttes (Figure 45). Après conjugaison, le nombre de molécules (alcynes tendus et fluorophores) par anticorps peut être calculé, et ce rapport est appelé le degré de conjugaison (DOC).

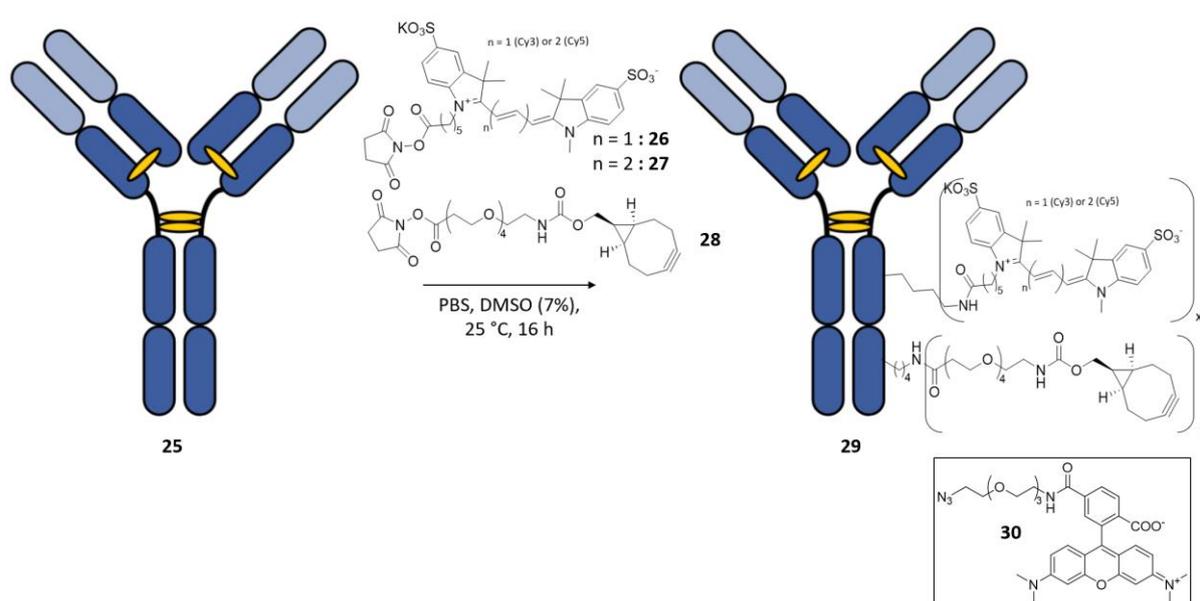


Figure 45: Bioconjugaison des Trastuzumab **25** par des fluorophores cyanines **26/27** et alcynes tendus BCN **28** pour obtenir les Trastuzumab conjugués **29**. Le degré de conjugaison des alcynes tendus est ensuite vérifié par réaction de SPAAC avec du TAMRA-N<sub>3</sub> **30**.

Une IgG de référence, le Trastuzumab, qui est une IgG1 anti-HER2 d'environ 150 000 Da,<sup>244</sup> a été utilisée pour réaliser les essais de SPAAC en gouttes. Différents lots d'anticorps ont été conjugués en conditions neutres (pH = 7.4) dans du tampon PBS avec 7% de DMSO avec 0 ou 2 équivalents molaires de fluorophore sous forme d'ester activé (sulfoCy5-NHS **27**) et 0 à 20 équivalents molaires de BCN-PEG<sub>4</sub>-NHS **28**. Ces conjugaisons ont permis d'obtenir des anticorps avec des DOC moyen de fluorophore entre 1 et 2 et des DOC moyens de BCN entre 0 et 5 (Tableau 3). Nous avons préparé des anticorps avec des DOC d'alcynes tendus

croissants afin de déterminer celui nécessaire pour avoir une relocalisation complète d'anticorps à la surface des gouttes. Les DOC ont été déterminés par mesure d'absorbance du sulfoCy5 à 647 nm pour le DOC de fluorophore, et par réaction click avec du TAMRA-N<sub>3</sub> **30** (Figure 45, et voir partie expérimentale VIII) 1.6) suivi de la mesure de l'absorbance à 555 nm pour déterminer le DOC moyen de BCN. Il est également possible de déterminer les DOC par spectrométrie de masse des composés *post*-conjugaison.

Tableau 3: Conjugaison du trastuzumab

Anticorps	Equivalent de BCN-PEG <sub>4</sub> -NHS	Equivalent de sulfoCy5	aDOC (BCN)	aDOC (sulfo-Cy5)
<b>(29-A)Trastuzumab</b>	0	2	0.0	1.2
<b>(29-B)Trastuzumab</b>	5	2	1.8	1.6
<b>(29-C)Trastuzumab</b>	10	2	3.6	2.0
<b>(29-D)Trastuzumab</b>	15	2	4.0	1.4
<b>(29-E)Trastuzumab</b>	20	2	5.0	1.5

### 5.3. Validation de la SPAAC à la surface des gouttes

Pour évaluer la relocalisation des anticorps à la surface des gouttes, des émulsions composées de gouttes de 45 pL contenant 400 nM d'anticorps dans un tampon PBS 1X ont été produites avec les tensioactifs monoN<sub>3</sub> **1**, diN<sub>3</sub> **2** et tétraN<sub>3</sub> **3**. Afin de valider que la relocalisation observée soit bien due à la réaction de SPAAC, des contrôles négatifs ont été réalisés en utilisant d'une part un tensioactif commercial sans azoture (008-F, Ran Biotechnologies) avec des anticorps-BCN (**29-E**), et d'autre part les tensioactifs pré-fonctionnalisés **1**, **2**, **3** avec des anticorps non conjugués avec des BCN (**29-A**). Les gouttes ont été collectées et conservées 1 h à température ambiante (20 °C), avant d'être observées par microscopie confocale (Figure 46).

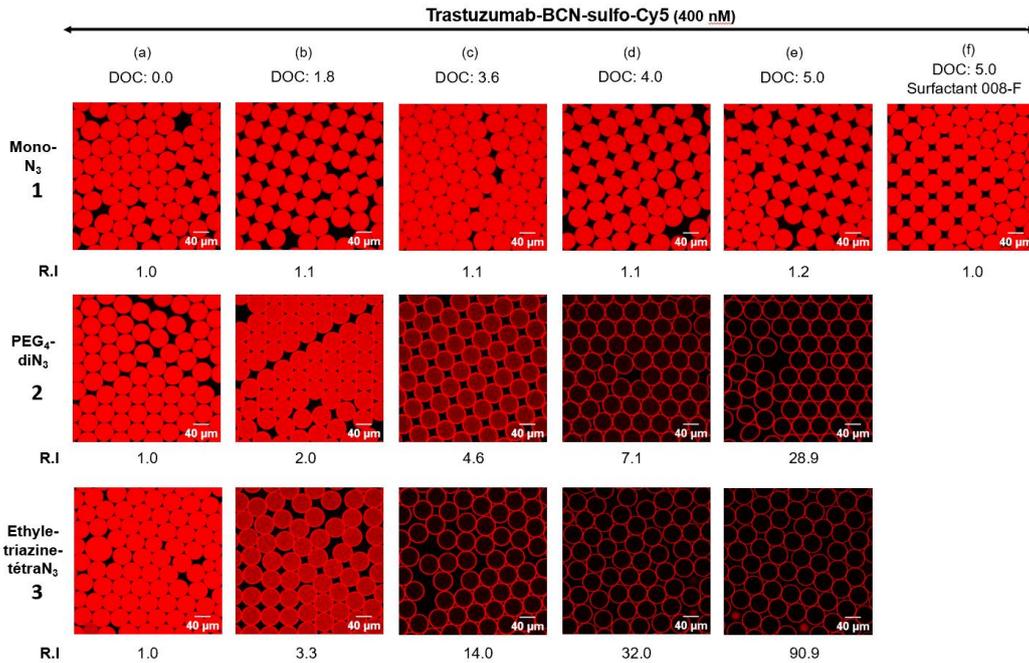


Figure 46: SPAAC en surface de gouttes. Des gouttes de 45  $\mu$ l contenant 400 nM d'anticorps et stabilisées par les tensioactifs **1**, **2**, **3** ou 008-F (2.5% dans de l'HFE 7500) sont produites, incubées 1 h et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), Trastuzumab (400 nM) ; A) Trastuzumab-sulfoCy5 ; B) Trastuzumab-BCN (DOC 1.8) - sulfoCy5 ; C) Trastuzumab-BCN (DOC 3.6) - sulfoCy5 ; D) Trastuzumab-BCN (DOC 4.0) - sulfoCy5 ; E-F) Trastuzumab-BCN (DOC 5.0) - sulfoCy5.

Les premiers résultats ont confirmé que le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1** ne réagissait pas avec les anticorps BCN, et ce peu importe le degré de conjugaison d'alcyne tendu sur les anticorps. En effet, une fluorescence homogènement répartie a été observée pour toutes les conditions testées avec le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1**. Au contraire, les tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** ont montré une relocalisation de la fluorescence à l'interface, qui augmente avec le DOC moyen d'alcyne tendu sur les anticorps (Figure 46, b,c,d,e). De plus, les contrôles négatifs, avec les tensioactifs azotures et des anticorps non BCN (DOC 0.0), et avec un tensioactif sans azoture (008-F) et des anticorps BCN (DOC 5.0), ont tous montré une fluorescence homogène au sein des gouttes, confirmant que la relocalisation est bien causée par la réaction de SPAAC (Figure 46, a, f).

Les images confocales ont été analysées afin de quantifier l'efficacité de la SPAAC (Figure 47). Pour cela, un paramètre, l'Index de Relocalisation, a été déterminé grâce à l'équation suivante :

$$R.I = \frac{(Fluorescence^{Surface} - Fluorescence^{Inter-gouttes})}{(Fluorescence^{Lumen} - Fluorescence^{Inter-gouttes})}$$

Avec R.I l'index de relocalisation, Fluorescence<sup>Surface</sup> la fluorescence mesurée à l'interface huile/eau des gouttes, Fluorescence<sup>Lumen</sup> la fluorescence mesurée dans le contenu des gouttes, et Fluorescence<sup>Inter-gouttes</sup> la fluorescence de bruit de fond dans l'huile.

Ce paramètre est représentatif de l'intensité de fluorescence en surface de gouttes par rapport à l'intensité de fluorescence dans les gouttes. Pour une absence de greffage, l'intensité de fluorescence en surface et dans les gouttes est identique, et le R.I est égal à 1. Dans le cas de greffage, plus la relocalisation est importante, plus le R.I augmente. Une valeur de R.I au-dessus de 20 indique que plus de 95% de fluorescence se trouve en surface des gouttes. Un R.I au-dessus de 30 indique une quantité de fluorescence dans les gouttes négligeable, et donc une relocalisation totale des anticorps encapsulés dans les gouttes à la surface.

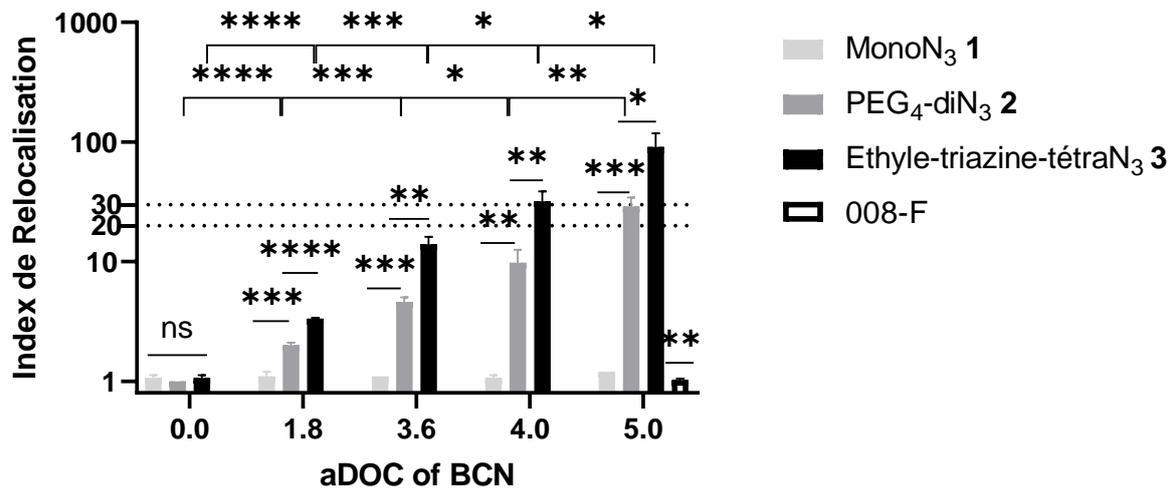


Figure 47: Comparaison des Index de Relocalisation (R.I) obtenus en utilisant les tensioactifs pré-fonctionnalisés **1**, **2**, **3** et le 008-F et 400 nM d'anticorps avec des DOC moyens croissants de BCN (de 0.0 à 5.0). Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.0001. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Le calcul du R.I pour les différentes conditions a permis de confirmer une absence de SPAAC avec le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1** et les conditions contrôles (R.I = 1). Les tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tetraN<sub>3</sub> **3** ont quant à eux entraîné une relocalisation des anticorps en surface des gouttes. Pour ces deux tensioactifs, augmenter le DOC moyen de BCN sur les anticorps a permis d'augmenter l'efficacité de ce greffage, avec des valeurs de R.I croissantes en passant d'un DOC moyen de 0.0 à 5.0 (Figure 47). Le tensioactif Ethyle-triazine-tetraN<sub>3</sub> **3** a également montré une meilleure efficacité de relocalisation des anticorps à DOC équivalent

par rapport au tensioactif PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2**. Enfin, pour ces deux tensioactifs, un greffage complet a été atteint avec les anticorps ayant un DOC moyen d'alcyne tendu de 5.0 (R.I ~30 ou > 30). Dans le cas du tensioactif Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> un greffage complet a été atteint dès le DOC moyen de 4.0 (Figure 47). Il est donc le tensioactif le plus efficace des trois pour le greffage d'anticorps-BCN.

Il est ainsi possible de fonctionnaliser l'interface interne de gouttes par des anticorps en utilisant une réaction de chimie click bioorthogonale (SPAAC). Cette fonctionnalisation est dépendante à la fois du nombre d'azotures présentés par les têtes polaires des tensioactifs, mais également du nombre de molécules d'alcyne tendus fonctionnalisant les anticorps. La première étape nécessaire pour effectuer des immunoessais en surface de gouttes est donc validée. De plus, une relocalisation complète des anticorps fonctionnalisés est possible, permettant de ne pas avoir d'anticorps résiduels dans les gouttes pouvant entrer en compétition lors des immunoessais. Pour la suite de ces travaux un seul tensioactif, l'Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3**, a été sélectionné, car il présente la meilleure efficacité de greffage.

## 6. Développement d'un immunoessai en surface de gouttes

### 6.1. Bioconjugaison des anticorps de l'immunoessai

Après avoir validé la possibilité de transformer la surface interne des gouttes en surface de capture portant des anticorps, un modèle d'immunoessai a été développé. Afin de pouvoir facilement identifier dans les gouttes les différents composants de l'immunoessai, nous avons choisi comme analyte cible une GFP-HisTag, et comme couple d'anticorps pour la capture et la détection un anticorps anti-HisTag et un anticorps anti-GFP, qui ont tous les deux été couplés à un fluorophore différent (Figure 48). Ainsi l'anticorps anti-HisTag a été marqué avec une sulfoCyanine3 (jaune), et l'anticorps anti-GFP a été marqué avec une sulfoCyanine5 (rouge). Les deux anticorps ont été conjugués de deux façons, soit uniquement avec les fluorophores, soit avec les fluorophores et les alcynes tendus. Cela a permis de préparer deux séries d'anticorps, afin de pouvoir utiliser les deux différents anticorps comme anticorps de capture et comme anticorps de détection. Ainsi deux immunosandwichs sont réalisables : un premier avec l'anticorps anti-GFP comme anticorps de capture (Anti-GFP-BCN-sulfoCy5/Anti-HisTag-sulfoCy3) et un deuxième avec l'anticorps anti-HisTag comme anticorps de capture (Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3/Anti-GFP-sulfoCy5) (Figure 48).

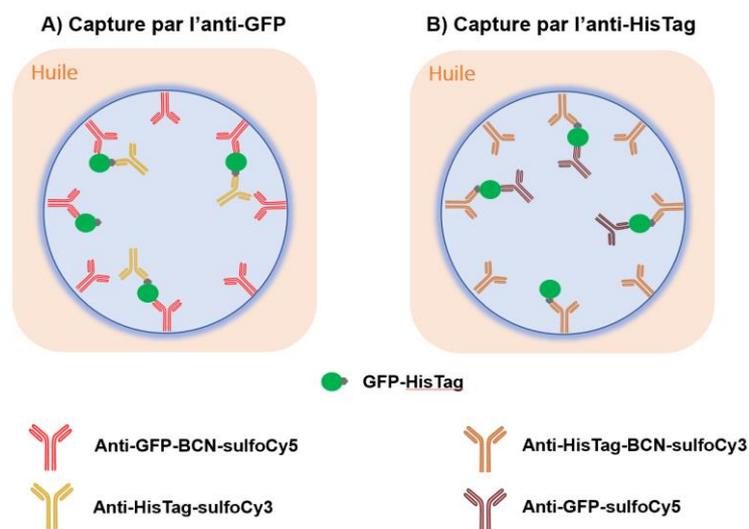


Figure 48: Représentation de l'immunoessai modèle : la surface des gouttes est fonctionnalisée par des anticorps de capture (couplés à des BCN) grâce à la SPAAC, permettant la capture de la GFP-HisTag, ce qui entraîne la relocalisation en surface des anticorps de détection. Le marquage des anticorps par des fluorophores permet de les suivre et de valider la formation de l'immunocomplexe en surface de gouttes. A) Immunoessai Anti-GFP/GFP-HisTag/Anti-HisTag, l'anti-GFP est l'anticorps de capture B) Immunoessai AntiHisTag/GFP-HisTag/Anti-GFP, l'anti-HisTag est l'anticorps de capture.

Les conditions de conjugaisons des anticorps ont été fixées pour obtenir un DOC moyen de 5.0 de BCN et un DOC moyen de 1 à 2 de fluorophore (Tableau 4).

Tableau 4: Bioconjugaison des anticorps anti-HisTag et anti-GFP

Anticorps	Equivalent de BCN-PEG <sub>4</sub> -NHS	Equivalent de sulfoCy5	Equivalent de sulfoCy3	aDOC (BCN)	aDOC (fluorophore)
(31-A) Anti-GFP	0	2	0	0.0	1.2
(31-B) Anti-GFP	15	2	0	5.5	1.7
(32-A) Anti-HisTag	0	0	2	0.0	0.8
(32-B) Anti-HisTag	15	0	2	5.0	1.0
(29-F)Trastuzumab	0	0	2	0.0	2.0

## 6.2. Validation de la SPAAC avec les anticorps de capture

L'étape de greffage a tout d'abord été validée pour les deux anticorps BCN en encapsulant ces anticorps à une concentration de 400 nM dans des gouttes de 45 pL stabilisées avec le tensioactif Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** ou avec le tensioactif 008-F commercial non fonctionnalisée (contrôle négatif). Les émulsions ont été collectées, incubées 1 h à température ambiante, puis observées par microscopie confocale et réinjectées dans une puce microfluidique pour obtenir le profil de fluorescence des gouttes en réinjection (Figure 49).

En microscopie confocale, les contrôles négatifs ont montré une fluorescence homogène dans les gouttes, validant l'absence de relocalisation aspécifique des anticorps en l'absence d'azoture sur le tensioactif ou de BCN sur les anticorps (Figure 49, A1,3,5,6). Les conditions avec le tensioactif tétra-azotures **3** et l'anti-GFP-BCN-sulfoCy5 ou l'anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 ont bien montré une relocalisation totale des anticorps à la surface des gouttes par SPAAC (Figure 49, A2,4). Le profil de réinjection des gouttes sur la plateforme microfluidique a également montré deux types de signaux bien distincts entre les conditions avec et sans greffage. En l'absence de greffage, la fluorescence homogène des gouttes est caractérisée par un signal convexe (Figure 49, B1,3,5,6). Dans les conditions où la fluorescence est relocalisée, un signal en « oreilles de lapin », concave, s'est formé, représentant une fluorescence plus importante en surface de goutte et plus faible dans les gouttes (Figure 49, B2,4).

Ces résultats valident le greffage par réaction de SPAAC des anticorps anti-GFP et anti-HisTag fonctionnalisés par des BCN. La surface interne des gouttes peut à présent servir de surface de capture pour la GFP-HisTag.

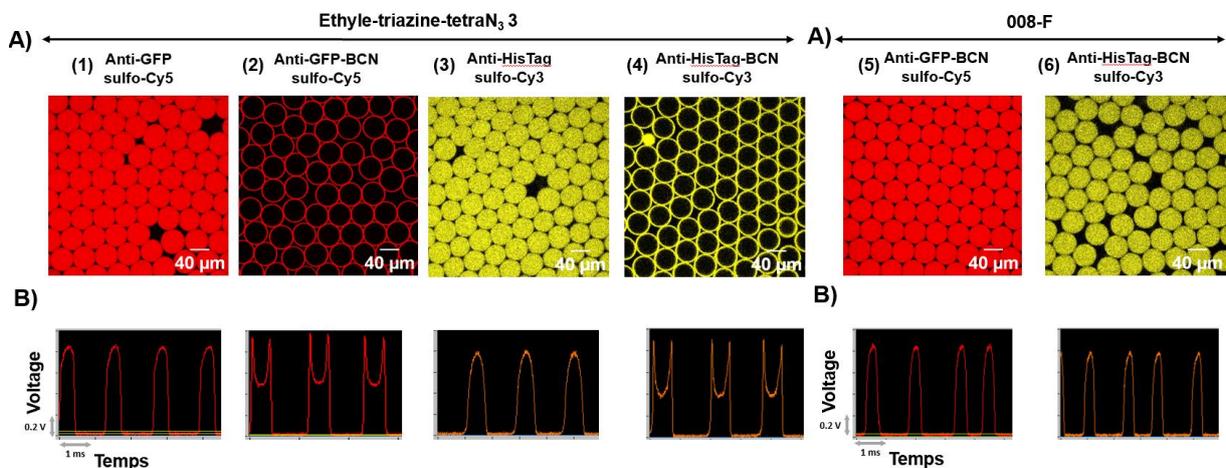


Figure 49: Vérification du greffage spécifique des anticorps anti-GFP et anti-HisTag avec ou sans BCN et avec ou sans tensioactif pré-fonctionnalisé. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (a-d) ou 008-F (e-f) (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), 400 nM d'anticorps : 1) Anti-GFP-sulfoCy5 ; 2) et 5) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 ; 3) Anti-HisTag-sulfoCy3 ; 4) et 6) Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3

### 6.3. Validation de l'immunoessai en gouttes

Après validation du greffage, des tests d'immunoessai ont été réalisés, en encapsulant dans des gouttes de 45 pL, stabilisées par le tensioactif **3**, une phase aqueuse contenant 400 nM d'anticorps de capture (Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3, jaune), 125 nM de GFP-HisTag (vert) et l'anticorps de détection (Anti-GFP-sulfoCy5, rouge) à 50 ou 100 nM. Les gouttes ont été collectées et observées par microscopie confocale et réinjectées sur une puce microfluidique (Figure 50). Pour les deux concentrations d'anticorps de détection, la capture et la relocalisation de la GFP en surface des gouttes a pu être observée en microscopie confocale, confirmant que le greffage des anticorps n'empêche pas la reconnaissance de l'antigène cible. Pour l'anticorps de détection (anticorps anti-GFP), une relocalisation à la surface a été observée, partielle à 100 nM (Figure 50, 1) et plus importante à 50 nM (Figure 50, 2).

La GFP-HisTag est donc bien reconnue par les deux anticorps, permettant la formation de l'immunosandwich à la surface. Le ratio entre les quantités d'analyte cible et d'anticorps de détection est important afin d'éviter un bruit de fond causé par la présence d'anticorps de détection non relocalisé.

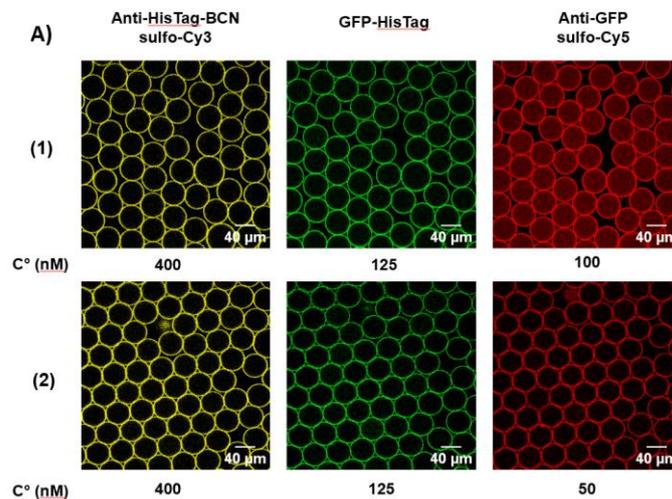


Figure 50: Immunoessais en surface de gouttes avec une variation de la concentration d'anticorps de détection. A) Images confocales. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 : 1) 100 nM, 2) 50 nM.

Le ratio de concentrations 400/125/50 nM (Anticorps de capture/GFP/Anticorps de détection) a été sélectionné, et les immunoessais avec les deux séries d'anticorps ont été testés en encapsulant dans les gouttes une phase aqueuse contenant les anticorps et la GFP

(Figure 51), suivi de leur observation en microscopie confocale et leur réinjection dans les mêmes conditions que les émulsions précédentes (Figure 51).

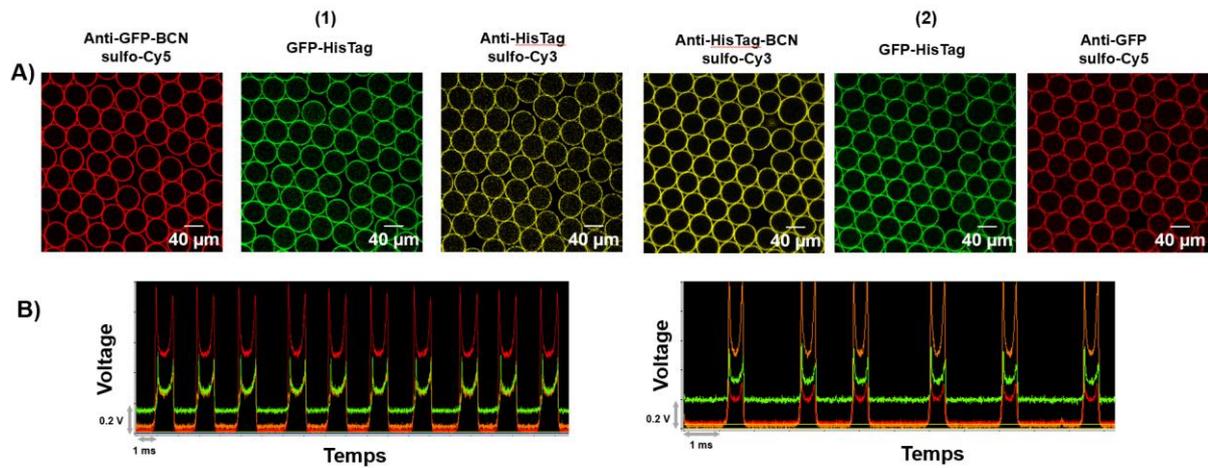


Figure 51: Immunoessais en surface de gouttes. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) ; 1) Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 (50 nM) ; 2) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (50 nM).

A la fois les images confocales et les signaux de réinjections ont montré la formation d'immunosandwichs à la surface des gouttes, pour les deux couples d'anticorps, indiquant que les immunoessais peuvent se former avec les deux anticorps différents de capture, et les deux anticorps de détection.

Afin de valider que la relocalisation de la GFP et des anticorps de détection en surface de gouttes soit bien spécifique, des contrôles ont été effectués en remplaçant un des deux anticorps par du Trastuzumab, qui ne cible aucun des épitopes présents sur la GFP (Figure 52). En greffant à la surface le Trastuzumab (Figure 52, 1,3), la GFP a été uniformément répartie dans le contenu des gouttes, indiquant qu'aucune capture de GFP n'a eu lieu, tandis que lors de l'utilisation d'anticorps ciblant la GFP greffée en surface (Figure 52, 2,4), une capture est observée. Cela indique que la relocalisation de la GFP en surface de gouttes est bien causée par sa reconnaissance par un anticorps spécifique. De même, en l'absence de capture de la GFP (Figure 52, 1,3), aucune relocalisation des anticorps de détection (anti-HisTag, anti-GFP) n'est observée. De manière similaire, en cas de capture de la GFP en surface et de l'utilisation d'anticorps de détection ne ciblant pas la GFP (Trastuzumab) (Figure 52, 2,4), aucune relocalisation n'est visible.

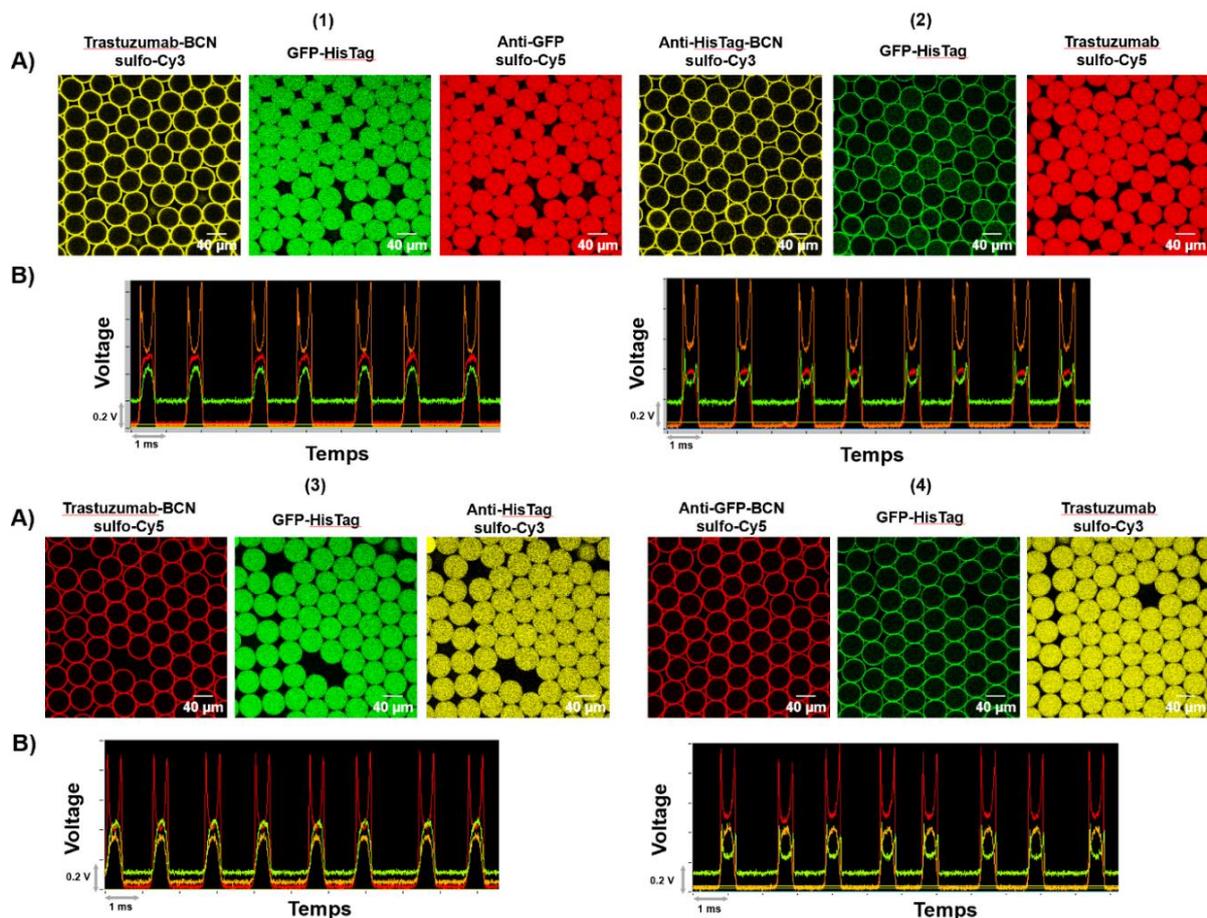


Figure 52: Contrôles négatifs de la relocalisation de la GFP et des anticorps de détection. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) ; 1) Trastuzumab-BCN-sulfoCy3 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 (50 nM) ; 2) Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Trastuzumab-sulfoCy5 (50 nM) ; 3) Trastuzumab-BCN-sulfoCy5 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (50 nM) ; 4) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (400 nM), GFP-HisTag (125 nM), Trastuzumab-sulfoCy3 (50 nM).

La formation d'immunosandwichs (Anticorps/protéine/Anticorps) en surface de gouttes est donc bien entraîné par la reconnaissance des épitopes de la GFP par des anticorps spécifiques, et il n'y a pas d'interactions et de liaisons aspécifiques entre la GFP et les anticorps dans les gouttes. Enfin, dans la production de gouttes contenant les anticorps sans GFP (Figure 53) on retrouve un bon greffage des anticorps de capture et une absence de relocalisation des anticorps de détection, validant l'absence d'interactions aspécifiques entre les anticorps anti-HisTag et anti-GFP.

Ces contrôles prouvent que toutes les relocalisations en surface de gouttes observées sont causées par des réactions de chimie click et par des interactions protéines/anticorps spécifiques.

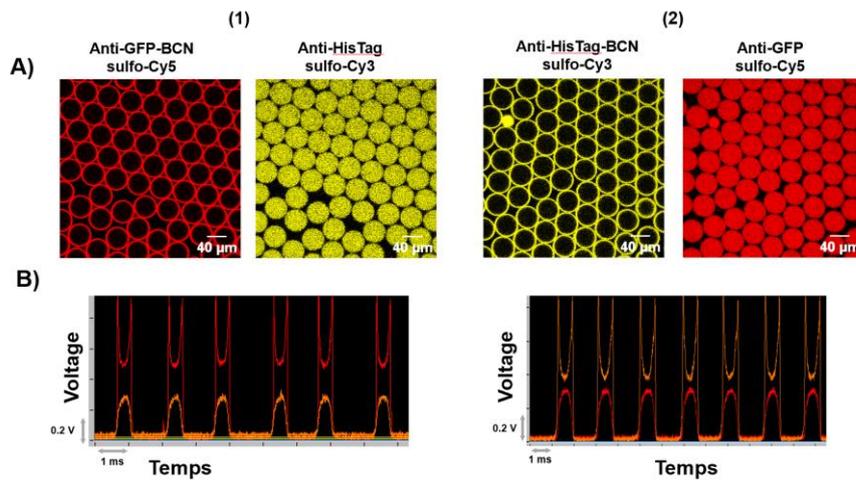


Figure 53: : Contrôles négatifs de la relocalisation des anticorps de détection. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) ; 1) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (400 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (50 nM).; 2) Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 (50 nM).

L'ensemble de ces expériences permet de conclure que l'utilisation de tensioactif portant des azotures permet la fonctionnalisation de la surface interne des gouttes par des anticorps-alcynes tendus. Cette fonctionnalisation ne bloque pas la capacité de ces anticorps à reconnaître et se lier à une protéine cible. Cette capture n'empêche pas la détection de la protéine par un deuxième anticorps, entraînant la formation d'immunosandwichs en surface de gouttes. La présence ou l'absence de ces immunosandwichs est détectable par microscopie confocale et par réinjection directe sur une puce de microfluidique, avec la formation de signaux caractéristiques. De plus, les gouttes restent manipulables et réinjectables, indiquant que la formation en surface de gouttes de larges complexes protéiques accrochés aux tensioactifs n'empêche pas la stabilisation des gouttes par ces mêmes tensioactifs.

## 7. Immunoessai avec pico-injection de la GFP

Le développement des immunoessais a été réalisé en encapsulant une phase aqueuse contenant les deux anticorps et la GFP dans les gouttes. Il est donc possible que l'immunosandwich se soit assemblé en surface des gouttes après le greffage des anticorps de capture, ou qu'il se soit déjà formé dans la phase aqueuse et que le complexe pré-formé se greffe ensuite en surface. Afin de confirmer que l'immunoessai peut bien se produire après le greffage des anticorps de capture, un test a été réalisé pour mimer des conditions de sécrétion en gouttes, en pico-injectant de la GFP dans des gouttes contenant des anticorps de capture et des anticorps de détection.

Une émulsion composée de gouttes de 90 pL contenant une phase aqueuse avec les anticorps (anti-GFP-BCN/Anti-HisTag, 400/50 nM) a été produite, collectée et incubée pendant 30 minutes. Ensuite, les gouttes ont été réinjectées dans une puce de microfluidique, et une solution aqueuse contenant de la GFP-HisTag (solution de 1250 nM, injection de 10 pL) a été picoinjectée dans 80% des gouttes. L'émulsion a ensuite été incubée 1 h et les gouttes ont été observées par microscopie confocale et par réinjection sur une puce microfluidique (Figure 54).

L'imagerie confocale et les signaux de réinjection ont montré que l'anticorps anti-GFP était bien greffé en surface. La pico-injection ne s'étant pas effectuée sur 100% des gouttes, une proportion minoritaire des gouttes (Figure 54, anneau bleu) ne contenait pas de GFP. Ces gouttes ont montré une répartition homogène d'anti-HisTag dans leur contenu. La majorité des gouttes (Figure 54, anneau jaune) contenaient de la GFP, qui a été capturée en surface des gouttes, et qui a ensuite entraîné la relocalisation de l'anticorps de détection anti-HisTag.

Ces expériences permettent de conclure que l'immunosandwich peut se former après fonctionnalisation de la surface. Cela est très intéressant car dans les applications de sécrétion dans les gouttes ou de détection de protéines issues d'une lyse cellulaire *post*-encapsulation, les analytes cibles ne seront présents qu'après une période d'incubation, l'immunocomplexe se formera donc après le greffage.

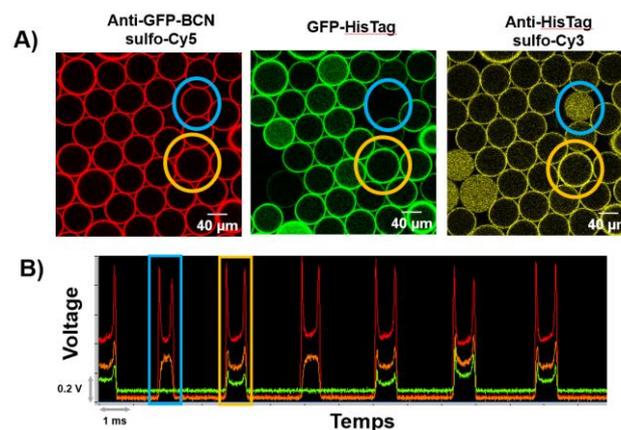


Figure 54: Immunoessais par pico-injection de GFP-HisTag. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse 1 (9/10 volume total) : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (400 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (50 nM). Phase aqueuse 2 (1/10 volume total) : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), GFP-HisTag (1250 nM). Anneau bleu : pas d'injection de GFP-HisTag ; anneau jaune : injection de GFP-HisTag.

## 8. Gamme de détection de l'immunoessai

Afin d'évaluer les concentrations basses et hautes d'analytes détectables par l'immunoessai, la concentration de GFP-HisTag dans les gouttes a été variée en conservant les concentrations d'anticorps à 400 nM pour l'anticorps de capture (anti-HisTag-BCN-sulfoCy3) et 50 nM pour l'anticorps de détection (anti-GFP-sulfoCy5). Les gouttes ayant un volume de 45 pL, cela correspond à 2.25 attomoles d'anticorps de détection (0.34 pg/goutte). Afin d'identifier la limite inférieure de concentration d'analyte détectable, une gamme de concentration de GFP-HisTag allant de 25 à 150 nM a été utilisée (Figure 55).

Les signaux de réinjection ont montré une augmentation progressive de l'intensité du signal correspondant à la GFP à mesure que la concentration augmente, et toutes les conditions ont montré l'aspect concave caractéristique d'une capture en surface (Figure 55, B,C). Le signal de l'anti-GFP est resté constant en intensité, mais sa forme a changé, passant d'une forme convexe à une forme concave avec l'augmentation de la concentration de GFP, indiquant une relocalisation progressive de l'anti-GFP en surface de goutte à partir de 50 nM de GFP (Figure 55, C). Les images confocales ont confirmé cette progression de la relocalisation, avec à 25 nM une répartition homogène de l'anti-GFP dans les gouttes, et une relocalisation progressive avec apparition d'un anneau de fluorescence à partir de 50 nM (Figure 55, A).

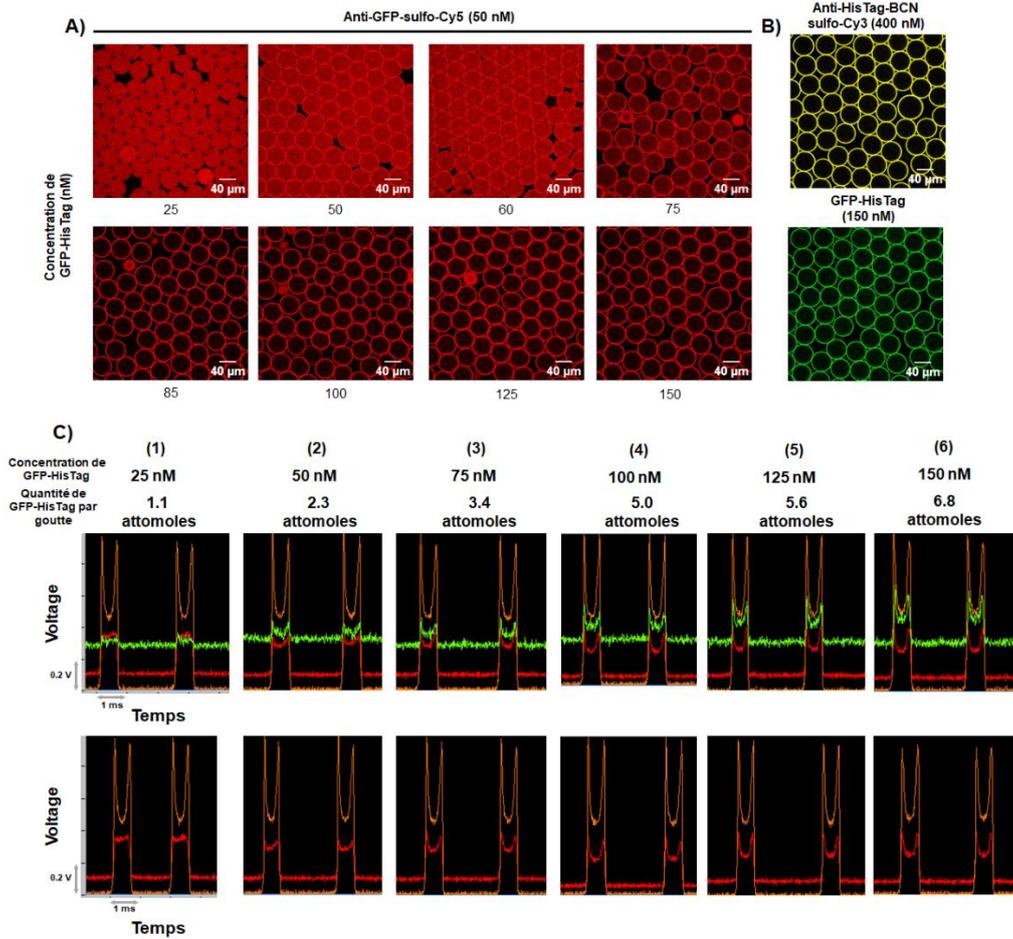


Figure 55: Limites de détection de l'immunoessai. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) ; Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 (50 nM) ; GFP-HisTag (25 à 150 nM). A) Images confocales du signal de l'anti-GFP-sulfoCy5 ; B) Images confocal des signaux de l'anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM) et de la GFP-HisTag (150 nM) pour confirmer la capture complète de la GFP. C) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique avec et sans laser à 488 nm (GFP).

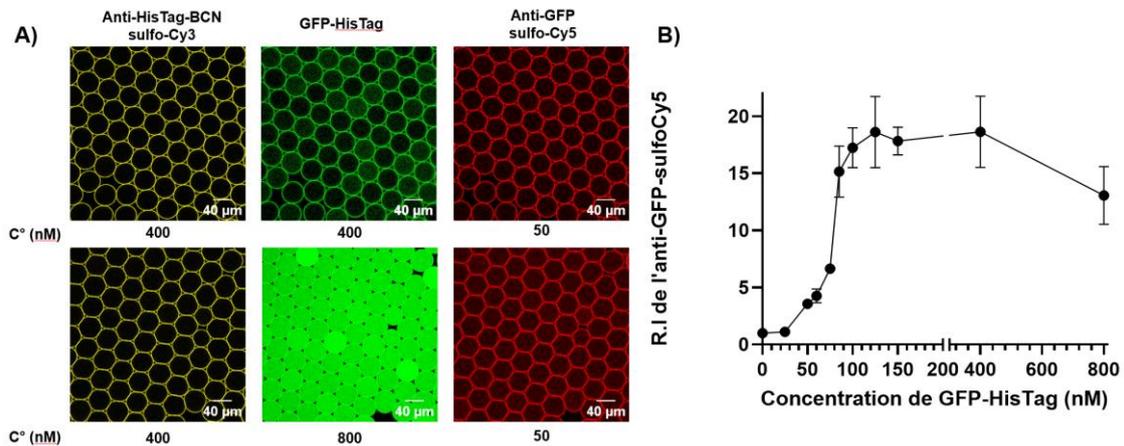


Figure 56: Limites de détection de l'immunoessai. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) ; Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), Anti-GFP-sulfoCy5 (50 nM) ; GFP-HisTag (400 et 800 nM). A) Images confocales ; B) Index de Relocation de l'anti-GFP-sulfoCy5 en fonction de la concentration de GFP-HisTag dans les gouttes.

Pour la limite supérieure de concentration d'analyte détectable, des émulsions contenant des concentrations de GFP de 400 et 800 nM ont été produites (Figure 56, A). Les images confocales de ces émulsions ont montré qu'à 800 nM, l'anneau de fluorescence de la GFP-HisTag n'était plus visible, et qu'un bruit de fond apparaissait pour l'anticorps anti-GFP. Cette perte de relocalisation et de signal de détection de l'anti-GFP peut-être causée par une saturation des anticorps de capture, ce qui laisse une partie de la GFP libre dans la goutte. Cela cause une compétition de liaison de l'anticorps de détection anti-HisTag avec la GFP-HisTag capturée et la GFP-HisTag libre dans la goutte, empêchant sa relocalisation complète en surface (effet postzone).

Afin de quantifier ces résultats, l'index de Relocalisation de l'anti-GFP (anticorps de détection) a été calculé en fonction de la concentration de GFP-HisTag en gouttes (Figure 56, B). Comme montré par les signaux de réinjection et de microscopie confocale, la gamme dynamique de détection est entre 50 et 100 nM de GFP, avec une augmentation rapide du R.I qui progresse de 4 à 17, puis atteint un plateau et reste stable jusqu'à 400 nM, caractérisant un maximum de relocalisation des anticorps de détection. Une fois les anticorps de capture saturés, la compétition de liaison de l'anti-GFP avec la GFP libre et la GFP capturée a entraîné la diminution du R.I à ~13.

L'immunoessai qui a été développé est donc sensible à des quantités de l'ordre de l'attomole d'analyte par goutte, et le signal de détection évolue dans un intervalle dynamique (~50-100 nM, 2.3-4.5 attomoles) avec la quantité de protéine ciblée. De plus, même avec un excès d'analyte, allant au-delà de l'intervalle dynamique, le signal de détection reste présent et détectable.

Les quantités d'anticorps de capture et de détection pourraient également être augmentées ou réduites permettant ainsi l'ajustement des intervalles de détection, sous certaines limites. La quantité d'anticorps de capture utilisable va pouvoir être augmentée jusqu'à atteindre la concentration d'anticorps au-delà de laquelle la surface des gouttes est saturée. La quantité minimale d'anticorps de détection, elle, sera dépendante des systèmes de détection, et de la concentration minimale d'anticorps nécessaire pour détecter la relocalisation de la fluorescence.

## 9. Sensibilité de détection de l'immunoessai :

Nous avons par la suite étudié la sensibilité de détection de l'immunoessai, en utilisant une gamme de concentration en anticorps de détection. Une série d'émulsions contenant une phase aqueuse composée de 400 nM d'anticorps de capture (anti-HisTag-BCN-sulfoCy3), 20 nM de GFP-HisTag et 5 à 20 nM d'anticorps de détection (anti-GFP-sulfoCy5) ont été produites et analysées (Figure 57).

Dans cette série d'expériences, la détection des anticorps anti-GFP par microscopie confocale ou en réinjection s'est avérée compliquée, du fait de leur concentration faible en gouttes, résultant en un signal de fluorescence difficilement détectable. L'anneau de relocalisation des anticorps anti-GFP était visible pour les concentrations de 5 et 10 nM par microscopie et en réinjection (signal concave), tandis que la fluorescence était homogène au-delà de ces concentrations.

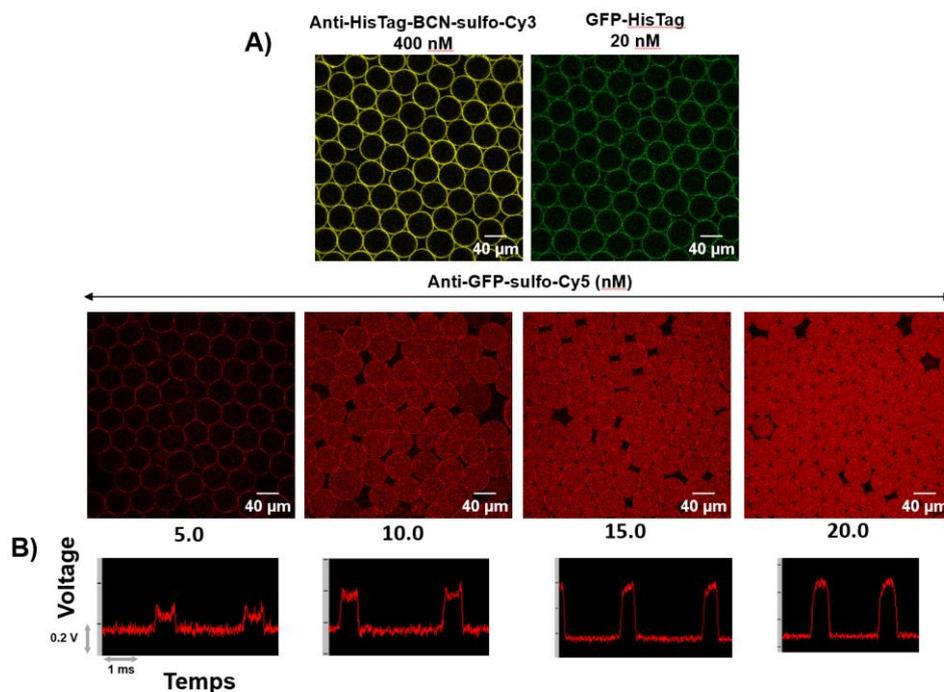


Figure 57: Immunoessai pour la détection de 20 nM de GFP-HisTag. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), Anti-HisTag-BCN-sulfoCy3 (400 nM), GFP-HisTag (20 nM) ; Anti-GFP-sulfoCy5 (5.0 à 20.0 nM)

Ces résultats indiquent qu'il est possible d'abaisser le seuil de détection de l'immunoessai en diminuant la concentration de l'anticorps de détection, permettant la détection de 0.9

attomoles (20 nM) de GFP-HisTag en gouttes. Cependant une optimisation de la méthode de détection est nécessaire afin de continuer de baisser le seuil de détection de l'immunoessai. En effet, travailler avec des concentrations aussi faibles d'anticorps de détection nécessite une augmentation du DOC de fluorophores par anticorps afin de maximiser les signaux de fluorescence et augmenter le ratio signal/bruit de détection.

## 10. Détection de protéines dans un milieu complexe de lyse cellulaire

Afin d'évaluer la capacité de l'immunoessai en surface à s'effectuer au sein d'un milieu complexe et potentiellement interférant, et d'évaluer si cette méthodologie est compatible pour l'étude de cellules uniques, un test de détection d'une protéine cytosolique au sein d'un lysat cellulaire a été réalisé. Pour cela, des *E.Coli* transformées par plasmide pour exprimer de la GFP-HisTag ont été encapsulées dans des gouttes avec des anticorps anti-GFP-BCN-sulfoCy5 et anti-HisTag-sulfoCy3 (ratio 8:1) et du tampon de lyse (Lysozyme : 5 à 10 mg/mL).

Afin d'éviter une lyse des bactéries avant l'encapsulation, les gouttes ont été produites sur une puce microfluidique à trois entrées, dont deux entrées de phase aqueuse. Une phase aqueuse comprenant les *E.Coli*, et une autre comprenant les anticorps et le tampon de lyse ont été co-encapsulées avec un ratio de 1:1. Les gouttes ont été collectées et analysées après 2 h d'incubation à 20 °C (Figure 58). La phase aqueuse contenant les *E.Coli* a été préparée afin d'avoir un taux d'occupation théorique des gouttes de 0.8 à 0.9. L'occupation des gouttes suivant la loi de Poisson, ces conditions permettent d'obtenir en théorie environ 45% des gouttes sans bactéries, 35% avec une bactérie, 15% avec deux bactéries et moins de 5% en contenant plus de deux. Après l'encapsulation, les bactéries sont entrées en contact avec le tampon de lyse, entraînant leurs lyses et la libération de la GFP-HisTag, qui peut ensuite être capturée en surface.

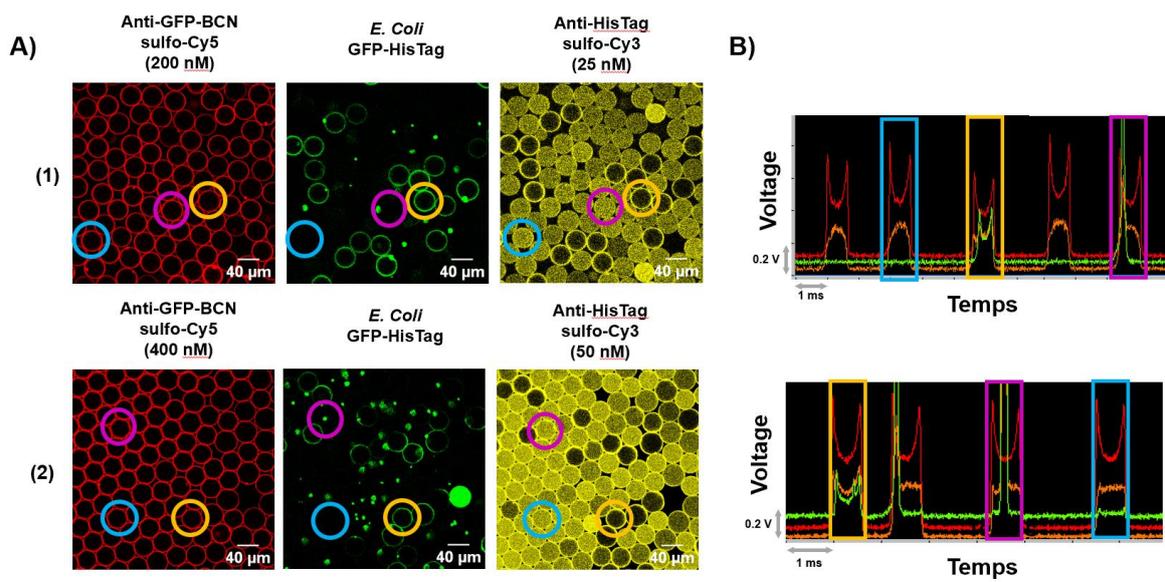


Figure 58: Immunodétection de GFP-HisTag cytosolique après libération par lyse de *E.Coli* en gouttes. A) Images confocales ; B) Profil de fluorescence des gouttes lors d'une réinjection dans une puce de microfluidique. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse 1 : CHAPS (1 mM dans du PBS 1X) (1) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (400 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (50 nM), lysozyme (10 mg/mL dans du PBS 1X) ; (2) Anti-GFP-BCN-sulfoCy5 (800 nM), Anti-HisTag-sulfoCy3 (100 nM), lysozyme (20 mg/mL dans du PBS 1X). Phase aqueuse 2 : *E.Coli* dans du PBS 1X. Ratio 1:1 des deux phases aqueuses dans les gouttes. Anneau bleu : absence d'*E.Coli* en goutte. Anneau rose : encapsulation d'*E.Coli* sans lyse. Anneau jaune : Lyse d'*E.Coli* en goutte.

Pour l'ensemble des gouttes, à la fois les images confocales et les profils de réinjection ont montré que le greffage de l'anticorps de capture anti-GFP-BCN-sulfoCy5 s'est correctement effectué. Le tampon de lyse n'empêche donc pas la réaction de SPAAC.

Ensuite, selon les gouttes, plusieurs profils ont été obtenus : certaines gouttes ne contenaient pas de *E.Coli* (Figure 58, Figure 59, anneau bleu). Ces gouttes ne contenaient donc pas de GFP-HisTag, et comme attendues elles ont présenté une homogénéité de répartition des anticorps de détection anti-HisTag-sulfoCy3 et un signal de détection uniforme convexe en réinjection.

Le reste des gouttes contenaient *E.Coli*, confirmé par l'observation d'une fluorescence verte en microscopie confocale et en réinjection. Trois cas de figures se sont présentés : dans le premier, les bactéries étaient lysées (Figure 58, Figure 59, anneau jaune), libérant la GFP-HisTag dans les gouttes. La protéine a ensuite été reconnue et capturée en surface, formant un anneau de fluorescence vert, et un signal de capture concave en réinjection. La GFP-HisTag capturée a ensuite été reconnue par les anticorps anti-HisTag de détection, qui se sont également relocalisés en surface, entraînant la formation d'un anneau de fluorescence jaune au confocal, et l'apparition d'un signal de détection concave en réinjection. D'autres gouttes ont présenté des *E.Coli* non lysées (Figure 58, Figure 59, anneau rose), sous la forme de spot

de fluorescence en microscopie confocal et avec un pic intense de fluorescence en réinjection. Cette absence de lyse peut s'expliquer par l'incubation de courte durée, à 20 °C, sans utilisation de forces externes (chaleur, vibrations) pour accélérer la lyse bactérienne.<sup>245</sup> Dans le cas d'une absence de lyse, la GFP était présente mais contenue dans les bactéries, et donc non disponible pour être capturée en surface et détectée par les anticorps de détection. Aucun anneau de détection ne s'est formé, ni de signal caractéristique en réinjection. Enfin des gouttes ont présenté un état intermédiaire, avec à la fois un spot de fluorescence et des anneaux de fluorescence correspondants à de la GFP-HisTag capturée en surface, et à une relocalisation d'anticorps anti-HisTag. Ce cas semble être dû à une lyse partielle de bactérie dans les gouttes.

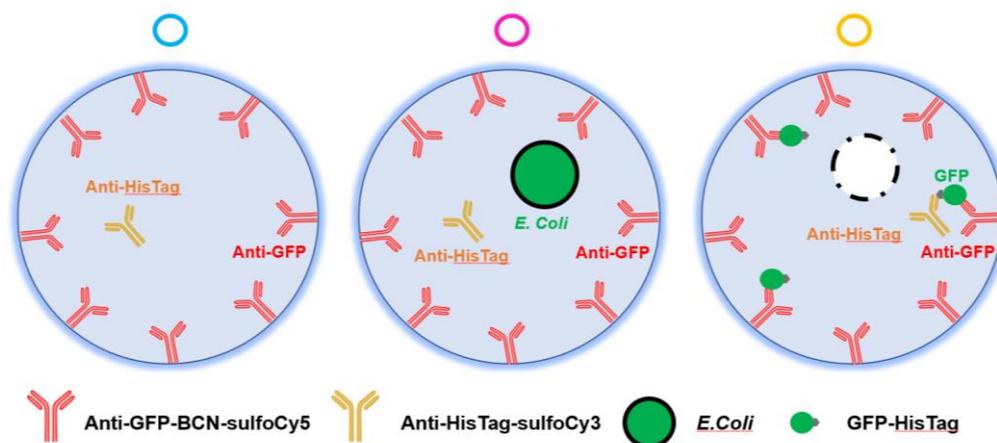


Figure 59 : Illustration des différents profils de gouttes retrouvés. Anneau bleu : absence d'E.Coli. Anneau rose : encapsulation d'E.Coli sans lyse. Anneau jaune : Lyse d'E.Coli en goutte.

Ainsi l'immunoessai en surface de gouttes est fonctionnel pour l'identification de protéines au sein d'un milieu complexe tel qu'un lysat cellulaire.

## 11. Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent la synthèse de deux nouveaux tensioactifs composés d'une queue PFPE et d'une tête hydrophile PEG fonctionnalisée par des groupements azotures. Après production de gouttes d'eau dans l'huile fluorée, ces tensioactifs sont capables de réagir en surface des gouttes *via* une réaction click bioorthogonale de SPAAC avec des anticorps conjugués à des alcynes tendus. La formation de cette liaison covalente entre les tensioactifs et les anticorps n'est pas affectée par la présence

de cellules, lysat cellulaire ou tampon de lyse. De plus, les tensioactifs avant et après réaction conservent leur capacité à stabiliser les gouttes, et les anticorps greffés en surface conservent leur capacité à se lier à des protéines cibles. Ces tensioactifs pré-fonctionnalisés permettent donc de transformer la surface interne de gouttes en surface de capture, qui peut être utilisée pour former des immunosandwichs fonctionnels en surface de gouttes, entre l'anticorps greffé, une protéine cible, et un anticorps de détection présent dans la phase aqueuse encapsulée et reconnaissant également la protéine cible.

L'utilisation d'un modèle d'immunoessai avec deux anticorps : anti-GFP et anti-HisTag et une protéine cible GFP-HisTag a prouvé l'efficacité de cette nouvelle méthode d'immunoessai en microfluidique en gouttes. Le marquage par des fluorophores des anticorps de détection permet la formation d'un signal spécifique indiquant la formation des immunocomplexes, en microscopie confocale comme en réinjection sur une puce de microfluidique. La forme de ce signal est proportionnelle à la quantité d'anticorps de détection qui se relocalise en surface et donc à la quantité d'analyte cible dans la goutte. Cet immunoessai est utilisable pour détecter des protéines isolées dans un tampon mais également des protéines cytosoliques issues de la lyse cellulaire d'une bactérie, dans un milieu plus complexe.

Les travaux présentés dans ce chapitre ouvrent la voie à de nombreuses applications dans l'analyse de cellules uniques, pour l'analyse de protéines cytosoliques, mais également pour l'analyse de protéines sécrétées. Notre méthode pourrait par exemple être utilisée pour l'identification de cellules sécrétantes au sein d'un mélange cellulaire, notamment pour des applications de production d'anticorps monoclonaux par des hybridomes.

Pour de telles applications, le signal de réinjection présente un fort potentiel. En effet, les résultats de gamme de sensibilité ont montré une évolution du signal de relocalisation en réinjection selon la quantité d'analyte dans les gouttes. La quantification de ces signaux, en évaluant la profondeur de cavitation, permettrait de pouvoir identifier lors de la réinjection les variations de concentration d'analytes cible dans les gouttes.

L'immunoessai peut également être adapté en augmentant ou diminuant les concentrations d'anticorps de capture, pour détecter des quantités d'analytes plus ou moins importantes. La méthode est très versatile car il est possible d'ajuster précisément les quantités d'anticorps de capture. Cela nécessite cependant de déterminer la quantité

maximale d'anticorps que l'on peut greffer à la surface de gouttes. De plus, pour descendre en sensibilité de détection, il est nécessaire de travailler sur le DOC de fluorophores conjugués aux anticorps de détection, afin d'amplifier le signal de fluorescence et d'avoir un meilleur rapport de signal sur bruit, permettant d'augmenter la précision du signal de relocalisation.

Au cours de ces travaux, nous avons également observé une limitation concernant le tensioactif Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3**. La stabilisation des émulsions était suffisante pour des applications à court terme (quelques heures), pour une ou plusieurs réinjections, pour de la déstabilisation contrôlée (pico-injection), ainsi que pour de l'observation en microscopie confocale. Cependant, l'incubation pendant une durée plus longue (16 h, 24 h) n'a pas été possible, en raison d'une coalescence partielle des émulsions, rendant impossible toute réinjection ou expérimentation.

Au vu de ces résultats, nous avons engagé une étude plus détaillée afin de mieux cerner la capacité des anticorps à fonctionnaliser la surface des gouttes, ainsi que leur capacité à stabiliser les émulsions formées, avant et après fonctionnalisation. Ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant.



## V) Etude de l'influence de la structure de l'alcyne et de la tête hydrophile des tensioactifs sur la fonctionnalisation et stabilisation d'émulsions en microfluidique en gouttes

### 1. Préambule

Ce chapitre présente les travaux réalisés dans le cadre de mon deuxième projet de thèse. Les travaux réalisés ont porté sur l'étude de la fonctionnalisation de la surface des gouttes, et sur la stabilité des émulsions formées. Dans cette étude, l'impact de la structure de l'alcyne tendu et de la tête hydrophile azoture des tensioactifs sur la fonctionnalisation de surface des gouttes a été étudié. Ensuite, la capacité des tensioactifs azoture à stabiliser des émulsions avant et après fonctionnalisation de la surface interne des gouttes a été caractérisée.

Les travaux présentés sont en partie retrouvés dans l'article « **Microfluidic droplet stabilization via SPAAC promoted antibody conjugation at the water/oil interface** » publié en septembre 2023 dans ACS Applied Materials and Interface, volume 15, pages 45498–45505. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c10655>

### 2. Introduction

Le développement de fluorotensioactifs pré-fonctionnalisés pour la microfluidique en gouttes a émergé ces dernières années. A notre connaissance, seules deux équipes ont publié des travaux sur des fluorotensioactifs azotures, notre équipe puis l'équipe de Rainer Haag.<sup>204,205,225,239</sup> Du fait de la nature très récente de cette stratégie, aucune étude n'existe pour identifier les paramètres structuraux influençant la SPAAC en surface de gouttes (structure de l'alcyne tendu et des têtes hydrophiles). De plus, les tensioactifs doivent être en mesure de stabiliser les émulsions (avant et après fonctionnalisation des gouttes), et aucune information n'est disponible à ce jour quant aux effets de la modification du tensioactif induite par le greffage de molécules en surface de gouttes sur leur stabilité. Les travaux effectués ont été réalisés en plusieurs temps :

- Premièrement, nous avons étudié l'influence de la nature de l'alcyne tendu utilisé ainsi que du degré de conjugaison de l'anticorps sur le greffage en surface de gouttes, en utilisant les tensioactifs développés dans le chapitre précédent.

- Dans un second temps, l'impact de la structure de la tête hydrophile des tensioactifs sur le greffage a été caractérisé. Pour cela nous avons développé une famille de tensioactifs possédant diverses structures de tête polaire mais ayant toutes des motifs di-azotures en partie terminale.
- Ensuite, l'effet de ces modifications de structure des têtes polaires sur la capacité des tensioactifs à stabiliser les gouttes a été évalué.
- Enfin, l'impact du greffage d'anticorps à la surface interne des gouttes sur la stabilité des émulsions a été étudié.

### 3. Etude de la relation entre la structure des réactifs de la SPAAC et le greffage en gouttes

#### 3.1. Etude de l'influence de l'alcyne tendu sur la fonctionnalisation de surface des gouttes

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la structure de l'alcyne tendu sur la capacité des anticorps à se greffer en surface de gouttes.

##### 3.1.1. Effet de la nature et du DOC moyen d'alcyne tendu des anticorps sur la SPAAC en gouttes

Trois tensioactifs pré-fonctionnalisés MonoN<sub>3</sub> **1**, PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** ont préalablement démontré leur incapacité (monoN<sub>3</sub>) ou capacité (diN<sub>3</sub> et tétraN<sub>3</sub>) à effectuer une SPAAC en surface des gouttes avec des anticorps fonctionnalisés par des BCN (voir partie IV) 5.3). Les résultats ont montré qu'à la fois le nombre d'azotures sur les têtes hydrophiles et le degré de conjugaison moyen des anticorps influent sur l'efficacité de greffage. Un paramètre n'a pas été modifié lors de ces expériences : la nature de l'alcyne tendu. En effet, la réaction de SPAAC peut s'effectuer avec différents alcynes tendus (voir partie II) 4.4.1).<sup>227</sup> Nous avons cherché à voir s'il était possible d'augmenter l'efficacité de la SPAAC en changeant d'alcyne tendu, et sélectionné le DiBenzoCycloOctyne (DBCO). Cet alcyne a été choisi car sa cinétique en SPAAC est deux fois plus rapide que celle du BCN (0.31 contre 0.14 M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>), grâce aux cycles benzènes fusionnés au cyclooctyne, qui augmentent la contrainte de cycle de l'alcyne.<sup>227</sup> De plus, le DBCO a préalablement montré sa capacité à réagir *via* SPAAC à la surface de gouttes en microfluidiques avec des tensioactifs azotures.<sup>204,205</sup> Enfin, les travaux de Yang *et al.* sur la fonctionnalisation *via* SPAAC de surfaces

solides présentant des polymères azotures ont montré une meilleure réactivité des réactifs DBCO par rapport aux réactifs BCN.<sup>246</sup>

### 3.1.1.1. Bioconjugaison du Trastuzumab

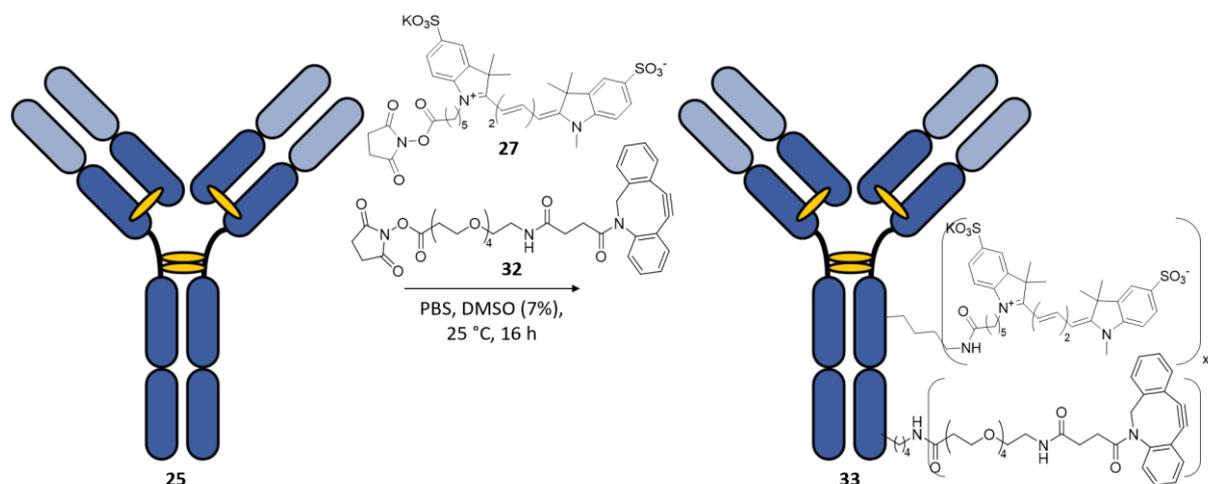


Figure 60: Bioconjugaison de Trastuzumab-DBCO 33

L'anticorps modèle, le Trastuzumab, a été conjugué dans des conditions identiques à celles utilisées pour la conjugaison avec des BCN (Tableau 3) : PBS 1X, pH = 7.4, DMSO 7%, 2 équivalents molaires de sulfoCy5-NHS **27** et 10 à 20 équivalents molaires de DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS **32** (Figure 60), de manière à obtenir des anticorps ayant un DOC moyen de fluorophore autour de 1, et un DOC moyen de DBCO de 0 à 5, selon le nombre d'équivalents de réactifs (Tableau 5).

Tableau 5: Conjugaison du Trastuzumab avec du DBCO et du sulfoCy5

Anticorps	Equivalent de DBCO-PEG <sub>4</sub> -NHS	Equivalent de sulfoCy5	aDOC (DBCO)	aDOC (sulfo-Cy5)
<b>(33-A)Trastuzumab</b>	0	2	0.0	1.0
<b>(33-B)Trastuzumab</b>	10	2	3.7	1.3
<b>(33-C)Trastuzumab</b>	15	2	4.6	0.6
<b>(33-D)Trastuzumab</b>	20	2	5.0	0.7
<b>(33-E)Trastuzumab</b>	20	0	4.1	0.0

### 3.1.1.2. Comparaison du greffage entre des anticorps-BCN et des anticorps-DBCO

Des émulsions composées de gouttes de 45 pL contenant 400 nM d'anticorps fonctionnalisés dans du PBS 1X ont été produites avec les tensioactifs monoN<sub>3</sub> **1** (Figure 31), PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** (Figure 33), ainsi qu'avec le tensioactif commercial 008-F, puis ont été conservées 1 h à température ambiante avant d'être observées par microscopie confocale (Figure 61). Les images confocales ont ensuite été analysées pour

calculer le R.I et quantifier la relocalisation des anticorps à la surface des gouttes (Figure 62). Les images ont montré une absence de relocalisation aspécifique des anticorps-DBCO avec le tensioactif non fonctionnalisé (Figure 61, e). Il a également été possible d’observer que pour le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1**, un greffage était présent pour un DOC moyen de DBCO de 3.6 (Figure 61, b), alors que les essais avec les anticorps-BCN n’avaient montré aucune relocalisation des anticorps et ce même à un DOC élevé de 5 (Figure 61, c).

La comparaison des R.I a montré qu’à DOC moyen égal, les anticorps-DBCO permettait systématiquement une meilleure efficacité de la réaction de SPAAC pour tous les tensioactifs. A DOC moyen de 3.6 d’alcyne tendu, pour le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1**, les anticorps-BCN ne se relocalisaient pas (R.I ~1), tandis que les anticorps-DBCO permettent d’obtenir un R.I proche de 5. Au même DOC moyen, pour le tensioactif diN<sub>3</sub> **2**, le R.I était à environ 5 avec les anticorps-BCN, tandis qu’il est supérieur à 20 avec les anticorps-DBCO. De même, pour le tensioactif tétraN<sub>3</sub> **3**, le R.I obtenu avec les anticorps-BCN n’était qu’à environ 14, alors qu’avec les anticorps-DBCO il est proche de 30. Enfin, à DOC moyen d’alcyne tendu de 5.0, Le R.I est supérieur à 30 pour les tensioactifs diN<sub>3</sub> **2** et tétraN<sub>3</sub> **3** avec les anticorps-DBCO, indiquant une relocalisation complète des anticorps (Figure 62).

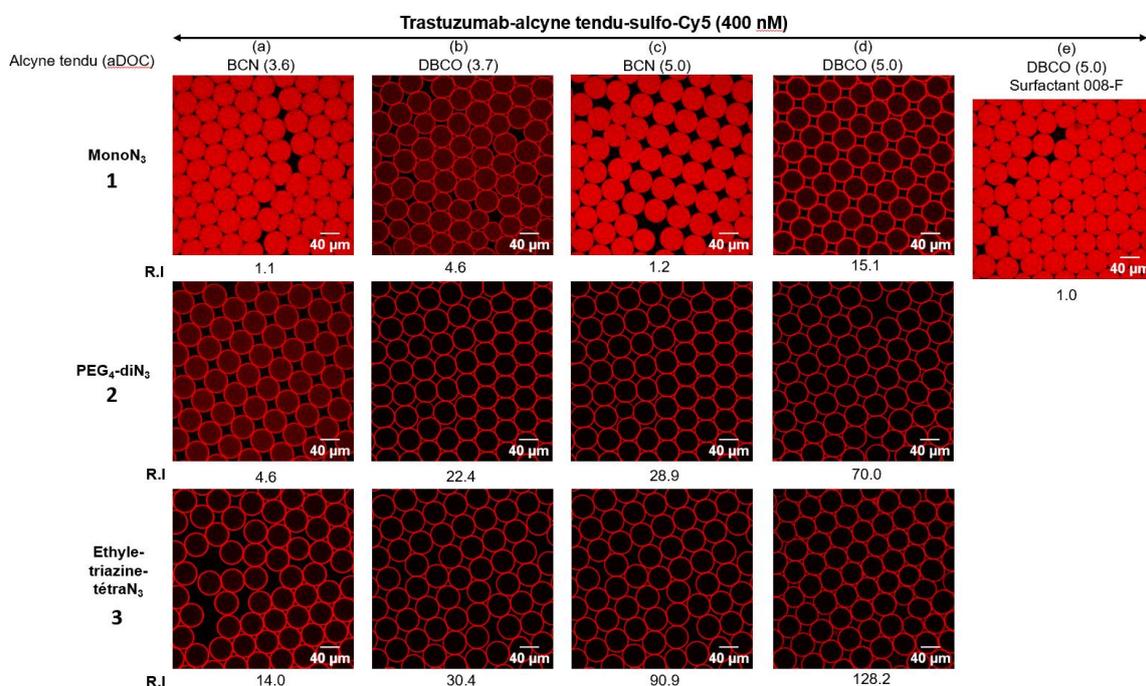


Figure 61: SPAAC en surface de gouttes. Des gouttes de 45 µl contenant 400 nM d’anticorps et stabilisées par les tensioactifs **1**, **2**, **3** ou 008-F (2.5% dans de l’HFE 7500) sont produites, incubées 1 h et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), Trastuzumab (400 nM); A) Trastuzumab-BCN(3.6)-sulfoCy5; B) Trastuzumab-DBCO(3.7)-sulfoCy5; C) Trastuzumab-BCN(5.0)-sulfoCy5; D-E) Trastuzumab-DBCO(5.0)-sulfoCy5.

En conclusion, le tensioactif tétraN<sub>3</sub> **3** présente une meilleure réactivité en SPAAC, car il permet une relocalisation complète des anticorps avec un degré de conjugaison moins élevé (3.7). Cependant à un DOC moyen de 5.0 de DBCO il n’y a plus de différence entre le tensioactif diN<sub>3</sub> et tétraN<sub>3</sub>. Enfin pour le tensioactif monoN<sub>3</sub> **1**, l’utilisation d’un alcyne DBCO à la place d’un alcyne BCN a permis à la SPAAC en goutte de s’effectuer, mais même pour un DOC moyen de 5.0, la relocalisation des anticorps en surface n’était pas complète (R.I ~15) (Figure 62).

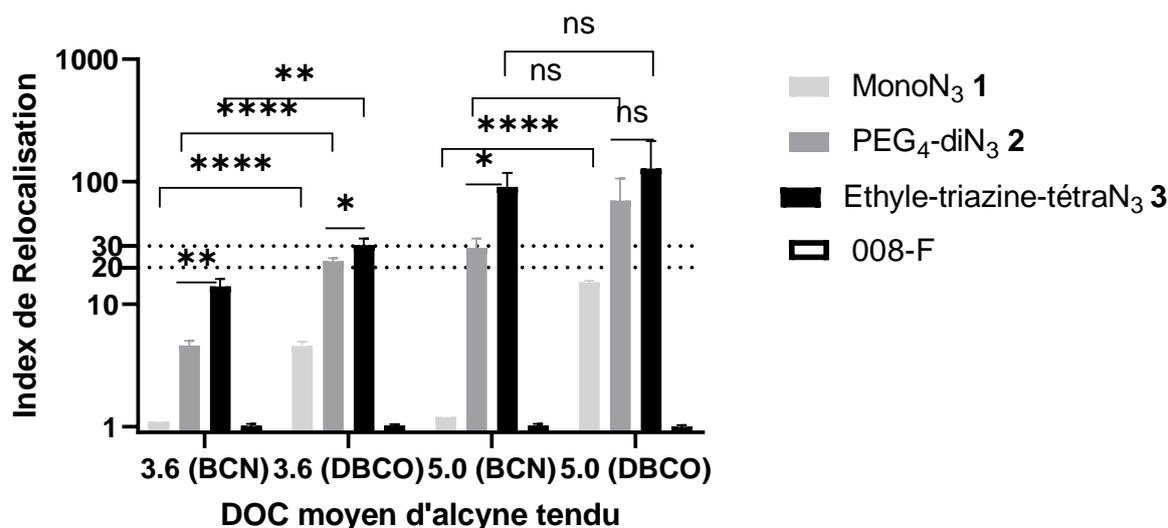


Figure 62: Index de relocalisation des tensioactifs avec des anticorps BCN et DBCO. Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.0001. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n’est pas significative avec une p-value > 0.05.

L’efficacité de la SPAAC en surface de gouttes semble donc être dépendante du nombre de groupements azotures par têtes hydrophiles, du degré de conjugaison d’alcynes tendus par anticorps et de la nature de l’alcyne tendu. Ces résultats sont cohérents avec la littérature et les cinétiques de la réaction de SPAAC décrites ( $0.14 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (BCN),  $0.31 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (DBCO)).<sup>227,246</sup> Ces résultats indiquent également qu’en augmentant suffisamment le DOC d’alcynes tendus par anticorps et/ou en utilisant des alcynes tendus suffisamment réactifs, il est possible de diminuer le nombre d’azotures par tensioactif sans impacter le greffage des anticorps. Ainsi deux azotures par tête hydrophile sont suffisants dans les conditions présentées pour permettre une fonctionnalisation efficace et complète de la surface des gouttes.

Au vu de ces conclusions, on pourrait retenir l’hypothèse qu’utiliser des alcynes tendus encore plus réactifs, tel que des biaryl-azacyclooctynone (BARAC) ( $0.96 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ou encore des

3,3,6,6-tetramethylthiacycloheptyne (TMTH) ( $4.0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) améliorerait encore plus l'efficacité de greffage.<sup>227</sup> De même, d'autres systèmes pourraient être utilisés, comme la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse avec le couple tétrazine/*trans*-cyclooctène, qui est une des réaction bioorthogonale les plus rapide connues à ce jour ( $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).<sup>247–250</sup>

### 3.1.2. Effet de la nature de l'alcyne tendu sur le greffage en condition de culture cellulaire

Afin d'évaluer si le greffage des anticorps est influencé par les milieux aqueux utilisés en culture cellulaire, plusieurs émulsions ont été produites en variant les phases aqueuses. Des gouttes ont été formées avec le tensioactif Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** et les anticorps Trastuzumab BCN et DBCO dans le PBS et dans le milieu de culture cellulaire RPMI 1640<sup>153</sup> sans ou en présence de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), qui est très couramment utilisé pour la culture de cellules.<sup>145,150,153,251</sup> Après collecte, les gouttes ont été conservées 1 h à température ambiante et observées au microscope confocal (Figure 63). L'observation des gouttes a montré que pour les anticorps BCN, le changement de phase aqueuse semble avoir peu d'effet, mais l'ajout de 10% de sérum de veau fœtal conduit à la formation d'un anneau de fluorescence en surface de goutte avec un bruit de fond important, indiquant un greffage incomplet (Figure 63, 1,b,d). Au contraire, pour les anticorps DBCO, aucune différence n'est observée dans les conditions avec ou sans ajout de sérum, avec la formation d'un anneau de fluorescence en surface des gouttes et l'absence de bruit de fond dans les gouttes, indiquant un greffage complet (Figure 63, 2).

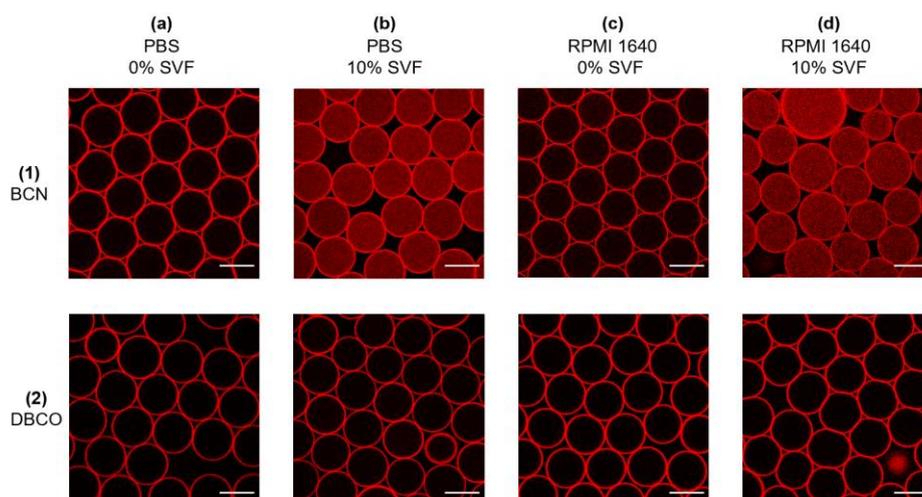


Figure 63 : SPAAC en surface de gouttes dans différents milieux. Conditions de production : phase fluorée : tensioactif Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** (2.5% dans de l'HFE 7500). Phase aqueuse : CHAPS (1 mM dans du Milieu) ; Anticorps (400 nM) 1) Trastuzumab-BCN(4.0)-sulfoCy5, 2) Trastuzumab-DBCO(4.1)-sulfoCy5. Milieu : a) PBS 1X ; b) PBS 1X + 10% SVF ; c) RPMI 1640 ; d) RPMI 1640 + 10% SVF. Barre d'échelle : 40  $\mu\text{m}$ .

Le contenu de la phase aqueuse peut donc influencer le greffage, notamment la présence de sérum. Cela peut être causé par la présence de BSA, connue pour se placer à l'interface, et qui pourrait ainsi limiter les interactions anticorps/tensioactifs. De même, les lipides contenus dans le sérum peuvent possiblement contribuer à limiter le contact des anticorps avec les tensioactifs en surface, et ainsi réduire l'efficacité de la SPAAC en gouttes. L'utilisation d'alcyne tendu DBCO permet cependant le maintien d'une fonctionnalisation de surface efficace par rapport au BCN. Au vu de ces résultats et des résultats précédents montrant la meilleure efficacité en SPAAC des anticorps DBCO, nous avons continué les études de fonctionnalisation avec cet alcyne tendu.

### 3.2. Etude de l'influence du nombre d'azotures des têtes hydrophiles sur la saturation de surface des gouttes

Nous avons ensuite évalué l'effet du nombre d'azotures sur la capacité des anticorps à se greffer en surface de gouttes.

#### 3.2.1. *Saturation de la surface des gouttes avec des anticorps-DBCO*

L'objectif de ces essais a été d'identifier si le nombre d'azotures présent sur les têtes hydrophiles de nos tensioactifs jouaient sur la concentration saturante d'anticorps en surface. Le tensioactif PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyl-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** ayant montré une capacité à totalement relocaliser des anticorps-DBCO (DOC 5) à 400 nM, nous avons ensuite évalué la quantité maximale d'anticorps greffables sur la surface interne de gouttes de 45 pL stabilisées avec les tensioactifs **2** et **3** dilués à 2.5% dans de l'HFE7500. Une gamme 1 à 10 μM d'anticorps Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (DOC moyen de 5) a été utilisée. Les gouttes ont été conservées 1 à 2 h puis observées au microscope confocal (Figure 64).

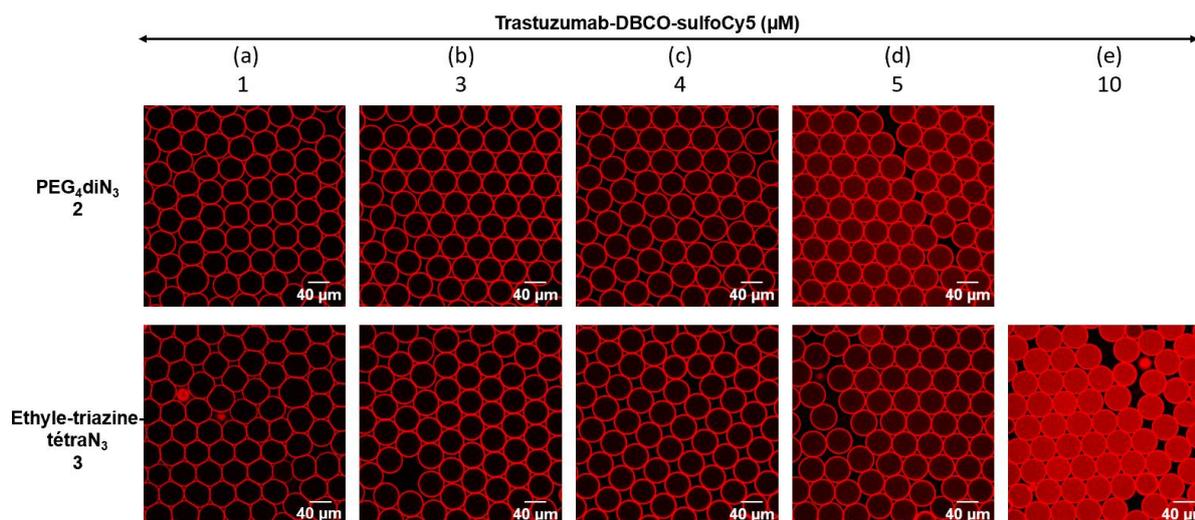


Figure 64: Saturation de la surface des gouttes par des anticorps-DBCO-sulfoCy5. Des gouttes de 45  $\mu$ L sont stabilisées par les tensioactifs **2** ou **3** (2.5% dans de l'HFE 7500) et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (1 à 10  $\mu$ M).

Les images ont ensuite été analysées par imageJ, pour calculer l'index de relocalisation des anticorps (Figure 65). Un paramètre dérivé du R.I a également été utilisé :

$$Relocalisation(\%) = \left( 1 - \frac{(Fluorescence^{Lumen} - Fluorescence^{Inter-gouttes})}{(Fluorescence^{surface} - Fluorescence^{Inter-gouttes})} \right) \times 100$$

Ce paramètre correspond au pourcentage de fluorescence de la fluorescence totale que l'on retrouve à l'interface. En cas de relocalisation totale des anticorps, le ratio de fluorescence (Lumen/surface) est proche de 0 et la valeur de relocalisation est proche de 100. Au contraire, si un bruit de fond apparaît dans les gouttes, la valeur de relocalisation diminue.

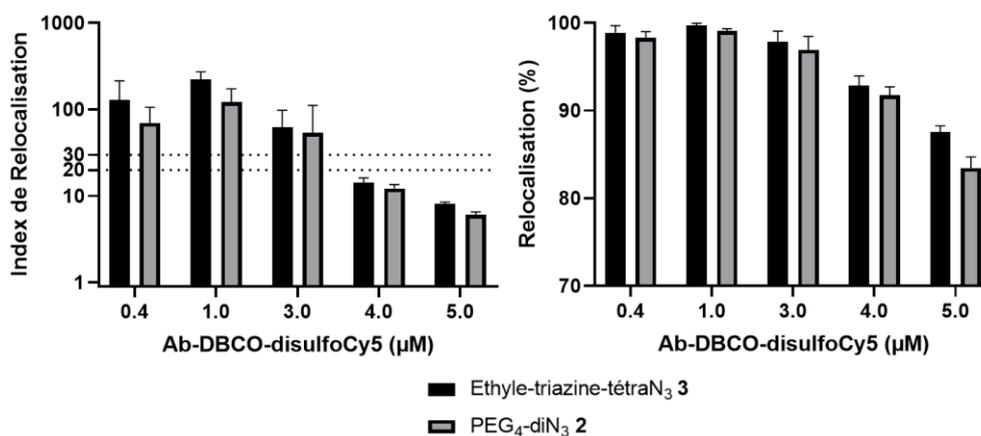


Figure 65: Index de relocalisation (R.I) et Relocalisation de la fluorescence à la surface des gouttes selon les tensioactifs et la concentration d'anticorps.

L'analyse des images confocales a montré que de 1 à 3  $\mu\text{M}$  d'anticorps, le R.I est supérieur 30, indiquant une relocalisation complète des anticorps en surface pour les deux tensioactifs. Puis lorsque la concentration d'anticorps augmente, entre 3 et 5  $\mu\text{M}$ , un bruit de fond commence à apparaître dans les gouttes et la valeur du R.I pour les deux tensioactifs diminue (12-14 à 4.0  $\mu\text{M}$  et 6-8 à 5.0  $\mu\text{M}$ ), montrant que la relocalisation n'est plus totale. Le pourcentage de relocalisation montre les mêmes résultats : la relocalisation des anticorps est supérieure à 95% pour les deux tensioactifs entre 1 et 3.0  $\mu\text{M}$  d'anticorps, puis chute pour des concentrations d'anticorps plus élevées (92-93% à 4.0  $\mu\text{M}$  et 83 à 88% à 5.0  $\mu\text{M}$ ). Ces résultats indiquent que la surface des gouttes était saturée entre 3 et 5  $\mu\text{M}$  d'anticorps pour les deux tensioactifs, ce qui correspond à une quantité de 135 à 225 attomoles d'anticorps/goutte. Cette expérience a été reproduite en diluant le tensioactif à 1.0%, et aucune différence n'a été observée, indiquant un nombre similaire d'azotures accessibles pour une dilution de 1 ou 2.5% de tensioactif.

Ces résultats semblent indiquer qu'avec des anticorps-DBCO et les tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** synthétisés, le nombre de groupements azotures par têtes hydrophiles au-delà de deux n'influence pas l'ordre de grandeur de concentration maximale d'anticorps greffables en surface des gouttes. Ces résultats montrent également que la surface greffée dans l'immunoessai précédemment développée (partie 0 ne représente que 10-15% de la surface fonctionnalisable disponible.

Cette stratégie de fonctionnalisation de surface pourrait ainsi être utilisée pour réaliser simultanément la détection de plusieurs protéines différentes. Pour cela, différents anticorps de capture pourraient être greffés en surface, capturant ainsi différentes protéines cibles. La relocalisation des anticorps secondaires de détection permettrait ensuite d'identifier la présence simultanée ou non des analytes.

### *3.2.2. Saturation de la surface des gouttes avec des sondes moléculaire DBCO*

Afin d'évaluer si la masse et l'encombrement du composé greffé en surface joue sur la limite de saturation, une sonde moléculaire DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5 **35** a été synthétisée. Une disulfocyanine-5 sous forme d'acide carboxylique **34** a été activée par un agent de couplage (hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy)méthaniminium, HATU) et couplée par liaison peptidique à une molécule de DBCO-

PEG<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (Figure 66). La sonde **35** a été obtenue avec une pureté de 96-97% (déterminée par HPLC). Cette sonde moléculaire fait environ 1100 g/mol, soit environ 1/140 de la masse molaire d'un anticorps conjugué (~150 000 g/mol).

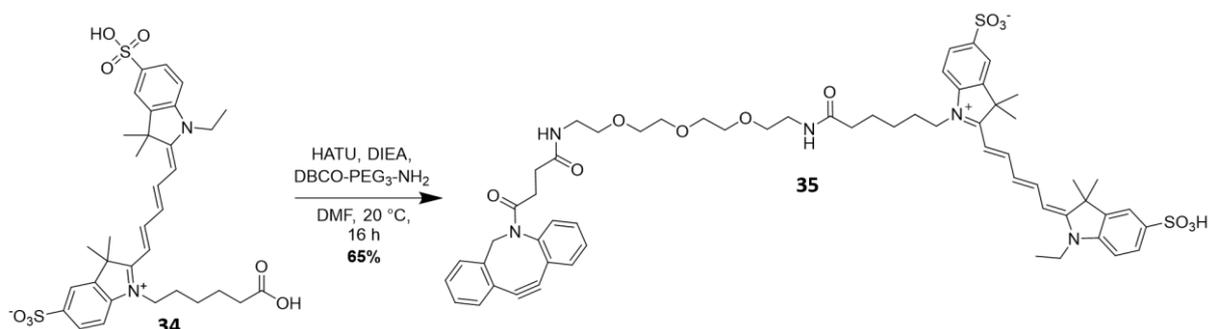


Figure 66: Synthèse de la sonde DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5 **35**

Nous avons étudié le greffage de la sonde à 0,4 ; 1 ; 5 et 10  $\mu$ M avec les trois tensioactifs synthétisés, en appliquant les mêmes conditions que les essais réalisés avec les anticorps-DBCO (Figure 67 et Figure 68). Les impuretés trouvées dans la sonde (3-4%) ont été visibles sur les images confocales, abaissant le R.I en dessous de 30 et le paramètre de relocalisation autour de 95% dès 0.4  $\mu$ M de sonde avec les trois tensioactifs testés. Les images confocales ont montré pour les trois tensioactifs une diminution du pourcentage de relocalisation dans les gouttes entre 1 et 5  $\mu$ M, avec un paramètre de relocalisation qui est passé de 93-94% (pour les trois tensioactifs) à 74% pour le monoN<sub>3</sub> **1** ou 83-84% pour les di et tétraN<sub>3</sub> **2** et **3**. Cette chute a continué de 5 à 10  $\mu$ M, condition pour laquelle le paramètre de localisation est descendu à moins de 70% pour les trois tensioactifs. Ces résultats correspondent à une saturation de la surface et une augmentation du nombre de sondes moléculaires libres dans les gouttes. La concentration saturante de sonde moléculaire DBCO pour les trois tensioactifs, indépendamment du nombre d'azotures présentés sur leurs têtes hydrophiles, était donc de l'ordre de 1 à 5  $\mu$ M. Cet ordre de grandeur est similaire à obtenu pour les anticorps-DBCO (3 à 5  $\mu$ M) discuté précédemment.

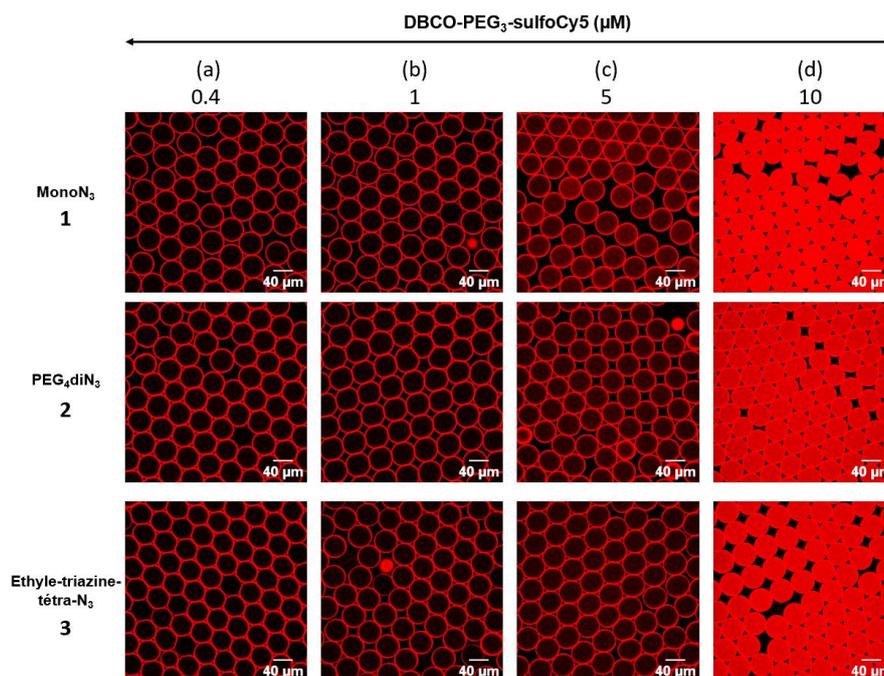


Figure 67: Saturation de la surface des gouttes par une sonde DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5. Des gouttes de 45  $\mu$ L sont stabilisées par les tensioactifs 1, 2 ou 3 (2.5% dans de l'HFE 7500) et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5 (1 à 10  $\mu$ M).

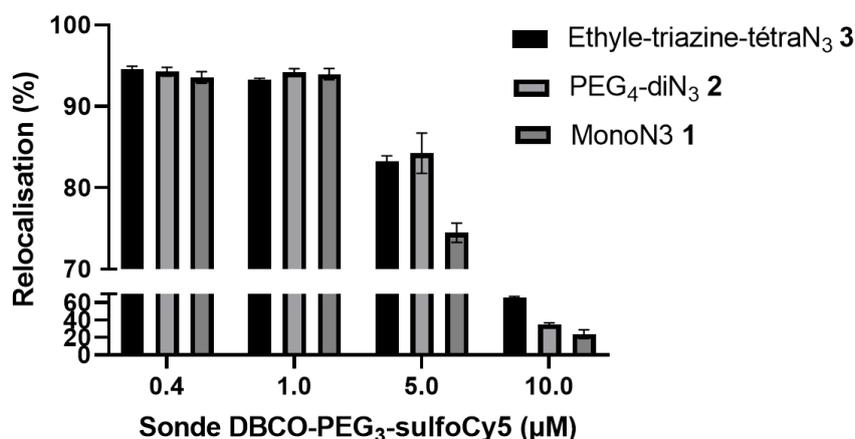


Figure 68: Relocalisation de la sonde sulfoCy5 à la surface des gouttes

Au vu de ces données, il semble donc que dans ces conditions, ni la nature/taille du composé greffé en surface, ni le nombre d'azotures (deux ou quatre) présentés par les têtes hydrophiles des tensioactifs n'ont d'influence marquée sur la limite de saturation de la surface des gouttes. La saturation de surface pourrait donc être limitée par le nombre d'azotures accessibles et disponibles pour effectuer des réactions de SPAAC. Des études plus poussées, par exemple par polarisation de la lumière sont une piste envisageable pour vérifier cette hypothèse.

### 3.3. Etude de l'influence de la structure des têtes hydrophiles des tensioactifs sur la fonctionnalisation de surface

Une famille de tensioactifs diazotures a été synthétisée pour évaluer l'influence de la structure de la tête hydrophile des tensioactifs sur la stabilisation et le greffage à l'interface des gouttes.

#### 3.3.1. Structure générale des tensioactifs synthétisés

Le design des tensioactifs est issu des travaux présentés dans le chapitre précédent, avec une structure en trois parties : une partie PFPE, une partie diPEG-azoture et un connecteur entre ces deux parties. Nous avons choisi de faire varier la nature et longueur du connecteur, en conservant les deux autres parties communes (Figure 69, A). Tous les connecteurs, à l'exception du connecteur Ethyle-triazine, ont présenté à leurs deux extrémités une amine (pour couplage à la chaîne PFPE) et un acide carboxylique (pour couplage au synthon diPEG-N<sub>3</sub>) (Figure 69, B). Les synthèses de la partie diPEG-N<sub>3</sub> et des têtes hydrophiles avec le connecteur PEG<sub>4</sub> et Ethyle-triazine ont été décrites dans le chapitre précédent (voir 3).

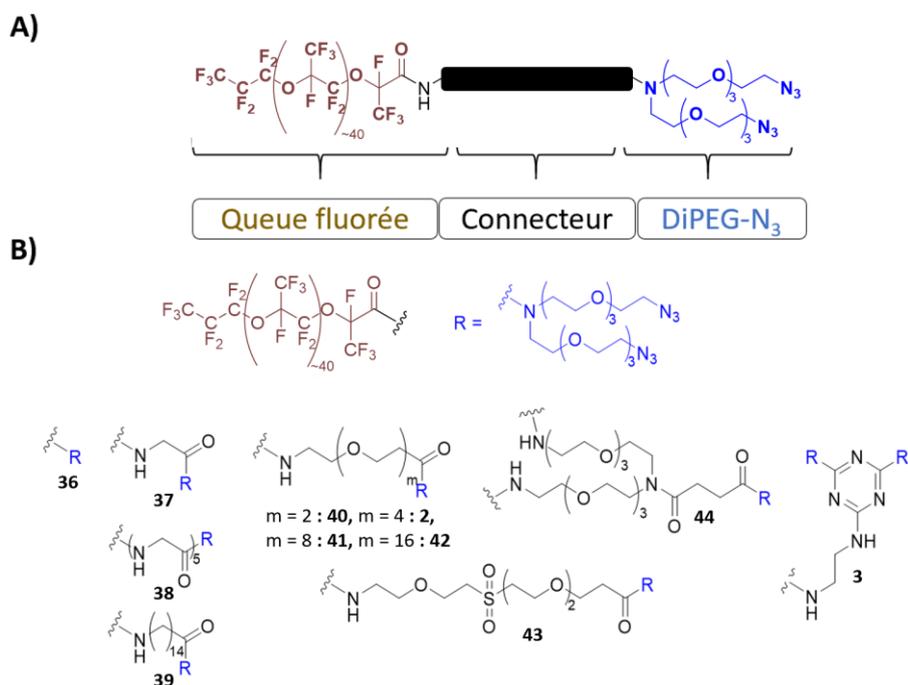


Figure 69: A) Structure communes aux tensioactifs pré-fonctionnalisés ; B) Structure des différents connecteurs des tensioactifs.

- Nous avons tout d'abord produit une tête hydrophile sans connecteur, avec le synthon diPEG-N<sub>3</sub> directement couplé à la queue fluorophile (Figure 69, B, **36**).

- Puis un connecteur glycine a été utilisé, afin d'obtenir une tête hydrophile un connecteur très compact (Figure 69, B, **37**).
- La longueur du connecteur hydrophile a ensuite été allongée en utilisant des PEG de deux à seize unités (Figure 69, B, **40, 2, 41, 42**).

Comme cela a été décrit dans l'introduction (partie 3.3.2), les structures de types PEG sont largement utilisés pour produire des tensioactifs fluorés,<sup>181</sup> et les travaux d'Etienne *et al.* sur les tensioactifs dibloc ont montré que l'augmentation de la longueur du PEG permettait d'améliorer la stabilité des émulsions.<sup>174</sup>

- Par la suite, un connecteur de même taille que le connecteur PEG<sub>4</sub> avec un des oxygènes substitués par un groupement sulfone a été synthétisé (Figure 69, B, **43**).

L'objectif de ce connecteur a été d'introduire une variation de structure et un nouveau groupement dans le connecteur sans toucher à sa taille. Cette stratégie a notamment été employée précédemment dans la synthèse de tensioactifs fluorés.<sup>205</sup>

Plusieurs tensioactifs utilisés dans la littérature présentent également des têtes polaires mixtes, dans lesquels des motifs non hydrophiles sont retrouvés (PPG-PEG).<sup>174,210</sup> Ainsi, afin d'évaluer l'impact de la nature hydrophile/hydrophobe du connecteur sur la stabilité et le greffage, des connecteurs hydrophobes ont été utilisés.

- D'une part un connecteur composé d'une chaîne alcane de quinze carbones (présentant un nombre d'atomes similaire au connecteur PEG<sub>4</sub>) (Figure 69, B, **39**).
- D'autre part un connecteur pentaglycines (acides aminés), formant un connecteur plus rigide et portant des groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène (Figure 69, B, **38**). Ce connecteur présentait également un nombre d'atomes similaire au connecteur PEG<sub>4</sub> et au connecteur alcane.
- Le connecteur éthyle-triazine, avec un cœur cyclique aromatique, a été également utilisé afin d'observer l'effet d'un cœur central non linéaire et rigide (Figure 69, B, **3**).
- En plus de ces connecteurs utilisés pour la synthèse de têtes hydrophiles de tensioactifs dibloc, un connecteur diPEG<sub>4</sub> a été synthétisé (Figure 69, B, **44**), pour obtenir un tensioactif tribloc diN<sub>3</sub> avec une taille de connecteur similaire au connecteur PEG<sub>4</sub>.

Ce connecteur a été utilisé afin de comparer un tensioactif tribloc et un tensioactif dibloc présentant la même géométrie de tête polaire, et une masse de tête hydrophile similaire.<sup>181</sup>

### 3.3.2. Synthèse des têtes hydrophiles à connecteurs PEGs

#### 3.3.2.1. Tête hydrophile PEG<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub>

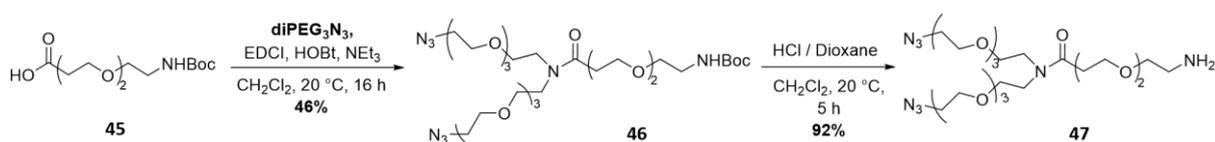


Figure 70: Synthèse de la tête PEG<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub> 47

La synthèse de la tête hydrophile PEG<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub> 47 a été effectuée par l'activation et le couplage d'un acide carboxylique *N*-Boc-amido-PEG<sub>2</sub> 45 avec un synthon diPEG-N<sub>3</sub> 11, suivi de la déprotection de l'amine terminale pour obtenir la tête hydrophile 47 avec un rendement de 42% sur deux étapes (Figure 70).

#### 3.3.2.2. Tête hydrophile PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub>

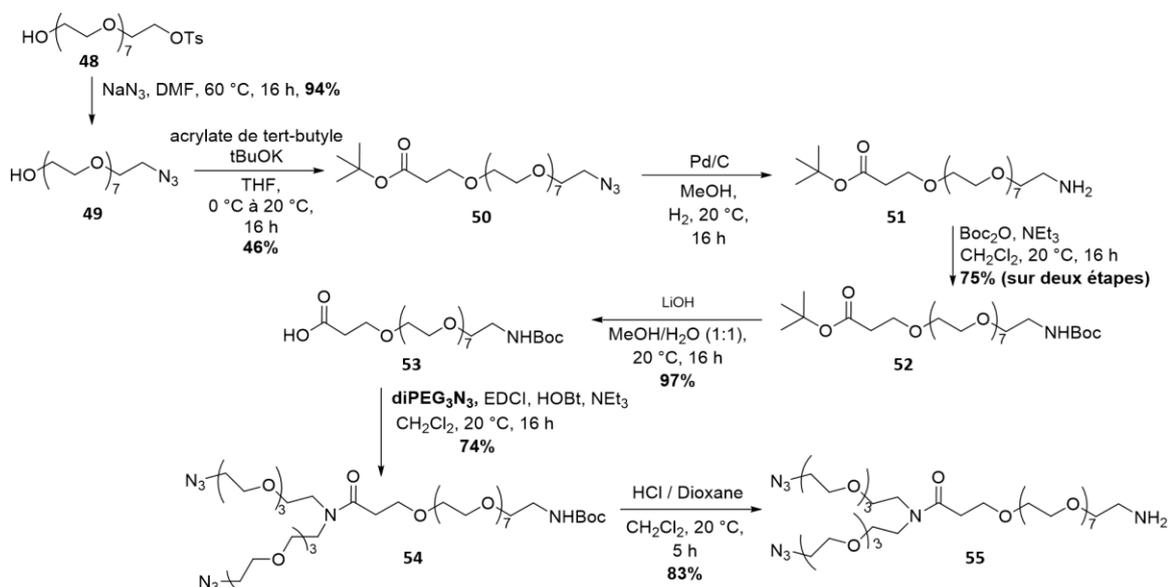


Figure 71: Synthèse de la tête PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub> 55

La synthèse de la tête hydrophile PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub> 55 a débuté à partir de l'intermédiaire 48, formé par monotosylation d'un PEG<sub>8</sub>. Une première étape de substitution du groupement tosylé par un azoture a permis l'obtention de l'intermédiaire 49 avec un rendement de 94%. Puis une étape d'addition d'*oxa*-Michael avec un acrylate de *tert*-butyle a permis d'obtenir

l'intermédiaire **50** avec un rendement de 46%. L'azoture a ensuite été réduit en amine primaire par hydrogénation catalytique, directement suivie d'une protection de l'amine par un groupement Boc, avec un rendement sur deux étapes de 75%. L'ester *tert*-butylique **52** a ensuite été clivé, et le connecteur PEG<sub>8</sub> **53** obtenu a été couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**, pour obtenir l'intermédiaire **54**. Enfin, l'amine terminale a été déprotégée en milieu acide pour obtenir la tête hydrophile **55** avec un rendement global de 19% sur sept étapes (Figure 71).

### 3.3.2.3. Tête hydrophile PEG<sub>16</sub>-diN<sub>3</sub>

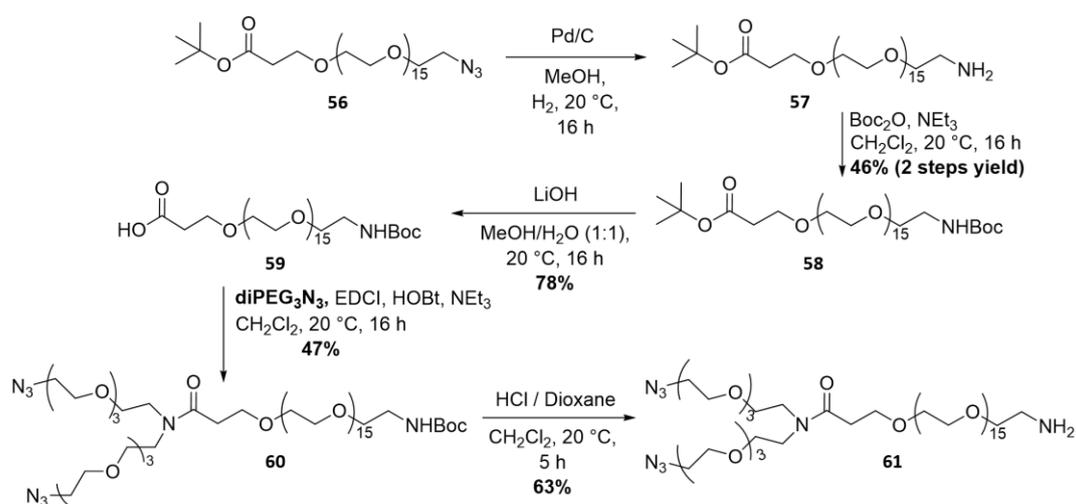


Figure 72: Synthèse de la tête PEG<sub>16</sub>-diN<sub>3</sub> **61**

La tête hydrophile PEG<sub>16</sub>-diN<sub>3</sub> **61** a été synthétisée suivant la même voie de synthèse que la tête PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub> **55**. L'azoture de l'intermédiaire *tert*-butyle-PEG<sub>16</sub>-azoture **56** a été réduit par hydrogénation catalytique, et l'amine obtenue a été protégée par un groupement Boc. L'ester *tert*-butylique **58** a ensuite été clivé pour obtenir l'acide carboxylique **59**, qui a été couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**. L'amine *N*-Boc de l'intermédiaire **60** résultant a finalement été déprotégée en milieu acide pour obtenir la tête hydrophile **61** avec un rendement global de 11% sur cinq étapes (Figure 72).

### 3.3.3. Synthèse des têtes hydrophiles à connecteurs hydrophobes

#### 3.3.3.1. Tête hydrophile Glycine-diN<sub>3</sub>

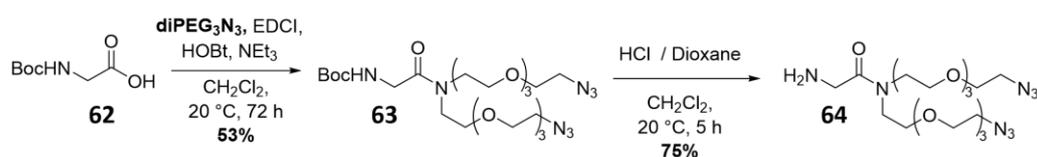


Figure 73: Synthèse de la tête Gly-diN<sub>3</sub> **64**

La tête hydrophile Gly-diN<sub>3</sub> **64** a été obtenue par le couplage d'une *N*-Boc-Glycine **62** au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**, suivi de la déprotection de l'amine pour obtenir la tête hydrophile correspondante **64** avec un rendement de 40% sur deux étapes (Figure 73).

### 3.3.3.2. Tête hydrophile pentadecanamide-diN<sub>3</sub>

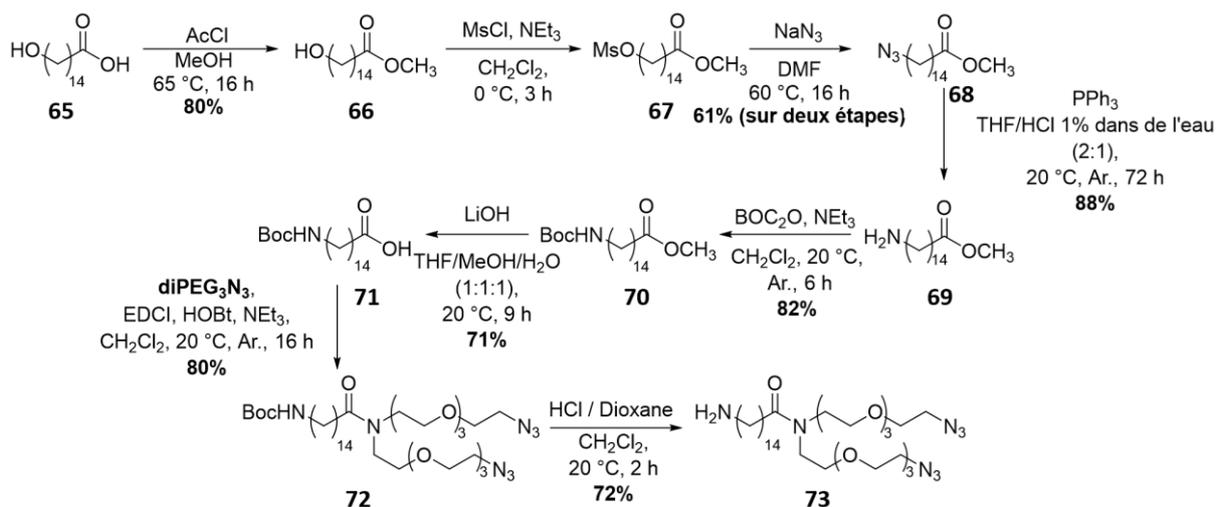


Figure 74: Synthèse de la tête Pentadecanamide-diN<sub>3</sub>

La synthèse de la tête hydrophile contenant le connecteur alcane **73** a commencé à partir de l'acide 15-hydroxypentadecanoïque **65**. L'acide carboxylique a été protégé sous forme d'ester méthylique **66**,<sup>252</sup> puis l'alcool a été activé et substitué par un azoture pour obtenir l'intermédiaire **68**.<sup>253</sup> L'azoture a ensuite été réduit en amine primaire par la réaction de Staudinger<sup>254</sup> et l'amine **69** protégée par un groupement Boc. L'ester méthylique **70** a ensuite été saponifié, et l'acide carboxylique **71** résultant couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**. Enfin, la déprotection de l'amine a permis d'obtenir la tête hydrophile **73** avec un rendement global de 20% sur huit étapes (Figure 74).

### 3.3.3.3. Synthèse de la tête hydrophile pentaglycine-diN<sub>3</sub>

La tête hydrophile pentaglycine-diN<sub>3</sub> **78** a été obtenue par synthèse peptidique sur support solide manuelle (Solide-Phase Peptid Synthesis, SPPS) en utilisant la stratégie de protection Fluorénylméthoxycarbone (Fmoc).<sup>255</sup>

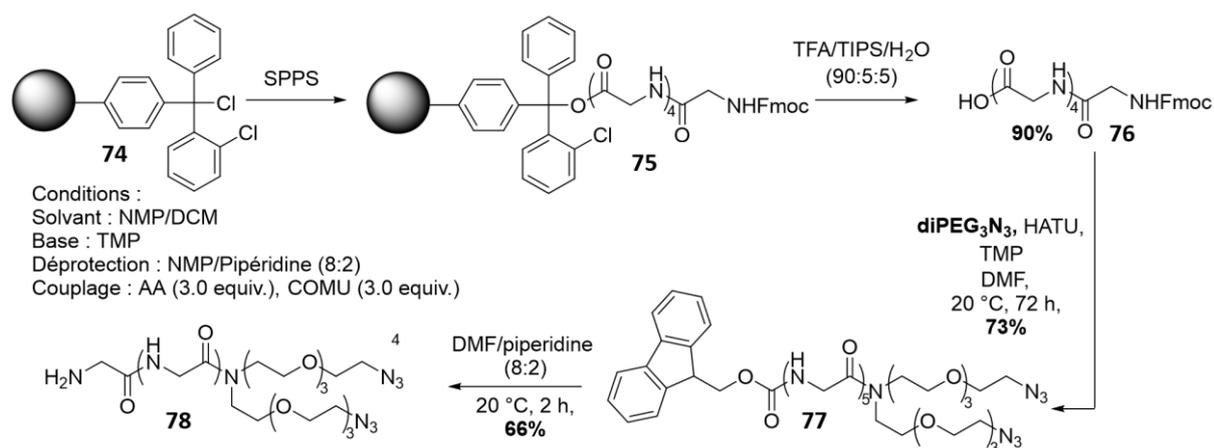


Figure 75: Synthèse de la tête Pentaglycine-diN<sub>3</sub> **78**

Cette synthèse a consisté à réaliser l'élongation du peptide en accrochant un premier acide aminé (AA) *N*-Fmoc sur une résine par son acide carboxylique (Cter), puis en déprotégeant l'amine de l'AA, suivi de l'apport de l'AA suivant activé par un agent de couplage. Une fois l'élongation terminée, la liaison au support est clivée pour récupérer le peptide. Les glycines ne portant pas de groupements protecteurs sur leur chaînes latérales, la synthèse a pu être réalisée sur une résine à clivage acide (2-chlorotrityl) **74**, permettant des conditions de déprotection Fmoc (basiques) des AA orthogonales aux conditions de clivage (acides) de la résine. Cette stratégie a permis l'obtention du peptide *N*-Fmoc-pentaglycine **76** avec un rendement de 90%. Ce peptide a ensuite été activé et couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11** pour obtenir l'intermédiaire **77**. La tête hydrophile pentaglycine-diN<sub>3</sub> **78** a ensuite été obtenue par déprotection Fmoc de l'amine, avec un rendement global de 43% sur trois étapes (Figure 75).

### 3.3.4. Synthèse de la tête hydrophile Sulfone-diN<sub>3</sub>

La synthèse du connecteur sulfone a commencé par la *N*-protection d'une éthanoline **79** par un groupement Boc, pour obtenir l'intermédiaire **80**. Cet intermédiaire a été ensuite additionné sur une divinylsulfone par *oxa*-Michael en utilisant la 4-Diméthylaminopyridine (DMAP) comme nucléophile relais, pour obtenir l'intermédiaire **81**.<sup>256</sup> En parallèle, un tBu-PEG<sub>2</sub> **83** a été synthétisé par *oxa*-Michael avec addition d'un éthylène glycol **82** sur un acrylate de *tert*-butyle. Ce tBu-PEG<sub>2</sub> **83** a ensuite été additionné *via* une autre réaction d'*oxa*-Michael sur l'intermédiaire **81**, en utilisant cette fois la triphénylphosphine (PPh<sub>3</sub>) comme nucléophile relais. L'ester *tert*-butylique du PEG-sulfone-PEG **84** ainsi obtenu a ensuite été clivé et l'acide

carboxylique correspondant **85** a été couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**. Enfin, l'amine a été déprotégée pour obtenir la tête hydrophile **87** avec un rendement global de 7% sur six étapes (Figure 76).

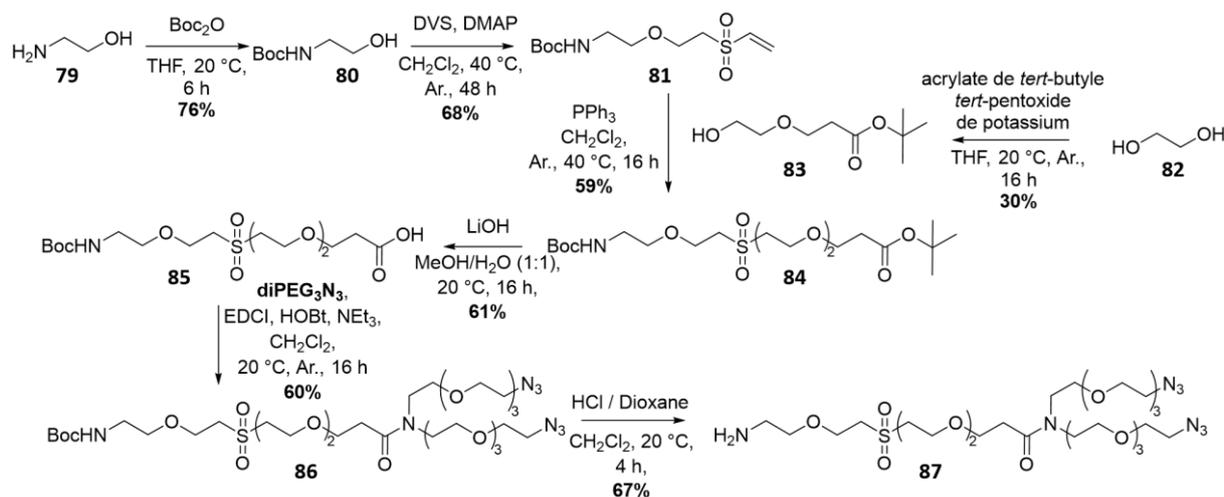


Figure 76: Synthèse de la tête Sulfone-diN<sub>3</sub> **87**

### 3.3.5. Synthèse de la tête hydrophile (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub>

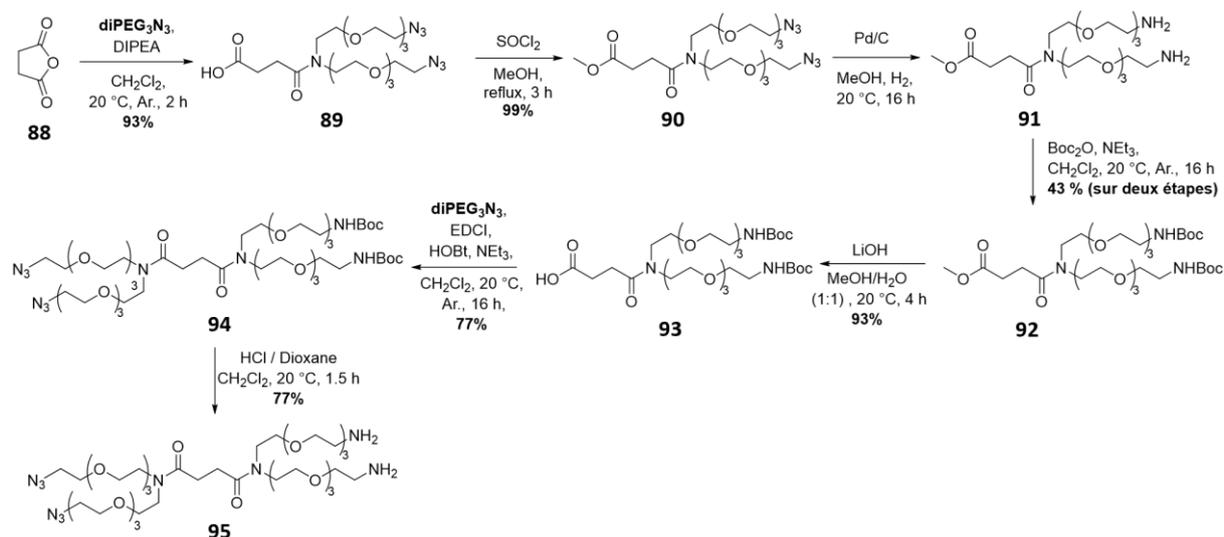


Figure 77: Synthèse de la tête Tribloc (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub>

La dernière tête hydrophile synthétisée **95** a été conçue pour pouvoir se coupler à deux queues fluorées, par le biais de deux amines terminales. La synthèse de cette tête hydrophile s'est effectuée par l'attaque d'un anhydride succinique **88** par le synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11** pour former l'intermédiaire **89**. L'acide carboxylique de l'intermédiaire formé **89** a ensuite été

protégé sous la forme d'un ester méthylique **90**. Les deux azotures de l'intermédiaire formé ont ensuite été réduits par hydrogénation catalytique et les amines obtenues ont été protégées par des groupements Boc. L'ester méthylique **92** a ensuite été saponifié, et l'acide carboxylique **93** a été couplé au synthon diPEG-N<sub>3</sub> **11**. Les deux amines ont finalement été déprotégées en condition acide pour obtenir la tête hydrophile **95** avec un rendement global de 22% sur six étapes.

### 3.3.6. Synthèse des tensioactifs

#### 3.3.6.1. Tensioactifs dibloc

La synthèse et la caractérisation de la pureté des tensioactifs diblock se sont effectuées suivant la même procédure que pour les tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et Ethyle-triazine-tétraN<sub>3</sub> **3** détaillée précédemment, en utilisant un excès de tête hydrophile (2 à 3 équivalents) pour favoriser le couplage avec la partie fluorée. Cette méthode a permis l'obtention des différents tensioactifs avec un taux de couplage de 80 à 100%. La synthèse du tensioactif sans connecteur a été plus compliquée, nécessitant cinq équivalents de tête hydrophile pour atteindre un couplage d'environ 90% (partie expérimentale).

Le tensioactif avec la tête hydrophile pentaglycine-diN<sub>3</sub> **78** n'a pas pu être obtenu. Les conditions classiques de couplage n'ont pas permis la solubilisation de la tête hydrophile. D'autres mélanges de solvant ont été utilisés, permettant de solubiliser la tête hydrophile, mais aucun tensioactif n'a été isolé après traitement (Tableau 6). Les raisons de l'absence de couplage n'ayant pas pu être élucidées, la synthèse de ce tensioactif n'a pas été poursuivie.

Tableau 6 : Conditions de couplage testées pour la synthèse du tensioactif pentaglycine-diN<sub>3</sub>

Equivalents de tête polaire	Solvants	Observation	Résultat
2.5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /HFE7100 (2:1)	Précipitation	Aucun couplage
2.5	DMF/HFE7100 (2:1)	Solution limpide brune	Aucun couplage
2.5	CHCl <sub>3</sub> /HFE7100 (2:1)	Solution limpide brune	Aucun couplage

### 3.3.6.2. Tensioactifs Tribloc

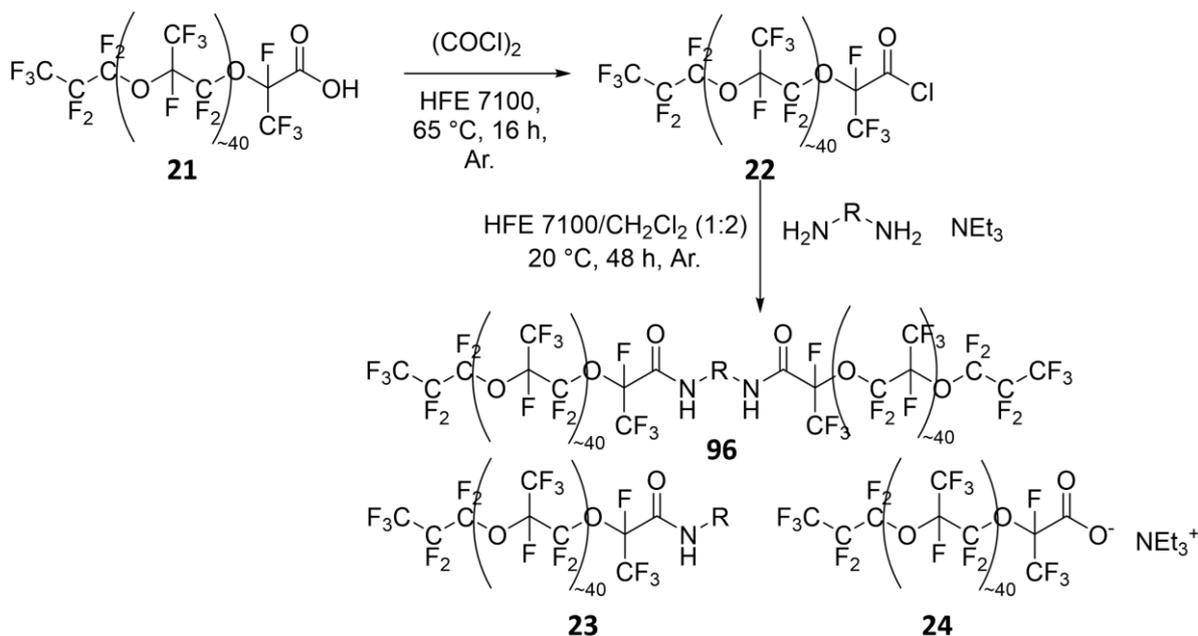


Figure 78 : Synthèse des tensioactifs tribloc

Lors de la réaction de couplage pour former des tensioactifs tribloc, il n'est pas possible d'utiliser un excès de tête hydrophile, une tête hydrophile doit réagir avec deux queues fluorées. Il est donc nécessaire d'utiliser un ratio de queue fluorée par tête hydrophile autour de 2:1. Ainsi trois produits peuvent se former : le tensioactif tribloc, le tensioactif dibloc, obtenu lorsqu'une seule des deux amines de la tête hydrophile a réagi avec une queue fluorée, et la queue fluorée carboxylate (Figure 78).<sup>179,183,204</sup>

Différentes conditions ont été testées en variant les équivalents de tête hydrophile (tableau 7), dans le but de favoriser le bis-couplage tout en limitant la formation de queue fluorée carboxylate. Le taux de couplage, déterminé par RMN du fluor, a permis d'identifier le ratio d'amide/carboxylate des tensioactifs produits.

Tableau 7: Optimisation de la synthèse de triblock fonctionnalisé

Equivalents de tête hydrophile	Equivalents de queue fluorée	C.E (RMN <sup>19</sup> F)
0.55 (correspondant à 1.10 équivalents d'amine)	1.00	70-75%
0.65 (correspondant à 1.30 équivalents d'amine)	1.00	81%
0.80 (correspondant à 1.60 équivalents d'amine)	1.00	90%

Les travaux effectués pour l'optimisation de la synthèse des tensioactifs tribloc ont montré qu'en augmentant les équivalents molaires de tête hydrophile, la réaction de couplage est favorisée, permettant d'atteindre un ratio d'amide/carboxylate de 9:1 pour 0.80 équivalents de tête polaire, et diminuant ainsi fortement la fraction de queue fluorée anionique dans le lot de tensioactif. Cependant, comme évoqué dans la partie sur la caractérisation des tensioactifs (IV) 4.3.3), la proportion de tribloc et de dibloc n'a pas été identifiée. Il est probable que selon les conditions, les proportions de tribloc et de dibloc obtenus ne soient pas identiques, et que ces variations jouent sur les propriétés de ces tensioactifs.

#### 3.4. Etude de l'influence du connecteur sur l'efficacité de la SPAAC en surface de gouttes

Le premier paramètre évalué sur ces tensioactifs a été leur capacité à relocaliser en surface des anticorps. Pour cela, des gouttes de 45 pL ont été produites avec une phase aqueuse contenant 400 nM d'anticorps-DBCO-sulfoCy5 (DOC 5.0) et une phase fluorée contenant les différents tensioactifs dilués à 2.5% dans de l'HFE7500. Les gouttes ont été collectées et observées après 1 h à température ambiante (Figure 79), et l'index de relocalisation a ainsi pu être calculé pour chaque condition (Figure 80). Afin de valider que la relocalisation des anticorps soit bien due au greffage, des contrôles négatifs ont été réalisés en utilisant des anticorps sans DBCO (annexe, Figure 89). Aucune relocalisation n'a été observée dans ces

expériences contrôles quel que soit le tensioactif étudié, indiquant une absence de relocalisation aspécifique des anticorps.

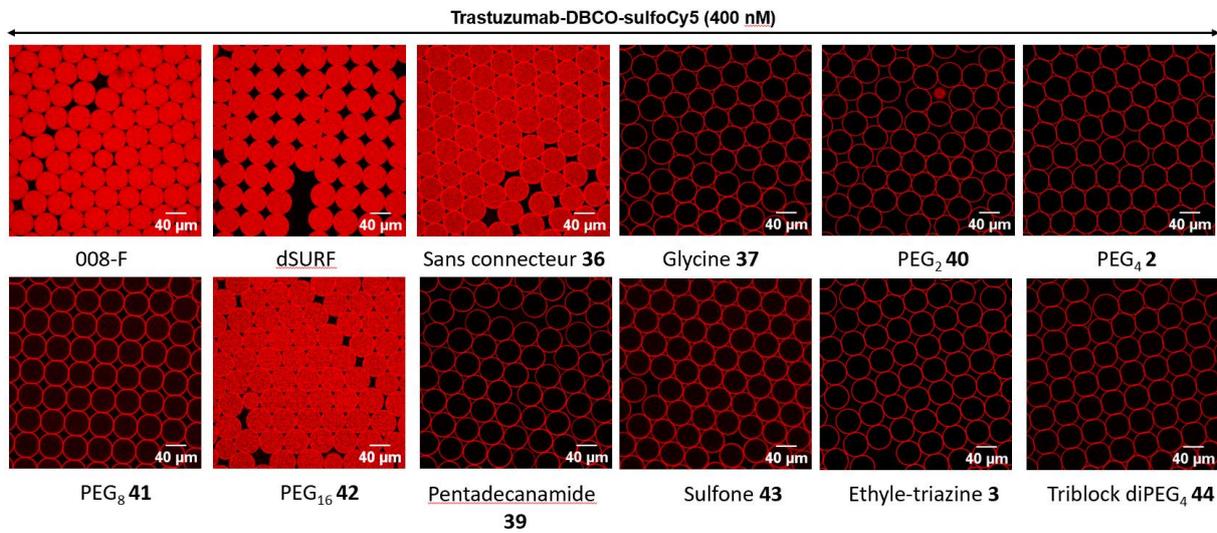


Figure 79: SPAAC en surface de gouttes selon les tensioactifs pré-fonctionnalisés. Des gouttes de 45 µL contenant 400 nM d'anticorps et stabilisées par les différents tensioactifs pré-fonctionnalisés ou contrôles non fonctionnalisés (008-F, dSURF) (2.5% dans de l'HFE 7500) sont produites, incubées 1-1.5 h et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (400 nM).

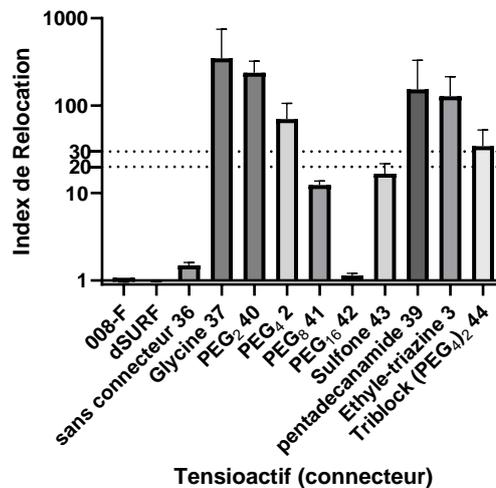


Figure 80: Index de relocation (R.I.) des tensioactifs avec 400 nM de Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5.

Ces expériences ont permis d'identifier trois catégories de tensioactifs. La première catégorie a présenté une fluorescence homogène dans les gouttes, indiquant une absence de relocalisation des anticorps en surface, et un R.I. ~1. Cette catégorie est composée des tensioactifs non fonctionnalisés : le 008-F (Ran Biotechnologies) et le dSURF (Fluigent), indiquant une absence de relocalisation aspécifique des anticorps-DBCO ; ainsi que des tensioactifs avec les connecteurs PEG<sub>16</sub> 42 et le tensioactif sans connecteur 36.

La deuxième catégorie présente une relocalisation partielle des anticorps en surface, avec un R.I compris entre 10 et 20. On y retrouve le tensioactif avec le connecteur PEG<sub>8</sub> **41**, ayant un R.I ~12-14 et le tensioactif avec le connecteur Sulfone **43** avec un R.I d'environ 16-20.

Enfin la dernière catégorie comprend les tensioactifs présentant une fluorescence complètement relocalisée en surface, caractérisés par un R.I > 30. Elle comprend les tensioactifs avec les connecteurs Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, PEG<sub>4</sub> **2**, Pentadecanamide **39**, Ethyle-triazine **3** et le tensioactif Tribloc ayant un connecteur (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub> **44**.

Le R.I diminue progressivement lors de l'augmentation du nombre d'unités PEG des connecteurs (PEG<sub>2</sub> **40** à PEG<sub>16</sub> **42**, Figure 80), avec des valeurs de R.I supérieures à 30 pour les connecteurs PEG<sub>2</sub> **40** et PEG<sub>4</sub> **2**, à ~14 pour le PEG<sub>8</sub> **41** et ~1 pour le PEG<sub>16</sub> **42**. Cela montre que l'utilisation d'un long connecteur PEG empêche complètement le greffage d'avoir lieu. Le connecteur (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub> du tensioactif tribloc diN<sub>3</sub> **44** permet une bonne efficacité de greffage (R.I > 30), comme attendu au vu de la taille du connecteur.

Les chaînes PEG sont connues pour pouvoir former des brosses denses au niveau des surfaces fonctionnalisées, en fonction de leur longueur et de leur densité de greffage, et le repliement des chaînes peut conduire à bloquer l'accessibilité des fonctions réactives par encombrement stérique ou en les dissimulant dans ces brosses.<sup>181,197,198,257-259</sup> Au vu des résultats obtenus, il est donc probable que plus le connecteur est long, plus l'interface PEG est dense, et moins les groupements azotures sont accessibles, limitant l'efficacité du greffage.

Il est intéressant de noter que le simple ajout d'un court connecteur (comparaison entre le tensioactif sans connecteur **36**, le tensioactif avec le connecteur glycine **37** et le tensioactif avec le connecteur PEG<sub>2</sub> **40**, Figure 80) a permis de passer d'une absence de greffage (sans connecteur **36**, R.I ~1) à un greffage complet (Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, R.I supérieur à 30). Il semble donc nécessaire d'avoir un espacement minimal entre la partie fonctionnalisée et l'interface pour initier le greffage.

**Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que dans la série de connecteurs PEG, les plus efficaces pour induire un greffage d'anticorps sont les connecteurs PEG<sub>2</sub> 40 et PEG<sub>4</sub> 2.**

Le greffage complet obtenu avec le connecteur Pentadecanamide **39**, similaire au connecteur PEG<sub>4</sub> **2**, confirme également que la nature du connecteur (hydrophile/hydrophobe) n'impacte pas l'efficacité du greffage à taille similaire.

Le connecteur cyclique éthyle-triazine **3**, quant à lui, permet également un greffage complet. Ce résultat indique que ce connecteur cyclique rigide ne provoque pas de gêne stérique pouvant empêcher la réaction de SPAAC à la surface des gouttes.

L'ensemble de ces données permet d'identifier que le paramètre principal influençant l'efficacité de la SPAAC est la taille du connecteur dans cette étude. Une taille minimale de connecteur est nécessaire, mais au vu des résultats, il existe également une taille maximale, notamment pour les connecteurs hydrophiles comme montré par la série des PEG. Ces bornes limitent les variations de taille possible pour le design de nouveaux connecteurs et têtes hydrophiles.

Du fait de la limitation de taille déterminée, autour du PEG<sub>4</sub> **2**, les variations possibles sur les générations suivantes de connecteurs peuvent consister en l'inclusion d'hétéroatomes (comme des soufres) pouvant conduire à des connecteurs avec des caractères polaires modulables (le soufre pouvant être présent sous forme de thioéther, sulfoxyde ou sulfone, différents états d'oxydation)<sup>205</sup> ou en synthétisant des connecteurs de nature mixte (hydrophile/hydrophobe), pour se rapprocher de structure type Jeffamine®.

Un nouveau connecteur développé à partir de ces résultats a été le connecteur Sulfone **43**, qui a présenté une efficacité de greffage entre le PEG<sub>4</sub> **2** et le PEG<sub>8</sub> **41** (Figure 79 et Figure 80). Afin de déterminer précisément pourquoi le greffage est moins bon que pour le connecteur PEG<sub>4</sub> **2**, il serait nécessaire de développer de nouveaux connecteurs. Synthétiser le même connecteur avec un thioéther à la place de la sulfone pourrait permettre d'identifier si la substitution de l'oxygène ou l'état d'oxydation du soufre (thioéther, sulfoxyde, sulfone) impacte le greffage. De même, varier le positionnement de la sulfone sur le connecteur pourrait permettre de mieux comprendre les résultats obtenus.

Un autre axe de développement pour de nouvelles générations de tensioactifs capables de fonctionnaliser la surface des gouttes pourrait être de varier la partie terminale portant les azotures, en remplaçant les chaînes PEG<sub>3</sub> par des chaînes PEG de taille différente, par exemple plus courtes. Des chaînes PEG trop longues pourraient entraîner la même perte de greffage que l'on observe avec les longs connecteurs. Le dimère PEG pourraient également être remplacé par des chaînes moins hydrophiles (alcanes), afin d'évaluer si le placement de la partie hydrophobe sur la tête hydrophile peut impacter le greffage (Figure 81). De même,

d'autres motifs hydrophiles pourraient être utilisés, pour les connecteurs et pour la partie terminale, comme des dérivés de glycérols, pouvant facilement incorporer des azotures par substitution de leurs alcools, et ayant déjà montré leur efficacité en tant que têtes hydrophiles de tensioactif.<sup>204</sup>

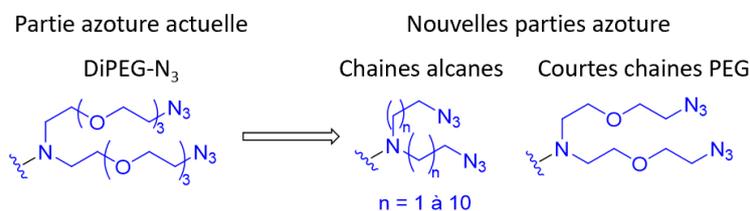


Figure 81 : Exemples de nouvelles parties terminale portant des azotures

#### 4. Etude Structure-stabilité des gouttes

Après avoir étudié les différents paramètres influençant l'efficacité de greffage en surface des gouttes, nous nous sommes intéressés à la stabilité des émulsions produites avec nos tensioactifs, ainsi qu'à l'effet du greffage sur la stabilité des gouttes.

##### 4.1. Etude de l'influence des têtes hydrophiles sur la stabilité des gouttes

###### 4.1.1. Méthodes d'études de la stabilité des émulsions

Différentes méthodes existent pour étudier et comparer les propriétés des tensioactifs utilisés en microfluidique en gouttes, notamment la mesure de l'abaissement de la tension superficielle à l'interface huile/phase aqueuse est un des paramètres les plus utilisés pour caractériser les tensioactifs.<sup>169,173,174,204</sup>

Les tensioactifs peuvent également être caractérisés et comparés sur leur efficacité à maintenir des émulsions et des gouttes intactes et homogènes.

La stabilité des gouttes formées peut être évaluée par l'observation visuelle des gouttes, au cours de la production ou après incubation, en analysant la dispersité de taille des gouttes. Il est également possible de faire une observation visuelle de l'état global des émulsions au cours du temps.<sup>179,181,192,200,205</sup>

La stabilité des gouttes peut également être évaluée en les soumettant à des contraintes thermiques ou mécaniques, pour entraîner un vieillissement accéléré des émulsions.

- Différentes méthodes existent pour évaluer la stabilité thermique de gouttes. Les émulsions peuvent ainsi être soumises à des cycles de PCR, ou des incubations à température constante jusqu'à 95 °C, suivi d'une observation visuelle de l'aspect des émulsions et/ou de la dispersité de taille des gouttes.<sup>180,183,260</sup> Une autre méthode utilisable est de soumettre les émulsions à des gradients croissants de température jusqu'à atteindre une coalescence totale des gouttes.<sup>174</sup>
- La stabilité mécanique des émulsions peut être évaluée par centrifugation, qui favorise la diminution du film d'huile entre les gouttes, la coalescence des gouttes et ainsi la séparation des phases. Après centrifugation, l'aspect des émulsions et/ou la dispersité de taille des gouttes peut être observée. Il est également possible d'appliquer un gradient croissant de centrifugation jusqu'à provoquer une coalescence totale des gouttes.<sup>174,261-265</sup> Une autre stratégie retrouvée dans la littérature consiste à appliquer une force physique sur des gouttes (comme une micro-aiguille) puis observer visuellement si celles-ci restent intactes ou coalesces.<sup>169</sup>

Les applications développées au sein du laboratoire pour nos tensioactifs ne nécessitent pas de chocs thermiques. Nous avons donc décidé d'évaluer en priorité la stabilité mécanique de nos gouttes. De plus, nous avons réalisé des mesures de l'abaissement de la tension superficielle par la méthode de la goutte montante.

#### *4.1.2. Mesure de la baisse de tension superficielle induite par les tensioactifs*

La mesure de l'abaissement de la tension superficielle des émulsions a été réalisée dans le laboratoire du Dr. Marie-Pierre Krafft, de l'Institut Charles Sadron à Strasbourg. Les mesures ont été réalisées par la méthode de la goutte montante. Des gouttes de 5 µL ont été produites en injectant une phase aqueuse de PBS dans une cellule de mesure contenant de l'huile HFE 7500. Les différents tensioactifs en solution dans de l'huile fluorée ont été injectés dans la cellule de mesure, entraînant l'adsorption à l'interface huile/phase aqueuse des molécules de tensioactifs. La diminution de la tension de surface jusqu'à l'atteinte d'un plateau a ainsi été mesurée (voir partie 3.2.2). Cet abaissement de tension superficielle a été mesuré avec les tensioactifs azotures, ainsi que le tensioactif dSURF (Fluigent), un tensioactif de référence commercial.

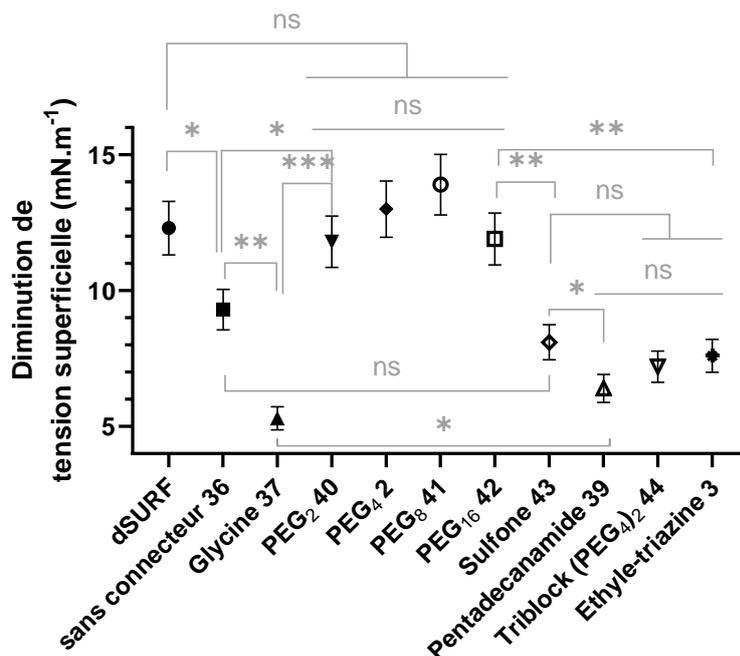


Figure 82: Mesures de l'abaissement de la tension superficielle entre une phase huileuse (HFE7500) et une phase aqueuse (PBS) selon les tensioactifs. Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Les résultats de cette série d'expériences ont permis de distinguer trois groupes de tensioactifs selon leur efficacité à diminuer la tension de surface.

Le premier groupe est composé du tensioactif commercial dSURF et des tensioactifs avec les connecteurs PEG (PEG<sub>2</sub> **40** à PEG<sub>16</sub> **42**). L'ensemble de ces tensioactifs a diminué la tension de surface de 10 à 15 mN.m<sup>-1</sup> par rapport à la tension entre la phase fluorée et la phase aqueuse en l'absence de tensioactif.

Le deuxième groupe est composé uniquement du tensioactif sans connecteur **36**, qui abaisse la tension de surface d'environ 9 mN.m<sup>-1</sup>.

Enfin Le dernier groupe est formé des tensioactifs avec les connecteurs Glycine **37**, Pentadecanamide **39**, Ethyle-triazine **3** et (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub> **44**, qui entraînent un abaissement moindre de la tension superficielle, entre 4 et 8 mN.m<sup>-1</sup> (Figure 82).

Les têtes hydrophiles PEG abaissent la tension superficielle de manière similaire au tensioactif commercial dSURF. Il est intéressant de constater qu'aucune différence significative de tension superficielle n'a été observée selon la longueur du connecteur PEG. En l'absence d'un connecteur, l'abaissement de tension superficielle est plus faible (tensioactif

**36**), suggérant qu'une taille minimale de connecteur est nécessaire pour abaisser la tension de surface. De plus, l'utilisation d'un court connecteur Glycine **37**, un acide aminé hydrophobe, n'a pas permis d'avoir un meilleur effet mais au contraire a entraîné un abaissement de la tension de surface encore plus faible qu'en l'absence de connecteur. Cela peut être lié à une gêne induite par la proximité des deux amides sur la tête polaire, ou par la structure du connecteur présentant des groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes spatialement proches, pouvant favoriser une conformation rigide des tensioactifs à l'interface des gouttes.

Les expériences ont également indiqué que la nature du connecteur influe sur la tension superficielle, avec la plus faible efficacité du connecteur linéaire hydrophobe pentadecanamide **39** par rapport à son équivalent hydrophile PEG<sub>4</sub> **2**. De même, le simple fait de remplacer l'un des oxygènes du connecteur PEG<sub>4</sub> **2** par une sulfone **43** a entraîné une perte d'efficacité du tensioactif. Cette différence entre le connecteur PEG<sub>4</sub> **2** et le connecteur sulfone **43** semble indiquer que des variations de structures peuvent drastiquement influencer l'efficacité des tensioactifs à diminuer la tension superficielle. Enfin le tensioactif avec le connecteur cyclique Ethyle-triazine **3** a présenté une efficacité comparable aux tensioactifs avec les connecteurs glycine **37** et pentadecanamide **39**, malgré une quantité totale de PEG deux fois plus importante. Comme pour le connecteur sulfone, cela semble indiquer que la nature du connecteur et la disposition des chaînes PEGs et joue sur les variations de tension de surface.

En ce qui concerne le tensioactif tribloc avec le connecteur diPEG<sub>4</sub> **44** (composé d'un mélange de tribloc, dibloc et queue fluorée carboxylate), la diminution de tension de surface a été plus faible que le tensioactif commercial dSURF, et que les dibloc PEG. Ce tribloc a pu être comparé avec le dibloc ayant un connecteur PEG<sub>4</sub> **2** (la longueur linéaire de la tête hydrophile comparable) et avec le dibloc ayant un connecteur PEG<sub>8</sub> **41** (la masse de la partie hydrophile est similaire à celle du connecteur triblock diPEG<sub>4</sub> **44**, environ 850 g.mol<sup>-1</sup>). Cette comparaison semble indiquer qu'à longueur ou masse de la tête hydrophile comparable, doubler la proportion de chaîne fluorée ne permettait pas d'avoir un meilleur abaissement de tension superficielle. Du fait du potentiel de variation de contenu des lots inhérent aux tribloc, en particulier le ratio dibloc/tribloc final, il serait nécessaire de reproduire ces mesures sur

différents lots, avec différents taux de couplage afin de valider ces résultats, ainsi que de tester individuellement chaque composant du mélange.

Pour cette série de tensioactifs, la nature du connecteur (hydrophile/hydrophobe) est un des principaux facteurs d'abaissement de la tension superficielle. De plus, la différence de tension de surface entre le connecteur PEG<sub>4</sub> **2** et sulfone **43** peut suggérer que la géométrie spatiale des têtes hydrophiles impacte leur capacité à abaisser la tension de surface, comme les travaux de Chowdhury et al. montrent, avec des tensions superficielles différentes obtenus entre les tensioactifs portant des têtes hydrophiles triglycérols de même composition, mais possédant une géométrie dendritique (14-15 mN.m<sup>-1</sup>) ou linéaire (18-19 mN.m<sup>-1</sup>).<sup>204</sup>

#### *4.1.3. Mesure de la stabilité mécanique des émulsions*

Pour comparer la stabilité des émulsions selon les tensioactifs utilisés, notre objectif a été de développer une méthode rapide à mettre en œuvre et efficace pour distinguer des différences de stabilité induites par les tensioactifs.

La stabilité des gouttes diminuant quand leur taille augmente,<sup>183,262</sup> nous avons produit des émulsions composées de gouttes de 100 pL, légèrement plus grande que le diamètre des gouttes de 45 pL utilisées précédemment (60 μm versus 45 μm). De plus, la concentration de tensioactif en solution a été abaissée à 1% (m/m), afin de favoriser la déstabilisation.<sup>160,168,209</sup>

Des gouttes de 100 pL encapsulant de la fluorescéine dans du PBS et stabilisées par les différents tensioactifs ont été produites, collectées pendant 20 minutes dans un tube Eppendorf contenant de l'HFE7500 et du PBS comme surnageant. L'émulsion collectée a ensuite été centrifugée. La quantification de la déstabilisation est effectuée en dosant la fluorescéine libérée dans le surnageant suite à la centrifugation (par mesure de l'absorbance à 490 nm du surnageant (PBS)). Les émulsions sont ensuite cassées par l'ajout de *1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-octanol*, conduisant à la séparation des deux phases (aqueuse et fluorée).<sup>3,266,267</sup> La mesure de fluorescence dans la phase aqueuse résultante permet de quantifier la fluorescéine totale, de calculer le pourcentage libéré après centrifugation, et donc donne une indication sur l'intégrité des émulsions après centrifugation (Figure 83).

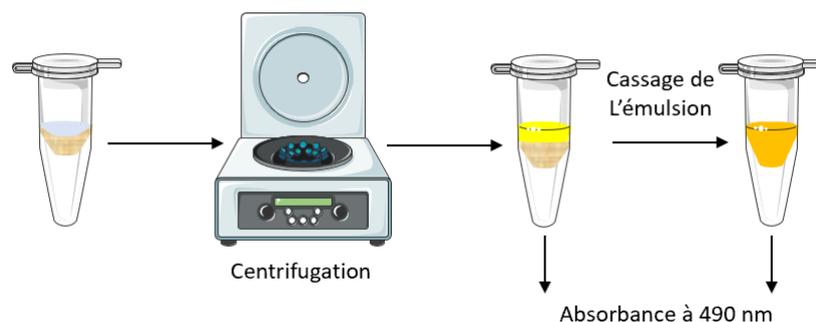


Figure 83: Schéma du protocole utilisé pour les mesures de stabilité des tensioactifs

Des observations visuelles d'émulsions stabilisées par le tensioactif Ethyle-triazine tétraN<sub>3</sub> **3** avait préalablement montré une instabilité plus importante des émulsions avec ce tensioactif par rapport au PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2**. Les essais initiaux de stabilité ont eu pour but de valider cette observation. Différentes stratégies de déstabilisation ont été employées lors de la mise au point de ces essais avec le tensioactif Ethyle-triazine tétraN<sub>3</sub> **3**, comme par exemple en soumettant les émulsions à un gradient de force centrifuge de 100 à 20 000 g ; ou en soumettant les émulsions à une seule force centrifuge (20 000 g) pendant une durée allant jusqu'à 40 minutes. Ces premières expériences n'ont cependant pas permis d'obtenir de déstabilisation importante des émulsions (moins de 20% de perte d'intégrité des émulsions). Du sérum de veau fœtal (SVF) a donc été ajouté dans la phase aqueuse pour favoriser la déstabilisation des émulsions. Un des constituants principaux de ce sérum est l'albumine de sérum bovin (BSA en anglais), une protéine surface-active, dont Holtze *et al.* avait déjà indiqué en 2008 que la présence pouvait déstabiliser les émulsions.<sup>181</sup> L'ajout de sérum dans la phase aqueuse (2.5% v/v) a effectivement entraîné une augmentation de la déstabilisation des émulsions. Ainsi les émulsions préparées avec le tensioactif Ethyle-triazine tétraN<sub>3</sub> **3** et une phase aqueuse PBS contenant 2.5% de SVF présentent une coalescence totale (deux phases limpides) après 10 minutes à 5000 g à 20 °C. En l'absence de sérum, les émulsions produites avec ce même tensioactif présentaient une coalescence de seulement 10 à 20%, même après 40 minutes à 20 000 g à 20 °C. L'ensemble des tensioactifs pré-fonctionnalisés, ainsi que deux tensioactifs commerciaux, le 008-F et le dSURF, ont été testés dans ces conditions (Figure 84). Des mesures d'absorbance ont été réalisées sur le surnageant avant centrifugation, et ont indiquée pour toutes les émulsions une stabilité supérieure à 90%, ce qui confirme que la déstabilisation détectée résulte bien de la centrifugation (voir annexe, Figure 90).

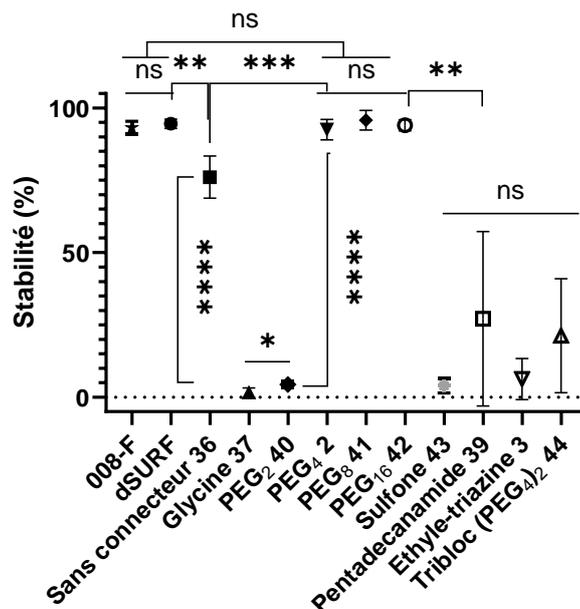


Figure 84: Stabilité relative des émulsions après centrifugation en fonction du tensioactif utilisé. Conditions de production des gouttes : phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200  $\mu$ M), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X). Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.0001. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Les tensioactifs ayant des connecteurs PEG<sub>4</sub> **2**, PEG<sub>8</sub> **41**, PEG<sub>16</sub> **42** ont montré des résultats similaires aux tensioactifs commerciaux dSURF et 008-F, avec un maintien de l'intégrité des émulsions (stabilité > 90%). Le tensioactif sans connecteur **36** a lui montré une stabilité partielle de son émulsion, avec une intégrité d'environ 75%. Les tensioactifs avec les connecteurs Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, Sulfone **43** et Ethyle-triazine **3** ont tous montré une coalescence complète des gouttes après centrifugation (Stabilité < 6%). Enfin les tensioactifs avec le connecteur Pentadecanamide **39** et le tribloc (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub> **44** ont tous deux montrés des résultats très hétérogènes, allant d'une émulsion partiellement stable à totalement coalescée.

Ces résultats objectivent que les tensioactifs avec les connecteurs hydrophiles PEG entraînent une meilleure stabilité que les autres connecteurs. Aucune différence n'était visible entre le PEG<sub>4</sub> **2** à PEG<sub>16</sub> **42** mais diminuer la taille du connecteur (PEG<sub>2</sub> **40**) a entraîné une perte de stabilité des émulsions. Le fait d'enlever totalement le connecteur diminue l'effet stabilisant du tensioactif, et l'utilisation de connecteurs courts (Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**) diminue encore plus la stabilité mécanique tout comme le remplacement d'un des oxygènes du connecteur par une sulfone. Enfin le tensioactif triblocs (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub> **44** a montré une stabilité plus faible que son équivalent diblocs (PEG<sub>4</sub> **2**), et que l'ensemble des diblocs PEG<sub>4</sub> **2** à PEG<sub>16</sub> **42**.

L'utilisation de connecteur hydrophile favorise ainsi la stabilité des émulsions, et une longueur minimale de tête hydrophile est nécessaire pour ancrer et maintenir les tensioactifs à l'interface des gouttes et éviter leur coalescence. La stabilité supérieure du tensioactif sans connecteur **36** par rapport aux tensioactifs à connecteurs courts ou connecteur sulfone **43** indique qu'en plus de la linéarité, longueur et hydrophilie, les interactions induites par les connecteurs jouent un rôle dans la stabilisation des gouttes. Il semble préférable d'avoir une absence de connecteur plutôt que d'avoir deux amides ou carbonyles trop proches spatialement à l'interface. Le connecteur hydrophobe pentadecanamide **39** entraîne une stabilité variable des émulsions, qui peut être causée par sa nature ni fluorophile ni hydrophile, limitant sa solubilité et affinité pour les deux phases. Ce tensioactif avec un connecteur hydrophobe présente une moins bonne stabilité que son équivalent PEG en longueur (PEG<sub>4</sub> **2**), confirmant que l'utilisation de connecteur hydrophile est meilleure pour augmenter la stabilité des émulsions. Au vu de ces résultats, la stabilité faible induite par le connecteur Ethyle-triazine **3**, cyclique et rigide, avec une géométrie non linéaire, n'est pas étonnante.

La stabilité faible des gouttes avec le tensioactif tribloc diN<sub>3</sub> (mélange de tribloc, dibloc et queue fluorée carboxylate) par rapport aux dibloc avec têtes hydrophiles PEG de longueur ou poids similaire pourrait indiquer un ratio PFPE/PEG non optimal, qui pourrait causer un ancrage insuffisant des tensioactifs à la surface des gouttes. De plus effectuer ces tests de stabilité avec différents lots de tensioactifs tribloc pourrait permettre d'évaluer si des différences sont présente selon le ratio des différents composés du mélange.

#### *4.1.4. Expériences supplémentaires de déstabilisation*

Des conditions plus drastiques ont également été utilisées sur les tensioactifs PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** et le dSURF, afin d'observer si cette méthodologie permet de différencier ces tensioactifs qui présentent une stabilité complète dans les conditions précédentes (condition (a) 2,5% de SVF, centrifugation à 5000 g pendant 10 minutes). Plusieurs conditions supplémentaires ont été testées, en augmentant la fraction de sérum dans la phase aqueuse et en augmentant la vitesse et durée de centrifugation (Figure 85) :

- b) 2,5% de SVF, centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes
- c) 10,0% de SVF, centrifugation à 5 000 g pendant 10 minutes

- d) 10,0% de SVF, centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes
- e) 10,0% de SVF, centrifugation à 15 000 g pendant 30 minutes

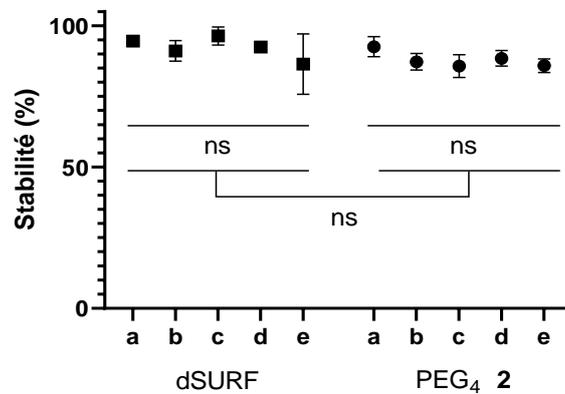


Figure 85: Stabilité relative des émulsions produites avec le tensioactif dSURF ou PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> 2 après centrifugation à 20 °C. Conditions de production des gouttes : phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500) ; Phase aqueuse – Fluorescéine (200 µM), FCS, dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X). a) 2.5% de SVF, 5000 g, 10 min ; b) 2.5% de SVF, 10 000 g, 10 min ; c) 10,0% de SVF, 5000 g, 10 min ; d) 10,0% de SVF, 15 000 g, 10 min ; e) 10,0% de SVF, 15 000 g, 30 min. Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Les conditions testées n'ont pas entraîné de baisse de stabilité des émulsions, ni avec le dSURF, ni avec le tensioactif PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> 2. Les émulsions ont présenté des intégrités supérieures à 85-90% dans toutes les conditions. Ces résultats ont ainsi montré que le tensioactif PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> 2 entraîne une robustesse des émulsions équivalente au tensioactif commercial de référence dans ces conditions de stress mécanique.

Si l'on souhaite pouvoir employer cette méthodologie pour différencier ces deux tensioactifs ou encore pour identifier des tensioactifs encore plus stabilisants que le dSURF ou que le PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> 2, il sera nécessaire de trouver des conditions plus déstabilisantes pour diminuer l'intégrité de leurs émulsions. Parmi les options envisageables il est possible d'augmenter la taille/volume des gouttes ou de diminuer la concentration des tensioactifs, ou encore de changer de méthode de déstabilisation, par exemple en réinjectant les gouttes et en utilisant un champ électrique.

#### 4.1.5. Liens entre stabilité mécanique et baisse de tension superficielle

Il est intéressant de noter que les mêmes groupes de tensioactifs ont été retrouvés avec la méthode de mesure de tension superficielle et les essais de stabilité mécanique des émulsions. Nous avons ainsi tracé un graphique afin de visualiser la tension superficielle en fonction de la stabilité des émulsions pour chaque tensioactif (Figure 86).

Les tensioactifs réduisant le plus la tension de surface (plus de 10  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  de différence) vont également stabiliser le plus les émulsions dans les tests de stress mécanique (Intégrité > 90%), tandis que les tensioactifs abaissant peu la tension superficielle (< 8-9  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  de différence) vont former des émulsions ne résistant pas à la centrifugation (intégrité entre 0 et 30%). Quant au tensioactif sans connecteur **36**, il a obtenu des résultats intermédiaires dans les deux tests (abaissement de la tension de 8-10  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , et intégrité de l'émulsion ~75% post-centrifugation).

Seul le tensioactif PEG<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub> **40**, a présenté des résultats discordants : il abaissait fortement la tension superficielle des gouttes, mais conduit à des gouttes avec une faible stabilité mécanique. Ce résultat peut s'expliquer par la structure de la tête hydrophile, appartenant à la série des PEG et induisant un abaissement de tension superficielle efficace mais peut-être trop courte pour ancrer suffisamment les tensioactifs à la surface des gouttes. Cela pourrait entraîner leur fuite dans la phase continue lorsque les gouttes sont soumises au stress mécanique.<sup>169,181</sup>

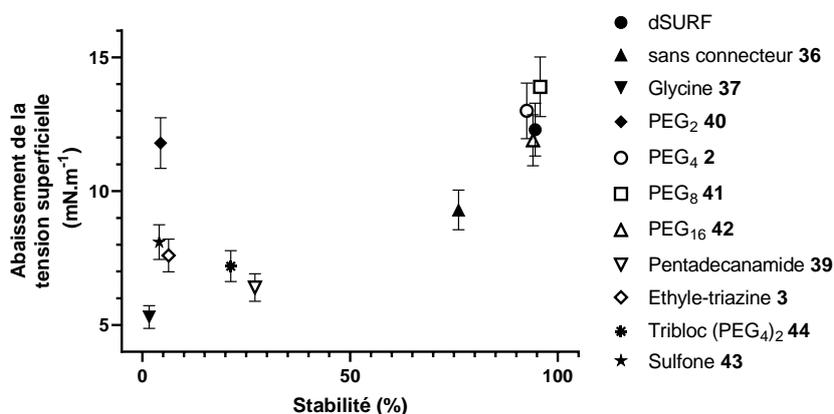


Figure 86: Comparaison de la capacité des tensioactifs à maintenir des émulsions stables après centrifugation et à abaisser la tension de surface

L'évaluation de la stabilité des gouttes par centrifugation est utilisable pour comparer et classer les différents tensioactifs pré-fonctionnalisés. De plus, la stabilité des émulsions semble être généralement représentative de leur capacité à abaisser la tension de surface. Ainsi l'étude de la baisse de tension superficielle induite par les tensioactifs pourrait permettre de prédire leur capacité à stabiliser les gouttes. Dans tous les cas, l'utilisation d'un test de stress mécanique comme la centrifugation permet également de valider la capacité des tensioactifs à s'ancrer et rester aux interfaces huile/eau. Cette méthode simple, rapide et peu

coûteuse peut être ainsi utilisée en routine pour anticiper le comportement des émulsions en microfluidique en gouttes et lors du développement de nouveaux tensioactifs.

#### 4.2. Impact du greffage d'anticorps en surface de gouttes sur la stabilité des émulsions

Après avoir étudié l'impact de la structure des têtes hydrophiles des tensioactifs sur la stabilité des gouttes avant fonctionnalisation, nous nous sommes intéressés à l'impact du greffage d'anticorps en surface de gouttes sur la stabilité des émulsions. Pour cela, les tensioactifs capables de greffer des anticorps en surface de gouttes ont été testés. Chaque tensioactif a été testé en produisant des émulsions en l'absence (-) et en présence (+) de Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (400 nM), et les résultats de stabilité ont été reportés dans la Figure 87. Chaque expérience a été reproduite trois fois pour montrer la reproductibilité du procédé

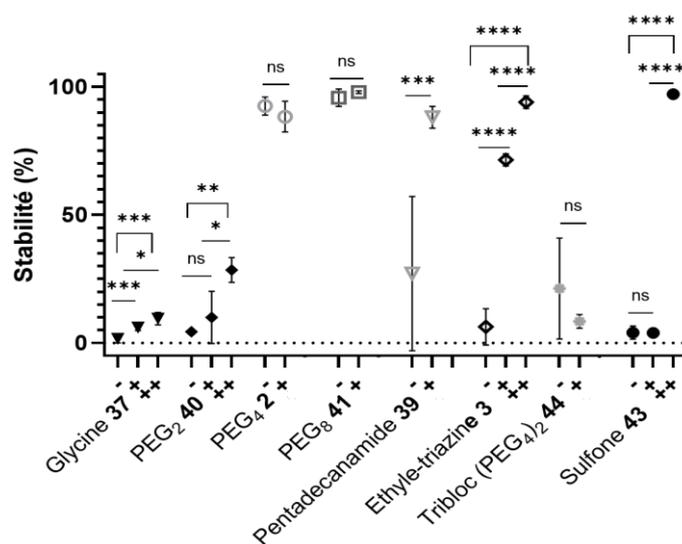


Figure 87 : Comparaison de la stabilité après centrifugation des émulsions produites avec les tensioactifs pré-fonctionnalisés avec ou sans greffage d'anticorps. Phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200  $\mu$ M), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), +/- Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (0  $\mu$ M (-), 0.4  $\mu$ M (+), 3.0  $\mu$ M (++)). Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.0001. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Les expériences ont montré que pour les tensioactifs avec le connecteur Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, Ethyle-triazine **3** et Pentadecanamide **39**, la fonctionnalisation de surface (+) a entraîné un gain significatif de stabilité des émulsions par rapport aux conditions sans anticorps (-). Dans le cas des tensioactifs qui permettaient déjà d'obtenir une bonne stabilisation, aucune perte de stabilité n'a été observée.

Ces résultats indiquent que les réactions de SPAAC en surface de gouttes entraînant la liaison covalente de tensioactifs et d'anticorps n'a pas d'effets négatifs sur les gouttes formées, mais au contraire va contribuer à accroître leur stabilité.

Les résultats de saturation effectués précédemment ont montré qu'à 400 nM d'anticorps, seul 10-15% de la surface interne des gouttes est fonctionnalisée. Nous avons souhaité observer si augmenter le nombre d'anticorps en surface pouvait entraîner une augmentation de stabilité. Des émulsions ont donc été produites avec 3  $\mu\text{M}$  d'anticorps DBCO (Figure 87, (++) ) et les tensioactifs avec les connecteurs les moins favorables pour la stabilisation (avant fonctionnalisation) : Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, Ethyle-triazine **3** et Sulfone **43**.

Ces tests de centrifugation ont révélé que pour tous les tensioactifs un gain significatif de stabilité est observé entre les conditions à 0,4 (+) et 3,0  $\mu\text{M}$  (++) . Les émulsions ayant été produites avec les tensioactifs sulfone **43** et Ethyle-triazine **3** sont passées de moins de 10% de stabilité sans anticorps à plus de 90% de stabilité après réaction de SPAAC avec 3.0  $\mu\text{M}$  d'anticorps. Des expériences contrôles utilisant les mêmes concentrations d'anticorps non fonctionnalisés par des DBCO ont montré une absence de gain de stabilité, prouvant que l'effet stabilisant était bien lié à la SPAAC en surface des gouttes et non juste à la présence d'anticorps dans les gouttes qui pourraient s'adsorber de manière non spécifique aux interfaces (voir annexe, Figure 90).

Le contrôle effectué en greffant 3  $\mu\text{M}$  de la sonde DBCO-sulfoCy5 **35** avec le tensioactif Ethyle-triazine **3** ou le tensioactif PEG<sub>2</sub> **40** n'a également pas entraîné de gain de stabilité. Ces résultats indiquent que la stabilisation est liée au greffage des anticorps, qui sont de larges composés polaires (voir annexe, Figure 90). Le gain de stabilité peut être causé par la formation des liaisons covalentes entre les tensioactifs et les anticorps, ce qui limite la mobilité des tensioactifs et force leur maintien à l'interface.

Le tensioactif Ethyle-triazine **3** a présenté la plus importante stabilisation post-greffage, passant d'une déstabilisation complète des émulsions à une stabilisation supérieure à 90%. On peut poser l'hypothèse que cela soit lié au fait qu'après l'ancrage des tensioactifs à l'interface des gouttes par liaison aux anticorps, les cœurs triazines vont être immobilisés et maintenus proches. Ces structures sont connues pour former des interactions en chimie supramoléculaire, avec la formation de réseau de liaisons hydrogène, des empilements pi, et

des interactions électrostatiques.<sup>268,269</sup> De plus, les quatre fonctions azotures qui sont retrouvées sur la tête hydrophile peuvent faciliter la SPAAC. Un tensioactif peut potentiellement se lier à plusieurs anticorps, ou inversement plusieurs tensioactifs peuvent se lier à un anticorps, formant un réseau réticulé. Ces différentes propriétés et le greffage d'anticorps peuvent favoriser la formation d'un réseau de liaisons hydrogènes à la surface interne des gouttes, la densifiant et ancrant les tensioactifs à l'interface.

Ainsi la fonctionnalisation de surface des gouttes par des anticorps renforce la stabilité des émulsions et cet effet stabilisant croît avec la quantité d'anticorps en surface des gouttes. Ces expériences confirment un atout supplémentaire à l'usage de la surface interne des gouttes en tant que surface de capture. Sachant que plus la surface est fonctionnalisée, plus la stabilité des gouttes s'accroît, cela indique qu'il est possible d'augmenter les concentrations d'anticorps de capture et donc la borne haute de détection sans préjudice pour les gouttes. De même, il sera ainsi possible et bénéfique de greffer en surface plusieurs types d'anticorps, reconnaissant différents antigènes, augmentant à la fois la fraction de surface fonctionnalisée, la stabilité des gouttes et permettant le multiplexage des immunoessais.

#### 5. Etude des liens entre les paramètres structuraux des tensioactifs leur permettant de fonctionnaliser la surface des gouttes et ceux leur permettant de stabiliser les émulsions

La comparaison des mesures de stabilité (pré-fonctionnalisation), des mesures de tension de surface et des mesures de l'Index de Relocalisation révèle que les paramètres de stabilité et de capacité à effectuer une SPAAC en gouttes n'ont pas une évolution corrélée, comme la Figure 88 le montre.

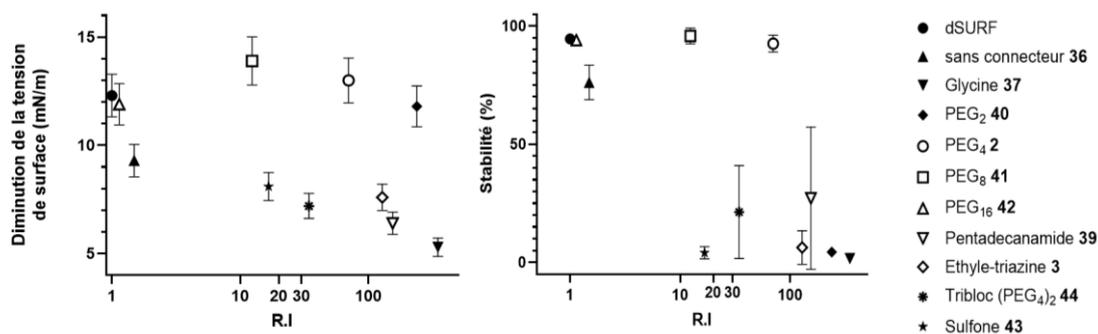


Figure 88: Représentation des paramètres d'abaissement de la tension superficielle en fonction de l'index de relocalisation des tensioactifs et de la stabilité des émulsions en fonction de l'index de relocalisation des tensioactifs.

Par exemple, certains tensioactifs ont présenté de bons résultats de greffage, comme ceux avec les connecteurs Glycine **37**, PEG<sub>2</sub> **40**, Ethyle-triazine **3**, avec un R.I supérieur à 20, mais abaissent peu la tension de surface (moins de 8 mN.m<sup>-1</sup>) et ne stabilisent pas les émulsions après centrifugation (stabilité inférieure à 20%). D'autres tensioactifs ayant un R.I plus faible (PEG<sub>8</sub> **41**, PEG<sub>16</sub> **42**, sans connecteur **36**) ont montré une bonne capacité à stabiliser les émulsions (stabilité supérieure à 75%).

Enfin le tensioactif PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> **2** montre à la fois une bonne capacité de greffage des anticorps (R.I supérieur à 30), une bonne diminution de la tension superficielle (13-14 mN.m<sup>-1</sup>), et une bonne stabilisation des émulsions (stabilité supérieure à 90%). Ce tensioactif reste le meilleur compromis entre fonctionnalisation de surface efficace et bonne stabilisation des gouttes.

Ces résultats mettent en évidence que la longueur du connecteur hydrophile, qui impacte négativement la capacité de fonctionnalisation des tensioactifs, contribue au contraire à augmenter leur capacité à stabiliser les émulsions. De manière similaire, l'inclusion d'un court connecteur glycine, qui permet de rétablir une capacité à fonctionnaliser la surface par rapport à l'absence d'un connecteur, va contribuer à diminuer la capacité à stabiliser les émulsions et abaisser la tension de surface huile/phase aqueuse.

Les deux paramètres : stabilité et efficacité de SPAAC, ne sont donc pas influencés par les mêmes éléments structuraux des têtes hydrophiles. La SPAAC en surface est favorisée par la présence d'un connecteur court, de longueur limitée, pouvant être hydrophile ou hydrophobe, cyclique ou linéaire. Au contraire, la stabilité des émulsions est favorisée par un connecteur hydrophile, linéaire, et dont l'allongement favorise la stabilisation des gouttes. L'optimisation de ces deux paramètres va donc nécessiter un compromis afin d'obtenir un tensioactif optimal pour les applications de fonctionnalisation de surface en microfluidique en gouttes.

## 6. Conclusion et perspectives

Les travaux développés dans ce chapitre ont témoigné dans un premier temps que l'efficacité de la SPAAC en surface de gouttes est dépendante de la nature de l'alcyne tendu utilisé, en plus du type de molécule ou biomolécule greffée en surface, du DOC des anticorps, et du nombre d'azotures par tensioactifs. Pour la fonctionnalisation de surface avec des anticorps, la réaction de SPAAC est appropriée pour obtenir un greffage complet. De plus, les résultats obtenus attestent qu'il est possible d'utiliser différents types d'alcyne tendus sur les anticorps pour améliorer la réactivité en SPAAC si nécessaire. Il est également possible d'augmenter le DOC d'alcyne tendus par anticorps pour améliorer la réactivité en SPAAC tant que la reconnaissance de l'antigène correspondant n'est pas affectée.

L'étude de la saturation de la surface des gouttes a également affiché que la surface fonctionnalisable disponible est du même ordre de grandeur entre les tensioactifs diN<sub>3</sub> et tétraN<sub>3</sub> synthétisés. Ces résultats ont mis en évidence l'importante surface disponible dans les gouttes, et l'importante capacité d'ajustement des quantités d'anticorps de capture en surface selon les immunoessais. De plus, ces résultats ouvrent la voie au développement de système de multiplexage au sein des gouttes par l'incorporation dans la phase aqueuse d'un panel d'anticorps de capture fonctionnalisés.

La relation entre la structure des têtes hydrophiles et leur efficacité à fonctionnaliser et stabiliser des émulsions a été explorée grâce à la synthèse de tensioactifs diazotures, et a permis de mettre en évidence des lignes directrices pour la conception des prochaines générations de tensioactifs pré-fonctionnalisés. Les résultats ont notamment révélé que les paramètres structuraux intervenants pour la stabilisation des émulsions et ceux intervenants pour la capacité à greffer des anticorps sont différents. Par exemple, allonger la longueur de PEG améliore la stabilité, mais diminue la réactivité en SPAAC. Cela met en avant l'importance d'effectuer une optimisation de structure avec de multiples critères étudiés (par exemple stabilité mécanique et capacité de greffage) pour développer les tensioactifs pré-fonctionnalisés les plus efficaces.

De plus, les tests de stabilité ont permis le développement d'une méthode rapide et efficace pour comparer et différencier les tensioactifs. Enfin la mise en évidence d'une

stabilisation des gouttes après greffage d'anticorps en surface renforce l'intérêt d'utiliser la surface des gouttes comme surface de capture pour des immunoessais.

Les travaux décrits dans ce chapitre indiquent que le développement d'une stratégie exploitant un couple fluorotensioactif/biomolécule conjuguée apparaît comme une méthode prometteuse en microfluidique en gouttes pour obtenir des gouttes stables et capable de réagir de manière spécifique vis-à-vis de leur contenu. Dans la continuité de ces travaux, des études seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le gain de stabilité après la SPAAC en surface. De plus, un aspect recherché dans les tensioactifs est leur capacité à limiter les échanges entre les gouttes. L'étude de l'effet du greffage d'anticorps (ou de (bio)molécules) en surface sur leur capacité à retenir les molécules et biomolécules dans la phase encapsulée présente donc un enjeu d'intérêt pour la suite de ce projet.

## VI) Conclusion générale

Les travaux réalisés dans cette thèse ont porté sur la synthèse, caractérisation et utilisation de fluorotensioactifs portant des azotures afin de fonctionnaliser les interfaces de gouttes d'eau dans de l'huile fluorée. Nous avons pu valider que ces tensioactifs peuvent efficacement fonctionnaliser la surface des gouttes avec des anticorps, et que ces anticorps peuvent ensuite être utilisés pour effectuer des immunoessais en surface de gouttes, en milieu plus ou moins complexes. Ces travaux confirment le potentiel de cette nouvelle méthode d'immunoessai pour la détection de protéines en goutte, et ouvrent la voie à de nouvelles applications de détection de protéines sécrétées.

Nous avons également étudié la fonctionnalisation de surface par les anticorps, et montré qu'il est possible d'y greffer des concentrations d'anticorps de l'ordre de plusieurs micromolaires, présentant ainsi un potentiel important pour la mise au point d'immunoessai avec différents anticorps de capture simultanément greffés. Nous avons pu synthétiser et tester une famille de tensioactifs diazotures, et ainsi étudier les paramètres structuraux des têtes hydrophiles impliqués dans la capacité à permettre la fonctionnalisation de surface et à stabiliser les émulsions. Enfin nous avons étudié l'impact de la fonctionnalisation de surface des gouttes par des anticorps sur leur stabilité, et rapporté que le greffage des anticorps en surface de gouttes a un effet positif sur leur stabilité, renforçant l'attrait de notre nouvelle méthode d'immunoessai en surface de goutte.

L'ensemble de ces travaux ouvre la voie vers le développement de nouvelles générations de tensioactifs pré-fonctionnalisés. Plusieurs pistes peuvent être explorées, comme la diversification de la structure de la partie terminale azoture, de la partie fluorée, ou l'utilisation de connecteurs dendronisés afin de modifier la géométrie spatiale de la tête hydrophile. De plus, un nouvel axe intéressant à explorer serait l'étude des effets du greffage des anticorps en surface des gouttes sur la rétention moléculaire. Également, l'exploration de nouveaux tensioactifs pré-fonctionnalisés, utilisant d'autres groupements click bioorthogonaux peut être envisagé, dans le but d'obtenir les tensioactifs les plus stabilisant et efficaces pour être utilisés en microfluidique en goutte.



## VII) Annexes

### 1. Contrôles négatifs de greffage avec la famille de tensioactifs azoture (Trastuzumab-sulfoCy5)

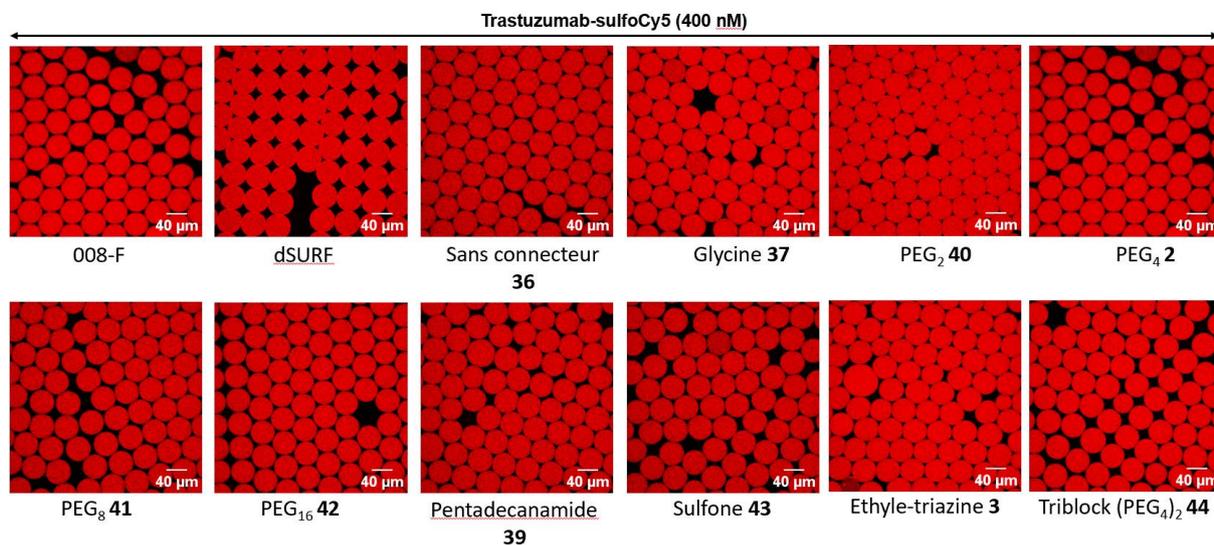


Figure 89: Contrôle négatif de SPAAC en surface de gouttes selon les tensioactifs pré-fonctionnalisés. Des gouttes de 45 pL contenant 400 nM d'anticorps sans alcynes tendus et stabilisées par les différents tensioactifs pré-fonctionnalisés ou non fonctionnalisés (008-F, dSURF) (2.5% dans de l'HFE 7500) sont produites, incubées 1-1.5 h et observées par microscopie confocale. Composition de la phase aqueuse : CHAPS (1mM dans du PBS 1X), Trastuzumab-sulfoCy5 (400 nM).

En l'absence de DBCO sur les anticorps, aucune relocalisation à la surface n'est observée. Cela confirme que la relocalisation observée lors des expériences de greffages est bien causée par des réactions de SPAAC entre les tensioactifs azotures et les anticorps-DBCO.

## 2. Contrôles de stabilité

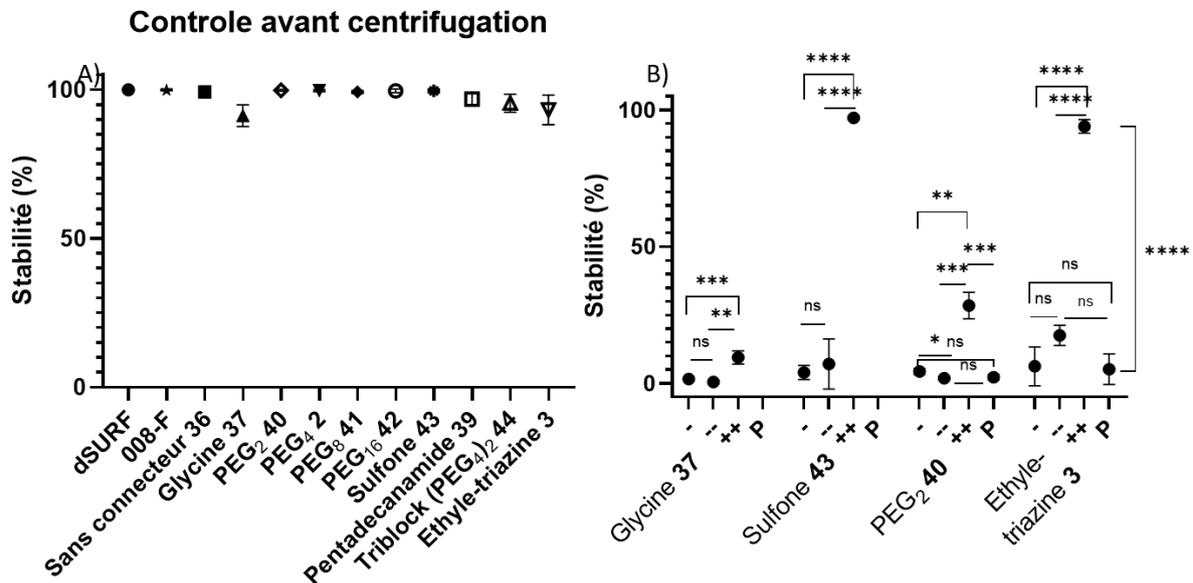


Figure 90: Contrôles des tests de stabilité. A) Stabilité des émulsions avant centrifugation ; B) Stabilité des émulsions avec ou sans greffage. Phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200  $\mu$ M), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), +/- Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (0  $\mu$ M (-), 3.0  $\mu$ M (++)), ou Trastuzumab-sulfoCy5 (3.0  $\mu$ M (--)), ou sonde DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5 (3.0  $\mu$ M, (P)). Les analyses T-test ont été effectuées avec le logiciel Prism. \*\*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.0001. \*\*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.001. \*\* signifie une différence significative avec une p-value < 0.01. \* signifie une différence significative avec une p-value < 0.05 et ns (non significatif) signifie que la différence n'est pas significative avec une p-value > 0.05.

Les tests de stabilité effectués avant la centrifugation (Figure 90, A) montrent que les émulsions sont stables en sortie de production, et que la coalescence observée après centrifugation est bien causée par le stress mécanique. Les différents contrôles de stabilité effectués sur les émulsions avec les tensioactifs Glycine **37**, Sulfone **43**, PEG<sub>2</sub> **40** et Ethyle-triazine **3** (Figure 90, B) indiquent une absence de gain de stabilité entre des gouttes ne contenant pas d'anticorps (-) et des gouttes contenant 3.0  $\mu$ M d'anticorps-sulfoCy5 sans DBCO (non greffés) (--). Au contraire, l'utilisation de 3.0  $\mu$ M d'anticorps-DBCO-sulfoCy5 (greffés) (++) exprime dans toutes les conditions une augmentation significative de stabilité par rapport aux conditions précédentes (sans anticorps et avec anticorps non greffés). Ces résultats indiquent qu'il s'agit bien de la fonctionnalisation de surface par SPAAC qui induit l'effet stabilisant observé, et non pas la simple présence des anticorps. De même, les émulsions formées avec les tensioactifs PEG<sub>2</sub> **40** et Ethyle-triazine **3** et 3.0  $\mu$ M d'une sonde DBCO **35** (P) n'entraînent pas de gain de stabilité significatif par rapport aux conditions sans anticorps (-) et avec

anticorps non DBCO (--). Ces résultats dévoilent que l'effet stabilisant est bien causé par le greffage d'anticorps (larges biomolécules de 150 kDa), et non pas par le simple fait de réaliser une SPAAC en surface.

### 3. Images confocales du greffage à 3 $\mu\text{M}$ d'anticorps ou de sonde (tests de stabilité)

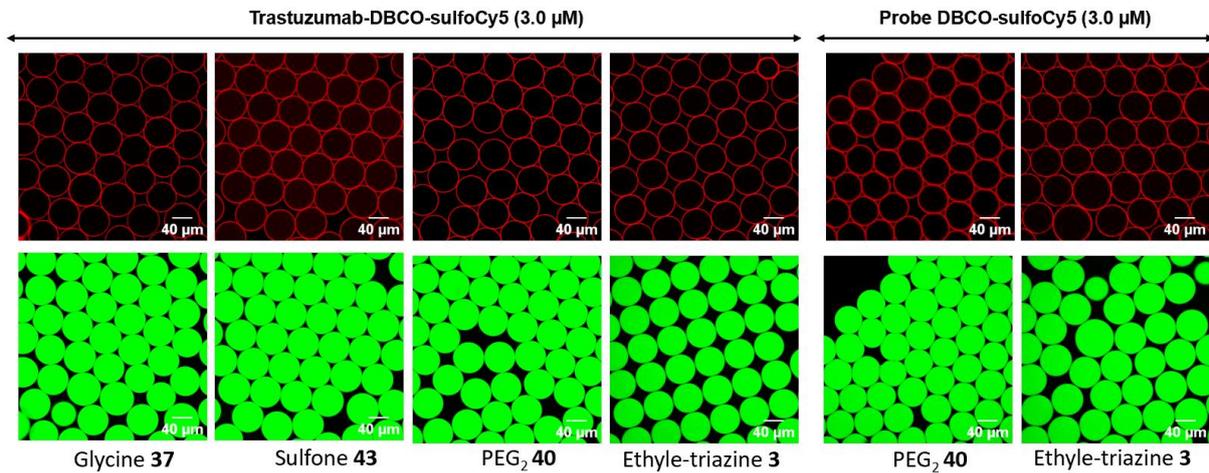


Figure 91 : Images confocales des gouttes produites dans les tests de stabilité. Phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200  $\mu\text{M}$ ), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), +/- Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (3.0  $\mu\text{M}$ ) ou sonde DBCO-PEG<sub>3</sub>-sulfoCy5 (3.0  $\mu\text{M}$ )

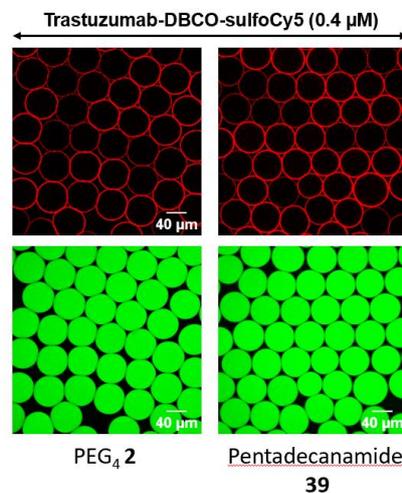


Figure 92 : Images confocales des gouttes produites dans les tests de stabilité. Phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200  $\mu\text{M}$ ), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), +/- Trastuzumab-DBCO-sulfoCy5 (0.4  $\mu\text{M}$ )

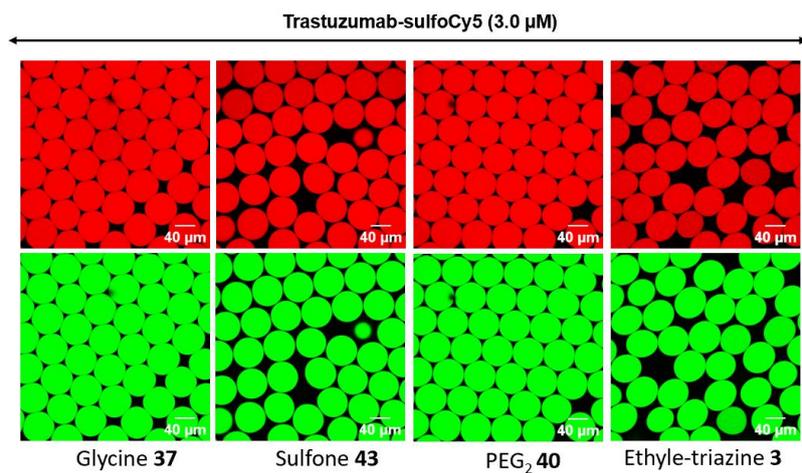


Figure 93 : Images confocales des gouttes produites dans les tests de stabilité. Phase fluorée – Tensioactifs (1.0% in Novec 7500); Phase aqueuse – Fluorescéine (200 μM), FCS (2.5% v/v) dans du CHAPS (1 mM dans du PBS 1X), Trastuzumab-sulfoCy5 (3.0 μM).

Les images confocales des émulsions produites avec 3 μM d'anticorps DBCO, non DBCO ou une sonde moléculaire DBCO montrent bien une fonctionnalisation de la surface en présence d'alcyne tendu et une homogénéité de répartition des anticorps dans les gouttes en l'absence de DBCO.

#### 4. Spectres RMN $^{19}\text{F}$ des tensioactifs dibloc

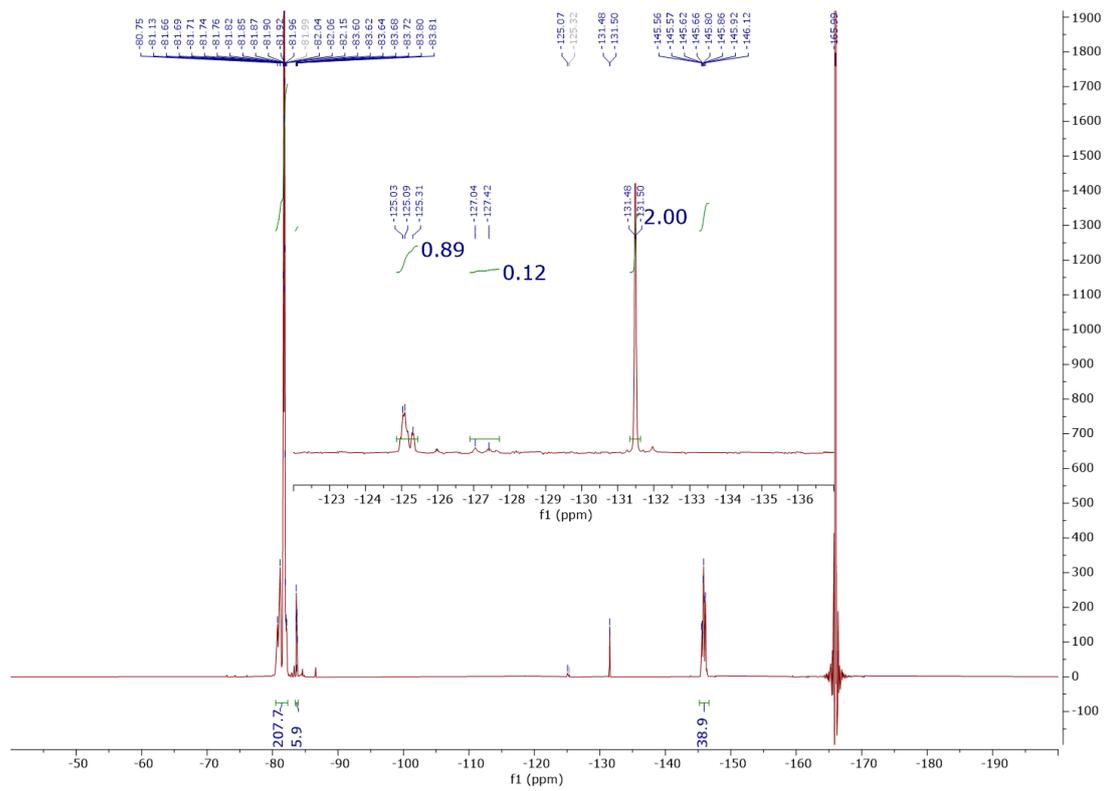


Figure 94 : RMN  $^{19}\text{F}$  du tensioactif Krytox-sans connecteur- $\text{diN}_3$  **36**

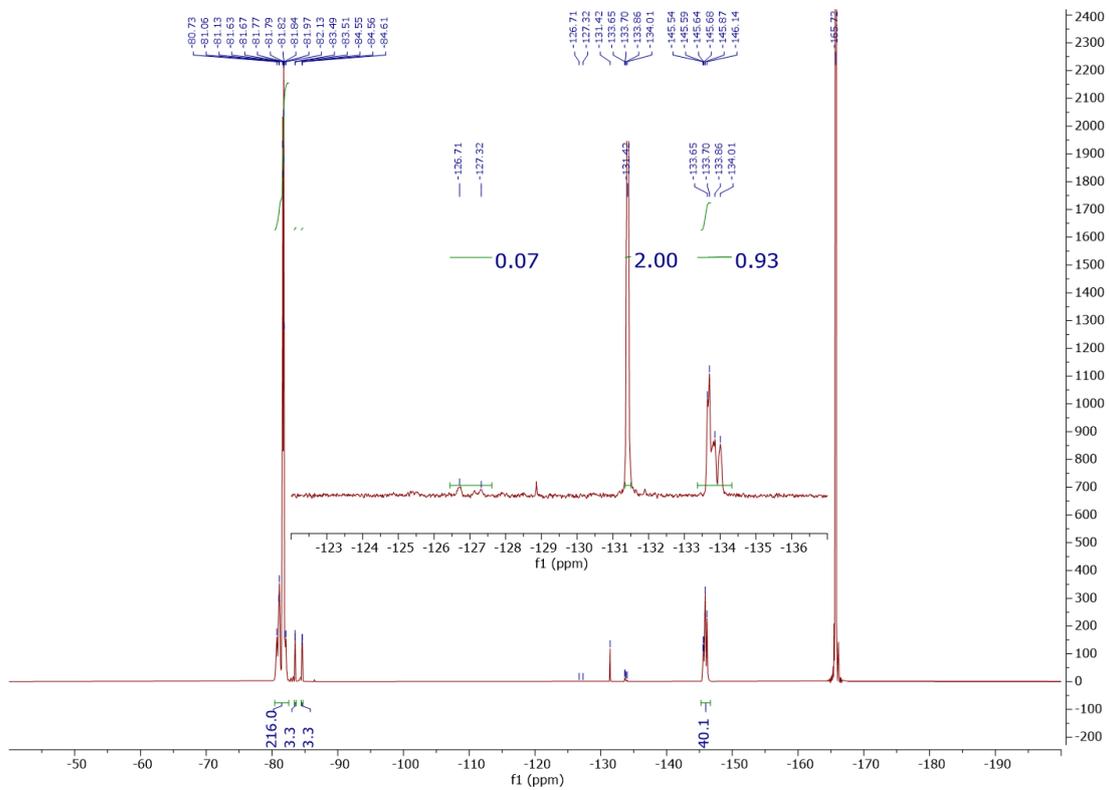


Figure 95: RMN  $^{19}\text{F}$  du tensioactif Krytox-Glycine- $\text{diN}_3$  **37**

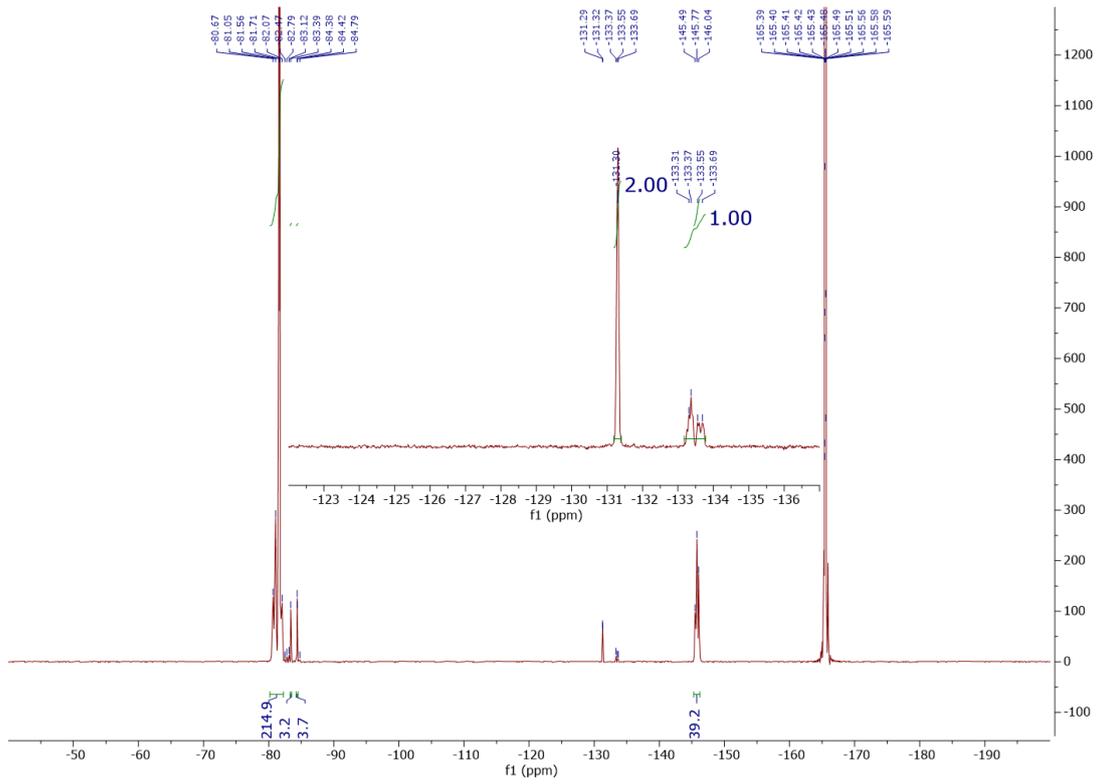


Figure 96 : RMN 19F du tensioactif Krytox-PEG<sub>2</sub>-dIN<sub>3</sub> 40

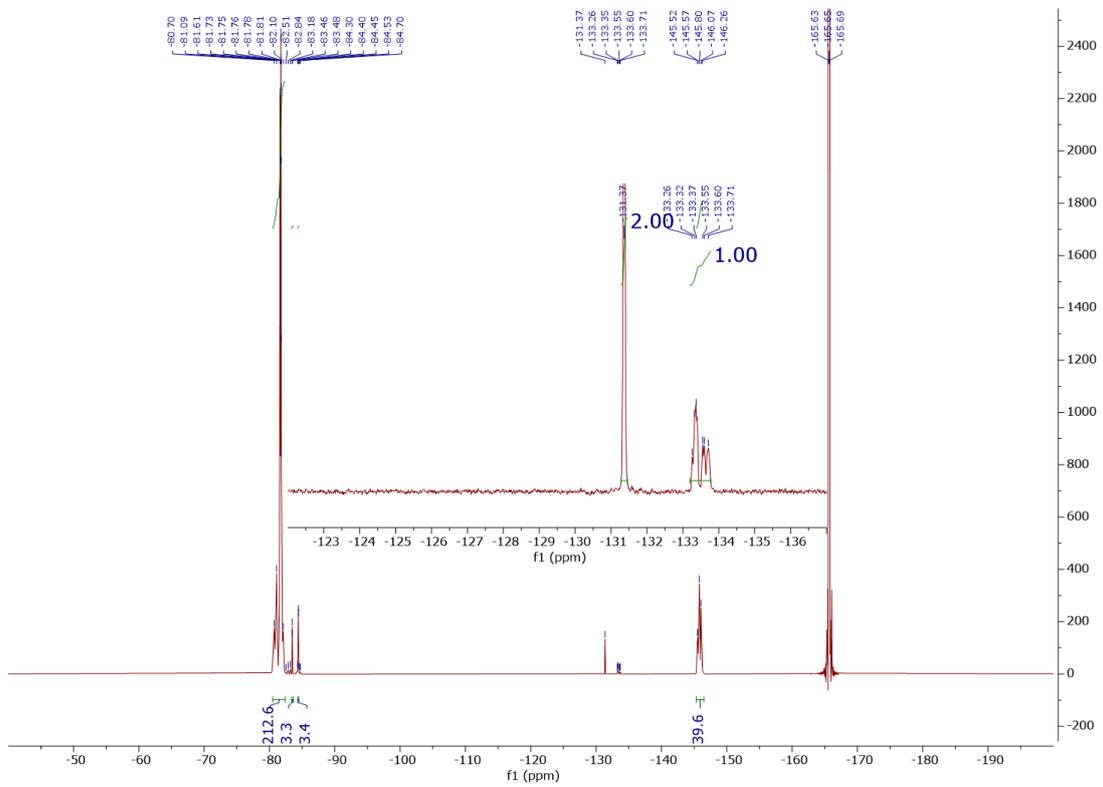


Figure 97: RMN 19F du tensioactif Krytox-PEG<sub>4</sub>-dIN<sub>3</sub> 2

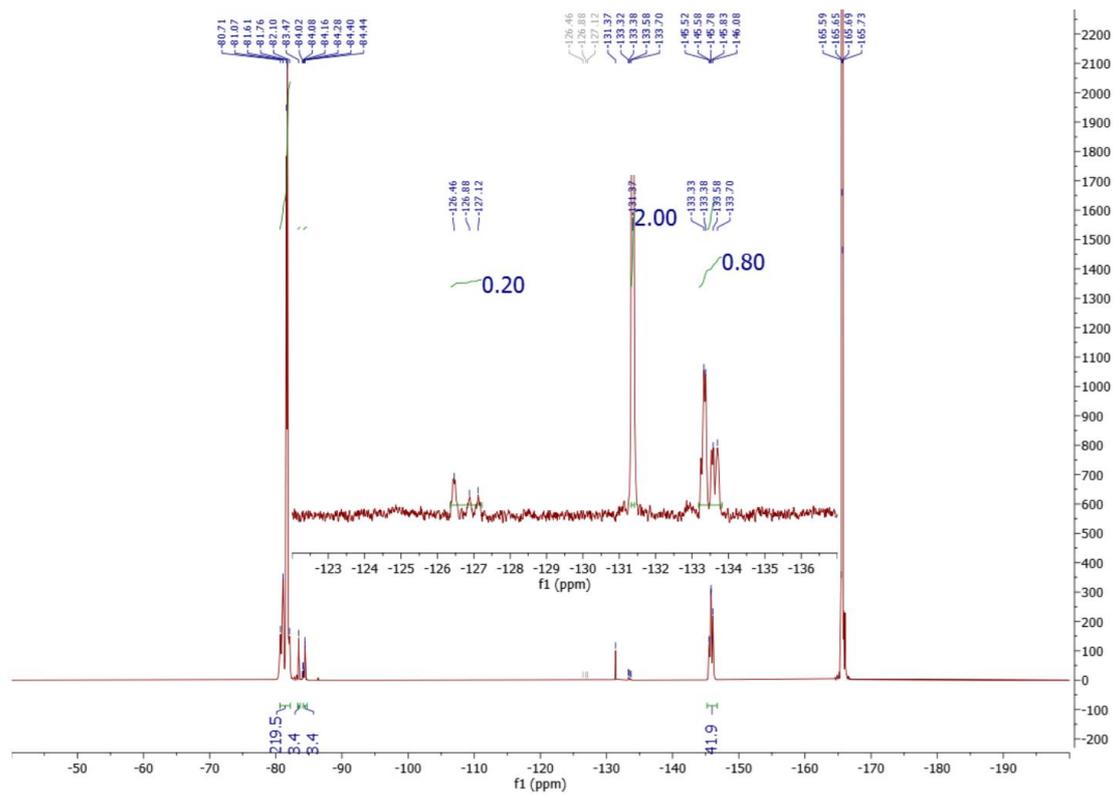


Figure 98 : RMN 19F du tensioactif Krytox-PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub> 41

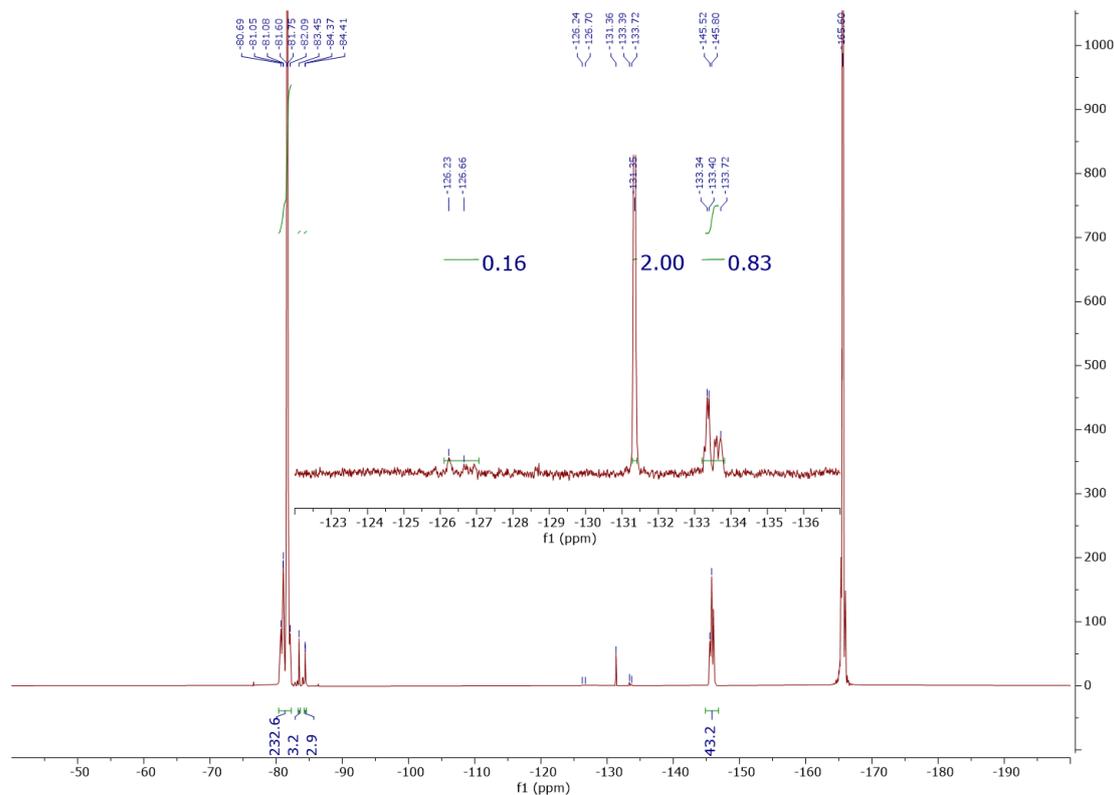


Figure 99: RMN 19F du tensioactif Krytox-PEG<sub>16</sub>-diN<sub>3</sub> 42

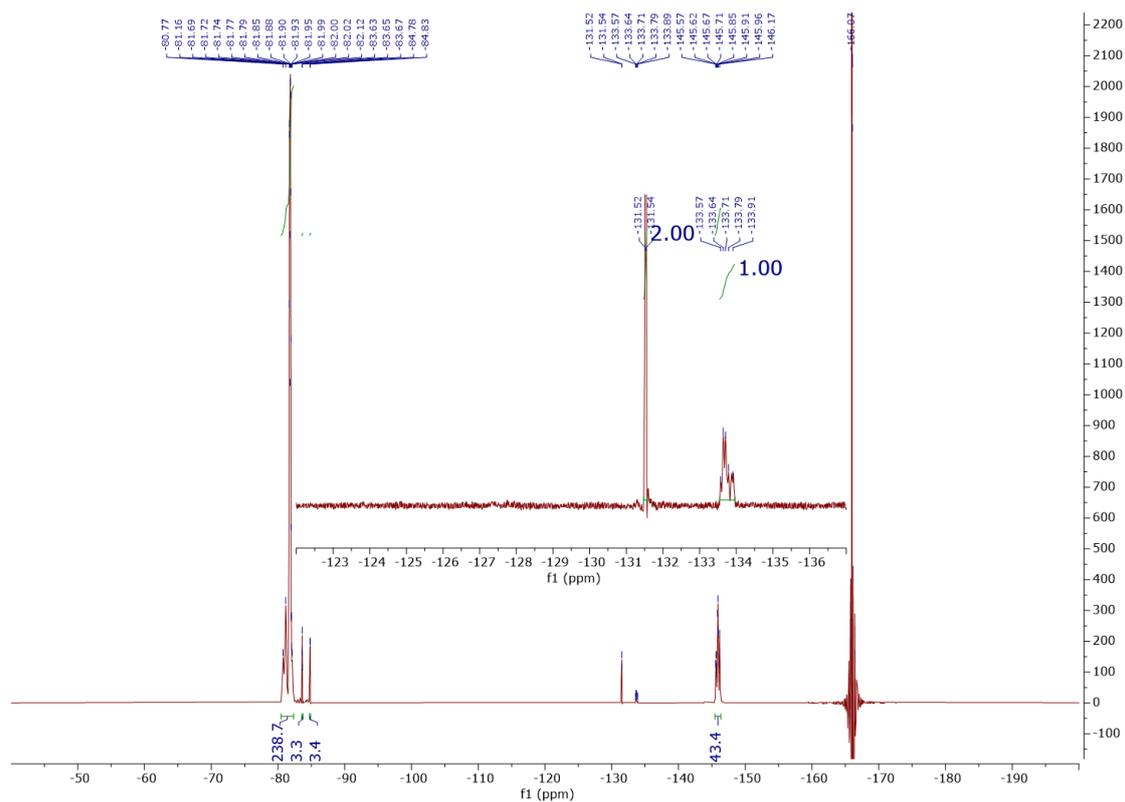


Figure 100 : RMN 19F du tensioactif Krytox-Pentadecanamide-diN<sub>3</sub> 39

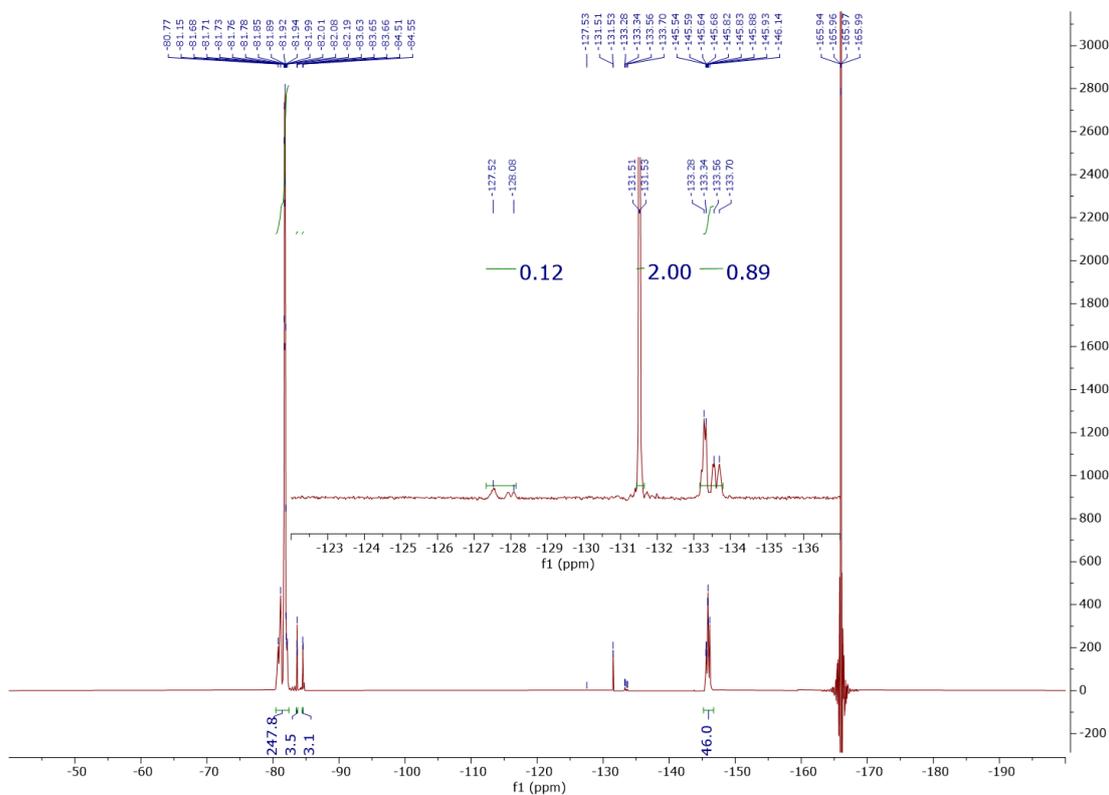


Figure 101 : RMN 19F du tensioactif Krytox-Ethyle-triazine-tetraN<sub>3</sub> 3

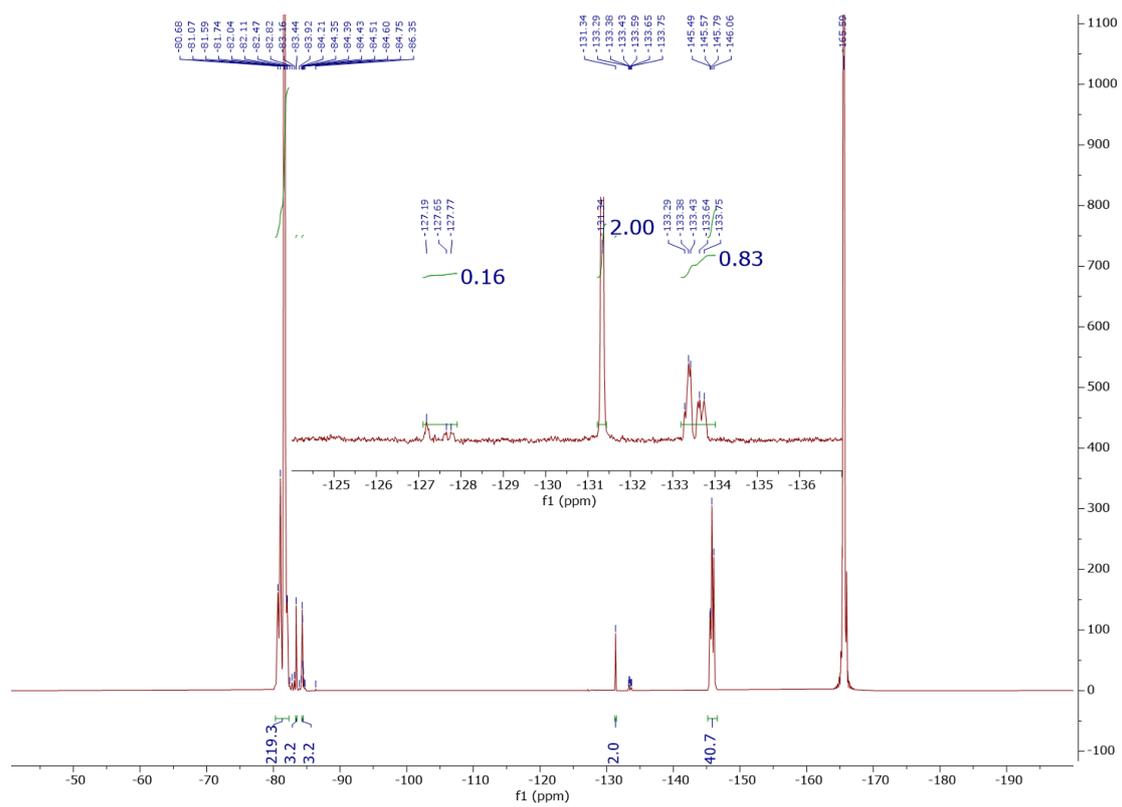


Figure 102 : RMN 19F du tensioactif Krytox-Sulfone-diN<sub>3</sub> **43**

## 5. Spectres RMN $^{19}\text{F}$ et IR des Tribloc di-azotures

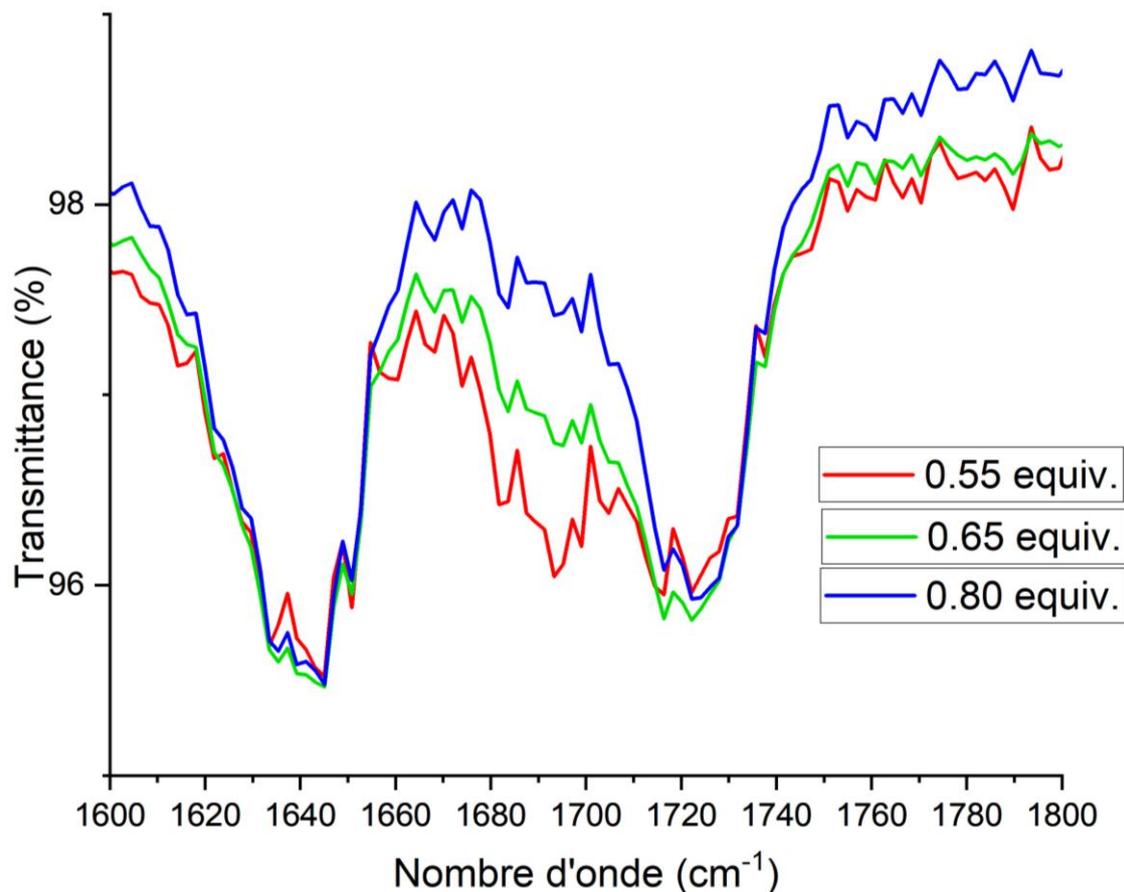


Figure 103 : Zoom (1600-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) des spectres IR des tensioactif Tribloc diN<sub>3</sub> 44

Les spectres IR des différents tribloc synthétisés montrent une absence de produit de départ (KrytoxCOOH, pic entre 1750-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) pour l'ensemble des tensioactifs. Les trois conditions montrent la formation d'un amide entre la queue fluorée et la tête hydrophile (1720  $\text{cm}^{-1}$ ). La condition avec 0.55 équivalents de tête hydrophile montre la présence de produit secondaire de la réaction (KrytoxCOO<sup>-</sup>, 1690  $\text{cm}^{-1}$ ), tandis que les conditions avec 0.65 et 0.80 équivalents ne présente pas de pic de carboxylate. L'analyse IR des différents tensioactifs confirme le couplage des queues fluorés aux têtes hydrophiles, l'absence de produit de départ résiduel et la présence de produit secondaire dans le lot produit avec un ratio têtes hydrophiles/queues fluorées de 1.1:2

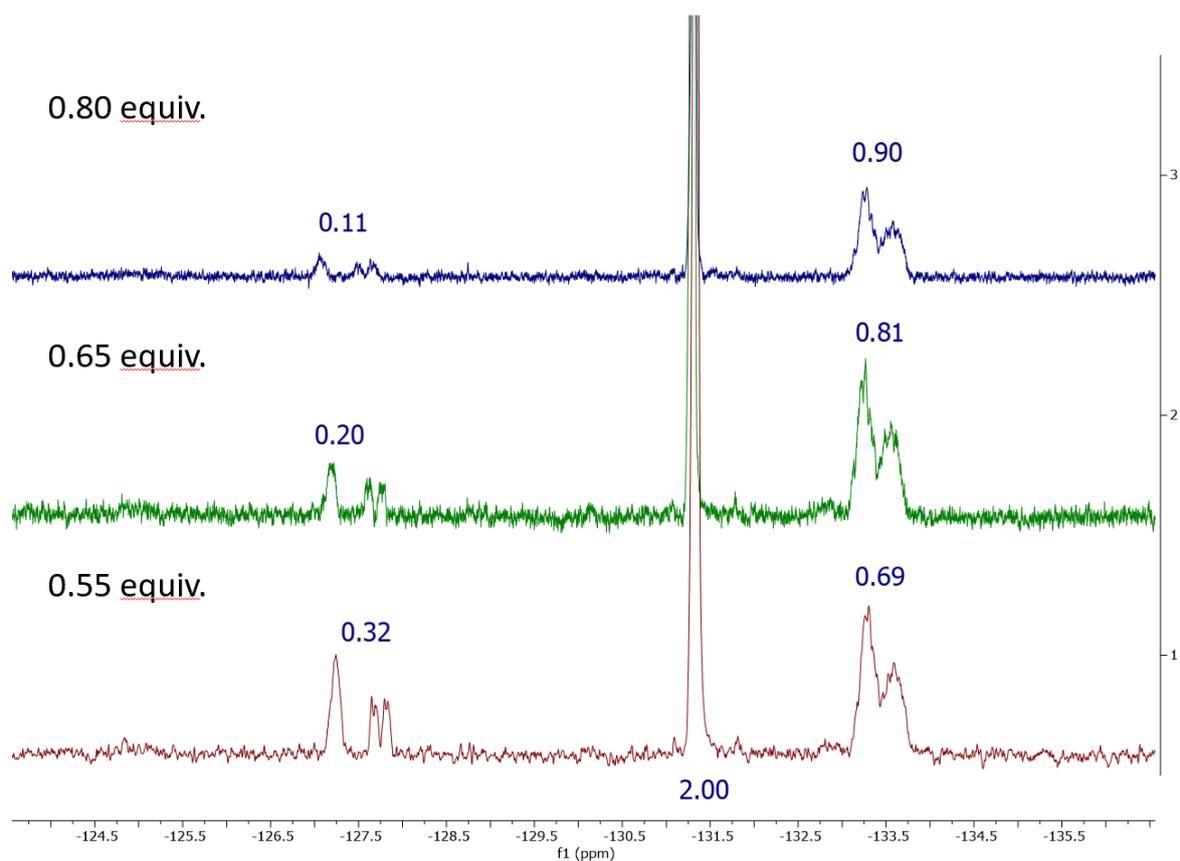


Figure 104 : zoom (-124 à -137 ppm) des RMN  $^{19}\text{F}$  des tensioactifs triblock diazotures synthétisés.

Les signaux des fluors en alpha du carbonyle (attribution des signaux décrite dans la partie 4.3) montrent que l'augmentation des équivalents de tête hydrophile (de 0.55 équivalents à 0.80 équivalents) entraîne une réduction de la fraction de produit carboxylate formée, passant de 30% pour 0.55 équivalents à 10% pour 0.80 équivalents, avec une augmentation complémentaire d'amide formée, passant de 70% à 90%. Augmenter les équivalents de tête polaire permet donc d'augmenter la quantité de queue fluorée qui réagit avec les amines des têtes hydrophiles pour former des liaisons amides, et de diminuer la fraction de produit sans tête polaire dans le lot de tensioactif.

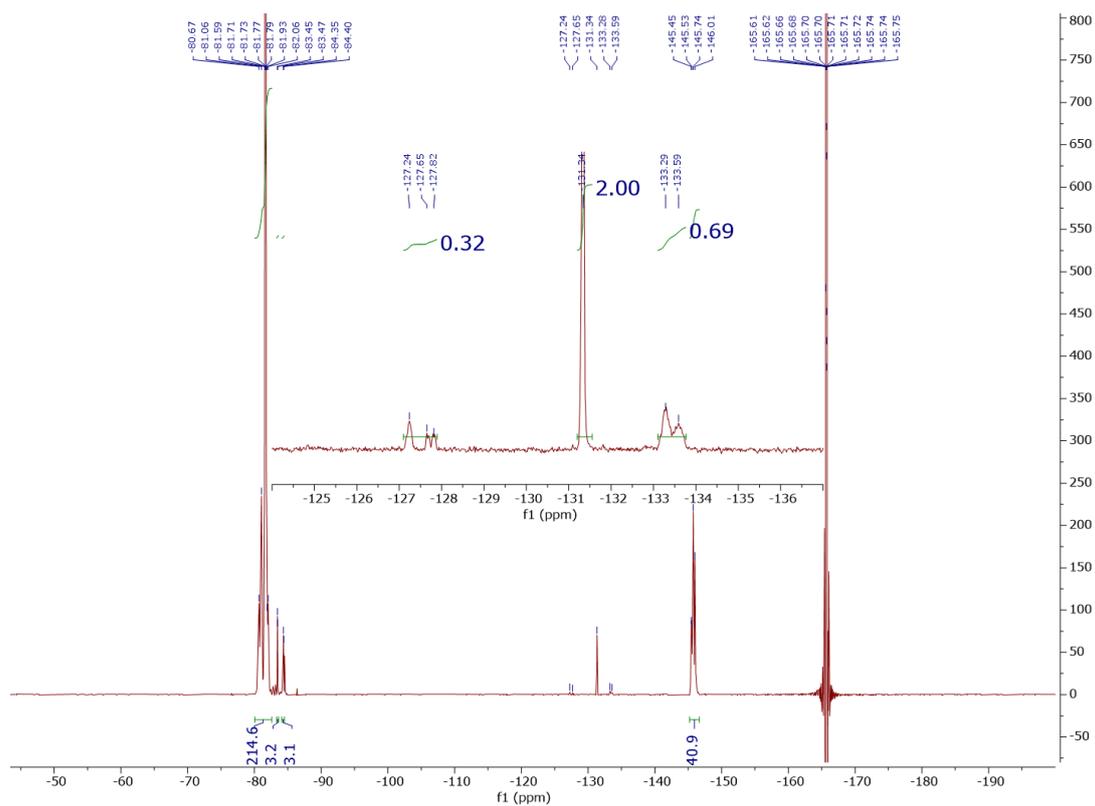


Figure 105 : RMN 19F du tensioactif Tribloc diazotures (0.55 équivalents de tête hydrophile)

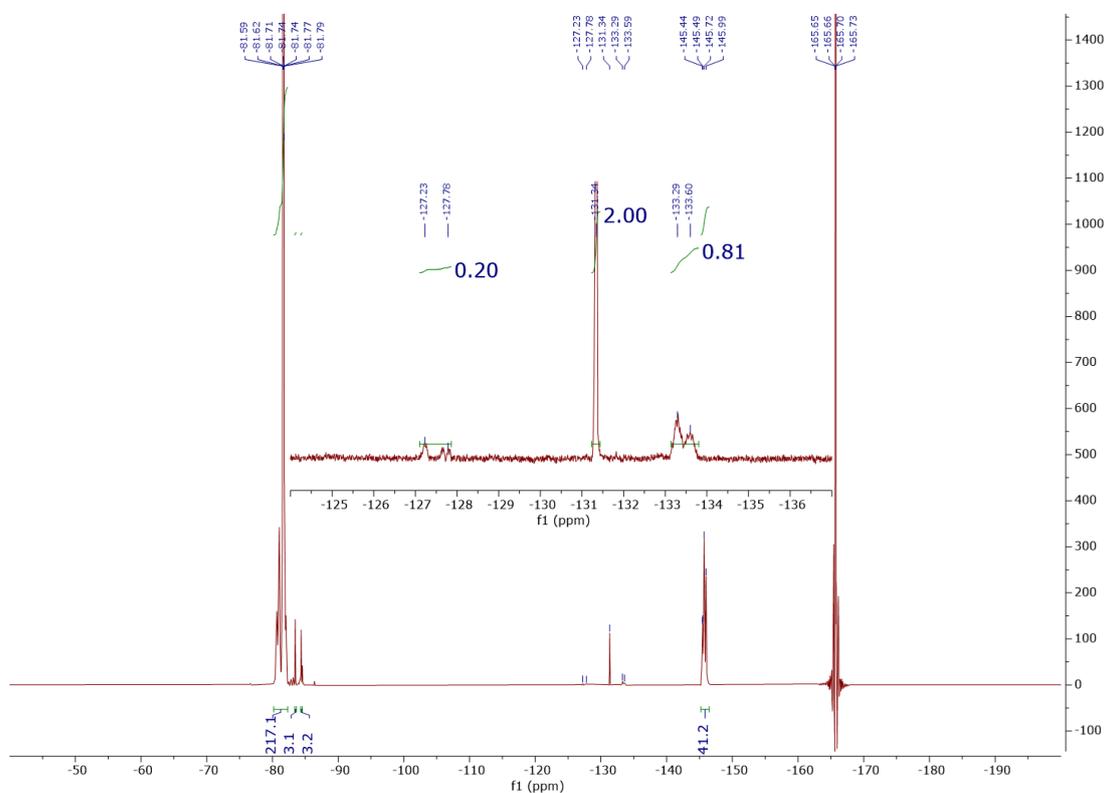


Figure 106 : RMN 19F du tensioactif Tribloc diazotures (0.65 équivalents de tête hydrophile)

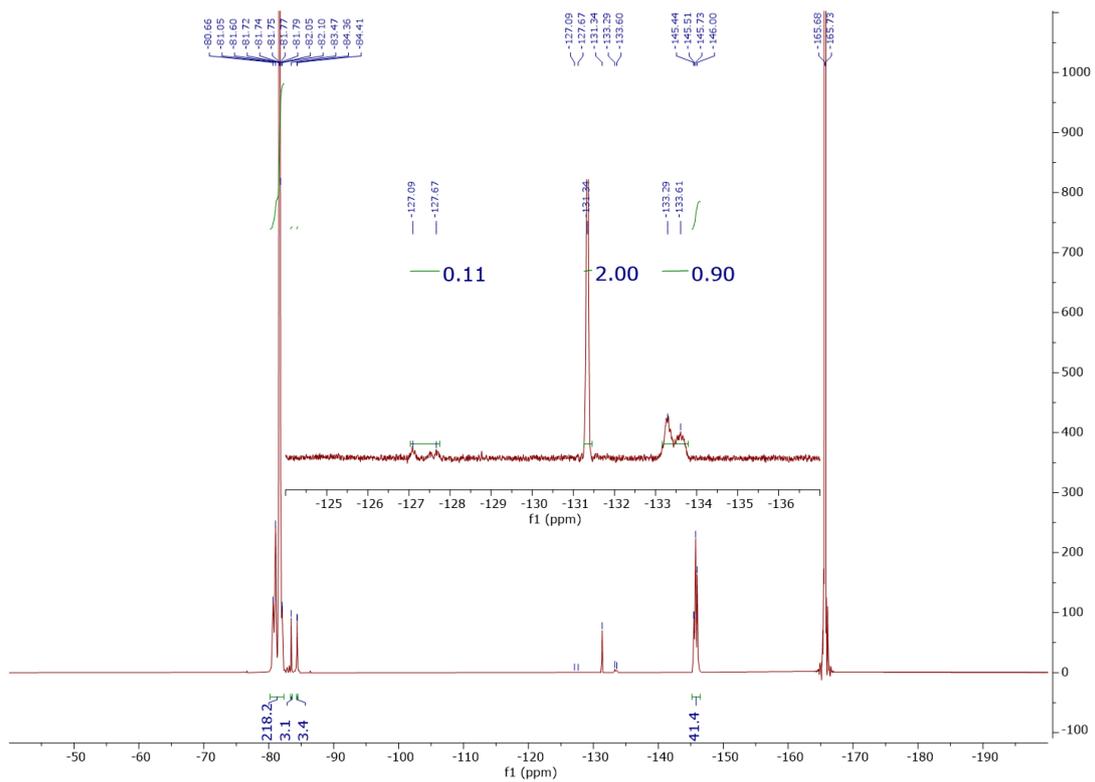


Figure 107 : RMN 19F du tensioactif Tribloc diazotures (0.80 équivalents de tête hydrophile)



## VIII) Partie expérimentale

### 1. Chemical Synthesis

#### 1.1. Materials and Methods

##### 1.1.1. Experimental Procedures

Unless otherwise indicated, reactions were carried out under an Ar. atmosphere in flame-dried glassware with magnetic stirring. Air and/or moisture-sensitive liquids were transferred *via* syringe. When required, solutions were degassed by argon bubbling through a needle. Organic solutions were concentrated by rotary evaporation at 25-80 °C at 15-30 Torr. Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using plates cut from aluminum sheets (ALUGRAM Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> from Macherey-Nagel). Visualization was achieved under a 254 or 365 nm UV light and by immersion in an appropriate staining solution.

##### 1.1.2. Materials

All reagents were obtained from commercial sources and used without further purification. Fluorinated solvents (HFE 7100 and HFE 7500) were purchased from 3M. Krytox157FS(H) was purchased from Dupond. Anhydrous solvents used in experiments were obtained from Sigma-Aldrich, Alfa Aesar or TCI. Pd/C was purchased from Alfa Aesar (A12012 Palladium, 10% on carbon, Type 487, dry). Oligonucleotides were purchased from IDT. Silica gel for column chromatography was purchased from Merck (Geduran® Si 60, 40-63 µm). Column flash chromatography was carried out using silica gel G-25 (40-63 µm) from Macherey-Nagel and Buchi.

##### 1.1.3. Instrumentation

*NMR spectroscopy*, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>19</sup>F NMR spectra were recorded with a Bruker 400/500 spectrometer at 23 °C. Data are represented as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet), coupling constant (*J*, Hz), integration and assignment (for <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F NMR).

*High resolution mass spectrometry (HRMS)* was conducted on an Agilent Accurate Mass QToF 6520 (PACSI Platform, Strasbourg University).

*Low resolution mass spectrometry (LRMS)* was conducted on an Agilent MSD 1200 SL (ESI/APCI) with a Agilent HPLC1200 SL and a Waters Acquity QDa (ESI) with a Waters Alliance 2695 HPLC.

*Analytical HPLC:* Analysis were carried out on Waters 2695 separations module equipped with Waters 2487 UV detector, Waters Acquity QDa mass detector and CORTECS, 2.7  $\mu\text{m}$ , C18, 50 x 4.6 mm column.

The flow rate was 1 mL/min and the solvent system was composed as follows: solvent A: 0.05% TFA in water; solvent B: acetonitrile. Unless indicated otherwise, the gradient run was 0 to 5 min. – 5% to 95% B; 5 to 6 min. – 95% B; 6 to 7 min. – 5% B. If the run is indicated to last 25 min, the gradient run was 0 to 25 min – 5% to 95% B; 25 to 26 min. – 95% B; 26 to 27 min. – 5% B. Mass detector was operated in positive MS Scan mode (ESI+) with a probe temperature of 600 °C, 1.5 kV capillary voltage and 10 V cone voltage.

*Semi-Preparative HPLC:* The semi-preparative HPLC system consisted of a Waters 600 pump, a 2487 detector (Waters), a 5 mL sample loop. Column: Sunfire C<sub>18</sub> (150 mm x 19 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ , Waters). Flow: 17 mL/min. Injection volume = 1 mL. Eluent A/B: (water with 0.1% TFA)/ACN. Gradient: 5% B to 95% B in 40 minutes and 10 minutes of re-equilibration. Detection: 254 nm or otherwise specific wavelength.

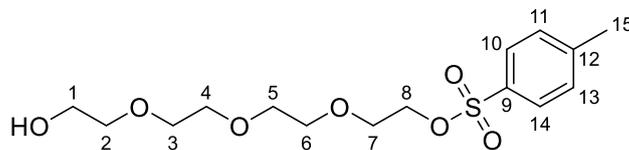
*IR spectra:* IR spectra were recorded in a Thermo-Nicolet FT/IR-380 spectrometer. Spectra were interpreted with OMNIC 9 software and are reported in  $\text{cm}^{-1}$ .

Concentrations of antibody solutions in dPBS (calcium and magnesium free, Merck, Ref. D8537-6X500ML) were determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) at 280 nm.

## 1.2. Synthesis of hydrophilic heads

### 1.2.1. Synthesis of the precursor PEG-N<sub>3</sub> (6)

#### 2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (5)



To a stirred solution of tetraethylene glycol (1.00 equiv., 10.00 g, 8.93 mL, 51.5 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (514 mL) at 0 °C were added Ag<sub>2</sub>O (1.50 equiv., 17.90 g, 77.2 mmol) and KI (0.20 equiv., 1.71 g, 1.14 mL, 10.3 mmol). Tosyl chloride (1.05 equiv., 10.30 g, 54.2 mmol) was then added portionwise over 15 minutes and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes. The reaction mixture was filtered through a pad of celite and then concentrated. The crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (11.50 g, 32.9 mmol, 64 %) as a yellow oil.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 7:3, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 7.80 (d, *J*<sub>o</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>, H<sub>14</sub>), 7.34 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>ortho</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>), 4.16 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 3.74-3.46 (m, 14H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 2.44 (s, 3H, H<sub>15</sub>).

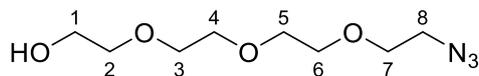
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 144.8, 133.1, 129.8 (2C), 128.0 (2C), 72.5, 70.8- 70.4 (4C), 69.2, 68.7, 61.8, 21.6 (3C).

**LRMS (ESI) m/z:** 349.08 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 8579-8584).<sup>235</sup>

**CAS number:** 77544-60-6

## 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (6)



To a solution of 2-(2-{2-[(4-methylbenzenesulfonyl)oxy]ethoxy}ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**5**) (1.00 equiv., 17.00 g, 48.8 mmol) in DMF (48.7 mL) was added NaN<sub>3</sub> (1.50 equiv., 4.76 g, 65.0 mmol). The mixture was stirred at 50 °C for 12 h, then filtered through a pad of celite and concentrated. The reaction mixture was then diluted with DCM (60 mL) and washed 4 times with brine (4 x 100 mL), then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (10.5 g, 47.8 mmol, 98%) as a transparent to yellow oil.

**TLC** : CycloH/EtOAc, 5:5, **R<sub>f</sub>** = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.75-3.71 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.71-3.64 (m, 10H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>), 3.64-3.59 (m, 2H, H<sub>7</sub>), 3.40 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H, H<sub>8</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 72.5, 70.7 -70.1 (5C), 61.9, 50.7.

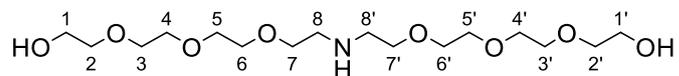
**LRMS (ESI) m/z**: 219.99 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 8579-8584).<sup>235</sup>

**CAS number**: 86770-67-4

1.2.2. Synthesis of the diazide  $NH(PEG_3N_3)_2 = di-PEG_3N_3$  (**11**)

**3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diol (7)**



To a degassed solution of 2-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethan-1-ol (**6**) (1.00 equiv., 5.0 g, 22.81 mmol) in ethanol (30 mL) was added Pd/C (purity: 10%, 0.05 equiv, 1.21 g, 1.14 mmol). The mixture was stirred under atmospheric pressure of  $H_2$  for 12 h at 20 °C. The reaction mixture was diluted with  $CH_2Cl_2$  (150 mL), filtered through a pad of celite and then concentrated. The crude was directly used without further purification.

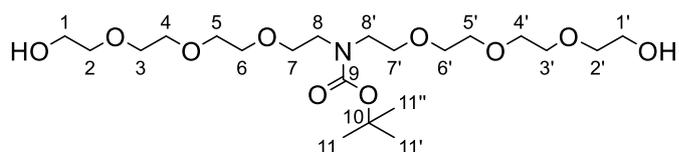
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.73 – 3.68 (m, 4H,  $H_1$ ), 3.68 – 3.56 (m, 24H,  $H_2$ ,  $H_3$ ,  $H_4$ ,  $H_5$ ,  $H_6$ ,  $H_7$ ), 2.84 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H,  $H_8$ ).

**$^{13}C$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm):** 72.8 (2C), 70.6 - 69.8 (10C), 61.5 (2C), 48.9 (2C).

**LRMS (ESI)  $m/z$ :** 370.20 [ $M + H$ ] $^+$ .

**CAS number:** 63721-14-2

**tert-Butyl bis(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (8)**



To a solution of 3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diol (**7**) (1.0 equiv., 8.0 g, 21.65 mmol) and  $\text{NEt}_3$  (3.0 equiv., 9.03 mL, 65.0 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (144.4 mL) was added  $\text{Boc}_2\text{O}$  (1.1 equiv., 5.2 g, 5.47 mL, 23.8 mmol). The reaction mixture was stirred 16 h at 20 °C before  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (aq., 1.0 M, 150 mL) was added to the solution. The reaction mixture was then extracted thrice with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 150 mL). The organic layers were combined, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ) to obtain the title compound (5.4 g, 11.44 mmol, 53% (2 steps yield))

**TLC:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.5

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.76 – 3.69 (m, 4H,  $\text{H}_1$ ), 3.69 – 3.53 (m, 24H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ), 3.44 (s, 4H,  $\text{H}_8$ ), 2.57 (s, 2H, OH), 1.44 (s, 9H,  $\text{H}_{11}$ ).

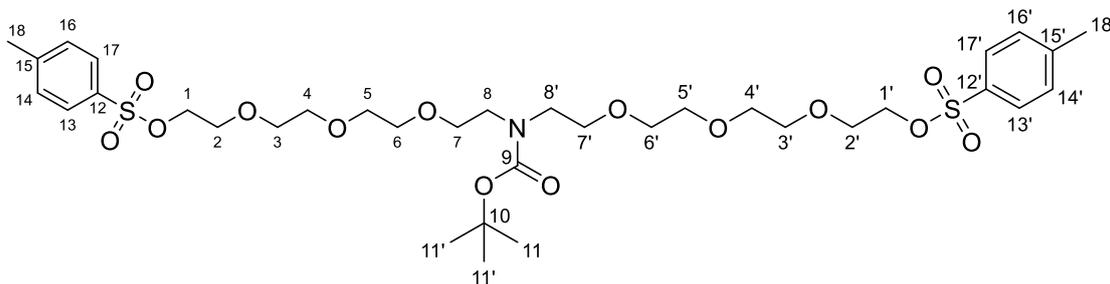
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 155.4, 79.5, 72.5 (2C), 70.6 – 69.5 (10C), 61.7 (2C), 28.4 (3C).

**LRMS (ESI) m/z:** 470.19 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

**CAS number:** 2093154-01-7

**12-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) (9)**



To a solution of *tert*-Butyl *N,N*-bis(2-{2-[2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamate (**8**) (1.0 equiv., 1.3 g, 2.77 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35.2 mL) at 0 °C was added DMAP (0.2 equiv., 67.6 mg, 0.55 mmol) and NEt<sub>3</sub> (10.0 equiv., 2.8 g, 3.85 mL, 27.70 mmol). The solution was stirred for 5 minutes at 0 °C before Tosyl chloride (4.0 equiv., 2.1 g, 11.10 mmol) was added. The solution was stirred at 20 °C for 5 h. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) was added, then the reaction mixture was washed once with NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), and the aqueous phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 x 100 mL, 1 x 150 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (1.86 g, 2.40 mmol, 87%) as an oil.

**TLC** : CycloH/EtOAc, 3:7, **R<sub>f</sub>** = 0.3

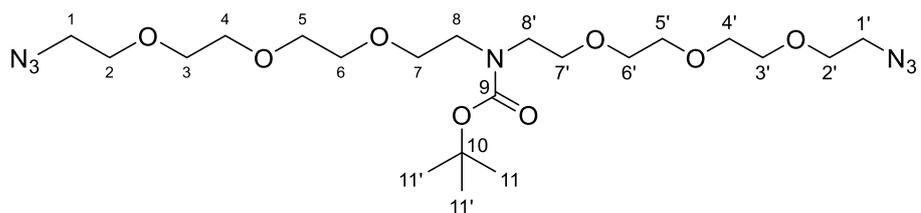
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 7.79 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H<sub>16</sub>, H<sub>14</sub>), 7.37 – 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, H<sub>13</sub>, H<sub>17</sub>), 4.15 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 3.68 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, H<sub>2</sub>), 3.64 – 3.49 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 3.47-3.35 (m, 4H, H<sub>8</sub>), 2.44 (s, 6H, H<sub>18</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 155.4, 144.7 (2C), 133.0 (2C), 129.8 (4C), 127.9 (4C), 79.5, 70.7- 69.5 (10C), 69.2 (2C), 68.7 (2C), 28.4 (3C), 21.6 (2C).

**LRMS (ESI) m/z**: 778.19 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

***tert*-Butyl bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (10)**



To a solution of 12-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diyl bis(4-methylbenzenesulfonate) (9) (1.0 equiv., 1.94 g, 2.49 mmol) in DMF (14.6 mL) was added NaN<sub>3</sub> (4.0 equiv., 648 mg, 9.98 mmol). The solution was stirred 16 h at 60 °C. After concentration, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) was added and the solution was filtrate through a celite pad, then the celite pad was washed twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20 mL). The filtrate was then concentrated to afford the title compound (1.28 g, 2.47 mmol, 99 %) as a yellow oil.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 1:1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.73 - 3.48 (m, 24H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 3.48 – 3.36 (m, 8H, H<sub>1</sub>, H<sub>8</sub>), 1.45 (s, 9H, H<sub>11</sub>).

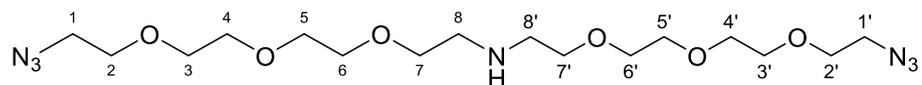
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 155.4, 79.5, 70.7 - 70.0 (12C), 50.7 (2C), 47.6 (2C), 28.4 (3C)

**LRMS (ESI) m/z:** 520.20 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

**CAS number:** 1258939-38-6

**bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amine (11)**



To a solution of *tert*-Butyl *N,N*-bis(2-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamate (**10**) (1.0 equiv., 1.24 g, 2.39 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.5 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 8.95 mL, 35.80 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 16 h. After concentration, the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to afford the titled compound (916 mg, 2.18 mmol, 92 %) as a yellow oil.

**TLC** : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 95/4.5/0.5, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.70 – 3.60 (m, 24H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 3.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, H<sub>8</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 70.7-69.8 (12C), 50.7 (2C), 48.9 (2C).

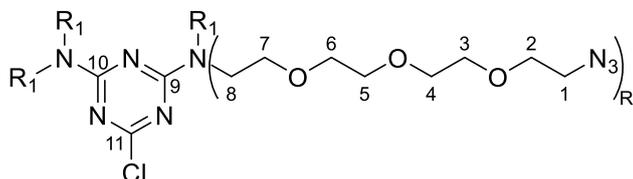
**LRMS (ESI) *m/z***: 420.25 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

**CAS number**: 1258939-39-7

1.2.3. Synthesis of the Hydrophilic head Ethyl-triazine tetra-azide (20)

***N*<sup>2</sup>,*N*<sup>2</sup>,*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-tetrakis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-6-chloro-1,3,5-triazine-2,4-diamine (19)**



To a solution of cyanuric chloride (1.0 equiv., 192 mg, 1.04 mmol) in acetonitrile (6.55 mL) was added 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (2.1 equiv., 916 mg, 2.18 mmol) and DIPEA (10.0 equiv., 1.34 g, 1.72 mL, 10.40 mmol). The reaction was stirred 5 h at 20 °C. After concentration, 50 mL of an HCl solution (aq., 10%) were added and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated. The crude material was purified by flash chromatography on silica gel (CycloH/EtOAc) to afford the title compound (830 mg, 0.873 mmol, 84%) as a yellowish oil.

**TLC** : EtOAc, **R<sub>f</sub>** = 0.3

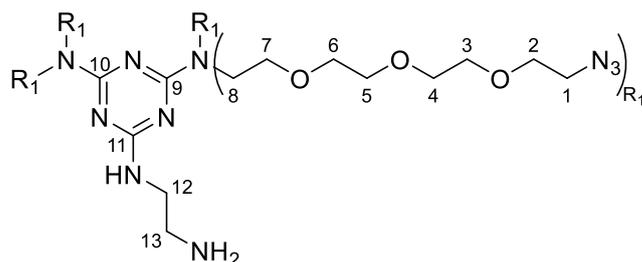
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.82 – 3.71 (m, 8H, H<sub>8</sub>), 3.70 – 3.55 (m, 48H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.2 Hz, 8H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 168.9, 164.6 (2C), 70.7-68.9 (25C), 50.7 (4C), 48.2 (2C), 47.9 (2C).

**LRMS (ESI) m/z**: 951.86 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

***N*<sup>2</sup>-(2-aminoethyl)-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-tetrakis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy) ethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (20)**



To a solution of 2-chloro-4,6-bis(1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosan-12-yl)-1,3,5-triazine (**19**) (1.0 equiv., 830 mg, 0.873 mmol) in acetonitrile (8.3 mL) was added DIPEA (20.0 equiv., 2.26 g, 2.89 mL, 17.5 mmol) and ethylene diamine (20.0 equiv., 1.05 g, 1.17 mL, 17.5 mmol). The reaction was stirred 16 h at 80 °C. The reaction mixture was concentrated and directly purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to afford the title compound (699 mg, 0.718 mmol, 82 %) as a transparent to brown oil.

**TLC** : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 95:4.5:0.5, **R<sub>f</sub>** = 0.1; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.5

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 4.98 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, NH), 3.80 – 3.51 (m, 58H, H<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>12</sub>), 3.38 (m, 10H, H<sub>1</sub>, H<sub>13</sub>), 2.87 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

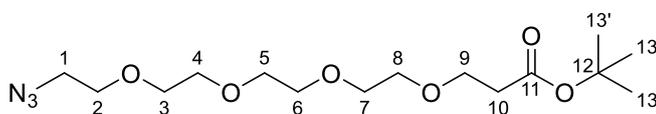
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 165.4, 164.0 (2C), 69.6-68.3 (25C), 49.6 (4C), 46.6 (4C), 42.3, 41.2.

**LRMS (ESI) m/z**: 974.89 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018,16, 8579-8584).<sup>235</sup>

1.2.4. Synthesis of the hydrophilic head PEG<sub>4</sub>-diN<sub>3</sub> (17)

neopentyl 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (12)



To a solution of 2-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethan-1-ol (**6**) (1.0 equiv., 1.0 g, 4.56 mmol) in THF (12.5 mL) under argon was introduced *tert*-butyl acrylate (1.5 equiv., 877 mg, 0.993 mL, 6.84 mmol). The solution was then cooled at 0 °C and tBuOK (0.1 equiv., 51.2 mg, 0.456 mmol) was added. The mixture was stirred at 20 °C for 72 h. After concentration, the crude was dissolved in EtOAc (50 mL) and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 50 mL). The aqueous phase was extracted thrice with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (667 mg, 1.81 mmol, 39 %) as a colorless oil.

TLC : CycloH/EtOAc, 7:3, R<sub>f</sub> = 0.2

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 3.74 – 3.58 (m, 16H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.50 (t, J = 2.6 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>13</sub>)

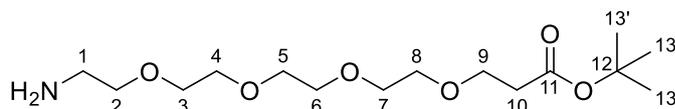
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 170.9, 80.5, 70.7-70.0 (7C), 66.9, 50.7, 36.3, 28.1 (3C).

LRMS (ESI) m/z: 370.10 [M + Na]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 8579-8584; *New J. Chem.*, 2014, **38**, 5226-5239).<sup>235,270</sup>

CAS Number: 581066-04-8

***tert*-butyl 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (13)**



To a solution of *tert*-butyl 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (**12**) (1.0 equiv., 620 mg, 1.780 mmol) in degassed MeOH (42 mL) and flushed with argon was added Pd/C (1 %, 10% on carbon, 19 mg, 0.0178 mmol). The atmosphere was replaced by H<sub>2</sub> and the mixture was stirred at 20 °C for 16 h. The mixture was then filtered through a celite pad and concentrated in vacuo. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the title compound (504 mg, 1.57 mmol, 80 %) as a colorless oil.

**TLC** : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.71 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.67 – 3.60 (m, 12H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.59 – 3.56 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 2.94 – 2.90 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.49 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 2.47 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) 1.43 (s, 9H, H<sub>13</sub>).

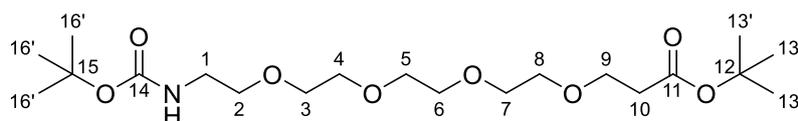
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 171.3, 80.8, 70.5-70.2 (7C), 66.9, 41.3, 36.2, 28.1 (3C).

**LRMS (ESI) m/z**: 322.13 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 8579-8584; *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 541-557).<sup>235,271</sup>

**CAS Number**: 581065-95-4

***tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oate (14)**



To a solution of *tert*-Butyl 1-amino-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oate (**13**) (1.0 equiv., 504 mg, 1.57 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11.7 mL) was added NEt<sub>3</sub> (2.0 equiv., 436 μL, 3.14 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.2 equiv., 410 mg, 432 μL, 1.88 mmol). The reaction mixture was stirred 16 h at 20 °C under argon. After concentration, the resulting crude was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and mQ water (20 mL) before the aq. phase was extracted thrice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (563 mg, 1.34 mmol, 85 %) as a yellowish oil.

TLC : CycloH/EtOAc, 1:1, R<sub>f</sub> = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.71 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.66-3.58 (m, 12H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.32 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.50 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (s, 18H, H<sub>13</sub>, H<sub>16</sub>)

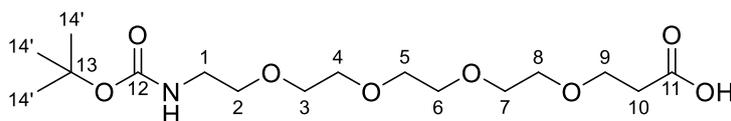
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.9, 156.0, 80.5, 79.2, 70.6 - 66.9 (8C), 40.4, 36.3, 28.4 (3C), 28.1 (3C).

**LRMS (ESI) m/z:** 444.21 [M + Na]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be consistent with reported data. (*J Label Compd Radiopharm.* 2020, **63**, 1, 15-24).<sup>272</sup>

**CAS Number:** 2138484-13-4

## 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oic acid (15)



To a solution of *tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oate (**14**) (1.0 equiv., 563 mg, 1.34 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 2 x 4.77 mL) was added solid LiOH (5.0 equiv., 163 mg, 6.68 mmol). The reaction was stirred at 20 °C for 16 h. After concentration, the crude was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and mQ water (10 mL). The aq. phase was acidified with citric acid to pH = 5.0, and then extracted five times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 20 mL). The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in order to obtain the title compound (400 mg, 1.09 mmol, 82%) as a yellow oil.

**TLC** : EtOAc, **R<sub>f</sub>** = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.78 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.75-3.60 (m, 12H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.56-3.50 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 3.35-3.25 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>14</sub>)

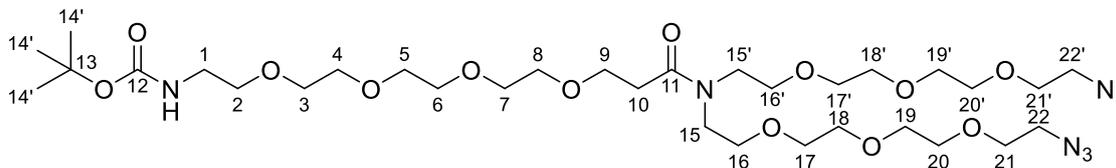
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 175.1, 156.3, 79.4, 70.7 - 70.2 (7C), 66.6, 40.4, 35.0, 28.5 (3C).

**LRMS (ESI) m/z**: 388.09 [M + Na]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*J Label Compd Radiopharm.* 2020, **63**, 1, 15-24).<sup>272</sup>

**CAS Number**: 756525-91-4

***tert*-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9,16,19,22,25- heptaosa-12-azaheptacosan-27-yl)carbamate (16)**



To a solution of 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17-pentaoxa-5-azaicosan-20-oic acid (**15**) (1.05 equiv., 180 mg, 0.493 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.06 mL) was added HOBT (1.10 equiv., 69.7 mg, 0.516 mmol), *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.10 equiv., 98.9 mg, 0.516 mmol) and NEt<sub>3</sub> (3.00 equiv., 196 μL, 1.410 mmol). The mixture was stirred at 20 °C for 15 min. A solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.05 equiv., 206 mg, 0.493 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.06 mL) was then added and the reaction mixture was stirred at 20 °C for 16 h. The reaction mixture was concentrated, then diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and washed twice with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1 M, 2 x 20 mL), twice with NaHCO<sub>3</sub> (aq., 1 M, 2 x 20 mL), and once with brine (1 x 20 mL). The organic phase was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9/1) to afford the title compound (300 mg, 0.391 mmol, 79%) as a yellowish oil.

**TLC** : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.3

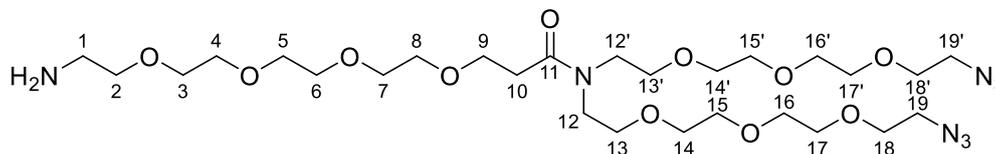
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 5.01 (s, 1H, NH), 3.78 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.67-3.50 (m, 42H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, H<sub>22</sub>), 3.30 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>14</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 171.5, 155.8, 79.0, 70.8 - 70.1 (19C), 69.9, 69.1, 67.4, 50.5, 48.7, 46.2, 33.3, 28.3 (3C).

**HRMS (ESI) m/z**, [M + Na]<sup>+</sup>: calculated for C<sub>32</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>13</sub>Na<sup>+</sup>: 789.4329; found: 789.4346.

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>**: 2866, 2102, 1708, 1636, 1107

**1-Amino-*N,N*-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amide (17)**



To a solution of *tert*-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9,16,19,22,25- heptaoxa-12-azaheptacosan-27-yl)carbamate (**16**) (1.0 equiv., 300 mg, 0.391 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.54 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4 M in dioxane, 1.47 mL, 5.87 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 4.5 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure. After concentration, the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to afford the title compound (218 mg, 0.327 mmol, 84%) as a yellow oil.

**TLC** : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 95:4.5:0.5, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 3.76 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.69 – 3.52 (m, 42H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>), 3.41 – 3.36 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, H<sub>19</sub>), 2.94 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.70 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>10</sub>).

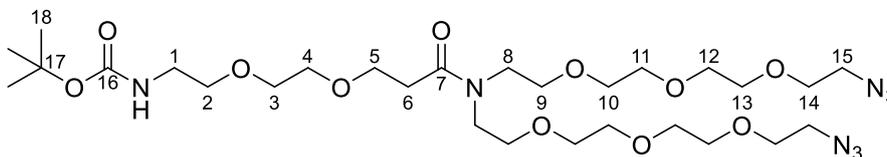
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm)**: 171.7, 71.7 - 70.1 (18C), 69.4, 69.2, 67.3, 50.7, 48.8, 46.3, 41.4, 33.5.

**HRMS (ESI) m/z**, [M + H]<sup>+</sup>: calculated for C<sub>27</sub>H<sub>55</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>: 667.3985; found: 667.4008.

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>**: 3397, 2867, 2101, 1635, 1108

1.2.5. Synthesis of the hydrophilic head PEG<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub> (47)

**tert-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9,16,19-pentaoxa-12-azahenicosan-21-yl)carbamate (46)**



To a solution of 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11-trioxa-5-azatetradecan-14-oic acid (1.0 equiv., 300.0 mg, 1.08 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.70 mL) and NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv., 328.4 mg, 0.45 mL, 3.25 mmol) was added HOBT (1.1 equiv., 160.8 mg, 1.19 mmol) and N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.05 equiv., 217.8 mg, 1.14 mmol). The solution was stirred for 15 min at 20 °C, then 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.0 equiv., 453.8 mg, 1.08 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.70 mL) was added. The reaction was stirred under Ar. at 20 °C for 16 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to obtain the titled compound (335 mg, 0.49 mmol, 46%)

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, R<sub>f</sub> = 0.4

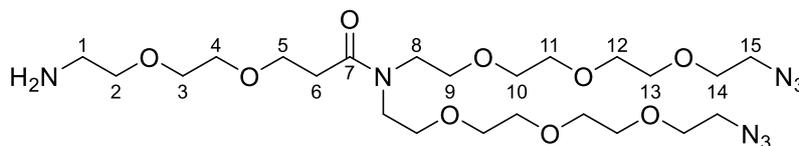
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5.06 (s, 1H, NH), 3.77 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 3.70-3.5 (m, 34H, H<sub>2-4</sub>; H<sub>8-14</sub>), 3.37 (t, J = 4;4 Hz, 4H, H<sub>15</sub>), 3.33-3.27 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.69 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>18</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.3, 156.0, 79.1, 70.8-69.3 (17C), 67.5, 50.7, 48.8, 46.3, 33.5, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>28</sub>H<sub>55</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>: 679.3990 ; found: 679.4008

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2867, 2101, 1709, 1636, 1520, 1113

**3-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)propanamide (47)**



To a solution of *tert*-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9,16,19-pentaoxa-12-azahenicosan-21-yl)carbamate (**46**) (1.0 equiv., 335 mg, 0.49 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.21 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 1.85 mL, 7.40 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 4 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the titled compound (263 mg, 0.45 mmol, 92%)

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.77 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 3.67-3.52 (m, 32H, H<sub>2-4</sub>, H<sub>9-14</sub>), 3.49 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H<sub>8</sub>), 3.37 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H<sub>15</sub>), 2.86 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 1.81 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)

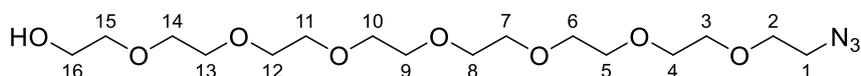
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.3, 73.2, 70.7-69.3 (15C), 67.5, 50.7, 48.7, 46.2, 41.7, 33.5.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>23</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 579.3466; found: 579.3483

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2098, 1633, 1101

### 1.2.6. Synthesis of the hydrophilic head PEG<sub>8</sub>-diN<sub>3</sub> (55)

#### 23-Azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (49)



To a solution of 23-Hydroxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosyl 4-methylbenzenesulfonate (1.0 equiv., 10.0 g, 19.06 mmol) in DMF (95.3 mL) was added NaN<sub>3</sub> (2.0 equiv., 2.5 g, 38.12 mmol). The reaction was stirred for 16 h at 60 °C. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure, the resulting crude was diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL) and filtered over celite. The filtrate was then dried under reduced pressure to obtain the title compound (7.1 g, 17.95 mmol, 94%) as an oil.

**TLC:** EtOAc/MeOH, 9:1, R<sub>f</sub> = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.72-3.71 (m, 2H, H<sub>16</sub>), 3.67-3.64 (m, 26 H, H<sub>2</sub> to H<sub>14</sub>), 3.60-3.54 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.87 (s, 1H, OH)

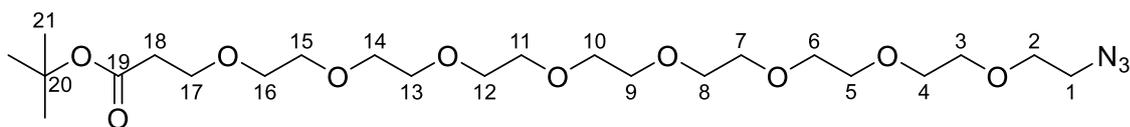
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 72.5, 70.7 - 70.0 (13C), 61.7, 50.7.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>: 396.2346 ; found: 396.2341

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2864, 2099, 1096

**CAS number:** 352439-36-2

#### *tert*-Butyl 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oate (50)



To a solution of 23-Azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol (49) (1.0 equiv., 3.00 g, 7.59 mmol) in THF (19.0 mL) under Ar. at 0 °C was added *tert*-Butyl acrylate (1.5 equiv., 1.46 g, 1.7 mL, 11.38 mmol) and potassium *tert*-Butoxide (0.1 equiv., 85 mg, 0.76 mmol). The reaction was stirred for 16 h at 20 °C. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in EtOAc (50.0 mL), then washed with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 50.0 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated. The crude was then purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH) to obtain the title compound (1.77 g, 3.38 mmol, 45%) as a yellow oil.

**TLC:** EtOAc, Rf = 0.1; EtOAc/MeOH, 9:1, Rf = 0.5

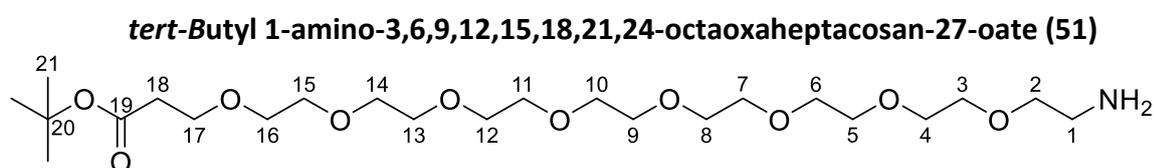
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.71-3.36 (m, 32H, H<sub>2</sub> to H<sub>17</sub>), 3.37 (t, J = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.48 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H<sub>18</sub>), 1.42 (s, 9H, H<sub>21</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.9, 80.5, 70.7 - 70.0 (15C), 66.9, 50.7, 36.3, 28.1 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>23</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup> : 541.3449 ; found: 541.3455

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2867, 2102, 1728, 1109

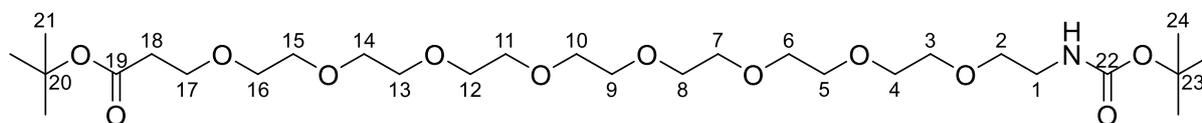
**CAS number:** 1623791-99-0



To a solution of *tert*-Butyl 1-azido-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oate (**50**) (1.00 equiv., 1.77 g, 3.380 mmol) in methanol (79.5 mL) was added Pd/C (0.01 equiv., 5% on carbon, 72 mg, 0.034 mmol). The reaction flask was sealed, degazed with Ar., then put under an H<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was stirred 16 h at 20 °C, then the reaction mixture was filtered over celite and concentrated to obtain the crude as a yellow oil. The product was directly used without further analysis.

**CAS number:** 756526-06-4

***tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29-nonaoxa-5-azadotriacontan-32-oate (52)**



*tert*-Butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-oate (**51**) was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45.8 mL) then Boc<sub>2</sub>O (1.2 equiv., 1.80 g, 1.9 mL, 8.25 mmol) and NEt<sub>3</sub> (2.0 equiv., 1.39 g, 1.9 mL, 13.75 mmol) were added. The reaction mixture was stirred 16 h at 20 °C under Ar then the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The resulting crude was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL) and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 50.0 mL), then the aq. phase was extracted three times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50.0 mL). The combined organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on

silica gel (EtOAc/MeOH) to obtain the title compound (3.14 g, 5.25 mmol, 75% over two steps) as a yellowish oil.

**TLC:** EtOAc,  $R_f = 0.1$

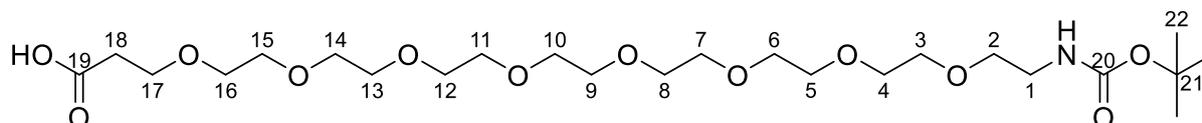
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.69 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{17}$ ), 3.65-3.56 (m, 28H,  $\text{H}_2$  to  $\text{H}_{16}$ ), 3.52 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 3.31-3.27 (m, 2H,  $\text{H}_1$ ), 2.48 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{18}$ ), 1.42 (s, 18H,  $\text{H}_{21}, \text{H}_{24}$ )

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 170.9, 156.0, 80.5, 79.1, 70.6-70.2 (15C), 66.9, 40.4, 36.3, 28.4 (3C), 28.1 (3C).

**HRMS (ESI)  $m/z$ :**  $[\text{M} + \text{H}]^+$ : calculated for:  $\text{C}_{28}\text{H}_{56}\text{NO}_{12}^+$  : 598.3803; found: 598.3793

**FTIR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** 2867, 1712, 1519, 1101

### 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29-nonaoxa-5-azadotriacontan-32-oic acid (**53**)



To a solution of *tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29-nonaoxa-5-azadotriacontan-32-oate (**52**) (1.0 equiv., 3.14 g, 5.25 mmol) in MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, 2 x 18.8 mL) was added solid LiOH (5.0 equiv., 0.64 g, 26.27 mmol). The reaction was stirred 16 h at 20 °C. The reaction mixture was then concentrated, diluted in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100.0 mL) and water (50.0 mL), and acidified with citric acid to pH 5.0. The aq. phase was then extracted five times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5x50.0 mL). The pooled organic phases were dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure in order to obtain the titled compound (2.75 g, 5.074 mmol, 97%) as a yellowish oil.

**TLC:**  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1,  $R_f = 0.39$

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.76 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{H}_{17}$ ), 3.66-3.57 (m, 28H,  $\text{H}_2$  to  $\text{H}_{16}$ ), 3.53 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_2$ ), 3.31-3.27 (m, 2H,  $\text{H}_1$ ), 2.58 (t,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{H}_{18}$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{H}_{22}$ )

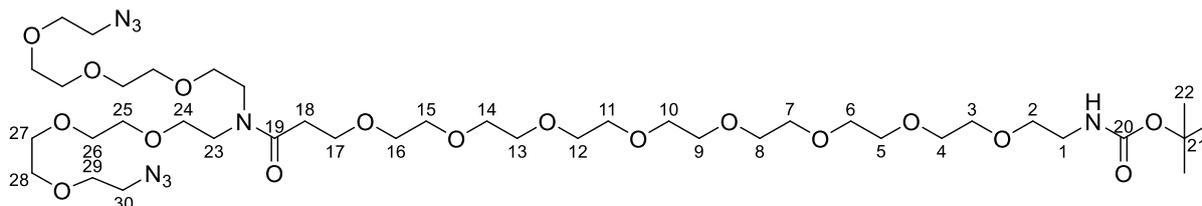
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 175.0, 156.1, 79.2, 70.5-70.2 (14C), 66.9, 44.9, 40.3, 35.4, 28.42 (3C)

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>12</sub><sup>+</sup> : 542.3177 ; found: 542.3170

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2869, 1709, 1520, 1094

**CAS number:** 756526-04-2

***tert*-Butyl (39-azido-28-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,31,34,37-undeca-oxa-28-azanonatriacontyl)carbamate (54)**



To a solution of 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29-nona-oxa-5-azadotriacontan-32-oic acid (**53**) (1.00 equiv., 1.72 g, 3.18 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10.60 mL) were added HOBt (1.10 equiv., 0.47 g, 3.5 mmol), *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.05 equiv., 0.64 g, 3.34 mmol) and NEt<sub>3</sub> (3.00 equiv., 0.96 g, 1.33 mL, 9.54 mmol). The mixture was stirred at 20 °C for 15 min. A solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexa-oxa-12-azatricosane (**11**) (1.05 equiv., 1.40 g, 3.34 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10.60 mL) was then added and the reaction mixture was stirred 16 h at 20 °C. The reaction mixture was concentrated, then the crude was purified by flash chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to afford the titled compound (2.22 g, 2.35 mmol, 74%) as a yellowish oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.4

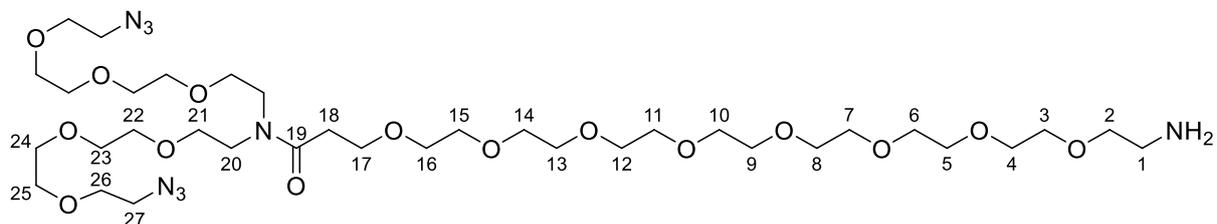
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.75 (t, J = 4.9 Hz, 2H, H<sub>17</sub>), 3.67-3.56 (m, 58H, H<sub>2</sub> to H<sub>16</sub>; H<sub>23</sub> to H<sub>29</sub>), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H<sub>30</sub>), 3.32-3.28 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.68 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>18</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>22</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.4, 156.1, 79.2, 70.8-70.1 (18C), 69.4, 69.3, 67.5, 50.7, 48.76, 46.3, 40.4, 33.5, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>40</sub>H<sub>79</sub>N<sub>8</sub>O<sub>17</sub><sup>+</sup> : 943.5563 ; found: 943.5553

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2101, 1709, 1634, 1520, 1096

**1-Amino-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxaheptacosan-27-amide (55)**



To a solution of *tert*-Butyl (39-azido-28-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-27-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,31,34,37-undecaoxa-28-azanonatriacontyl)carbamate (**54**) (1.0 equiv., 2.2 g, 2.33 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.20 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 8.75 mL, 34.99 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 4.5 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to afford the titled compound (1.63 g, 1.93 mmol, 83%) as a yellowish oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.2

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.76 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>17</sub>), 3.69-3.54 (m, 58H, H<sub>2</sub> to H<sub>17</sub>; H<sub>23</sub> to H<sub>29</sub>), 3.39 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H<sub>30</sub>), 2.97 (t, J = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>) 2.69 (t, J = 6.9 Hz, 2H, H<sub>18</sub>)

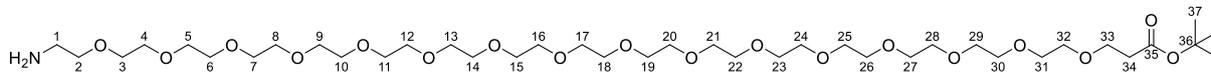
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.29, 70.8-70.1 (24C), 69.4, 69.3, 67.5, 50.7, 48.7, 46.2, 41.2, 33.5.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>35</sub>H<sub>71</sub>N<sub>8</sub>O<sub>15</sub><sup>+</sup> : 843.5039 ; found: 843.5040

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2101, 1637, 1096

### 1.2.7. Synthesis of the hydrophilic head PEG<sub>16</sub>-diN<sub>3</sub> (61)

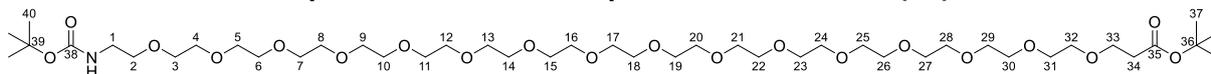
#### ***tert*-Butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaohaxenpentacontan-51-oate (57)**



To a solution of *tert*-Butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaohaxenpentacontan-51-oate (1.0 equiv., 2.00 g, 2.280 mmol) in MeOH (53.7 mL) was added palladium (0.01 equiv., 5% on carbon, 49 mg, 0.023 mmol). The reaction flask was sealed, degazed with Ar., then put under an H<sub>2</sub> atmosphere. The mixture was stirred 16 h at 20 °C. The mixture was then filtered through a celite pad and concentrated under reduced pressure. The resulting crude was directly used in the next step without further analysis.

**CAS number:** 2428400-12-6

#### ***tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53-heptadecaoha-5-azahexapentacontan-56-oate (58)**



To a solution of *tert*-Butyl 1-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaohaxenpentacontan-51-oate (**57**) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.20 mL), was added NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv., 0.69 g, 0.95 mL, 6.84 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.3 equiv., 0.65 g, 0.68 mL, 2.96 mmol). The reaction mixture was stirred under Ar. for 16 h at 20 °C, then the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and directly purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to obtain the titled compound (1 g, 1.052 mmol, 46%, two step yield) as a yellow oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **Rf** = 0.3

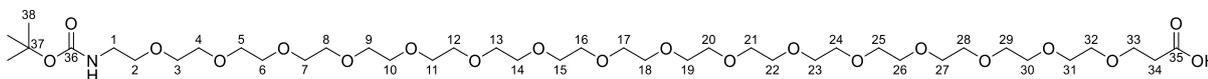
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.75-3.57 (m, 62H, H<sub>3</sub> to H<sub>33</sub>), 3.52 (t, J = 5.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.31-3.27 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.48 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H<sub>34</sub>), 1.43 (s, 18H, H<sub>37</sub>, H<sub>40</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.9, 156.0, 80.5, 79.1, 70.6-70.2 (30C), 66.9, 40.4, 36.3, 28.4 (3C), 28.1 (3C), 27.8.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>39</sub>H<sub>91</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup> : 967.6165 ; found: 967.6166

FTIR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 2866, 1711, 1520, 1096

**2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53-heptadeca-oxa-5-azahexapentacontan-56-oic acid (59)**



To a solution of *tert*-Butyl 2,2-dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53-heptadeca-oxa-5-azahexapentacontan-56-oate (**58**) (1.0 equiv., 1.00 g, 1.05 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 2 x 3.9 mL) was added solid LiOH (5.0 equiv., 0.13 g, 5.52 mmol). The reaction was stirred at 20 °C 16 h. The reaction mixture was then concentrated, diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20.0 mL) and water (20.0 mL) acidified with citric acid until pH = 5. The aq. phase was then extracted thrice times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20.0 mL). The pooled organic phases were then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure in order to obtain the titled compound (730 mg, 0.86 mmol, 78%) as a yellow oil.

TLC: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, R<sub>f</sub> = 0.1

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 3.66-3.60 (m, 64H, H<sub>3</sub> to H<sub>33</sub>), 3.52 (t, J = 5.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.33-3.30 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.60 (t, J = 6.1 Hz, 2H, H<sub>34</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>38</sub>)

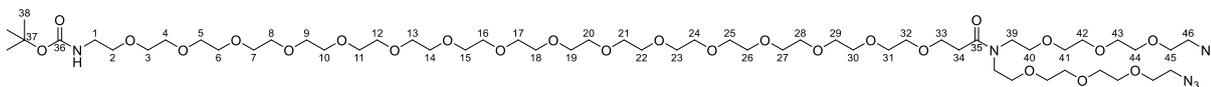
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 156.1, 79.2, 72.5, 70.7-70.2 (31C), 66.6, 40.4, 34.9, 28.4 (3C).

HRMS (ESI) m/z: [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>40</sub>H<sub>83</sub>N<sub>2</sub>O<sub>20</sub><sup>+</sup> : 911.5539 ; found: 911.5657

FTIR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 2866, 1709, 1520, 1093

CAS number: 2941512-88-3

***tert*-Butyl (63-azido-52-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-51-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,55,58,61-nonadeca-52-azatrihexacontyl)carbamate (60)**



To a solution of 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53-heptadeca-5-azahexapentacontan-56-oic acid (**59**) (1.00 equiv., 730.0 mg, 0.86 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.80 mL) were added HOBt (1.10 equiv., 127.7 mg, 0.94 mmol), NEt<sub>3</sub> (3.00 equiv., 260.7 mg, 0.36 mL, 2.58 mmol) and *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.05 equiv., 172.9 mg, 0.902 mmol). The mixture was stirred at 20 °C for 15 min. A solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.05 equiv., 378.3 mg, 0.902 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.80 mL) was then added and the reaction mixture was stirred at 20 °C under Ar. for 16 h. The reaction mixture was concentrated, then the crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to afford the titled compound (1.44 g, 1.88 mmol, 78%) as a yellowish oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.4

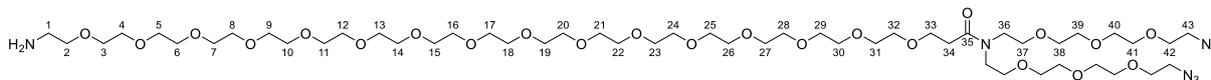
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>33</sub>), 3.68-3.51 (m, 90H, H<sub>2</sub> to H<sub>32</sub>; H<sub>39</sub> to H<sub>45</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H<sub>46</sub>), 3.33-3.28 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, H<sub>34</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>38</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.3, 156.0, 79.1, 70.8 - 70.2 (41C), 70.1, 69.4, 69.3, 67.5, 50.7, 48.8, 46.3, 40.4, 33.5, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>56</sub>H<sub>114</sub>N<sub>9</sub>O<sub>25</sub><sup>+</sup>: 1312.7926 ; found: 1312.7863

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2864, 2105, 1709, 1636, 1095

**1-Amino-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-  
3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaohexapentacontan-51-amide (61)**



To a solution of *tert*-Butyl (63-azido-52-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-51-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,55,58,61-nonadecaoha-52-azatrihexacontyl)carbamate (**60**) (1.0 equiv., 500 mg, 0.400 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.30 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 1.5 mL, 5.99 mmol). The solution was stirred for 16 h at 20 °C. The reaction mixture was then concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to obtain the titled compound (290 mg, 0.25 mmol, 63%) as an oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.94-3.91 (m, 2H, H<sub>33</sub>), 3.80-3.52 (m, 90H, H<sub>2</sub> to H<sub>32</sub>; H<sub>36</sub> to H<sub>42</sub>), 3.38 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H<sub>43</sub>), 3.21-3.14 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.69 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>34</sub>).

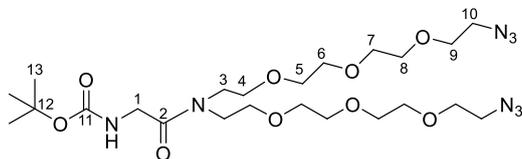
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.4, 70.8 - 69.3 (42C), 67.5, 66.8, 53.4, 50.7, 48.8, 46.3, 40.5, 33.5.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>51</sub>H<sub>103</sub>N<sub>8</sub>O<sub>23</sub><sup>+</sup> : 1195,7136; found: 1195.7092

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2104, 1634, 1093

1.2.8. Synthesis of the hydrophilic head Gly-diN<sub>3</sub> (64)

**tert-Butyl (14-azido-3-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)carbamate (63)**



To a solution of Boc-glycine (5.0 equiv., 313 mg, 1.790 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (931 μL) was added HOBt (5.0 equiv., 241 mg, 1.790 mmol), *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (4.5 equiv., 308 mg, 1.610 mmol) and NEt<sub>3</sub> (10.1 equiv., 364 mg, 500 μL, 3.6 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 10 minutes, then a solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.0 equiv., 150 mg, 0.358 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (931 μL) was added. The solution was stirred at 20 °C under Ar. for 24 h. After concentration, the crude was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) and washed twice times with NaOH (aq., 1.0 M, 2 x 20 mL) and twice with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 2 x 20 mL). The organic phase was then dried over MgSO<sub>4</sub>, concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to afford the title compound (110 mg, 0.191 mmol, 53%) as a yellow oil.

**TLC:** EtOAc, R<sub>f</sub> = 0.2

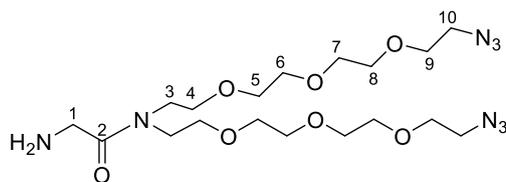
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.98 (s, 2H, H<sub>1</sub>), 3.63 – 3.42 (m, 28H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>), 3.32 (t, J = 4.3 Hz, 4H, H<sub>10</sub>), 1.38 (s, 9H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 169.1, 155.8, 79.4, 70.8 - 68.9 (12C), 50.7, 48.0, 46.3 (2C), 42.3, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 577.3317; found: 577.3318.

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2107, 1713, 1651, 1124.

**2-Amino-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acetamide (64)**



To a solution of *tert*-Butyl (14-azido-3-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2-oxo-6,9,12-trioxa-3-azatetradecyl)carbamate (**63**) (1.0 equiv., 110 mg, 0.191 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.24 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 0.715 mL, 2.86 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 16 h. After concentration the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to afford the title compound (68 mg, 0.143 mmol, 75 %) as a yellow oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.7 ; EtOAc, **R<sub>f</sub>** = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.73 – 3.46 (m, 30H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>), 3.45 – 3.35 (m, 4H, H<sub>10</sub>), 2.44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

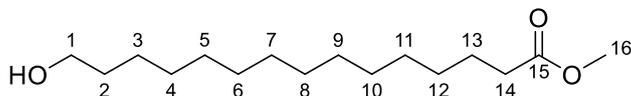
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 172.9, 70.7- 68.9 (12C), 50.7, 48.0, 46.4 (2C), 42.8.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 477.2780; found: 477.2794

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2100, 1647, 1117.

1.2.9. Synthesis of hydrophilic head Pentadecanamide-diN<sub>3</sub> (73)

**Methyl 15-Hydroxypentadecanoate (66)**



To a solution of 15-Hydroxypentadecanoic acid (1.0 equiv., 1.00 g, 3.87 mmol) in methanol (19.30 mL) was added acetyl chloride (3.0 equiv., 0.911 g, 0.839 mL, 11.60 mmol). The solution was stirred at 65 °C for 20 h. After concentration, the crude was diluted and concentrated thrice with toluene (3 x 20.0 mL). The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (840 mg, 3.08 mmol, 80%) as a white solid.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 8:2, **R<sub>f</sub>** = 0.2

**Mp:** 51 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.66 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.64 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.66 – 1.22 (m, 25H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>).

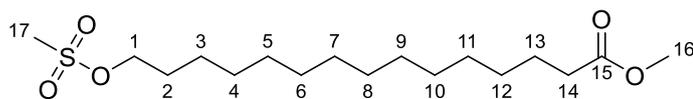
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 174.4, 63.1, 51.4, 34.1, 32.8, 29.6 - 29.2 (9C), 25.7, 25.0.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 273.2430; found: 273.2437

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*ACS Catal.* 2020, **10** (9), 5230-5235).<sup>252</sup>

**CAS number:** 76529-42-5

### Methyl 15-((Methylsulfonyl)oxy)pentadecanoate (**67**)

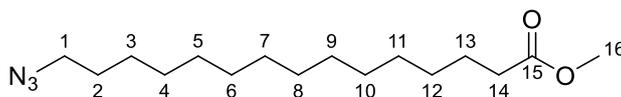


To a solution of Methyl 15-Hydroxypentadecanoate (**66**) (1.0 equiv., 450 mg, 1.65 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8.260 mL) at 0 °C was added  $\text{NEt}_3$  (2.0 equiv., 334 mg, 0.459 mL, 3.30 mmol) and mesylchloride (1.5 equiv., 283 mg, 0.192 mL, 2.48 mmol). The solution was stirred for 3 h at 0 °C under Ar., then concentrated under reduced pressure. The crude was diluted with EtOAc (20.0 mL), then washed with  $\text{NaHCO}_3$  (aq., 1.0 M, 20.0 mL) and brine (20.0 mL). The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated under reduced pressure, and the resulting crude was then directly used in the next step without further purification.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 8:2, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**CAS number:** 869734-95-2

### Methyl 15-Azidopentadecanoate (**68**)



To a solution of Methyl 15-((Methylsulfonyl)oxy)pentadecanoate (**67**) (1.0 equiv., 579 mg, 1.65 mmol) in DMF (8.26 mL) was added  $\text{NaN}_3$  (1.5 equiv., 161 mg, 2.48 mmol). The solution was stirred 16 h at 20 °C, then 5 h at 60 °C. After concentration, the crude was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20.00 mL), filtered over a pad of celite and washed 5 times with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 x 20.0 mL), concentrated then diluted in EtOAc (25.0 mL) washed once with  $\text{NaHCO}_3$  (aq., 1.0 M, 20.0 mL) and thrice with brine (3 x 25.0 mL). The organic phase was dried over  $\text{MgSO}_4$  and concentrated to afford the title compound (300 mg, 1.01 mmol, 61%) as an oil.

**TLC:** EtOAc 100%, **R<sub>f</sub>** = 0.5

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.66 (s, 3H,  $\text{H}_{16}$ ), 3.25 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_1$ ), 2.30 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{H}_{14}$ ), 1.65 – 1.56 (m, 4H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_{13}$ ), 1.40-1.20 (m, 20H,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{10}$ ,  $\text{H}_{11}$ ,  $\text{H}_{12}$ ).

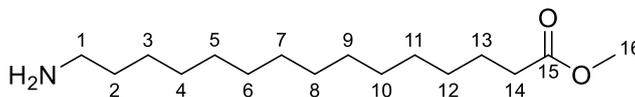
**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 173.9, 51.1, 51.0, 33.7, 29.2 - 28.4 (10C), 26.3, 24.5.

**HRMS (ESI)  $m/z$ ,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ :** calculated for  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}^+$ : 320.2319; found: 320.2339

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Cellulose*, 2005, **12**, 209-219).<sup>253</sup>

**CAS number:** 151309-55-6

**Methyl 15-Aminopentadecanoate (69)**



To a solution of Methyl 15-Azidopentadecanoate (**68**) (1.0 equiv., 580 mg, 1.95 mmol) in THF (19.5 mL) was added PPh<sub>3</sub> (2.5 equiv., 1264 mg, 4.82 mmol). The solution was stirred under inert atmosphere 16 h at 20 °C. Then water (4.0 mL) was added. The solution was stirred 72 h at 20 °C. 10 mL of a solution of HCl 1% was then added (The yellowish transparent solution turned white opaque). The solution was stirred 2 h at 20 °C, then concentrated. The resulting crude was then directly purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the title compound (467 mg, 1.72 mmol, 88%) as a white solid.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**Mp:** 65 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.66 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 2.76 – 2.70 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.58 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.29 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.61 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, H<sub>13</sub>), 1.49 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.26 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

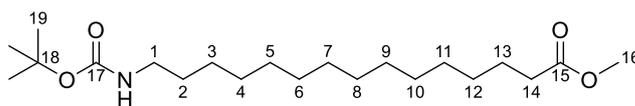
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 174.4, 51.4, 41.8, 34.1, 32.6, 29.6 - 29.2 (9C), 26.8, 25.0.

**LRMS (ESI) m/z:** 272.26 [M + H]<sup>+</sup>.

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*J. Org. Chem.* 2013, **78**, 2, 582–589).<sup>254</sup>

**CAS number:** 862743-30-4 (hydrochloride salt form)

### Methyl 15-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentadecanoate (70)



To a solution of methyl 15-Aminopentadecanoate (**69**) (1.0 equiv., 460 mg, 1.69 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (11.30 mL) was added NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv., 514 mg, 0.707 mL, 5.08 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (1.2 equiv., 443 mg, 0.435 mL, 2.03 mmol). The solution was stirred for 6 h at 20 °C under Ar. The reaction mixture was then concentrated and directly purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (515 mg, 1.39 mmol, 82%) as a white solid.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 9:1, R<sub>f</sub> = 0.4

**Mp:** 58 °C

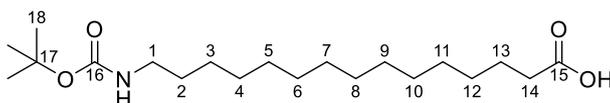
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 4.49 (s, 1H, NH), 3.66 (s, 3H, H<sub>16</sub>), 3.10 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 2.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.60 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>13</sub>), 1.44 (m, 11H, H<sub>2</sub>, H<sub>19</sub>), 1.26 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 174.4, 156.0, 79.0, 51.4, 40.7, 34.1, 30.1, 29.6 - 29.2 (9C), 28.4 (3C), 26.8, 25.0.

**HRMS (ESI) m/z, [M + Na]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>21</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>: 394.2933; found: 394.2932

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3381, 2917, 2871, 2848, 1739, 1683, 1162.

### 15-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentadecanoic acid (**71**)



To a solution of Methyl 15-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentadecanoate (**70**) (1.0 equiv., 510.0 mg, 1.37 mmol) in MeOH/THF/H<sub>2</sub>O (1:1:1, 3 x 4.6 mL) was added solid LiOH (3.0 equiv., 98.6 mg, 4.12 mmol). The solution was stirred for 9 h at 20 °C. The reaction mixture was then acidified with HCl (aq., 1.0 M) to pH = 4-5, and was then concentrated. The resulting crude was dissolved in EtOAc (25.0 mL) and water (pH = 4, 25.0 mL) and extracted thrice with EtOAc (3 x 25.0 mL). The pooled organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to obtain the title compound (350.0 mg, 0.979 mmol, 71%) as a white solid.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.4

**Mp:** 83 °C

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 4.52 (s, 1H, NH), 3.09 (s, 2H, H<sub>1</sub>), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.63 (q, J = 7.4 Hz, 2H, H<sub>13</sub>), 1.44 (s, 11H, H<sub>2</sub>, H<sub>18</sub>), 1.36 – 1.22 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

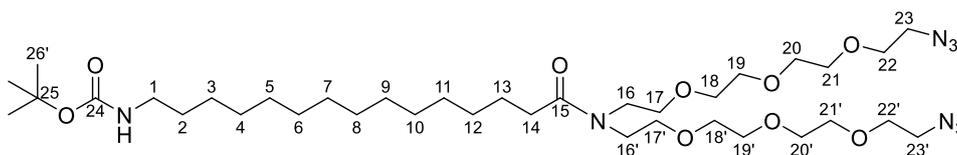
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 178.7, 79.2, 40.7, 33.9, 30.0, 29.5 - 29.0 (10C), 28.4 (3C), 26.8, 24.7..

**HRMS (ESI) m/z, [M + Na]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub>Na<sup>+</sup>: 380.2777; found: 380.2780

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3366, 2916, 2871, 2850, 1702, 1682.

**CAS number:** 1661040-68-1

***tert*-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptacosan-27-yl)carbamate (72)**



To a solution of 15-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)pentadecanoic acid (**71**) (1.05 equiv., 246.0 mg, 0.688 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.95 mL) was added NEt<sub>3</sub> (3.00 equiv., 198.0 mg, 0.273 mL, 1.97 mmol), then HOBt (1.1 equiv., 97.4 mg, 0.721 mmol) and *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.10 equiv., 138.0 mg, 0.721 mmol). The mixture was stirred at 20 °C under Ar. for 10 min. A solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.0 equiv., 274.0 mg, 0.655 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.95 mL) was then added and the reaction mixture was stirred at 20 °C under Ar. for 20 h. The reaction mixture was then diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30.0 mL) washed with mQ water (30.0 mL), then the aq. phase was extracted twice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 20.0 mL). The pooled organic phases were washed once with brine (50.0 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated. The resulting crude was then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (399.0 mg, 0.526 mmol, 80 %) as a colorless oil.

**TLC:** EtOAc, R<sub>f</sub> = 0.3

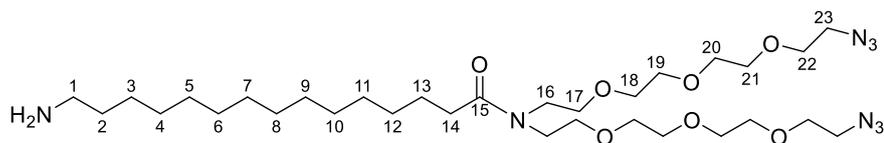
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 4.49 (s, 1H, NH), 3.71 – 3.50 (m, 28H, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>, H<sub>22</sub>), 3.38 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H<sub>23</sub>), 3.09 (s, 2H, H<sub>1</sub>), 2.39 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.61 (q, J = 7.5 Hz, 2H, H<sub>13</sub>), 1.50 – 1.40 (m, 11H, H<sub>2</sub>, H<sub>26</sub>), 1.35 – 1.21 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 173.8, 156.0, 81.0, 70.8 - 69.3 (11C), 50.7 (2C), 48.8 (2C), 46.3, 33.0, 30.1, 29.7 - 29.3 (10C), 28.4 (3C), 26.8, 25.4.

**HRMS (ESI) m/z, [M + Na]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>36</sub>H<sub>70</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup>: 781.5163; found: 781.5162

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2923, 2853, 2099, 1708, 1636, 1115.

### 15-Amino-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)pentadecanamide (73)



To a solution of *tert*-Butyl (1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptacosan-27-yl)carbamate (**71**) (1.0 equiv., 540 mg, 0.711 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.74 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 2.67 mL, 10.700 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 4.5 h. After concentration, the crude material was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the title compound (337 mg, 0.511 mmol, 72 %) as a yellow oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.71 – 3.51 (m, 28H, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>, H<sub>22</sub>), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H<sub>23</sub>), 2.94 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 2.34 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.72 (q, J = 7.6 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.60 (q, J = 7.4 Hz, 2H, H<sub>13</sub>), 1.40 – 1.19 (m, 20H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>).

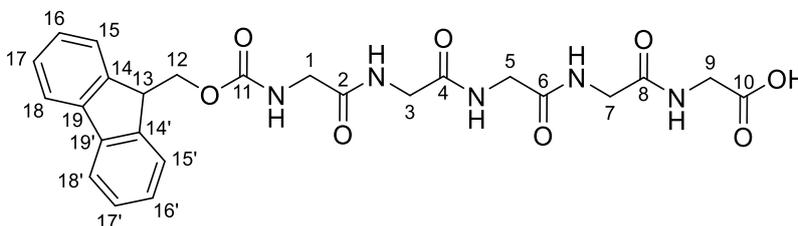
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 173.5, 70.6 - 69.2 (11C), 50.5 (2C), 48.5 (2C), 46.0, 39.9, 32.9, 29.4 - 28.8 (8C), 28.0 (2C), 26.3, 25.1.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>31</sub>H<sub>63</sub>N<sub>8</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>: 659.4820; found: 659.4855

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3414, 2922, 2853, 2100, 1635, 1116.

### 1.2.10. Synthesis of the hydrophilic head pentaglycine-diN<sub>3</sub> (78)

#### **(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)glycylglycylglycylglycylglycine (76)**



#### **Solid-phase peptide synthesis protocol:**

**Resin swelling:** 2-Chlorotrityl resin (1 equiv., 1.0 g, 1.0 mmol) was dried in vacuo, dissolved in DCM (8 mL) and stirred with an end-over-end mixer.

**Resin activation:** SOCl<sub>2</sub> (13.8 equiv., 1.0 mL, 13.8 mmol) was added and the mixture was vortexed for 1 h. Solvents were drained and the activated resin was washed with 2 x *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) (5 mL), once with NMP/2,4,6-trimethylpyridine (TMP) (4/1, v/v, 5 mL), then 2 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL). Solvents were drained and the red resin was used immediately.

**First AA:** Add a solution of Fmoc-Glycine (10 equiv., 3.0 g, 10.1 mmol) and TMP (7.5 equiv., 1.0 mL, 7.5 mmol) in DCM (6 mL) and stir for 1 h.

**Washing conditions:** Wash with 2 x NMP (5 mL) then 2 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) for 30 sec each.

**Resin capping:** Add a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/TMP (80/15/5, v/v/v, 10 mL) and stir for 15 min. Solvents were removed and resin was washed as before.

**Fmoc deprotection:** A solution of piperidine/NMP (2/8, v/v, 10 mL) was added and the mixture was stirred for 15 min. This operation was repeated one more time. Solvents were removed and resin was washed as before. For the first AA only, all deprotection solutions were combined and analyzed by UV (dilution x100 in EtOH, 301 nm,  $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) to calculate the amount of Fmoc that was deprotected, thus the loading.

**Elongation:** To a solution of Fmoc-Glycine (3.0 equiv., 0.9 g, 3.0 mmol), COMU (3.0 equiv., 1.3 g, 3.0 mmol) in NMP (3 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was added TMP (7.5 equiv., 1.0 mL, 7.5 mmol). Resin was washed as before.

**Kaiser test:** Put a few beads in a small Eppendorf and add 3 drops of solution A, B and C, in that order. Heat to 80 °C for 3 min. If the beads are brown, continue the synthesis. If the solution or the beads are blue, the coupling isn't complete and reveal the presence of primary amines. If so, a second coupling with half the quantity of AA and base was performed. solution A (ninhydrin in EtOH (0.5g/10 mL)), B (phenol in EtOH (40g/10 mL)) and C (KCN/water/pyridine (13 mg/0.2 mL/9.8 mL))

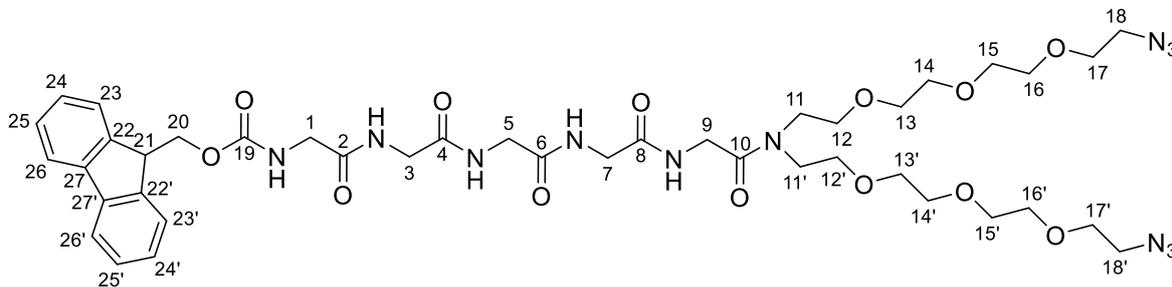
**Repeat the cycle:** deprotection Fmoc, wash, elongation, wash, kaiser test, and wash until the final peptide.

**Resin cleavage:** After the last wash step, the resin was washed again 6 x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8 mL) to remove a maximum of NMP. The resin was then recovered in a round bottom flask, and dried under vacuum for 1 h without heating. A solution of TFA/water/TIPS (90:5:5, v/v/v, 10 mL) was then added and the resin was stirred for 30 min. Afterwards, the resin was filtered off and washed with TFA (3 x 3 mL). Solvents were removed in vacuo until ~1 mL of solvents is remaining and the residual solution was added dropwise into a falcon containing 10 mL of -20 °C diethyl ether to precipitate the peptide. After 15 min at -20 °C, the whole mixture was centrifugated at 4000 rpm for 3 x 5 min. Solvents were discarded and the peptide was dried under vacuum for 1 h to get rid of diethyl ether in order to obtain the title peptide (576 mg, 0.9 mmol, 90%). The purity was assessed by HPLC, and the product analysed by mass spectrometry and directly used without further purification.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>:526.1938; found: 526.1994

**CAS number:** 132742-00-8

**(9H-Fluoren-9-yl)methyl (26-azido-15-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-2,5,8,11,14-pentaoxo-18,21,24-trioxa-3,6,9,12,15-pentaazahexacosyl)carbamate (77)**



To a solution of Fmoc-Glycylglycylglycylglycylglycine (**76**) (1.00 equiv., 116 mg, 0.22 mmol) in DMF (1.47 mL) was added HATU (1.05 equiv., 88.13 mg, 0.23 mmol) and 2,4,6-trimethylpyridine (3.00 equiv., 0.088 mL, 0.66 mmol). The solution was stirred for 15 min at 20 °C under Ar., then 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (1.30 equiv., 120.4 mg, 0.29 mmol) was added. The solution was stirred 3 days at 20 °C under Ar. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and then directly purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to obtain the title compound (150 mg, 0.16 mmol, 73%) as an oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.7 ; EtOAc, **R<sub>f</sub>** = 0.3 ; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.2

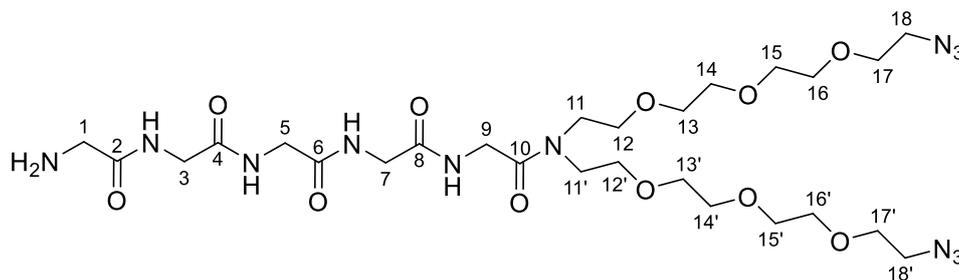
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.15 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, NH), 7.88 (s, 1H, NH), 7.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>26</sub>), 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H<sub>23</sub>), 7.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H<sub>24</sub>), 7.27 (t, *J* = 7.5, 2H, H<sub>25</sub>), 6.67 (s, 1H, NH), 4.45 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H<sub>20</sub>), 4.26 – 4.09 (m, 8H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>9</sub>), 4.01 (s, 3H, H<sub>21</sub>, H<sub>1</sub>), 3.71 – 3.28 (m, 32H, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.3 - 169.0 (5C), 160.7, 143.9 (2C), 141.3 (2C), 127.7 (2C), 127.1 (2C), 125.1 (2C), 119.9 (2C), 70.6 - 69.9 (16C), 68.6, 52.3, 50.6 (4C), 47.1.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>N<sub>12</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>: 927.4325; found: 927.4359

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2100, 1712, 1694, 1628, 1508, 1105

**2-(2-(2-(2-(2-Aminoacetamido)acetamido)acetamido)acetamido)-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)acetamide (78)**



To a solution of (9H-Fluoren-9-yl)methyl N-[[[([[[[([bis(2-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy)ethyl]carbonyl]methyl]carbonyl]methyl]carbonyl]methyl]carbonyl]methyl (77) (1.0 equiv., 200 mg, 0.22 mmol) in DMF (8.0 mL) was added piperidine (2.0 mL). The reaction was stirred for 2 h at 20 °C. The reaction mixture was then concentrated and directly purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) in order to obtain the title compound (100 mg, 0.14 mmol, 66%).

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.1

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 8.49 (s, 1H, NH), 8.05 (s, 1H, NH), 7.84 (s, 1H, NH), 7.53 (s, 1H, NH), 4.22 – 4.08 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 4.06 - 3.85 (m, 6H, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>7</sub>), 3.76 – 3.45 (m, 30H, H<sub>1</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>), 3.38 (t, J = 5.0 Hz, 4H, H<sub>18</sub>).

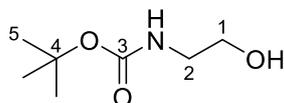
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 187.2, 170.5 - 169.3 (4C), 70.7 - 68.9 (12C), 50.7 (2C), 48.0 (2C), 46.5, 43.2 - 42.8 (3C), 41.2.

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>26</sub>H<sub>49</sub>N<sub>12</sub>O<sub>11</sub><sup>+</sup>: 705.3644; found: 705.3665

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2868, 2101, 1640, 1101

1.2.11. Synthesis of the hydrophilic head Sulfone-diN<sub>3</sub> (87)

**tert-Butyl (2-hydroxyethyl)carbamate (79)**



To a solution of ethanolamine (1.1 equiv., 5.6 g, 5.5 mL, 91.68 mmol) in THF (250.0 mL) was added dropwise a solution of Boc<sub>2</sub>O (1.0 equiv., 18.9 g, 19.9 mL, 86.49 mmol) in THF (25.0 mL). The reaction mixture was stirred at 20 °C for 6 h. The reaction mixture was then concentrated, diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) and washed thrice with NaHCO<sub>3</sub> (aq. phase, saturated, 3 x 30 mL). The organic phase was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to afford the title compound (11.2 g, 69.53 mmol, 76%) as a transparent oil.

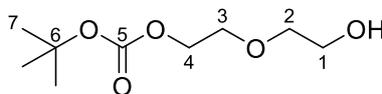
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.68 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3.27 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, H<sub>5</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 156.8, 79.7, 62.5, 43.2, 28.4 (3C).

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*Polym. Chem.*, 2017,**8**, 1206-1216).<sup>273</sup>

**CAS number:** 26690-80-2

**tert-Butyl 3-(2-hydroxyethoxy)propanoate (83)**



To a solution of ethylene glycol (3.00 equiv., 10.0 g, 9.0 mL, 161.11 mmol) in THF (40.0 mL) was added potassium 2-methylbutan-2-olate (0.15 equiv., 4.7 mL, 8.06 mmol). Then *tert*-butyl acrylate (1.00 equiv., 6.9 g, 7.8 mL, 53.71 mmol) was added. The reaction was stirred at 20 °C under Ar. for 16 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), to obtain the title compound (3.0 g, 15.77 mmol, 29%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.76 – 3.67 (m, 4H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>), 3.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 2.50 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.38 – 2.28 (m, 1H, OH), 1.45 (s, 9H, H<sub>7</sub>).

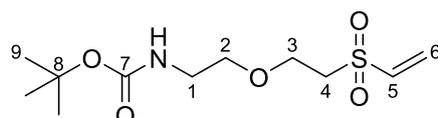
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.2, 80.9, 71.9, 66.4, 61.6, 36.1, 28.1 (3C).

**LCMS (ESI) m/z:** [M + Na]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>4</sub><sup>+</sup>: 213.1103; found: 213.1105

Analyses were found to be in adequation with reported data. (*ACS Med. Chem. Lett.* 2019, **10** (5), 767–772).<sup>274</sup>

**CAS number:** 671802-00-9

***tert*-Butyl (2-(2-(vinylsulfonyl)ethoxy)ethyl)carbamate (81)**



To a solution of divinyl sulfone (4.0 equiv., 10 g, 84.64 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (38.50 mL) was added DMAP (0.5 equiv., 1.29 g, 10.58 mmol) and N-boc-ethanolamine (1.0 equiv., 3.41 g, 3.27 mL, 21.16 mmol). The solution was stirred under Ar. at 35 °C for 48 h. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, then purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (4.02 g, 14.39 mmol, 68%) as a yellow oil.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 1:1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

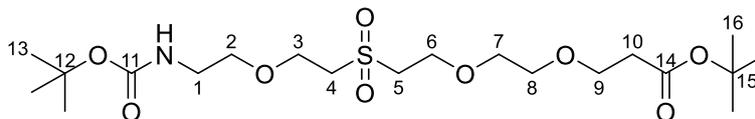
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.71 (dd, *J* = 16.6, 9.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.42 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.11 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 3.86 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 3.52 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.34 – 3.28 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.25 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 1.44 (s, 9H, H<sub>9</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 155.9, 137.7, 129.1, 70.3, 64.2, 54.9, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + Na]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>5</sub>S<sup>+</sup>: 302.1038; found: 302.1042

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 1707, 1518, 1365, 1314, 1123, 909, 730

***tert*-Butyl 3-(2-(2-((2-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethyl)sulfonyl)ethoxy)ethoxy)propanoate (**84**)**



To a solution of *tert*-Butyl N-{2-[2-(ethenesulfonyl)ethoxy]ethyl}carbamate (**81**) (1.0 equiv., 2.00 g, 7.16 mmol) in DCM (13.0 mL) was added *tert*-butyl 3-(2-hydroxyethoxy)propanoate (**83**) (2.0 equiv., 2.72 g, 14.32 mmol) and PPh<sub>3</sub> (0.1 equiv., 0.19 g, 0.72 mmol). The reaction was stirred at 40 °C for 16 h. The reaction mixture was then concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc) to obtain the title compound (2.00 g, 4.26 mmol, 59%) as a yellow oil.

**TLC:** CycloH/EtOAc, 1:1, **R<sub>f</sub>** = 0.2

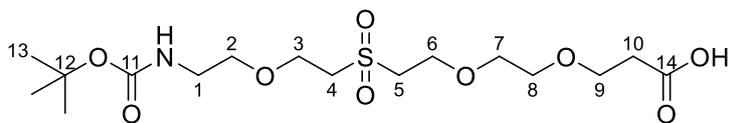
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.91 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>), 3.69 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>9</sub>), 3.66 – 3.58 (m, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.54 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 3.38 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H<sub>1</sub>), 3.31 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>), 2.48 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (d, *J* = 2.0 Hz, 18H, H<sub>13</sub>, H<sub>16</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 170.7, 156.0, 80.7, 79.3, 70.4 - 70.0 (4C), 66.8, 64.9, 64.3, 55.0, 54.8, 36.2, 28.5 (3C), 28.1 (3C).

**HRMS (ESI) *m/z*:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>9</sub>S<sup>+</sup> :470.2424; found: 470.2449

**FTIR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>:** 2870, 1712, 1505, 1365, 1316, 1107

**3-(2-(2-((2-(2-((tert-Butoxycarbonyl)amino)ethoxy)ethyl)sulfonyl)ethoxy)ethoxy)propanoic acid (85)**



To a solution of tert-Butyl 3-(2-{2-[2-(2-[[tert-butoxy]carbonyl]amino}ethoxy)ethanesulfonyl]ethoxy}ethoxy)propanoate (**84**) (1.0 equiv., 450 mg, 0.96 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 2 x 3.2 mL) was added LiOH (5.0 equiv., 114.75 mg, 4.79 mmol). the reaction was stirred at 20 °C for 16 h. The reaction mixture was diluted in mQ water (10 mL), then washed thrice with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 15 mL). The aqueous phase was then acidified by HCl (aq., 1.0 M) until pH = 4, then extracted five times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 15 mL) and three times with EtOAc (3 x 20 mL). The organic phase was dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to obtain the title compound (240 mg, 0.58 mmol, 61%)

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.2

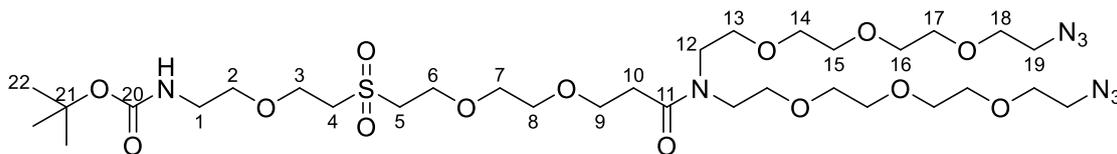
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 6.93 (s, 1H, COOH), 5.27 (s, 1H, CONH), 3.95-3.87 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>), 3.77-3.71 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 3.66-3.60 (m, 4H, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.59-3.52 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 3.47 – 3.37 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.36-3.23 (m, 4H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>), 2.61-2.53 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.45 (s, 9H, H<sub>13</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 175.4, 157.0, 79.7, 70.1 - 66.5 (5C), 64.9, 57.4, 55.0, 54.6, 35.0, 28.4 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>9</sub>S<sup>+</sup>: 414.1798; found: 414.1803

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 2924, 1705, 1521, 1365, 1314, 1104

***tert*-Butyl (2-(2-((1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9,16,19-pentaoxa-12-azahenicosan-21-yl)sulfonyl)ethoxy)ethyl)carbamate (**86**)**



To a solution of 3-(2-{2-[2-(2-[[*tert*-Butoxy]carbonyl]amino}ethoxy)ethanesulfonyl]ethoxy}ethoxy)propanoic acid (**85**) (1.0 equiv., 200.0 mg, 0.48 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.61 mL) was added NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv., 146.8 mg, 202 μL, 1.45 mmol), HOBt (1.1 equiv., 71.9 mg, 0.53 mmol) and then N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (1.05 equiv., 97.4 mg, 0.51 mmol). The reaction mixture was stirred under Ar. for 15 min, then 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.05 equiv., 213.0 mg, 0.51 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.61 mL) was added. The reaction mixture was stirred for 16 h at 20 °C under Ar. The crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH) to afford the title compound (227.0 mg, 0.28 mmol, 58%) as a yellowish oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5, **R<sub>f</sub>** = 0.4

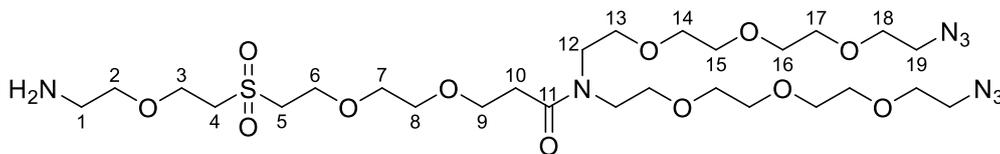
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5.29 (s, 1H, CONH), 3.95 – 3.85 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>), 3.80 – 3.72 (m, 2H, H<sub>9</sub>), 3.70 – 3.50 (m, 34H, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>12-18</sub>), 3.37 (m, 6H, H<sub>1</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>), 3.31 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, H<sub>19</sub>), 2.67 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.45 – 1.41 (m, 9H, H<sub>22</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.1, 156.0, 79.2, 70.7 - 69.3 (17C), 67.4, 64.9, 64.3, 55.0, 54.8, 50.7, 48.7, 46.2, 33.5, 28.5 (3C).

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>32</sub>H<sub>63</sub>N<sub>8</sub>O<sub>14</sub>S<sup>+</sup> : 815.4184; found: 815.4189

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2869, 2101, 1705, 1635, 1363, 1105

**3-(2-(2-((2-(2-Aminoethoxy)ethyl)sulfonyl)ethoxy)ethoxy)-N,N-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)propanamide (87)**



To a solution of *tert*-Butyl N-(2-{2-[2-(2-{2-[bis(2-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)carbamoyl]ethoxy}ethoxy)ethanesulfonyl]ethoxy}ethyl)carbamate (**86**) (1.0 equiv., 497.0 mg, 0.61 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.96 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 2.29 mL, 9.15 mmol). The solution was stirred at 20 °C for 4 h. The reaction mixture was then concentrated under reduced pressure and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the title compound (290.0 mg, 0.41 mmol, 67%)

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.3

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.90 (m, 4H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>), 3.75 (t, *J* = 6.8, 2H, H<sub>9</sub>), 3.70 – 3.48 (m, 34H, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>12-18</sub>), 3.41 – 3.29 (m, 8H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>19</sub>), 2.87 (t, *J* = 5.3, 2H, H<sub>1</sub>), 2.67 (t, *J* = 6.8, 2H, H<sub>10</sub>), 1.63 (s, 2H, NH<sub>2</sub>).

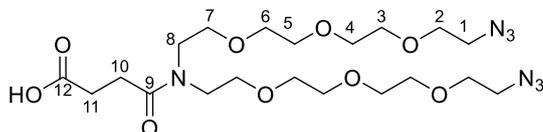
**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 171.2, 73.3, 70.7-69.3 (15C), 67.4, 64.8, 64.3, 55.0, 54.8, 50.7, 48.7, 46.2, 41.6, 33.5.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>27</sub>H<sub>55</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sup>+</sup> :715.3660; found: 715.3662

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2866, 2098, 1635, 1352, 1102

1.2.12. Synthesis of the Triblock hydrophilic head (PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-diN<sub>3</sub> (**95**)

**1-Azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-aza-hexadecan-16-oic acid (**89**)**



To a solution of 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.1 equiv., 550 mg, 1.31 mmol) and NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv., 500  $\mu$ L, 3.58 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7.95 mL) was added succinic anhydride (1.0 equiv., 120 mg, 1.19 mmol). The solution was stirred for 2 h at 20 °C under Ar. The reaction mixture was then diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL), then washed three times with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 3 x 50 mL). The organic phase was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to obtain the title compound (576 mg, 1.11 mmol, 93%). The resulting product was directly used without further purification.

**TLC:** EtOAc, R<sub>f</sub> = 0.1

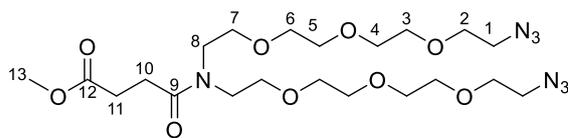
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 3.70 – 3.54 (m, 28H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.39 (td, J = 5.1, 1.8 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.85 – 2.77 (m, 2H, H<sub>11</sub>), 2.69 – 2.62 (m, 2H, H<sub>10</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm):** 174.8, 173.8, 70.8 - 68.8 (80C), 50.7 (2C), 49.3 (2C), 46.6, 30.9, 30.5, 28.1 (2C).

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 520.2731; found: 520.2754

**FTIR  $\nu$  cm<sup>-1</sup>:** 2869, 2102, 1731, 1640, 1118.

**Methyl 1-Azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oate (90)**



To a solution of 1-Azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oic acid (**89**) (1.0 equiv., 576 mg, 1.11 mmol) in methanol (7.4 mL) was added  $\text{SOCl}_2$  (3.0 equiv., 240  $\mu\text{L}$ , 3.33 mmol) dropwise. The solution was stirred at reflux (65  $^\circ\text{C}$ ) for 3 h. The reaction mixture was then concentrated to obtain the title compound (590 mg, 1.106 mmol, 99%) as an oil.

**TLC:** EtOAc,  $R_f = 0.3$

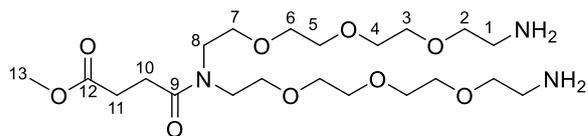
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 3.77 – 3.52 (m, 31H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>), 3.43 – 3.35 (m, 4H, H<sub>1</sub>), 2.72 (td,  $J = 6.5, 1.1$  Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 2.63 (td,  $J = 6.5, 1.1$  Hz, 2H, H<sub>10</sub>).

**$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm):** 173.7, 171.8, (72.5, 71.4, impurities), 70.8 - 69.2 (8C), 61.8 (impurity), 51.7, 50.7, 48.7 (2C), 46.4, 42.7, 29.3, 28.1 (2C).

**HRMS (ESI)  $m/z$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ :** calculated for  $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{O}_9^+$ : 534.2888; found: 534.2891

**FTIR  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ :** 2866, 2098, 1734, 1640, 1112.

**Methyl 1-Amino-12-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oate (91)**



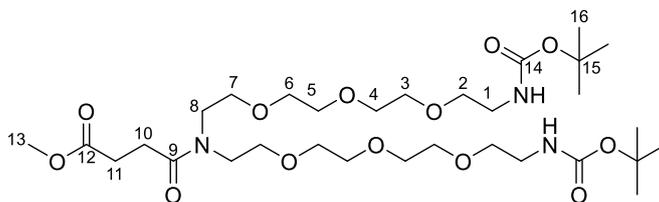
To a solution of Methyl 1-Azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oate (**90**) (1.00 equiv., 580.00 mg, 1.087 mmol) in MeOH (27.2 mL) was added palladium (0.02 equiv., 46.27 mg, 0.022 mmol). The solution was flushed with Ar., then the reaction mixture was stirred under an H<sub>2</sub> atmosphere for 16 h at 20 °C. The reaction mixture was then diluted in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10.0 mL), filtered over a celite pad, washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 5.0 mL) and concentrated. The product was directly used in the next step without further purification or analysis.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.05

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 482.3078; found: 482.3075

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3368, 2869, 1731, 1633, 1110.

**Methyl 17-(2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)-2,2-dimethyl-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazahenicosan-21-oate (92)**



To a solution of Methyl 1-Amino-12-(2-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oate (**91**) (1.0 equiv., 496 mg, 1.03 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.9 mL) was added NEt<sub>3</sub> (5.0 equiv., 720 μL, 5.15 mmol) and Boc<sub>2</sub>O (2.5 equiv., 562 mg, 590 μL, 2.57 mmol). The solution was stirred 2 h at 20 °C under Ar. The reaction mixture was then concentrated and the resulting crude was purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH) to obtain the title compound (320 mg, 0.47 mmol, 46 %) as an oil.

**TLC:** EtOAc, **R<sub>f</sub>** = 0.1 ; EtOAc/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.6

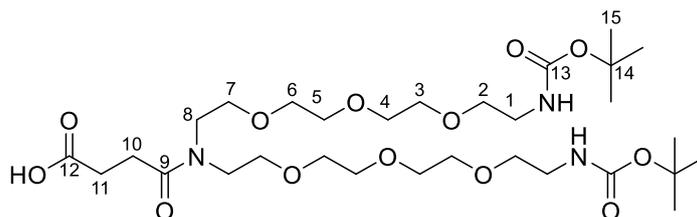
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.66 (s, 3H, H<sub>13</sub>), 3.64 – 3.48 (m, 28H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.29 (t, *J* = 5.3 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.71 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>11</sub>), 2.62 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, H<sub>10</sub>), 1.42 (s, 18H, H<sub>16</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 173.7, 171.8, 156.0 (2C), 79.2 (2C), 70.8 - 69.2 (8C), 51.7 (2C), 48.7 (2C), 46.4, 40.4 (2C), 29.2, 28.4 (6C), 28.1 (2C).

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>31</sub>H<sub>60</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>: 682.4126; found: 682.4162

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3349, 2868, 1704, 1634, 1515, 1101.

**17-(2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)-2,2-dimethyl-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazahenicosan-21-oic acid (93)**



To a solution of Methyl 17-(2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)-2,2-dimethyl-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazahenicosan-21-oate (**92**) (1.0 equiv., 320.0 mg, 0.47 mmol) in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 4.7 mL) was added LiOH (5.0 equiv., 56.2 mg, 2.35 mmol). The solution was stirred 2.5 h at 20 °C, then concentrated under reduced pressure. The resulting crude was diluted in NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (aq., 1.0 M, 20.0 mL) and extracted 5 times with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 20.0 mL). The pooled organic phases were dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated to obtain the title compound (290.0 mg, 0.43 mmol, 93 %) as a colorless transparent oil.

**TLC:** EtOAc/MeOH, 9:1, **R<sub>f</sub>** = 0.1

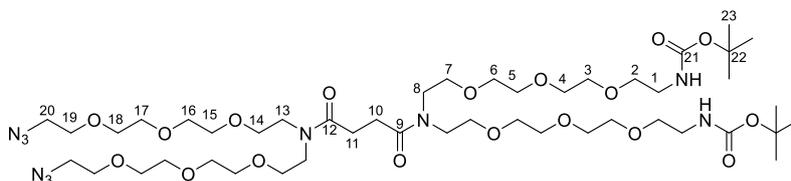
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 5.18 (s, 1H, NH), 5.10 (s, 1H, NH), 3.72 – 3.50 (m, 28H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>), 3.31 (d, J = 5.8 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.80 (m, 2H, H<sub>11</sub>), 2.66 (m, 2H, H<sub>10</sub>), 1.44 (s, 18H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):**199.5, 170.2, 155.6 (2C), 79.3 (2C), 77.3 - 68.9 (8C), 61.8 (2C), 49.1 (2C), 46.5, 40.3 (2C), 28.4 (9C)

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>30</sub>H<sub>58</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub><sup>+</sup>: 668.3970; found: 668.3977

**FTIR v cm<sup>-1</sup>:** 3349, 2921, 2868, 1704, 1633, 1514, 1098.

**di-tert-Butyl (12-(1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oyl)-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diyl)dicarbamate (94)**



To a solution of 17-(2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl)-2,2-dimethyl-4,18-dioxo-3,8,11,14-tetraoxa-5,17-diazahenicosan-21-oic acid (**93**) (1.0 equiv., 280.0 mg, 0.42 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.8 mL) was added NEt<sub>3</sub> (5.0 equiv., 290 μL, 2.096 mmol), then HOBt (1.1 equiv., 62.3 mg, 0.46 mmol) and then N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.0 equiv., 80.4 mg, 0.42 mmol). The solution was stirred for 15 min under Ar. at 20 °C, then 1,23-Diazido-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane (**11**) (1.1 equiv., 193.5 mg, 0.46 mmol) was added. The solution was stirred 16 h under Ar. at 20 °C. The reaction mixture was concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (EtOAc/MeOH) to obtain the title compound (344.0 mg, 0.32 mmol, 77 %) as an oil.

**TLC:** EtOAc/MeOH, 95:5, R<sub>f</sub> = 0.1

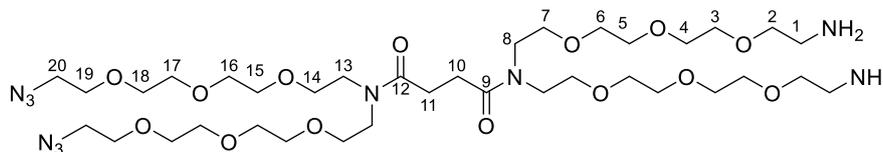
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.67 – 3.52 (m, 56H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H<sub>20</sub>), 3.30 (t, J = 5.2 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.72 (s, 4H, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>), 1.44 (s, 18H, H<sub>23</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 172.5 (2C), 156.0 (2C), 79.2 (2C), 70.7 - 69.4 (24C), 50.7 (2C), 48.6 (2C), 46.6 (2C), 41.7 (2C), 28.4 (6C), 28.3 (2C)

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>46</sub>H<sub>89</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub><sup>+</sup>: 1069.6356; found: 1069.6350

**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 3363, 2868, 2106, 1708, 1634, 1115.

***N*<sup>1</sup>,*N*<sup>1</sup>-bis(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-*N*<sup>4</sup>,*N*<sup>4</sup>-bis(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)succinamide (95)**



To a solution of di-*tert*-Butyl (12-(1-azido-12-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-oyl)-3,6,9,15,18,21-hexaoxa-12-azatricosane-1,23-diyl)dicarbamate (**94**) (1.0 equiv., 334 mg, 0.31 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.10 mL) was added HCl (15.0 equiv., 4.0 M in dioxane, 1.17 mL, 4.69 mmol). The solution was stirred 1h30 at 20 °C. The reaction mixture was then concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH) to obtain the title compound (210 mg, 0.24 mmol, 77%) as an oil.

**TLC:** CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH, 9:0.9:0.1, **R<sub>f</sub>** = 0.1

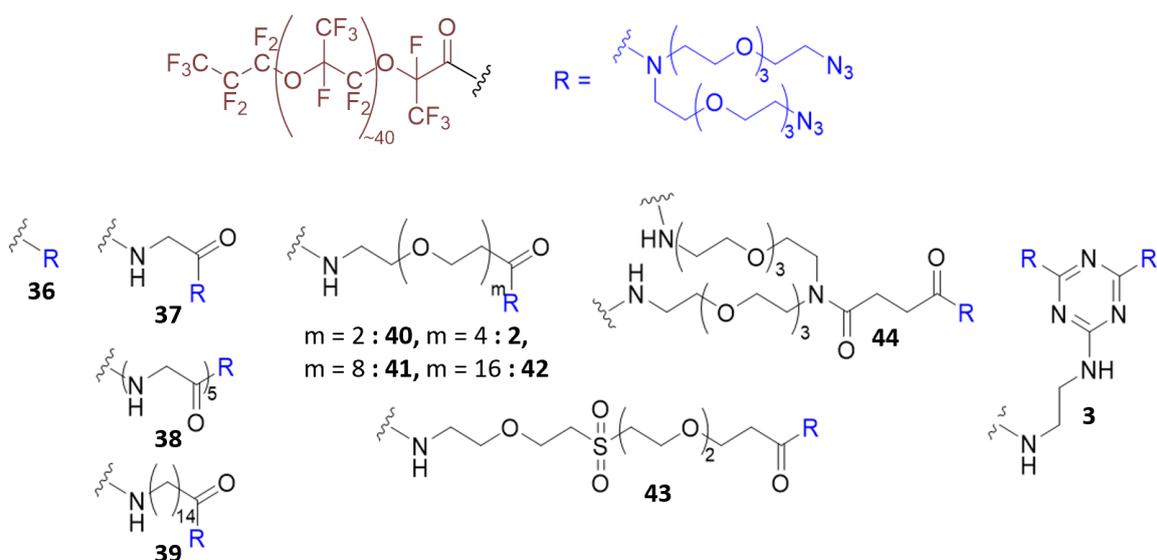
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 3.70 – 3.48 (m, 56H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>), 3.39 (t, J = 5.1 Hz, 4H, H<sub>20</sub>), 2.87 (t, J = 5.2 Hz, 4H, H<sub>1</sub>), 2.69 (s, 4H, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm):** 172.5 (2C), 73.2 (2C), 70.7 - 69.4 (22C), 50.7 (2C), 48.6 (2C), 46.6 (2C), 41.7 (2C), 28.3 (2C).

**HRMS (ESI) m/z, [M + H]<sup>+</sup>:** calculated for C<sub>36</sub>H<sub>73</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub><sup>+</sup>: 869.5308; found: 869.5295

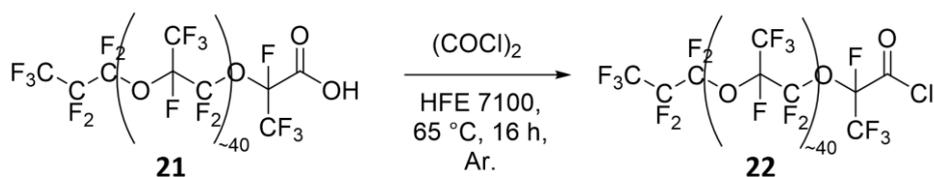
**FTIR ν cm<sup>-1</sup>:** 2869, 2106, 1632, 1110

### 1.3. Surfactant synthesis



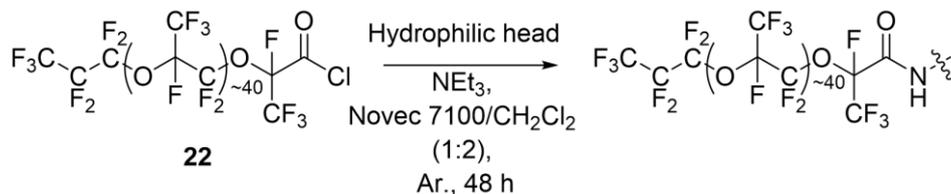
#### 1.3.1. General procedure:

##### 1.3.1.1. Carboxylate activation:



Krytox157FSH **21** (1.0 equiv.) was dissolved in Novec7100 (0.2-0.4 g/mL) and oxalyl chloride (30.0 equiv.) was added to the solution. The reaction mixture was stirred under reflux (65 °C) overnight. The crude Krytox-COCl **22** obtained after concentration was directly used in the next step without further purification.

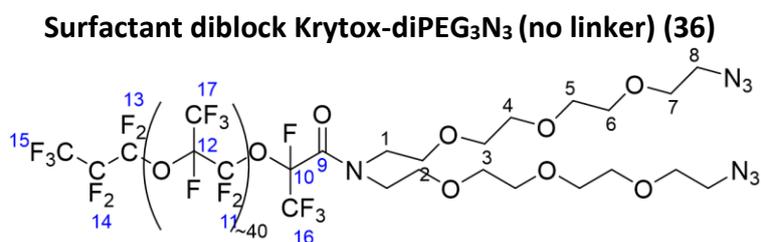
##### 1.3.1.2. Coupling step:



Krytox-COCl **22** (1.0 equiv.) was dissolved in Novec7100/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 0.15-0.17 g/mL). A solution of hydrophilic head (2.0 to 5.0 equiv.) and NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv.) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was then added dropwise, so that the final volume ratio between Novec7100 and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> equates

1:2 (0.11 g/mL). The reaction mixture was stirred for 48 h at 20 °C under Ar. The crude obtained after evaporation of the solvent was dissolved in HFE7500 (0.02 g/mL), transferred into a separatory funnel and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.02 g/ml). The fluorinated phase was then concentrated under reduced pressure to afford a mixture of the surfactant and the carboxylate form of Krytox as a sticky oil. The purity was determined by <sup>19</sup>F NMR, using a mixture of C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (45:5) as NMR solvent.

### 1.3.2. Surfactants synthesis :

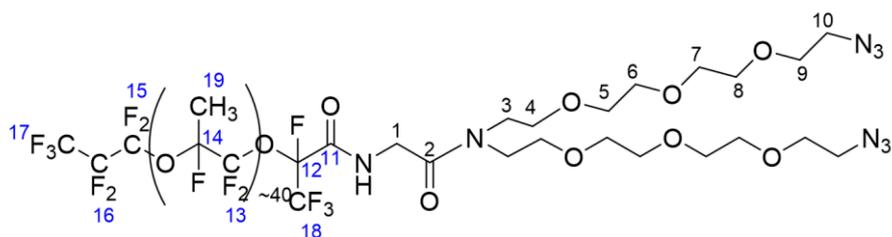


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.157 mmol, 1.02 g), **11** (0.834 mmol, 350 mg), triethylamine (0.719 mmol, 100 μL), Novec7100 (3.06 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 3.06 mL). To afford the surfactant (1.0 g) as a sticky white oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm):** 3.99 – 3.60 (m, 28H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>), 3.29 (t, 4H, *J* = 4.5 Hz, H<sub>8</sub>)

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm): Surfactant:** -80.8 - -82.0 (m, 207F, F<sub>17</sub>, F<sub>11</sub>, F<sub>13</sub>), -83.6 - -83.8 (m, 6F, F<sub>15</sub>, F<sub>16</sub>), -125.0 - -125.1 (0.89F, F<sub>10</sub>), -131.5 (2F, F<sub>14</sub>), -145.3 - -146.5 (39F, F<sub>12</sub>).  
**Carboxylate Krytox157FSH:** -80.8 - -82.0 (m, 207F, F<sub>17</sub>, F<sub>11</sub>, F<sub>13</sub>), -83.6 - -83.8 (m, 6F, F<sub>15</sub>, F<sub>16</sub>), -127.0 - -127.8 (0.12F, F<sub>10</sub>), -131.5 (2F, F<sub>14</sub>), -145.3 - -146.5 (39F, F<sub>12</sub>).

### Surfactant diblock Krytox-Gly<sub>1</sub>-diPEGN<sub>3</sub> (37)

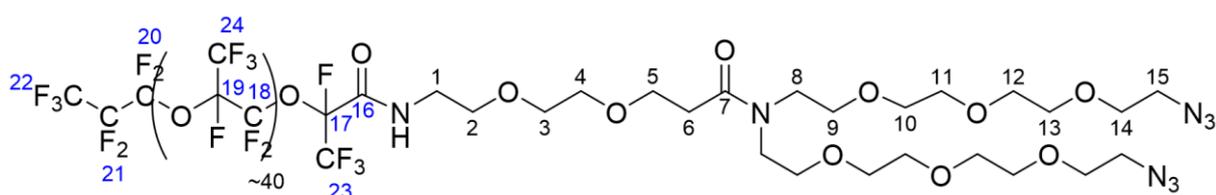


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.14 mmol, 909 mg), **64** (0.42 mmol, 200 mg), triethylamine (0.42 mmol, 58,3  $\mu$ L), Novec7100 (2.73 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2.73 mL). To afford the surfactant (850 mg) as a sticky white oil.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm):** 7.80 (s, 1H, NH), 4.29-4.18 (m, 2H, H<sub>1</sub>), 3.68-3.54 (m, 28H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>), 3.28-3.23 (m, 4H, H<sub>10</sub>)

**$^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm):** Surfactant: -80.4- -82.6 (m, 212F, F<sub>13</sub>, F<sub>19</sub>), -83.4- -83.6 (m, 3F, F<sub>17</sub>), -84.5- -84.7 (m, 3F, F<sub>18</sub>), -131.4 (s, 2F, F<sub>16</sub>), -133.5- -134.1 (m, 0.93F, F<sub>12</sub>), -145.3- -146.5 (m, 40F, F<sub>14</sub>). Carboxylate Krytox157FSH: -80.4- -82.6 (m, 212F, F<sub>13</sub>, F<sub>19</sub>), -83.4- -83.6 (m, 3F, F<sub>17</sub>), -84.5- -84.7 (m, 3F, F<sub>18</sub>), -126.4- -127.5 (m, 0.07F, F<sub>12</sub>), -131.4 (s, 2F, F<sub>16</sub>), -145.3- -146.5 (m, 40F, F<sub>14</sub>).

### Surfactant diblock Krytox-PEG<sub>2</sub>-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (40)

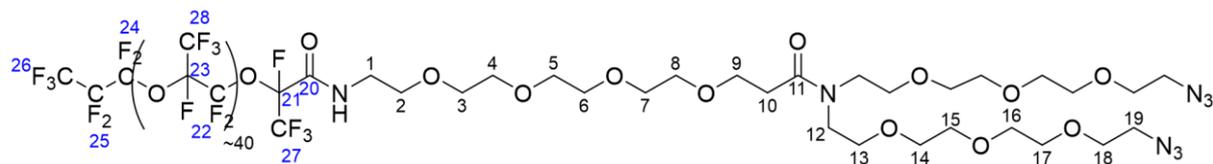


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.17 mmol, 1078.34 mg), **47** (0.41 mmol, 240 mg),  $\text{NEt}_3$  (0.50 mmol, 69  $\mu$ L), Novec7100 (3.23 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 3.23 mL), to afford the surfactant (912 mg) as a sticky white oil.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm):** 8.28 (s, 1H, NH), 3.80 – 3.69 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 3.66 – 3.42 (m, 36H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>, H<sub>14</sub>), 3.19 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 4H, H<sub>15</sub>), 2.58 (m, 2H, H<sub>6</sub>).

**$^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm): Surfactant:** -80.7 - -82.1 (m, 214F,  $\text{F}_{24}$ ,  $\text{F}_{18}$ ,  $\text{F}_{20}$ ), -83.3 - -84.1 (m, 3F,  $\text{F}_{22}$ ), -84.4 - -84.5 (m, 3F,  $\text{F}_{23}$ ), -131.3 (m, 2F,  $\text{F}_{21}$ ), -133.4 - -133.7 (m, 1.00F,  $\text{F}_{17}$ ), -145.5 - -146.0 (m, 39F,  $\text{F}_{19}$ ).

### Surfactant diblock Krytox-PEG<sub>4</sub>-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (2)

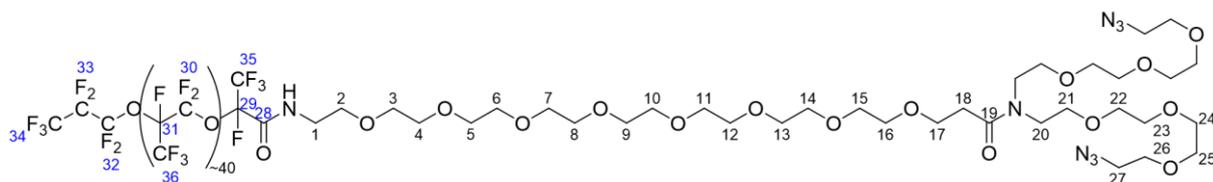


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.51 mmol, 3314 mg), **17** (1.27 mmol, 850 mg), triethylamine (1.53 mmol, 210  $\mu\text{L}$ ), Novec 7100 (9.9 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 9.9 mL), to obtain the desired surfactant (3107 mg) as an oil.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm):** 8.36 (s, 1H, NH), 3.79 – 3.49 (m, 46H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_7$ ,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{13}$ ,  $\text{H}_{14}$ ,  $\text{H}_{15}$ ,  $\text{H}_{16}$ ,  $\text{H}_{17}$ ,  $\text{H}_{18}$ ), 3.24 (t,  $J = 5.0$  Hz, 4H,  $\text{H}_{19}$ ), 2.62 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_{10}$ ).

**$^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm): Surfactant:** -80.7 - -82.5 (m, 214F,  $\text{F}_{28}$ ,  $\text{F}_{22}$ ,  $\text{F}_{24}$ ), -83.3 - -83.5 (m, 3F,  $\text{F}_{26}$ ), -84.3 - -84.5 (m, 3F,  $\text{F}_{27}$ ), -131.4 (m, 2F,  $\text{F}_{25}$ ), -133.2 - -133.8 (m, 1.00F,  $\text{F}_{21}$ ), -145.5 - -146.3 (m, 40F,  $\text{F}_{23}$ ).

### Surfactant diblock Krytox-PEG<sub>8</sub>-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (41)

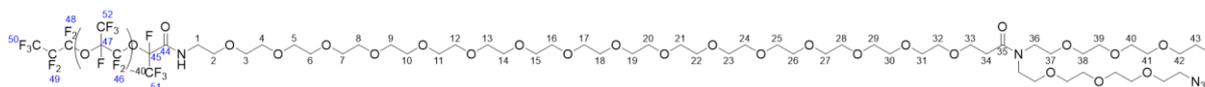


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.24 mmol, 1.54 g), **55** (0.60 mmol, 600 mg), triethylamine (0.71 mmol, 100  $\mu\text{L}$ ), Novec7100 (3.06 mL) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 4.62 mL). To afford the surfactant (700 mg) as a sticky white oil.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{C}_6\text{F}_6/\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\delta$  ppm):** 8.35 (s, 1H, NH), 3.70 – 3.48 (m, 62H,  $\text{H}_{1-17}$ ,  $\text{H}_{20-26}$ ), 3.25 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H,  $\text{H}_{27}$ ), 2.61 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{18}$ ).

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm): Surfactant:** -80.7 - -82.5 (m, 220F, F<sub>30</sub>, F<sub>36</sub>, F<sub>32</sub>), -83.5 - -83.6 (m, 3F, F<sub>34</sub>), -84.3 - -84.5 (m, 3F, F<sub>35</sub>), -125.0 - -125.1 (0.80F, F<sub>29</sub>), -131.5 (2F, F<sub>33</sub>), -145.4 - -146.4 (42F, F<sub>31</sub>). **Carboxylate Krytox157FSH:** -80.7 - -82.5 (m, 220F, F<sub>30</sub>, F<sub>36</sub>, F<sub>32</sub>), -83.5 - -83.6 (m, 3F, F<sub>34</sub>), -84.3 - -84.5 (m, 3F, F<sub>35</sub>), -126.5 - -127.1 (0.20F, F<sub>29</sub>), -131.5 (2F, F<sub>33</sub>), -145.4 - -146.4 (42F, F<sub>31</sub>).

### Surfactant diblock Krytox-PEG<sub>16</sub>-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (42)

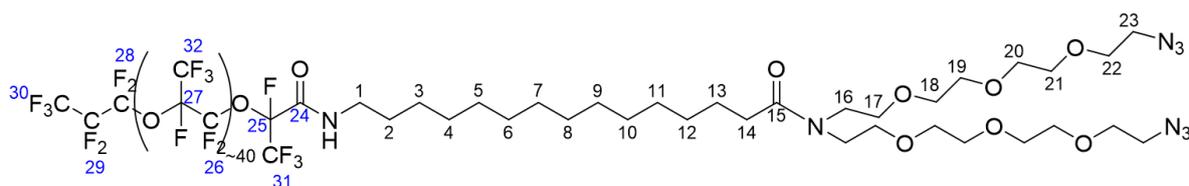


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.12 mmol, 775 mg), **61** (2.5 equiv., 0.30 mmol, 330 mg), triethylamine (0.36 mmol, 50 μL), Novec7100 (2.1 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2.1 mL). To afford the surfactant (500 mg) as a sticky white oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm):** 8.24 (s, 1H, NH), 3.70-3.48 (m, 94H, H<sub>1-33</sub>, H<sub>36-42</sub>), 3.25 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, H<sub>43</sub>), 2.61 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>34</sub>)

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm): Surfactant:** -80.3 - -82.4 (m, 241F, F<sub>46</sub>, F<sub>52</sub>, F<sub>48</sub>), -83.4 - -83.5 (m, 3F, F<sub>50</sub>), -84.3 - -84.5 (m, 3F, F<sub>51</sub>), -131.4 (2F, F<sub>49</sub>), -133.2 - -133.8 (m, 0.83F, F<sub>45</sub>), -145.3 - -146.3 (m, 44F, F<sub>47</sub>). **Carboxylate Krytox157FSH:** -80.3 - -82.4 (m, 241F, F<sub>46</sub>, F<sub>52</sub>, F<sub>48</sub>), -83.4 - -83.5 (m, 3F, F<sub>50</sub>), -84.3 - -84.5 (m, 3F, F<sub>51</sub>), -126.2 - -127.1 (m, 0.16F, F<sub>47</sub>), -131.4 (2F, F<sub>49</sub>), -145.3 - -146.3 (m, 44F, F<sub>47</sub>).

### Surfactant diblock Krytox-pentadecanamide-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (39)

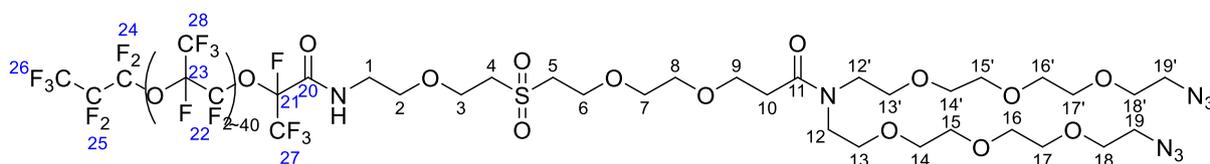


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.162 mmol, 1.05 g), **73** (0.486 mmol, 320 mg), triethylamine (0.486 mmol, 67.5  $\mu$ L), Novec7100 (3.09 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 3.09 mL). To afford the surfactant (1.10 g) as a sticky white oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 7.33 (s, 1H, NH), 3.74-3.45 (m, 30H, H<sub>1</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>, H<sub>18</sub>, H<sub>19</sub>, H<sub>20</sub>, H<sub>21</sub>, H<sub>22</sub>), 3.33-3.30 (m, 4H, H<sub>23</sub>), 2.40 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H, H<sub>14</sub>), 1.75-1.72 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 1.58 – 1.36 (m, 22H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): Surfactant:** -80.8- -82.1 (m, 239F, F<sub>32</sub>, F<sub>26</sub>, F<sub>28</sub>), -83.6- -83.6 (m, 3F, F<sub>30</sub>), -84.8- -84.8 (m, 3F, F<sub>31</sub>), -131.5 (s, 2F, F<sub>29</sub>), -133.6- -133.9 (m, 0.99F, F<sub>25</sub>), -145.6- -146.2 (m, 44F, F<sub>27</sub>).

### Surfactant diblock Krytox-sulfone-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (87)



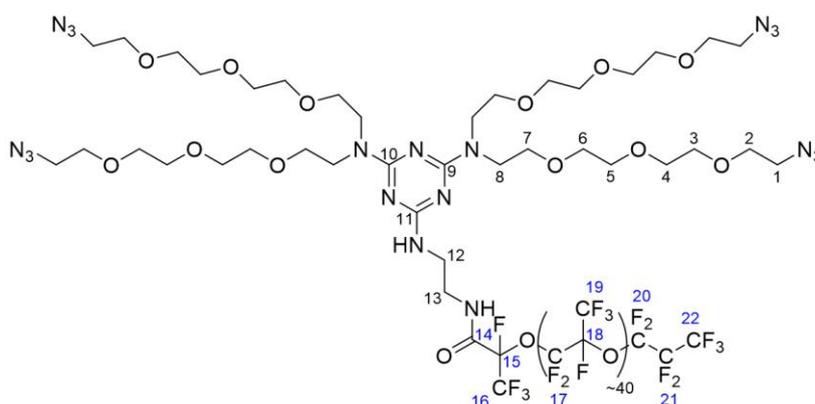
The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.150 mmol, 980 mg), **87** (0.380 mmol, 270 mg), triethylamine (0.604 mmol, 84  $\mu$ L), Novec7100 (2.95 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2.95 mL). To afford the surfactant (850 mg) as a sticky white oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 8.43 (s, 1H, NH), 3.85-3.72 (m, 6H, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>), 3.67-3.53 (m, 36H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>12-18</sub>), 3.32-3.26 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 3.24 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H, H<sub>19</sub>), 3.11-3.05 (m, 2H, H<sub>5</sub>), 2.67 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, H<sub>10</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): Surfactant:** -80.7- -82.6 (m, 220F, F<sub>28</sub>, F<sub>22</sub>, F<sub>24</sub>), -83.4- -83.6 (m, 3F, F<sub>26</sub>), -84.2- -84.6 (m, 3F, F<sub>27</sub>), -131.3 (s, 2F, F<sub>25</sub>), -133.3- -133.8 (m, 0.83F, F<sub>21</sub>

(amide)), -145.5 -146.1 (m, 41F, F<sub>23</sub>). **Carboxylate Krytox157FSH**: -80.7- -82.6 (m, 220F, F<sub>28</sub>, F<sub>22</sub>, F<sub>24</sub>), -83.4- -83.6 (m, 3F, F<sub>26</sub>), -84.2- -84.6 (m, 3F, F<sub>27</sub>), -127.2 - -127.8 (m, 0.16F, F<sub>21</sub>), -131.3 (s, 2F, F<sub>25</sub>), -145.5 -146.1 (m, 41F, F<sub>23</sub>)

**Surfactant Krytox-Ethylene-Triazine-tetraPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (3)**

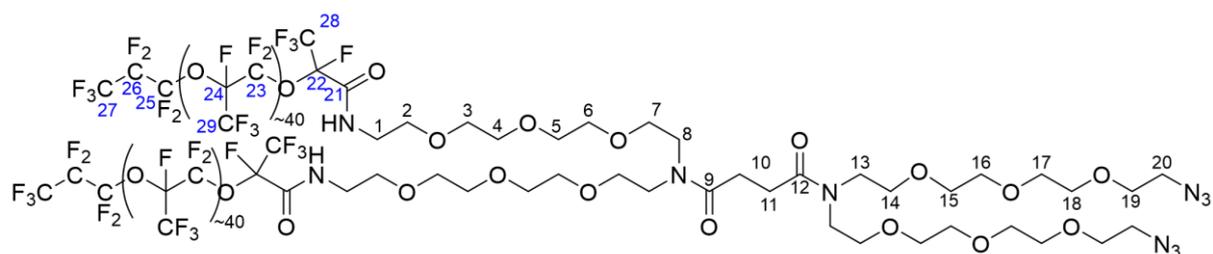


The surfactant was synthesized according to the general procedure described previously, using **22** (0.33 mmol, 2.17 g), **20** (0.67 mmol, 650 mg), triethylamine (1.00 mmol, 140  $\mu$ L), Novec 7100 (6.5 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 6.5 mL) to obtain the desired surfactant (2.15 g) as an oil.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** 8.22 (s, 1H, NH amide), 3.87 – 3.65 (m, 60H, H<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>12</sub>, H<sub>13</sub>), 3.34 – 3.31 (m, 8H, H<sub>1</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm):** **Surfactant:** -80.7 – -82.2 (m, 248F, F<sub>17</sub>, F<sub>19</sub>, F<sub>20</sub>), -83.6 (m, 3F, F<sub>22</sub>), -84.5 (m, 3F, F<sub>16</sub>), 131.4 – -131.7 (m, 2F, F<sub>21</sub>), -133.1 – -133.9 (m, 0.89F, F<sub>15</sub>), -145.3 – -146.8 (m, 43F, F<sub>18</sub>). **Carboxylate Krytox157FSH:** -80.2 – -82.5 (m, 248F, F<sub>17</sub>, F<sub>19</sub>, F<sub>20</sub>), -83.6 (m, 3F, F<sub>22</sub>), -84.5 (m, 3F, F<sub>16</sub>), -127.2 – -128.3 (m, 0.12F, F<sub>15</sub>), -131.4 – -131.7 (m, 2F, F<sub>21</sub>), -145.3 – -146.8 (m, 43F, F<sub>18</sub>)

**Surfactant Triblock Krytox-(PEG<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-diPEG<sub>3</sub>N<sub>3</sub> (44)**



**General procedure for Triblock surfactant:** **22** (1.0 equiv.) was dissolved in Novec7100/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 0.15-0.17 g/mL). A solution of hydrophilic head **95** (0.55 to 0.80 equiv.) and NEt<sub>3</sub> (3.0 equiv.) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was then added dropwise, so that the final volume ratio between Novec7100 and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> equates 1:2 (0.11 g/mL). The reaction mixture was stirred for 48 h at 20 °C under Ar. The crude obtained after evaporation of the solvent was dissolved in HFE7500 (0.02 g/mL), transferred into a separatory funnel and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.02 g/ml). The fluorinated phase was then concentrated under reduced pressure to afford a mixture of the surfactant and the carboxylate form of Krytox as a sticky oil. The purity was determined by <sup>19</sup>F NMR, using a mixture of C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (45:5) as NMR solvent.

*Tableau 8: Tribloc coupling conditions*

Polar head (equiv.)	Polar head	Krytox-COCl	NEt <sub>3</sub>	Solution 1 Novec7100 /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Solution 2 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Product	C.E (%)
<b>0.55</b>	115 μmol – 100 mg	209 μmol – 1,36 g	627 μmol – 87 μL	4,07/4,07 mL	4,07 mL	1,03 g	70-75%
<b>0.65</b>	115 μmol – 100 mg	177 μmol – 1,15 g	531 μmol – 74 μL	3,45/3,45 mL	3,45 mL	0,72 g	81%
<b>0.80</b>	115 μmol – 100 mg	144 μmol – 0,94 g	432 μmol – 60 μL	2,81/2,81 mL	2,81 mL	0,74 g	90%

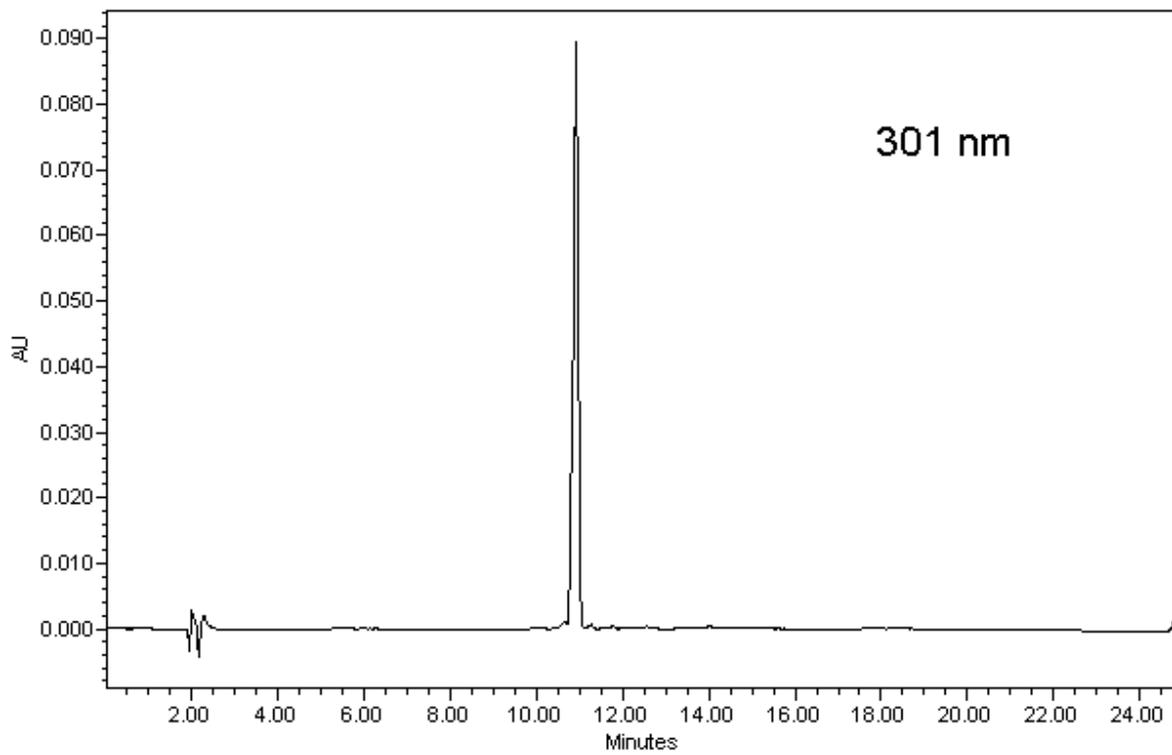
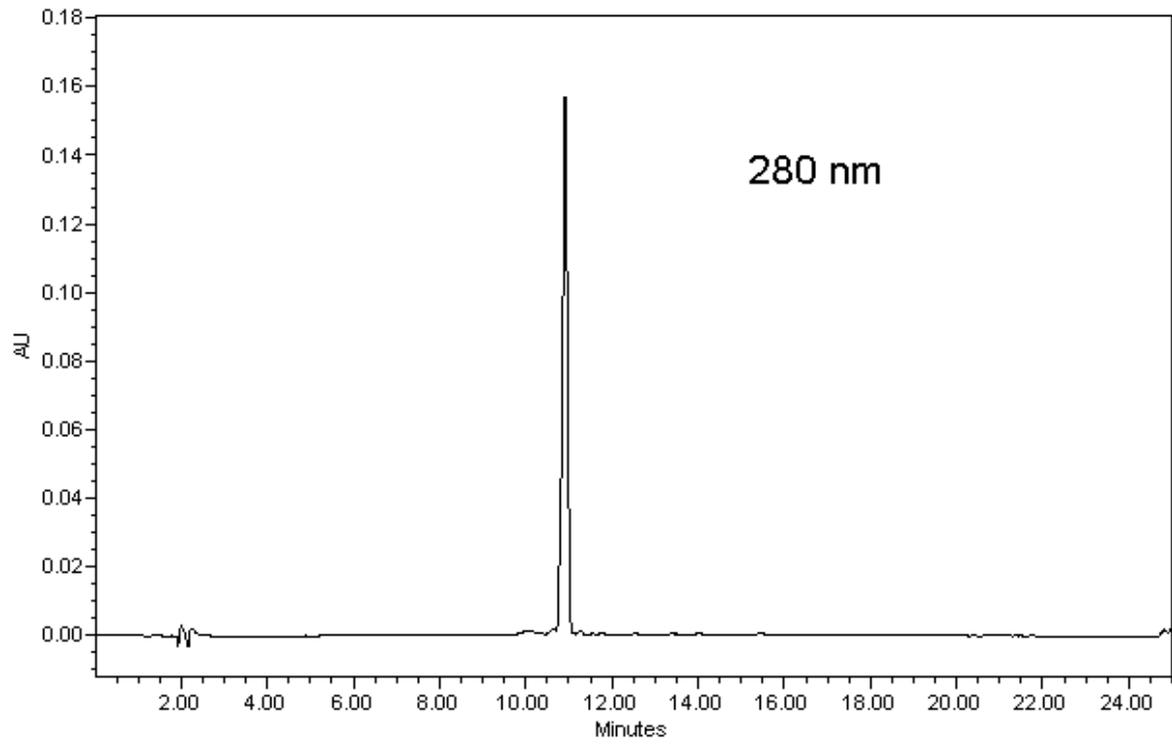
**NMR analysis (for the batch with 0.80 equivalents of hydrophilic head):**

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm):** 8.35 (s, 1-2H, NH) 3.72-3.46 (m, 60H, H<sub>1-8</sub>, H<sub>13-19</sub>), 3.27-3.20 (m, 4H, H<sub>20</sub>), 2.79-2.64 (m, 4H, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub>).

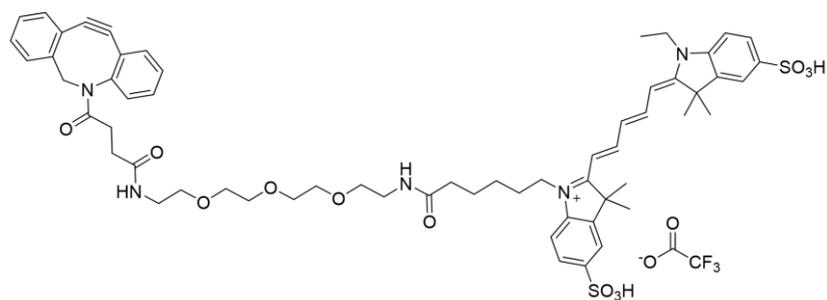
**<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>/C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ ppm):** Surfactant: -80.7 - -82.1 (m, 220F, F<sub>23</sub>, F<sub>29</sub>, F<sub>25</sub>), -83.4 - -83.5 (m, 3F, F<sub>27</sub>), -84.3 - -84.6 (m, 3F, F<sub>28</sub>), -131.4 (2F, F<sub>26</sub>), -133.1 - -133.8 (m, 0.90F, F<sub>22</sub>), -145.4 - -146.0 (m, 42F, F<sub>24</sub>). **Carboxylate Krytox157FSH:** -80.7 - -82.1 (m, 220F, F<sub>23</sub>, F<sub>29</sub>, F<sub>25</sub>), -83.4 - -83.5 (m, 3F, F<sub>27</sub>), -84.3 - -84.6 (m, 3F, F<sub>28</sub>), -127.0 - -127.8 (m, 0.11F, F<sub>22</sub>), -131.4 (4F, F<sub>26</sub>), -145.4 - -146.0 (m, 42F, F<sub>24</sub>).

1.4. HPLC analysis of Peptid FmocGly5

**HPLC analysis : 280 nm and 301 nm : one product**



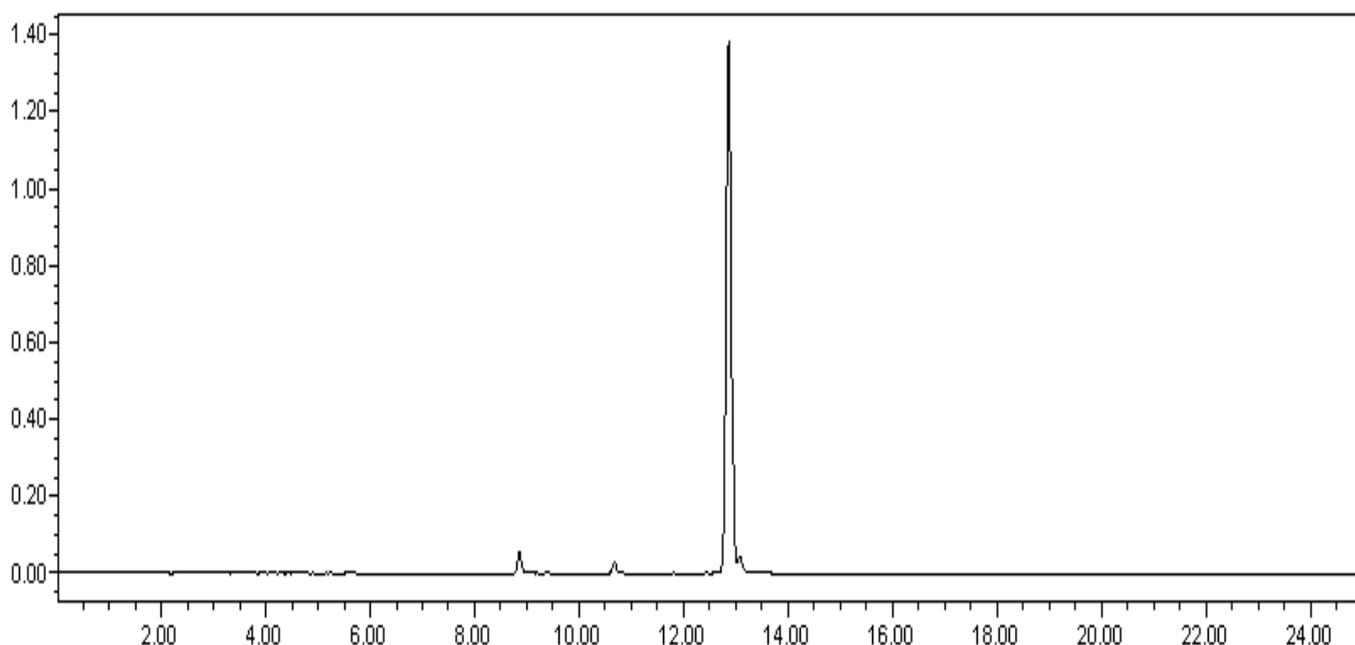
1.5. Synthesis of Probe disulfoCy5-PEG<sub>3</sub>-DBCO (35)



To a solution of 1-(5-carboxypentyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonate (1.0 equiv., 1.00 mg, 1.5  $\mu$ mol) in DMF (304.00  $\mu$ L) was added DIPEA (3.0 equiv., 0.75  $\mu$ L, 4.6  $\mu$ mol) and HATU (1.1 equiv., 0.64 mg, 1.7  $\mu$ mol). The solution was stirred for 15 min, then N-(2-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl)-4-{2-azatricyclo[10.4.0.0<sup>4,9</sup>]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-yn-2-yl}-4-oxobutanamide (2.0 equiv., 60.90  $\mu$ L, 3.0  $\mu$ mol) was added. The solution was stirred 16 h at 20 °C. The solution was then diluted in mQ water (15 mL) and purified by reverse chromatography (preparative HPLC). The resulting fractions were lyophilized overnight to obtain the title compound as a blue powder (1.1 mg, 1.0  $\mu$ mol, 65%) as a TFA salt.

**HRMS (ESI) m/z:** [M + H]<sup>+</sup>: calculated for: C<sub>60</sub>H<sub>72</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>: 1118.4619; found: 1118.4542

**HPLC analysis (648 nm) : Purity : 97%**



## 1.6. Antibodies bioconjugation

### 1.6.1. *General procedure for antibody bioconjugation (fluorophores and BCN):*

To a solution of antibody (1.0 equiv., 40  $\mu$ M, 6 mg/mL) in dPBS (pH 7.5) were added disulfoCy5-NHS or disulfoCy3-NHS (2.0 equiv.), with/without BCN-PEG<sub>4</sub>-NHS (5.0 to 20 equiv.) as 0.1, 0.1 and 0.005 M stock solutions in DMSO, respectively. DMSO and dPBS volumes were adjusted to have a final reaction volume of 50  $\mu$ L and a fixed concentration of DMSO (7% volume). The reaction mixture was then incubated at 25 °C for 16 h, after which 50  $\mu$ L of dPBS were added and the excess reagents were removed by gel filtration chromatography on Bio-Spin P-30 columns pre-equilibrated with dPBS 1X (pH 7.5) to give a solution of conjugated antibody. The DOC of cyanine and the protein concentration were both determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (280 nm (Ab), 571 nm (sulfo-Cy3), 647 nm (sulfo-Cy5)).

### 1.6.2. *General procedure for the determination of the average DOC of BCN:*

To a solution of doubly conjugated (disulfoCy5 or disulfoCy3/BCN-PEG<sub>4</sub>) antibody (1.0 equiv., 300 pmoles, 6  $\mu$ M, 0.9 mg/mL) in dPBS (pH = 7.5) was added a solution of TAMRA-N<sub>3</sub> (12.0 equiv., 3600 pmoles, 0.1 M stock solution in DMSO) or Cy5-N<sub>3</sub> (12.0 equiv., 3600 pmoles, 0.1 M stock solution in DMSO). dPBS volume was adjusted to have a reaction volume of 50  $\mu$ L and a DMSO concentration < 10%. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 16 h, after which 50  $\mu$ L of dPBS were added and the excess reagents were removed by gel filtration chromatography on Bio-Spin P-30 columns pre-equilibrated with dPBS 1X (pH 7.5) to give a solution of click-conjugated antibody. The DOC of TAMRA or Cy5 and the protein concentration were determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer. Assuming a complete conversion for this step, the DOC of TAMRA or Cy5 is then considered to be the average DOC of BCN on the antibody.

### 1.6.3. *General procedure for antibody bioconjugation (with DBCO):*

To a solution of Trastuzumab (1.0 equiv., 40  $\mu$ M, 6 mg/mL) in dPBS (pH 7.4) were added disulfoCy5-NHS (2.0 equiv.), with/without DBCO-PEG<sub>4</sub>-NHS (5.0 to 15.0 equiv.) as 0.1, 0.1 and 0.005 M stock solutions in DMSO, respectively. DMSO and dPBS volumes were adjusted to have a final reaction volume of 50  $\mu$ L and a fixed concentration of DMSO (7% volume). The reaction mixture was then incubated at 25 °C for 16 h, after which 50  $\mu$ L of dPBS were added and the excess reagents were removed by gel filtration chromatography on Bio-Spin P-30 columns pre-equilibrated with dPBS 1X (pH 7.5) to give a solution of conjugated antibody. The

cyanine and the protein concentration were both determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (280 nm (Ab), 647 nm (sulfo-Cy5)). The Ab concentration was corrected using  $C^\circ$  (M) IgG =  $(A_{280} - CF \times A_{309}) / \epsilon_{\text{IgG}}$  where CF = DBCO correction factor at 280 nm = 1.089 and  $\epsilon_{\text{IgG}}$  the molar extinction coefficient of IgG antibody at 280 nm: 204,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### 1.6.4. General procedure for the determination of the average DOC of DBCO:

To a solution of doubly conjugated (disulfoCy5/DBCO-PEG<sub>4</sub>) Trastuzumab (1.0 equiv., 300 pmoles, 6 μM, 0.9 mg/mL) in dPBS (pH = 7.4) was added a solution of TAMRA-N<sub>3</sub> (12.0 equiv., 3600 pmoles, 0.1 M stock solution in DMSO). dPBS volume was adjusted to have a reaction volume of 50 μL and a DMSO concentration < 10%. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 16 h, after which 50 μL of dPBS were added and the excess reagents were removed by gel filtration chromatography on Bio-Spin P-30 columns pre-equilibrated with dPBS 1X (pH 7.4) to give a solution of click-conjugated antibody. The concentration of TAMRA and the protein concentration were determined by UV absorbance using a NanoDrop spectrophotometer (280 nm (Ab), 555 nm (TAMRA)). The Ab concentration was corrected using  $C^\circ$  (M) IgG =  $(A_{280} - CF \times A_{309}) / \epsilon_{\text{IgG}}$  where CF = DBCO correction factor at 280 nm = 1.089 and  $\epsilon_{\text{IgG}}$  the molar extinction coefficient of IgG antibody at 280 nm: 204,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Assuming a complete conversion for this step, the DOC of TAMRA is then consider to be the average DOC of DBCO on the antibody.

## 2. Microfluidics experiments

### 2.1. Materials and methods

#### 2.1.1. Microchip fabrication:

The fabrication of silicon wafer was performed by STnano Platform (Hicham Majjad, IPCMS Strasbourg University). A mold of SU-8 resist (MicroChem Corp.) was prepared on a silicon wafer (Siltronix) by UV exposure (MJB3 contact mask aligner; SUSS MicroTec) through a photolithography mask (Selba SA) and subsequent development (SU-8 developer; MicroChem Corp.). A curing agent was added to the PDMS base (Sylgard 184 silicone elastomer kit; Dow Corning Corporation) to a final concentration of 10% (w/w), mixed and poured over the mold to a depth of 5 mm. Following degassing for several minutes and cross-linking at 70 °C for 2 h, the PDMS was peeled off the mold and the input and output ports were punched with a 1.0 mm-diameter Harris Uni-Core biopsy punch (Electron Microscopy Sciences). For chips with electrodes, input and output port for electrodes were punched with a 0.5 mm-diameter Harris

Uni-Core biopsy punch (Electron Microscopy Sciences). The PDMS was activated by incubation for 3 minutes in an oxygen plasma (Diener Zepto) and was bound to a 50 mm x 75 mm glass slide (Corning Incorporated). In order to insert the electrodes, chips were heated at 70 °C, then solder alloy (IN51 BI32.5 SN16.5, Indium Corporation of America) was inserted in the corresponding ports. Electrodes (KYNAR wire, 100-24, Digi-Key) were then added, and the alloy solidified at room temperature. The PDMS was then activated by incubation for 30 seconds in an oxygen plasma (Diener Zepto), and the electrodes fixed with a UV-polymerized glue (352<sup>TM</sup>, Loctite). The glue was cured for 20 minutes under UV light exposure. Channels were made fluorophilic using a commercial surface coating agent (ABCR, AB111155). For the 45 pL droplet-maker chip, height of the channel was 40 μm and size of the nozzle was 25 μm with a channel width of 40 μm. A second chip was used to reinject collected emulsion with a channel width of 50 μm. A third type of chip was used for picoinjections experiments, with a channel width of 50 μm.

#### *2.1.2. Microfluidic station:*

If not mentioned, all optical materials were purchased from Thorlab. The optical setup comprises an Eclipse Ti inverted microscope (Nikon) mounted on an optical table and includes 4 lasers (Stratus-375 nm 16mW, Stradus-488 nm 50 mW, Stradus-532 nm 40 mW and Stradus-642 nm 110 mW). Emitted fluorescence was detected by photomultiplier tubes (PMT, Hamamatsu Photosensor H10722-20). The output signal from the PMTs was analyzed using a PCI-7852R Virtex-5 LX50R FPGA card (National Instruments Corporation) executing a program written in LabView 2013 (FPGA module, National Instruments Corporation). The optical table includes also a camera (Guppy F-080, Allied Vision Technologies). Electric impulses were provided by a High voltage amplifier (Model 623B, Trek)

#### *2.1.3. Confocal microscopy:*

W/O emulsions were analyzed using a Leica SPE confocal microscope (lasers used: 488 (GFP, fluorescein), 561 nm (sulfoCy3 derivatives) and 635 nm (sulfoCy5 derivatives)), objective 20X, Leica 11506513) with an image acquisition software (Leica confocal LAS AF, Leica).

## 2.2. Experimental setup:

### 2.2.1. Droplets production: 45 pL and 100 pL droplets (two entries chip):

Droplets were produced in two-entries chips, one entrance for the oil phase carrying the fluorosurfactant, one entrance for the aqueous phase. Flow rates were controlled by Fluigent software. Flow rates of 1000  $\mu\text{L/h}$  for the aqueous phase and of 1200-1400  $\mu\text{L/h}$  (45 pL) or 1400-1800  $\mu\text{L/h}$  (100 pL) for the fluorinated oil phase (3M HFE 7500) were used to create droplets of 40-50 pL or 95-105 pL. Emulsions were collected either in an Eppendorf filled with oil and closed with a PDMS plug, or in Eppendorf filled with oil (3M HFE7500) and dPBS to prevent coalescence due to contact with air. For control experiments, 2.5% or 1.0% w/w of non-functionalized surfactant (dSURF, Fluigent / 008-F, Ran Biotechnologies) was used in oil phase. For SPAAC reaction, the functionalized surfactants were used at 2.5% or 1.0% w/w in oil phase. Biomolecules were introduced *via* the aqueous phase and dissolved in CHAPS (1 mM in PBS 1X).

### 2.2.2. Droplets production for cell encapsulation (three entries chip):

Droplets were produced in three-entries chips. Flow rates were controlled by Fluigent software. Flow rates of 500  $\mu\text{L/h}$  for aqueous phase 1 and 2 and of 1000-1200  $\mu\text{L/h}$  for fluorinated oil phase (3M HFE 7500) were used to create droplets of 40-50 pL. Emulsion was collected in an Eppendorf filled with oil and closed with a PDMS plug to prevent coalescence due to contact with air. For SPAAC reaction, the functionalized surfactant were used at 2.5% w/w in oil phase. Biomolecules were introduced *via* one aqueous phase and dissolved in CHAPS (1 mM in PBS 1X). E.Coli were brought *via* the second aqueous phase in PBS 1X. Aqueous phases had identical flow rates in order for the ratio of the two aqueous phases in the droplet to be 1:1.

### 2.2.3. Picoinjection:

Picoinjection were done in three entries chips. Flow rates were controlled by Fluigent software. Flow rates of 1700  $\mu\text{L/h}$  for fluorinated oil phase (3M HFE 7500), 1000  $\mu\text{L/h}$  for emulsion sample, and 180  $\mu\text{L/h}$  for picoinjected solution were used to picoinject droplets. Droplets were destabilized by continuous electric impulses with a frequency of 30 kHz and an amplitude of 400 mV, to inject 80% of the droplets an average of 10  $\mu\text{L}$  of aqueous phase. Percentage of pico-injected droplets and assessment of the injected volume were calculated using fluorescence signals repartition and intensity.

Emulsion were collected in an Eppendorf filled with oil and closed with a PDMS plug to prevent coalescence due to contact with air. The functionalized surfactant were used at 2.5% w/w in oil phase. Biomolecules were picoinjected *via* the aqueous phase and dissolved in CHAPS (1 mM in PBS 1X).

#### 2.2.4. Reinjection:

W/O emulsions were reinjected in the second chip and spaced by fluoruous oil (3M HFE 7500). Flow rates of 300  $\mu$ L/h for HFE 7500 and of 100  $\mu$ L/h for emulsion sample were used.

### 2.3. Aqueous phase preparation

#### 2.3.1. Immunoassay

All reagents came from stock solutions in PBS 1X. CHAPS came from a stock solution at 10 mM in PBS 1X. The aqueous phases were prepared in order to obtain a final concentration in droplets of 1 mM of CHAPS, 400 nM of BCN-modified antibodies, 125 nM of GFP-HisTag, and 50 nM of the detection antibodies. Aqueous phases for the detection assay were prepared with a concentration of 1 mM of CHAPS, 400 nM of BCN-modified antibodies, 50 nM of detection antibodies and a concentration of GFP-HisTag of 25, 50, 75, 100, 125 or 150 nM. Aqueous phase for the sensibility assay were prepared with a concentration of 1 mM of CHAPS, 400 nM of BCN-modified antibodies, 20 nM of GFP-HisTag, and 5.0 to 20.0 nM of detection antibodies.

#### 2.3.2. *E.Coli* encapsulation

All reagents came from stock solutions in PBS 1X. CHAPS came from a stock solution at 10 mM in PBS 1X. Two aqueous phases were prepared, and mixed in droplets at a 1:1 ratio. The first aqueous phase contained the *E.Coli* in CHAPS (1mM in PBS 1X). The second contained the antibodies and lysozyme in CHAPS (1 mM in PBS 1X). The aqueous phases were prepared in order to obtain a final concentration in droplets of 1 mM of CHAPS, 200 or 400 nM of BCN-modified antibodies, 25 or 50 nM of the detection antibodies, 5 or 10 mg/mL of Lysozyme, and *E.Coli* (occupation rate : 0.8-0.9).

#### 2.3.3. SPAAC tests

All reagents came from stock solutions in PBS 1X. CHAPS came from a stock solution at 10 mM in PBS 1X. The aqueous phases were prepared in order to obtain a final concentration in droplets of 1 mM of CHAPS, 400 nM of antibodies.

#### 2.3.4. SPAAC in RPMI and PBS +/- FCS

CHAPS came from a stock solution at 10 mM in PBS 1X. RPMI-1640 was supplemented with of L-Glutamine 2mM, Sodium pyruvate 1mM, Penicillin-Streptomycin 100 units/mL (100µg/mL), 2 Mercaptoethanol 0.5mM, IL6 1.25µg/L. The aqueous phases were prepared in order to obtain a final concentration in droplets of 1 mM of CHAPS, 400 nM of antibodies, and 0 to 10% of Fetal Calf Serum (FCS).

#### 2.3.5. Stability tests

All reagents came from stock solutions in PBS 1X. CHAPS came from a stock solution at 10 mM in PBS 1X. Fluorescein came from a stock solution of 500 µM in PBS 1X (pH = 7.4). The aqueous phases were prepared in order to obtain a final concentration in droplets of 1 mM of CHAPS, 200 µM of Fluorescein, 2.5% of Fetal Calf Serum (FCS) and a concentration of Ab from 0 nM to 3000 nM.

#### 2.4. Grafting efficiency calculs

For each condition, ten background spots, ten spots of the content of the droplets and ten spots of the interface of different droplets were selected using imageJ. The mean fluorescence of the background, the content of the droplets and the inner surface of the droplet was calculated. Then the Relocation Index was calculated using equation 1. This ratio was normalized for each condition by the ratio found in the negative controls (using non functionalized surfactant or using non-BCN antibodies).

$$Relocation\ Index = \left( \frac{Fluo^{Surface} - Fluo^{Background}}{Fluo^{Lumen} - Fluo^{Backgground}} \right) \quad (1)$$

Where  $Fluo^{Surface}$  is the mean fluorescence at droplet inner surface,  $Fluo^{Lumen}$  is the mean fluorescence reaming free within the droplet and  $Fluo^{Background}$  is the mean background fluorescence of the picture.

#### 2.5. Stability tests

Aqueous phases were prepared according to the protocol described above. Materials used to contain the aqueous phase were coated with fetal calf serum for 2 h, then extensively washed with PBS 1X before use. Surfactants solutions were prepared by solubilizing the surfactants in Novec 7500 to obtain solution at 1% (w/w). Droplets (100 pL) were produced and collected

for 20 minutes in Eppendorf filled with 500  $\mu$ L of oil (3M HFE7500) and 100  $\mu$ L of dPBS. Once the emulsions were collected, the Eppendorf were centrifugated at 5000 g for 10 minutes at 20 °C. The absorbance of the supernatant was measured by using a NanoDrop spectrophotometer (490 nm). Then 10  $\mu$ L of 1H,1H,2H,2H-perfluorooctanol were added to the Eppendorf and vortexed for 10 seconds, then the emulsion rested for 1 minute, followed by 30 seconds of centrifugation. After visual confirmation of the complete breaking of the emulsion, the absorbance of the supernatant was measured again. As negative control to validate that the fluorophore found in the supernatant was due to the centrifugation process, emulsions were produced and let rested without being centrifugated, and the absorbance was measured.

Data were computed with Prism software. T-test analysis were obtained by Prism software. \*\*\*\* means significantly different at the p value<0.0001. \*\*\* means significantly different at the p value<0.001. \*\* means significantly different at the p value<0.01. \*means significantly different at the p value<0.05 and ns means the differences are not significant at the p value>0.05.

### 3. Cell culture and encapsulation

#### 3.1. Cell culture

A T7 Express lysY/lq *E. coli* transformed with a pIVEX GFP plasmid was grown at 37°C under agitation in a 2YT media supplemented with ampicillin and glucose 2% to reach an optical density of 0.8. The GFP protein production was induced overnight at 37°C with 62.5  $\mu$ M of IPTG in a 2YT ampicillin media.

2 mL of the bacteria media was centrifugated for 5 minutes at 4000 g, the supernatant was discarded and the bacteria were washed with 2 mL of PBS 1X and centrifugated for 5 minutes at 4000 g. The bacteria were recovered in 1 mL of PBS 1X, and the concentration of bacteria solution was determined by optical density at 600 nm.

The aqueous phase for bacteria encapsulation was prepared by diluting the bacteria solution in CHAPS 1 mM in PBS 1X to obtain a final solution at an optical density of 0.05 at 600

nm. Using a co-flow production with two parallel aqueous phases, the OD<sub>600</sub> in the droplets is thus 0.025

### 3.2. Encapsulation rate of E.Coli

The concentration of E.Coli can be determined by OD<sub>600</sub>. For an OD<sub>600</sub> = 1.0, the concentration of E.Coli is at 8.0 x 10<sup>8</sup> E.Coli/mL. At an OD<sub>600</sub> = 0.025, the concentration of E.Coli is at 2 x 10<sup>7</sup> E.Coli/mL, thus 0.02 E.Coli/pL. The occupation rate (λ) of 45 pL droplets is 0.80-0.90 E.Coli.

The distribution of E.Coli in droplets follows the Poisson law, and can be calculated:

$$P(X=x) = \frac{e^{-\lambda}}{x!} \times \lambda^x$$

With x the number of E.Coli per droplets and λ the occupation rate.

*Tableau 9: E.Coli occupation of the droplets*

X (E.Coli per droplet)	% of droplets
0	41-45
1	36-37
2	14-16
3	4-5
4	1
5	0

#### 4. Surface tension measurements

Measures of the adsorption of the surfactants at the HFE 7500/PBS 1X interface

The shape of a liquid droplet in another non miscible liquid depends on the buoyancy and surface tension. The principle of measurement is based on the image acquisition of the droplet profile using a CCD camera and its digitalization, and fitting using the Young–Laplace equation, which allows determination of the surface tension kinetics.<sup>275,276</sup> Time dependence of the surface tension during adsorption at the liquid/liquid interface was measured using a Tracker<sup>®</sup> tensiometer (Teclis, Civrieux d’Azergues, France). The droplet (5  $\mu\text{L}$ ) was formed at the end of a stainless-steel capillary (diam. 2 mm) into a measuring cell (40.0 x 23.6 x 15.0 mm, Hellma Analytics) that contains HFE 7500. Solutions of the surfactants in HFE 7500 (30  $\mu\text{L}$ ) were injected in the measuring cell, which provoked a further decrease of the surface tension until an equilibrium was reached. Each compound was thus characterized by its capacity to lower the interfacial tension of HFE 7500. All measurements were achieved at  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  and repeated 3 to 5 times.

## Bibliographie

- (1) Seemann, R.; Brinkmann, M.; Pfohl, T.; Herminghaus, S. Droplet Based Microfluidics. *Rep. Prog. Phys. Phys. Soc. G. B.* **2012**, *75* (1), 016601. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/75/1/016601>.
- (2) Theberge, A. B.; Courtois, F.; Schaerli, Y.; Fischlechner, M.; Abell, C.; Hollfelder, F.; Huck, W. T. S. Microdroplets in Microfluidics: An Evolving Platform for Discoveries in Chemistry and Biology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (34), 5846–5868. <https://doi.org/10.1002/anie.200906653>.
- (3) Rakszewska, A.; Tel, J.; Chokkalingam, V.; Huck, W. T. One Drop at a Time: Toward Droplet Microfluidics as a Versatile Tool for Single-Cell Analysis. *NPG Asia Mater.* **2014**, *6* (10), e133–e133. <https://doi.org/10.1038/am.2014.86>.
- (4) Amirifar, L.; Besanjideh, M.; Nasiri, R.; Shamloo, A.; Nasrollahi, F.; de Barros, N. R.; Davoodi, E.; Erdem, A.; Mahmoodi, M.; Hosseini, V.; Montazerian, H.; Jahangiry, J.; Darabi, M. A.; Haghniaz, R.; Dokmeci, M. R.; Annabi, N.; Ahadian, S.; Khademhosseini, A. Droplet-Based Microfluidics in Biomedical Applications. *Biofabrication* **2022**, *14* (2), 022001. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ac39a9>.
- (5) Suea-Ngam, A.; Howes, P. D.; Srisa-Art, M.; deMello, A. J. Droplet Microfluidics: From Proof-of-Concept to Real-World Utility? *Chem. Commun.* **2019**, *55* (67), 9895–9903. <https://doi.org/10.1039/C9CC04750F>.
- (6) Abate, A. R.; Hung, T.; Mary, P.; Agresti, J. J.; Weitz, D. A. High-Throughput Injection with Microfluidics Using Picoinjectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (45), 19163–19166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006888107>.
- (7) Wu, C.-Y.; Ouyang, M.; Wang, B.; de Rutte, J.; Joo, A.; Jacobs, M.; Ha, K.; Bertozzi, A. L.; Di Carlo, D. Monodisperse Drops Templated by 3D-Structured Microparticles. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (45), eabb9023. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb9023>.
- (8) Christopher, G. F.; Anna, S. L. Microfluidic Methods for Generating Continuous Droplet Streams. *J. Phys. Appl. Phys.* **2007**, *40* (19), R319–R336. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/40/19/R01>.
- (9) Anna, S. L.; Mayer, H. C. Microscale Tipstreaming in a Microfluidic Flow Focusing Device. *Phys. Fluids* **2006**, *18* (12), 121512. <https://doi.org/10.1063/1.2397023>.
- (10) Rosenfeld, L.; Fan, L.; Chen, Y.; Swoboda, R.; Tang, S. K. Y. Break-up of Droplets in a Concentrated Emulsion Flowing through a Narrow Constriction. *Soft Matter* **2014**, *10* (3), 421–430. <https://doi.org/10.1039/C3SM51843D>.
- (11) Shang, L.; Cheng, Y.; Zhao, Y. Emerging Droplet Microfluidics. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (12), 7964–8040. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848>.

- (12) De Menech, M.; Garstecki, P.; Jousse, F.; Stone, H. A. Transition from Squeezing to Dripping in a Microfluidic T-Shaped Junction. *J. Fluid Mech.* **2008**, *595*, 141–161. <https://doi.org/10.1017/S002211200700910X>.
- (13) Umbanhowar, P. B.; Prasad, V.; Weitz, D. A. Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream. *Langmuir* **2000**, *16* (2), 347–351. <https://doi.org/10.1021/la990101e>.
- (14) Baret, J.-C. Surfactants in Droplet-Based Microfluidics. *Lab. Chip* **2012**, *12* (3), 422–433. <https://doi.org/10.1039/C1LC20582J>.
- (15) Yao, X.; Liu, Z.; Ma, M.; Chao, Y.; Gao, Y.; Kong, T. Control of Particle Adsorption for Stability of Pickering Emulsions in Microfluidics. *Small* **2018**, *14* (37), 1802902. <https://doi.org/10.1002/smll.201802902>.
- (16) Kaminski, T. S.; Scheler, O.; Garstecki, P. Droplet Microfluidics for Microbiology: Techniques, Applications and Challenges. *Lab. Chip* **2016**, *16* (12), 2168–2187. <https://doi.org/10.1039/C6LC00367B>.
- (17) Kamnerdsook, A.; Juntasaro, E.; Khemthongcharoen, N.; Chanasakulniyom, M.; Sripumkhai, W.; Pattamang, P.; Promptmas, C.; Atthi, N.; Jeamsaksiri, W. On Classification of Water-in-Oil and Oil-in-Water Droplet Generation Regimes in Flow-Focusing Microfluidic Devices. *Colloids Interfaces* **2023**, *7* (1), 17. <https://doi.org/10.3390/colloids7010017>.
- (18) Zhu, P.; Wang, L. Passive and Active Droplet Generation with Microfluidics: A Review. *Lab. Chip* **2017**, *17* (1), 34–75. <https://doi.org/10.1039/C6LC01018K>.
- (19) Nunes, J. K.; Tsai, S. S. H.; Wan, J.; Stone, H. A. Dripping and Jetting in Microfluidic Multiphase Flows Applied to Particle and Fibre Synthesis. *J. Phys. Appl. Phys.* **2013**, *46* (11), 114002. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/11/114002>.
- (20) Bai, L.; Fu, Y.; Zhao, S.; Cheng, Y. Droplet Formation in a Microfluidic T-Junction Involving Highly Viscous Fluid Systems. *Chem. Eng. Sci.* **2016**, *145*, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.02.013>.
- (21) Garstecki, P.; Fuerstman, M. J.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. Formation of Droplets and Bubbles in a Microfluidic T-Junction—Scaling and Mechanism of Break-Up. *Lab. Chip* **2006**, *6* (3), 437–446. <https://doi.org/10.1039/b510841a>.
- (22) Rostami, B.; Morini, G. L. Micro Droplets of Non-Newtonian Solutions in Silicone Oil Flow through a Hydrophobic Micro Cross-Junction. *J. Phys. Conf. Ser.* **2017**, *923*, 012021. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/923/1/012021>.
- (23) Ibrahim, A. M.; Padovani, J. I.; Howe, R. T.; Anis, Y. H. Modeling of Droplet Generation in a Microfluidic Flow-Focusing Junction for Droplet Size Control. *Micromachines* **2021**, *12* (6), 590. <https://doi.org/10.3390/mi12060590>.
- (24) Wang, J.; Wang, J.; Feng, L.; Lin, T. Fluid Mixing in Droplet-Based Microfluidics with a Serpentine Microchannel. *RSC Adv.* **2015**, *5* (126), 104138–104144. <https://doi.org/10.1039/C5RA21181F>.

- (25) Pit, A.; Duits, M.; Mugele, F. Droplet Manipulations in Two Phase Flow Microfluidics. *Micromachines* **2015**, *6* (11), 1768–1793. <https://doi.org/10.3390/mi6111455>.
- (26) Roy, T.; Sinha, A.; Chakraborty, S.; Ganguly, R.; Puri, I. K. Magnetic Microsphere-Based Mixers for Microdroplets. *Phys. Fluids* **2009**, *21* (2), 027101. <https://doi.org/10.1063/1.3072602>.
- (27) Link, D. R.; Anna, S. L.; Weitz, D. A.; Stone, H. A. Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *92* (5), 054503. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.054503>.
- (28) Jung, J. H.; Destgeer, G.; Ha, B.; Park, J.; Sung, H. J. On-Demand Droplet Splitting Using Surface Acoustic Waves. *Lab. Chip* **2016**, *16* (17), 3235–3243. <https://doi.org/10.1039/C6LC00648E>.
- (29) Mazutis, L.; Griffiths, A. D. Selective Droplet Coalescence Using Microfluidic Systems. *Lab. Chip* **2012**, *12* (10), 1800–1806. <https://doi.org/10.1039/c2lc40121e>.
- (30) Bremond, N.; Thiam, A. R.; Bibette, J. Decompressing Emulsion Droplets Favors Coalescence. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100* (2), 024501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.024501>.
- (31) Fidalgo, L. M.; Abell, C.; Huck, W. T. S. Surface-Induced Droplet Fusion in Microfluidic Devices. *Lab. Chip* **2007**, *7* (8), 984–986. <https://doi.org/10.1039/b708091c>.
- (32) Zagnoni, M.; Baroud, C. N.; Cooper, J. M. Electrically Initiated Upstream Coalescence Cascade of Droplets in a Microfluidic Flow. *Phys. Rev. E* **2009**, *80* (4), 046303. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.80.046303>.
- (33) Link, D. R.; Grasland-Mongrain, E.; Duri, A.; Sarrazin, F.; Cheng, Z.; Cristobal, G.; Marquez, M.; Weitz, D. A. Electric Control of Droplets in Microfluidic Devices. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (16), 2556–2560. <https://doi.org/10.1002/anie.200503540>.
- (34) Sesen, M.; Fakhfour, A.; Neild, A. Coalescence of Surfactant-Stabilized Adjacent Droplets Using Surface Acoustic Waves. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (12), 7538–7545. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05456>.
- (35) Sun, J.; Wang, W.; He, F.; Chen, Z.-H.; Xie, R.; Ju, X.-J.; Liu, Z.; Chu, L.-Y. On-Chip Thermo-Triggered Coalescence of Controllable Pickering Emulsion Droplet Pairs. *RSC Adv.* **2016**, *6* (69), 64182–64192. <https://doi.org/10.1039/C6RA12594H>.
- (36) O'Donovan, B.; Eastburn, D. J.; Abate, A. R. Electrode-Free Picoinjection of Microfluidic Drops. *Lab. Chip* **2012**, *12* (20), 4029–4032. <https://doi.org/10.1039/c2lc40693d>.
- (37) Ling, S. D.; Geng, Y.; Chen, A.; Du, Y.; Xu, J. Enhanced Single-Cell Encapsulation in Microfluidic Devices: From Droplet Generation to Single-Cell Analysis. *Biomicrofluidics* **2020**, *14* (6), 061508. <https://doi.org/10.1063/5.0018785>.

- (38) Collins, D. J.; Neild, A.; deMello, A.; Liu, A.-Q.; Ai, Y. The Poisson Distribution and beyond: Methods for Microfluidic Droplet Production and Single Cell Encapsulation. *Lab. Chip* **2015**, *15* (17), 3439–3459. <https://doi.org/10.1039/C5LC00614G>.
- (39) Li, P.; Ma, Z.; Zhou, Y.; Collins, D. J.; Wang, Z.; Ai, Y. Detachable Acoustophoretic System for Fluorescence-Activated Sorting at the Single-Droplet Level. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (15), 9970–9977. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01708>.
- (40) Moon, H.-S.; Je, K.; Min, J.-W.; Park, D.; Han, K.-Y.; Shin, S.-H.; Park, W.-Y.; Yoo, C. E.; Kim, S.-H. Inertial-Ordering-Assisted Droplet Microfluidics for High-Throughput Single-Cell RNA-Sequencing. *Lab. Chip* **2018**, *18* (5), 775–784. <https://doi.org/10.1039/C7LC01284E>.
- (41) Kemna, E. W. M.; Schoeman, R. M.; Wolbers, F.; Vermes, I.; Weitz, D. A.; van den Berg, A. High-Yield Cell Ordering and Deterministic Cell-in-Droplet Encapsulation Using Dean Flow in a Curved Microchannel. *Lab. Chip* **2012**, *12* (16), 2881–2887. <https://doi.org/10.1039/c2lc00013j>.
- (42) Kamalakshakurup, G.; Lee, A. P. High-Efficiency Single Cell Encapsulation and Size Selective Capture of Cells in Picoliter Droplets Based on Hydrodynamic Micro-Vortices. *Lab. Chip* **2017**, *17* (24), 4324–4333. <https://doi.org/10.1039/C7LC00972K>.
- (43) Sauzade, M.; Brouzes, E. Deterministic Trapping, Encapsulation and Retrieval of Single-Cells. *Lab. Chip* **2017**, *17* (13), 2186–2192. <https://doi.org/10.1039/C7LC00283A>.
- (44) Link, A.; McGrath, J. S.; Zaimagaoglu, M.; Franke, T. Active Single Cell Encapsulation Using SAW Overcoming the Limitations of Poisson Distribution. *Lab. Chip* **2022**, *22* (1), 193–200. <https://doi.org/10.1039/D1LC00880C>.
- (45) Zhong, J.; Liang, M.; Tang, Q.; Ai, Y. Selectable Encapsulated Cell Quantity in Droplets via Label-Free Electrical Screening and Impedance-Activated Sorting. *Mater. Today Bio* **2023**, *19*, 100594. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100594>.
- (46) Köster, S.; Angilè, F. E.; Duan, H.; Agresti, J. J.; Wintner, A.; Schmitz, C.; Rowat, A. C.; Merten, C. A.; Pisignano, D.; Griffiths, A. D.; Weitz, D. A. Drop-Based Microfluidic Devices for Encapsulation of Single Cells. *Lab. Chip* **2008**, *8* (7), 1110–1115. <https://doi.org/10.1039/b802941e>.
- (47) Didelot, A.; Kotsopoulos, S. K.; Lupo, A.; Pekin, D.; Li, X.; Atochin, I.; Srinivasan, P.; Zhong, Q.; Olson, J.; Link, D. R.; Laurent-Puig, P.; Blons, H.; Hutchison, J. B.; Taly, V. Multiplex Picoliter-Droplet Digital PCR for Quantitative Assessment of DNA Integrity in Clinical Samples. *Clin. Chem.* **2013**, *59* (5), 815–823. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.193409>.
- (48) Clausell-Tormos, J.; Lieber, D.; Baret, J.-C.; El-Harrak, A.; Miller, O. J.; Frenz, L.; Blouwolff, J.; Humphry, K. J.; Köster, S.; Duan, H.; Holtze, C.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D.; Merten, C. A. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (5), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.04.004>.

- (49) Frenz, L.; Blank, K.; Brouzes, E.; Griffiths, A. D. Reliable Microfluidic On-Chip Incubation of Droplets in Delay-Lines. *Lab Chip* **2009**, *9* (10), 1344–1348. <https://doi.org/10.1039/B816049J>.
- (50) Huebner, A.; Bratton, D.; Whyte, G.; Yang, M.; deMello, A. J.; Abell, C.; Hollfelder, F. Static Microdroplet Arrays: A Microfluidic Device for Droplet Trapping, Incubation and Release for Enzymatic and Cell-Based Assays. *Lab Chip* **2009**, *9* (5), 692–698. <https://doi.org/10.1039/B813709A>.
- (51) Collins, J.; Lee, A. P. Control of Serial Microfluidic Droplet Size Gradient by Step-Wise Ramping of Flow Rates. *Microfluid. Nanofluidics* **2006**, *3* (1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/s10404-006-0093-8>.
- (52) Baret, J.-C.; Miller, O. J.; Taly, V.; Ryckelynck, M.; El-Harrak, A.; Frenz, L.; Rick, C.; Samuels, M. L.; Hutchison, J. B.; Agresti, J. J.; Link, D. R.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D. Fluorescence-Activated Droplet Sorting (FADS): Efficient Microfluidic Cell Sorting Based on Enzymatic Activity. *Lab. Chip* **2009**, *9* (13), 1850–1858. <https://doi.org/10.1039/b902504a>.
- (53) Gérard, A.; Woolfe, A.; Mottet, G.; Reichen, M.; Castrillon, C.; Menrath, V.; Ellouze, S.; Poitou, A.; Doineau, R.; Briseno-Roa, L.; Canales-Herrerias, P.; Mary, P.; Rose, G.; Ortega, C.; Delincé, M.; Essono, S.; Jia, B.; Iannascoli, B.; Richard-Le Goff, O.; Kumar, R.; Stewart, S. N.; Pousse, Y.; Shen, B.; Grosselin, K.; Saudemont, B.; Sautel-Caillé, A.; Godina, A.; McNamara, S.; Eyer, K.; Millot, G. A.; Baudry, J.; England, P.; Nizak, C.; Jensen, A.; Griffiths, A. D.; Bruhns, P.; Brennan, C. High-Throughput Single-Cell Activity-Based Screening and Sequencing of Antibodies Using Droplet Microfluidics. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38* (6), 715–721. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0466-7>.
- (54) Gielen, F.; Hours, R.; Emond, S.; Fischlechner, M.; Schell, U.; Hollfelder, F. Ultrahigh-Throughput-Directed Enzyme Evolution by Absorbance-Activated Droplet Sorting (AADS). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (47), E7383–E7389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606927113>.
- (55) Türkcan, S.; Nguyen, J.; Vilalta, M.; Shen, B.; Chin, F. T.; Pratx, G.; Abbyad, P. Single-Cell Analysis of [18F]Fluorodeoxyglucose Uptake by Droplet Radiofluidics. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (13), 6667–6673. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00792>.
- (56) Maceiczky, R. M.; Hess, D.; Chiu, F. W. Y.; Stavrakis, S.; deMello, A. J. Differential Detection Photothermal Spectroscopy: Towards Ultra-Fast and Sensitive Label-Free Detection in Picoliter & Femtoliter Droplets. *Lab Chip* **2017**, *17* (21), 3654–3663. <https://doi.org/10.1039/C7LC00946A>.
- (57) Ng, E. X.; Miller, M. A.; Jing, T.; Chen, C.-H. Single Cell Multiplexed Assay for Proteolytic Activity Using Droplet Microfluidics. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *81*, 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.002>.
- (58) Willner, M. R.; McMillan, K. S.; Graham, D.; Vikesland, P. J.; Zagnoni, M. Surface-Enhanced Raman Scattering Based Microfluidics for Single-Cell Analysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (20), 12004–12010. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b02636>.

- (59) Yin, L.; Zhang, Z.; Liu, Y.; Gao, Y.; Gu, J. Recent Advances in Single-Cell Analysis by Mass Spectrometry. *The Analyst* **2019**, *144* (3), 824–845. <https://doi.org/10.1039/C8AN01190G>.
- (60) Liu, W.; Zhu, Y. “Development and Application of Analytical Detection Techniques for Droplet-Based Microfluidics”-A Review. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1113*, 66–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.011>.
- (61) Liu, S.; Gu, Y.; Le Roux, R. B.; Matthews, S. M.; Bratton, D.; Yunus, K.; Fisher, A. C.; Huck, W. T. S. The Electrochemical Detection of Droplets in Microfluidic Devices. *Lab. Chip* **2008**, *8* (11), 1937–1942. <https://doi.org/10.1039/b809744e>.
- (62) Lombardo, T.; Lancellotti, L.; Souprayen, C.; Sella, C.; Thouin, L. Electrochemical Detection of Droplets in Microfluidic Devices: Simultaneous Determination of Velocity, Size and Content. *Electroanalysis* **2019**, *31* (11), 2103–2111. <https://doi.org/10.1002/elan.201900293>.
- (63) Pan, C. W.; Horvath, D. G.; Braza, S.; Moore, T.; Lynch, A.; Feit, C.; Abbyad, P. Sorting by Interfacial Tension (SIFT): Label-Free Selection of Live Cells Based on Single-Cell Metabolism. *Lab. Chip* **2019**, *19* (8), 1344–1351. <https://doi.org/10.1039/C8LC01328D>.
- (64) Tan, Y.-C.; Ho, Y. L.; Lee, A. P. Microfluidic Sorting of Droplets by Size. *Microfluid. Nanofluidics* **2008**, *4* (4), 343–348. <https://doi.org/10.1007/s10404-007-0184-1>.
- (65) Mazutis, L.; Griffiths, A. D. Preparation of Monodisperse Emulsions by Hydrodynamic Size Fractionation. *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *95* (20), 204103. <https://doi.org/10.1063/1.3250432>.
- (66) Hatch, A. C.; Patel, A.; Beer, N. R.; Lee, A. P. Passive Droplet Sorting Using Viscoelastic Flow Focusing. *Lab. Chip* **2013**, *13* (7), 1308–1315. <https://doi.org/10.1039/c2lc41160a>.
- (67) Xi, H.-D.; Zheng, H.; Guo, W.; Gañán-Calvo, A. M.; Ai, Y.; Tsao, C.-W.; Zhou, J.; Li, W.; Huang, Y.; Nguyen, N.-T.; Tan, S. H. Active Droplet Sorting in Microfluidics: A Review. *Lab. Chip* **2017**, *17* (5), 751–771. <https://doi.org/10.1039/C6LC01435F>.
- (68) Sánchez Barea, J.; Lee, J.; Kang, D.-K. Recent Advances in Droplet-Based Microfluidic Technologies for Biochemistry and Molecular Biology. *Micromachines* **2019**, *10* (6), 412. <https://doi.org/10.3390/mi10060412>.
- (69) Theberge, A. B.; Whyte, G.; Frenzel, M.; Fidalgo, L. M.; Wootton, R. C. R.; Huck, W. T. S. Suzuki–Miyaura Coupling Reactions in Aqueous Microdroplets with Catalytically Active Fluorous Interfaces. *Chem. Commun.* **2009**, No. 41, 6225–6227. <https://doi.org/10.1039/b911594c>.
- (70) Jochyms, Q.; Mignard, E.; Vincent, J.-M. Fluorosurfactants for Applications in Catalysis. *J. Fluor. Chem.* **2015**, *177*, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2015.01.011>.
- (71) de Mas, N.; Günther, A.; Schmidt, M. A.; Jensen, K. F. Microfabricated Multiphase Reactors for the Selective Direct Fluorination of Aromatics. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, *42* (4), 698–710. <https://doi.org/10.1021/ie020717q>.

- (72) Cygan, Z. T.; Cabral, J. T.; Beers, K. L.; Amis, E. J. Microfluidic Platform for the Generation of Organic-Phase Microreactors. *Langmuir* **2005**, *21* (8), 3629–3634. <https://doi.org/10.1021/la0471137>.
- (73) Sun, A. C.; Steyer, D. J.; Allen, A. R.; Payne, E. M.; Kennedy, R. T.; Stephenson, C. R. J. A Droplet Microfluidic Platform for High-Throughput Photochemical Reaction Discovery. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 6202. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19926-z>.
- (74) Zhao, Y.; Cheng, Y.; Shang, L.; Wang, J.; Xie, Z.; Gu, Z. Microfluidic Synthesis of Barcode Particles for Multiplex Assays. *Small* **2015**, *11* (2), 151–174. <https://doi.org/10.1002/smll.201401600>.
- (75) Nisisako, T. Recent Advances in Microfluidic Production of Janus Droplets and Particles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2016**, *25*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.05.003>.
- (76) Song, H.; Chen, D. L.; Ismagilov, R. F. Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (44), 7336–7356. <https://doi.org/10.1002/anie.200601554>.
- (77) Jiang, Z.; Shi, H.; Tang, X.; Qin, J. Recent Advances in Droplet Microfluidics for Single-Cell Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2023**, *159*, 116932. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116932>.
- (78) Klein, A. M.; Macosko, E. InDrops and Drop-Seq Technologies for Single-Cell Sequencing. *Lab. Chip* **2017**, *17* (15), 2540–2541. <https://doi.org/10.1039/C7LC90070H>.
- (79) Del Ben, F.; Turetta, M.; Celetti, G.; Piruska, A.; Bulfoni, M.; Cesselli, D.; Huck, W. T. S.; Scoles, G. A Method for Detecting Circulating Tumor Cells Based on the Measurement of Single-Cell Metabolism in Droplet-Based Microfluidics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (30), 8581–8584. <https://doi.org/10.1002/anie.201602328>.
- (80) Cedillo-Alcantar, D. F.; Han, Y. D.; Choi, J.; Garcia-Cordero, J. L.; Revzin, A. Automated Droplet-Based Microfluidic Platform for Multiplexed Analysis of Biochemical Markers in Small Volumes. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (8), 5133–5141. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05689>.
- (81) Gu, Z.; Wu, M.-L.; Yan, B.-Y.; Wang, H.-F.; Kong, C. Integrated Digital Microfluidic Platform for Colorimetric Sensing of Nitrite. *ACS Omega* **2020**, *5* (19), 11196–11201. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01274>.
- (82) Song, H.; Li, H.-W.; Munson, M. S.; Van Ha, T. G.; Ismagilov, R. F. On-Chip Titration of an Anticoagulant Argatroban and Determination of the Clotting Time within Whole Blood or Plasma Using a Plug-Based Microfluidic System. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (14), 4839–4849. <https://doi.org/10.1021/ac0601718>.
- (83) Hammar, P.; Angermayr, S. A.; Sjostrom, S. L.; van der Meer, J.; Hellingwerf, K. J.; Hudson, E. P.; Joensson, H. N. Single-Cell Screening of Photosynthetic Growth and Lactate Production by Cyanobacteria. *Biotechnol. Biofuels* **2015**, *8* (1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0380-2>.

- (84) Brouzes, E.; Medkova, M.; Savenelli, N.; Marran, D.; Twardowski, M.; Hutchison, J. B.; Rothberg, J. M.; Link, D. R.; Perrimon, N.; Samuels, M. L. Droplet Microfluidic Technology for Single-Cell High-Throughput Screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (34), 14195–14200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903542106>.
- (85) Miller, O. J.; Harrak, A. E.; Mangeat, T.; Baret, J.-C.; Frenz, L.; Debs, B. E.; Mayot, E.; Samuels, M. L.; Rooney, E. K.; Dieu, P.; Galvan, M.; Link, D. R.; Griffiths, A. D. High-Resolution Dose–Response Screening Using Droplet-Based Microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (2), 378–383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113324109>.
- (86) Mullis, K. B.; Faloona, F. A. [21] Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1987; Vol. 155, pp 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6).
- (87) Teymouri, M.; Mollazadeh, S.; Mortazavi, H.; Naderi Ghale-noie, Z.; Keyvani, V.; Aghababaei, F.; Hamblin, M. R.; Abbaszadeh-Goudarzi, G.; Pourghadamyari, H.; Hashemian, S. M. R.; Mirzaei, H. Recent Advances and Challenges of RT-PCR Tests for the Diagnosis of COVID-19. *Pathol. - Res. Pract.* **2021**, *221*, 153443. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153443>.
- (88) Schaerli, Y.; Wootton, R. C.; Robinson, T.; Stein, V.; Dunsby, C.; Neil, M. A. A.; French, P. M. W.; deMello, A. J.; Abell, C.; Hollfelder, F. Continuous-Flow Polymerase Chain Reaction of Single-Copy DNA in Microfluidic Microdroplets. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (1), 302–306. <https://doi.org/10.1021/ac802038c>.
- (89) Hindson, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A.; Belgrader, P.; Heredia, N. J.; Makarewicz, A. J.; Bright, I. J.; Lucero, M. Y.; Hiddessen, A. L.; Legler, T. C.; Kitano, T. K.; Hodel, M. R.; Petersen, J. F.; Wyatt, P. W.; Steenblock, E. R.; Shah, P. H.; Bousse, L. J.; Troup, C. B.; Mellen, J. C.; Wittmann, D. K.; Erndt, N. G.; Cauley, T. H.; Koehler, R. T.; So, A. P.; Dube, S.; Rose, K. A.; Montesclaros, L.; Wang, S.; Stumbo, D. P.; Hodges, S. P.; Romine, S.; Milanovich, F. P.; White, H. E.; Regan, J. F.; Karlin-Neumann, G. A.; Hindson, C. M.; Saxonov, S.; Colston, B. W. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>.
- (90) Zhu, X.; Liu, P.; Lu, L.; Zhong, H.; Xu, M.; Jia, R.; Su, L.; Cao, L.; Sun, Y.; Guo, M.; Sun, J.; Xu, J. Development of a Multiplex Droplet Digital PCR Assay for Detection of Enterovirus, Parechovirus, Herpes Simplex Virus 1 and 2 Simultaneously for Diagnosis of Viral CNS Infections. *Viol. J.* **2022**, *19* (1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01798-y>.
- (91) Pekin, D.; Skhiri, Y.; Baret, J.-C.; Le Corre, D.; Mazutis, L.; Ben Salem, C.; Millot, F.; El Harrak, A.; Hutchison, J. B.; Larson, J. W.; Link, D. R.; Laurent-Puig, P.; Griffiths, A. D.; Taly, V. Quantitative and Sensitive Detection of Rare Mutations Using Droplet-Based Microfluidics. *Lab. Chip* **2011**, *11* (13), 2156–2166. <https://doi.org/10.1039/c1lc20128j>.
- (92) Kaushik, A. M.; Hsieh, K.; Wang, T. Droplet Microfluidics for High-sensitivity and High-throughput Detection and Screening of Disease Biomarkers. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **2018**, *10* (6), e1522. <https://doi.org/10.1002/wnan.1522>.

- (93) Zec, H.; Shin, D. J.; Wang, T.-H. Novel Droplet Platforms for the Detection of Disease Biomarkers. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2014**, *14* (7), 787–801. <https://doi.org/10.1586/14737159.2014.945437>.
- (94) Pellegrino, M.; Sciambi, A.; Treusch, S.; Durruthy-Durruthy, R.; Gokhale, K.; Jacob, J.; Chen, T. X.; Geis, J. A.; Oldham, W.; Matthews, J.; Kantarjian, H.; Futreal, P. A.; Patel, K.; Jones, K. W.; Takahashi, K.; Eastburn, D. J. High-Throughput Single-Cell DNA Sequencing of Acute Myeloid Leukemia Tumors with Droplet Microfluidics. *Genome Res.* **2018**, *28* (9), 1345–1352. <https://doi.org/10.1101/gr.232272.117>.
- (95) Kim, S. C.; Clark, I. C.; Shahi, P.; Abate, A. R. Single-Cell RT-PCR in Microfluidic Droplets with Integrated Chemical Lysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (2), 1273–1279. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04050>.
- (96) Matuła, K.; Rivello, F.; Huck, W. T. S. Single-Cell Analysis Using Droplet Microfluidics. *Adv. Biosyst.* **2020**, *4* (1), 1900188. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900188>.
- (97) Zilionis, R.; Nainys, J.; Veres, A.; Savova, V.; Zemmour, D.; Klein, A. M.; Mazutis, L. Single-Cell Barcoding and Sequencing Using Droplet Microfluidics. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (1), 44–73. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.154>.
- (98) Klein, A. M.; Mazutis, L.; Akartuna, I.; Tallapragada, N.; Veres, A.; Li, V.; Peshkin, L.; Weitz, D. A.; Kirschner, M. W. Droplet Barcoding for Single-Cell Transcriptomics Applied to Embryonic Stem Cells. *Cell* **2015**, *161* (5), 1187–1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044>.
- (99) Zheng, B.; Tice, J. D.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F. A Droplet-Based, Composite PDMS/Glass Capillary Microfluidic System for Evaluating Protein Crystallization Conditions by Microbatch and Vapor-Diffusion Methods with On-Chip X-Ray Diffraction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (19), 2508–2511. <https://doi.org/10.1002/anie.200453974>.
- (100) Mazutis, L.; Araghi, A. F.; Miller, O. J.; Baret, J.-C.; Frenz, L.; Janoshazi, A.; Taly, V.; Miller, B. J.; Hutchison, J. B.; Link, D.; Griffiths, A. D.; Ryckelynck, M. Droplet-Based Microfluidic Systems for High-Throughput Single DNA Molecule Isothermal Amplification and Analysis. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (12), 4813–4821. <https://doi.org/10.1021/ac900403z>.
- (101) Courtois, F.; Olguin, L. F.; Whyte, G.; Bratton, D.; Huck, W. T. S.; Abell, C.; Hollfelder, F. An Integrated Device for Monitoring Time-Dependent in Vitro Expression From Single Genes in Picolitre Droplets. *ChemBioChem* **2008**, *9* (3), 439–446. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700536>.
- (102) Arayanarakool, R.; Shui, L.; Kengen, S. W. M.; van den Berg, A.; Eijkel, J. C. T. Single-Enzyme Analysis in a Droplet-Based Micro- and Nanofluidic System. *Lab. Chip* **2013**, *13* (10), 1955–1962. <https://doi.org/10.1039/c3lc41100a>.
- (103) Chen, C.-H.; Sarkar, A.; Song, Y.-A.; Miller, M. A.; Kim, S. J.; Griffith, L. G.; Lauffenburger, D. A.; Han, J. Enhancing Protease Activity Assay in Droplet-Based Microfluidics Using a Biomolecule Concentrator. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (27), 10368–10371. <https://doi.org/10.1021/ja2036628>.

- (104) Manteca, A.; Gadea, A.; Van Assche, D.; Cossard, P.; Gillard-Bocquet, M.; Beneyton, T.; Innis, C. A.; Baret, J.-C. Directed Evolution in Drops: Molecular Aspects and Applications. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (11), 2772–2783. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00313>.
- (105) Beneyton, T.; Thomas, S.; Griffiths, A. D.; Nicaud, J.-M.; Drevelle, A.; Rossignol, T. Droplet-Based Microfluidic High-Throughput Screening of Heterologous Enzymes Secreted by the Yeast *Yarrowia Lipolytica*. *Microb. Cell Factories* **2017**, *16* (1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0629-5>.
- (106) Prakadan, S. M.; Shalek, A. K.; Weitz, D. A. Scaling by Shrinking: Empowering Single-Cell “omics” with Microfluidic Devices. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18* (6), 345–361. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.15>.
- (107) Shahi, P.; Kim, S. C.; Haliburton, J. R.; Gartner, Z. J.; Abate, A. R. Abseq: Ultrahigh-Throughput Single Cell Protein Profiling with Droplet Microfluidic Barcoding. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 44447. <https://doi.org/10.1038/srep44447>.
- (108) DeVoe, D. L.; Lee, C. S. Microfluidic Technologies for MALDI-MS in Proteomics. *ELECTROPHORESIS* **2006**, *27* (18), 3559–3568. <https://doi.org/10.1002/elps.200600224>.
- (109) Taniguchi, Y.; Choi, P. J.; Li, G.-W.; Chen, H.; Babu, M.; Hearn, J.; Emili, A.; Xie, X. S. Quantifying *E. Coli* Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. *Science* **2010**, *329* (5991), 533–538. <https://doi.org/10.1126/science.1188308>.
- (110) Magdeldin, S.; Enany, S.; Yoshida, Y.; Xu, B.; Zhang, Y.; Zureena, Z.; Lokamani, I.; Yaoita, E.; Yamamoto, T. Basics and Recent Advances of Two Dimensional- Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Clin. Proteomics* **2014**, *11* (1), 16. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-16>.
- (111) Lin, Y.; Trouillon, R.; Safina, G.; Ewing, A. G. Chemical Analysis of Single Cells. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (12), 4369–4392. <https://doi.org/10.1021/ac2009838>.
- (112) Telford, W. G.; Hawley, T.; Subach, F.; Verkhusha, V.; Hawley, R. G. Flow Cytometry of Fluorescent Proteins. *Methods* **2012**, *57* (3), 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.003>.
- (113) Spitzer, M. H.; Nolan, G. P. Mass Cytometry: Single Cells, Many Features. *Cell* **2016**, *165* (4), 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.019>.
- (114) Mou, L.; Jiang, X. Materials for Microfluidic Immunoassays: A Review. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (15), 1601403. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601403>.
- (115) Byrnes, S. A.; Huynh, T.; Chang, T. C.; Anderson, C. E.; McDermott, J. J.; Oncina, C. I.; Weigl, B. H.; Nichols, K. P. Wash-Free, Digital Immunoassay in Polydisperse Droplets. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (5), 3535–3543. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02526>.
- (116) Mondal, M.; Liao, R.; Guo, J. Highly Multiplexed Single-Cell Protein Analysis. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24* (28), 7083–7091. <https://doi.org/10.1002/chem.201705014>.

- (117) Heath, J. R.; Ribas, A.; Mischel, P. S. Single-Cell Analysis Tools for Drug Discovery and Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15* (3), 204–216. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.16>.
- (118) Labib, M.; Kelley, S. O. Single-Cell Analysis Targeting the Proteome. *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4* (3), 143–158. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-0162-7>.
- (119) Brown, K. J.; Formolo, C. A.; Seol, H.; Marathi, R. L.; Duguez, S.; An, E.; Pillai, D.; Nazarian, J.; Rood, B. R.; Hathout, Y. Advances in the Proteomic Investigation of the Cell Secretome. *Expert Rev. Proteomics* **2012**, *9* (3), 337–345. <https://doi.org/10.1586/epr.12.21>.
- (120) Jammes, F. C.; Maerkl, S. J. How Single-Cell Immunology Is Benefiting from Microfluidic Technologies. *Microsyst. Nanoeng.* **2020**, *6* (1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41378-020-0140-8>.
- (121) Stastna, M.; Van Eyk, J. E. Secreted Proteins as a Fundamental Source for Biomarker Discovery. *PROTEOMICS* **2012**, *12* (4–5), 722–735. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100346>.
- (122) Ranganathan, S.; Garg, G. Secretome: Clues into Pathogen Infection and Clinical Applications. *Genome Med.* **2009**, *1* (11), 113. <https://doi.org/10.1186/gm113>.
- (123) Bucheli, O. T. M.; Sigvaldadóttir, I.; Eyer, K. Measuring Single-cell Protein Secretion in Immunology: Technologies, Advances, and Applications. *Eur. J. Immunol.* **2021**, *51* (6), 1334–1347. <https://doi.org/10.1002/eji.202048976>.
- (124) Luo, X.; Chen, J.-Y.; Ataei, M.; Lee, A. Microfluidic Compartmentalization Platforms for Single Cell Analysis. *Biosensors* **2022**, *12* (2), 58. <https://doi.org/10.3390/bios12020058>.
- (125) Shembekar, N.; Chaipan, C.; Utharala, R.; Merten, C. A. Droplet-Based Microfluidics in Drug Discovery, Transcriptomics and High-Throughput Molecular Genetics. *Lab. Chip* **2016**, *16* (8), 1314–1331. <https://doi.org/10.1039/C6LC00249H>.
- (126) Stoeckius, M.; Hafemeister, C.; Stephenson, W.; Houck-Loomis, B.; Chattopadhyay, P. K.; Swerdlow, H.; Satija, R.; Smibert, P. Simultaneous Epitope and Transcriptome Measurement in Single Cells. *Nat. Methods* **2017**, *14* (9), 865–868. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4380>.
- (127) Peterson, V. M.; Zhang, K. X.; Kumar, N.; Wong, J.; Li, L.; Wilson, D. C.; Moore, R.; McClanahan, T. K.; Sadekova, S.; Klappenbach, J. A. Multiplexed Quantification of Proteins and Transcripts in Single Cells. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (10), 936–939. <https://doi.org/10.1038/nbt.3973>.
- (128) Yu, Z.; Zhou, L.; Zhang, T.; Shen, R.; Li, C.; Fang, X.; Griffiths, G.; Liu, J. Sensitive Detection of MMP9 Enzymatic Activities in Single Cell-Encapsulated Microdroplets as an Assay of Cancer Cell Invasiveness. *ACS Sens.* **2017**, *2* (5), 626–634. <https://doi.org/10.1021/acssensors.6b00731>.
- (129) Bajar, B. T.; Wang, E. S.; Zhang, S.; Lin, M. Z.; Chu, J. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors* **2016**, *16* (9), 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>.

- (130) Sekar, R. B.; Periasamy, A. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localizations. *J. Cell Biol.* **2003**, *160* (5), 629–633. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210140>.
- (131) Algar, W. R.; Hildebrandt, N.; Vogel, S. S.; Medintz, I. L. FRET as a Biomolecular Research Tool — Understanding Its Potential While Avoiding Pitfalls. *Nat. Methods* **2019**, *16* (9), 815–829. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8>.
- (132) Debs, B. E.; Utharala, R.; Balyasnikova, I. V.; Griffiths, A. D.; Merten, C. A. Functional Single-Cell Hybridoma Screening Using Droplet-Based Microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (29), 11570–11575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204514109>.
- (133) Darwish, I. A. Immunoassay Methods and Their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **2006**, *2* (3), 217–235.
- (134) Plaut, D. S. Immunoassays in the Clinical Chemistry Laboratory. *Lab. Med.* **1999**, *30* (11), 728–731. <https://doi.org/10.1093/labmed/30.11.728>.
- (135) Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A. Drivers of Biodiagnostic Development. *Nature* **2009**, *462* (7272), 461–464. <https://doi.org/10.1038/nature08605>.
- (136) Lin, C.-C.; Wang, J.-H.; Wu, H.-W.; Lee, G.-B. Microfluidic Immunoassays. *J. Assoc. Lab. Autom.* **2010**, *15* (3), 253–274. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.01.013>.
- (137) Hornbeck, P. V. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *110* (1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0201s110>.
- (138) Shah, K.; Maghsoudlou, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): The Basics. *Br. J. Hosp. Med.* **2016**, *77* (7), C98–C101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>.
- (139) Sakamoto, S.; Putalun, W.; Vimolmangkang, S.; Phoolcharoen, W.; Shoyama, Y.; Tanaka, H.; Morimoto, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantitative/Qualitative Analysis of Plant Secondary Metabolites. *J. Nat. Med.* **2018**, *72* (1), 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.
- (140) Cohen, L.; Walt, D. R. Single-Molecule Arrays for Protein and Nucleic Acid Analysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2017**, *10* (1), 345–363. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045340>.
- (141) Duffy, D. C.; Walt, D. R. Protein Detection by Counting Molecules. *Clin. Chem.* **2019**, *65* (6), 809–810. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.298653>.
- (142) Tighe, P. J.; Ryder, R. R.; Todd, I.; Fairclough, L. C. ELISA in the Multiplex Era: Potentials and Pitfalls. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* **2015**, *9* (3–4), 406–422. <https://doi.org/10.1002/prca.201400130>.
- (143) Lim, C. T.; Zhang, Y. Bead-Based Microfluidic Immunoassays: The next Generation. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22* (7), 1197–1204. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.005>.

- (144) Tang, M. Y. H.; Shum, H. C. One-Step Immunoassay of C-Reactive Protein Using Droplet Microfluidics. *Lab. Chip* **2016**, *16* (22), 4359–4365. <https://doi.org/10.1039/C6LC01121G>.
- (145) Mazutis, L.; Gilbert, J.; Ung, W. L.; Weitz, D. A.; Griffiths, A. D.; Heyman, J. A. Single-Cell Analysis and Sorting Using Droplet-Based Microfluidics. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (5), 870–891. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.046>.
- (146) Konry, T.; Dominguez-Villar, M.; Baecher-Allan, C.; Hafler, D. A.; Yarmush, Martin. L. Droplet-Based Microfluidic Platforms for Single T Cell Secretion Analysis of IL-10 Cytokine. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (5), 2707–2710. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.006>.
- (147) Ding, R.; Hung, K.-C.; Mitra, A.; Ung, L. W.; Lightwood, D.; Tu, R.; Starkie, D.; Cai, L.; Mazutis, L.; Chong, S.; Weitz, D. A.; Heyman, J. A. Rapid Isolation of Antigen-Specific B-Cells Using Droplet Microfluidics. *RSC Adv.* **2020**, *10* (45), 27006–27013. <https://doi.org/10.1039/D0RA04328A>.
- (148) Tate, J.; Ward, G. Interferences in Immunoassay. *Clin. Biochem. Rev.* **2004**, *25* (2), 105–120.
- (149) Eyer, K.; Doineau, R. C. L.; Castrillon, C. E.; Briseño-Roa, L.; Menrath, V.; Mottet, G.; England, P.; Godina, A.; Brient-Litzler, E.; Nizak, C.; Jensen, A.; Griffiths, A. D.; Bibette, J.; Bruhns, P.; Baudry, J. Single-Cell Deep Phenotyping of IgG-Secreting Cells for High-Resolution Immune Monitoring. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35* (10), 977–982. <https://doi.org/10.1038/nbt.3964>.
- (150) Gérard, A.; Woolfe, A.; Mottet, G.; Reichen, M.; Castrillon, C.; Menrath, V.; Ellouze, S.; Poitou, A.; Doineau, R.; Briseno-Roa, L.; Canales-Herrerias, P.; Mary, P.; Rose, G.; Ortega, C.; Delincé, M.; Essono, S.; Jia, B.; Iannascoli, B.; Richard-Le Goff, O.; Kumar, R.; Stewart, S. N.; Pousse, Y.; Shen, B.; Grosselin, K.; Saudemont, B.; Sautel-Caillé, A.; Godina, A.; McNamara, S.; Eyer, K.; Millot, G. A.; Baudry, J.; England, P.; Nizak, C.; Jensen, A.; Griffiths, A. D.; Bruhns, P.; Brenan, C. High-Throughput Single-Cell Activity-Based Screening and Sequencing of Antibodies Using Droplet Microfluidics. *Nat. Biotechnol.* **2020**, *38* (6), 715–721. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0466-7>.
- (151) Shembekar, N.; Hu, H.; Eustace, D.; Merten, C. A. Single-Cell Droplet Microfluidic Screening for Antibodies Specifically Binding to Target Cells. *Cell Rep.* **2018**, *22* (8), 2206–2215. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.071>.
- (152) Broketa, M.; Bruhns, P. Single-Cell Technologies for the Study of Antibody-Secreting Cells. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 821729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.821729>.
- (153) Rutkauskaite, J.; Berger, S.; Stavrakis, S.; Dressler, O.; Heyman, J.; Casadevall I Solvas, X.; deMello, A.; Mazutis, L. High-Throughput Single-Cell Antibody Secretion Quantification and Enrichment Using Droplet Microfluidics-Based FRET Assay. *iScience* **2022**, *25* (7), 104515. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104515>.
- (154) Rissin, D. M.; Kan, C. W.; Campbell, T. G.; Howes, S. C.; Fournier, D. R.; Song, L.; Piech, T.; Patel, P. P.; Chang, L.; Rivnak, A. J.; Ferrell, E. P.; Randall, J. D.; Provuncher, G. K.; Walt, D.

- R.; Duffy, D. C. Single-Molecule Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Detects Serum Proteins at Subfemtomolar Concentrations. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (6), 595–599. <https://doi.org/10.1038/nbt.1641>.
- (155) Rissin, D. M.; Walt, D. R. Digital Concentration Readout of Single Enzyme Molecules Using Femtoliter Arrays and Poisson Statistics. *Nano Lett.* **2006**, *6* (3), 520–523. <https://doi.org/10.1021/nl060227d>.
- (156) Cohen, L.; Cui, N.; Cai, Y.; Garden, P. M.; Li, X.; Weitz, D. A.; Walt, D. R. Single Molecule Protein Detection with Attomolar Sensitivity Using Droplet Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *ACS Nano* **2020**, *14* (8), 9491–9501. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02378>.
- (157) Shim, J.; Ranasinghe, R. T.; Smith, C. A.; Ibrahim, S. M.; Hollfelder, F.; Huck, W. T. S.; Klenerman, D.; Abell, C. Ultrarapid Generation of Femtoliter Microfluidic Droplets for Single-Molecule-Counting Immunoassays. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 5955–5964. <https://doi.org/10.1021/nn401661d>.
- (158) Ho, T. M.; Razzaghi, A.; Ramachandran, A.; Mikkonen, K. S. Emulsion Characterization via Microfluidic Devices: A Review on Interfacial Tension and Stability to Coalescence. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2022**, *299*, 102541. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102541>.
- (159) Riechers, B.; Maes, F.; Akoury, E.; Semin, B.; Gruner, P.; Baret, J.-C. Surfactant Adsorption Kinetics in Microfluidics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (41), 11465–11470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604307113>.
- (160) Baret, J.-C.; Kleinschmidt, F.; El Harrak, A.; Griffiths, A. D. Kinetic Aspects of Emulsion Stabilization by Surfactants: A Microfluidic Analysis. *Langmuir* **2009**, *25* (11), 6088–6093. <https://doi.org/10.1021/la9000472>.
- (161) Ruckenstein, E.; Nagarajan, R. Critical Micelle Concentration. Transition Point for Micellar Size Distribution. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79* (24), 2622–2626. <https://doi.org/10.1021/j100591a010>.
- (162) Dai, B.; Leal, L. G. The Mechanism of Surfactant Effects on Drop Coalescence. *Phys. Fluids* **2008**, *20* (4), 040802. <https://doi.org/10.1063/1.2911700>.
- (163) Taylor, P. Ostwald Ripening in Emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1995**, *99* (2–3), 175–185. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(95\)03161-6](https://doi.org/10.1016/0927-7757(95)03161-6).
- (164) Pal, R. Modeling of Sedimentation and Creaming in Suspensions and Pickering Emulsions. *Fluids* **2019**, *4* (4), 186. <https://doi.org/10.3390/fluids4040186>.
- (165) Witthayapanyanon, A.; Harwell, J. H.; Sabatini, D. A. Hydrophilic–Lipophilic Deviation (HLD) Method for Characterizing Conventional and Extended Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *325* (1), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.05.061>.
- (166) Lin, I. J. Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) of Fluorocarbon Surfactants and Its Relation to the Critical Micelle Concentration (Cmc). *J. Phys. Chem.* **1972**, *76* (14), 2019–2023. <https://doi.org/10.1021/j100658a020>.

- (167) Al-Soufi, W.; Novo, M. A Surfactant Concentration Model for the Systematic Determination of the Critical Micellar Concentration and the Transition Width. *Molecules* **2021**, *26* (17), 5339. <https://doi.org/10.3390/molecules26175339>.
- (168) Gruner, P.; Riechers, B.; Semin, B.; Lim, J.; Johnston, A.; Short, K.; Baret, J.-C. Controlling Molecular Transport in Minimal Emulsions. *Nat. Commun.* **2016**, *7* (1), 10392. <https://doi.org/10.1038/ncomms10392>.
- (169) Wagner, O.; Thiele, J.; Weinhart, M.; Mazutis, L.; Weitz, D. A.; Huck, W. T. S.; Haag, R. Biocompatible Fluorinated Polyglycerols for Droplet Microfluidics as an Alternative to PEG-Based Copolymer Surfactants. *Lab. Chip* **2015**, *16* (1), 65–69. <https://doi.org/10.1039/C5LC00823A>.
- (170) Yan, J. F.; Palmer, M. B. A Nuclear Magnetic Resonance Method for Determination of Critical Micelle Concentration. *J. Colloid Interface Sci.* **1969**, *30* (2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(69\)80004-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(69)80004-4).
- (171) Szutkowski, K.; Kołodziejaska, Ż.; Pietralik, Z.; Zhukov, I.; Skrzypczak, A.; Materna, K.; Kozak, M. Clear Distinction between CAC and CMC Revealed by High-Resolution NMR Diffusometry for a Series of Bis-Imidazolium Gemini Surfactants in Aqueous Solutions. *RSC Adv.* **2018**, *8* (67), 38470–38482. <https://doi.org/10.1039/C8RA07081D>.
- (172) Mabrouk, M. M.; Hamed, N. A.; Mansour, F. R. Spectroscopic Methods for Determination of Critical Micelle Concentrations of Surfactants; a Comprehensive Review. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2023**, *58* (3), 206–234. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1955702>.
- (173) Holt, D. J.; Payne, R. J.; Chow, W. Y.; Abell, C. Fluorosurfactants for Microdroplets: Interfacial Tension Analysis. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *350* (1), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.06.036>.
- (174) Etienne, G.; Kessler, M.; Amstad, E. Influence of Fluorinated Surfactant Composition on the Stability of Emulsion Drops. *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218* (2), 1600365. <https://doi.org/10.1002/macp.201600365>.
- (175) Savva, M.; Sivakumar, B.; Selvi, B. The Conventional Langmuir Trough Technique as a Convenient Means to Determine the Solubility of Sparingly Soluble Surface-Active Molecules: Case Study Cholesterol. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *325* (1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.04.025>.
- (176) Volpe, C. D.; Siboni, S. The Wilhelmy Method: A Critical and Practical Review. *Surf. Innov.* **2018**, *6* (3), 120–132. <https://doi.org/10.1680/jsuin.17.00059>.
- (177) Berry, J. D.; Neeson, M. J.; Dagastine, R. R.; Chan, D. Y. C.; Tabor, R. F. Measurement of Surface and Interfacial Tension Using Pendant Drop Tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *454*, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.05.012>.

- (178) Roach, L. S.; Song, H.; Ismagilov, R. F. Controlling Nonspecific Protein Adsorption in a Plug-Based Microfluidic System by Controlling Interfacial Chemistry Using Fluorous-Phase Surfactants. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (3), 785–796. <https://doi.org/10.1021/ac049061w>.
- (179) Scanga, R.; Chrastecka, L.; Mohammad, R.; Meadows, A.; Quan, P.-L.; Brouzes, E. Click Chemistry Approaches to Expand the Repertoire of PEG-Based Fluorinated Surfactants for Droplet Microfluidics. *RSC Adv.* **2018**, *8* (23), 12960–12974. <https://doi.org/10.1039/C8RA01254G>.
- (180) DeJournette, C. J.; Kim, J.; Medlen, H.; Li, X.; Vincent, L. J.; Easley, C. J. Creating Biocompatible Oil-Water Interfaces without Synthesis: Direct Interactions between Primary Amines and Carboxylated Perfluorocarbon Surfactants. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (21), 10556–10564. <https://doi.org/10.1021/ac4026048>.
- (181) Holtze, C.; Rowat, A. C.; Agresti, J. J.; Hutchison, J. B.; Angilè, F. E.; Schmitz, C. H. J.; Köster, S.; Duan, H.; Humphry, K. J.; Scanga, R. A.; Johnson, J. S.; Pisignano, D.; Weitz, D. A. Biocompatible Surfactants for Water-in-Fluorocarbon Emulsions. *Lab. Chip* **2008**, *8* (10), 1632–1639. <https://doi.org/10.1039/b806706f>.
- (182) Li, X.; Turánek, J.; Knötigová, P.; Kudláčková, H.; Mašek, J.; Pennington, D. B.; Rankin, S. E.; Knutson, B. L.; Lehmler, H.-J. Synthesis and Biocompatibility Evaluation of Fluorinated, Single-Tailed Glucopyranoside Surfactants. *New J. Chem.* **2008**, *32* (12), 2169–2179. <https://doi.org/10.1039/b805015e>.
- (183) Chowdhury, M. S.; Zheng, W.; Kumari, S.; Heyman, J.; Zhang, X.; Dey, P.; Weitz, D. A.; Haag, R. Dendronized Fluorosurfactant for Highly Stable Water-in-Fluorinated Oil Emulsions with Minimal Inter-Droplet Transfer of Small Molecules. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4546. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12462-5>.
- (184) Gruner, P.; Riechers, B.; Chacón Orellana, L. A.; Brosseau, Q.; Maes, F.; Beneyton, T.; Pekin, D.; Baret, J.-C. Stabilisers for Water-in-Fluorinated-Oil Dispersions: Key Properties for Microfluidic Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2015**, *20* (3), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.005>.
- (185) O'Hagan, D. Understanding Organofluorine Chemistry. An Introduction to the C–F Bond. *Chem Soc Rev* **2008**, *37* (2), 308–319. <https://doi.org/10.1039/B711844A>.
- (186) Kovalchuk, N. M.; Trybala, A.; Starov, V.; Matar, O.; Ivanova, N. Fluoro- vs Hydrocarbon Surfactants: Why Do They Differ in Wetting Performance? *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *210*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.04.003>.
- (187) Lemal, D. M. Perspective on Fluorocarbon Chemistry. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1021/jo0302556>.
- (188) Scott, R. L. The Solubility of Fluorocarbons <sup>1</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70* (12), 4090–4093. <https://doi.org/10.1021/ja01192a036>.

- (189) Fidalgo, L. M.; Whyte, G.; Bratton, D.; Kaminski, C. F.; Abell, C.; Huck, W. T. S. From Microdroplets to Microfluidics: Selective Emulsion Separation in Microfluidic Devices. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (11), 2042–2045. <https://doi.org/10.1002/anie.200704903>.
- (190) Chabert, M.; Dorfman, K. D.; de Cremoux, P.; Roeraade, J.; Viovy, J.-L. Automated Microdroplet Platform for Sample Manipulation and Polymerase Chain Reaction. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (22), 7722–7728. <https://doi.org/10.1021/ac061205e>.
- (191) Johnston, K. P.; Randolph, T.; Bright, F.; Howdle, S. Toxicology of a PFPE Surfactant. *Science* **1996**, *272* (5269), 1726b–1726b. <https://doi.org/10.1126/science.272.5269.1726b>.
- (192) Holt, D. J.; Payne, R. J.; Abell, C. Synthesis of Novel Fluorous Surfactants for Microdroplet Stabilisation in Fluorous Oil Streams. *J. Fluor. Chem.* **2010**, *131* (3), 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2009.12.010>.
- (193) Tedeschini, T.; Campara, B.; Grigoletto, A.; Bellini, M.; Salvalaio, M.; Matsuno, Y.; Suzuki, A.; Yoshioka, H.; Pasut, G. Polyethylene Glycol-Based Linkers as Hydrophilicity Reservoir for Antibody-Drug Conjugates. *J. Controlled Release* **2021**, *337*, 431–447. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.041>.
- (194) Alcantar, N. A.; Aydil, E. S.; Israelachvili, J. N. Polyethylene Glycol-Coated Biocompatible Surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51* (3), 343–351. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20000905\)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D).
- (195) Upadhyayula, S.; Quinata, T.; Bishop, S.; Gupta, S.; Johnson, N. R.; Bahmani, B.; Bozhilov, K.; Stubbs, J.; Jreij, P.; Nallagatla, P.; Vullev, V. I. Coatings of Polyethylene Glycol for Suppressing Adhesion between Solid Microspheres and Flat Surfaces. *Langmuir* **2012**, *28* (11), 5059–5069. <https://doi.org/10.1021/la300545v>.
- (196) Prime, K. L.; Whitesides, G. M. Adsorption of Proteins onto Surfaces Containing End-Attached Oligo(Ethylene Oxide): A Model System Using Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (23), 10714–10721. <https://doi.org/10.1021/ja00076a032>.
- (197) Li, M.; Jiang, S.; Simon, J.; Paßlick, D.; Frey, M.-L.; Wagner, M.; Mailänder, V.; Crespy, D.; Landfester, K. Brush Conformation of Polyethylene Glycol Determines the Stealth Effect of Nanocarriers in the Low Protein Adsorption Regime. *Nano Lett.* **2021**, *21* (4), 1591–1598. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c03756>.
- (198) Jeong, W.; Bu, J.; Jafari, R.; Rehak, P.; Kubiatoiwicz, L. J.; Drelich, A. J.; Owen, R. H.; Nair, A.; Rawding, P. A.; Poellmann, M. J.; Hopkins, C. M.; Král, P.; Hong, S. Hierarchically Multivalent Peptide–Nanoparticle Architectures: A Systematic Approach to Engineer Surface Adhesion. *Adv. Sci.* **2022**, *9* (4), 2103098. <https://doi.org/10.1002/advs.202103098>.
- (199) Zinchenko, A.; Devenish, S. R. A.; Kintsjes, B.; Colin, P.-Y.; Fischlechner, M.; Hollfelder, F. One in a Million: Flow Cytometric Sorting of Single Cell-Lysate Assays in Monodisperse Picolitre Double Emulsion Droplets for Directed Evolution. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2526–2533. <https://doi.org/10.1021/ac403585p>.

- (200) Lee, M.; Collins, J. W.; Aubrecht, D. M.; Sperling, R. A.; Solomon, L.; Ha, J.-W.; Yi, G.-R.; Weitz, D. A.; Manoharan, V. N. Synchronized Reinjection and Coalescence of Droplets in Microfluidics. *Lab Chip* **2014**, *14* (3), 509–513. <https://doi.org/10.1039/C3LC51214B>.
- (201) Lucio, A. *Optimization of Microdroplet-Based Techniques to Measure Mechanical Stresses in 3D Multicellular Systems*; University of California, Santa Barbara, 2018; Vol. Doctoral Thesis.
- (202) Malisova, B.; Tosatti, S.; Textor, M.; Gademann, K.; Zürcher, S. Poly(Ethylene Glycol) Adlayers Immobilized to Metal Oxide Substrates Through Catechol Derivatives: Influence of Assembly Conditions on Formation and Stability. *Langmuir* **2010**, *26* (6), 4018–4026. <https://doi.org/10.1021/la903486z>.
- (203) Koprowski, Bartosz T. *Lab Around the Chip: Novel Engineering and Chemical Tools for Droplet Based Microfluidics*; ETH Zurich, 2018; Vol. Doctoral Thesis.
- (204) Chowdhury, M. S.; Zheng, W.; Singh, A. K.; Ong, I. L. H.; Hou, Y.; Heyman, J. A.; Faghani, A.; Amstad, E.; Weitz, D. A.; Haag, R. Linear Triglycerol-Based Fluorosurfactants Show High Potential for Droplet-Microfluidics-Based Biochemical Assays. *Soft Matter* **2021**, *17* (31), 7260–7267. <https://doi.org/10.1039/D1SM00890K>.
- (205) Chowdhury, M. S.; Zhang, X.; Amini, L.; Dey, P.; Singh, A. K.; Faghani, A.; Schmueck-Henneresse, M.; Haag, R. Functional Surfactants for Molecular Fishing, Capsule Creation, and Single-Cell Gene Expression. *Nano-Micro Lett.* **2021**, *13* (1), 147. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00663-x>.
- (206) Dunkel, P.; Hayat, Z.; Barosi, A.; Bchellaoui, N.; Dhimane, H.; Dalko, P. I.; El Abed, A. I. Photolysis-Driven Merging of Microdroplets in Microfluidic Chambers. *Lab. Chip* **2016**, *16* (8), 1484–1491. <https://doi.org/10.1039/C6LC00024J>.
- (207) An, C.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Wang, J.; Zhang, Y.; Cheng, F.; Sun, K.; Wang, H. Thermo-Responsive Fluorinated Surfactant for on-Demand Demulsification of Microfluidic Droplets. *Lab. Chip* **2021**, *21* (18), 3412–3419. <https://doi.org/10.1039/D1LC00450F>.
- (208) Woronoff, G.; El Harrak, A.; Mayot, E.; Schicke, O.; Miller, O. J.; Soumillion, P.; Griffiths, A. D.; Ryckelynck, M. New Generation of Amino Coumarin Methyl Sulfonate-Based Fluorogenic Substrates for Amidase Assays in Droplet-Based Microfluidic Applications. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (8), 2852–2857. <https://doi.org/10.1021/ac200373n>.
- (209) Janiesch, J.-W.; Weiss, M.; Kannenberg, G.; Hannabuss, J.; Surrey, T.; Platzman, I.; Spatz, J. P. Key Factors for Stable Retention of Fluorophores and Labeled Biomolecules in Droplet-Based Microfluidics. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (4), 2063–2067. <https://doi.org/10.1021/ac504736e>.
- (210) Skhiri, Y.; Gruner, P.; Semin, B.; Brosseau, Q.; Pekin, D.; Mazutis, L.; Goust, V.; Kleinschmidt, F.; El Harrak, A.; Hutchison, J. B.; Mayot, E.; Bartolo, J.-F.; Griffiths, A. D.; Taly, V.; Baret, J.-C. Dynamics of Molecular Transport by Surfactants in Emulsions. *Soft Matter* **2012**, *8* (41), 10618–10627. <https://doi.org/10.1039/c2sm25934f>.

- (211) Jahnke, K.; Weiss, M.; Frey, C.; Antona, S.; Janiesch, J.; Platzman, I.; Göpfrich, K.; Spatz, J. P. Programmable Functionalization of Surfactant-Stabilized Microfluidic Droplets via DNA-Tags. *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29* (23), 1808647. <https://doi.org/10.1002/adfm.201808647>.
- (212) Lucio, A. A.; Mongera, A.; Shelton, E.; Chen, R.; Doyle, A. M.; Campàs, O. Spatiotemporal Variation of Endogenous Cell-Generated Stresses within 3D Multicellular Spheroids. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 12022. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12363-x>.
- (213) Li, M.; Jiang, W.; Chen, Z.; Suryaprakash, S.; Lv, S.; Tang, Z.; Chen, X.; Leong, K. W. A Versatile Platform for Surface Modification of Microfluidic Droplets. *Lab. Chip* **2017**, *17* (4), 635–639. <https://doi.org/10.1039/C7LC00079K>.
- (214) Dundas, C. M.; Demonte, D.; Park, S. Streptavidin–Biotin Technology: Improvements and Innovations in Chemical and Biological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (21), 9343–9353. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5232-z>.
- (215) Kreutz, J. E.; Li, L.; Roach, L. S.; Hatakeyama, T.; Ismagilov, R. F. Laterally Mobile, Functionalized Self-Assembled Monolayers at the Fluorous–Aqueous Interface in a Plug-Based Microfluidic System: Characterization and Testing with Membrane Protein Crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (17), 6042–6043. <https://doi.org/10.1021/ja808697e>.
- (216) Dauvergne, J.; Polidori, A.; Vénien-Bryan, C.; Pucci, B. Synthesis of a Hemifluorinated Amphiphile Designed for Self-Assembly and Two-Dimensional Crystallization of Membrane Protein. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49* (14), 2247–2250. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.02.043>.
- (217) Platzman, I.; Janiesch, J.-W.; Spatz, J. P. Synthesis of Nanostructured and Biofunctionalized Water-in-Oil Droplets as Tools for Homing T Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (9), 3339–3342. <https://doi.org/10.1021/ja311588c>.
- (218) Sarin, V.; Gaffin, R. D.; Meininger, G. A.; Muthuchamy, M. Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD)-Containing Peptides Inhibit the Force Production of Mouse Papillary Muscle Bundles via  $\alpha_5\beta_1$  Integrin: Regulation of Cardiac Contractility by Integrins. *J. Physiol.* **2005**, *564* (2), 603–617. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.083238>.
- (219) Geisow, M. J. Fluorescein Conjugates as Indicators of Subcellular PH. *Exp. Cell Res.* **1984**, *150* (1), 29–35. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(84\)90698-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(84)90698-0).
- (220) Sanford, L. N.; Wittwer, C. T. Monitoring Temperature with Fluorescence during Real-Time PCR and Melting Analysis. *Anal. Biochem.* **2013**, *434* (1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.037>.
- (221) Haller, B.; Göpfrich, K.; Schröter, M.; Janiesch, J.-W.; Platzman, I.; Spatz, J. P. Charge-Controlled Microfluidic Formation of Lipid-Based Single- and Multicompartement Systems. *Lab. Chip* **2018**, *18* (17), 2665–2674. <https://doi.org/10.1039/C8LC00582F>.

- (222) Sheshachala, S.; Huber, B.; Schuetzke, J.; Mikut, R.; Scharnweber, T.; Domínguez, C. M.; Mutlu, H.; Niemeyer, C. M. Charge Controlled Interactions between DNA-Modified Silica Nanoparticles and Fluorosurfactants in Microfluidic Water-in-Oil Droplets. *Nanoscale Adv.* **2023**, *5*, 3914–3923. <https://doi.org/10.1039/D3NA00124E>.
- (223) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- (224) Devaraj, N. K.; Finn, M. G. Introduction: Click Chemistry. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (12), 6697–6698. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00469>.
- (225) Ursuegui, S.; Mosser, M.; Wagner, A. Copper-Free Click Chemistry for Microdroplet's W/O Interface Engineering. *RSC Adv.* **2016**, *6* (97), 94942–94948. <https://doi.org/10.1039/C6RA20385J>.
- (226) Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (46), 15046–15047. <https://doi.org/10.1021/ja044996f>.
- (227) Li, K.; Fong, D.; Meichsner, E.; Adronov, A. A Survey of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition in Polymer Chemistry. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (16), 5057–5073. <https://doi.org/10.1002/chem.202003386>.
- (228) Agard, N. J.; Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Lo, A.; Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (10), 644–648. <https://doi.org/10.1021/cb6003228>.
- (229) Li, K.; Fong, D.; Meichsner, E.; Adronov, A. A Survey of Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition in Polymer Chemistry. *Chem. – Eur. J.* **2021**, *27* (16), 5057–5973. <https://doi.org/10.1002/chem.202003386>.
- (230) van Geel, R.; Pruijn, G. J. M.; van Delft, F. L.; Boelens, W. C. Preventing Thiol-Yne Addition Improves the Specificity of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (3), 392–398. <https://doi.org/10.1021/bc200365k>.
- (231) Weterings, J.; Rijcken, C. J. F.; Veldhuis, H.; Meulemans, T.; Hadavi, D.; Timmers, M.; Honing, M.; Ippel, H.; Liskamp, R. M. J. TMTHSI, a Superior 7-Membered Ring Alkyne Containing Reagent for Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition Reactions. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (33), 9011–9016. <https://doi.org/10.1039/D0SC03477K>.
- (232) Kang, D.-K.; Monsur Ali, M.; Zhang, K.; Pone, E. J.; Zhao, W. Droplet Microfluidics for Single-Molecule and Single-Cell Analysis in Cancer Research, Diagnosis and Therapy. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *58*, 145–153. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.006>.
- (233) Ding, Y.; Howes, P. D.; deMello, A. J. Recent Advances in Droplet Microfluidics. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (1), 132–149. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05047>.
- (234) Sesen, M.; Whyte, G. Image-Based Single Cell Sorting Automation in Droplet Microfluidics. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 8736. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65483-2>.

- (235) Ursuegui, S.; Schneider, J. P.; Imbs, C.; Lauvoisard, F.; Dudek, M.; Mosser, M.; Wagner, A. Expedient Synthesis of Trifunctional Oligoethyleneglycol-Amine Linkers and Their Use in the Preparation of PEG-Based Branched Platforms. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (44), 8579–8584. <https://doi.org/10.1039/C8OB02097C>.
- (236) Blotny, G. Recent Applications of 2,4,6-Trichloro-1,3,5-Triazine and Its Derivatives in Organic Synthesis. *Tetrahedron* **2006**, *62* (41), 9507–9522. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.07.039>.
- (237) A) Sharma, A.; El-Faham, A.; de la Torre, B. G.; Albericio, F. Exploring the Orthogonal Chemoselectivity of 2,4,6-Trichloro-1,3,5-Triazine (TCT) as a Trifunctional Linker With Different Nucleophiles: Rules of the Game. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 516. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00516>. B) Sato, D.; Wu, Z.; Fujita, H.; Lindsey, J.S. Design, Synthesis, and Utility of Defined Molecular Scaffolds. *Organics* **2021**, *2*, 161-273. <https://doi.org/10.3390/org2030013>.
- (238) Schuster, T.; Krumpfer, J. W.; Schellenberger, S.; Friedrich, R.; Klapper, M.; Müllen, K. Effects of Chemical Structure on the Dynamic and Static Surface Tensions of Short-Chain, Multi-Arm Nonionic Fluorosurfactants. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *428*, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.04.051>.
- (239) Dufosse, R.; Ursuegui, S.; Baudrey, S.; Pernod, K.; Mouftakhir, S.; Oulad-Abdelghani, M.; Mosser, M.; Chaubet, G.; Ryckelynck, M.; Wagner, A. Droplet Surface Immunoassay by Relocation (D-SIRe) for High-Throughput Analysis of Cytosolic Proteins at the Single-Cell Level. *Anal. Chem.* **2023**, *95* (9), 4470–4478. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05168>.
- (240) Gauthier, M. A.; Klok, H.-A. Peptide/Protein–Polymer Conjugates: Synthetic Strategies and Design Concepts. *Chem. Commun.* **2008**, No. 23, 2591-2611. <https://doi.org/10.1039/b719689j>.
- (241) Tantipanjanorn, A.; Wong, M.-K. Development and Recent Advances in Lysine and N-Terminal Bioconjugation for Peptides and Proteins. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1083. <https://doi.org/10.3390/molecules28031083>.
- (242) Alves, N. J. Antibody Conjugation and Formulation. *Antib. Ther.* **2019**, *2* (1), 33–39. <https://doi.org/10.1093/abt/tbz002>.
- (243) Luckau, L.; Groves, K.; Blencowe, C.; Scrimshaw, S.; Dent, A.; Quaglia, M. Impact of Bioconjugation on Structure and Function of Antibodies for Use in Immunoassay by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *9*, 866843. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.866843>.
- (244) Sornay, C.; Hessmann, S.; Erb, S.; Dovgan, I.; Ehkirch, A.; Botzanowski, T.; Cianféroni, S.; Wagner, A.; Chaubet, G. Investigating Ugi/Passerini Multicomponent Reactions for the Site-Selective Conjugation of Native Trastuzumab\*\*. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (61), 13797–13805. <https://doi.org/10.1002/chem.202002432>.

- (245) Shehadul Islam, M.; Aryasomayajula, A.; Selvaganapathy, P. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* **2017**, *8* (3), 83. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>.
- (246) Yang, B.; Wang, Y.; Vorobii, M.; Sauter, E.; Koenig, M.; Kumar, R.; Rodriguez-Emmenegger, C.; Hirtz, M. Evaluation of Dibenzocyclooctyne and Bicyclononyne Click Reaction on Azido-Functionalized Antifouling Polymer Brushes via Microspotting. *Adv. Mater. Interfaces* **2022**, *9* (16), 2102325. <https://doi.org/10.1002/admi.202102325>.
- (247) Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519. <https://doi.org/10.1021/ja8053805>.
- (248) Kang, K.; Park, J.; Kim, E. Tetrazine Ligation for Chemical Proteomics. *Proteome Sci.* **2017**, *15*. <https://doi.org/10.1186/s12953-017-0121-5>.
- (249) Béquignat, J.-B.; Ty, N.; Rondon, A.; Taiariol, L.; Degoul, F.; Canitrot, D.; Quintana, M.; Navarro-Teulon, I.; Miot-Noirault, E.; Boucheix, C.; Chezal, J.-M.; Moreau, E. Optimization of IEDDA Bioorthogonal System: Efficient Process to Improve Trans-Cyclooctene/Tetrazine Interaction. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *203*, 112574. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112574>.
- (250) Johann, K.; Svatunek, D.; Seidl, C.; Rizzelli, S.; Bauer, T. A.; Braun, L.; Koynov, K.; Mikula, H.; Barz, M. Tetrazine- and *Trans*-Cyclooctene-Functionalised Polypept(o)ides for Fast Bioorthogonal Tetrazine Ligation. *Polym. Chem.* **2020**, *11* (27), 4396–4407. <https://doi.org/10.1039/D0PY00375A>.
- (251) McLeod, C.; Anderson, D. W. J.; Katz, W. Preparation of Foetal Calf Serum for Use in Tissue Culture. *J. Biol. Stand.* **1980**, *8* (4), 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0092-1157\(80\)80003-5](https://doi.org/10.1016/S0092-1157(80)80003-5).
- (252) Yang, M.; Wang, X.; Zhao, J. Ynamide-Mediated Macrolactonization. *ACS Catal.* **2020**, *10* (9), 5230–5235. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00523>.
- (253) Kamitakahara, H.; Nakatsubo, F. Synthesis of Diblock Copolymers with Cellulose Derivatives. 1. Model Study with Azidoalkyl Carboxylic Acid and Cellobiosylamine Derivative. *Cellulose* **2005**, *12* (2), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-0426-2>.
- (254) Nishikawa, K.; Yoshimi, Y.; Maeda, K.; Morita, T.; Takahashi, I.; Itou, T.; Inagaki, S.; Hatanaka, M. Radical Photocyclization Route for Macrocyclic Lactone Ring Expansion and Conversion to Macrocyclic Lactams and Ketones. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 582–589. <https://doi.org/10.1021/jo3024126>.
- (255) Hansen, P. R.; Oddo, A. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Peptide Antibodies*; Houen, G., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1348, pp 33–50. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_5).

- (256) Strasser, S.; Slugovc, C. Nucleophile-Mediated Oxa-Michael Addition Reactions of Divinyl Sulfone – a Thiol-Free Option for Step-Growth Polymerisations. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5* (12), 5091–5094. <https://doi.org/10.1039/C5CY01527H>.
- (257) Mao, L.; Russell, A. J.; Carmali, S. Moving Protein PEGylation from an Art to a Data Science. *Bioconjug. Chem.* **2022**, *33* (9), 1643–1653. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconchem.2c00262>.
- (258) Labouta, H. I.; Gomez-Garcia, M. J.; Sarsons, C. D.; Nguyen, T.; Kennard, J.; Ngo, W.; Terefe, K.; Iragorri, N.; Lai, P.; Rinker, K. D.; Cramb, D. T. Surface-Grafted Polyethylene Glycol Conformation Impacts the Transport of PEG-Functionalized Liposomes through a Tumour Extracellular Matrix Model. *RSC Adv.* **2018**, *8* (14), 7697–7708. <https://doi.org/10.1039/C7RA13438J>.
- (259) Yang, Q.; Jones, S. W.; Parker, C. L.; Zamboni, W. C.; Bear, J. E.; Lai, S. K. Evading Immune Cell Uptake and Clearance Requires PEG Grafting at Densities Substantially Exceeding the Minimum for Brush Conformation. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (4), 1250–1258. <https://doi.org/10.1021/mp400703d>.
- (260) Zhang, F.; Liao, P.; Sun, Y.; Chen, Z.; Pang, Y.; Huang, Y. Surfactant and Oil Formulations for Monodisperse Droplet Emulsion PCR. *Lab. Chip* **2020**, *20* (13), 2328–2333. <https://doi.org/10.1039/D0LC00052C>.
- (261) Liu, Z.; Chan, S. T.; Faizi, H. A.; Roberts, R. C.; Shum, H. C. Droplet-Based Electro-Coalescence for Probing Threshold Disjoining Pressure. *Lab. Chip* **2015**, *15* (9), 2018–2024. <https://doi.org/10.1039/C5LC00177C>.
- (262) Tcholakova, S.; Denkov, N. D.; Ivanov, I. B.; Campbell, B. Coalescence in  $\beta$ -Lactoglobulin-Stabilized Emulsions: Effects of Protein Adsorption and Drop Size. *Langmuir* **2002**, *18* (23), 8960–8971. <https://doi.org/10.1021/la0258188>.
- (263) Restu, W. K.; Sampora, Y.; Meliana, Y.; Haryono, A. Effect of Accelerated Stability Test on Characteristics of Emulsion Systems with Chitosan as a Stabilizer. *Procedia Chem.* **2015**, *16*, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.031>.
- (264) Latreille, B.; Paquin, P. Evaluation of Emulsion Stability by Centrifugation with Conductivity Measurements. *J. Food Sci.* **1990**, *55* (6), 1666–1668. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03595.x>.
- (265) Mohsin, S.; Akhtar, N.; Mahmood, T.; Khan, H.; Mustafa, R. Formulation and Stability of Topical Water in Oil Emulsion Containing Corn Silk Extract. *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, *15* (6), 1115. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i6.1>.
- (266) Karbaschi, M.; Shahi, P.; Abate, A. R. Rapid, Chemical-Free Breaking of Microfluidic Emulsions with a Hand-Held Antistatic Gun. *Biomicrofluidics* **2017**, *11* (4), 044107. <https://doi.org/10.1063/1.4995479>.

- (267) Chokkalingam, V.; Ma, Y.; Thiele, J.; Schalk, W.; Tel, J.; Huck, W. T. S. An Electro-Coalescence Chip for Effective Emulsion Breaking in Droplet Microfluidics. *Lab Chip* **2014**, *14* (14), 2398–2402. <https://doi.org/10.1039/C4LC00365A>.
- (268) Gamez, P.; Reedijk, J. 1,3,5-Triazine-Based Synthons in Supramolecular Chemistry. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006* (1), 29–42. <https://doi.org/10.1002/ejic.200500672>.
- (269) Mooibroek, T. J.; Gamez, P. The S-Triazine Ring, a Remarkable Unit to Generate Supramolecular Interactions. *Inorganica Chim. Acta* **2007**, *360* (1), 381–404. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.07.061>.
- (270) Garofalo, A.; Parat, A.; Bordeianu, C.; Ghobril, C.; Kueny-Stotz, M.; Walter, A.; Jouhannaud, J.; Begin-Colin, S.; Felder-Flesch, D. Efficient Synthesis of Small-Sized Phosphonated Dendrons: Potential Organic Coatings of Iron Oxide Nanoparticles. *New J Chem* **2014**, *38* (11), 5226–5239. <https://doi.org/10.1039/C4NJ00654B>.
- (271) Herzner, H.; Kunz, H. Spacer-Separated Sialyl LewisX Cyclopeptide Conjugates as Potential E-Selectin Ligands. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342* (3–4), 541–557. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.09.012>.
- (272) Song, F.; Chen, L.; Lin, R.; Salter, R. Synthesis of Carboxy-Polyethylene Glycol-Amine (CA (PEG)<sub>n</sub>) and [1-<sup>14</sup>C]-CA (PEG)<sub>n</sub> via Oxa-Michael Addition of Amino-Polyethylene Glycols to Propiolates vs to Acrylates. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2020**, *63* (1), 15–24. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3816>.
- (273) Lin, S.; Das, A.; Theato, P. CO<sub>2</sub>-Responsive Graft Copolymers: Synthesis and Characterization. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (7), 1206–1216. <https://doi.org/10.1039/C6PY01996J>.
- (274) Peng, L.; Zhang, Z.; Lei, C.; Li, S.; Zhang, Z.; Ren, X.; Chang, Y.; Zhang, Y.; Xu, Y.; Ding, K. Identification of New Small-Molecule Inducers of Estrogen-Related Receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) Degradation. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (5), 767–772. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00025>.
- (275) Benjamins, J.; Cagna, A.; Lucassen-Reynders, E. H. Viscoelastic Properties of Triacylglycerol/Water Interfaces Covered by Proteins. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1996**, *114*, 245–254. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(96\)03533-9](https://doi.org/10.1016/0927-7757(96)03533-9).
- (276) Yang, G.; O'Duill, M.; Gouverneur, V.; Krafft, M. P. Recruitment and Immobilization of a Fluorinated Biomarker Across an Interfacial Phospholipid Film Using a Fluorocarbon Gas. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (29), 8402–8406. <https://doi.org/10.1002/anie.201502677>.



## Conception et synthèse de fluorotensioactifs pour des applications en microfluidique en gouttes

### Résumé

La microfluidique en gouttes offre d'importants avantages pour l'exploration de systèmes biologiques complexes. Dans la plupart des applications, des gouttes de phase aqueuse sont créées au sein d'une phase huileuse fluorée. Pour maintenir la stabilité de ces gouttes, des agents tensioactifs se positionnent à l'interface entre la phase huileuse et la phase aqueuse. Dans le cadre de cette thèse, la disposition des parties hydrophiles des tensioactifs a été exploitée pour fonctionnaliser la surface interne des gouttes, permettant ainsi la capture et la détection de composés présents à l'intérieur des gouttes. Tout d'abord des tensioactifs préalablement pré-fonctionnalisés avec des azotures, et capables de réagir au sein des gouttes *via* une réaction de SPAAC (cycloaddition azoture-alcyne tendu) avec des anticorps, ont été synthétisés. Puis, une fois le greffage d'anticorps optimisé, une nouvelle méthode d'immunoessai à la surface des gouttes par délocalisation de fluorescence a été développée. Enfin, les paramètres influençant la fonctionnalisation et la stabilisation des gouttes ont été examinés plus en détails.

**Mots-clés :** microfluidique en gouttes, fluorotensioactifs, anticorps, SPAAC, immunoessai

### Summary

Droplet-based microfluidic offers significant advantages for the exploration of complex biological systems. In most applications, droplets encapsulating an aqueous phase are produced within a fluorinated oil phase. To maintain the stability of the droplets, surfactants place themselves at the interface between the oil and the aqueous phases. In this thesis work, the position of the hydrophilic heads of the surfactants was leveraged to functionalize the internal surface of droplets, enabling the capture and detection of compounds present inside the droplets. Firstly, surfactant pre-functionalized with azides, and able to react within the droplets through a SPAAC (Strained Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) reaction with antibodies were synthesized. Then, once the antibodies grafting was optimized, a new method of immunoassay on the droplet surface via fluorescence delocalization was developed. Finally, the parameters influencing the functionalization and stabilization of the droplets were examined in more details.

**Keywords :** Droplet-based microfluidic, fluorosurfactants, antibodies, SPAAC, immunoassay