



UNIVERSITE DE LILLE I – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Adil ELAGLI

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

***Contribution à l'intensification de procédés appliqués à la protéolyse enzymatique
Etude microcinétique en réacteur microfluidique et conception assistée par plasma
froid d'un microréacteur à enzyme immobilisé***

N° Ordre : 41717

Préparée aux laboratoires :

Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien

ProBioGEM, UPRES EA 1026, IUTA – Polytech'Lille, France

Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie

IEMN, UMR CNRS 8520, France

Soutenue le 2 Avril 2015 devant le jury composé de :

M. Thierry MAUGARD	Professeur (Université de la Rochelle – LIENSs)	Rapporteur
M. Jérôme PULPYTEL	Maître de conférences – HDR (UPMC – LISE)	Rapporteur
M. Loïc BLUM	Professeur (Université de Lyon 1 – ICBMS)	Examineur
M. René FROIDEVAUX	Professeur (Université de Lille 1 – ProBioGEM)	Directeur de thèse
M. Philippe SUPLOT	Professeur (Université de Lille 1 – IEMN)	Directeur de thèse
M. Bertrand BOCQUET	Professeur (Université de Lille 1 – SCité)	Directeur de thèse

Résumé

De nouveaux enjeux économiques et environnementaux sont amenés à structurer la pratique des procédés en génie chimique et biotechnologique. Ces préoccupations ont introduit depuis quelques années déjà le concept d'intensification des procédés. En traitant de la maîtrise et de l'intensification de procédés enzymatiques, cette thèse s'est partagée en deux parties. La première s'est focalisée sur la mise en œuvre et l'étude microcinétique de réactions enzymatiques en microréacteur. Elle visait à optimiser la préparation d'un peptide opioïde à partir d'une réaction protéolytique, l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine. Tout d'abord, en employant la β -galactosidase comme enzyme modèle, la cinétique d'une réaction simple à un substrat a été étudiée. Par la suite, une modulation de la sélectivité cinétique de la réaction de protéolyse enzymatique a été mise en évidence. Puis, en adoptant une démarche d'intensification, un couplage du microprocédé de protéolyse enzymatique à un microprocédé séparatif a été mis au point. Il a permis la récupération sélective et continue de l'hémorphine LVV-h7 par un enchaînement de deux extractions liquide-liquide consécutives. Cette approche est présentée comme une preuve de concept illustrant la pertinence de l'utilisation de la microfluidique en termes de cinétique d'extraction et d'économie de solvant. Au travers de l'ensemble de ces résultats, la première partie de ce travail de thèse tente de mettre en évidence quelques bénéfices attrayants que peut procurer l'utilisation de technologies microfluidiques en génie des procédés. Enfin, la deuxième partie de cette thèse s'est étendue à la conception d'un réacteur microstructuré à enzyme immobilisé en proposant l'utilisation exclusive d'un matériau organosilicié, le TétraMéthylDiSiloxane. La technologie des plasmas froids employée a d'abord permis la mise au point d'une méthodologie originale d'immobilisation enzymatique par piégeage stérique. La β -galactosidase a été immobilisée par une couche mince de polymère déposée par polymérisation assistée par plasma. Le protocole développé a ensuite permis d'imaginer la conception « *bio-intégrante* » d'un microréacteur à enzyme immobilisé. Ce dernier a pu être réalisé dans son ensemble avec le même matériau polymère. L'apport de l'ensemble des travaux entrepris réside certainement dans les démarches d'intensification adoptées, dans la singularité des résultats expérimentaux ainsi que dans les preuves de concepts apportées.

Mots-clés : *enzyme ; protéolyse enzymatique ; cinétique ; sélectivité cinétique ; peptides bioactifs ; microréacteur ; microfluidique ; extraction liquide-liquide ; immobilisation enzymatique ; polymère ; microcanaux ; plasma froid*

Abstract

New economic and environmental issues are changing practices in chemical and biotechnological processes. These concerns previously introduced the concept of process intensification since some years ago. Dealing with the control and the intensification of enzyme processes, this thesis was divided into two parts. The first part focused on the study of enzyme reactions in microreactor from a kinetic perspective. It was intended to optimize the preparation of an opioid peptide from a proteolytic reaction, the hydrolysis of bovine hemoglobin by porcine pepsin. Firstly, by using β -galactosidase as model enzyme, the kinetics of a simple single substrate reaction was investigated. Subsequently, a modulation of the enzymatic proteolysis kinetic selectivity was highlighted. Then, on the basis of a sustainable approach, the enzymatic process was coupled to a separative process. It allowed the selective and continuous recovery of the hemorphin LVV-h7 by a sequence of two consecutive liquid-liquid extractions. This approach is shown as a proof of concept illustrating the benefits to use microfluidics in terms of extraction kinetics and solvent economy. Through all of these results, the first part of this thesis attempts to highlight some attractive benefits derived from the use of microfluidics in process engineering. Finally, the second part of this thesis has been extended to the design of a microstructured reactor with immobilized enzyme exclusively by using an organosilicon material, TetraMethylDiSiloxane. First, cold plasma technology allowed the development of an original methodology for enzyme immobilization by steric entrapment. β -galactosidase was immobilized by a polymer thin film deposited by plasma-assisted polymerization. Then, this protocol was used to design an immobilized enzyme microreactor according to a “*bio-integrating*” methodology. The reactor microfabrication was entirely achieved by using the same polymer material. The global contribution of this work may lie in the intensification approaches, in the singularity of the experimental results and in the proof of concepts.

Keywords: *enzyme ; enzymatic proteolysis ; kinetics ; kinetic selectivity ; bioactive peptides ; microreactor ; microfluidics ; liquid-liquid extraction ; enzyme immobilization ; polymer ; microchannels ; cold plasma*

Remerciements

Durant ces années de thèse, les diverses missions qui m'ont été confiées et les va-et-vient incessants entre les différents laboratoires m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes. J'exprime ici mes chaleureux remerciements envers chacune d'entre elles, en espérant n'oublier personne !

J'exprime d'abord toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude envers mes trois directeurs de thèse pour le travail proposé et pour la liberté qu'ils m'ont accordée dans la gestion du sujet et de mon agenda de travail. Merci d'avoir mis à disposition les moyens et l'encadrement nécessaires à l'aboutissement de mes idées. Un grand merci au professeur Rénato FROIDEVAUX du laboratoire ProBioGEM pour sa disponibilité et son suivi constant de mon travail ainsi que pour la confiance accordée. Nos nombreuses discussions ont à chaque fois permis de redéfinir les priorités de nos études et ont largement contribuées à faire mûrir la thèse. J'en profite pour saluer ta capacité à porter un sujet hautement interdisciplinaire comme celui-ci face à un vent parfois contraire. Je remercie également chaleureusement le professeur Philippe SUPLOT, responsable de l'équipe P²M de l'IEMN, pour la participation active à ce travail, mais aussi pour l'intérêt constant et le soutien sans faille de toutes mes initiatives. Merci pour la clarté et la richesse de ses conseils, pour m'avoir accordé la liberté de disposer des bâtis plasma et pour avoir pris le temps de m'y former. Enfin, je remercie vivement le professeur Bertrand BOCQUET pour son soutien permanent au travail. C'est avec amertume que je n'ai pu avoir la possibilité d'accomplir l'étude initialement prévue malgré une motivation certaine. Toutefois, j'ai pris un grand plaisir à participer au projet M²T pendant la première année de ma thèse. Une pensée particulière pour m'avoir transmis la passion de la microfluidique dès les cours de Master.

Je remercie bien évidemment Pascal DHULSTER, directeur de l'Institut Charles Violette et anciennement du laboratoire ProBioGEM, ainsi que Lionel BUCHAILLOT, directeur de l'IEMN, pour m'avoir permis de travailler au sein de leur structure où j'ai pu bénéficier de nombreux équipements.

Je souhaite maintenant témoigner de mes sincères et respectueux remerciements envers les membres de mon jury de thèse. C'est avec spontanéité que le professeur Thierry MAUGARD de l'université de La Rochelle a accepté d'être rapporteur de ce manuscrit de thèse. Votre haute expertise dans le domaine du génie des procédés est garante d'un apport critique et constructif à ce travail. Je vous remercie vivement du temps consacré à l'examen de ces travaux. J'adresse également de sincères remerciements à Jérôme PULPYTEL, maître de conférences à l'université Pierre et Marie Curie, qui a accepté d'examiner cette thèse en qualité de rapporteur. Je ne doute pas de la pertinence de vos critiques qui complètent les travaux de thèse et je vous adresse toute ma considération pour le temps passé à examiner ce mémoire. Je témoigne enfin de mon plus profond respect envers le professeur Loïc BLUM de l'université de Lyon 1 qui a accepté d'être examinateur de cette thèse. Acceptez mes chaleureux remerciements pour l'honneur que vous me faites de juger ce travail que vous complétez par vos connaissances.

Je souhaite exprimer de sincères remerciements envers les chercheurs qui m'ont encadré dans leur spécialité. Je pense évidemment à Céline VIVIEN qui m'a formé sur la technologie des plasmas au sein du groupe P²M de l'IEMN. Au-delà des obstacles techniques que nous avons pu rencontrer, c'est toujours avec enthousiasme que nous avons travaillé ensemble. Je pense aussi à Anthony TREIZEBRE qui m'a fait découvrir les techniques de microfabrication en salle blanche et avec qui j'ai partagé quelques séances de mesures en spectroscopie TeraHertz. Ce fut un plaisir de participer aux expérimentations ainsi qu'au congrès à Lucerne dont je me rappelle de très bons souvenirs !

J'adresse de sincères remerciements à Simon LAURETTE, docteur depuis peu, grâce à qui j'ai bien souvent trouvé des réponses à mes questions et avec qui j'ai pu partager de nombreuses discussions techniques. J'espérais poursuivre les efforts accomplis en spectroscopie mais le sort en a décidé autrement ! Un grand merci également à Sébastien LAMANT, bientôt docteur, pour la collaboration entreprise. Bravo pour ta dextérité à déposer nos enzymes !

Merci aux nombreux ingénieurs et techniciens que j'ai pu solliciter aux cours de mes travaux. De l'équipe ProBioGEM, je citerais Gabrielle CHATAIGNE, Corinne BOISTEL et bien sûr l'incontournable Max BECHET, avec qui la discussion du lundi matin tournait inévitablement autour des résultats footballistique du week-end. Au sein de l'équipe P²M, j'ai toujours pu manipuler dans les meilleures conditions techniques grâce à l'indispensable Christian MALAS ainsi qu'à Garrett CURLEY. Je leur adresse un très grand merci pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci aussi à Christophe BOYAVAL et à Dominique DERESMES de l'IEMN pour les magnifiques images obtenues grâce à leur expertise respective au MEB et à l'AFM. Enfin, je mentionnerais Sylvie LEPILLIET et Vanessa AVRAMOVIC de la salle de caractérisation de l'IEMN grâce à qui les mesures se sont déroulées dans les meilleures conditions.

J'adresse de vifs remerciements à tous les chercheurs, les enseignants et le personnel que j'ai croisé au cours de ces années et avec qui j'ai pu discuter et échanger des points de vue. Je pense notamment à Krasimir DIMITROV, Benoît CUDENNEC et Naïma NEDJAR-ARROUME. Je mentionnerais également Didier GUILLOCHON et Vincent SENEZ qui ont pris part à plusieurs réunions scientifiques. Ayant bénéficié d'un statut de moniteur, j'ai pu apprendre la fonction d'enseignement à l'IUT auprès de l'excellent Mohammed ARROUME, que je remercie vivement pour ses conseils, sa bienveillance et ses bonnes blagues. Je remercie également Magalie BOTQUIN pour son dévouement et sa gentillesse, sans oublier Dominique VERCAIGNE-MARKO qui m'a confié cette mission d'enseignement. J'en profite aussi pour remercier l'indispensable et sympathique Cathy OUBLION du laboratoire ProBioGEM ainsi que Nora BENBAHLOULI de l'administration de l'IEMN.

Je souhaite à présent exprimer toute mon amitié envers l'ensemble des post-doctorants, doctorants et stagiaires que j'ai côtoyé. En commençant par les *anciens*, je citerai Aurélien, Lucie, Joany, Pascal,

Omar, Mathieu, Loyal, Jovana, Faiza, Rafik, Assaad, Rim, Fateh, Imad et Pauline. Parmi les docteurs diplômés depuis peu, je salue Cédric (*alias* monsieur huile), Leandro (*alias el gringo* ou encore *el pinche*), Marwan (*alias* docteur connard), Karima et Amirouche. Je souhaite du courage et de l'ambition à tous les thésards actuels, Qassim, Ameen, Yazen, Alaa, Ahmed, Paola, Rémi (actionnaire chez *Forum de l'étudiant*®), Thibault, Alexandra, Taki, Delphine, Jean-Christian, Sonia, Alexandre, Oussama, Ramiro, Amel, Juliette, Mickaël, Oumayma, Sabrine, Debarun, Luiz (*alias* le fédérateur) et Lamia. Merci pour toutes les discussions scientifiques et politiques plus animées les unes que les autres, mais aussi pour l'excellente ambiance générale et pour l'animation durant les nombreuses pauses-café. J'ai aussi apprécié partager du temps et de mes connaissances avec de nombreux stagiaires parmi lesquels Maureen, Mehdi, Abdu, Nicole, Fanny, Soraya, Christelle (« ah ouais quand même ! »), Jihen, Jordan, Joris et Rose-annie (*alias* la chiente). J'adresse également un salut aux membres de DEINOVE, Hugo, Marjorie, Guillaume et Marie-hélène.

Je ne peux clôturer mes remerciements sans mentionner mes deux compères et camarades de la première heure avec qui j'ai successivement formé un binôme de travail. Je remercie donc infiniment David GEORGE et Kalim BELHACENE pour tout le temps passé ensemble et les nombreux fous rires. J'adresse à David (*alias* « petit malade ») toute mon admiration pour sa grande volonté et sa passion dans le travail accompli avec moi. A Kalim (*alias* « chef »), avec qui j'ai formé le binôme « *Tucker et Walker* », j'exprime toute ma reconnaissance pour le travail accompli avec abnégation parfois, mais surtout avec motivation, enthousiasme, efficacité et bonne humeur. Un grand merci pour tous les bons moments passés au P3, en C115 et au *kebab* ! *I'll be back!!!*

J'adresse encore de chaleureux remerciements envers mes nombreux amis, dont beaucoup ont été cités, pour les moments nécessaires de distraction dans la vie d'un thésard. Avec une pensée plus qu'amicale pour Meryeme et les souvenirs inoubliables à Marseille... Je suis fier de t'avoir à mes côtés.

Finalement, je tiens à remercier ma très chère famille pour la joie et le bonheur permanent qu'elle m'apporte mais aussi pour le soutien constant et pour avoir supporté mes humeurs. Je vous dédie ce modeste travail, avec une pensée émue pour ceux qui ne sont plus.

Je dédie ce modeste travail à

mes parents bien-aimés, mon très cher père et ma tendre mère, avec une profonde reconnaissance ;

mon adorable sœur Jihane ;

la mémoire de mes grands-parents ;

toute ma famille ;

ma douce et précieuse Meryeme ;

et à tous mes amis.

« Soit A un succès dans la vie. Alors $A = x + y + z$ où $x = \text{travailler}$, $y = \text{s'amuser}$, $z = \text{se taire}$ »

Albert EINSTEIN

Nomenclature

Abréviations & acronymes

AFM	Atomic Force Microscopy
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
B	Buffer
BioMEMS	Bio-MicroElectroMechanical System
BSA	Bovine Serum Albumin
β -Gal	β -Galactosidase
CVD	Chemical Vapor Deposition
CW	Continuous-Wave
DTS	Distribution du Temps de Séjour
EC	Enzyme Commission (number)
EtoH	Ethanol
DC	Direct Current
FTIR	Fourier Transform InfraRed
GHz	GigaHertz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMER	IMmobilized Enzyme Reactor
IP	Intensification des Procédés
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid-Liquid extraction
LVVh-7	LVV-hémorphine 7
MD	Molecular Dynamics
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MHz	MegaHertz
MS	Mass Spectrometry
MW	Microwaves
<i>o</i> -NPG	<i>ortho</i> -NitroPhenyl- β -D-Galactopyranoside
PDL	Post-Décharge Lointaine
PECVD	Plasma Enhanced CVD
pH	potentiel Hydrogène
PPSL	Plasma Polymerization on Sacrificial Layer
PPMS	Plasma Polymerization on Micropatterned Surface
ppTMDSO	plasma polymerized TMDSO
P-V	Peak-to-Valley (separation)
RBG	Resorufin- β -D-Galactopyranoside
RF	Radiofréquence
RPECVD	Remote PECVD
RP-HPLC	Reversed-Phase HPLC
SEM	Scanning Electron Microscopy
Si	Silicium
slpm	standard liter per minute
sccm	standard cubic centimeter per minute
THz	TeraHertz
TMDSO	1,1,3,3-TetraMéthylDiSiloxane
UV	Ultra-Violet
VNA	Vectorial Network Analyzer

Symboles

E	Energie
φ	Débit (gaz/ monomère)
p	Pression
A	Absorbance
α	Coefficient d'absorption
D	Coefficient de diffusion
λ	Longueur d'onde
f	Fréquence
τ	Temps de diffusion
h	Hauteur
w	Largeur
V	Vitesse
N_A	Nombre d'Avogadro
T_e	Température des électrons
T_n	Température du gaz (molécules neutres)
T_i	Température des ions
n_i	Densité des ions
n_e	Densité des électrons
P_i	Puissance incidente
P_t	Puissance transmise
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_m^{app}	K_m apparent
V_{max}	Vitesse maximale de réaction
V_{max}^{app}	V_{max} apparent
$[E]$	Concentration d'enzyme
$[S]$	Concentration de substrat
$[P]$	Concentration de produit
k_{cat}	Constante catalytique
k	Constante de vitesse
Da_{II}	Second nombre de Damköhler

Table des matières

Table des matières

RESUME.....	<i>i</i>
ABSTRACT.....	<i>iii</i>
REMERCIEMENTS.....	<i>v</i>
NOMENCLATURE.....	<i>xi</i>
TABLES DES MATIERES.....	<i>xiii</i>
1. INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1.Contexte de l'étude et problématique.....	3
1.2.Concept de la thèse.....	11
Références bibliographiques.....	13
2. GENERALITES BIBLIOGRAPHIQUES.....	19
2.1.Flexibilité conformationnelle et fonction protéique : vue d'ensemble de la catalyse enzymatique.....	19
2.1.1. Architecture et fonction des protéines.....	19
2.1.2. Les enzymes : aperçu historique.....	21
2.1.3. Les niveaux d'organisation structurale.....	21
2.1.4. Effet du pH et de la température.....	22
2.1.5. Considérations énergétiques et thermodynamiques de la biocatalyse...	24
2.1.6. Interactions faibles et flexibilité.....	25
2.1.7. Dynamique des milieux liquides.....	25
Références bibliographiques.....	26
2.2.Etude structurale et microcinétique de la biocatalyse : potentialité de la spectroscopie TeraHertz.....	28
2.2.1. Spectre électromagnétique et champ TeraHertz.....	28
2.2.2. Génération d'ondes aux fréquences TeraHertz.....	30
2.2.3. Phénomènes résonants et variétés des modes : activité spectroscopique	32
2.2.4. Mesure en phase liquide : spectroscopie TeraHertz appliquée aux milieux aqueux.....	35
Références bibliographiques.....	38
2.3.La technologie MEMS au service de la chimie et de la biologie.....	42

2.3.1. Miniaturisation et fluidique.....	42
2.3.2. Notions d'hydrodynamique des systèmes microfluidiques et nombre adimensionnels.....	45
2.3.3. Stratégies de microfabrication.....	48
2.3.3.1. <i>Techniques dures</i>	48
2.3.3.2. <i>Techniques douces</i>	51
2.3.4. Microsystèmes microfluidiques : applications et enjeux.....	51
2.3.4.1. <i>Lab on Chips, BioMEMS, μTAS et biocapteurs comme outils d'analyse</i>	51
2.3.4.2. <i>Les microréacteurs : une alternative ?</i>	54
2.3.4.2.1. Intérêts de miniaturiser un réacteur.....	55
2.3.4.2.2. Des plateformes variées.....	58
2.3.4.2.3. Mélanger : un défi ?.....	60
2.3.4.2.4. Microréacteurs et enzymes : applications majeures.....	64
2.3.4.3. <i>Vers une intensification des procédés</i>	66
2.3.4.3.1. Des procédés continus et miniaturisés pour le développement durable.....	67
2.3.4.3.2. Extrapolation et productivité : du <i>scale-up</i> au <i>numbering-up</i>	70
2.3.4.3.3. Le « tryptique » réaction-détection-séparation.....	71
Références bibliographiques.....	74
2.4. Immobilisation d'enzyme et plasmas froids pour la conception de surfaces bioactives : vers une microfabrication simple et <i>bio-intégrante</i>	81
2.4.1. Immobilisation d'enzyme : un aperçu des méthodologies majeures.....	81
2.4.1.1. <i>Nature du support</i>	82
2.4.1.1.1. Supports à deux dimensions.....	83
2.4.1.1.2. Supports à trois dimensions.....	85
2.4.1.2. <i>Immobilisation chimique de l'enzyme</i>	86
2.4.1.2.1. Liaison covalente de l'enzyme.....	86
2.4.1.2.2. Liaison par affinité chimique.....	88
2.4.1.3. <i>Immobilisation physique de l'enzyme</i>	89
2.4.1.3.1. Adsorption.....	89
2.4.1.3.2. Piégeage stérique de l'enzyme au sein du support : inclusion et confinement.....	90
2.4.2. Les plasmas froids comme outil d'ingénierie de surface.....	92

2.4.2.1. <i>Physique des plasmas et mécanismes d'obtention</i>	92
2.4.2.2. <i>Types de traitements assistés par plasma</i>	95
2.4.2.2.1. Traitements de surface des substrats par plasma.....	95
2.4.2.2.2. Dépôts de couches minces.....	96
2.4.2.3. <i>Stratégies de conception de surfaces bioactives par des procédés plasma</i>	101
2.4.2.3.1. Fonctionnalisation de surface pour le greffage d'enzymes.....	101
2.4.2.3.2. Adsorption d'enzymes sur des films polymère.....	104
2.4.2.3.3. Inclusion d'enzymes dans des films polymère.....	105
2.4.2.4. <i>Dépôt de films minces organosiliciés en phase vapeur assisté par plasma froid : cas du tetraméthylidisiloxane</i>	106
2.4.2.4.1. Polymérisation assistée en post-décharge d'un plasma microonde d'azote.....	106
2.4.2.4.2. Exemple de réalisation microfluidique : microcanaux en ppTMDSO.....	110
Références bibliographiques.....	113
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	119
3.1. Réactions enzymatiques en réacteur à flux laminaire : influence de la miniaturisation des réacteurs sur les cinétiques réactionnelles.....	121
3.1.1. Modèle réactionnel β -galactosidase / o-NPG : étude cinétique.....	121
3.1.2. Protéolyse enzymatique pepsine porcine / hémoglobine bovine : évolution réactionnelle.....	145
Références bibliographiques.....	157
3.2. Rôle de l'outil microfluidique dans le couplage réaction-séparation : application à l'extraction liquide-liquide d'une hémorphine à partir de la protéolyse pepsine porcine / hémoglobine bovine.....	159
Références bibliographiques.....	173
3.3. La technologie des plasmas froids pour la conception de réacteurs enzymatiques microstructurés.....	175
3.3.1. Elaboration d'une méthodologie d'immobilisation enzymatique par piégeage stérique par un film polymère de ppTMDSO obtenu par polymérisation assistée par plasma.....	175

3.3.2. Conception <i>bio-intégrante</i> de microcanaux en ppTMDSO à enzyme immobilisé : preuve de concept.....	189
Références bibliographiques.....	197
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	199
ANNEXES.....	214
LISTE DES FIGURES.....	230

Chapitre 1

Introduction générale

Chapitre 1

Introduction générale

Ce premier chapitre introduit le contexte scientifique de l'étude et tente d'en exposer la problématique principale. Tout comme le titre du manuscrit, la définition de celle-ci ne peut revendiquer une représentation fidèle de la variété des travaux entrepris. Leur diversité, inhérente aux enjeux scientifiques posés, illustre bien la nécessité d'une vision moins cloisonnante des champs disciplinaires. Dans ce cadre, une hiérarchisation des travaux est mise à plat dans la partie traitant du concept de la thèse. En prenant en considérations les contraintes rencontrées, celle-ci redéfinit les motivations spécifiques de chaque partie tout en les resituant dans l'approche globale définissant la problématique de ce travail.

1.1. Contexte de l'étude et problématique

Contexte spécifique : Maîtrise de la protéolyse enzymatique pour l'obtention de peptides bioactifs – première partie du travail

L'hydrolyse enzymatique poussée dite « extensive » de protéines intéresse divers domaines depuis plusieurs années, en particulier la santé (industrie pharmaceutique, alimentation thérapeutique fonctionnelle) et l'agroalimentaire (préparation et conservation d'aliments) [1,2]. Les sources protéiques concernées, majoritairement le lait, le soja et le sang, détiennent en effet des séquences peptidiques qui, une fois libérées de la protéine, recouvrent des activités potentiellement exploitables telles immunostimulantes [3], analgésiques [4], antimicrobiennes [5,6] ou encore antioxydantes¹ [7,8] pour n'en citer que quelques-unes. Depuis quelques temps, il a été démontré que les « déchets² » issus de l'industrie agroalimentaire pouvaient être considérés comme des ressources valorisables [9]. Le développement de procédés associés à leur valorisation se montre aujourd'hui de plus en plus d'actualité [10]. L'intérêt de développer des procédés biocatalytiques s'explique ainsi aisément par la valorisation de quantités de matière potentiellement très importantes et par la nécessité de concevoir des procédés de

¹ Cas des peptides hémiques.

² Cas du sang comme déchet d'abattoir.

préparation de peptides robustes et adaptés [11]. D'un point de vue quantitatif, la catalyse enzymatique représente un mécanisme de production efficace [2,11]. Enfin, d'un point de vue qualitatif, l'utilisation de peptides bioactifs à destination de l'humain permet un recours à celle d'analogues synthétiques souvent plus coûteux, et dont l'usage s'avère parfois inadapté ou à l'origine d'effets indésirables [1].

Malgré des soucis antécédents d'ordre sanitaire, la filière « sang » reste concernée par cette valorisation, en partie du fait de la grande homogénéité du cruor, déchet d'abattoirs, en hémoglobine, source protéique. Le sang constitue également une source protéique importante du fait de son abondance. Enfin, le grand nombre d'études structurales effectuées à propos de l'hémoglobine suggère qu'elle constitue un modèle protéique intéressant pour l'hydrolyse enzymatique. Toutefois, si la variété des peptides actifs potentiellement générés est grande, leur préparation se heurte à quelques obstacles :

- l'hydrolyse de l'hémoglobine est régie par des étapes réactionnelles irréversibles consécutives et parallèles générant des populations peptidiques dont la composition (et donc la sélectivité) est sous contrôle cinétique³ [12] ;
- la préparation de peptides d'intérêt est en conséquence souvent difficile à maîtriser car leur concentration dans les hydrolysats est faible et variable ;
- l'isolement de tels peptides à partir d'hydrolysats si complexes met en jeu des techniques de fractionnement et de purification lourdes de telle sorte que l'enrichissement⁴ est souvent préféré à la purification totale du peptide actif⁵.

Pour l'équipe ProBioGEM, équipe constitutive de l'Institut Charles Violette, ces contraintes conduisent à trois enjeux majeurs dans la conception, la mise en œuvre, la maîtrise et l'optimisation de procédés biocatalytiques et séparatifs efficaces pour l'obtention sélective de peptides actifs : (i) le suivi instantané de l'avancement de la réaction protéolytique (de la cinétique réactionnelle), (ii) le contrôle de la sélectivité réactionnelle⁶ et de la productivité de peptides ou populations de peptides spécifiques et (iii) l'efficacité du procédé séparatif et son couplage au procédé biocatalytique.

³ Valable en milieu aqueux car les alcools permettent d'influer la stabilité de la structure tridimensionnelle de la pepsine, affectant la sélectivité en conséquence.

⁴ L'enrichissement signifie une purification « partielle » d'un composé.

⁵ Il est admis qu'un peptide pur est plus actif qu'une fraction enrichie [1].

⁶ Le contrôle de la sélectivité réactionnelle impose de façon sûre le contrôle de la cinétique d'apparition des peptides.

Le premier enjeu résume l'importance de bénéficier de systèmes de détection et d'analyse fiables en temps réel. En effet, comme définie par Linderstrøm-Lang [12], la réaction protéolytique met en jeu une variabilité forte de la nature des peptides générés en fonction de son avancement. Ainsi, le suivi de la cinétique réactionnelle permettant d'obtenir des informations instantanées⁷ sur la nature (information qualitative) ou les concentrations relatives de peptides ou populations de peptides d'intérêt (information quantitative) serait bienvenu. Une telle stratégie d'analyse intégrée pourrait permettre une alternative facultative à des analyses externes récurrentes comme la chromatographie liquide. Il s'agit donc d'un outil de suivi et d'optimisation pouvant servir à guider efficacement la préparation de peptides. Néanmoins, l'intégration d'un tel outil à un réacteur pose la condition du développement technologique d'un capteur capable de rendre compte de ces informations. Actuellement, dans le domaine de l'hydrolyse de protéines, peu de moyens analytiques sont offerts pour satisfaire une analyse en temps réel de ces paramètres. Classiquement, les procédés mis en place reposent sur l'utilisation de systèmes pH-métriques dont la sensibilité conditionne bien évidemment la précision de la mesure et indirectement la productivité vis-à-vis du produit désiré. De plus, des difficultés liées à l'utilisation de milieux tamponnés rendront cette technique incompatible. Néanmoins, si la mise en œuvre de cette stratégie de mesure peut être considérée dans certains cas comme adaptée à l'échelle laboratoire, le passage aux échelles supérieures rend vite compte de l'incompatibilité dimensionnelle entre le système de mesure pH-métrique et le réacteur. Celle-ci peut engendrer une inefficacité importante de la mesure (principalement dues à l'inhomogénéité spatiale du mélange en grande cuve). Partant de ce constat, il apparaît important de développer des outils de mesure adaptés et couplés ou intégrés au réacteur afin de faciliter et de guider efficacement les procédés de préparation de peptides actifs.

Face au second défi, quelques orientations ont cherché à tirer profit des caractéristiques physico-chimiques de peptides (taille, charge, hydrophobie) afin d'élaborer des procédés sélectifs d'obtention de certains peptides opioïdes [13,14] ou antimicrobiens [15]. Cette stratégie de préparation reflète toutefois la difficulté à maîtriser la protéolyse dans son ensemble, c'est-à-dire à orienter sa sélectivité. En effet, compte-tenu de la variété des peptides actifs potentiellement générés au cours de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine, il apparaît important de réussir à maîtriser la réaction car de nombreux peptides possédant des activités fortes ne présentent pas de caractéristiques physico-chimiques prononcées. D'autres

⁷ Au cours de la réaction.

orientations ayant trait à la sélectivité ont consisté à jouer sur les conditions de préparation des peptides, en ajoutant par exemple des alcools au milieu réactionnel afin de déstructurer partiellement l'hémoglobine au niveau de sa structure tertiaire [16]. Enfin, des études relatives à la productivité de certains peptides ont été menées dans l'optique de passage du régime discontinu (réacteur fermé de type *batch*) au régime continu (réacteur ouvert de type CSTR). De cette manière, Froidevaux *et al.* ont ainsi mis en place un procédé continu et sélectif de préparation de peptides opioïdes [14], puis ont cherché à optimiser davantage le procédé voire à intensifier les conditions opératoires [17]. Si depuis longtemps les moyens employés pour traiter des quantités industrielles reposent principalement sur l'utilisation de réacteurs *batch* de grande contenance (afin de valoriser un maximum de matière), un changement de paradigme s'effectue depuis quelques années, sous l'impulsion forte de certains chimistes (au-delà de leur communauté même), avec la mise en œuvre de réacteurs continus [18-20]. Les motivations principales concernent naturellement le traitement de matière de façon continue, la productivité mais également d'éventuels couplages de procédés séparatifs, accompagnés des aspects économiques et environnementaux. Le génie des procédés nous enseigne en effet qu'un réacteur est un outil qui doit pouvoir s'adapter au procédé dans son ensemble de façon optimale (et non l'inverse), en nous rappelant que sa performance influe significativement sur la réussite de ce dernier. La multiplicité des réacteurs dont les propriétés sont bien caractérisées est censée permettre un large choix dans la mise en œuvre de procédés catalytiques. De ce point de vue, il est un fait bien établi que la nature d'un réacteur et son dimensionnement impacte significativement les conditions physico-chimiques du milieu réactionnel. En conséquence la cinétique de la réaction qui s'y déroule est affectée. Compte-tenu du mécanisme protéolytique impliqué [12], ce paramètre est un élément important à prendre en compte dans la préparation sélective de peptides et la productivité.

Enfin, le dernier défi souligné concerne le choix de la méthodologie séparative et son efficacité dans la recherche du produit désiré. De façon optimale, la nature du procédé séparatif doit rendre possible un couplage avec le procédé catalytique amont afin de satisfaire des besoins pratiques à visée industrielle. Dans cette optique, plus la séparation est résolutive, plus la valeur ajoutée apportée au produit d'intérêt grandit. Néanmoins, l'idéal est que la résolution atteinte n'entrave pas la productivité du procédé séparatif dans son ensemble. Ainsi, s'il est reconnu que les méthodes de séparation au format capillaire telles que la chromatographie ou l'électrophorèse capillaire sont hautement résolutes, leur coût et la difficulté de couplage au procédé catalytique freinent considérablement leur mise en œuvre. De plus, la faible

productivité de ces techniques complique davantage leur utilisation en dehors de l'aspect purement analytique. Les procédés séparatifs les plus répandus dans le domaine de la séparation de mélanges peptidiques complexes tels que les hydrolysats recouvrent principalement les techniques membranaires [21-23] et les techniques extractives [14,17]. La mise en œuvre de tels procédés séparatifs s'étudie généralement afin de rendre possible un couplage au procédé biocatalytique amont, souvent motivée par la recherche d'un procédé continu de traitement de matière. L'enjeu est donc de mettre au point des procédés de type réaction-séparation fiables, adaptés au réacteur amont et adaptés au produit recherché.

Ces enjeux rappellent que d'une manière générale, le développement, la mise en œuvre et l'optimisation des outils de production ne peuvent se faire que de façon convergente en vue d'une efficacité optimale. Dans certains cas, des changements d'outils et de perception vis-à-vis des concepts de production dont bénéficient la recherche et l'industrie peuvent s'avérer bénéfiques.

Lorsque l'écoulement modifie les transferts

Il est un fait bien établi que le taux de production d'une espèce chimique ne dépend pas uniquement de la cinétique de la réaction. La présence d'un écoulement conditionne la mise en contact des réactifs et contrôle ainsi les performances du réacteur. Un procédé de transformation de matière ou d'énergie fait ainsi intervenir à la fois des phénomènes d'interactions physiques et chimiques qui sont intimement couplés. Les contraintes précédemment soulevés illustrent bien que dans certains cas, des outils davantage adaptés sont requis en vue d'un contrôle plus efficace de ces phénomènes.

« L'outil » microfluidique

La microfluidique traite principalement de l'étude des écoulements et de la manipulation de fluides à l'échelle de quelques microns dans des systèmes microfabriqués [24]. La technologie microfluidique représente l'outil dont la flexibilité et les caractéristiques nous ont permis d'imaginer innover et relever quelques défis parmi ceux évoqués. Au cœur de notre démarche et motivée par trois points cruciaux, la technologie microfluidique est susceptible de répondre : (i) à la recherche d'un dimensionnement de réacteur susceptible de permettre une maîtrise accrue de la protéolyse (maîtrise de la cinétique et de la sélectivité de la réaction par un contrôle

plus poussé des phénomènes de transfert), (ii) à une volonté forte d'intégration d'un système analytique au réacteur et (iii) au développement de procédés séparatifs couplés et raisonnés. La problématique spécifique qui résulte de ces éléments convergents peut être définie par la question du ***rôle que peut jouer la microfluidique dans la maîtrise et l'intensification de procédés appliqués à la protéolyse enzymatique pour l'obtention de peptides bioactifs.***

Positionnement général des microréacteurs

L'avènement récent des systèmes microfluidiques offre depuis une bonne décennie un mode de réaction très attrayant par la prépondérance d'une physique spécifique [24]. Aux échelles des réacteurs miniaturisés dits microréacteurs, les phénomènes de transfert sont considérés comme très efficaces si bien qu'ils sont souvent décrits en génie chimique comme pouvant satisfaire certains aspects sécuritaires ou encore certaines contraintes d'ordre cinétique, voire même de sélectivité réactionnelle [25,26]. En prenant une importance croissante en synthèse chimique, les réacteurs microfluidiques démontrent leur capacité à satisfaire des besoins divers et variés en génie chimique, dont les préoccupations sont tantôt très proches des préoccupations du génie enzymatique. D'abord, les réacteurs microfluidiques sont capables d'offrir des plateformes efficaces d'expérimentations multiparamétriques utiles à l'optimisation de procédés [25,27]. Ensuite, ils peuvent être à l'origine de procédés innovants lorsque des limitations freinent la mise en œuvre ou le développement de procédés catalytiques à une échelle plutôt conventionnelle (en volume macroscopique) [18,25,27]. Le but recherché est souvent d'optimiser la taille du procédé en fonction des contraintes de l'opération qui va s'y dérouler, c'est-à-dire que c'est l'appareil qui est adapté au produit plutôt que l'inverse. Le contrôle des réactions délicates à maîtriser dans des installations traditionnelles, mais aussi la maîtrise de la cinétique ou de la sélectivité de réactions amènent aujourd'hui à des intérêts légitimes envers le concept de miniaturisation d'unités de production. Ainsi, l'aspect fondamental lié à la problématique posée a amené à considérer un certain nombre de réflexions. Plusieurs interrogations dépassant largement des frontières disciplinaires parfois trop cloisonnantes peuvent être soulignées afin de déterminer les bénéfices spécifiques que peut procurer l'utilisation de microréacteurs :

- Dans quel cas la miniaturisation d'un réacteur est-elle envisageable ?
- Que peut apporter la microfluidique dans la mise en œuvre de procédés continus ?
- Peut-on raisonner la production par l'utilisation de microréacteurs ?

- La microfluidique a-t-elle un sens en industrie ou quelle vision de l'augmentation des volumes de production ? *up-scaling vs. numbering-up*.

Si les quelques éléments de réponse qui seront apportés sont certes d'abord corrélées aux travaux réalisés dans le cadre de ce travail, l'extension des résultats et des concepts qui seront décrits pourraient raisonnablement être opérée vers d'autres champs d'application afin d'être exploités et connectés à des utilisations différentes des réacteurs microfluidiques. Eu égard des enjeux majeurs, des problématiques technologiques relativement nouvelles et d'une littérature parfois versatile sur certains aspects, il est crucial que l'interprétation des résultats passe par l'acquisition de données expérimentales fiables et reproductibles mais aussi qu'elle propose des hypothèses et concepts forts soulignant les potentialités énormes de la microfluidique et des microtechnologies dans le domaine de la (bio)catalyse.

Contexte élargi : Nouveaux concepts et intensification des techniques de conception en réponse aux enjeux technologiques – deuxième partie du travail

Actuellement, la microfluidique est un domaine de recherche en pleine expansion dont la vitalité est nourrie par la diversité de ses applications. L'extension de la microfluidique à la chimie et la biologie pousse continuellement au développement et à l'application de nouveaux protocoles et de technologies. C'est dans ce cadre que des concepts nouveaux et originaux ont l'opportunité de répondre aux nouveaux enjeux qui accompagnent l'utilisation de microréacteurs. Des technologies innovantes permettant de concevoir ou « façonner » un réacteur microfluidique pour des applications spécifiques peuvent être mises à profit. Ainsi, l'approche fréquente de l'immobilisation du catalyseur (souvent récurrente en systèmes analytiques ou de production), peut être redéfinie selon les objectifs. La surface disponible au sein d'un réacteur miniaturisé constitue effectivement un bénéfice intéressant dans l'élaboration de parois réactives. C'est ce que propose la deuxième partie de ce travail dans une démarche traitant de l'élaboration d'un microréacteur de type IMER (*IMmobilized Enzyme Reactor*). L'immobilisation d'enzyme, dans un microréacteur ou non, est souvent confrontée à la problématique de la méthodologie en fonction des objectifs fixés et des moyens à disposition. Il n'existe effectivement pas de règle ni de méthodologie idéale régissant l'immobilisation d'un enzyme au sein d'un réacteur. Pour preuve, la diversité des applications, des enzymes et des supports a conduit à des résultats d'une abondance rare dans la littérature.

En faisant suite à un brevet déposé en 2009 (par l'équipe P²M) [28], notre objectif fut de développer une méthodologie originale d'immobilisation répondant à des critères de compatibilité entre un enzyme, un matériau polymère (impliqué dans l'immobilisation) et un système analytique (développé par l'équipe M²T) [29]. La possibilité de concevoir aisément des microréacteurs de type IMERs était envisagée et s'inscrivait dans une perspective d'optimisation d'un dispositif microfluidique réutilisable. Par ailleurs, l'immobilisation d'enzyme donnait également au système analytique la fonctionnalité d'un biocapteur par l'intermédiaire d'une communication de type biorécepteur-transducteur. En première approche, une conception simple de films polymères bioactifs pouvant être aisément intégrés dans un procédé de microfabrication était visée. Ensuite, la technologie des plasmas froids employée pouvait permettre une microfabrication complètement « *bio-intégrante* » du réacteur en autorisant une alternative à l'application de techniques de microfabrication « dures » (par opposition aux techniques « douces »). En perspective, un « mariage » de la technologie plasma avec la technologie TeraHertz permettait d'imaginer la conception d'une structure microfluidique entièrement faite de polymère (déposé par plasma) et qui intégrerait un biocapteur TeraHertz au microréacteur de type IMER. A cet effet, la mise au point du protocole d'immobilisation enzymatique devait rendre possible ces perspectives. Par ailleurs, les considérations économiques et environnementales n'étaient pas exclues.

Problématique globale : « Microreaction engineering – Is small better? »

Les interrogations majeures définissant la problématique globale de ce travail peuvent être bien résumées par la question que pose K. F. Jensen dans le titre de l'une de ses publications : « *Microreaction engineering - Is small better?* » [30]. En prenant en compte les réflexions soumises dans un contexte global, il est possible de définir une problématique dépassant le contexte des peptides bioactifs, en l'étendant du monde de la recherche à celui de l'industrie. En donnant davantage de sens aux éléments de réponse qu'espèrent apporter nos travaux, cette considération propose la problématique globale suivante : ***maîtrise et intensification de procédés biocatalytiques et séparatifs : quel rôle pour la microfluidique ?***

Les termes « maîtrise » et « intensification » englobent ici les aspects relevant de la productivité, de l'immobilisation de biocatalyseurs pour le travail en flux continu et de l'intégration de systèmes de détection. Ils sont détaillés ci-après.

1.2. Concept de la thèse

Démarche

C'est sur les enjeux importants posés par l'utilisation récente des technologies microfluidiques en biotechnologies et procédés enzymatiques que se focalise la problématique globale de ce travail. Ainsi, un des intérêts de cette étude est de souligner certains défis majeurs accompagnant la mise en place de microprocédés dans ces domaines. Au travers des résultats expérimentaux, l'objectif est également d'apporter des preuves de concept (i) validant la pertinence et les bénéfices de l'utilisation de la microfluidique et (ii) renforçant l'utilisation de microréacteurs pour la maîtrise et l'intensification de procédés.

En considérant un procédé de préparation d'un produit dans son ensemble, notre démarche se centre sur la considération de trois composantes spécifiques : la réaction, la détection (l'analyse) et la séparation. Plus spécifiquement, nos préoccupations se tournent vers la mise en œuvre de procédés biocatalytiques en réacteur microfluidique suivant une approche microcinétique (compréhension, modélisation) et selon le principe de l'intensification. Par principe d'intensification, on entend notamment les approches faisant intervenir (i) l'immobilisation du catalyseur pour le travail en flux continu, (ii) la conception de procédés couplés et raisonnés pour la séparation des produits, et (iii) le couplage/ l'intégration d'un élément de détection de la réaction ou des produits. Des éclairages sur ces différents points sont traités dans la partie bibliographique de ce travail (partie 2.3.4.3.).

Dans notre cas, rappelons que le procédé biocatalytique d'intérêt met en jeu l'hydrolyse enzymatique de protéines et plus précisément l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine. Le procédé séparatif traite alors de la récupération sélective de peptides d'intérêt. Nous nous intéresserons spécifiquement à la récupération d'un peptide opioïde par un procédé d'extraction liquide-liquide. Motivés par des conditions de travail en flux continu et par l'intégration d'un système de type biocapteur, nous avons également entrepris l'élaboration d'un protocole d'immobilisation enzymatique *via* l'utilisation des plasmas froids. Par extension, la conception « *bio-intégrante* » d'un réacteur microfluidique a été imaginée. Enfin, l'aspect de détection par spectroscopie TeraHertz constitue une perspective analytique basée sur quelques résultats préliminaires récents [31,32].

Hierarchisation du manuscrit

Pour faire suite à cette première partie introductive, la hiérarchisation du manuscrit peut donc se décrire comme suit. La deuxième partie du mémoire relate les *généralités*, dont quelques principes expérimentaux et méthodes, nécessaires à la bonne compréhension des résultats dans leur contexte. L'entrée en matière expose une vue d'ensemble de la catalyse enzymatique puis appuie sur la spécificité de la spectroscopie TeraHertz dans le sondage potentiel de telles réactions, c'est-à-dire dans son potentiel comme stratégie de détection. Ces deux premiers chapitres sont mineurs et volontairement raccourcis afin de laisser une plus large place aux deux thèmes majeurs de notre travail.

En restant centré sur le domaine de la catalyse enzymatique, deux chapitres principaux se dégagent ensuite : l'un traitant de la technologie des systèmes microfluidiques et de leurs applications en chimie-biologie, particulièrement dans les domaines de l'analyse et de la (bio)catalyse ; l'autre décrivant la technologie des plasmas comme outil d'ingénierie de surface, notamment en vue de la conception d'interfaces bioactives. Quelques détails sur les méthodologies majeures d'immobilisation enzymatique sont apportés avant un bref état de l'art des méthodes possibles par voie plasma.

La troisième partie du manuscrit présente les principaux *résultats* obtenus durant ce travail, principalement sous forme de publications acceptées, soumises ou en préparation. Elles sont à chaque fois introduites et résumées en français. Le chapitre démarre avec une étude préliminaire sur l'influence de la miniaturisation d'un réacteur sur une cinétique enzymatique simple à un substrat. L'article rédigé sur cette étude tente de résumer les informations majeures pouvant être tirées à la lecture des résultats expérimentaux. Cet article soumis, noté article (i), s'intitule « *Kinetic study of an enzyme-catalyzed reaction in a microfluidic reactor* ». Une réaction protéolytique plus complexe a ensuite été étudiée dans les mêmes conditions de flux laminaire. Accompagnés d'une modélisation, les effets sur la cinétique et la sélectivité de cette réaction ont été reportés dans l'article (ii) : « *Diffusion based kinetic selectivity modulation of enzymatic proteolysis in a microfluidic reactor: experimental analysis and stochastic modeling* », publié dans *RSC Advances*. Dans une optique de couplage de la réaction de protéolyse enzymatique à la séparation sélective d'un des produits de réaction, un procédé continu de type réaction-séparation a été mis en œuvre. Ce procédé de réaction et d'extraction sélective et continue d'un peptide opioïde est décrit dans l'article (iii) en préparation pour publication : « *Sustainable*

efficient way to prepare the opioid peptide LVV-h7 from enzymatic proteolysis by a microfluidic reaction-extraction process with solvent recycling ». Ces trois articles se réfèrent à la première partie de la thèse, partie centrée sur la mise en œuvre et la compréhension de réactions enzymatiques en microréacteurs. Il met l'accent sur le rôle spécifique de la microfluidique sur la cinétique voire la « mécanistique » des réactions ainsi que sur les mérites et l'efficacité du couplage du microprocédé de protéolyse enzymatique à un microprocédé séparatif.

Ensuite, des résultats parallèles ont été obtenus dans le cadre de la deuxième partie de la thèse. Il s'agissait d'immobiliser des enzymes au sein de films polymères dans le but de concevoir une structure microfluidique de type IMER intégrant de tels films. Une méthodologie d'immobilisation par piégeage stérique d'un enzyme au sein d'un film déposé par polymérisation assistée par plasma est détaillée dans l'article (iv) : « *Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film* », publié dans *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Finalement, un canal microfluidique comportant des enzymes immobilisés a pu être réalisé selon une approche de fabrication « *bio-intégrante* ». Ce résultat est exposé dans le texte, un article est néanmoins en préparation.

Notons que des éléments de résultats relatifs au développement de la spectroscopie TeraHertz en microsystème microfluidique sont présentés en annexe du mémoire sous la forme d'un article intitulé « *Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem* » et publié dans *RSC Advances* (Annexe 1).

Enfin, la quatrième et dernière partie du manuscrit apporte les *conclusions et perspectives* pouvant être données par cette étude. Une conclusion préliminaire synthétise les différents résultats obtenus durant ce travail et propose des perspectives d'étude. Une conclusion plus générale apporte ensuite des prospectives ainsi que des éléments de réponse et de réflexion sur la place des microprocédés dans le « renouveau » prôné par l'intensification des procédés.

Références

- [1] Agyei D., Danquah M. K., "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides", *Biotechnol. Adv.*, **29**, 2011, 272–277.
- [2] Tavano O. L., "Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology", *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **90**, 2013, 1–11.

- [3] Gill H. S., Doull F., Rutherford K. J., Cross M. L., “Immunoregulatory peptides in bovine milk”, *Br. J. Nutr.*, **84**, 2000, S111–S117.
- [4] Takagi H., Shiomi H., Fukui K., Hayashi K., Kiso Y., Kitagawa K., “Isolation of a novel analgesic pentapeptide, neo-kyotorphin, from bovine brain”, *Life Sci.*, **31**, 1982, 1733–1736.
- [5] Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Miloudi K., Daoud R., Krier F., Kouach M., Briand G., Guillochon D., “Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin”, *Peptides*, **27**, 2006, 2082–2086.
- [6] Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje E. Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D., “Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides”, *Peptides*, **29**, 2008, 969–977.
- [7] Chang C.-Y., Wu K.-C., Chiang S.-H., “Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates”, *Food Chem.*, **100**, 2007, 1537–1543.
- [8] In M.-J., Chae H. J., Oh N.-S., “Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin”, *Bioresour. Technol.*, **84**, 2002, 63–68.
- [9] Pfaltzgraff L. A., De bruyn M., Cooper E. C., Budarin V., Clark J. H., “Food waste biomass: a resource for high-value chemicals”, *Green Chem.*, **15**, 2013, 307–314.
- [10] Narodoslawsky M., “Chemical engineering in a sustainable economy”, *Chem. Eng. Res. Des.*, **91**, 2013, 2021–2028.
- [11] Woodley J. M., Breuer M., Mink D., “A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production”, *Chem. Eng. Res. Des.*, **91**, 2013, 2029–2036.
- [12] Linderstrøm-Lang K., “Les phases initiales de la dégradation des protéines par les enzymes”, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1953, 100–116.
- [13] Piot J.-M., Zhao Q., Guillochon D., Ricart G., Thomas D., “Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**, 1992, 101–110.
- [14] Froidevaux R., Vercaigne-Marko D., Kapel R., Lecouturier D., Chung S., Dhulster P., Guillochon D., “Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of heamorphins in the course of peptic hemoglobin hydrolysis”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 2006, 1433–1440.
- [15] Froidevaux R., Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarz E., Ruckebusch C., Dhulster P., Guillochon D., “Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment”, *FEBS Lett.*, **491**, 2001, 159–163.
- [16] Adje E. Y., Balti R., Kouach M., Dhulster P., Guillochon D., Nedjar-Arroume N., “Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **49**, 2011, 143–153.
- [17] Froidevaux R., Vanhoute M., Lecouturier D., Dhulster P., Guillochon D., “Continuous preparation of two opioid peptides and recycling of organic solvent using liquid-liquid extraction coupled with aluminum oxide column during heamoglobin hydrolysis by immobilized pepsin”, *Process Biochem.*, **43**, 2008, 431–437.

- [18] Newman S. G., Jensen K. F., “The role of flow in green chemistry and engineering”, *Green Chem.*, **15**, 2013, 1456–1472.
- [19] Valera F. E., Quaranta M., Moran A., Blacker J., Armstrong A., Cabral J. T., Blackmond D. G., “The flow’s the thing...or is it? Assessing the merits of homogeneous reactions in flask and flow”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2010, 2478–2485.
- [20] Lomel S., Falk L., Commenge J. M., Houzelot J. L., Ramdani K., “The microreactor: a systematic and efficient tool for the transition from batch to continuous process?”, *Chem. Eng. Res. Des.*, **84**, 2006, 363–369.
- [21] Kuba M., Tana C., Tawata S., Yasuda M., “Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus Purpureus* acid protease”, *Process Biochem.*, **40**, 2005, 2191–2196.
- [22] Kapel R., Froidevaux R., Nedjar-Arroume N., Fertin-Bazus A., Dhulster P., Guillochon D., “Continuous production of a peptidic fraction containing the intermediate opioid peptide LVV-hemorphin-7 (LVV-h7) by peptic hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **37**, 2003, 317–324.
- [23] Bazinet L., Firdaous L., “Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides”, *Recent Pat. Biotechnol.*, **3**, 2009, 61–72.
- [24] Tabeling P., “Introduction à la microfluidique”, Edition Belin, 2003, 254 pages.
- [25] Hartman R. L., Jensen K. F., “Microchemical systems for continuous-flow synthesis”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2495–2507.
- [26] Amemiya F., Matsumoto H., Fuse K., Kashiwagi T., Kuroda C., Fuchigami T., Atobe M., “Product selectivity control induced by using liquid-liquid parallel laminar flow in a microreactor”, *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2011, 4256–4265.
- [27] Elvira K. S., Casadevall i Solvas X., Wootton R. C. R., deMello A. J., “The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis”, *Nat. Chem.*, **5**, 2013, 905–915.
- [28] Abbas A., Supiot P., Guillochon D., Bocquet B., “Method for making microchannels on a substrate, and substrate including such microchannels”, WO/2010/097548, 2010.
- [29] Bocquet B., Treizebre A., Laurette S., “Microsystem having a microelectrical and microfluidic function, and method for manufacturing same”, WIPO Patent Application WO/2012/072917, 2012.
- [30] Jensen K. F., “Microreaction engineering – is small better?”, *Chem. Eng. Sci.*, **56**, 2001, 293–303.
- [31] Abbas A., Treizebre A., Supiot P., Bourzgui N.-E., Guillochon D., Vercaigne-Marko D., Bocquet B., “Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis”, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2009, 154–160.
- [32] Laurette S., Treizebre A., Affouard F., Bocquet B., “Subterahertz characterization of ethanol hydration layers by microfluidic system”, *Appl. Phys. Lett.*, **97**, 2010, 111904.

Chapitre 2

Généralités bibliographiques

Chapitre 2

Généralités bibliographiques

Les principales notions rencontrées dans le travail de recherche sont exposées dans ce chapitre bibliographique. Il relate de façon quasi chronologique les thèmes pris en considération dans notre démarche. Analyse par spectroscopie TeraHertz, mise en œuvre de réacteurs microfluidiques et immobilisation enzymatique par technologie plasma correspondent aux trois thèmes majeurs et transversaux aux travers desquels nous avons envisagé expérimenter la biocatalyse. Un bref état de l'art de chaque thème est présenté en relation avec nos objectifs.

2.1. Flexibilité conformationnelle et fonction protéique : vue d'ensemble de la catalyse enzymatique

Ce premier chapitre bibliographique s'attache à exposer les considérations de base de la catalyse enzymatique. Il passe rapidement en revue les propriétés des enzymes et aborde quelques principes fondamentaux gouvernant l'interaction d'un enzyme avec son substrat. Un accent est mis sur la dynamique des milieux liquides, encore mal comprise et peu investiguée, alors qu'elle joue un rôle primordial dans de nombreux phénomènes, y compris l'acte catalytique.

2.1.1. Architecture et fonction des protéines

Vue d'ensemble des protéines

Les protéines forment une famille de macromolécules biologiques fondamentales. Elles correspondent à des polymères linéaires construits d'acides aminés consécutivement reliés entre eux par des liaisons amides entre les groupements α -carboxyliques et α -aminés, les liaisons peptidiques [1]. Structures et fonctions de ces entités se révèlent être étroitement liées : la séquence des acides aminés d'une protéine, déterminée par la séquence des nucléotides de son gène codant, constitue un niveau d'organisation structural qui spécifie à son tour la façon

dont la protéine se replie en des structures plus complexes [1]. Ces structures sont à l'origine d'une architecture rigoureusement spécifique d'une fonction.

La fonction d'une protéine peut faire référence à la fonction biochimique qu'elle accomplit lorsqu'elle est considérée isolément, à la fonction cellulaire qu'elle exécute conjointement avec d'autres molécules sous la forme d'un assemblage ou complexe, ou encore au phénotype qu'elle détermine dans une cellule ou un organisme. De fait, il existe une multitude de fonctions auxquelles les protéines sont rattachées : transport, catalyse, motricité, stockage, protection, régulation, défense...

La catalyse par les enzymes

D'un point de vue biochimique, la catalyse constitue une fonction protéique majeure car elle est assurée la plupart du temps par des protéines dénommées enzymes, le cas des ribozymes mis à part. D'un point de vue physiologique, le déroulement harmonieux des processus biologiques n'est possible que parce que chaque cellule dispose de son propre équipement enzymatique génétiquement déterminé et gouvernant des cascades de réactions coordonnées, les voies métaboliques. Possédant une grande spécificité, les enzymes participent également à de nombreux mécanismes de régulation qui permettent d'adapter le métabolisme à des situations variables.

Mentionnons qu'un certain nombre d'enzymes possède des applications industrielles. Les principaux domaines d'utilisation des enzymes recouvrent l'industrie des détergents et de l'amidon, l'agroalimentaire (alimentation humaine et animale), la chimie fine et la santé ainsi que les applications analytiques, diagnostic et autres (bio)capteurs. Par ailleurs, la spécificité des enzymes ainsi que leurs caractéristiques en font des outils de choix pour réaliser des réactions de synthèse dans des conditions particulièrement compatibles avec la préservation de l'environnement (milieux aqueux, pH et températures modérés). Dans une optique de développement durable, leur usage est donc compatible avec l'utilisation croissante de matières premières renouvelables d'origine biologique.

2.1.2. Les enzymes : aperçu historique

La découverte des enzymes n'est pas des plus simples à dater. Dès 1783, les travaux de Spallanzani ont permis de mettre en évidence une activité hors d'une cellule vivante lorsqu'il constata une « liquéfaction » de la viande par le suc gastrique de faucon. Bien que d'autres observations similaires aient été faites par la suite, la première découverte d'un enzyme est généralement créditée à Payen et Persoz pour leurs travaux sur le malt en 1833 [2]. Le traitement d'un extrait aqueux de malt par de l'éthanol leur a permis de précipiter une substance labile à la chaleur, laquelle initie l'hydrolyse de l'amidon. Ils appelèrent cette fraction « diastase », aujourd'hui bien connue sous le nom d'amylase.

En 1878, Kühne propose le mot *enzyme*, signifiant « dans la levure » en grec, afin de distinguer les « ferments organisés » (le microorganisme entier) des « ferments inorganisés » (excrétés par les microorganismes). Ensuite, c'est Bertrand qui, en 1897, découvrit que certaines enzymes nécessitaient des facteurs dialysables pour leur activité, les coenzymes.

A partir du début du 20^e siècle, de nombreux essais sont réalisés dans le but de purifier des enzymes mais aussi de décrire leur activité catalytique dans un formalisme mathématique. En suggérant que le complexe enzyme-substrat représente un intermédiaire obligatoire dans la réaction catalytique, Henri met au point en 1902 une équation mathématique reliant l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse réactionnelle. En 1909, Sørensen met en évidence l'effet du pH sur l'activité enzymatique avant que Michaelis et Menten ne redécouvrent l'équation d'Henri et la reformulent en se basant sur les principes d'équilibre chimique [3]. Ce n'est que vers la fin des années 1920 que les enzymes sont admises comme étant des protéines.

2.1.3. Les niveaux d'organisation structurale

De nature protéique, la structure des enzymes peut donc être décrite selon quatre niveaux d'organisation :

- *la structure primaire*, ordre d'enchaînement des acides aminés de série L (lévogyre). Ils sont liés par la liaison peptidique de type amide. Ce premier niveau de structure est à l'origine des niveaux d'organisation supérieurs et se trouve responsable de toutes les propriétés de protéines, en particulier des propriétés catalytiques des enzymes ;

- *la structure secondaire*, qui résulte de la formation de liaisons hydrogènes entre les groupements amide ($-NH$) et carbonyle ($-CO$) du squelette peptidique. L'existence de structure secondaire provient du fait que les repliements énergétique favorables de la chaîne peptidique sont limités et que seules certaines configurations sont possibles. Les trois principales catégories de structures secondaires selon le repliement des liaisons peptidiques sont les hélices (de type α), les feuillets (de type β) et les coudes ;
- *la structure tertiaire*, correspondant au repliement sur elle-même de la chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire. Ce repliement forme une configuration spatiale bien déterminée, généralement de forme globulaire pour la majorité des enzymes. Les liaisons intramoléculaires (pont disulfure, liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes) responsables de la stabilité de cette structure tertiaire se forment à partir des chaînes latérales des acides aminés ;
- *la structure quaternaire*, correspondant à une structure faite de plusieurs sous-unités, chacune étant une chaîne polypeptidique de structure tertiaire définie. L'assemblage des sous-unités entre elles se réalise par des liaisons intramoléculaires. Cette association en structure quaternaire est spécifique de l'activité de l'enzyme.

2.1.4. Effet du pH et de la température sur l'activité d'un enzyme

L'activité d'un enzyme dépend fortement des conditions physico-chimiques du milieu dans lequel il réagit. Les conditions les plus influentes et les plus abondamment expérimentées sont le pH et la température.

Effet du pH

La relation entre l'activité d'un enzyme et le pH se traduit généralement par une courbe en cloche (Figure 1). La vitesse de réaction est la plus élevée autour d'une zone étroite dite de pH optimum, de part et d'autre de laquelle la vitesse décroît notablement. Cet effet peut être dû à trois actions indépendantes :

- un effet de dégradation irréversible des pH extrêmes sur l'enzyme ;
- un effet sur l'état d'ionisation du substrat de l'enzyme ;
- un effet sur l'état d'ionisation de l'enzyme.

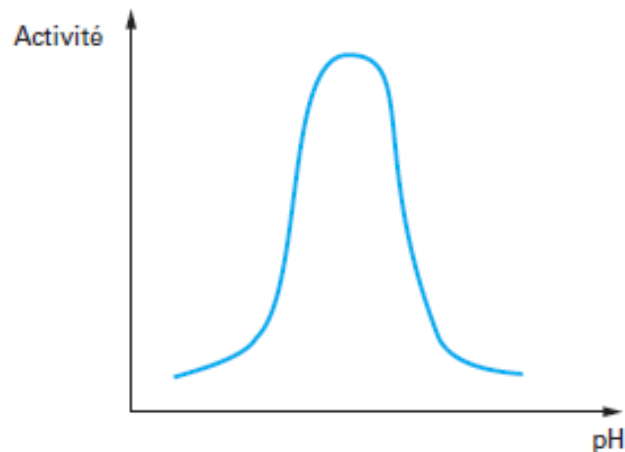


Figure 1. Influence du pH sur l'activité d'un enzyme.

Effet de la température

Deux phénomènes relatifs à l'effet de la température peuvent survenir (Figure 2). Une augmentation de la température peut provoquer :

- l'activation de la réaction par agitation moléculaire jusqu'à une certaine température. Le nombre des collisions croît, augmentant ainsi l'énergie à l'origine de l'augmentation de la vitesse de réaction ;
- l'inactivation des enzymes par dénaturation thermique, au-delà d'une certaine température. Sous l'effet de la chaleur s'opère une transformation de la forme active de l'enzyme en une forme dénaturée.

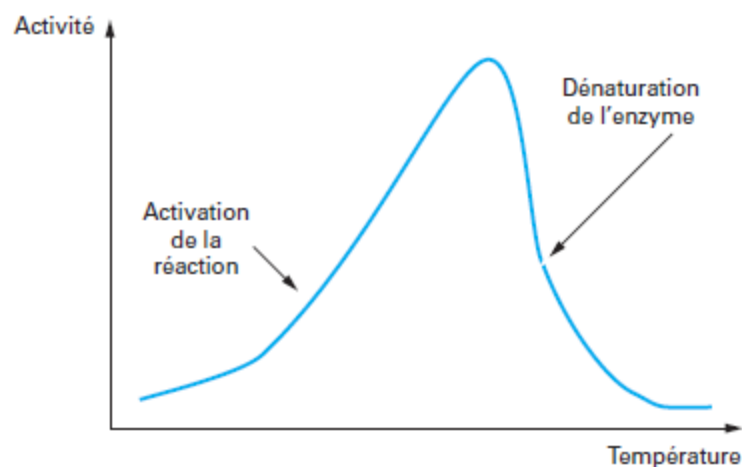


Figure 2. Influence de la température sur l'activité d'un enzyme.

La valeur de température pour laquelle l'activité enzymatique est la plus importante est dite température optimale.

2.1.5. Considérations énergétiques et thermodynamiques de la biocatalyse

D'un point de vue chimique, un enzyme est un catalyseur, ayant pour fonction de diminuer l'énergie d'activation nécessaire à une réaction afin d'augmenter le nombre de molécules susceptibles d'y participer (Figure 3). Ainsi, une fois la barrière d'énergie d'activation franchie, la vitesse d'une réaction catalysée peut augmenter au-delà d'un facteur 10^{12} . Au cours de la réaction, l'enzyme n'est pas consommé et ne modifie ni la nature de la réaction, ni son équilibre, ni son bilan thermodynamique. En effet, les enzymes respectent rigoureusement les lois de la catalyse. Ils ne figurent pas quantitativement parmi les produits de réaction, ce qui signifie bien qu'ils ne sont pas consommés et que chaque molécule d'enzyme peut théoriquement provoquer la transformation d'un nombre illimité de molécules de substrat. D'autre part, un enzyme n'influence nullement l'énergie d'une réaction puisqu'il ne catalyse que les réactions thermodynamiquement permises. Enfin, ils ne déplacent pas le point d'équilibre d'une réaction : la nature des produits reste inchangée, seule la vitesse de réaction est augmentée.

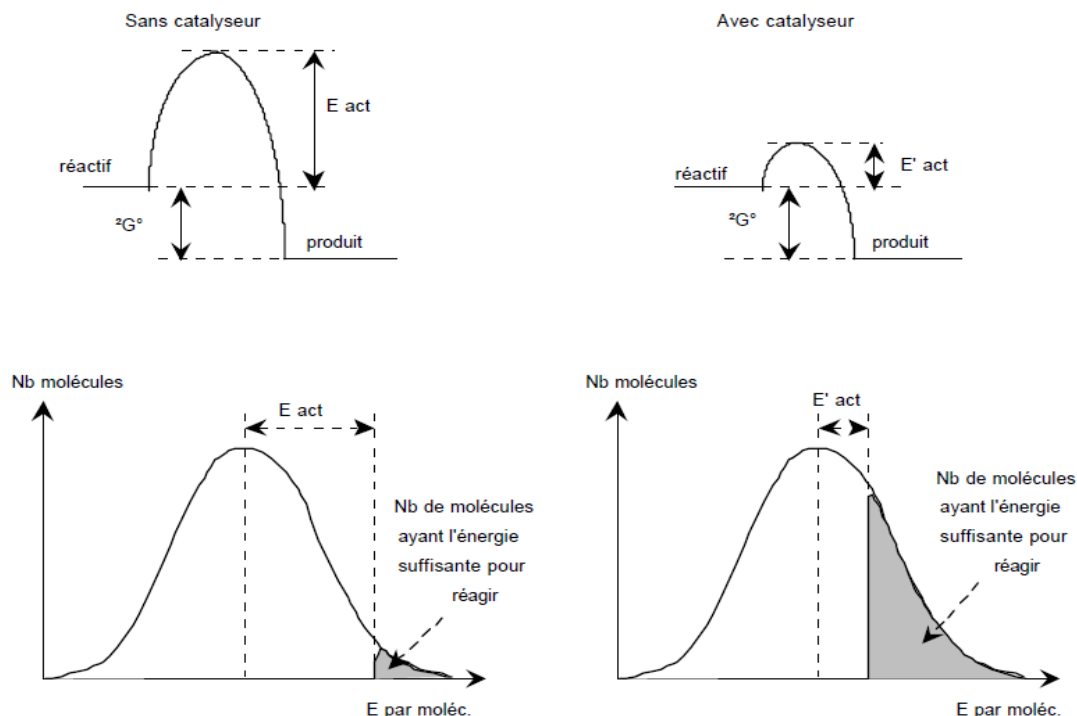


Figure 3. Niveaux d'énergie d'activation (E_{act}) en absence et en présence de catalyseur [4].

2.1.6. Interactions faibles et flexibilité

Au-dessus du zéro absolu, toutes les liaisons chimiques présentent une certaine flexibilité : les atomes peuvent vibrer et les groupements chimiques adopter des mouvements rotationnels. La plupart des forces qui stabilisent l'état natif d'une protéine étant non covalentes, il existe suffisamment d'énergie thermique aux températures physiologiques pour que les interactions faibles se rompent et se reforment fréquemment. En conséquence, une molécule protéique présente davantage de flexibilité qu'une molécule dont la structure spatiale est uniquement régie par des forces covalentes. Les structures protéiques fluctuent donc continuellement autour de leurs conformations à l'équilibre, pouvant être décrites par cristallographie ou résonance magnétique nucléaire. Ces fluctuations apparaissent essentielles au déroulement de la catalyse enzymatique. La flexibilité intrinsèque d'une protéine est effectivement primordiale à l'opération des changements conformationnels qui répondent à sa fonction biochimique. Un enzyme doit être capable de lier un réactif ou substrat de façon spécifique au niveau d'un centre actif: c'est le modèle de l'ajustement induit. Le complexe ainsi formé peut alors s'orienter afin d'adopter une position propice à la formation de l'état de transition, maximum d'énergie libre sur la voie réactionnelle conduisant du substrat au produit.

2.1.7. Dynamique des milieux liquides

La flexibilité des protéines n'est pas uniquement liée à l'agitation thermique mais également à la dynamique du milieu dans lequel elles se trouvent [5]. Les propriétés singulières des protéines et donc des enzymes peuvent également s'expliquer *via* la dynamique à laquelle elles sont soumises à travers le phénomène d'hydratation. Ce phénomène ubiquitaire majeur relatif à la solubilisation, qui peut très grossièrement se résumer à l'interaction entre une protéine, soluté, et l'eau, solvant, joue un rôle prépondérant.

C'est dès 1917 que le phénomène d'hydratation a été évoqué par Sørensen à propos de l'interaction entre l'eau et des protéines lorsqu'il étudie les cristaux d'ovalbumine [6]. Il remarque la présence d'une eau résiduelle liée aux protéines à la surface des cristaux solides. Cette eau semble jouer un rôle prépondérant dans la dynamique d'une protéine. L'étude de cette dynamique d'hydratation à l'échelle moléculaire peut, en théorie, permettre d'appréhender les phénomènes conformationnels relatifs à la catalyse d'un substrat par un enzyme.

De nombreuses techniques instrumentales ont été mises en œuvre dans le but de caractériser le phénomène d'hydratation moléculaire. On peut noter la spectroscopie diélectrique (basée sur le phénomène de relaxation diélectrique) [7-10], la diffusion neutronique [11], la spectroscopie d'absorption de rayons γ (effet Mössbauer) [12], la fluorescence infrarouge [13], mais pas seulement. Au sein du spectre électromagnétique, il existe un champ de faible énergie propice à cette étude : il s'agit du champ TeraHertz dit « *TeraHertz gap* », encore sous-exploité aujourd'hui en sciences du vivant. A ces fréquences, une spectroscopie en temps réel et non ionisante est permise, pourvu que l'expérimentation soit adaptée [14].

Il sera montré au prochain chapitre que l'expérimentation analytique envisagée aux fréquences TeraHertz est en parfaite adéquation avec le dimensionnement recherché du réacteur enzymatique, prouvant que le suivi cinétique de réactions biocatalytiques à ces fréquences est permis.

Références

- [1] Petsko G. A., Ringe D., Sanlaville C., Charmont-Bensimon D., "Structure et fonctions des protéines", De Boeck, 2008, 190 pages.
- [2] Payen A., Persoz J. F., "Mémoire sur la diastase, les principaux produits de ses réactions et leurs applications aux arts industriels", *Annales de chimie et de physique*, 2nde série, **53**, 1833, 73-92.
- [3] Michaelis L., Menten M. L., "Die kinetik der Invertinwirkung", *Biochem Z.*, **49**, 1913, 333–369.
- [4] Fabiano S., "Immobilisation d'enzymes dans des films de polymère conducteur : le PEDT. Application à la réalisation de biocapteurs ampérométriques pour le dosage du glucose et des composés phénoliques", *Thèse de doctorat*, Université de Lyon 1, soutenue le 23 Mai 2002, 172 pages.
- [5] van Holde K. E., "Reflections on a century of protein chemistry", *Biophys. Chem.*, **100**, 2003, 71–79.
- [6] Sørensen S. P. L., "Studies on proteins", *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **12**, 1917, 1-372.
- [7] Pethig R., "Protein-water interactions determined by dielectric methods", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 1992, 177–205.
- [8] Grant E. H., McClean V. E. R., Nightingale N. R. V., Sheppard R. J., Chapman M. J., "Dielectric behavior of water in biological solutions: studies on myoglobin, human low-density lipoprotein and polyvinylpyrrolidone", *Bioelectromagnetics*, **7**, 1986, 151–162.
- [9] Nandi N., Bagchi B., "Dielectric relaxation of biological water", *J. Phys. Chem. B*, **101**, 1997, 10954–10961.

- [10] Oleinikova A., Sasisanker P., Weingartner H., “What can really be learned from dielectric spectroscopy of protein solutions? A case study of ribonuclease A”, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 2004, 8467–8474.
- [11] Michalarias I., Gao X. L., Ford R. C., Li J. C., “Recent progress on our understanding of water around biomolecules”, *J. Mol. Liq.*, **117**, 2005, 107–116.
- [12] Frauenfelder H., Chen G., Berendzen J., Fenimore P. W., Jansson H., McMahon B. H., Stroer I. R., Swenson J., Young R. D., “A unified model of protein dynamics”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2009, 5129–5134.
- [13] Zhang L. Y., Wang L. J., Kao Y. T., Qiu W. H., Yang Y., Okobiah O., Zhong D. P., “Mapping hydration dynamics around a protein surface”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2007, 18461–18466.
- [14] Laurette S., “Métrologie TeraHertz des liquides par microsystème microfluidique”, *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 20 Novembre 2012, 203 pages.

2.2. Etude structurale et micro-cinétique de la biocatalyse : potentialité de la spectroscopie TeraHertz

Ce court chapitre initie brièvement l'approche analytique envisagée, basée sur la caractérisation de l'état d'hydratation et de conformation moléculaire, dont la spécificité n'est pas étrangère à la démarche annoncée de miniaturisation. La convergence de ces orientations est en effet principalement abordée sous l'angle technologique. Il est ainsi brièvement montré que l'exploration relativement récente de la bande de fréquences TeraHertz en biologie impose des stratégies de mesure qui conditionnent fortement l'expérimentation, notamment en milieu aqueux. Parmi ces stratégies, le recours à « l'outil » microfluidique est présenté comme un choix intéressant dans l'élaboration d'un capteur couplé à un microréacteur.

2.2.1. Spectre électromagnétique et champ TeraHertz

Les ondes THz se réfèrent au spectre électromagnétique dans la bande se situant entre l'infrarouge proche et les micro-ondes. Ce domaine spectral s'étend typiquement entre 0,1 et 10THz (3.3 cm^{-1} à 333.6 cm^{-1}) (l'appréciation de l'étendue du domaine THz peut varier selon la littérature) (Figure 4) [1], ce qui correspond à des longueurs d'ondes millimétriques et submillimétriques ($30\mu\text{m}$ à 3mm environ) dont l'énergie des photons est comprise entre 0,4 et 40meV environ. Ces énergies sont largement plus faibles que celles impliquées dans les transitions électroniques des atomes et molécules (plus de 1eV).

Les ondes THz se révèlent être non ionisantes (une énergie de plus de 10eV est en général nécessaire pour ioniser une molécule) et capables d'exciter des liaisons de faibles énergies au sein de la matière (Figure 4) [1]. La forte absorption par ces liaisons chimiques du rayonnement à ces fréquences prédit une forte sensibilité des milieux aqueux aux ondes THz. Les applications potentielles s'en trouvent très variées et les plus prometteuses, dont nous citerons quelques antécédents en références, concernent la sécurité [2,3], le contrôle industriel [4,5], le secteur biomédical [6-8] et l'analyse en chimie-biologie [1,9,10].

Les applications des ondes THz en biologie se diversifient progressivement grâce aux progrès conjoints de l'électronique et de l'optique dans le développement de sources et de détecteurs d'ondes THz. Plusieurs études ont déjà démontré l'intérêt de sonder des matériaux biologiques à ces fréquences : imagerie et analyse histopathologique [11-13], analyse d'acides aminés [14],

détection de gaz [15], étude de phénomènes d'interaction moléculaire mettant en jeu l'ADN [16], le complexe avidine-biotine [17] ou encore l'hydratation [18].

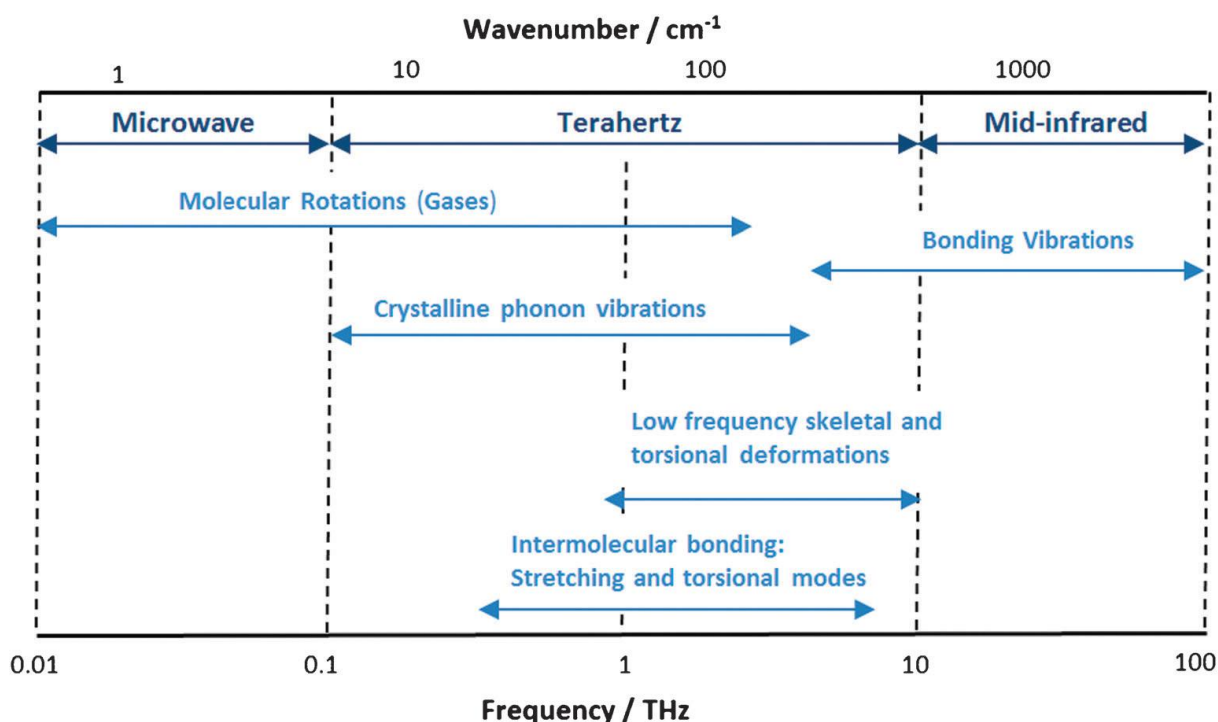


Figure 4. Emplacement du champ TeraHertz dans le spectre électromagnétique et comportement des molécules soumises à son rayonnement [1].

A titre d'exemple, l'imagerie médicale tire profit de la forte absorption des tissus vivants afin de détecter ou de mettre en évidence des contrastes d'humidité parfois caractéristiques de maladies ou de cancers, comme c'est le cas pour des mélanomes [11,12]. En effet, l'apparition de cellules cancéreuses s'accompagne fréquemment d'une augmentation de la vascularisation et donc du contenu en eau local, alors susceptible de fournir un agent de contraste naturel pour la détection de cellules malignes et le suivi de leur évolution (Figure 5) [19,20]. A l'échelle moléculaire, le développement de techniques analytiques utilisant le rayonnement THz est à l'origine d'une spectroscopie très attrayante, sans utilisation de marqueurs, non ionisante et en temps réel [1].

La localisation des fréquences THz entre le domaine électronique et le domaine optique permet l'utilisation de différents outils pour la génération et la détection d'ondes : des outils électroniques tels que les oscillateurs, des outils optiques tels que les lasers ou encore un « mariage » des deux.

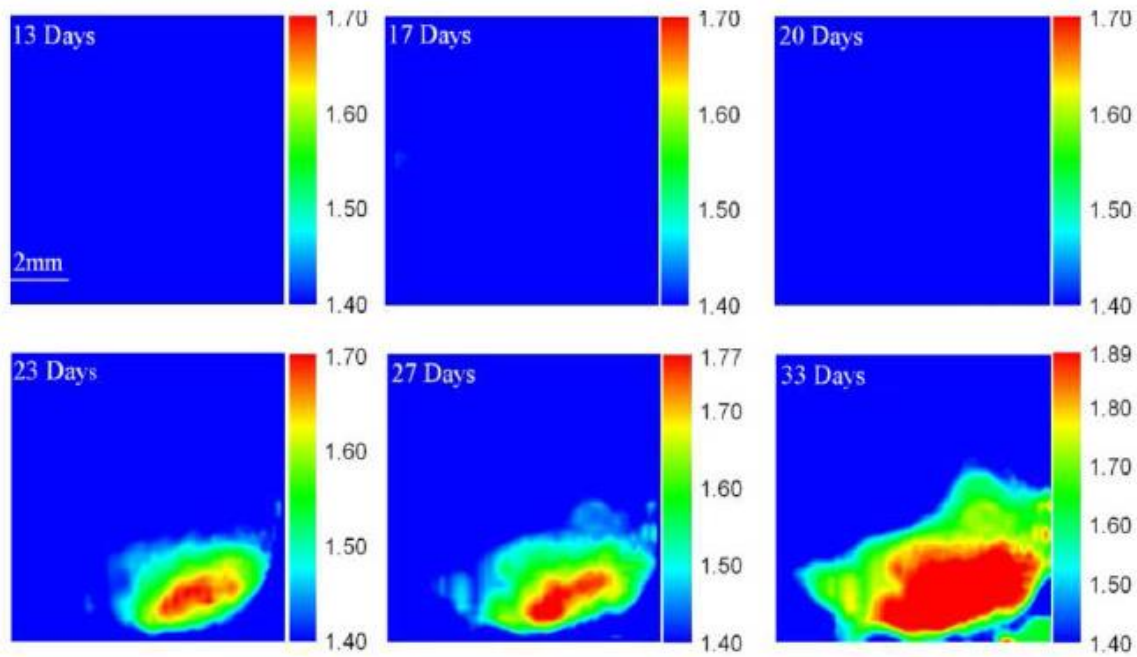


Figure 5. Suivi de l'évolution d'une tumeur implantée chez une souris par imagerie TeraHertz in vivo. La tumeur a été implantée dans un environnement lipidique [20].

2.2.2. Génération d'ondes aux fréquences TeraHertz

Approche électronique

Globalement, l'approche électronique pour la génération d'ondes aux fréquences THz repose sur le déplacement haute fréquence des charges électriques mobiles situées dans les matériaux utilisés, c'est-à-dire qu'elle se base sur le transport des électrons au sein des matériaux.

Divers composants électroniques générant des oscillations, autonomes ou non, peuvent être employés. Citons les oscillateurs à base de diodes Gunn, qui permettent d'atteindre des fréquences de l'ordre de 400-500 GHz (0.4-0.5 THz) ou encore ceux à base de diodes à effet tunnel résonnant (RTD), impliquant le passage d'un puit quantique par les électrons par effet tunnel [21]. Les fréquences pouvant être atteintes par les diodes à effet tunnel résonnant peuvent quant à elle atteindre jusqu'à 1 THz [21]. Ces deux types d'oscillateurs autonomes permettent une génération directe de l'onde térahertz suite à une application d'une différence de potentiel aux bornes de leurs composants électroniques.

D'autres systèmes plus complexes existent pour la génération indirecte d'ondes aux fréquences THz. Il s'agit de systèmes fonctionnant par conversion de fréquence impliquant l'utilisation de guides d'ondes. Des multiplieurs (*multiplexer*) aux fréquences sub-THz et THz sont ainsi réalisables à l'aide de diodes Schottky (jonction métal/ semi-conducteur) couplées à des guides d'ondes [21]. L'association en cascade de ces multiplieurs permet d'atteindre jusqu'à 2.7 THz [21]. Ce mode de travail est notamment celui des analyseurs de réseaux vectoriels (VNA, *Vectorial Network Analyzer*).

Toutefois, l'ensemble de ces composants électroniques permet généralement de travailler dans la bande inférieure du spectre THz car ils sont limités par les temps de transit et les effets capacitifs [22]. D'autres types de composants permettent un fonctionnement dans la partie supérieure du spectre. Il s'agit de composants optiques basés sur l'émission de photons.

Approche optique

La génération de fréquences dans la partie haute du spectre THz peut mettre à profit la transition d'électrons entre différentes bandes énergétiques. L'énergie perdue par l'électron lors de la transition s'accompagne de l'émission d'un photon dont la fréquence lui est directement proportionnelle ($\Delta E = hf$, avec h constante de Planck). Les diodes LASER permettent cette émission pour la formation d'un faisceau optique. Plusieurs variantes LASER peuvent être citées pour la génération de fréquences THz. Citons le LASER à cascade quantique (QCL pour *Quantum Cascade Laser*) [1,23] ou encore le LASER à électrons libres (FEL pour *Free Electron Laser*) [1]. Rappelons en outre que le premier QCL THz démontré en 2001 a permis d'atteindre une fréquence de 4.4 THz [24].

Approche hybride : spectroscopie térahertz en domaine temporel (THz-TDS)

La spectroscopie THz en domaine temporel est probablement la technique la plus répandue à l'heure actuelle. Son principe repose sur l'utilisation d'impulsions LASER de l'ordre de quelques dizaines de femtosecondes qui vont d'abord servir à l'excitation d'un matériau semi-conducteur (typiquement de type GaAs), générant ainsi l'émission d'une onde THz pouvant être guidée ou rayonnée⁸ (Figure 6) [25-27]. Le semi-conducteur d'émission est polarisé par

⁸ La fréquence de l'onde électromagnétique générée est régie par le temps de l'impulsion LASER selon une dualité temps-fréquence.

une tension continue et impacté par le faisceau d'excitation. L'onde THz se propage ensuite vers l'échantillon puis polarise un deuxième semi-conducteur (patch GaAs ou ZnTe) impacté par le faisceau de détection. Le courant généré est alors détecté et le signal reconstruit par échantillonnage. Les ondes incidentes et transmises (ou réfléchies) par l'échantillon sont analysées par transformée de Fourier pour remonter aux propriétés d'absorption ou de réflexion de celui-ci en fonction de la fréquence.

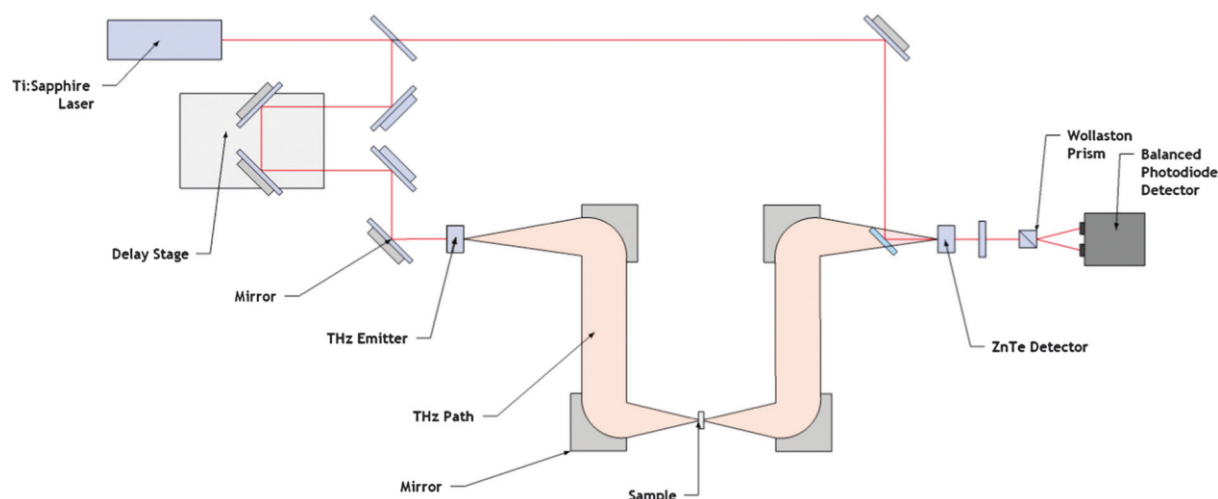


Figure 6. Représentation schématique d'un système de mesure pour la spectroscopie TeraHertz en domaine temporel (THz-TDS) [1].

2.2.3. Phénomènes résonants et variétés des modes : activité spectroscopique

Interaction onde TeraHertz-molécule

Les réponses mécaniques des molécules exposées à des rayonnements électromagnétiques diffèrent selon les fréquences auxquelles elles sont soumises. Ainsi, entre les fréquences caractéristiques des micro-ondes et celles de l'infrarouge, des phénomènes de rotations et vibrations moléculaires sont susceptibles de se manifester (Figure 7).

L'excitation de liaisons intra- et intermoléculaires de faibles énergies comme les liaisons hydrogène offre la possibilité d'étudier la dynamique de milieux liquides mais aussi les modes conformationnels et la dynamique structurale de molécules (Figure 8). Appliquée à la biologie, la spectroscopie THz ouvre ainsi la voie à l'étude de phénomènes variés tels que l'hybridation de l'ADN [16] ou l'hydratation de biomolécules et la conformation de protéines [18,28-33]

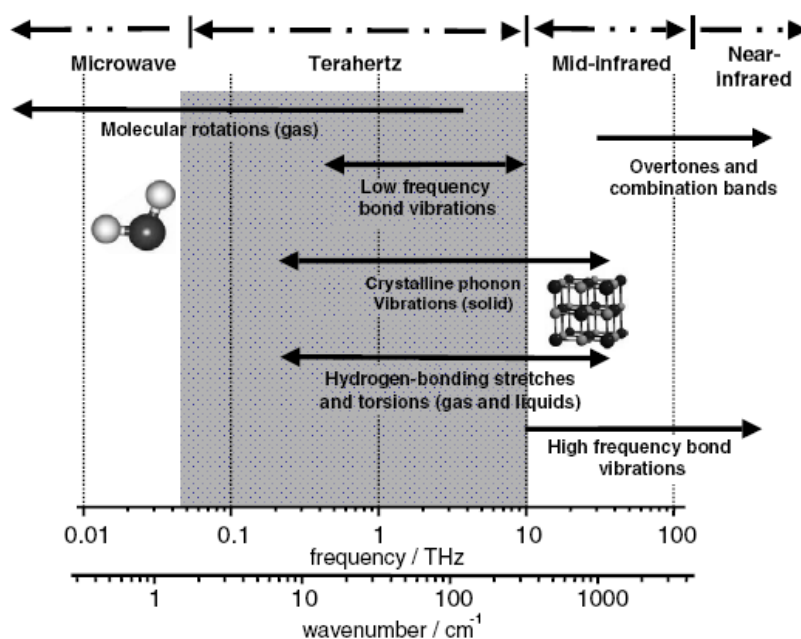


Figure 7. Modes et activités moléculaires dans la gamme de fréquence TeraHertz [7].

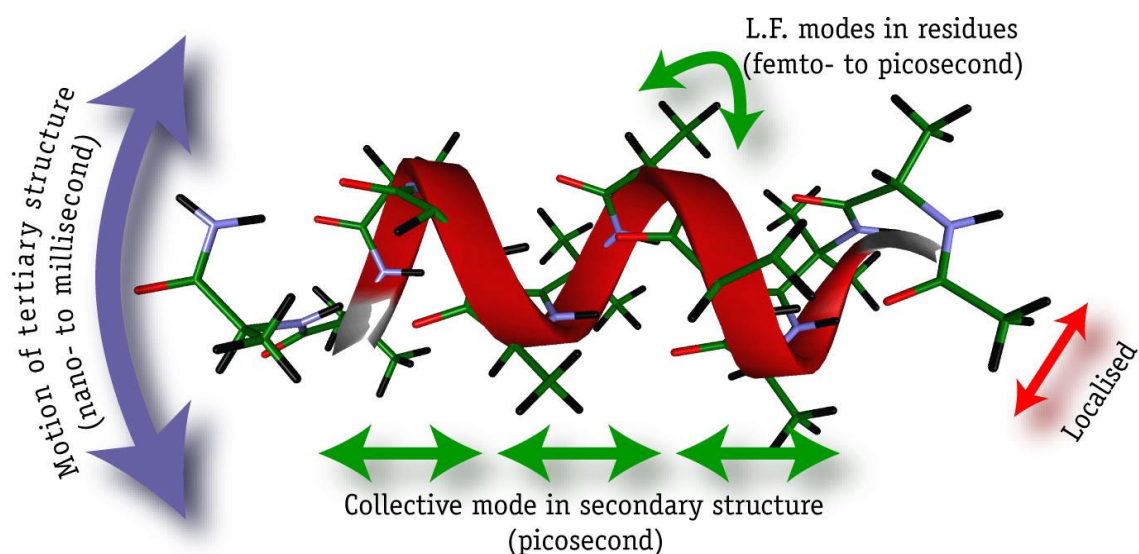


Figure 8. Schéma représentant les modes variés de la dynamique d'une macromolécule et leur échelle de temps approximative. Les modes de vibration basses fréquences intra- et intermoléculaires représentés en vert sont susceptibles d'être sondés aux fréquences TeraHertz (THz). La détection des modes vibrationnels localisés dans des groupes fonctionnels, représentés par une flèche rouge, relève plutôt du domaine infrarouge (IR) [34].

Etude de la conformation moléculaire et de l'hydratation de protéines

S'il est un fait bien établi que l'hydratation d'une protéine joue un rôle majeur dans l'expression de sa fonction [35], l'étude de la dynamique de l'eau qui l'entoure ouvre une nouvelle fenêtre

sur la compréhension des phénomènes permettant à une protéine d'assumer sa fonction. L'eau fortement liée aux protéines, dite eau de structure, participe en effet de façon cruciale à leur dynamique conformationnelle [36,37]. Cette couche d'eau qui enveloppe toute molécule, couche d'hydratation, forme un réseau dynamique autour d'elle (Figure 9) [31,36]. Il semblerait que ce réseau et que le nombre de molécules d'eau qui le compose soient spécifiques à chaque protéine, à chacune des conformations qu'elle peut adopter mais également sensible à une mutation au niveau de la structure primaire de celle-ci [18,38,39]. Ainsi, en sondant l'hydratation, c'est-à-dire l'enveloppe de solvant entourant une protéine, il devient potentiellement possible de :

- discriminer des protéines différentes dont les enveloppes diffèrent ;
- discriminer différentes conformations d'une même protéine, chacune possédant sa propre enveloppe.

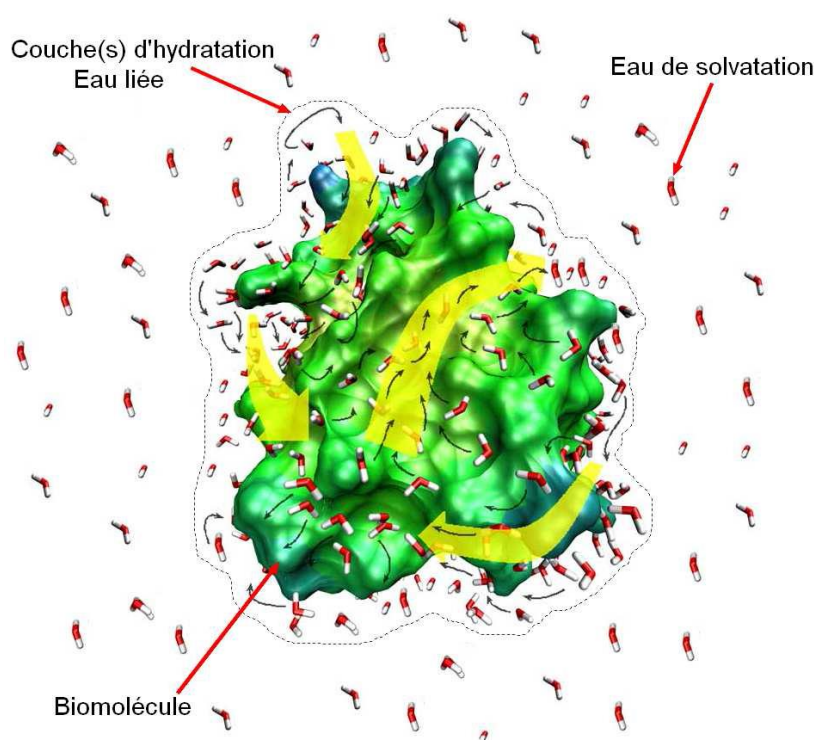


Figure 9. Couche(s) d'hydratation d'une (bio)molécule en milieu aqueux. La dynamique des molécules d'eau et des liaisons hydrogène est représentée par les flèches noires et la dynamique structurale de la macromolécule par les flèches jaunes [38] (modifié, repris de [41]).

La discrimination par spectroscopie THz entre « eau de liaison » et « eau de solvation » semble être permise par une différence d'absorption entre ces environnements. Cette différence peut s'expliquer par des niveaux d'enthalpie des liaisons hydrogène qui sont très probablement différents en fonction de la position approximative de ces dernières par rapport à la

macromolécule, c'est-à-dire à leur localisation (au sein de l'eau d'hydratation ou dans l'eau de solvation dite « *bulk* ») [40]. Tout élément biologique dissous en milieu aqueux pourrait donc être détecté grâce à la spécificité de son enveloppe, ce qui offre potentiellement une spécificité de détection sans précédent. Cette voie est l'une des plus prometteuses en ce qui concerne l'application de la spectroscopie THz en biologie.

La détection de l'interaction avidine-biotine réussie par Menikh A. montre qu'il est aussi possible d'étendre la détection d'une molécule à celle du complexe qu'elle peut former avec une autre molécule [17]. De cette façon, une réaction biocatalytique peut potentiellement être sondée grâce à la dynamique conformationnelle très importante qu'elle établit. Les événements mis en jeu devraient alors permettre la détection d'une telle réaction. Cependant, la sensibilité caractéristique de la spectroscopie THz aux liaisons chimiques de faible énergie impose des stratégies de mesure particulières.

2.2.4. Mesures en phase liquide : spectroscopie TeraHertz appliquée aux milieux aqueux

Sensibilité d'analyse : limitations

Le domaine THz est très sensible à la présence de liaisons de faibles énergies. Avec une enthalpie de liaison de quelques kilojoules jusqu'à une quarantaine de kilojoules par mole, c'est le cas des liaisons hydrogène. De type dipôle-dipôle, ces liaisons non covalentes jouent un rôle primordial dans la structure et les propriétés de l'eau, solvant biologique par excellence. Ainsi, les investigations en milieu aqueux deviennent très vite délicates dans la mesure où les liaisons hydrogènes y sont extrêmement abondantes. La forte absorption de l'eau génère des contraintes notables sur l'instrumentation THz : l'atténuation en puissance de l'onde transmise peut être très élevée (Figure 10). C'est pourquoi le développement de cette spectroscopie s'est d'abord consacré à l'analyse d'échantillons secs et déshydratés. C'est le cas des travaux de Markelz *et al.* où des protéines ont été analysées à l'état de poudre jusqu'à 2.4 THz. Les mesures sur banc de type TDS combinées à des investigations en dynamique moléculaire ont permis d'étudier les variations de conformation de la bactério-rhodopsine (protéine dont la conformation est sensible à l'éclairement qu'elle reçoit) [42]. Toutefois, la forte absorption par les milieux aqueux constitue un obstacle qui n'est pas insurmontable pour l'analyse d'échantillons liquides.

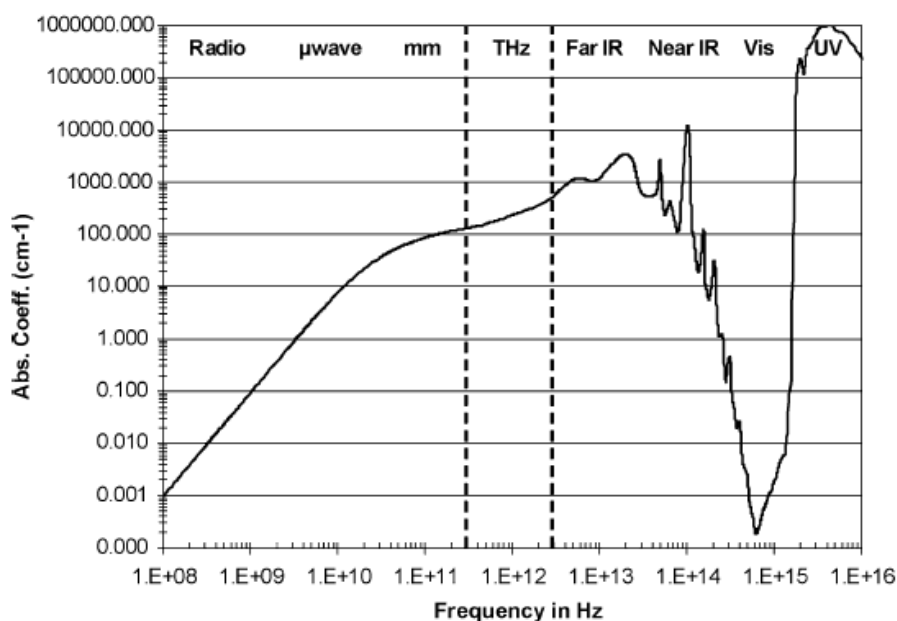


Figure 10. Coefficient d'absorption de l'eau à 292K en fonction de la fréquence [22].

Stratégies de mesure en milieu liquide

Différentes stratégies de mesure en milieu liquide se présentent afin de surmonter la forte absorption des ondes THz par l'eau :

- *l'analyse des échantillons par réflexion*, permettant de s'affranchir du caractère hautement absorbant de la solution mais dont l'extraction des informations demeure assez complexe ;
- *l'utilisation de faisceau TeraHertz de forte puissance*, approche notamment adoptée par le groupe de M. Havenith [10,18,30-32,38,39] ;
- *la diminution du volume des échantillons*, permettant l'utilisation de sources de faible puissance ainsi que des analyses en transmission.

Dans le troisième cas, des approches originales et innovantes peuvent être mentionnées. L'idée de créer de fines cavités (d'une centaine de micromètres) contenant le liquide à sonder a notamment été proposée par Kindt et Schmuttenmaer [43]. Selon cette approche, Cooksey *et al.* ont réussi à synthétiser des micelles inverses (nano-poches de solution aqueuse) au sein d'un solvant apolaire, l'heptane, transparent aux fréquences THz [44].

La distinction entre différentes conformations d'une même protéine a pu être observée par Yoneyama *et al.* en milieu liquide [45]. Des échantillons de BSA (*Bovine Serum Albumin*)

native et dénaturée ont pu être discriminés en comparant les spectres d'absorption entre 0.5 et 3 THz. L'expérience a été menée par spectroscopie TDS en plaçant les échantillons aqueux à analyser dans des puits de 100µL. Cette expérience montre qu'il est certainement possible de sonder les variations de conformation d'un enzyme impliqué dans l'acte catalytique.

Pour réduire l'influence de l'eau, une autre approche utile est celle des microsystèmes microfluidiques permettant de réduire les volumes d'analyse et ainsi d'augmenter la transmission du signal. L'intérêt d'utiliser des microcanaux est justifié par plusieurs points par George *et al.* [46] :

- l'utilisation de sources de faibles puissances pour la mesure en transmission ;
- l'analyse en temps réel ;
- l'intégration dans des plateformes d'analyse multiparamétrique.

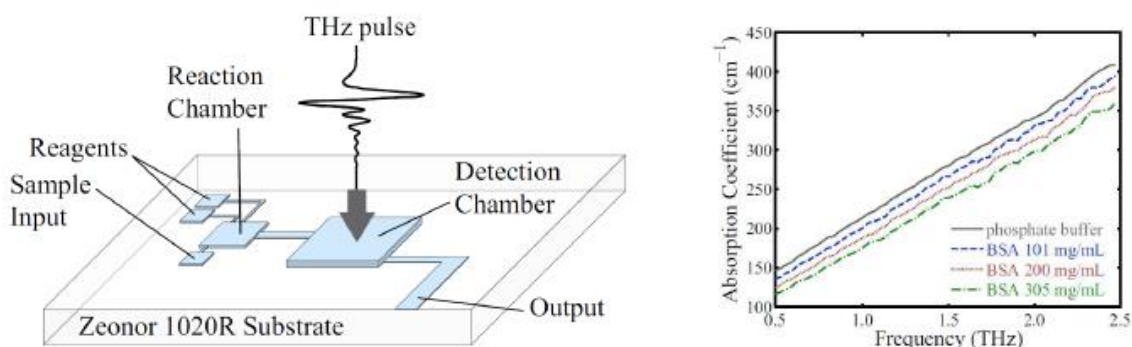


Figure 11. Dispositif expérimental pour la spectroscopie TeraHertz en environnement microfluidique et absorption de solutions de BSA (Bovine Serum Albumine) de différentes concentrations pour des fréquences allant de 0.5 à 2.5 THz [46].

Différents systèmes microfluidiques ont été mis au point pour la détection et l'analyse THz d'échantillons biologiques et en particulier de protéines. Un faisceau THz peut être focalisé sur une cavité microfluidique (Figure 11) [46,47]. Autrement, un guidage de l'onde au sein du dispositif peut être préféré à sa propagation/ focalisation en espace libre. Cette approche va dans le sens d'une intégration plus poussée des outils spectroscopiques. Des guides d'ondes métalliques peuvent notamment être employés [48,49]. La co-intégration des fonctions de guidage électromagnétique et de circulation microfluidique est un point important dans la réalisation de (bio)capteurs ou de systèmes d'analyse performants de type « laboratoire sur puce ». Ces enjeux ont fait l'objet d'efforts importants dans notre équipe de recherche

[40,50,51]. Par ailleurs, une étude préliminaire confirme que le suivi en temps réel d'une réaction enzymatique est possible [52].

La conception de dispositifs d'analyse au format microfluidique est donc essentiellement basée sur la miniaturisation de contrôle des fluides mais aussi des systèmes de propagation des ondes électromagnétiques. Originales, ces nouvelles approches font partie intégrante de l'avènement des bio-microsystèmes.

Références

- [1] McIntosh A. I., Yang B., Goldup S. M., Watkinson M., Donnan R. S., "Terahertz spectroscopy: a powerful new tool for the chemical sciences?", *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2012, 2072–2082.
- [2] Federici J. F., Schulkin B., Huang F., Gary D., Barat R., Oliveira F., Zimdars D., "THz imaging and sensing for security applications-explosives, weapons and drugs", *Semicond. Sci. Technol.*, **20**, 2005, S266–S280.
- [3] Appleby R., Wallace Bruce H., "Standoff detection of weapons and contraband in the 100 GHz to 1 THz region", *IEEE Trans. Antenn. Propag.*, **55**, 2944–2956 2007.
- [4] Wietzke S., Jansen C., Rutz F., Mittleman D. M., Koch M., "Determination of additive content in polymeric compounds with terahertz time-domain spectroscopy", *Polym. Test.*, **26**, 2007, 614–618.
- [5] Wietzke S., Jördens C., Baudrit B., Bastian M., Koch M., "Terahertz imaging: a new non-destructive technique for the quality control of plastic weld joints", *J. Eur. Opt. Soc. – Rapid Publications*, **2**, 2007, 07013.
- [6] Smye S. W., Chamberlain J. M., Fitzgerald A. J., Berry E., "The interaction between terahertz radiation and biological tissue", *Phys. Med. Biol.*, **46**, 2001, R101–R112.
- [7] Pickwell E., Wallace V. P., "Biomedical applications of terahertz technology", *J. Phys. D Appl. Phys.*, **39**, 2006, 301–310.
- [8] Siegel P. H., "Terahertz technology in biology and medicine", *IEEE Trans. Microw. Theory Techniques*, **52**, 2004, 2438–2447.
- [9] Plusquellic D. F., Siegrist K., Heilweil E. J., Esenturk O., "Applications of terahertz spectroscopy in biosystems", *ChemPhysChem*, **8**, 2007, 2412–2431.
- [10] Arora A., Luong T. Q., Krüger M., Kim Y. J., Nam C.-H., Manz A., Havenith M., "Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution", *Analyst*, **137**, 2012, 575–579.
- [11] Pickwell E., Cole B., Fitzgerald A. J., Pepper M., Wallace V. P., "In vivo study of human skin using pulsed terahertz radiation", *Phys. Med. Biol.*, **49**, 2004, 1595–1607.
- [12] Fitzgerald A. J., Wallace V. P., Mercedes J.-L., Bobrow L., Pye R. J., Purushotham A. D., Arnone D. D., "Terahertz pulsed imaging of human breast tumors", *Radiology*, **239**, 2006, 533–540.

- [13] Knobloch P., Schildknecht C., “Medical terahertz imaging: an investigation of histopathological samples”, *Phys. Med. Biol.*, **47**, 2002, 3875–3884.
- [14] Nagai N., Kumazawa R., Fukasawa R., “Direct evidence of intermolecular vibrations by terahertz spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.*, **413**, 2005, 495–500.
- [15] Drouin B. J., Maiwal F. W., “Extended THz measurements of nitrous oxide, N₂O”, *J. Mol. Spectrosc.*, **236**, 2006, 150–152.
- [16] Nagel M., Richter F., Kurz H., “A functionalized THz sensor for marker-free DNA analysis”, *Phys. Med. Biol.*, **46**, 2003, 3625–3636.
- [17] Menikh A., “Label-free amplified bioaffinity detection using terahertz wave technology”, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2004, 658–662.
- [18] Born B., Kim S. J., Ebbinghaus S., Gruebele M., Havenith M., “The terahertz dance of water with the proteins: the effect of protein flexibility on the dynamical hydration shell of ubiquitin”, *Faraday Discuss.*, **141**, 2009, 161–173.
- [19] Yu C., Fan S., Pickwell-McPherson F., “The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: a review of investigations to date”, *Quant. Imaging Med. Surg.*, **2**, 2012, 33–45.
- [20] Chen H., Chen T.-H., Tseng T.-F., Lu J.-T., Kuo C.-C., Fu S.-C., Lee W.-J., Tsai Y.-F., Huang Y.-Y., Chuang E. Y., Hwang Y.-J., Sun C.-K., “High-sensitivity *in vivo* THz transmission imaging of early human breast cancer in a subcutaneous xenograft mouse model”, *Opt. Express*, **19**, 2011, 21552–21562.
- [21] Chattopadhyay G., “Technologies, capabilities and performance of low power terahertz sources”, *IEEE Trans. Terahz Sci. Technol.*, **1**, 2011, 33–53.
- [22] Siegel P. H., “Terahertz technology”, *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, **50**, 2002, 910–928.
- [23] Capasso F., Gmachl C., Sivco D. L., Cho A. Y., “Quantum cascade lasers”, *Physics Today*, **5**, 2002, 34–40.
- [24] Kohler L., Tredicucci A., Beltram F., Beere H. E., Linfield E. H., Davies A. G., Ritchie D. A., Iotti R. C., Rossi F., “Terahertz semiconductor-heterostructure laser”, *Nature*, **417**, 2002, 156–159.
- [25] Tonouchi M., “Cutting-edge terahertz technology”, *Nature Photonics*, **1**, 2007, 97–105.
- [26] Ferguson B., Zhang X.-C., “Materials for terahertz science and detection”, *Nature Materials*, **1**, 2002, 26–33.
- [27] Schmuttenmaer C., “Exploring dynamics in the far-infrared with terahertz spectroscopy”, *Chem. Rev.*, **104**, 2004, 1759–1779.
- [28] Kitagawa J., Ohkubo T., Onuma M., Kadoya Y., “Thz spectroscopic characterization of biomolecule/ water systems by compact sensor chips”, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 2006, 041114.
- [29] Xu J., Plaxco K. W., Allen S. J., “Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy”, *Protein Sci.*, **15**, 2006, 1175–1181.
- [30] Heugen U., Schwaab G., Bründermann E., Heyden M., Yu X., Leitner D., Havenith M., “Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2006, 12301–12306.

- [31] Ebbinghaus S., Kim S. J., Heyden M., Yu X., Heugen U., Gruebele M., Leitner D. M., Havenith M., "An extended dynamical hydration shell around proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 20047, 20749–20752.
- [32] Leitner D. M., Gruebele M., Havenith M., "Solvation dynamics of biomolecules: modeling and terahertz experiments", *HSFP J.*, **2**, 2008, 314–324.
- [33] Sinha S. K., Chakraborty S., Bandyopadhyay S., "Thickness of the hydration layer of a protein from molecular dynamics simulation", *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2008, 8203–8209.
- [34] "Opportunities in THz science", Editeurs : Scherwin M. S., Schmittenmaer C. A., Bucksbaum Arlington P. H., Rapport de *DOE-NSF-NIH Workshop*, Février 2004, 124 pages.
- [35] Fenimore P. W., Frauenfelder H., McMahon B. H., Young R. D., "Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2004, 14408–14413.
- [36] Zhang L. Y., Wang L. J., Kao Y. T., Qiu W. H., Yang Y., Okobiah O., Zhong D. P., "Mapping hydration dynamics around a protein surface", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2007, 18461–18466.
- [37] Ball P., "Water as an active constituent in cell biology", *Chem. Rev.*, **108**, 2008, 74–108.
- [38] Born B., Havenith M., "Terahertz dance of proteins and sugars with water", *J. Infrared Milli. Terahz Waves*, **30**, 2009, 1245–1254.
- [39] Ebbinghaus S., Kim S. J., Heyden M., Yu X., Gruebele M., Leitner D. M., Havenith M., "Protein sequence- and pH-dependent hydration probed by terahertz spectroscopy", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 2008, 2374–2375.
- [40] Laurette S., "Métrologie TeraHertz des liquides par microsystème microfluidique", *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 20 Novembre 2012, 203 pages.
- [41] Abbas A., "Fabrication et fonctionnalisation de BioMEMS par plasma froid pour l'analyse de al biocatalyse en spectroscopie TeraHertz", *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 27 octobre 2009, 135 pages.
- [42] Markelz A., Whitemire S., Hillebrecht J., Birge R., "THz time-domain spectroscopy of biomolecular conformational mode", *Phys. Med. Biol.*, **47**, 2002, 3797–3805.
- [43] Kindt J. T., Schmittenmaer C. A., "Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy", *J. Phys. Chem.*, **100**, 1996, 10373–10379.
- [44] Cooksey C. C., Greer B. J., Heilweil E. J., "Terahertz spectroscopy of 1-proline in reverse aqueous micelles", *Chem. Phys. Lett.*, **467**, 2009, 424–429.
- [45] Yoneyama H., Yamashita M., Kasai S., Kawase K., Ueno R., Ito H., Ouchi T., "Terahertz spectroscopy of native conformation and thermally denatured bovine serum albumin (BSA)", *Phys. Med. Biol.*, **53**, 2008, 3543–3549.
- [46] George P. A., Hui W., Rana F., Hawkins B. G., Smith A. E., Kirby B. J., "Microfluidic devices for terahertz spectroscopy of biomolecules", *Opt. Express*, **16**, 2008, 1577–1582.
- [47] Baragwanath A. J., Swift G. P., Gallant A. J., Chamberlain J. M., "Silicon based microfluidic cell for terahertz frequencies", *J. Appl. Phys.*, **108**, 2010, 013102.

- [48] Mendis R., Astley V., Liu J., Mittleman D. M., “Terahertz microfluidic sensor based on a parallel-plate waveguide resonant cavity”, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 2009, 171113.
- [49] Matvejev V., De Tandt C., Ranson W., Stiens J., Vounckx R., Mangelings D., “Integrated waveguide structure for highly sensitive terahertz spectroscopy of nano-liter liquids in capillary tubes”, *Prog. Electromagn. Res.*, **121**, 2011, 89–101.
- [50] Treizebre A., “BioMEMS Terahertz pour l’étude du trafic informationnel de cellules biologiques”, *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 6 Décembre 2007, 233 pages.
- [51] Laurette S, Treizebre A., Bocquet B., “Co-integrated microfluidic and THz functions for biochip devices”, *J. Micromech. Microeng.*, **21**, 2011, 065029.
- [52] Abbas A., Treizebre A., Supiot P., Bourzgui N.-E., Guillochon D., Vercaigne-Marko D., Bocquet B., “Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis”, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2009, 154–160.

2.3. La technologie MEMS au service de la chimie et de la biologie

Dans ce chapitre sont exposées les avancées majeures qu'offrent les dispositifs miniaturisés microfabriqués. Après quelques rappels historiques et des principes fondamentaux de la microfluidique, les aspects généraux de microfabrication sont exposés et les applications majeures des microsystèmes microfluidiques en chimie-biologie sont présentées. Un accent est porté sur l'usage des microréacteurs, notamment en génie enzymatique. Enfin, les opportunités d'utilisation de ces dispositifs comme outils de production sont posées.

2.3.1. Miniaturisation et fluidique

Les avancées technologiques spectaculaires de la microélectronique de ces dernières décennies ont permis une automatisation à grande échelle de fonctions comme les calculs. L'intégration croissante de composants réduits à l'extrême a démontré ses bénéfices en termes de performance. Pour preuve, la dimension critique de transistors recule constamment alors que, dans le même temps, leur intégration au sein de puces électroniques augmente sans cesse [1]. La recherche de la miniaturisation n'est cependant pas bornée aux dispositifs électroniques ou mécaniques. Elle s'étend à différents domaines pour lesquels miniaturiser un système serait susceptible d'en augmenter les performances.

En 2001, K. F. Jensen pose la question : « *Microreaction engineering – is small better?* » [2]. Cette question s'accompagne d'une foule de considérations à prendre en compte dont la première est sans doute de prédire le comportement de fluides au sein de telles structures. La miniaturisation d'un système d'écoulement repose en effet sur des phénomènes dépendant d'une physique différente du monde dit macroscopique. Une image inspirée d'un dessin animé célèbre illustre bien la prépondérance des forces associées à ce changement d'échelle (Figure 12). Le dessin représente l'effort important que doit développer une fourmi pour libérer sa camarade emprisonnée dans une bulle. A l'échelle de celle-ci, les forces capillaires sont très importantes par rapport aux forces musculaires que l'animal peut développer [3]. Dans cet esprit, on conçoit également que certains insectes sont capables de marcher sur l'eau.

La mécanique des fluides à l'échelle microscopique a pris le nom de microfluidique, dont le sens peut être en partie donné par la définition de G. M. Whitesides qui la décrit comme « la science et la technologie des systèmes qui manipulent de petits volumes de fluides en utilisant des canaux de la dimension de quelques dizaines de micromètres » [4]. Si cette définition ne

fait pas rigoureusement mention de la variété des applications microfluidiques, elle expose néanmoins ses enjeux principaux : la miniaturisation des systèmes, existants ou non (la microfluidique a donnée naissance à des applications spécifiques liées à ses caractéristiques), mettant en jeu la fonction microfluidique, ainsi que la manipulation de fluides à des échelles spatiales qui rivalisent avec la taille de circuits microélectroniques. La vitalité de cette discipline peut s'expliquer par la diversité de ses applications. Ses propriétés sont naturellement exploitées en sciences expérimentales mais également quotidiennement dans des objets relativement usuels comme des capteurs de gaz ou les imprimantes à jets d'encre [5]. En réalité, la pluralité des sujets se retrouve dès les premières réalisations microfluidiques qui datent de la fin des années 1970.

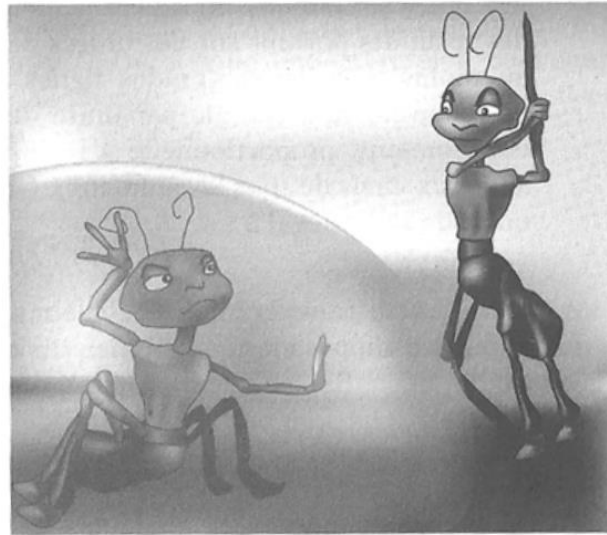


Figure 12. Illustration humoristique de l'importance des forces capillaires avec le changement d'échelle [3].

Il est difficile de désigner tel ou tel système comme étant le premier circuit microfluidique jamais fabriqué. Néanmoins, deux systèmes apparaissent régulièrement comme des ancêtres : le microsystème réfrigérant fabriqués par Little en 1978 [6,7] et le système chromatographique réalisé par Terry en 1979 [8]. Vingt ans plus tard, le développement de la microfluidique s'est étendu à divers disciplines en brisant les cloisonnements qui pouvaient exister entre technologues, fondamentalistes et expérimentateurs. Ironiquement, alors que des structures microfluidiques complexes telles que des accéléromètres avaient déjà été réalisées, ce fut grâce à la redécouverte de simples microcanaux que la microfluidique s'est étendue à la chimie et la biologie dans les années 1990.

Le succès récent de la microfluidique poursuit celui rencontré par les analyses au format capillaire en conduisant à une miniaturisation encore plus poussée apportant divers bénéfices, autant dans le domaine analytique que dans celui du génie des procédés. Les bénéfices les plus évidents semblent être :

- le travail sur des microvolumes d'échantillons, autorisant une portabilité des unités et pouvant se révéler d'un grand secours quant à la rareté ou la disponibilité en quantité suffisante pour une analyse classique⁹ ;
- l'intégration potentiellement importante de fonctions avancées couvrant par exemple le mélange, l'analyse *in situ* ou encore le pompage, réduisant ainsi le besoin ou les étapes d'intervention humaine dans la préparation ou l'analyse d'échantillons et par là même les problèmes de contamination, de fiabilité et de risques sécuritaires ;
- une sensibilité d'analyse potentiellement améliorée par la réduction de la taille des sondes aux dimensions de l'espèce cible, par la possibilité d'investiguer à une échelle de temps plus fine et à une échelle spatiale pouvant atteindre la cellule unique par confinement ;
- des phénomènes de transfert massique et thermique pouvant être très largement améliorés et mieux maîtrisés grâce aux propriétés physiques inhérentes à la miniaturisation ;
- une réduction potentielle du coût et du temps des opérations, pouvant notamment être permis par la possibilité de paralléliser les unités.

Notons par exemple que la combinaison de certains de ces avantages peut générer de nouvelles applications, de nouveaux procédés ou encore des protocoles innovants. A titre d'exemple, *Brouzes et al.* ont mis au point une technologie basée sur la microfluidique discrète (mise en mouvement de gouttes) afin de réaliser du *screening* à haut débit (*High Throughput Screening HTS*) de cellules uniques [9]. On peut aussi citer Kaigala *et al.*, qui rapportent l'intérêt de techniques microfluidiques pour accéder à la surface de microenvironnements biologiques qu'ils nomment des « interfaces biologiques » [10].

Globalement, la microfluidique représente un outil pouvant être associé au développement de trois axes : (i) l'étude fondamentale de phénomènes physiques, chimiques ou biologiques avec une haute précision et sous une forte résolution spatio-temporelle, (ii) la création de systèmes

⁹ Le cas peut par exemple se présenter en paléontologie, génie génétique ou médecine légale.

d'analyse chimique ou biologique, (iii) la conception de plateformes dédiées à mener des réactions (bio)catalytiques nécessitant des conditions particulières ou une intensification de procédés. De plus, les nombreux progrès réalisés dans ces domaines poussent fortement les technologies microfluidiques à répondre à un nouveau besoin de dépôt, de structuration ou encore de matriçage (*patterning*) de biomolécules et d'éléments biologiques à l'échelle micro-voire nanométrique. Le développement récent de cet axe vise à élargir les techniques disponibles pour travailler à cette échelle, dont certaines sont rappelées par Tran *et al.* [11]. La plupart des approches basées sur la microfluidique restent relativement nouvelles [12-14], la plus connue est peut-être l'impression de type « jet d'encre » (*inkjet*) [13,14].

Micro- et nanofluidique se distinguent cependant de la millifluidique, bien connue dans certaines analyses au format capillaire, par la prépondérance d'une physique différente, marquée par un régime d'écoulement laminaire et des effets de surface très marqués. Quelques éléments de base de l'hydrodynamique régissant la microfluidique peuvent être abordés.

2.3.2. Notions d'hydrodynamique des systèmes microfluidiques et nombres adimensionnels

Les dimensions typiques des systèmes microfluidiques sont comprises entre une fraction de micron et le millimètre. Excepté pour les phénomènes de raréfaction des gaz, la physique des microsystèmes ne diffère pas fondamentalement de la physique classique macroscopique. Néanmoins, l'augmentation du rapport *surface sur volume* nécessite de réviser la prépondérance des forces mises en jeu dans de tels systèmes : les phénomènes surfaciques s'intensifient alors que la gravité devient négligeable sur le comportement des fluides [15].

L'ensemble des phénomènes physiques pouvant intervenir dans les microsystèmes est vaste et requiert une description appropriée par un formalisme mathématique. Les détails dans cette section se réduisent uniquement à l'expression de notions fondamentales régissant l'hydrodynamique dans les microsystèmes microfluidiques.

La première notion fondamentale lorsque l'on traite de microfluidique introduit l'hydrodynamique à bas *nombre de Reynolds* (Re), caractérisant l'écoulement et défini par :

$$Re = \frac{\rho UL}{\eta}$$

où U et L représentent respectivement la vitesse et la longueur caractéristiques de l'écoulement, η et ρ représentant respectivement la viscosité dynamique et la masse volumique du fluide. Il signifie le rapport des forces inertielles vis-à-vis des forces visqueuses. Caractéristique de l'écoulement microfluidique, l'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds simplifie l'équation vectorielle de Navier-Stokes¹⁰

$$\frac{D\mathbf{v}}{Dt} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \Delta \mathbf{u} + \frac{1}{\rho} \mathbf{F}$$

à l'expression suivante, en considérant un écoulement stationnaire,

$$\eta \Delta \mathbf{v} - \nabla p + \mathbf{F} = 0$$

où η est la viscosité dynamique, ν la viscosité cinématique, $\mathbf{v}$ la vitesse d'écoulement du fluide, p la pression dans le fluide et $\mathbf{F}$ une force extérieure par unité de volume. Les rapports d'aspect importants des canaux microfluidiques autorisent une simplification lorsque la largeur w est plus importante que la hauteur h , ce qui est régulièrement le cas. Ainsi, dans le cas où aucune force extérieure $\mathbf{F}$ ne s'applique au système, la résolution de l'équation précédente permet d'apprécier le débit Q , donné par la relation :

$$Q = -\frac{h^3 w}{12\eta} \nabla p$$

ce qui correspond à une vitesse moyenne $\mathbf{v}_0$:

$$\mathbf{v}_0 = -\frac{h^2}{12\eta} \nabla p$$

où ∇p traduit le gradient de pression uniforme sur toute la longueur du canal. La relation de l'écoulement à la variation de pression est analogue à la loi d'Ohm : la tension peut être reliée

¹⁰ Les vecteurs sont indiqués en gras

à la chute de pression et le courant au débit. On parle de résistance fluidique du canal, qui est sensible aux variations de ses dimensions, ce qui a été décrit par Poiseuille. On voit donc que la vitesse moyenne v_0 de l'écoulement est proportionnelle à l'échelle et varie comme le carré de l'épaisseur du canal.

Les écoulements laminaires à faible nombre de Reynolds impliquent généralement l'absence de phénomènes turbulents utiles au phénomène de mélange à l'échelle macroscopique. Le transfert massique dans des microcanaux peut être apprécié par le *nombre de Péclet* (Pe), défini par :

$$Pe = \frac{UL}{D}$$

où U et L représente respectivement une vitesse caractéristique de l'écoulement et une longueur caractéristique du système (relative au trajet diffusionnel des espèces) et D le coefficient de diffusion d'une espèce. Ce nombre sans dimension mesure l'importance relative des termes d'advection vis-à-vis des termes de diffusion. Il montre bien qu'un canal de petite taille limite les phénomènes de transfert par convection au profit de la diffusion. Inversement, plus le nombre de Péclet est grand, plus l'influence de l'écoulement est importante vis-à-vis de la diffusion moléculaire. On comprend ainsi pourquoi des solutions technologiques ont été mises au point pour accélérer les temps de mélange dans le cas de macromolécules à faible diffusivité. En effet, le temps de diffusion d'une espèce (τ) peut être approximativement décrit par la relation :

$$\tau \sim \frac{L^2}{D}$$

où le coefficient de diffusion D est défini par la formule de Stokes-Einstein [16] :

$$D = \frac{kT}{6\pi R\eta}$$

avec k la constante de Boltzmann, T la température, R le rayon du diffuseur (supposé sphérique) et η la viscosité dynamique. Rappelons enfin que, en considérant une assemblée de diffuseurs, la loi fondamentale reliant le flux J d'une espèce au gradient s'exprime par la relation :

$$\mathbf{J} = -D\nabla C$$

qui traduit le mouvement d'un ensemble de « marcheurs browniens », avec C la concentration de l'espèce. C'est la première loi de Fick.

Pour profiter de la spécificité de l'hydrodynamique à l'échelle de la microfluidique, il faut être capable de concevoir des structures de taille micrométrique avec une grande précision. La microfabrication de dispositifs fluidiques à cette échelle se réalise généralement par deux types de techniques, les unes pouvant être qualifiées de « mûres » alors que les autres sont plus récentes.

2.3.3. Stratégies de microfabrication

La microfluidique est historiquement une branche du monde des MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*). De cet héritage, elle a adopté les techniques de microfabrication originellement développées pour la microélectronique au cours des années 1970. L'extension des MEMS aux systèmes fluidiques a été permise par la mise au point de méthodes de gravure profonde et de collage du silicium mais aussi de matériaux comme le verre ou le quartz. La réalisation de circuits microfluidiques étanches par ces procédures emploie des techniques de fabrication qualifiées de *dures*, par opposition aux techniques *douces* qui seront présentées par la suite.

2.3.3.1. Techniques dures

La dénomination de ces techniques provient des matériaux employés, majoritairement le verre et le silicium. Le principe de création des géométries microfluidiques dérive des procédés planaires de la microélectronique. En prenant l'exemple du motif élémentaire de la microfluidique, le canal, il est possible de définir succinctement les étapes de sa création par une technique dure. Elle comprend les étapes qui (i) définissent les dimensions latérales du canal par *photolithographie*, (ii) déterminent la profondeur désirée par *gravure*, (iii) procèdent à d'éventuels *dépôts* (couches minces, matériel biologique ou autre) et (iv) assurent l'étanchéité par *collage* dans le cas d'un canal fermé.

Photolithographie

Elle permet de créer des structures d'épaisseur uniformes dans une résine photosensible déposée sur un substrat que l'on nommera *wafer*, le plus souvent en verre ou silicium. Cette résine est éclairée à travers un masque, plaque généralement en quartz sur laquelle un dépôt de chrome formant le motif a été réalisé. Trois étapes successives sont nécessaires à la création de ces structures :

- *l'enduction de la résine photosensible*, consistant en son étalement uniforme à l'aide d'une « tournette » ou *spin-coater*. Son épaisseur va dépendre de la vitesse de rotation du *wafer* et de la viscosité de la résine. Celle-ci est ensuite chauffée afin d'évaporer le solvant et obtenir une couche solide ;
- *l'insolation*, où le masque définissant les structures désirées est positionné face au *wafer* enduit de résine puis insolé par un faisceau de lumière U.V. traversant le masque. Le flux lumineux initie alors des réactions physico-chimiques dans la résine, qui modifient sa solubilité vis-à-vis de certains solvants. Pour les résines dites positives, les zones éclairées deviennent solubles vis-à-vis d'un certain solvant et peuvent être dissoutes alors que les autres restent insolubles. L'inverse s'applique aux résines négatives (SU8 par exemple) ;
- *le développement*, consistant à la dissolution de la résine insolée dans le cas des résines positives et de la résine non-insolée dans le cas des résines négatives. Les structures finales sont obtenues après rinçage.

Gravure

Les endroits du substrat déterminés à l'issue de l'étape de photolithographie sont attaqués (« creusés ») chimiquement ou physiquement par gravure. Il peut s'agir de gravures humides ou sèches.

Les *gravures humides* sont des procédés d'attaques chimiques en phase liquide. L'attaque de substrats de verre emploie régulièrement l'acide fluorhydrique (HF) comme réactif capable de dissoudre la silice. Les supports de silicium mettent généralement en jeu l'hydroxyde de potassium (KOH). Dans ce cas, la forme du canal dépend préférentiellement de l'orientation cristalline du *wafer* de silicium.

Les *gravures sèches* correspondent à l'attaque d'un substrat par une espèce ionique contenue dans une phase gazeuse, très souvent un plasma. Elles sont détaillées dans la partie 2.4.2.2.1. traitant de l'application des plasmas pour structurer un support par gravure.

Dépôts

Divers dépôts pouvant intervenir avant ou après gravure peuvent être réalisées sur des substrats. Toute sorte de matériaux peut être déposée : des métaux, des isolants, des semiconducteurs, des polymères voire des protéines (impression de type jet d'encre ou *inkjet* par exemple). Une partie massive des techniques de dépôts peut être regroupée en deux catégories que sont les *dépôts physiques* (PVD ou *Physical Vapor Deposition*) et les *dépôts chimiques* (CVD ou *Chemical Vapor Deposition*). Ils sont détaillés succinctement dans la section 2.4.2.2.2. où les dépôts de type CVD prennent une large place.

Collage

Lorsque l'on cherche à obtenir une structure étanche comme un microcanal fermé, l'étape finale consiste à procéder au collage du substrat présentant les sillons creusés par gravure avec une autre pièce, souvent en verre ou en silicium. De façon optimale, l'adhésion doit s'appliquer sur la totalité des surfaces amenées en contact afin de ne présenter aucun espace interstitiel. Les techniques communes comprennent :

- *les colles chimiques* ;
- *le collage anodique*, permettant de coller du verre sur un métal ou semi-métal comme le silicium. Il a lieu à haute température ($\sim 400\text{ }^{\circ}\text{C}$) et consiste à mettre en contact un *wafer* en silicium et un *wafer* en verre en appliquant une différence de potentiel de plusieurs centaines de volts entre eux. Le collage de nature électrostatique est assuré par la migration des ions jusqu'à l'interface où ils forment une couche ;
- *le collage par fusion*, consistant à chauffer deux wafers en silicium ou en verre. L'agitation thermique crée une réorganisation des atomes à l'interface, établissant une interpénétration fine assurant le collage. Les températures de travail peuvent s'étendre entre 300 et 1100 $^{\circ}\text{C}$. L'avantage ici est de pouvoir assembler deux *wafers* en verre pour obtenir un système transparent.

La réalisation de circuits microfluidiques avec une grande précision à base de silicium ou de verre est donc possible par voie dure. Néanmoins, des considérations de coût, d'accessibilité et de rapidité à concevoir de tels systèmes a poussé à imaginer de nouvelles méthodes de fabrication basées sur l'utilisation de matériaux plastiques ou élastomères.

2.3.3.2. Techniques douces

Ces techniques peuvent également servir à concevoir des structures microfluidiques. Elles font intervenir les « *technologies plastiques* », employant des matériaux comme le polycarbonate ou le PMMA (PolyMéthylMéthAcrylate), mais également les « *technologies molles* », mettant à profit des élastomères dont le plus connus est sans doute le PDMS (Poly(DiMéthylSiloxane)).

En fonction des matériaux, les structures peuvent être réalisées suivant une méthode directe employant l'ablation laser ou une méthode de réplique. Cette dernière est une méthode très répandue pour la conception de canaux microfluidiques en PDMS. Elle implique le recours à un moule devant être élaboré par ailleurs et qui présente en relief les structures souhaitées. Le PDMS réticulé et démoulé est ensuite collé à un capot en verre ou en PDMS réticulé. Un collage réversible est possible en utilisant l'affinité existante entre surface de même nature. Un traitement par un plasma d'oxygène favorisera plutôt un collage irréversible mettant en jeu des fonctions covalentes à partir des groupements silanols Si-OH créées par le plasma à la surface du substrat.

En aval du processus de microfabrication apparaissent d'autres aspects techniques de la microfluidique. Parmi eux, les aspects cruciaux de « microplomberie », relevant de la circulation de fluides dans les unités conçues, concernent principalement la connectique ainsi que l'injection des fluides. Ces aspects subtils sont généralement dépendants de l'architecture du dispositif mis au point et donc de son application. Les plus abondantes des applications des microsystèmes microfluidiques sont rappelées ci-après, ainsi que les enjeux de certaines orientations.

2.3.4. Microsystèmes microfluidiques : applications et enjeux

2.3.4.1. Lab on chips, μ TAS, BioMEMS et biocapteurs comme outils d'analyse

Si les premiers développements de miniaturisation ont d'abord concerné les dispositifs électromécaniques ou MEMS, la technologie des systèmes microfabriqués s'est ensuite rapidement étendue aux domaines chimique, biologique et médical en donnant naissance à des divers objets connus sous les noms de *Lab on chips*, *μTAS* (*micro Total Analysis System*) ou encore *BioMEMS* (*Biological MicroElectroMechanical Systems*) (Figure 1). Ils assument principalement une fonction de biocapteur couplée à une fonction microfluidique. Cette dernière peut être plus ou moins complexe si elle intègre la préparation de l'échantillon. Ces dispositifs sont donc habituellement composés d'une partie *microfluidique* contrôlant la manipulation des fluides, d'un *élément biologique* pouvant être intégré au système (immobilisé) ou momentanément introduit pour les besoins de l'analyse, ainsi que d'une *plateforme de détection* plus ou moins complexe selon la nature de l'analyse.

L'explosion de la recherche dans ce segment a entraîné une multiplicité des nomenclatures et des concepts techniques. En réalité, le terme BioMEMS est usuellement utilisé pour désigner et regrouper la grande panoplie de ces outils d'analyse sans en mentionner ni la variété, ni les fonctionnalités (Figure 13). Il est néanmoins possible d'énumérer ces bio-microsystèmes à travers leurs fonctionnalités et le degré d'intégration de leurs composants mécaniques, électroniques ou biologiques, sans ordre d'importance (avec pour certains leur dénomination courante anglo-saxonne) :

- les *micropuces* (*Microarrays*), basées essentiellement sur l'hybridation (brins d'ADN) ou la reconnaissance moléculaire (ligand-récepteur), qui sont généralement détectées par fluorescence sans l'intervention d'un transducteur intégré. Actuellement, beaucoup de développements se font sur des puces à protéines, à lipides ou à saccharides, qui s'ajoutent aux puces à ADN déjà commercialisées ;
- les *micro- et nano-machines* ou *-objets*, pouvant être injectées dans les liquides corporels et ne comportant pas nécessairement une composante biologique mais dont la fonction est d'interagir avec une cible du système vivant ;
- les *dispositifs implantables* (*implantable devices*), microsystèmes bio-hybrides ou artificiels en contact direct avec un organe vivant, interfaces cerveau-machine et systèmes de libération médicamenteuse ;
- les *biocapteurs* (*biosensors*), composés de biorécepteurs immobilisés sur un transducteur qui peut être optique ou plus généralement électromagnétique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique. Le principe de base d'un biocapteur est de transformer une propriété biochimique d'un phénomène

biologique en un signal électrique (Figure 14). L'élément de la couche sensible du biocapteur se veut être un élément biologique comme un enzyme ou encore un anticorps. Un des premiers biocapteurs a été développé en 1950 par Leland Clarke pour mesurer la concentration en oxygène dissout dans le sang grâce à des électrodes fonctionnalisées.

- les laboratoires sur puces (*Lab on chips* et μ TAS), microdispositifs multifonctionnels et plus élaborés qui permettent, selon leur degré d'intégration, une fonction de transduction, mais surtout de préparation des échantillons, séparation, analyse, de culture cellulaire ou tissulaire. En plus du transducteur, ces composants contiennent un système microfluidique gérant les fluides à analyser.

Cette classification n'est évidemment pas statique et de nouveaux dispositifs peuvent naître de l'intégration de plusieurs éléments parmi les précédents ou de leur combinaison avec des systèmes de l'échelle nanométrique pour former des BioNEMS (*Bio-NanoElectroMechanical Systems*).

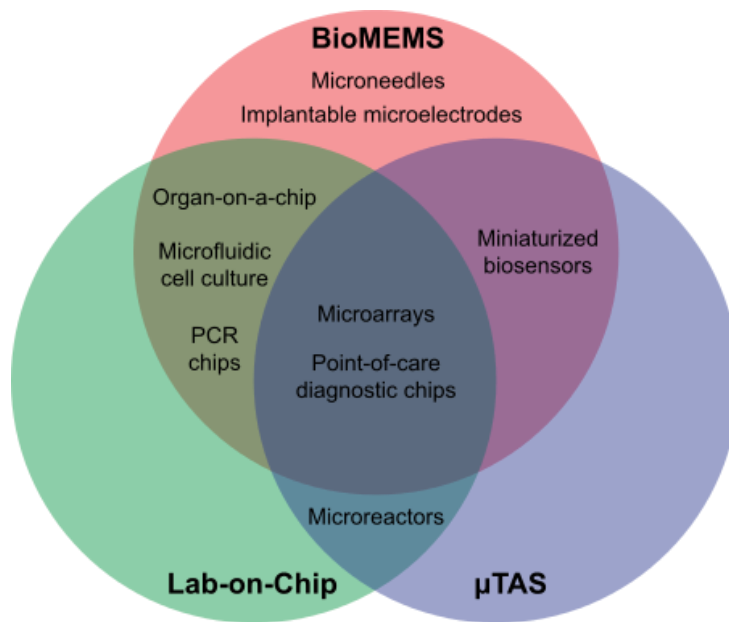


Figure 13. Diagramme de Venn illustrant les différents aspects couverts par les BioMEMS, Lab on chips et μ TAS.

En un peu plus de deux décennies, l'ensemble des bénéfices inhérents aux BioMEMS leur a permis d'investir toutes les structures du vivant, de la biologie moléculaire jusqu'à l'ingénierie tissulaire, en passant par la microbiologie et les manipulations cellulaires. De nombreuses

applications sont d'ores et déjà annoncées dans le secteur médical, en couvrant la thérapie, les organes artificiels ou encore le diagnostic voire l'autodiagnostic, mais aussi dans le secteur de la sécurité agro-alimentaire ou environnementale. De nombreuses références couvrent ces avancées et prospectives [17-24].

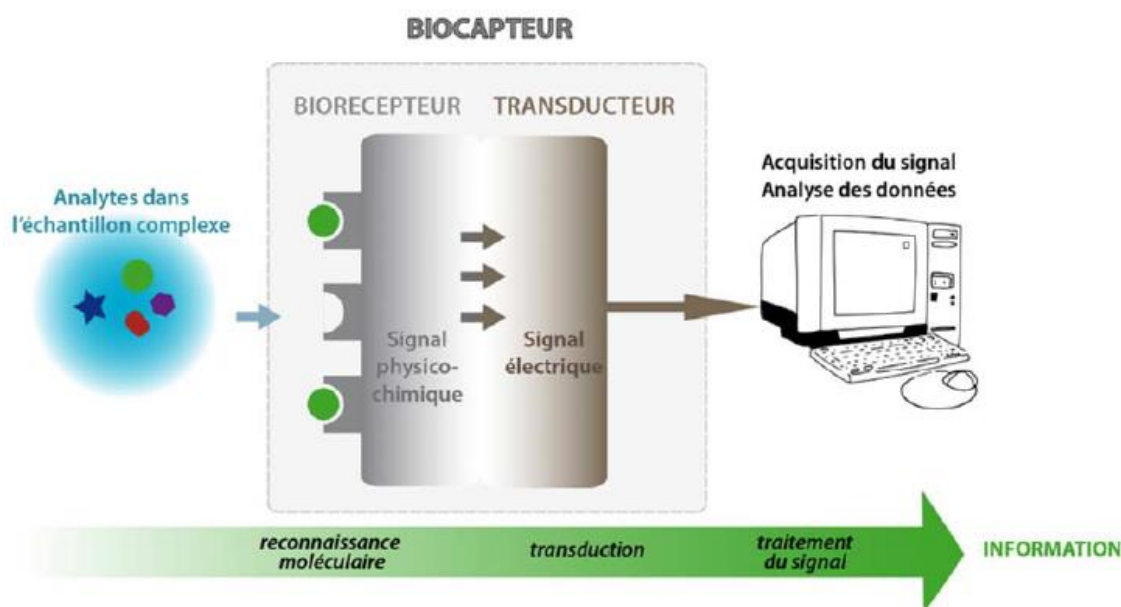


Figure 14. Principe de fonctionnement d'un biocapteur [25].

Les outils issus du développement de la technologie microfluidique constituent également une classe d'équipements innovants pour le génie des procédés, particulièrement pour la catalyse. Ce domaine couvre l'utilisation d'une large panoplie de réacteurs, allant des matériaux méso- et macroporeux aux réacteurs industriels, en passant par la verrerie traditionnelle à l'échelle laboratoire. Parmi les réacteurs disponibles, les réacteurs microfluidiques se distinguent par plusieurs de leurs propriétés. Elles permettent d'imaginer de nouveaux procédés ou des alternatives attrayantes à des procédés déjà en place.

2.3.4.2. Les microréacteurs : une alternative ?

La technologie microfluidique a émergé en laboratoire de catalyse depuis une bonne décennie. La recherche d'alternatives à des protocoles ou procédés conventionnels difficiles à maîtriser ou à mettre en œuvre a poussée certains spécialistes à employer des microréacteurs. D'autres ont cherché à tirer profit de la spécificité de l'écoulement pour mettre au point de nouvelles approches. Les procédures de microfabrications les plus flexibles autorisent en effet la conception de réacteurs microstructurés très variés, allant de simples canaux parallèles à des

structures plus élaborées, parfois complexes. La variété des plateformes réactionnelles potentiellement réalisables ouvre une voie attrayante dans la mise en œuvre, l'optimisation, voire l'intensification de procédés catalytiques [26,27].

2.3.4.2.1. Intérêts de miniaturiser un réacteur

Les intérêts de travailler avec des microréacteurs sont divers. Mentionnons néanmoins que leur utilisation implique régulièrement la même limitation, qui peut rendre compte d'un désavantage notable lorsque le réacteur joue le rôle d'un outil de production. Cet inconvénient principal a trait à l'aspect quantitatif et peut se définir par la convergence de trois points majeurs susceptibles de limiter la productivité. Il s'agit :

- de la manipulation de faibles volumes de réactifs généralement sous le millilitre ;
- du régime d'écoulement fortement laminaire s'accompagnant de la problématique du mélange ;
- de l'utilisation de faibles débits, limités par la tolérance de certains microdispositifs¹¹

Malgré ces contraintes, dont nous verrons qu'elles peuvent être surmontées, les microréacteurs suscitent une certaine attractivité par quelques propriétés singulières menant à divers bénéfices. Les intérêts les plus couramment mis en évidence sont [26-33] :

- *le rapport surface /volume élevé* menant à un confinement prononcé des écoulements ainsi qu'à des phénomènes surfaciques particulièrement intensifiés par une réduction significative des distances de transfert. Pour des diamètres de canaux allant de la dizaine à la centaine de micromètres, le rapport *surface/ volume* atteint 10000 à 50000 m² m⁻³ [32]. Cette caractéristique est à l'origine d'une intensification significative du phénomène de transfert aux interfaces (i) liquide-liquide ou (ii) liquide-solide. Au premier point, l'amélioration de ces phénomènes peut mener à des rendements améliorés dans des réactions catalytiques voire des phénomènes d'extraction par solvant. Au second point, les échanges aux parois sont améliorés par rapport à des installations de taille classique. Il peut s'agir d'un échange thermique permettant, dans certains cas, de contrôler l'exothermicité de réactions chimiques afin d'éviter un emballement thermique, ce qui autorise un gain en sécurité. Il peut également s'agir

¹¹ Même si certains dispositifs microfluidiques possèdent des tolérances élevées à la pression, la gamme de débits disponibles ne permet pas d'obtenir des volumes élevés par unité de temps.

d'un échange de matière plus prononcé avec la paroi ou les « murs » constituant le support sur lequel un catalyseur est immobilisé ;

- *les faibles volumes de réactifs et/ ou de solvant* dans les réactions ou procédés mis en œuvre à cette échelle, autorisant une minimisation des quantités de matière, une réduction potentielle du temps des réactions, une automatisation, une potentialité d'analyse intégrée autrement délicate, un stockage ou un transport plus aisé. Ce mode de travail permet par exemple d'envisager une production sur place ou à la demande de substances présentant un danger potentiel lors de leur stockage, leur transport ou leur mise en œuvre (intermédiaires de synthèse chimique par exemple). Par extension, les microréacteurs donnent l'image d'une chimie plus responsable avec la possibilité de minimiser déchets et énergie [33-35] ;
- *le travail en flux continu* permettant (i) une (bio)catalyse hétérogène et un recyclage du catalyseur, (ii) un éventuel couplage de la (bio)catalyse à un procédé séparatif et donc (iii) un traitement continu de matière.

Dans une moindre mesure, citons :

- *la dualité/ équivalence espace-temps de séjour moyen* (Figure 15) permettant (i) d'investiguer à de courtes échelles de temps pour l'étude de réactions/ phénomènes rapides et (ii) de mener des analyses intégrées pointues dans le but d'optimiser une réaction particulière, un procédé ou plus simplement d'opérer un suivi cinétique (*monitoring*) ;
- un accès plus sûr à des *conditions supercritiques*.

La technologie des microréacteurs apporte également une approche différente dans la façon d'analyser, de concevoir et d'optimiser des procédés de réaction [27,29,36,37]. La « nouvelle fenêtre de procédés », désignée comme telle par Illg *et al.* [37], autorise le travail en génie chimique à haute pression [38] et haute température [39], ou encore sous régime « explosif » [40]. Notons en plus l'utilisation de microréacteurs comme plateformes d'expérimentations multiparamétriques ou « outil d'exploration et d'optimisation des conditions d'une réaction » [28], qui permettent de tirer des « informations chimiques » [26]. Mentionnons enfin l'augmentation de la productivité par une montée en échelle de type *numbering up* (par opposition au type *scale up*, démarches qui sont abordées à la section 2.3.4.3.2.) [28], le *screening* de catalyseur à haut débit (*HT catalysts screening*) [41] ou encore la possibilité de mener une intensification de procédés (section 2.3.4.3.) [42-44].

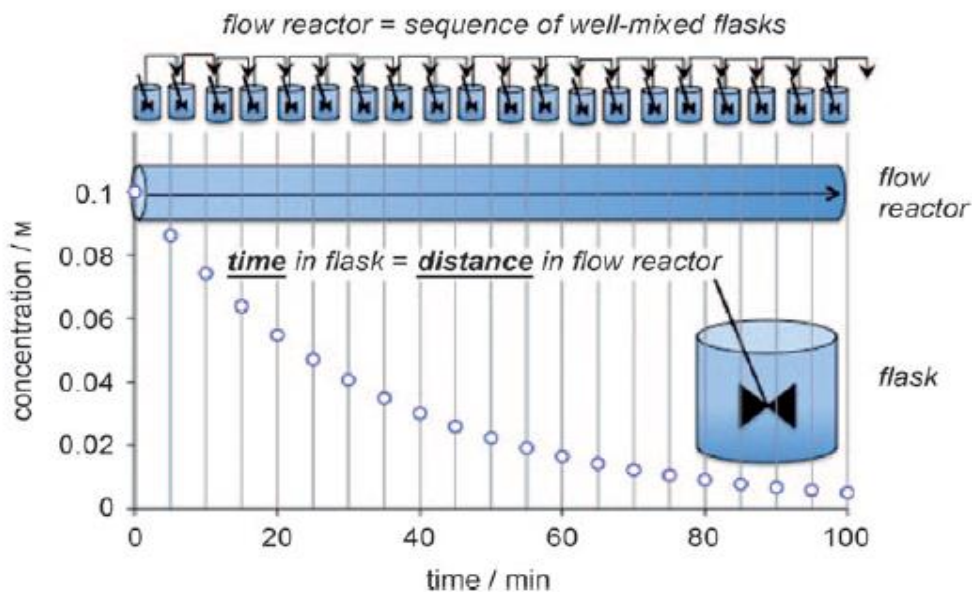


Figure 15. Illustration de la dualité espace-temps en microréacteur. La variable représente la concentration d'un réactif [29].

Selon Brivio *et al.* [45], les points clés qui adressent la spécificité d'un microréacteur sont :

- les propriétés de surfaces des matériaux de microfabrication ;
- la mise en mouvement des fluides en son sein, permettant de contrôler les temps de réaction (distribution du temps de séjour des espèces) et la composition du système (mélange) ;
- la géométrie des canaux, contrôlant par exemple le processus de mélange ;
- l'intégration d'outils avancés, pour par exemple le contrôle de la température, du mélange ou encore pour l'analyse instantanée.

Sans prétendre être exhaustifs, l'ensemble des éléments rapportés ci-avant ont suscité l'intérêt en génie chimique en premier lieu, notamment en synthèse. Divers bénéfices concrets ont été rapportés, souvent en termes de rendement [46] ou de sélectivité [47] de réactions chimiques. L'application des microréacteurs à des réactions spécifiques nécessitant d'exploiter des interfaces importants a également été menée avec succès : c'est le cas de la catalyse de transfert de phase [48-50], où le rapport *surface/ volume* important permet de revoir la cinétique et la sélectivité d'une réaction par rapport à l'utilisation de réacteurs conventionnels de type *batch*. Dans le même aspect, on comprend qu'il peut être avantageux d'opérer des procédés d'extraction liquide-liquide, qui peuvent facilement être mis en œuvre dans des systèmes à co-courant [51,52] (thème abordé en section 2.3.4.3.1.).

Naturellement, l'architecture d'une plateforme de réaction est tout à fait spécifique à l'utilisation qui lui est promise. Ainsi, les microréacteurs revêtissent plusieurs formes selon le degré d'intégration d'éventuels composants et selon leur degré de complexité.

2.3.4.2.2. Des plateformes variées

On peut classer les plateformes utiles à la mise en œuvre de réactions comme plateformes de type *on-chip* ou *off-chip*, c'est-à-dire qu'elles permettent de réaliser des réactions soit dans des unités compactes, soit dans des capillaires de diamètre micrométrique. Si l'on considère un écoulement par différence de pression, la fonctionnalité des capillaires est semblable à celle des microréacteurs compacts. En revanche, les premiers ne permettent pas un contrôle total des propriétés de surface internes ni de l'écoulement comme pourrait le permettre un microsystème.

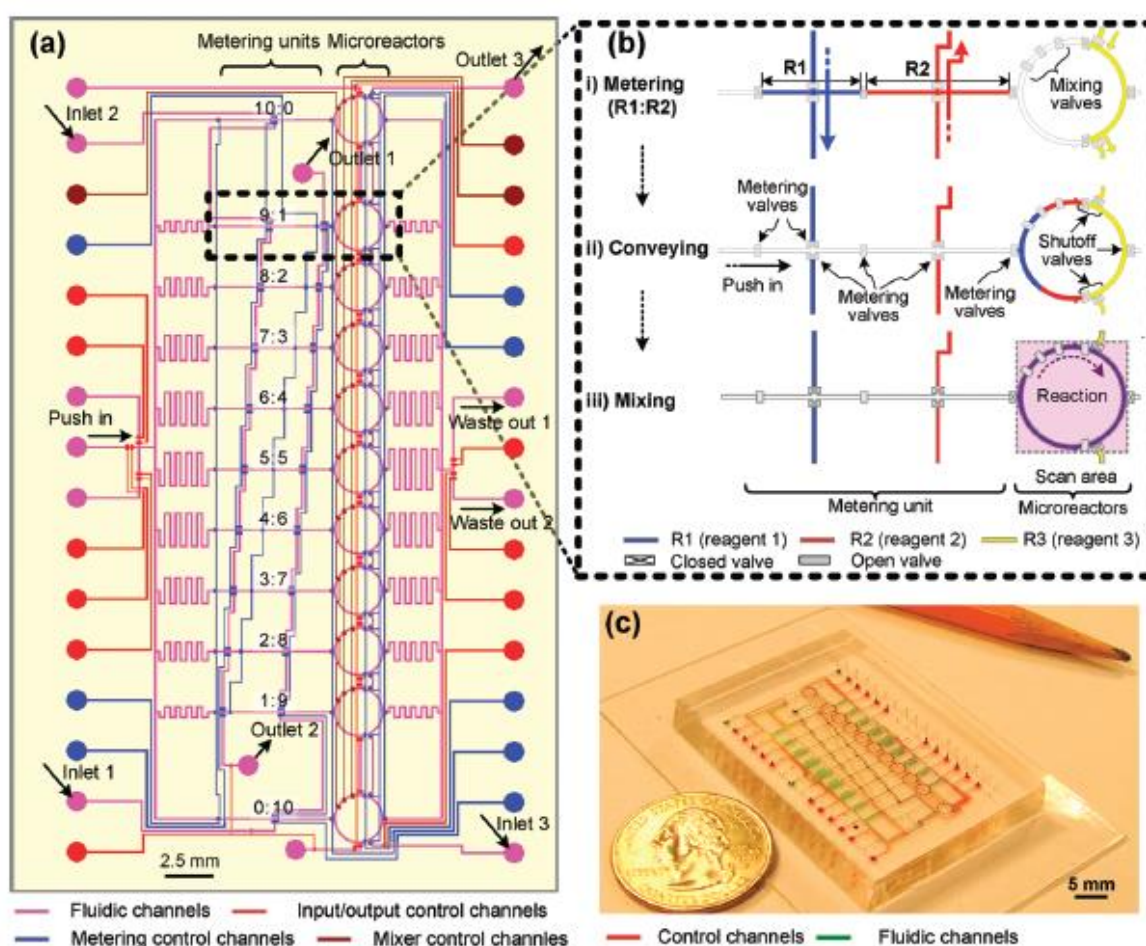


Figure 16. Système microfluidique intégré permettant des réactions enzymatiques en parallèle. a) configuration du microsystème, b) schématisation de la circulation microfluidique et du mélange, c) photographie du système. 11 réactions peuvent avoir lieu dans 11 microréacteurs différents localisés sur la même puce microfluidique [53].

Les étapes de la création de ce dernier (section 2.3.3.) permettent en effet d'effectuer d'éventuels traitements de surface et de le doter de fonctions avancées telles que des micropompes, valves, micromélangeurs (Figure 16) [53], ou autres capteurs [54]. En outre, la souplesse de certaines procédures de microfabrication autorise la conception de réacteurs microstructurés très variés, allant de simples canaux parallèles à des structures élaborées plus complexes en passant par des « nano-puits » [55]. L'architecture des plateformes de réaction employant des capillaires se limite à des géométries de types X et Y ou T. Les microstructures se sont développées depuis les années 1980 sous l'impulsion de quelques pionniers en aux Etats-Unis et en Europe. Elles touchent une communauté de scientifiques et d'industriels plus vaste depuis le milieu des années 1990, comme en témoigne le premier *meeting* international dédié à ces systèmes organisé par l'IMM (*Institut für Mikrotechnik Mainz*).

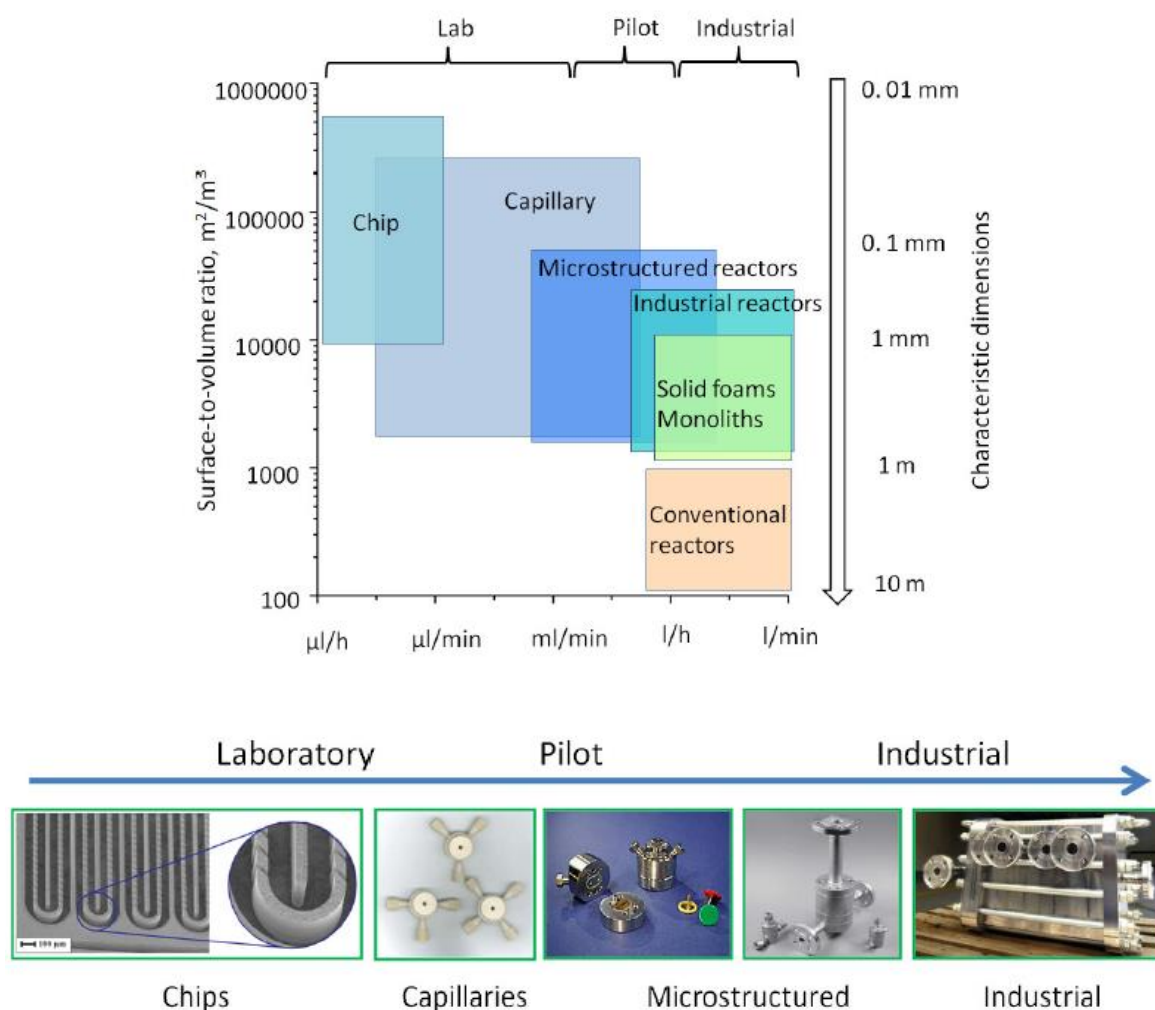


Figure 17. Les quatre grandes classes de microréacteurs et leurs principales caractéristiques [58].

Les microréacteurs principalement employés peuvent être approximativement classés en fonction de l'échelle à laquelle ils sont utilisés : l'échelle laboratoire, pilote ou industrielle (Figure 17). Il est intéressant de rappeler que des entreprises telles que *Lonza*[®], *DSM Pharma Chemicals*[®], *Degussa*[®] et *Bayer*[®] emploient des microréacteurs à l'échelle industrielle [35,56,57]. Notons finalement que la pratique de réactions en réacteurs microfluidiques reste principalement axée sur des conditions de flux continu.

2.3.4.2.3. Mélanger : un défi ?

Les microréacteurs impliquent quasiment systématiquement de considérer l'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds. Ainsi, la problématique du mélange dans des conditions fortement diffusives est régulièrement posée. Plusieurs solutions technologiques ont été développées pour « forcer » deux réactifs à se mélanger au sein d'un microcanal. Elles se divisent principalement en deux orientations : le *mélange actif* et le *mélange passif* (Figure 18). Le mélange passif met simplement à profit l'énergie cinétique des fluides en mouvement alors que le mélange actif utilise une source d'énergie complémentaire afin d'alimenter un actionneur mécanique, électrique, piézoélectrique, magnétique ou encore thermique. Ces modes de mélange ont été largement reportés dans la littérature [15,59-66].

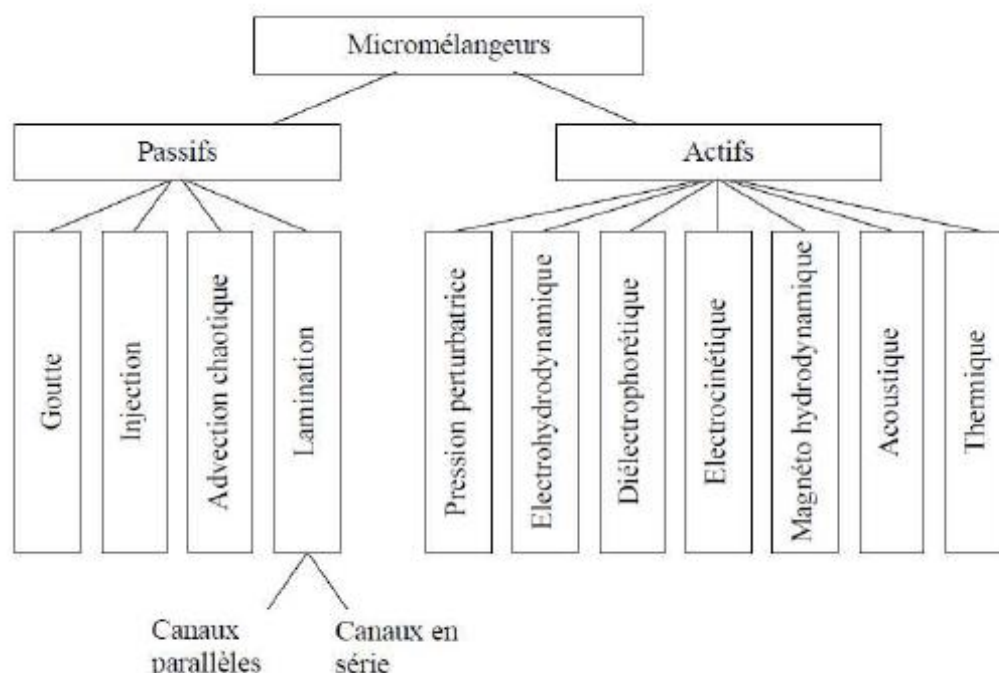


Figure 18. Classification des principaux types de micromélangeurs [59] (adapté, repris de [67]).

Des exemples originaux ont montré comment pallier au caractère laminaire de l'écoulement lorsqu'il n'autorise pas un mélange efficace des réactifs. Effectivement, ce caractère ne permet pas d'assurer efficacement certaines réactions pour lesquelles le mélange n'est pas un facteur limitant (par rapport à la cinétique de la réaction). Ce peut être particulièrement le cas de réactions impliquant le mélange d'espèces de haut poids moléculaire. D'autres réactions impliquant des réactifs de faible masse moléculaire ne nécessitent pas forcément l'usage de micromélangeurs.

Au-delà de la présence de mélangeurs, les paramètres cruciaux à gérer pour assurer le déroulement de réactions dans les meilleures conditions de mélange sont la largeur des canaux et le temps de séjour des espèces. Notons d'ailleurs que l'écoulement de Poiseuille dans un réacteur à flux laminaire implique une distribution du temps de séjour (*DTS*) des espèces tout à fait spécifique (Figure 19). Celle-ci est souvent à l'origine d'un phénomène de dispersion important [68], en fonction des débits appliqués.

La forme parabolique du champ de vitesse des écoulements à petites échelles a pour conséquence de disperser les particules au sein de l'écoulement (Figure 19A). Les molécules au centre de l'écoulement séjournent en moyenne moins de temps dans le réacteur que les molécules proches des parois, où la vitesse d'écoulement est beaucoup plus faible. Dans une section de fluide à une distance donnée, il y aura donc une *DTS*.

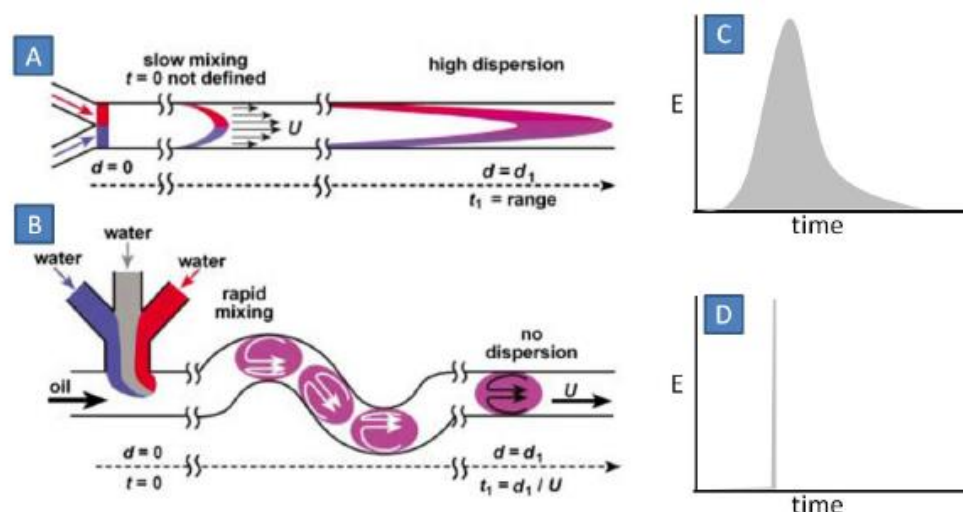


Figure 19. Modes d'écoulement en microcanaux et distribution du temps de séjour (*DTS*) des espèces injectées à co-courant dans un système A) monophasique et B) biphasique (eau/ huile) générant des gouttelettes. *DTS* respectif des espèces injectées en écoulement C) monophasique et D) segmenté [69] (adapté, repris de [70]).

Le profil de vitesse au sein d'un capillaire cylindrique à un débit fixé imposera une vitesse nulle aux parois et une vitesse équivalente à deux fois la vitesse moyenne au centre de la conduite. Le phénomène de dispersion peut être bien visualisé expérimentalement à l'aide de l'utilisation de marqueurs fluorescents (Figure 20) [71].

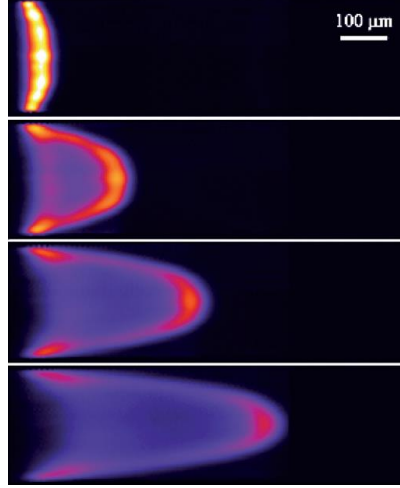


Figure 20. Dispersion d'une sonde fluorescente au sein d'un canal microfluidique rectangulaire de $250 \mu\text{m} \times 70 \mu\text{m}$ soumis à un écoulement laminaire [71].

Taylor a été le premier à étudier le phénomène de dispersion dans un capillaire cylindrique [72], puis Aris l'a étudié dans d'autres géométries avant de proposer un modèle généralisé [73]. Le modèle de Taylor-Aris permet de décrire la DTS au sein d'un écoulement laminaire pour un temps de convection largement supérieur au temps de diffusion des particules au sein de la section. Le coefficient de diffusion moléculaire classique D est remplacé par un coefficient tenant compte de la dispersion axiale, $D_{\text{Taylor-Aris}}$:

$$D_{\text{Taylor-Aris}} = D + \frac{\bar{u}^2 R^2}{48D}$$

avec $\bar{u}$ la vitesse moyenne et R le rayon du capillaire cylindrique. La DTS peut ainsi être approximée par :

$$DTS(\theta) = \frac{1}{\sqrt{4\pi \left(\frac{D_{\text{Taylor-Aris}}}{\bar{u}L} \right)}} \cdot \exp \left(-\frac{(1-\theta)^2}{4\theta \left(\frac{D_{\text{Taylor-Aris}}}{\bar{u}L} \right)} \right)$$

où θ représente le ratio du temps sur le temps de séjour moyen, $\bar{u}$ la vitesse moyenne sur la section et L la longueur du capillaire. Ce transport convectif est cependant accompagné d'un

transport diffusif radial et axial des molécules tendant à homogénéiser leur dispersion au sein de l'écoulement. Pour un temps de séjour supérieur au temps de diffusion nécessaire aux espèces pour parcourir la largeur du canal, le phénomène de dispersion peut être limité. Dans le cas contraire, ce phénomène peut influencer la distribution spatiale de particules telles des produits de réaction, ce qui est un paramètre à considérer. Il existe cependant des systèmes dans lesquels les fluides sont mis en mouvement par phénomène d'électroosmose. Les flux électroosmotiques sont alors à l'origine d'un champ de vitesse homogène dans la section.

Mentionnons finalement qu'afin d'apprécier les problèmes de mélange pouvant survenir dans un microréacteur, le second nombre de Damköhler Da_{II} peut être utile. Il représente le rapport *temps de diffusion* (t_D)/ *temps de réaction* (t_r) :

$$Da_{II} = \frac{t_D}{t_r}$$

avec $t_D \cong y^2/D$ où y représente la distance de diffusion et t_r , dans le cas d'une réaction enzymatique, pouvant être assimilé à :

$$t_r = \frac{[S]_0}{V_0 [E]}$$

où $[S]_0$ représente la concentration initiale de substrat, $[E]$ la concentration d'enzyme et V_0 la vitesse initiale de la réaction enzymatique. En utilisant l'équation de Michaelis-Menten [74,75], t_r devient

$$t_r = \frac{(K_m + [S])}{V_{\max} [E]}$$

avec K_m la constant de Michaelis-Menten et $V_{\max}$ la vitesse maximale de réaction. L'insertion de cette expression dans le second nombre de Damköhler Da_{II} donne

$$Da_{II} = \frac{y^2}{D} \cdot \frac{(V_{\max} [E])}{K_m + [S]}$$

Cette relation a été exprimée par Swarts *et al.* dans « *Effect of diffusion on enzyme activity in a microreactor* » [75].

2.3.4.2.4. Microréacteurs et enzymes : applications majeures

L'emploi de microréacteurs dans le domaine du génie enzymatique est globalement moins mentionné que dans le domaine du génie chimique mais se développe et se diversifie progressivement [76,77]. Les applications principales pouvant être mentionnées touchent les domaines de la *protéomique*, de l'*analyse cinétique* et de la *production de molécules d'intérêt*.

Protéomique

C'est principalement la digestion rapide de protéines qui est visée [78-84]. Elle précède leur analyse par spectrométrie de masse et des méthodes de couplage ont été étudiées [80,83]. Une amélioration des vitesses de digestion est généralement constatée par rapport aux protocoles conventionnels [77-84]. Un exemple original de protéolyse en microréacteur met en avant l'utilisation de quantités minimales d'échantillon de protéine (réduit à une gouttelette de 2 μL) et d'enzyme digestive (réduit à un « disque » de gel d'agarose de 2 mm de diamètre où l'enzyme est immobilisé) (Figure 21) [82]. Récemment, les systèmes employés se sont étendus aux dispositifs permettant de modéliser le processus de digestion [85].

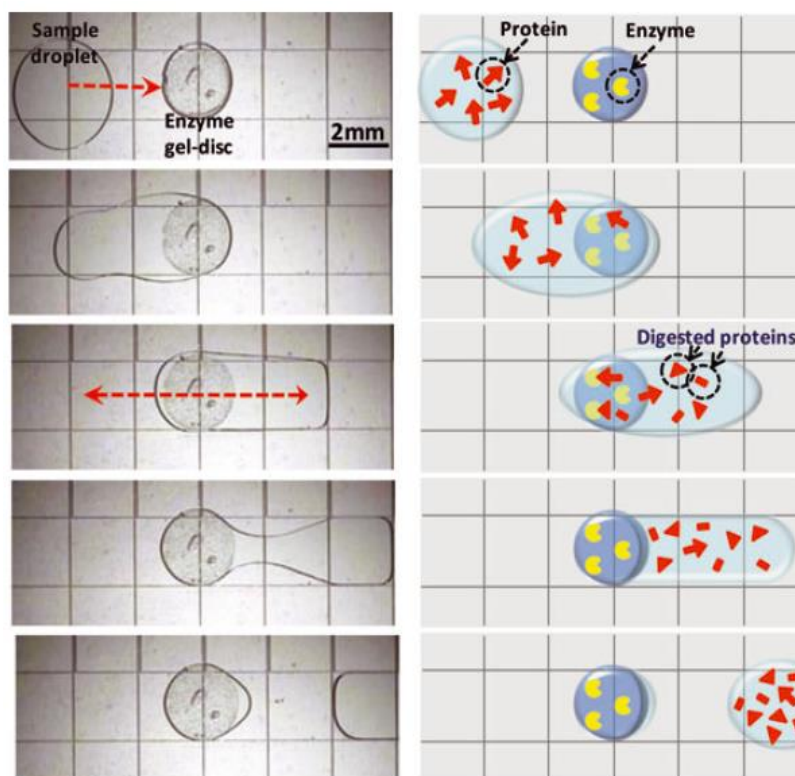


Figure 21. Digestion de protéines dans un microréacteur prenant en charge des « gouttelettes » de 2 μL . L'enzyme digestif (trypsine) est immobilisé dans un disque de gel d'agarose [82].

Analyse cinétique

Certaines études ont visé à concevoir des dispositifs permettant l'analyse rapide de cinétiques enzymatiques *via* (i) une architecture (*design*) adaptée (Figure 22) et/ ou un système de mesure intégré [53,86-89] ou encore (ii) un formalisme mathématique dérivé de la dualité espace-temps offerte par ces systèmes [90,91]. Aussi, des études examinant l'impact des conditions inhérentes à la miniaturisation et des paramètres opératoires sur des cinétiques réactionnelles ont été menées [53,55,75,92-95]. Elles sont primordiales pour appréhender et concevoir efficacement des procédés enzymatiques dans des microréacteurs. De ce point de vue, certains travaux indiquent clairement que l'utilisation de microréacteurs permet d'accélérer des cinétiques de réactions [96,97].

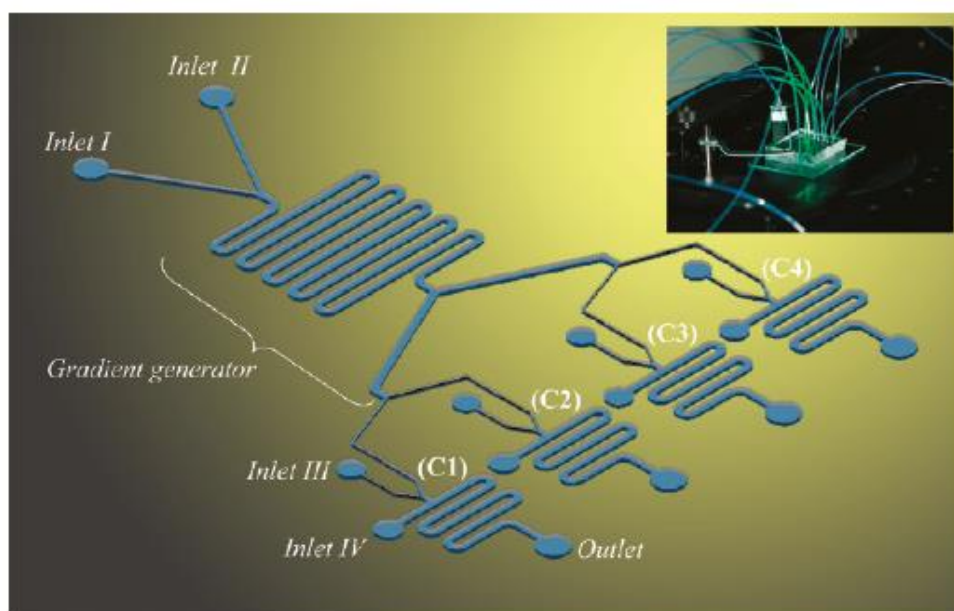


Figure 22. Schématisation d'un dispositif microfluidique dont l'architecture permet de générer un gradient de concentration linéaire dans quatre chambres réactionnelles (C1, C2, C3 et C4). Le dispositif, mettant en jeu la formation de gouttelettes à l'entrée des chambres, permet le déroulement de quatre réactions en parallèle pour la détermination rapide de paramètres cinétiques. Inlet I : substrat (resorufin- β -D-galactopyranoside) ; Inlet II : buffer ; Inlet III : enzyme (β -galactosidase) ; Inlet IV : huile [86].

Approches micro- et macrocinétique des procédés biocatalytiques

Plus récemment, des systèmes microfluidiques ont émergé en biotechnologie/ procédés enzymatiques pour la production efficace de molécules d'intérêt [77,78,98-101]. Cette option peut être choisie parce qu'elle permet d'atteindre des conditions inaccessibles aux réacteurs de

type *batch* (conditions particulières d'écoulement, de transferts thermique ou massique). Elle peut aussi prendre le pas sur des procédés déjà en place si elle permet une maîtrise accrue de la cinétique ou de la sélectivité d'une réaction, ou encore si elle autorise un gain de nature pratique. L'approche *microcinétique* va alors s'intéresser au comportement des espèces mises en œuvre dans les réacteurs microfluidiques et à la modélisation des termes de réaction, ce qui permet de concevoir de nouveaux procédés biocatalytiques. A cette échelle, cette approche permet une réduction efficace des pertes de matière pendant cette phase d'étude et de développement, à l'issue de laquelle suit l'approche *macrocinétique*. Cette dernière a trait à l'optimisation et à la maîtrise du procédé. L'augmentation de la productivité adopte alors une montée en échelle plus simple une fois le procédé optimisé (au contraire d'un *batch*, partie 2.3.4.3.2.). Ce point spécifique, auquel on ajoutera des considérations économiques et environnementales, est la base de l'intensification des procédés [35,37,42-44,100].

2.3.4.3. Vers une intensification des procédés

En rupture avec les traditionnels procédés discontinus de type *batch*, le concept d'intensification vise à promouvoir des procédés continus dont les conditions opératoires sont intensifiées. Il consiste, *via* le développement de techniques et d'appareils adaptés, à réduire de manière importante la taille des unités en rapport avec leurs volumes de production, leur nombre d'étapes ou leur consommation énergétique dans un esprit de développement durable. L'intensification d'un procédé concerne ainsi l'ensemble d'une chaîne de production : réaction, séparation, isolement et analyse des produits voire séchage et mise en forme. L'utilisation des microréacteurs est l'une des voies technologiques qui permet d'intensifier les étapes d'un procédé, mais aussi de rendre accessible des chimies comportant des difficultés et ainsi d'envisager un accès maîtrisé et plus sûr à certains produits, voire à de nouveaux produits.

Classiquement, les réacteurs microfluidiques sont reportés comme permettant de favoriser un meilleur contrôle des conditions de réactions, une diminution de la taille des équipements, une amélioration des conditions de sécurité et des économies d'énergie. Ils répondent ainsi aux enjeux importants que pose l'intensification des procédés en apportant (i) une grande flexibilité lors des augmentations des capacités de production en facilitant la montée en échelle et (ii) des procédés plus « propre », sûrs et respectueux de l'environnement. L'intégration potentielle de nombreux outils avancés pour l'analyse va dans le même sens, en apportant suivi et sécurité des opérations.

2.3.4.3.1. Des procédés continus et miniaturisés pour le développement durable

Depuis longtemps, la majeure partie des procédés, notamment industriels, repose sur l'utilisation de réacteurs et de procédés de type *batch*, procédés discontinus. Les procédés continus sont depuis quelques années mis en avant dans de nombreuses revues et articles [28,29,33,34,37,102,103], insistant sur les mérites de ce mode de travail pour des applications industrielles. L'idée posée dans cette littérature indique que les technologies microfluidiques sont parmi celles capables d'assurer un passage raisonné du *batch* au continu, en permettant de concevoir des procédés « durables » et plus efficaces (Figure 23). Cependant, la miniaturisation implique une modification parfois profonde du procédé. D'un point de vue technologique, la rupture par rapport à des procédés conventionnels doit se faire selon trois axes afin d'en tirer un maximum de bénéfices :

- adapter l'équipement à la chimie et non l'inverse (pour par exemple optimiser les conditions propices aux phénomènes de transfert) ;
- promouvoir le continu par rapport au *batch* ;
- tendre vers la multifonctionnalité de l'équipement (section 2.3.4.3.3.).



Figure 23. Bénéfices potentiels pouvant être tirés de la mise en place de procédés continus [33].

Les progrès technologiques actuels permettent aujourd'hui de fabriquer à l'échelle du micron des structures parfaitement adaptées à des procédés continus et plus responsables. Si l'on prend le cas d'un procédé séparatif comme l'extraction liquide-liquide, l'utilisation de solvant et les temps d'opération peuvent être largement réduits en comparaison avec des procédés de même nature à l'échelle conventionnelle [51,104-109]. Des approches originales peuvent être conçues, comme l'extraction rapide et continue de composés d'intérêt à travers une membrane

liquide, en mettant à profit deux interfaces liquide-liquide [108,109]. En sus, des procédés couplés peuvent se développer plus aisément (CFCP pour *Continuous-Flow Chemical Processing*) [52]. Aussi, la panoplie des micro-opérations (MUOs pour *Micro Unit Operations*) réalisables au sein de circuits microfluidiques va dans le sens d'une multifonctionnalité de l'équipement (Figure 24) [52]. On voit ainsi que l'intérêt et les bénéfices que peut procurer la miniaturisation d'un procédé dans son ensemble sont divers.

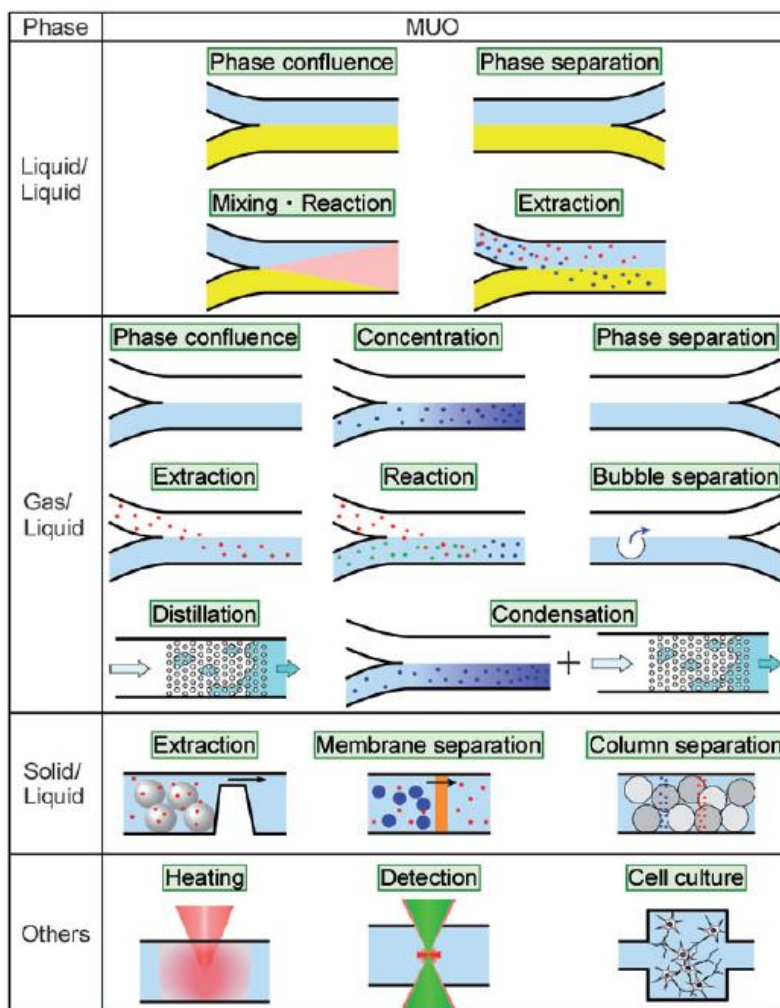


Figure 24. Exemple de micro-opérations (MUOs) pouvant être réalisées par voie microfluidique [52].

Parmi d'autres outils, l'intensification tend vers le développement durable, qui peut se définir comme « la capacité des générations présentes à satisfaire leurs besoins sans compromettre l'aptitude des générations futures à satisfaire leurs propres besoins ». Dans ce contexte, les microréacteurs tentent de répondre à cet enjeu, dont le principe basique est de chercher à

satisfaire une règle/ un concept simple, celui des « 3P » : « *People, Planet, Profit* » (Figure 25) [44]. Selon ce concept, les procédés doivent tendre vers :

- une sûreté de la chimie et des procédés, une sécurité des installations et un encombrement visuel réduit (approche sociale) ;
- une consommation raisonnée et limitée en ressources telles que le matériel, les infrastructures et l'espace, ou encore l'énergie ; mais aussi un traitement de la biomasse et une valorisation des déchets (approche écologique) ;
- une meilleure productivité à moindre coût (approche économique).

Ce concept enseigne que le positionnement de l'industrie de production au sens large doit tendre vers une philosophie, devant par ailleurs être appuyée par une réglementation des pratiques afin d'être assimilé par tous les acteurs. L'agence américaine de la protection de l'environnement a d'ailleurs exposé en 1997 les « douze principes de la chimie verte », reformulés par P. Anastas et J. Warner en 1998 dans l'ouvrage « *Green chemistry: theory and practice* » (Annexe 2) [110]. Il en ressort notamment que la « chimie verte » va bien au-delà de la seule chimie du végétal, qui n'en est pas moins un élément important. Ces principes résument également l'intérêt même de la chimie et des biotechnologies à améliorer leur image.

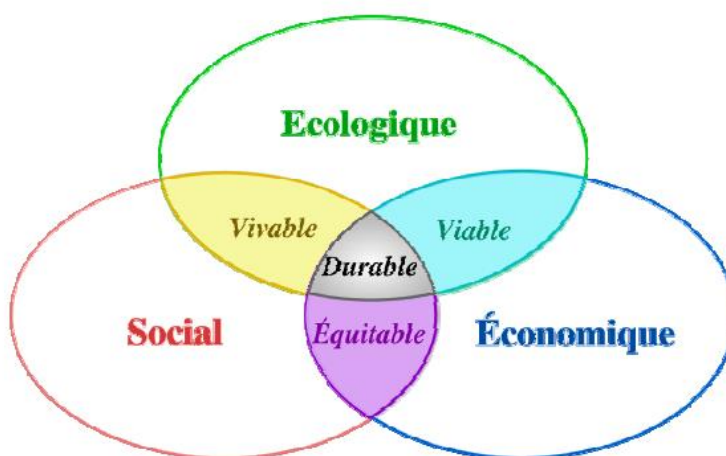


Figure 25. Schéma synthétique illustrant le concept des « 3P » : *People* (social), *Planet* (écologique), *Profit* (économique).

Le volet économique du concept des « 3P » met en jeu la notion d'augmentation des capacités de production. La stratégie de montée en échelle selon le principe de l'intensification de procédé va alors reposer sur une approche spécifique en rupture avec le traditionnel « scale-up ».

2.3.4.3.2. Extrapolation et productivité : du scale-up au numbering-up

L'augmentation de la productivité en microréacteur repose sur deux approches possibles : (i) le dimensionnement des unités réactionnelles (augmentation de la taille des canaux tant qu'elle n'entrave pas les conditions propices optimisées) ou (ii) la multiplication des microréacteurs optimisés. La deuxième approche est la plus efficace et repose sur une extrapolation simple : la parallélisation des unités réactionnelles, appelée *numbering up* (Figure 26) [56,111]. Ce mode de montée en échelle repose sur la parallélisation d'un microréacteur optimisé autant de fois que l'impose la quantité de produit désirée, sans risque de modifier les phénomènes physico-chimiques mis en jeu.

En réalité, la démarche adaptée est souvent un compromis entre les deux approches (i) et (ii) : on parle de *smart numbering-up*. Dans un premier temps, elle implique l'étude préliminaire d'une réaction dans un réacteur de faibles dimensions caractéristiques (approche microcinétique), puis les paramètres sont optimisés et l'échelle est augmentée tant que les propriétés de transfert sont conservées (approche macrocinétique). Une unité de réaction est alors conçue. Dans un second temps, la mise en parallèle de plusieurs de ces unités est effectuée en accord avec la productivité visée. Dans ces conditions, le microréacteur optimisé préfigure dès le laboratoire des conditions opératoires du procédé final, accélérant ainsi le passage à l'industrialisation.

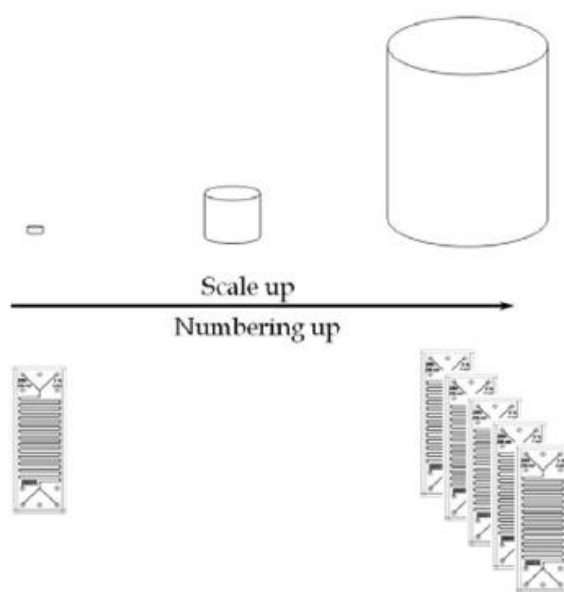


Figure 26. Augmentation des volumes de production selon deux stratégies opposées de montée en échelle : scale up « versus » numbering up [111].

Parmi les spécificités et les avantages de la mise en place de microprocédés, la possibilité de paralléliser et de coupler des micro-opérations vient d'être mentionnée. Ces aspects collent parfaitement avec les aspirations d'industrialisation d'un procédé. Cependant, la révision des conditions opératoires qui accompagnent l'intensification d'un procédé impose souvent d'acquérir de nouvelles données thermocinétiques. De ce point de vue, l'outil microfluidique tend à s'imposer comme un outil pertinent d'acquisition de données, d'autant qu'il permet l'intégration de divers capteurs autorisant des analyses instantanées. En ce sens, il permet aussi de concevoir des réacteurs disposant de systèmes analytiques délicats voire impossible à installer en batch. La combinaison des opérations qui définissent l'ensemble d'un procédé passe donc par plusieurs aspects que la miniaturisation peut prétendre intimement connecter. Les opérations de couplage et autre intégration y sont effectivement plus simple qu'en batch.

2.3.4.3.3. Le « tryptique » réaction-détection-séparation

Un (bio)procédé ne peut se résumer uniquement aux phénomènes physico-chimiques qui le caractérisent. Lorsque l'on considère un procédé de production dans son ensemble, il convient de s'attarder sur tous les « aspects » qui mènent à l'obtention du produit final. Dans le contexte de préparation d'un produit par une étape (bio)catalytique, comme la préparation de peptides actifs par hydrolyse enzymatique (notre contexte spécifique), le procédé global de préparation fait intervenir des opérations de réaction, de séparation et de détection des produits. En considérant que chaque opération constitue déjà un procédé en lui-même, l'intensification doit alors permettre de les compacter.

Couplage réaction-séparation

C'est le couplage de (micro-)opérations évoqué dans la partie 2.3.4.3.1. permettant la contraction des étapes d'un procédé global de production. Cet aspect relève du passage raisonné du *batch* au continu afin de satisfaire des considérations pratiques, économiques et environnementales. Le couplage d'une fonction de réaction à une fonction de séparation peut être facilement permis par le mode de travail en continu. L'apport des technologies microfluidiques dans ce domaine autorise la conception de systèmes spécifiquement adaptés à la préparation de certaines espèces et fonctionnant en continu (CFCP) [52]. A titre d'exemple, on peut citer la combinaison d'une réaction biocatalytique à une séparation par filtration membranaire [112].

Vers une synergie microréacteur-(bio)capteur

Le suivi cinétique d'une réaction est tout à fait crucial dans l'optimisation et l'intensification d'un procédé (bio)catalytique. L'acquisition instantanée de données de ce type peut être permise par l'intégration de composants analytiques au réacteur. La souplesse et la spécificité de certaines procédures de microfabrication est censé permettre l'intégration de tels outils. La possibilité de suivre instantanément un procédé continu constitue une mesure cruciale pour la maîtrise de ce dernier [100,113]. Les besoins en détection font donc partie intégrante de l'intensification dans la mesure où ils permettent de contrôler des micro-opérations voire l'ensemble d'un procédé. Ils autorisent ainsi un suivi précis et par là une maîtrise complète ainsi qu'une sécurité renforcée.

Réacteurs enzymatiques avancés microstructurés

La « promesse » faite par l'intensification des procédés enzymatiques dans le domaine des biotechnologies aboutira certainement de plus en plus à des réacteurs microstructurés dotés de diverses fonctions avancées comme des fonctions de détection.

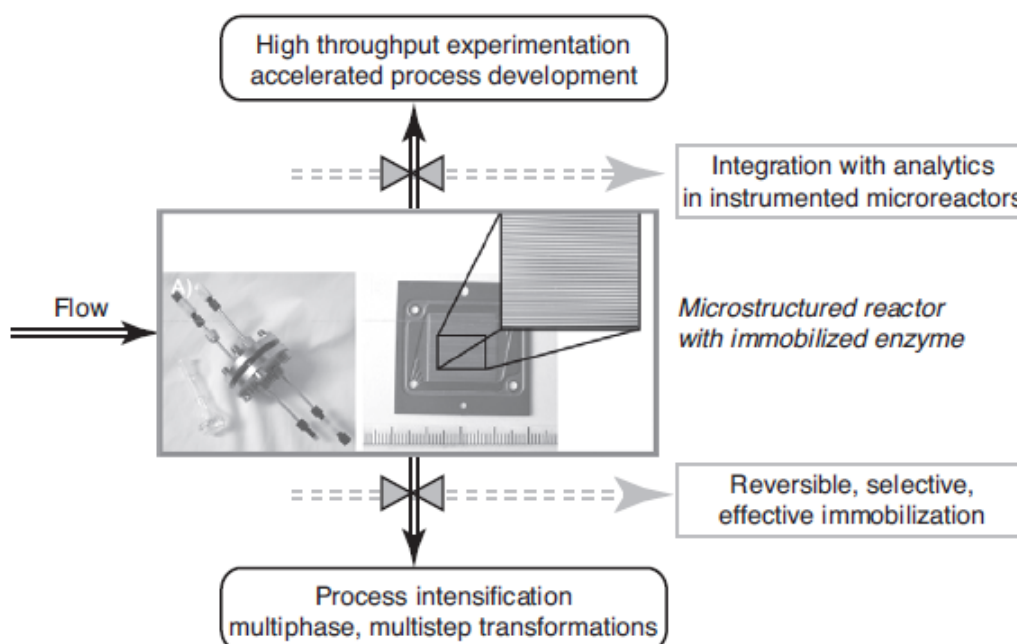


Figure 27. Représentation schématique illustrant les défis à relever (encadrés francs) pour la conception de réacteurs microstructurés avancés à enzymes immobilisées. Les opportunités et perspectives visées rejoignent les conditions globales posées par le concept d'intensification (encadré précédé d'une « vanne » en position fermée) [100].

Les voies actives de développement dans ce domaine concernent également l'élaboration de protocoles d'immobilisation compatibles avec la conception et la fabrication de microréacteurs. L'utilisation de microréacteurs, l'intégration de fonctions de détection et la conception de surfaces à enzymes immobilisés ont en effet été reportées comme permettant d'accélérer le développement de procédés et d'intensifier les conditions de transformations (Figure 27) [100,114].

Les outils microfluidiques s'intègrent dans l'approche nouvelle du génie des microprocédés en s'appuyant notamment sur le principe d'un procédé continu et sur l'utilisation d'unités réactionnelles élémentaires associées en parallèle pour obtenir des unités de production de forte capacité. Les microréacteurs développés selon cette approche tentent notamment de répondre aux enjeux posés par le développement durable. Dans le contexte de notre travail, traitant de la préparation de peptides par voie enzymatique (section 1.1), l'intensification est susceptible d'améliorer les conditions opératoires. Parmi les objectifs qu'il semble important d'atteindre dans ce domaine, on peut citer :

- (i) la maîtrise de la cinétique et de la sélectivité des réactions protéolytiques ;
- (ii) le couplage de procédés biocatalytiques à des procédés séparatifs ;
- (iii) la conception de procédés séparatifs raisonnés (écoconception) ;
- (iv) le développement de techniques analytiques intégrées.

La mise en œuvre de procédés d'hydrolyse de protéines à une échelle batch rend généralement compte de quelques contraintes comme la quantité élevée de catalyseurs, la difficulté de mélanger efficacement des volumes élevés ou encore l'analyse cinétique et le sondage en temps réel. Dans ce contexte, les microréacteurs peuvent jouer un rôle de premier plan afin de pallier à certains obstacles, tout en constituant une approche idéalement adaptée à la préparation de molécules à haute valeur ajoutée.

Dans l'optique de préparation de molécules par voie enzymatique, il est souvent évoqué l'immobilisation du biocatalyseur dans le but de simplifier les opérations de purification et de « recycler » l'enzyme pour profiter d'utilisations continues et successives des réacteurs. Le travail en microréacteur permet une valorisation importante des surfaces émanant du fort confinement spatial, ce qui entrevoit des performances significatives. La recherche de protocoles permettant la conception adaptée de surfaces bioactives est donc tout à fait cruciale. De façon optimale, l'étape de préparation de telles surfaces et, par extension, la fabrication

complète d'un microréacteur de type IMER, se réalise selon les principes de l'intensification, c'est-à-dire qu'elle implique idéalement l'utilisation ou la mise au point d'un procédé « propre », peu énergivore et peu coûteux.

Références

- [1] Moore G. E., "Cramming more components onto integrated circuits", *Electronics*, **38**, 1965, 114–117.
- [2] Jensen K. F., "Microreaction engineering – is small better?", *Chem. Eng. Sci.*, **56**, 2001, 293–303.
- [3] Tabeling P., "Introduction à la microfluidique", Edition Belin, 2003, 254 pages.
- [4] Whitesides G. M., "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, **442**, 2006, 368–373.
- [5] Gravesen P., Branebjerg J., Jensen O. S., "Microfluidics – a review", *J. Micromech. Microeng.*, **3**, 1993, 168–182.
- [6] Little W. A., "Microminiature refrigeration – small is better", *Physica B & C*, **109-110**, 1982, 2001–2009.
- [7] Little W. A., "Microminature refrigeration", *Rev. Scien. Instr.*, **55**, 1984, 661–680.
- [8] Terry S. C., Jerman J. H., Angell J. B., "Gas-chromatographic air analyzer fabricated on silicon-wafer", *IEEE Trans. Electron. Devices*, **26**, 1979, 1880–1886.
- [9] 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. USA*, **106**, 2009, 14195–14200.
- [10] Kaigala G. V., Lovchik R. D., Delamarche E., "Microfluidics in the "open space" for performing localized chemistry on biological interfaces", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 2012, 11224–11240.
- [11] Tran H., Killops K. L., Campos L. M., "Advancements and challenges of patterning biomolecules with sub-50 nm features", *Soft Matter*, **9**, 2013, 6578–6586.
- [12] Ding Y., Huang E., Lam K. S., Pan T., "Microfluidic impact printer with interchangeable cartridges for versatile non-contact multiplexed micropatterning", *Lab Chip*, **13**, 2013, 1902–1910.
- [13] Delaney J. T., Smith P. J., Schubert U. S., "Inkjet printing of proteins", *Soft Matter*, **5**, 2009, 4866–4877.
- [14] Apilux A., Ukita Y., Chikae M., Chailapakul O., Takamura Y., "Development of automated paper-based devices for sequential multistep sandwich enzyme-linked immunosorbent assays using inkjet printing", *Lab Chip*, **13**, 2013, 126–135.
- [15] Squires T. M., Quake S. R., "Microfluidics: fluid physics at the nanoliter scale", *Rev. Mod. Phys.*, **77**, 2005, 977–1026.
- [16] Einstein A., "Investigations on the theory of Brownian movement", New York, Dover, 1956.

- [17] Zhang Y., Ozdemir P., “Microfluidic DNA amplification: a review”, *Anal. Chim. Acta.*, **638**, 2009, 115–125.
- [18] Bashir R., “BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 2004, 1565–1586.
- [19] Andersson H., Van den Berg A., “Microfluidic devices for cellomics: a review”, *Sens. Actuators B: Chemical*, **92**, 2003, 315–325.
- [20] Ioanna G., Jürgen K., Cornie S., “BioMEMS in diagnostics: review and recent developments”, *Recent Patents Eng.*, **2**, 2008, 114–121.
- [21] Palivan C. G., Fischer-Onaca O., Delcea M., Iteľ F., Meier W., “Protein-polymer nanoreactors for medical applications”, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2012, 2800–2823.
- [22] Abbas A., Brimer A., Slocik J. M., Tian L., Naik R. R., Singamaneni S., “Multifunctional analytical platform on a paper strip: separation, pre-concentration and sub-attomolar detection”, *Anal. Chem.*, **85**, 2013, 3977–3983.
- [23] Feng X., Du W., Luo Q., Liu B.-F., “Microfluidic chip: next-generation platform for systems biology”, *Anal. Chim. Acta*, **650**, 2009, 83–97.
- [24] Neethirajan S., Kobayashi I., Nakajima M., Wu D., Nandagopal S., Lin F., “Microfluidics for food, agriculture and biosystems industries”, *Lab Chip*, **11**, 2011, 1574–1586.
- [25] Le Goff G. C., “Immobilisation de biomolécules pour l’analyse multiparamétrique sur biopuces. Application au génotypage érythrocytaire haut-débit”, *Thèse de doctorat*, Université de Lyon 1, soutenue le 14 Octobre 2011, 216 pages.
- [26] Elvira K. S., Casadevall i Solvas X., Wootton R. C. R., deMello A. J., “The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis”, *Nature Chem.*, **5**, 2013, 905–915.
- [27] deMello A. J., “Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems”, *Nature*, **442**, 2006, 394–402.
- [28] Hartman R. L., Jensen K. F., “Microchemical systems for continuous-flow synthesis”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2495–2507.
- [29] Valera F. E., Quaranta M., Moran A., Blacker J., Armstrong A., Cabral J. T., Blackmond D. G., “The flow’s the thing...or is it? Assessing the merits of homogeneous reactions in flask and flow”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 2010, 2478–2485.
- [30] Jasanek D., Franzke J., Manz A., “Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems”, *Nature*, **442**, 2006, 374–380.
- [31] Löwe H., Ehrfeld W., “State-of-the-art in microreaction technology: concepts, manufacturing and applications”, *Electrochim. Acta*, **44**, 1999, 3679–3689.
- [32] Hessel V., Hardt S., Löwe H., “Chemical micro-process engineering – Fundamentals, modeling and reactions”, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [33] Vaccaro L., Lanari D., Marrocchi A., Strappaveccia G., “Flow approaches towards sustainability”, *Green Chem.*, **16**, 2014, 3680–3704.

- [34] Newman S. G., Jensen K. F., "The role of flow in green chemistry and engineering", *Green Chem.*, **15**, 2013, 1456–1472.
- [35] Lerou J. J., Tonkovitch A. L., Silva S., Perry S., McDaniel J., "Microchannel reactor architecture enables greener processes", *Chem. Eng. Sci.*, **65**, 2010, 380.
- [36] Mills P. L., Quiram D. J., Ryley J. F., "Microreactor technology and process miniaturization for catalytic reactions – A perspective on recent developments and emerging technologies", *Chem. Eng. Sci.*, **62**, 2007, 6992–7010.
- [37] Illg T., Lob P., Hessel V., "Flow chemistry using milli- and microstructured reactors – From conventional to novel process windows", *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 2010, 3707.
- [38] Benito-Lopez F., Tiggelaar R. M., Salbut K., Huskens J., Egberink R. J. M., Reinhoudt D. N., Gardeniers H. J. G. E., Verboom W., "Substantial rate enhancements of the esterification reaction of phthalic anhydride with ethanol at high pressure and using supercritical CO₂ as a co-solvent in a glass microreactor", *Lab Chip*, **7**, 2007, 1345–1351.
- [39] Zaborenko N., Bedore M. W., Jamison T. F., Jensen K. F., "Kinetic and scale-up investigations of epoxyde aminolysis in microreactors at high temperatures and pressures", *Org. Process Res. Dev.*, **15**, 2011, 131–139.
- [40] Voloshin Y., Halder R., Lawal A., "Kinetics of hydrogen peroxide synthesis by direct combination of H₂ and O₂ in a microreactor", *Catal. Today*, **125**, 2007, 40.
- [41] Scheidtmann J., Weiss P. A., Maier W. F., "Hunting for better catalysts and material-combinatorial chemistry and high throughput technology", *Appl. Catal. A: Gen.*, **222**, 2001, 79–89.
- [42] Charpentier J. C., "Process intensification by miniaturization", *Chem. Eng. Technol.*, **28**, 2005, 255–258.
- [43] Becht S., Franke R., Geißelmann A., Hahn H., "Micro process technology as a means of process intensification", *Chem. Eng. Technol.*, **30**, 2007, 295–299.
- [44] Stankiewicz A. I., Moulijn J. A., "Process intensification: transforming chemical engineering", *Chem. Eng. Progress*, **96**, 2000, 22–34.
- [45] Brivio M., Verboom W., Reinhoudt D. M., "Miniaturized continuous flow reaction vessels: influence on chemical reactions", *Lab Chip*, **6**, 2006, 329–344.
- [46] Pommela A., Tommaiuolo G., Chartoire A., Caserta S., Toscano G., Nolan S. P., Guido S., "Palladium-N-heterocyclic carbene (NHC) catalyzed C–N bond formation in a continuous flow microreactor. Effect of process parameters and comparison with batch operation", *Chem. Eng. J.*, **223**, 2013, 578–583.
- [47] Amemiya F., Matsumoto H., Fuse K., Kashiwagi T., Kuroda C., Fuchigami T., Atobe M., "Product selectivity control induced by using liquid-liquid parallel laminar flow in a microreactor", *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 2011, 4256–4265.
- [48] Hisamoto H., Saito T., Tokeshi M., Hibara A., Kitamori T., "Fast and high conversion phase-transfer synthesis exploiting the liquid-liquid interface formed in a microchannel chip", *Chem. Commun.*, 2001, 2662–2663.

- [49] Jovanović J., Rebrov E. V., Nijhuis T. A., Kreutzer M. T., Hessel V., Schouten J. C., “Liquid-liquid flow in long capillaries: hydrodynamic flow patterns and extraction performance”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51**, 2012, 1015–1026.
- [50] Jovanović J., Rebrov E. V., Nijhuis T. A., Hessel V., Schouten J. C., “Phase-transfer catalysis in segmented flow in a microchannel: fluidic control of selectivity and productivity”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **49**, 2010, 2681–2687.
- [51] Lu Y., Xia Y., Luo G., “Phase separation of parallel laminar flow for aqueous two phase systems in branched microchannel”, *Microfluid. Nanofluid.*, **10**, 2011, 1079–1086.
- [52] Aota A., Mawatari K., Kitamori T., “Parallel multiphase microflows: fundamental physics, stabilization methods and applications”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2470–2476.
- [53] Jambovane S., Duin E. C., Kim S.-K., Hong J. W., “Determination of kinetic parameters, K_m and k_{cat} , with a single experiment on a chip”, *Anal. Chem.*, **81**, 2009, 3239–3245.
- [54] Abbas A., Treizebre A., Supiot P., Bourzgui N.-E., Guillochon D., Vercaigne-Marko D., Bocquet B., “Cold plasma functionalized Terahertz BioMEMS for enzyme reaction analysis”, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 2009, 154–160.
- [55] Siuti P., Retterer S. T., Choi C.-K., Doktycz M. J., “Enzyme reactions in nanoporous, picoliter volume containers”, *Anal. Chem.*, **84**, 2012, 1095–1097.
- [56] Kockmann N., Gottsponer M., Roberge D. M., “Scale-up concept of single-channel microreactors from process development to industrial production”, *Chem. Eng. J.*, **167**, 2011, 718–726.
- [57] Dann, E. et al., “Corningl advanced-flowTM glass reactors – the benefits are clear”, *Chim. Oggi.*, **27**, 2009, 12–13.
- [58] Jovanović J., “Liquid-liquid microreactors for phase transfer catalysis”, *Thèse de doctorat*, Université d’Eindhoven, soutenue le 14 Décembre 2011, 152 pages.
- [59] Nguyen N.-T., Wu Z., “Micromixers—a review”, *J. Micromech. Microeng.*, **15**, 2005, R1–R16.
- [60] Tabeling P., “A brief introduction to slippage, droplets and mixing in microfluidic systems”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2428–2436.
- [61] Sudarsan A. P., Ugaz V. M., “Multivortex micromixing”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 2006, 7228–7233.
- [62] Stroock A. D., Dertinger S. K. W., Adjari A., Mezić I., Stone H. A., Whitesides G. M., “Chaotic mixer for microchannels”, *Science*, **295**, 2002, 647–651.
- [63] Egawa T., Durand J. L., Hayden E. Y., Rousseau D. L., Yeh S.-R., “Design and evaluation of a passive alcove-based microfluidic mixer”, *Anal. Chem.*, **81**, 2009, 1622–1627.
- [64] Jen C.-P., Wu C.-Y., Lin Y.-C., Wu C.-Y., “Design and simulation of the micromixer with chaotic advection in twisted microchannels”, *Lab Chip*, **3**, 2003, 77–81.
- [65] Sudarsan A. P., Ugaz V. M., “Fluid mixing in planar spiral microchannels”, *Lab Chip*, **6**, 2006, 74–82.
- [66] Buchegger W., Haller A., van den Driesche S., Kraft M., Lendl B., Vellekoop M., “Studying enzymatic bioreactions in a millisecond microfluidic flow mixer”, *Biomicrofluidics*, **6**, 2012, 012803.

- [67] Delhaye C., “Spectroscopie Raman et microfluidique : application à la diffusion Raman exaltée de surface”, *Thèse de doctorat*, Université de Bordeaux 1, soutenue le 17 Décembre 2009, 202 pages.
- [68] Datta S., Ghosal S., “Characterizing dispersion in microfluidic channels”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2537–2550.
- [69] Song H., Tice J. D., Ismagilov R.F., “A microfluidic system for controlling reaction networks in time”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 2003, 767–772.
- [70] Rahman M. D. T., Rebrov E. V., “Microreactors for gold nanoparticles synthesis: from Faraday to flow”, *Processes*, **2**, 2014, 466–493.
- [71] Devasenathipathy S., Santiago J., “Microscale diagnostic techniques”, Springer, New York, USA, 2001, pages.
- [72] Taylor G., “Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube”, *Proc. Roy. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.*, **219**, 1953, 186–203.
- [73] Aris R., “On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube”, *Proc. Roy. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.*, **235**, 1956, 67–77.
- [74] Michaelis L., Menten M. L., “Die kinetik der Invertinwirkung”, *Biochem Z.*, **49**, 1913, 333–369.
- [75] Swarts J. W., Kolfschoten R. C., Jansen M. C. A. A., Janssen A. E. M., Boom R. M., “Effect of diffusion on enzyme activity in a microreactor”, *Chem. Eng. J.*, **162**, 2010, 301–307.
- [76] Miyazaki M., Maeda H., “Microchannel enzyme reactors and their applications for processing”, *Trends Biotechnol.*, **24**, 2006, 463–470.
- [77] Miyazaki M., Honda T., Yamaguchi H., M. P. P. Briones, Maeda H., “Enzymatic processing in microfluidic reactors”, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **25**, 2008, 405–428.
- [78] Peterson D. S., Rohr T., Svec F., Fréchet J. M. J., “Enzymatic microreactor-on-a-chip: protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices”, *Anal. Chem.*, **74**, 2002, 4081–4088.
- [79] Sim T. S., Kim E.-M., Joo H. S., Kim B. G., Kim Y.-K., “Application of a temperature controllable microreactor to simple and rapid protein identification using MALDI-TOF MS”, *Lab Chip*, **6**, 2006, 1056–1061.
- [80] Duan J., Sun L., Liang Z., Zhang J., Wang H., Zhang L., Zhang W., Zhang Y., “Rapid protein digestion and identification using monolithic enzymatic microreactor coupled with nano-liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A*, **1106**, 2006, 165–174.
- [81] Stigter E. C. A., de Jong G. J., van Bennekom W. P., “Pepsin immobilized in dextran-modified fused-silica capillaries for on-line protein digestion and peptide mapping”, *Anal. Chim. Acta*, **619**, 2008, 231–238.
- [82] Luk V. N., Fiddes L. K., Luk V. M., Kumacheva E., Wheeler A. R., “Digital microfluidic hydrogel microreactors for proteomics”, *Proteomics*, **12**, 2012, 1310–1318.
- [83] Ji J., Nie L., Qiao L., Li Y., Guo L., Liu B., Yang P., Girault H., “Proteolysis in microfluidic droplets: an approach to interface protein separation and peptide mass spectrometry”, *Lab Chip*, **12**, 2012, 2625–2629.

- [84] Pereira-Medrano A. G., Forster S., Fowler G. J. S., McArthur S. L., Wright P. C., "Rapid fabrication of glass/PDMS hybrid μ IMER for high throughput membrane proteomics", *Lab Chip*, **10**, 2010, 3397–3406.
- [85] Gatellier Ph., Santé-Lhoutellier V., "Digestion study of proteins from cooked meat using an enzymatic microreactor", *Meat Sci.*, **81**, 2009, 405–409.
- [86] Seong G. H., Heo J., Crooks R. M., "Measurement of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system", *Anal. Chem.*, **75**, 2003, 3161–3167.
- [87] Bui M.-P. N., Li C. A., Han K. N., Choo J., Lee E. K., Seong G. H., "Enzyme kinetic measurements using a droplet-based microfluidic system with a concentration gradient", *Anal. Chem.*, **83**, 2011, 1603–1608.
- [88] Xie Y., Ahmed D., Lapsley M. I., Lin S.-C. S., Nawaz A. A., Wang L., Huang T. J., "Single-shot characterization of enzymatic reactions constants K_m and k_{cat} by an acoustic-driven, bubble-based fast micromixer", *Anal. Chem.*, **84**, 2012, 7495–7501.
- [89] Han Z., Li W., Huang Y., Zheng B., "Measuring rapid enzymatic kinetics by electrochemical method in droplet-based microfluidic devices with pneumatic valves", *Anal. Chem.*, **81**, 2009, 5840–5845.
- [90] Ristenpart W. D., Wan J., Stone H. A., "Enzymatic reactions in microfluidic devices: Michaelis-Menten kinetics", *Anal. Chem.*, **80**, 2008, 3270–3276.
- [91] Ristenpart W. D., Stone H. A., "Michaelis-Menten kinetics in shear flow: similarity solutions for multi-step reactions", *Biomicrofluidics*, **6**, 2012, 014108.
- [92] Yamashita K., Miyazaki M., Nakamura H., Maeda H., "Nonimmobilized enzyme that rely on laminar flow", *J. Phys. Chem. A*, **113**, 2009, 165–169.
- [93] Wang C., Li S.-J., Wu Z.-Q., Xu J.-J., Chen H.-Y., Xia X.-H., "Study on the kinetics of homogeneous enzyme reactions in a micro/nanofluidic device", *Lab Chip*, **10**, 2010, 639–646.
- [94] Wang C., Sheng Z.-H., Ouyang J., Xu J.-J., Chen H.-Y., Xia X.-H., "Nanoconfinement effects: glucose oxidase reaction kinetics in nanofluidics", *ChemPhysChem*, **13**, 2012, 762–768.
- [95] Karande R., Schmid A., Buehler K., "Miniaturizing biocatalysis: enzyme catalyzed-reactions in an aqueous/organic segmented flow capillary microreactor", *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2011, 2511–2521.
- [96] Kundu S., Bhangale A. S., Wallace W. E., Flynn K. M., Guttman C. M., Gross R. A., Beers K. L., "Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor", *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2011, 6006–6011.
- [97] Lloret L., Eibes G., Moreira M. T., Feijoo G., Lema J. M., Miyazaki M., "Improving the catalytic performance of laccase using a novel continuous-flow microreactor", *Chem. Eng. J.*, **223**, 2013, 497–506.
- [98] Pohar A., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/*n*-heptane two-phase system at the microreactor scale", *Lab Chip*, **9**, 2009, 3385–3390.
- [99] Matsuura S.-I., Yokoyama T., Ishii R., Itoh T., Tomon E., Hamakawa S., Tsunoda T., Mizukami F., Nanbu H., Hanaoka T.-A., "An enzyme-encapsulated microreactor for efficient theanine synthesis", *Chem. Commun.*, **48**, 2012, 7058–7060.

- [100] Bolivar J. M., Wiesbauer J., Nidetsky B., “Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream?”, *Trends Biotechnol.*, **29**, 2011, 333–342.
- [101] Hessel V., Tibhe J., Noël T., Wang Q., “Biotechnical micro-flow processing at the EDGE – Lessons to be learnt from a young discipline”, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **28**, 2014, 167–188.
- [102] Lomel S., Falk L., Commenge J. M., Houzelot J. L., Ramdani K., “The microreactor, a systematic and efficient tool for the transition from batch to continuous process”, *Chem. Eng. Res. Des.*, **84**, 2006, 363–369.
- [103] Roberge D. M., Zimmermann B., Rainone F., Gottsponer M., Eyholzer M., Kockmann N., “Microreactor technology and continuous processes in the fine chemical and pharmaceutical industry: is the revolution underway?”, *Org. Proc. Res. Dev.*, **12**, 2008, 905–910.
- [104] Kralj J. G., Sahoo H. R., Jensen K. F., “Integrated continuous microfluidic liquid-liquid extraction”, *Lab Chip*, **7**, 2007, 256–263.
- [105] Dessimov A. L., Cavin L., Renken A., Kiwi-Minsker L., “Liqui-liquid two-phase flow patterns and mass transfer characteristics in rectangular glass microreactors”, *Chem. Eng. Sci.*, **63**, 2008, 4035–4044.
- [106] Fries D. M., Voithl T., von Rohr P. R., “Liquid extraction of vanillin in rectangular microreactors”, *Chem. Eng. Technol.*, **31**, 2008, 1182–1187.
- [107] Li S., Jing S., Luo Q., Chen J., Luo G., “Bionic system for countercurrent multi-stage micro-extraction”, *RSC Adv.*, **2**, 2012, 10817–10820.
- [108] Tetala K. K. R., Swarts J. W., Chen B., Janssen A. E. M., van Beek T. A., “A three-phase microfluidic chip for rapid sample clean-up of alkaloids from plant extracts”, *Lab Chip*, **9**, 2009, 2085–2092.
- [109] Mu X., Liang Q., Hu P., Ren K., Wang Y., Luo G., “Selectively modified microfluidic chip for solvent extraction of *Radix Salvia Miltiorrhiza* using three-phase laminar flow to provide double liquid-liquid interface area”, *Microfluid. Nanofluid.*, **93**, 2010, 365–373.
- [110] Anastas P., Warner J., “Green chemistry: theory and practice”, Oxford University Press, New York, 1998.
- [111] Šalic A., Tušek A., Zelić B., “Application of microreactors in medicine and biomedicine”, *J. Appl. Biomed.*, **10**, 2012, 137–153.
- [112] O’Sullivan B., Al-Bahrani H., Lawrence J., Campos M., Cázares A., Baganz F., Wohlgemuth R., Hailes H. C., Szita N., “Modular microfluidic reactor and inline filtration system for the biocatalytic synthesis of chiral metabolites”, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **77**, 2012, 1–8.
- [113] Mohr S., Fisher K., Scrutton N. S., Godard N. J., Fielden P. R., “Continuous two-phase flow miniaturised bioreactor for monitoring anaerobic biocatalysis by pentaerythritol tetranitrate reductase”, *Lab Chip*, **10**, 2010, 1929–1936.
- [114] McMullen J. P., Jensen K. F., “Integrated microreactors for reaction automation: new approaches to reaction development”, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **3**, 2010, 19–42.

2.4. Immobilisation d'enzyme et plasmas froids pour la conception de surfaces bioactives : vers une microfabrication simple et *bio-intégrante*

L'ingénierie de surface à l'échelle des dispositifs micrométriques tels les biocapteurs ou les microréacteurs nécessite l'utilisation d'outils performants et adaptés à la conception d'interfaces robustes. C'est dans ce cadre que ce dernier chapitre bibliographique s'intéresse à la conception de revêtements de surface bioactifs par la technologie des plasmas froids. Après une courte présentation des supports et des méthodologies majeures d'immobilisation enzymatique, la spécificité des plasmas dans l'obtention de films fonctionnels et polymères est exposée. Ensuite, quelques stratégies majeures de traitement de surface par plasma pour immobiliser des enzymes sont abordées. Enfin, plus spécifiquement à notre étude, quelques précisions concernant la réalisation et les caractéristiques des films obtenus par RPECVD (Remote Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition) à partir de tétraméthylsiloxane (TMDSO) sont apportées. Leur potentialité dans l'immobilisation d'enzymes et dans la réalisation de canaux microfluidiques est par ailleurs présentée en relation avec nos objectifs et les perspectives pouvant être données par ce travail.

2.4.1. Immobilisation d'enzymes : un aperçu des méthodologies majeures

Dès 1916, Nelson et Griffin ont constaté que l'invertase, catalysant l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose, conservait son activité lorsqu'elle était adsorbée sur du charbon actif ou de l'hydroxyde d'aluminium [1]. La possibilité d'immobiliser un enzyme pour une utilisation en réacteur continu ou pour sa récupération et sa réutilisation a ainsi permis d'envisager leur mise en œuvre à l'échelle industrielle. Le développement massif de méthodologies d'immobilisation devait permettre d'améliorer de manière significative la mise en œuvre d'un procédé enzymatique tout en diminuant le coût associé à l'utilisation d'enzyme [2]. Par ailleurs, une augmentation significative de la stabilité de l'enzyme est généralement constatée, celle-ci étant conférée par un maintien de la structure tridimensionnelle active. Rappelons en outre que dans les systèmes vivants ou dans la nature, les enzymes n'agissent quasiment qu'à l'état immobilisé, par exemple sur la surface des structures membranaires d'une cellule ou d'un organelle cellulaire, ou encore adsorbés sur les composés argileux et humiques dans les sols. L'immobilisation d'un enzyme sur un support de nature connue peut alors servir à déterminer l'effet du microenvironnement sur son activité catalytique. Ces conditions permettent ainsi de mieux de mieux appréhender le fonctionnement *in vivo* d'un système vivant, ce que ne permet

pas automatiquement une étude du comportement cinétique d'un enzyme en solution homogène.

Dans certains cas, l'immobilisation d'un enzyme permet aussi de limiter sa sensibilité vis-à-vis de son environnement, autorisant ainsi son emploi dans des conditions opératoires plus agressives qu'à ses optimums comme des températures élevées, des pH extrêmes, ou encore des concentrations élevées de substrat ou des solvants organiques [3]. Plus rarement, l'immobilisation peut induire une modification dans la spécificité ou la sélectivité aux substrats, d'énantiosélectivité ou encore de réactivité [4,5].

Le développement actuel des micro- et nanobiotechnologies permet de redécouvrir les diverses méthodes d'immobilisation massivement mises au point depuis le début des années soixante. Comme l'attestent les milliers de brevets et de publications disponibles dans ce domaine, il est impossible de prétendre être exhaustif bien que quelques méthodologies majeures se révèlent. Le choix de la stratégie d'immobilisation dépend généralement de plusieurs critères conditionnant l'efficacité globale du procédé enzymatique.

Les performances d'un système à enzymes immobilisés sont dépendantes de plusieurs facteurs parmi lesquels le choix de la méthodologie d'immobilisation. Outre certaines exigences économiques ou environnementales, il peut notamment dépendre :

- du choix du support, lui-même limité par le choix des matériaux composant le système (contrainte pouvant néanmoins être surmontée dans certains cas par un prétraitement de surface) ;
- de la chimie d'immobilisation, ou la nécessité éventuelle d'orientation des biomolécules.

2.4.1.1. Nature du support

Relativement rare mais pouvant être mentionnée, l'immobilisation d'enzyme sans support dite *carrier free* est mise en œuvre par l'agrégation d'enzymes entre elles [2]. Elle est effectuée dans un solvant spécifique et souvent par ajout d'un agent pontant tel que le glutaraldéhyde.

Pour les principales méthodologies, le choix du support est principalement lié à l'application visée. D'une manière générale, les critères conditionnant ce choix peuvent être :

- l'homogénéité chimique et la stabilité (chimique, mécanique) ;
- les propriétés de surfaces (mouillabilité, polarité...) ;
- d'éventuelles propriétés optiques ;
- l'étendue des réactions de modification de surface permise (réactivité, compatibilité) ;
- la facilité de mise en œuvre de ce support et la reproductibilité dans sa préparation.

Dans le segment des micro- et nanobiotechnologies, les supports se limitent généralement à ceux classiquement utilisés en microtechnologie et pour lesquels divers traitements et opérations de gravure, d'assemblage ou de matriçage sont réalisables. L'incorporation de tels supports dans des procédés de microfabrication mènent en effet parfois à des dispositifs d'un niveau de sophistication extrême nécessitant différentes opérations. Par conséquent, ces dernières sont susceptibles de limiter le choix du support dans la gamme existante. Dans « *Chemical strategies for generating protein biochips* » [6], Jonkheijm *et al.* énumèrent la plupart des supports utilisés pour immobiliser des biomolécules à l'échelle de la microfluidique. Ils sont ici succinctement décrits d'après cette revue.

2.4.1.1.1. Supports à deux dimensions

Supports plans classiques

Le verre s'est rapidement imposé comme surface de référence grâce à ses propriétés optiques. C'est le support de choix pour l'immobilisation des séquences d'ADN dans la conception de puces. Il est généralement employé sous le format standard d'une lame de microscope. Son attrait tient d'abord à son importante résistance physique et chimique : inerte, durable, il peut supporter de hautes températures et ses propriétés de surface restent stables en milieu aqueux [7]. De plus, sa transparence et sa faible fluorescence intrinsèque le rendent particulièrement intéressant pour le développement de capteurs optiques. Enfin, les stratégies de modification de surface sont bien connues et maîtrisées pour ce matériau. A titre d'exemple, la voie la plus couramment employée consiste à activer le verre dans une première étape par un traitement oxydant, tel qu'un plasma d'oxygène ou la solution « piranha » ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$), afin de générer en surface des groupements silanols réactifs (Si-OH) [6].

Le quartz, autre silicate, est également utilisé pour ses propriétés similaires, en particulier pour les capteurs optiques. C'est notamment le support utilisé par Affymetrix, leader dans le domaine des puces à oligonucléotides à détection optique.

Le silicium s'est distingué dans l'industrie des semi-conducteurs par ses propriétés électriques mais aussi par son excellente résistance aux solvants et sa bonne stabilité mécanique. Sa faible fluorescence intrinsèque est encore une fois un atout. Cependant, le silicium s'oxydant spontanément à l'air, une étape d'activation de surface est parfois nécessaire en vue d'une fonctionnalisation. Une première voie d'activation consiste à générer des fonctions Si-H en surface par un traitement par l'acide fluorhydrique, puis à les coupler avec des alcènes fonctionnalisés. Un plasma d'oxygène créera quant à lui des fonctions Si-OH, ouvrant la voie à diverses méthodes d'activation par des organosilanes. Ces deux voies sont illustrées ci-après (Figure 28).

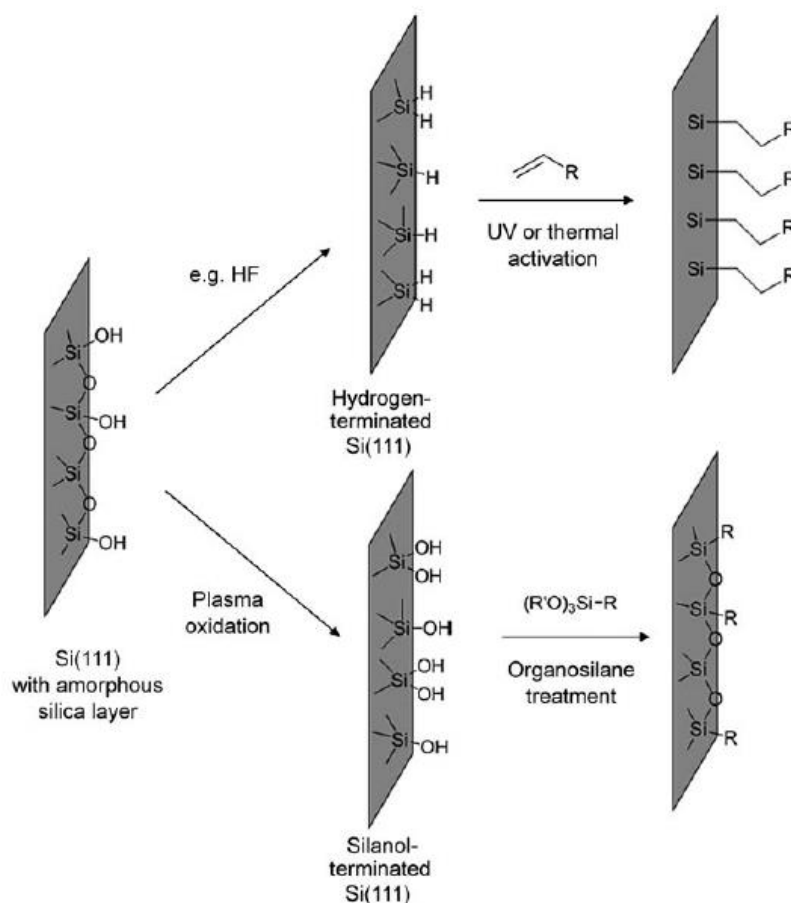


Figure 28. Exemples de voies d'activation du silicium pour la fonctionnalisation. La surface du silicium (Si (111)) peut être traitée par de l'acide fluorhydrique (HF) ou par un plasma d'oxygène [6].

L'or constitue une surface métallique très utilisée, généralement sous la forme d'une mince couche recouvrant un support en verre principalement pour les capteurs à détection électrochimique ou par résonance de plasmons de surface. L'activation la plus courante est la formation en surface de monocouches auto-assemblées de thiols pour l'intégration de nouveaux groupes fonctionnels, la chimie or-thiol étant bien maîtrisée et facile à mettre en œuvre.

Supports plans polymériques

Le développement de supports à base de polymère s'est rapidement démocratisé conjointement à leur utilisation pour la conception de dispositif de type μ TAS ou *Lab on a chip*. L'engouement pour ces matériaux, dont les plus connus sont le PMMA et le PDMS, peut s'expliquer par la facilité relative de mise en œuvre des protocoles d'usinage, leur bas coût ainsi que leur disponibilité. Les techniques d'usinage de masse issues de l'industrie des polymères ou des semi-conducteurs sont transposables à ces matériaux [8]. Le polystyrène est également employé comme support d'immobilisation de biomolécules [9], il est notamment largement utilisé pour les tests ELISA. Elastomère, le PDMS est vite devenu un standard dans la fabrication de microsystèmes microfluidiques [10].

Cependant, la plupart de ces matériaux étant inertes chimiquement, le recours à des méthodes d'activation par plasma d'oxygène [11] ou à des couplages photochimiques [12] se révèle parfois nécessaire afin d'obtenir des surfaces réactives pour le greffage covalent d'entités. Cependant, il a été montré que l'immobilisation directe de biomolécules sans prétraitement au sein de supports polymériques est possible [13]. Par ailleurs, les propriétés chimiques et mécaniques de certains polymères autorisent des voies innovantes de matriçage (*patterning*) de biomolécules [14], mais aussi de microfabrication [15].

2.4.1.1.2. Supports à trois dimensions

Les supports à trois dimensions sont poreux et leur surface spécifique peut permettre d'immobiliser une densité de biomolécules très importante en comparaison aux supports plans. Cependant, l'interaction entre l'espèce libre et l'espèce immobilisée reste limitée par les contraintes de diffusion prenant place au sein du support.

Parmi ces types de supports on retrouve majoritairement *des polymères* et *des supports poreux inorganiques*. Parmi ces derniers, l'alumine est souvent mise en œuvre en raison de son coût modérée et de sa structuration présentant une flexibilité de la taille des pores. Aussi, de nombreuses voies d'activation chimique de sa surface sont disponibles, notamment des méthodes de silanisation.

Les supports de type polymère sont souvent des membranes ou des hydrogels. Les plus connues des membranes sont celles à base de polymères organiques comme la nitrocellulose ou le polyéthersulfone qui sont disponibles commercialement. Les hydrogels, créés par une polymérisation photo- ou thermo- induite, sont souvent utilisés en raison de propriétés hydrophiles biocompatibles. Le polyacrylamide constitue le polymère composant les hydrogels les plus classiquement mis en œuvre mais il en existe une variété importante pouvant être classée en deux groupes :

- les polymères neutres (poly-(vinylalcool) (PVA), poly-(éthylèneglycol) (PEG)...)
- les polymères ioniques (poly-(acide acrylique) (PAA), poly-(acide méthacrylique (PMAA), le poly-(acrylamide (PAAm))

Bien évidemment, le choix du support et de la méthodologie d'immobilisation est fortement motivé par l'application visée. Ainsi, il existe une panoplie de procédures expérimentales permettant de déterminer quatre natures distinctes d'immobilisation enzymatique.

2.4.1.2. Immobilisation chimique de l'enzyme

2.4.1.2.1. Liaison covalente de l'enzyme

La méthodologie la plus couramment employée afin de limiter au maximum le relargage de l'enzyme après son immobilisation est la fixation covalente de celle-ci au support. Il est alors nécessaire d'impliquer les groupes fonctionnels à la surface de la molécule d'enzyme afin d'établir une liaison covalente avec le support. Les groupements impliqués peuvent être de différentes natures :

- amine primaire : groupes N-terminal et lysine ;
- acide carboxylique : groupes C-terminal et acides aspartiques et glutamique ;
- thiol : cystéine ;
- phénol : tyrosine ;

- imidazole : histidine ;
- hydroxyle : sérine et thréonine ;
- fraction glucidique des glyco-enzymes.

L'établissement de la liaison covalente doit préférentiellement se faire dans des conditions relativement douces afin d'éviter toute dénaturation irréversible de l'enzyme. Aussi, il est important d'éviter toute formation de liaison covalente avec des groupes fonctionnels nécessaire à l'activité catalytique afin de préserver le site catalytique de l'enzyme. Parfois, l'ajout de *spacers* entre la fonction réactive et l'enzyme est effectué afin d'éviter la dénaturation des enzymes fixés ou de leur accorder plus de liberté d'un point de vue stérique. Le plus commun d'entre eux est sans doute le glutaraldéhyde.

Deux méthodes d'immobilisation covalente se distinguent : l'immobilisation covalente sur support insoluble et l'immobilisation par réticulation.

Immobilisation covalente sur support

Le principe de cette méthode repose principalement sur la mise en contact des molécules d'enzymes avec un support activé, portant des groupes suffisamment réactifs pour réagir avec ceux de l'enzyme dans des conditions compatibles avec la préservation de l'activité catalytique.

L'activation des supports peut se faire :

- par voie chimique ;
- par irradiation UV ou activation photochimique ;
- par traitement plasma (*cf* section 2.4.2.3.1.).

A titre d'exemple, il est possible de citer la stratégie par voie chimique développée par la société américaine Corning Glass pour immobiliser la glucose isomérase. Des verres poreux aminés sont utilisés par greffage de γ -amino-propyl-triéthoxy-silane (APTES) activé par le glutaraldéhyde ($\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$). Ce réactif établit des ponts covalents (liaisons imines stabilisées) entre les groupes aminés du support et ceux de l'enzyme. Un autre exemple schématise l'activation de surfaces aminées par carbodiimide et glutaraldéhyde (Figure 29) [16].

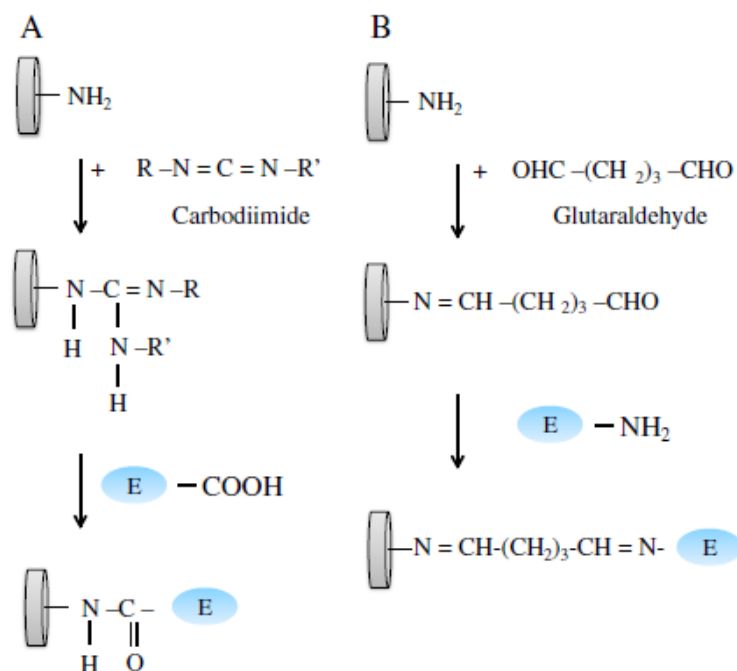


Figure 29. Exemple d'immobilisation enzymatique sur une surface aminée par couplage par (A) carbodiimide et (B) glutaraldéhyde [16].

Immobilisation par réticulation

Ici, le principe est de ponter les molécules d'enzymes entre elles, ou entre elles et d'autres protéines, afin d'obtenir des macrostructures insolubles. Un réactif polyfonctionnel tel que le glutaraldéhyde est utilisé pour y parvenir. Les enzymes sont liées entre eux pour former leur propre support insoluble appelé CLEs (*Cross Linked Enzymes*). Pour la formation de CLEAs (*Cross Linked Enzyme Aggregates*), la technique consiste d'abord à précipiter l'enzyme avant d'ajouter l'agent réticulant. Pour la formation de CLECs, (*Cross Linked Enzyme Crystals*) une cristallisation des enzymes remplace l'étape de précipitation [2].

Les CLEAs peuvent être modifiés en opérant la réticulation en présence d'un monomère permettant d'amorcer une co-polymérisation sous certaines conditions. Des complexes CLEAs-polymères peuvent ainsi être obtenus, autorisant parfois une charge en enzyme plus importante.

2.4.1.2.2. Liaison par affinité chimique

L'interaction par bio-affinité ou interaction moléculaire entre biomolécules peut être un moyen d'immobiliser un enzyme. C'est une méthode à l'origine d'une fixation orientée et spécifique

mais qui souffre d'une préparation contraignante voire délicate pour certains enzymes. Elle impose souvent une interaction de type :

- *biotine/streptavidine*, dont la forte affinité ($K_d \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$) permet d'envisager la fonctionnalisation de biomolécules par un groupement biotine suivi par l'immobilisation sur une surface de streptavidine ou l'inverse [17];
- *étiquette poly-histidine*, étiquette d'affinité parmi la plus répandue mettant en jeu six acides aminés histidine successifs et introduite par génie génétique. Cette étiquette interagit fortement avec certains cations métalliques divalents comme l'ion Nickel (II) (Ni^{2+}). La surface est fréquemment activée par l'acide nitriloacétique (NTA) qui forme avec le cation Ni^{2+} un complexe hexagonal dont deux positions vacantes permettent de lier la poly-histidine [17].

Dans le cas de l'immobilisation d'enzymes, cette méthode est peu utilisée en raison de son coût généralement plus élevé que les autres stratégies. Un autre frein repose sur la complexité relative de la préparation.

2.4.1.3. Immobilisation physique de l'enzyme

2.4.1.3.1. Adsorption

L'immobilisation par adsorption repose sur l'établissement de liaisons de faible niveau énergétique (van der Waals, ionique, hydrogène, hydrophobe mais encore pont métallique, transfert de charges, échange de ligands...) entre les groupes fonctionnels situés à la surface de l'enzyme et ceux présents à la surface du support insoluble.

Les paramètres qui conditionnent l'efficacité de l'adsorption sont généralement :

- *la concentration d'enzyme* (la description par des isothermes de type Freundlich ou Langmuir peut décrire la relation entre la masse d'enzyme adsorbés et la concentration d'enzyme à l'équilibre. Elle renseigne sur le palier de saturation du support) ;
- *l'aire spécifique disponible* (pouvant être décrite de différentes façons, généralement par unités de masse de support pour la majorité d'entre eux). Elle peut notamment dépendre de la taille des particules et de la porosité du support, mais aussi de la taille de la molécule d'enzyme (ainsi que du ou des substrats et produits) ;

- *le temps de contact* : le phénomène d'adsorption est d'autant plus rapide que la granulométrie du support est faible et que la diffusivité de l'enzyme est élevée ;
- *le milieu* : l'adsorption repose sur un phénomène de partage des molécules d'enzymes entre la solution et le support. Des additifs tendant à diminuer la solubilité de l'enzyme (sels, solvants miscibles à l'eau...) favoriseront donc son adsorption. De même, l'adsorption sera d'autant plus efficace que le pH du milieu se rapproche du point isoélectrique de l'enzyme ;
- *la température*.

Le principal avantage de l'immobilisation par adsorption est sa simplicité de mise en œuvre puisqu'il suffit de mettre en contact la préparation d'enzyme avec le support. De plus, il est possible de procéder à une « régénération » du support en désorbant l'enzyme qui est devenue inactive ou trop peu active et en le remplaçant par une nouvelle préparation d'enzymes actives. C'est ce principe qui a été adopté par la société japonaise Tanabe Seiyaku dans la première application industrielle d'enzymes immobilisés : la production de L-méthionine à partir d'un mélange racémique de N-acétyl-D,L-méthionine à l'aide d'une acylase énantiosélective d'*Aspergillus Oryzae* adsorbées sur DEAE-Sephadex. Le même support a pu être utilisé pendant cinq années, diminuant ainsi significativement le coût de production par rapport au procédé faisant intervenir l'enzyme en condition homogène.

Le principal inconvénient reste le risque de désorption de l'enzyme dont l'interaction avec le support ne présente que peu de résistance aux contraintes chimiques et mécaniques. Ce risque est cependant fortement limité lorsque l'enzyme immobilisé agit en milieu non aqueux, du fait de l'absence ou de la faible solubilité de celui-ci. C'est le cas de la préparation de la lipase B de *Candida Antarctica* (CalB) commercialisées par Novozymes sous forme immobilisé sur une résine acrylique macroporeuse (Novozym 435).

2.4.1.3.2. Piégeage stérique de l'enzyme au sein du support : inclusion et confinement

Lorsque l'enzyme est retenu physiquement à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, on parle d'inclusion. Lorsque l'enzyme est retenu à l'intérieur d'un volume défini, soit par une membrane, soit dans une microcapsule, on parlera plutôt de confinement, voire d'encapsulation. Cette rétention peut éventuellement être accompagnée d'une réticulation covalente par un réactif plurifonctionnel.

Lorsque l'enzyme est piégé au sein du support, ce dernier n'existe généralement pas avant l'immobilisation mais se forme de façon concomitante au piégeage de l'enzyme. Néanmoins, certains cas montrent que l'enzyme peut également être piégé à la surface d'un support à la suite d'un recouvrement de celui-ci par un polymère [18].

Inclusion dans une matrice

L'inclusion dans un gel ou un réseau de type polymère peut être réalisé par divers procédés et au sein de divers matrice. Les procédés les plus couramment employés pour obtenir ce type de matrice restent les procédés de polymérisation (électro- ou photopolymérisation ou encore la polymérisation assistée par plasma décrite section 2.4.2.2.2.) et les procédés sol-gel [16].

Du fait de leur porosité élevée, les gels obtenus à partir de polysaccharides gélifiants (carraghénanes et alginates) sont souvent mis en œuvre dans l'immobilisation d'enzymes présentant un volume hydrodynamique élevé. Leur faible coût, leur disponibilité ainsi que leur caractère naturel sont des avantages certains qui permettent leur application dans le domaine agroalimentaire. Dans le domaine des biocapteurs, des polymères photoréticulables tels que le poly(vinyl alcool) sont largement utilisés [16].

Inclusion dans un volume défini par une matrice

Des microcapsules contenant des enzymes peuvent être obtenues par des méthodes de polymérisation interfaciale. Celles-ci mettent en jeu la réaction d'un monomère hydrophile d'une phase aqueuse contenant l'enzyme avec un monomère hydrophobe réactif dispersée dans une phase organique. Par exemple, la réaction de l'hexaméthylène diamine avec le chlorure de sébacoyl ou d'adipoyl conduit à la formation d'une membrane polyamide. Les techniques de préparation de membranes liquides ou de liposomes peuvent aussi être employées.

Le volume défini par une membrane semi-perméable peut également servir à confiner un enzyme. Les membranes planes ou fibres creuses telles que celles utilisées en ultra- et nanofiltration présentent une géométrie adaptée à la conception de membranes catalytiques [19]. Des réacteurs à membrane semi-perméable s'appliquent parfaitement à l'hydrolyse d'un substrat macromoléculaire comme une protéine générant une diversité importante de peptides. Un procédé de cette nature peut apporter une sélectivité intéressante dans l'obtention de

peptides spécifiques, comme c'est le cas pour l'hydrolyse de protéines de lait dans l'obtention de peptides à usage nutritionnel.

L'immobilisation d'un enzyme au sein d'un microréacteur ou d'un biocapteur demande une préparation minutieuse des surfaces disponibles afin d'assurer la fixation recherchée et un maintien optimal de l'activité. La technologie plasma est un outil approprié permettant de traiter et modifier une grande variété de surface, facilitant ainsi la préparation de supports ou de structures propices à divers protocoles d'immobilisation enzymatique.

2.4.2. Les plasmas froids comme outil d'ingénierie de surface

2.4.2.1. Physique des plasmas et mécanismes d'obtention

Les états communément reconnus de la matière sont les états solide, liquide et gazeux. La transformation respective d'un état vers un autre est obtenue par un apport externe d'énergie. Un apport supplémentaire d'énergie à l'état gazeux aboutit à l'ionisation partielle ou complète de ce gaz, c'est-à-dire au détachement d'électrons de certains atomes ou molécules entrant dans sa composition. Le terme *plasma*, qui aurait été originellement désigné comme tel par Langmuir en 1928 [20], décrit ce milieu comme un mélange d'atomes neutres, d'ions, de molécules et d'électrons formant le quatrième état de la matière. Dans le cas d'une ionisation complète, la composition du plasma se limite aux ions et électrons. Ces derniers constituent des charges électriques libres rendant un plasma électriquement conducteur, chimiquement très réactif et hautement sensible au champ électromagnétique. Un plasma peut donc être considéré comme un volume conducteur électriquement neutre où la densité des espèces négatives (électrons et anions) est rééquilibrée par celle des ions positifs.

Les plasmas peuvent être générés dans un gaz par un apport d'énergie mécanique, thermique, chimique (réactions exothermiques), nucléaire ou électromagnétique (décharges DC (à courant continu, *direct current* en anglais), RF (RadioFréquences), MW (microondes), laser), ou par la combinaison de certains de ces éléments. Les électrons chauds présents dans les décharges luminescentes créées provoquent des réactions d'ionisation, d'attachements électroniques, d'excitation et de dissociation lors des collisions inélastiques avec les molécules du gaz vecteur. Les ions et radicaux formés réagissent à leur tour avec les atomes et molécules du gaz. La température d'un plasma est déterminée par les énergies moyennes des particules neutres et

chargées qui le composent et leur degré de liberté (translationnelle, rotationnelle, vibrationnelle et d'excitation électronique). Les plasmas de laboratoires peuvent être essentiellement classés en deux grandes catégories: les plasmas thermiques dits à l'équilibre (proche de l'équilibre thermodynamique) et les plasmas non thermiques, également appelés plasmas hors équilibre ou encore plasma froids.

Plasmas thermiques

Les plasmas thermiques sont constitués d'espèces ayant toutes la même énergie cinétique. La température des espèces lourdes est identique à celle des électrons si bien que le plasma se trouve dans un équilibre thermodynamique. C'est un plasma généré à pression atmosphérique induisant suffisamment de collisions au sein du gaz plasmagène pour que les espèces lourdes atteignent des températures équivalentes à celles des électrons. Les caractéristiques d'un tel plasma sont [21,22] :

- la température des espèces¹² $T : T_{e^-} \approx T_i \approx T_n \approx 0.1\text{-}2 \text{ eV}$ soit $1000\text{-}23000 \text{ K}$ ($1 \text{ eV} = 11600 \text{ K}$) ;
- la densité des particules chargées $n : n_i \approx n_{e^-} \approx 10^{14}\text{-}10^{19} \text{ cm}^{-3}$;
- la pression : $p \geq 10^5 \text{ Pa}$;
- le degré d'ionisation¹³ : $\geq 10^{-4}$ (jusqu'à 1)

Plasmas froids

Les plasmas froids se distinguent du plasma thermique car ils sont principalement générés dans un gaz à pression réduite ou atmosphérique, ou parfois à basse puissance ou avec des systèmes de décharges pulsées. Les électrons y ont une énergie cinétique et donc une température bien plus importante que celles des ions et molécules neutres, qui restent « froids », donnant au gaz une température proche de la température ambiante. Les limites des caractéristiques suivantes indiquent les domaines typiques d'apparition de ces milieux hors de l'équilibre thermodynamique [21,22]:

- $T_{e^-} \approx 0\text{-}20 \text{ eV}$ soit $0\text{-}230\,000 \text{ K}$;
- $T_i \approx T_n \approx 0.02\text{-}0.04$ soit $300\text{-}1000 \text{ K}$;

¹² La notion de température des électrons devient délicate à définir dans certains cas car la distribution en énergie cinétique s'écarte significativement de la loi de Maxwell-Boltzmann lorsque la pression diminue [22].

¹³ Le degré d'ionisation correspond au rapport de la densité des espèces chargées à celle de l'ensemble des espèces.

- $n_i \approx n_e \approx 10^9\text{-}10^{12} \text{ cm}^{-3}$;
- $10^{-2} \text{ Pa} \leq p \leq 10^5 \text{ Pa}$;
- un degré d'ionisation autour de $10^{-4}\text{-}10^{-6}$.

Les décharges les plus courantes utilisées pour créer des plasmas froids sont les décharges basses fréquences, radiofréquences et microondes. C'est de la fréquence excitatrice appliquée par le générateur que va dépendre le comportement des ions et des électrons. Les plasmas générés à basse fréquence (25-450 KHz) rendent généralement compte d'un comportement similaire des ions de plus faible masse et électrons dans le suivi des variations du champ électrique. En revanche, pour les plasmas radiofréquences (1-500 MHz) et hyperfréquences (2450 MHz), les électrons suivent les variations du champ électrique alors que les ions y sont de moins en moins sensibles avec l'augmentation de fréquence. Selon la fréquence appliquée, il est ainsi possible de favoriser ou non le bombardement ionique sur le substrat (support). Pour les dépôts de matière, ce paramètre peut être utilisé pour modifier la densité du film que l'on souhaite déposer, sa structure ou encore sa vitesse de formation.

La spécificité et les caractéristiques des plasmas froids leur confèrent des avantages certains par rapport aux techniques classiques de modification de surface en milieu liquide ou vapeur [23]. Parmi ces avantages, on peut citer [23,24]:

- la modification chimique de la surface sans affecter les propriétés intrinsèques du matériau traité ;
- la formation de polymères avec de nombreux composants organiques ou organosiliciés quand la polymérisation chimique conventionnelle nécessite en général des monomères spécifiques ;
- l'utilisation de faibles quantités de matière sans recours à des catalyseurs toxiques ou polluants ;
- le développement d'une chimie de surface très spécifique, contrôlée par le choix des gaz de traitement et leur mélange ;
- le traitement de surfaces de composition chimique hétérogène et de formes variées ;
- une meilleure maîtrise du dépôt à l'échelle nanométrique (épaisseur, fonctionnalité...) pouvant être atteinte par un réglage des paramètres physique lors des dépôts (pression, puissance, flux des gaz...) ;
- une adaptation à l'échelle industrielle par la mise en œuvre de traitements de surface en défilé à haute vitesse par des plasmas générés à pression atmosphérique.

Plus généralement, les caractéristiques physico-chimiques des plasmas les rendent très attractifs dans de nombreux secteurs. Leurs applications touchent des domaines aussi différents que la microfabrication en microélectronique, le dépôt de revêtements de surface protecteurs pour l'industrie automobile, aéronautique ou textile, la conversion d'énergie, la production d'hydrogène et d'ozone, la stérilisation de surface ou d'outils médicaux, les lampes à néons ou encore la télévision dite à écran plasma. Outre ces applications, les plasmas formeraient plus de 99% de la matière visible de l'univers.

La modification de surface par plasma couvre un large éventail de techniques, de procédés et de réacteurs. Elle peut servir à structurer une surface par gravure, à modifier son caractère hydrophile/hydrophobe, à la fonctionnaliser ou encore à la traiter par une couche mince via un dépôt chimique en phase vapeur.

2.4.2.2. Types de traitements assistés par plasma

2.4.2.2.1. Traitements de surface des substrats par plasma

Un plasma peut être utilisé en microfabrication dans le cas de la structuration d'un substrat par *gravure*. Différents types de gravure peuvent être obtenus en jouant sur la nature du plasma contenant les ions. Les types les plus couramment mis en œuvre sont [25]:

- *la gravure physique*, dont on peut citer la gravure sèche du silicium, attaqué suivant un mouvement de type ballistique par une espèce ionique contenu dans un plasma. La gravure peut être isotrope ou anisotrope suivant les conditions ;
- *la gravure chimique*, où le mouvement des espèces réactives et ions est diffusif. On peut citer les systèmes impliquant la formation d'un plasma froid basés sur le tétrafluorure de carbone (CF_4), dont les ions CF_3^+ et les espèces CF_3 et F formés dans le plasma sont réactives vis-à-vis du silicium ;
- *la gravure physico-chimique*, gravure sèche mixte couplant gravure physique et chimique. Ces systèmes RIE (*Reactive Ion Etching*) sont très répandus dans les centrales de microfabrication car ils présentent une grande flexibilité ;
- *la gravure physico-chimique avec inhibiteur*, processus sophistiqué consistant à développer des couches protectrices le long des flancs des cavités gravées pendant qu'elles sont attaquées chimiquement et physiquement. Soumis aux flux d'ions, les

composés volatils créés lors des réactions en surface sont éjectés et s'adsorbent sur les surfaces verticales voisines, formant un film protecteur polymérisé. Le couplage de tels systèmes à des plasmas très énergétiques (*Ion Coupling Plasma* ou *ICP*) a donné naissance à la technique DRIE (*Deep RIE*), permettant de réaliser des géométries à fort rapport d'aspect avec des gravures atteignant parfois plus de 500µm de profondeur.

La *fonctionnalisation* de la surface d'un support est un autre type de traitement, s'appuyant sur une action chimique sur le substrat qui peut être directement soumis au plasma. Elle fait intervenir des gaz spécifiques des fonctions recherchées. L'obtention de différents types de surfaces réactives est détaillée dans la section 2.4.2.3.1. Notons que la fonctionnalisation d'un support peut aussi être réalisée par polymérisation assistée par plasma, processus décrit dans la section 2.4.2.2.2. ci-après.

On peut aussi modifier les *propriétés physico-chimiques des surfaces* des substrats, notamment le caractère hydrophile/ hydrophobe d'une surface. Le caractère hydrophile peut être apporté par des fonctions oxygénées (O₂, NO₂, CO₂, CO, NO) ou chlorées (CCl₄, CF₂Cl₂). Le caractère hydrophobe est régulièrement apporté par des composés fluorés (SF₆, CF₄, C₂F₆). Il est également possible d'obtenir cet effet par le dépôt d'une couche mince pouvant être obtenue par polymérisation assistée par plasma (polymérisation d'hexane, de précurseurs siloxanes (hexaméthylidisiloxane (HMDSO), tetraméthylidisiloxane (TMDSO)...), ou encore de composés tels que CHF₃ et C₄F₈).

2.4.2.2.2. Dépôts de couches minces

Le dépôt est une opération jouant un rôle important dans beaucoup de processus de microfabrication. Une bonne partie des techniques de dépôts peut être regroupée en deux catégories :

- le *dépôt physique* dit PVD (*Physical Vapor Deposition*), principalement pour les dépôts métalliques, où la cible est mise en contact avec un gaz dont certaines espèces peuvent s'adsorber sur elle, formant une couche constituant le dépôt ;
- le *dépôt chimique* dit CVD (*Chemical Vapor Deposition*), où les espèces en contact avec la cible développent des réactions en surface et forment des composés se liant chimiquement à l'objet.

Dépôts chimiques en phase vapeur

Un plasma froid peut être créé pour un dépôt de type PVD lorsque l'on met en œuvre la méthode de pulvérisation (*sputtering*) [25]. Autrement, les plasmas sont principalement utilisés pour les dépôts de type CVD. Dans ce cas, le substrat est mis en contact avec un gaz contenant des espèces réactives. Le matériau est formé à la surface du substrat sous forme de couche mince selon deux possibilités :

- la réaction prend place dans le gaz et les produits de celle-ci sont adsorbés sur la surface du substrat : la réaction est dite homogène ;
- la réaction se développe à la surface du substrat (cible) : la réaction est dite hétérogène.

L'adhérence du film créé est généralement supérieure à la suite de réactions hétérogènes. Un tel procédé CVD peut être décrit par un modèle cinétique global caractérisé par les étapes élémentaires et chronologiques suivantes (les molécules contenant les éléments du matériau à déposer sont appelées *précurseurs* et le support cible est appelé *substrat*) (Figure 30) [25-27]:

- transport du précurseur au voisinage du substrat ;
- diffusion du précurseur vers la surface du substrat à travers la couche limite ;
- adsorption du précurseur sur la surface du substrat ;
- diffusion des espèces sur la surface du substrat ;
- réaction en surface formant le matériau et les espèces gazeuses ;
- désorption des espèces produites ;
- diffusion des résidus gazeux à travers la couche limite et évacuation.

La technique CVD nécessite donc un contrôle précis de la température du substrat, de la pression dans l'enceinte réactionnelle ainsi que des pressions partielles et des débits des différents composants de la phase gazeuse. Les techniques de CVD les plus connus sont désignées par les variantes suivantes :

- LPCVD (*Low Pressure CVD*) : dépôt à basse pression permis par une activation thermique du substrat ;
- APCVD (*Atmospheric Pressure CVD*) : dépôt à pression atmosphérique ;
- ALCVD (*Atomic Layer CVD*) : dépôt par croissance de couches monoatomiques successives ;
- MOCVD (*Metal-Organic CVD*) : dépôt à partir de précurseur organométalliques ;

- PECVD (*Plasma-Enhanced CVD*) et autres variantes désignant des modes d'assistance énergétique au procédé CVD (RPECVD (*Remote PECVD*), MPCVD (*Magnetron PCVD*), LECVD (*Laser-Enhanced CVD*), PEALD (*Plasma Enhanced Atomic Layer Deposition*) : systèmes dans lesquels on cherche à diminuer la température de dépôt ou pour lesquels l'activation thermique n'est pas suffisante. L'utilisation d'un plasma permet donc d'activer des réactions chimiques à la surface de la cible.

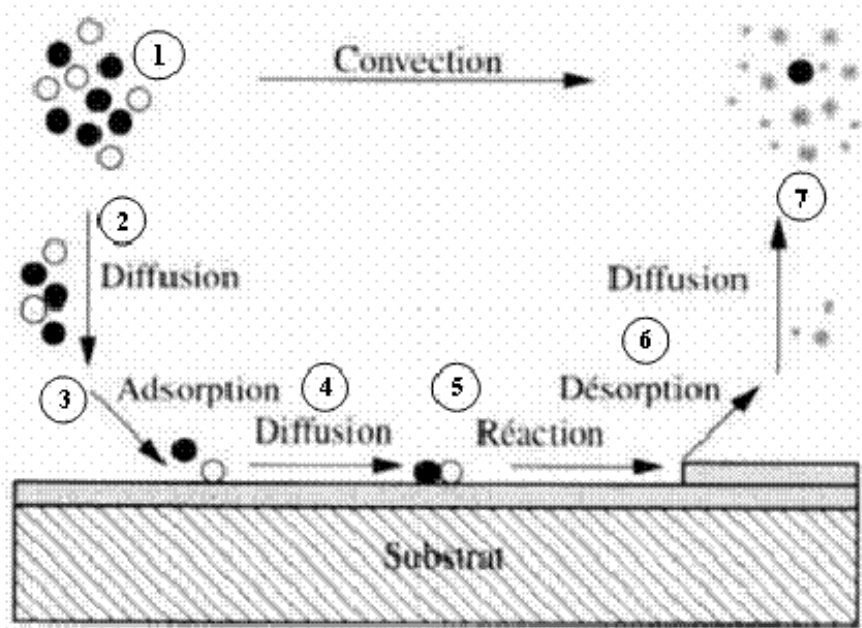


Figure 30. Illustration des différentes étapes d'un procédé de dépôt chimique en phase vapeur (CVD) [26].

Ces techniques de dépôts chimiques en phase vapeur permettent d'obtenir des dépôts de films en une seule étape, ce qui n'est pas le cas de techniques réputées moins onéreuses comme les techniques de *spray-* et *spin-coating*. Néanmoins, il faut différencier les *dépôts conformes* et les *dépôts non conformes* parmi ceux obtenus à l'issue d'un dépôt de type CVD. L'épaisseur du film est constante en tout point de la surface du substrat chez les premiers. D'un point de vue physique, ce cas suppose que les particules incidentes aient suffisamment d'énergie pour diffuser sur la surface du substrat avant d'établir des liaisons chimiques. Ce processus dépend donc de l'énergie initiale et de la réactivité des particules incidentes et du libre parcours moyen, que l'on cherchera à augmenter en travaillant à pression réduite, en particulier dans les systèmes PECVD. Dans le cas de dépôts *non conformes*, la surface du dépôt développe des formes différentes (bourrelets, creux).

Polymérisation assistée par plasma

La *polymérisation assistée par plasma* représente une technique majeure de dépôt CVD de couches minces à la surface d'un substrat. Elle se réalise classiquement par la technique de PECVD, encore appelée PACVD (*Plasma-Assisted CVD*). Le principe général repose sur la polymérisation d'un monomère organique activé. Celle-ci se réalise au travers de phénomènes d'ionisation, fragmentation, réarrangement et recombinaison. La formation d'un film polymère selon ce procédé peut être typiquement décrite par trois phases principales [27,28]:

- *l'initiation* : les électrons accélérés par la décharge entrent en collision avec les molécules de monomère qui s'ionise à cet effet, entraînant la formation de radicaux libres, d'atomes et d'ions. Ces derniers participent à leur tour à l'ionisation et à la dissociation du monomère ;
- *la propagation* : réarrangement et recombinaison des fragments moléculaires et radicaux menant à la formation de chaînes polymériques à la surface du substrat ;
- *la terminaison* : finalisation de l'étape de propagation aboutissant à un produit chimiquement stable.

Pendant la polymérisation, la mobilité des chaînes de polymères en surface du film peut être importante. On considère généralement que ces chaînes moléculaires sont aléatoirement branchées et terminées avec un degré de réticulation relativement important. Globalement, la structure et les paramètres physico-chimiques des polymères dépendent largement des paramètres opérationnels du plasma (pression, puissance injectée, débits des gaz et du monomère), influençant le flux et l'énergie des espèces réactives tombant sur le film en croissance. Par exemple, l'augmentation de la puissance du champ excitateur accentue le phénomène de dissociation et augmente ainsi la quantité d'espèces réactives. Un autre facteur est la position du substrat et de l'injection du monomère dans l'enceinte réactionnelle : un matériau différent peut être obtenu selon que le précurseur est injecté directement dans la décharge (PECVD directe) ou en dehors de celle-ci dans une zone en aval (PECVD indirecte). Il apparaît assez clairement qu'un dépôt de type *PECVD directe* met en jeu une compétition entre un mode de dépôt et un mode de gravure : le film en croissance subit un phénomène d'ablation résultant de son bombardement par les espèces énergétiques (ions, électrons, radicaux) et les radiations du rayonnement ultraviolet (UV) créées par le plasma (la puissance du champ excitateur est donc ici un paramètre important permettant de favoriser l'un ou l'autre mode). En revanche, un procédé de type *PECVD indirecte*, encore appelé RPECVD (*Remote*

PECVD), fait intervenir le mode de dépôt de façon prédominante, le substrat et l'injection du monomère étant placés en dehors de la zone de décharge. Un même précurseur peut être polymérisé soit en mode PECVD direct soit en mode PECVD indirect, ce qui peut conduire à deux matériaux de propriétés différentes [28]. Dans ce dernier mode, les réactions de polymérisation se déroulent sous écoulement en aval du plasma de la décharge (Figure 31). La température de la post-décharge lointaine est donc très modérée, proche de la température ambiante. Les espèces chargées y sont quasiment absentes au profit des espèces neutres, ce qui favorise le mode dépôt par rapport au mode gravure. Les vitesses de croissance des films y sont donc généralement plus élevées que pour les dépôts effectués dans la décharge. Finalement, notons que la géométrie de l'enceinte possède un effet sur le processus de dépôt en influençant les paramètres de transport des espèces qui participent à la polymérisation.

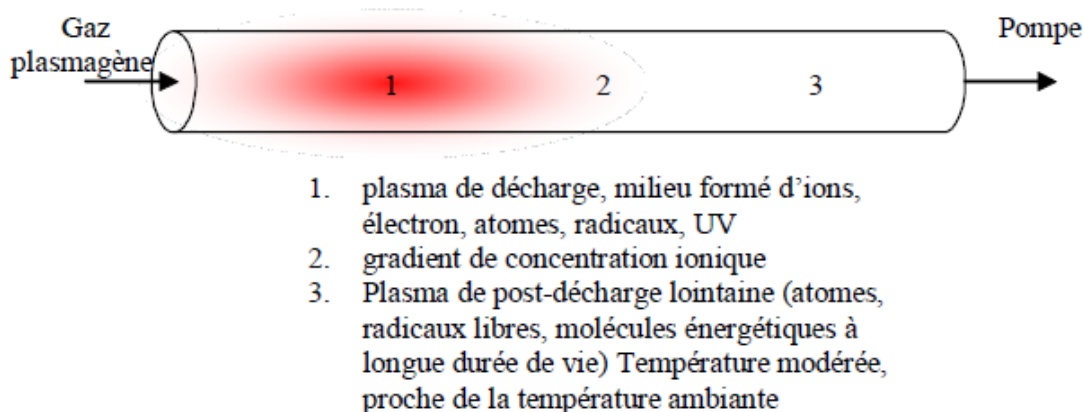


Figure 31. Les différentes zones d'un plasma sous écoulement en RPECVD.

Des réacteurs de type RPECVD ont été utilisés pour déposer divers matériaux, en particulier quelques organosiliciés, déposés à partir de précurseurs comme le TEOS (TétraEthOxySilane $[\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4]$), l'HMDSO (HéxaMéthylDiSiloxane $[(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3]$), le TMDSO (TétraMéthylDiSiloxane $[(\text{HCH}_3)_2\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_2\text{H}]$) ou l'HMDSN (HéxaMéthylDiSilazane $[(\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3]$) mélangés à un gaz ou une association de gaz plasmagènes non polymérisables (O_2 , NO_2 , N_2 , Ar ou NH_3) [29]. Les matériaux organosiliciés obtenus par l'utilisation de ces précurseurs sont respectivement appelés ppTEOS, ppHMDSO, ppTMDSO et ppHMDSN, où la dénomination *pp* signifie *plasma polymerized* en anglais. L'obtention de films à partir de TMDSO comme précurseur sera spécifiquement traitée dans la partie 2.4.2.4. à titre de méthode employée dans ce travail.

La variété des types de traitements assistés par plasma a conduit à diverses stratégies de conception de surfaces présentant une activité ou réactivité chimique ou biologique. L'utilisation de la technologie des plasmas peut en effet servir à modifier un support pour le rendre chimiquement réactif en vue d'un greffage covalent d'une espèce. Elle peut également permettre d'imaginer des structures polymériques tridimensionnelles incluant celle-ci.

2.4.2.3. Stratégies de conception de surfaces bioactives par des procédés plasmas

Des surfaces bioactives peuvent être conçues grâce à la technologie des plasmas. La surface peut être modifiée directement par un plasma ou alors subir un dépôt. Parmi les caractéristiques physico-chimiques des films déposés par plasma, rappelons qu'ils sont généralement biocompatibles et peuvent souvent être chimiquement activés de façon simple en vue d'un greffage covalent d'un enzyme [30]. C'est notamment le cas de polymères, dont la préparation s'applique régulièrement à la conception de biopuces [29]. Certains films offrent une stabilité thermique importante, des propriétés mécaniques intéressantes ou encore une résistance notable aux solvants organiques [30]. En sus de ces avantages attrayants, la modification de surface assistée par plasma offre une flexibilité intéressante. En fonction de la géométrie du réacteur et de son degré de fonctionnalité, il est techniquement possible de jouer sur plusieurs de leurs propriétés lors des dépôts : épaisseur, rugosité, réticulation, énergie de surface ou hydrophobicité. Ces propriétés permettent par exemple d'influer sur la densité des fonctions en surface du film en vue d'une fonctionnalisation, ou encore de modifier la porosité nécessaire pour une inclusion efficace d'une biomolécule comme un enzyme. Cette flexibilité se traduit aussi par une diversité des stratégies de conception de films minces bioactifs. En rapport à l'immobilisation d'enzyme, quelques protocoles se dégagent de la littérature.

2.4.2.3.1. Fonctionnalisation de surface pour le greffage d'enzymes

Les plasmas sont capables de générer des surfaces réactives aminées, hydroxylées, carboxylées ou encore offrant des groupements aldéhyde [30]. Ces fonctions offrent des possibilités de greffage de nombreuses biomolécules parmi lesquelles des anticorps, des glycosaminoglycanes et des protéines, notamment des enzymes. L'ajout de *spacers* peut être effectué : l'anhydride succinique permet par exemple d'éviter la dénaturation de l'enzyme [31] ou encore une gêne stérique [32]. Le polyéthylène glycol (PEG) est également souvent utilisé.

Les surfaces réactives contenant des fonctions amines et des fonctions carboxyliques sont plus largement générées et décrites que celles contenant des fonctions hydroxyles, aldéhydes ou thiols. Quelques détails sur leurs préparations peuvent être abordés.

Surfaces aminées

Les surfaces aminées obtenues par un procédé plasma ont été largement expérimentées pour le greffage de molécules de différentes natures comme l'ADN [33], l'immunoglobuline G [34], des polysaccharides comme le dextran ou ses dérivés [35], mais aussi des enzymes tels que la glucose oxydase [36] et la glucose isomérase [37]. Des surfaces riches en groupements amines ($-NH_2$) peuvent s'obtenir suivant deux approches majeures : (i) le traitement plasma par des gaz non polymérisables directement sur substrat ou (ii) la polymérisation assistée par plasma de monomères.

Dans le premier cas (i), les traitements les plus connus sont ceux utilisant un plasma d'ammoniac (NH_3), un plasma combinant le diazote et le dihydrogène (N_2/H_2) ou un plasma d'azote seul (N_2 ou diazote) [38]. Des variantes de ces plasmas peuvent exister lorsqu'un autre gaz est ajouté en combinaison. Par exemple, l'ajout d'argon (Ar) à un plasma d'ammoniac a permis d'augmenter les ratios atomiques N/C et O/C de la surface traitée [39].

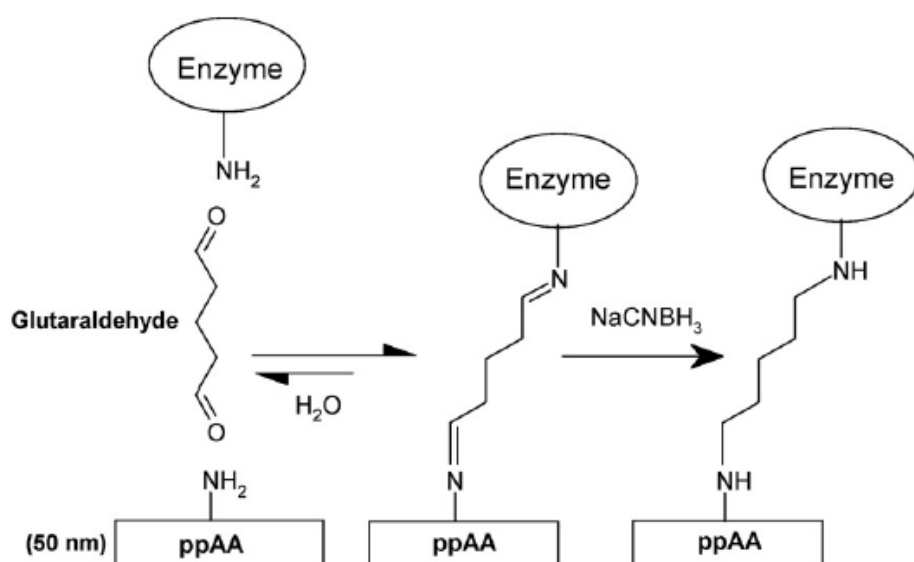


Figure 32. Représentation schématique de l'immobilisation covalente d'un enzyme (trypsine) sur un film polymère d'allylamine (ppAA) obtenu par polymérisation plasma [45].

Dans le second cas (ii), l'obtention de ce type de surface se réalise par polymérisation assistée par plasma de monomères aminés. Il peut s'agir par exemple de l'allylamine [40], de l'éthylène diamine [41], du butylamine [37] ou du diaminocyclohexane (DACH) [42]. Des polymérisations d'acétonitrile [43,44] et d'acrylonitrile [44] ont également été reportées.

L'immobilisation d'enzymes sur des surfaces aminés a été réalisée avec succès dans de nombreux cas [36,37,45,46]. Une illustration de la fixation covalente de la trypsine sur un film polymère d'allylamine riche en fonctions $-NH_2$ est représentée ci-après (Figure 32).

Surfaces carboxylées

Ce type de surface est adéquat à l'immobilisation de diverses entités biologiques comme les cellules, le collagène mais aussi des enzymes comme l'urokinase [47]. De façon générale, l'obtention de surfaces riches en fonction carboxyliques ($-COOH$) peut s'effectuer par (i) traitement plasma sur les surfaces cibles en utilisant le dioxyde de carbone (CO_2) ou le monoxyde de carbone (CO) comme gaz mais encore par (ii) polymérisation assistée par plasma de monomères comme l'acide acrylique [48] ou propanoïque [49].

En jouant sur les paramètres opérationnels, la polymérisation semblerait permettre d'obtenir des surfaces plus riches en fonctions carboxyliques qu'à la suite d'un traitement de surface par CO_2 ou CO [30]. Par ailleurs, la copolymérisation de monomères a montré qu'elle était un moyen de contrôler la densité des fonctions $-COOH$ en surface, voire de prévenir la dissolution du polymère formé par l'eau [30], ce qui est le cas en utilisant l'acide acrylique avec l'octa-1,7-diène [50].

Surfaces présentant des fonctions hydroxyles, aldéhydes ou thiols

La conception de telles surfaces n'est pas aussi populaire que les précédentes car elles sont moins attractives pour la fixation de biomolécules, notamment des enzymes. Par exemple, la réactivité chimique d'un groupement hydroxyle ($-OH$) reste faible en comparaison avec celle des fonctions amines ou carboxyliques, qui réagiront plus facilement et plus abondamment avec des molécules d'enzymes. D'autre part, les procédés de préparation sont globalement moins maîtrisés et parfois plus restreints que les précédents. En attestent par exemple la forte proportion de perte de fonction $-OH$ durant la fragmentation de monomères d'alcools, la volatilité forte des aldéhydes ($C=O$) ou encore l'impossibilité de générer des surfaces présentant

des fonctions C=O par traitement plasma du substrat (uniquement par polymérisation de monomères) [30].

La préparation de surfaces hydroxylées se réalise souvent en traitant la surface cible par un plasma d'oxygène [30,51] ou en procédant à la polymérisation de monomères comme l'éthanol ou le méthanol [52]. En revanche, la préparation par plasma de surfaces présentant des groupements C=O se réalise uniquement par polymérisation de monomères comme l'acétaldéhyde. La fonction aldéhyde reste généralement inutilisée dans la fixation d'enzymes. En revanche, des groupements hydroxyles ont servis à immobiliser la glucose isomérase [53].

Les fonctions thiols (–SH) peuvent également servir à l'immobilisation d'un enzyme et peuvent être obtenues après polymérisation d'allylmercaptan [29].

2.4.2.3.2. Adsorption d'enzymes sur des films polymère

Cette technique a été adoptée dans les travaux de Muguruma *et al.* [54] et a été reportée par le même auteur [29,55]. Celui-ci décrit la possibilité d'immobiliser des enzymes par adsorption (physisorption) sur des surfaces traitées par plasma ou des films obtenus par polymérisation par plasma. La fixation physique de l'enzyme peut être éventuellement suivie d'un recouvrement par un deuxième film ultra mince. C'est le cas dans « *Enzyme biosensor based on plasma-polymerized film-covered carbon nanotube layer grown directly on a flat substrate* » où Muguruma *et al.* décrivent l'adsorption de la glucose oxydase sur des nanotubes de carbone préalablement traités par plasma d'azote ou d'oxygène [54].

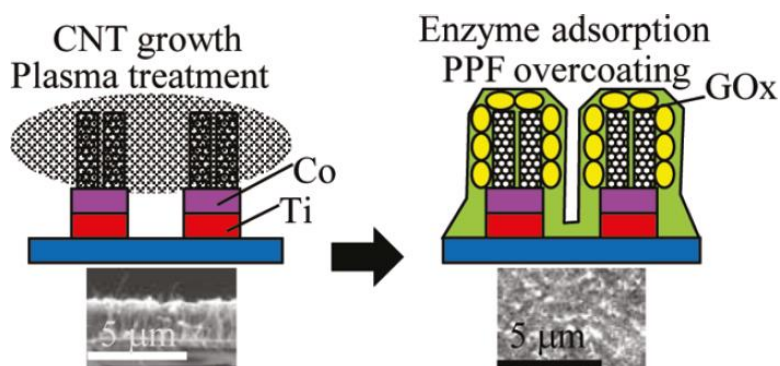


Figure 33. Schéma représentant l'élaboration d'un biocapteur ampérométrique où la glucose oxydase est immobilisée par adsorption/ recouvrement par un film sur des nanotubes de carbone (CNT) préalablement traités par un plasma d'azote [54].

Un recouvrement de l'enzyme par un film de 13 nm d'épaisseur obtenu par polymérisation d'acétonitrile est ensuite réalisé, ce qui contribue à maintenir l'enzyme adsorbé sur les nanotubes de carbone (Figure 33). La structure finale assure une fonction de biocapteur ampérométrique.

2.4.2.3.3. *Inclusion d'enzymes dans des films polymère*

Quelques méthodologies ayant recours à la technologie plasma ont permises d'immobiliser avec succès des enzymes au sein de polymères. Il se dégage de la littérature que ces procédures peuvent faire intervenir soit (i) un piégeage stérique de l'enzyme concomitant à la formation du polymère, soit (ii) un piégeage stérique faisant suite à la formation de celui-ci.

Comme décrit au premier point, Heyse *et al.* ont réussi à immobiliser glucose oxydase et lipase par inclusion en une étape durant la formation d'un film polymère en utilisant l'acétylène comme précurseur [56]. Le second point peut être illustré par les travaux d'Amorosi *et al.*, qui présentent la conception d'un film polymère MAA/EGDMA (obtenu par copolymérisation d'acide méthacrylique (MAA) et d'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA)) suivi de l'immobilisation mixte par piégeage stérique et adsorption des enzymes mis en incubation à son contact [57].

Les méthodes de traitements de surface présentées dans cette partie apportent régulièrement des solutions innovantes aux principaux enjeux de conception de surfaces bioactives. Elles s'intègrent généralement aisément dans les processus de microfabrication les plus courants. Les propriétés de microstructuration de certains films obtenus par polymérisation permettent parfois de considérer la technologie plasma comme un outil de microfabrication, celui-ci autorisant une alternative à l'usage de procédés « durs » souvent longs et coûteux. A cet effet, notre intérêt envers un matériau organosilicié répondait à une double attente : (i) la conception de structures microfluidiques de type microcanaux avec (ii) des parois internes présentant des enzymes immobilisés. La multifonctionnalité potentielle de ce matériau, film polymère réalisé par RPECVD à partir du tétraméthylidisiloxane, peut s'expliquer par quelques-unes de ces caractéristiques et propriétés rappelées ci-après avec quelques détails.

2.4.2.4. Dépôts de films minces organosiliciés en phase vapeur assistés par plasma froid : cas du tétraméthylidisiloxane

2.4.2.4.1. Polymérisation assistée en post-décharge d'un plasma microonde d'azote

Le 1,1,3,3-TétraMéthylDiSiloxane (TMDS ou TMDSO) est un précurseur organosilicié qui présente une bonne biocompatibilité grâce à sa partie organique hydrocarbonée et conduit à des matériaux ayant une bonne résistance thermique et une tenue mécanique, communes aux silicones. Ces caractéristiques le rendent propice à son utilisation comme (i) matériau supportant l'immobilisation d'un enzyme et (ii) matériau de microfabrication.

La polymérisation du TMDSO, auquel l'oxygène peut éventuellement être ajouté comme gaz de transport réactif, est possible dans un réacteur plasma en post-décharge en présence d'azote (gaz plasmagène). L'épaisseur des dépôts peut être mesurée *in situ* par interférométrie laser [57]. Un certain nombre de travaux peuvent être recensés sur ce procédé développé par l'équipe P²M. [24,26,58-61]. Rappelons néanmoins le principe de leur formation.

Principe du dépôt par polymérisation-plasma

Le plasma est généré à l'aide d'une cavité résonnante de décharge microonde dans l'azote en écoulement à une pression de quelques mbar (Figure 34). Le monomère est classiquement introduit en post-décharge en amont de la position du substrat et en aval de la décharge. L'écoulement traverse des zones distinctes (Figure 34):

- *la décharge*, caractérisée par une très forte luminosité du plasma, de hautes températures du gaz (au-delà de 700 K) et de fortes concentrations d'espèces excitées ;
- *la post-décharge*, regroupant un espace sombre de transition (ET) et une zone d'ionisation secondaire (IS) riche en particules chargées (N_2^+ , N_3^+ , N_4^+ , e^- , N , N_2^* (molécule de diazote excitée)) provenant d'une ré-ionisation du gaz hors champ électrique ;
- *la post-décharge lointaine*, milieu réactif abrégée PDL, formée principalement d'espèces neutres (atomes, molécules et radicaux dans différents états d'excitation à longue durée de vie) assurant le transfert partiel de l'énergie injectée dans le plasma et apparaissant après la relaxation de la zone IS (ions et électrons se recombinent rapidement). Dans un plasma d'azote comme ici, la PDL présente une émission

lumineuse jaune reportée comme la luminescence de Lewis-Rayleigh témoignant de la recombinaison radiative en volume des atomes $N(^4S)$ (état fondamental) [62].

Le concept de polymérisation plasma rend globalement compte de réactions élémentaires telles que l'ionisation et la fragmentation des molécules de monomères, la formation de sites radicalaires et la recombinaison des fragments actifs [27,28]. Ces réactions à l'origine de la formation d'un polymère ont été décrites dans l'encart sur le principe de la polymérisation assistée par plasma dans la section 2.4.2.2.2. La formation de films polymères à partir de TMDSO obéit au même schéma englobant les étapes d'initiation, de propagation et de terminaison. Les atomes d'azote N jouent le rôle de vecteur d'énergie.

-

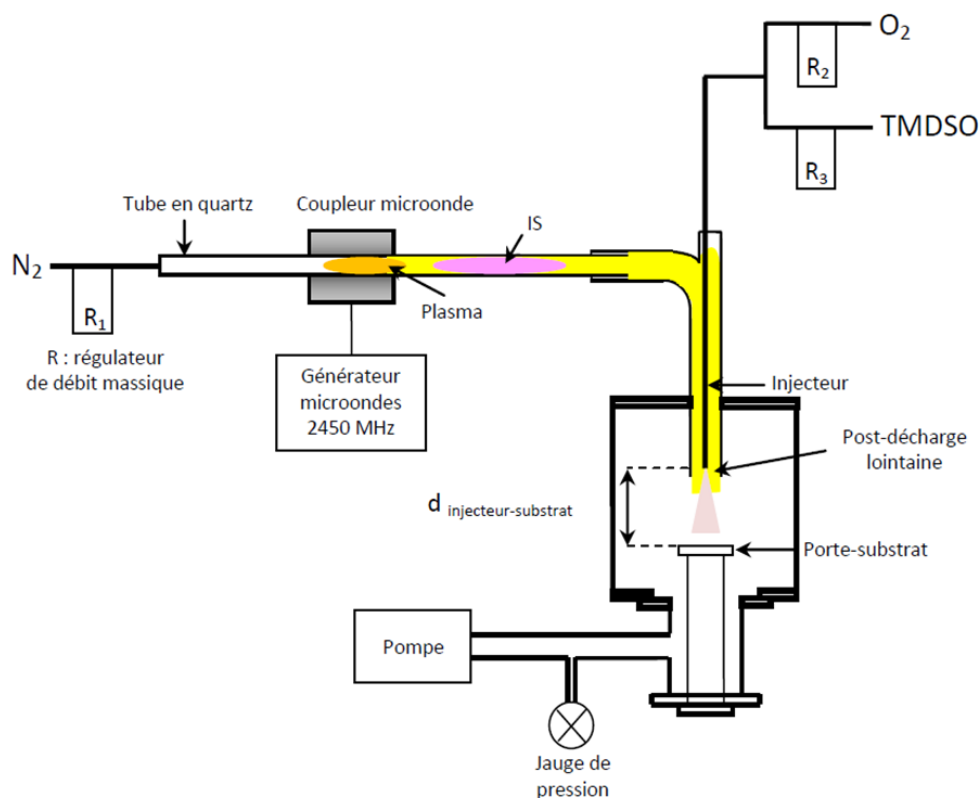


Figure 34. Schéma de principe du réacteur RPECVD pour le dépôt de ppTMDSO (IS : ionisation secondaire ; d : distance ; TMDSO : TetraMéthylDiSiloxane).

Mécanisme de polymérisation de TMDSO et variantes en fonction de la composition en gaz

La chimie et les mécanismes de la polymérisation du TMDSO dans une PDL restent complexes. Un modèle possible, s'appuyant sur l'analyse des propriétés des films déposés, a été proposé et

détaillé par Callebert et al. [61] puis repris dans d'autres ouvrages [24,26]. Dans un souci de simplification, un schéma global et récapitulatif du mécanisme de polymérisation simplifié d'un système $N_2/TMDSO/O_2$ est présenté (Figure 35).

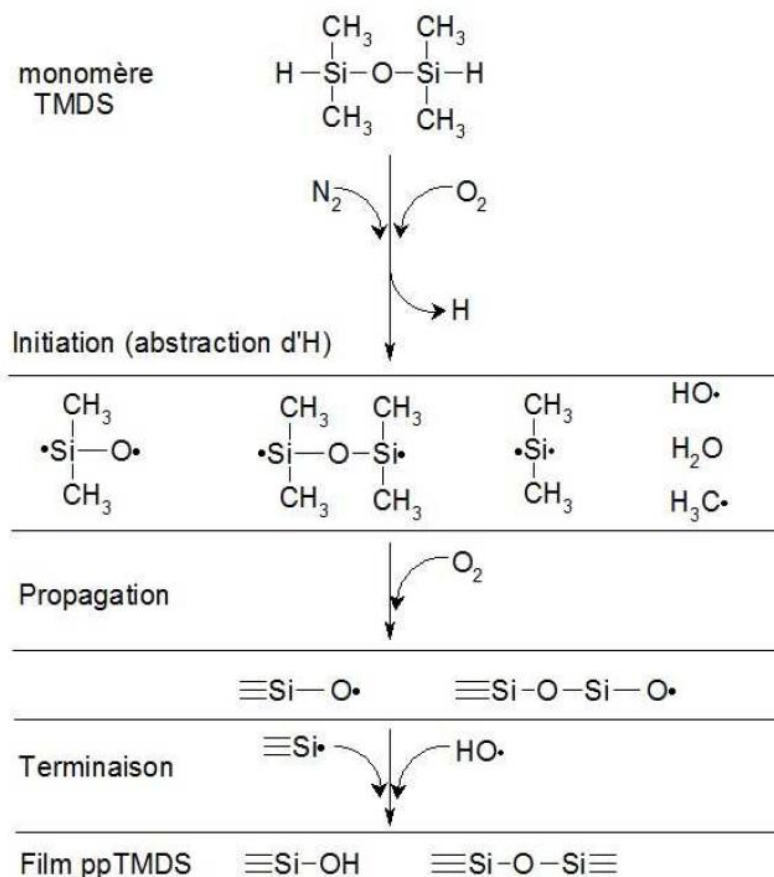


Figure 35. Mécanisme simplifié de la polymérisation plasma de TMDSO par la technique RPECVD en présence d'azote et d'oxygène [24].

Dans un milieu plasma contenant de l'azote et de l'oxygène, la polymérisation du TMDSO par la technique RPECVD s'initie par une abstraction d'hydrogène labile par un atome d'azote ou d'oxygène et forme un monoradical. Un diradical peut être formé dans le cas où une seconde abstraction a lieu. Les radicaux générés subissent une fragmentation après collision avec des atomes d'azote. À l'issue de l'étape d'initiation, les trois radicaux majeurs générés comprennent le diméthylsilanol $[(CH_3)_2Si=O]$ qui représente une espèce très réactive (Figure 35). L'oxygène réagit ensuite rapidement pendant l'étape de propagation, permettant aux fragments de se réarranger et se recombiner. La terminaison aboutit à un film de ppTMDSO riche en siloxanes à la surface du substrat. Dans les cas où le débit de TMDSO est supérieur ou égal à celui d'oxygène non nul, l'azote peut être faiblement incorporé dans le polymère par l'intermédiaire

de radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$). Cette fixation d'azote est à l'origine de structures silazanes ($\equiv\text{Si}-\text{NH}-\text{Si}\equiv$) [58], dont la stabilité reste néanmoins fragile du fait de l'hydrolyse.

A l'issu de la polymérisation, le film de ppTMDSO présente une structure polysiloxane de type polymère-plasma, c'est-à-dire relativement réticulée. Sa surface est riche en groupements méthyls ($-\text{CH}_3$) et plutôt pauvre en fonctions polaires. Les dépôts de ce type réalisés par Supiot et al. [60] sont repris avec des conditions similaires dans notre étude : le plasma dans la décharge est généré à une fréquence de 2450 MHz dans un débit d'azote de 1.8 slpm (*Standard Liter Per Minute*) à une pression de 520 Pa, la puissance délivrée à la décharge est de 200 W, le débit de TMDSO est fixé à 20 sccm (*Standard Cubic Centimeter per Minute*) et celui d'oxygène à 25 sccm (conditions rappelées en Annexe 4). Le réacteur utilisé est schématisé par la Figure 34. Ces dépôts conduisent classiquement à une croissance avec des vitesses autour de 500 à 1000 nm par minute [60]. La formation de couches rigides allant jusqu'à quelques dizaines de micromètres est possible [15]. Ce système a été utilisé dans ce travail pour déposer un film utile à la conception de microcanaux présentant des enzymes immobilisés à leur surface (section 3.3.2.).

Rappelons qu'un tel dépôt RPECVD rend possible l'utilisation de matériel biologique comme les enzymes car la température de la PDL où est placé l'échantillon à traiter est très modérée (température quasiment ambiante) et aucun bombardement par les espèces énergétiques ne survient. Ainsi, dans le but de montrer la faisabilité d'un procédé d'immobilisation enzymatique par piégeage stérique par voie sèche au sein d'un film de ppTMDSO (partie 3.3.1.), nous avons préalablement utilisé un système N_2/TMDSO (principalement pour des raisons pratiques) qui se différencie légèrement du système $\text{N}_2/\text{TMDSO}/\text{O}_2$ dans les étapes de propagation et terminaison. Ces différences font d'abord intervenir un départ des groupements $-\text{CH}_3$ des trois principaux radicaux obtenus après l'étape d'initiation. En réagissant avec l'azote par étapes successives, ces radicaux subissent l'arrachement de groupements $-\text{CH}_3$ pendant l'étape de propagation, menant aux radicaux $\bullet\text{O}-\text{Si}\cdot$; $\cdot\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\cdot$; $\text{Si}\cdot$. Ensuite, la réticulation provient de la recombinaison des fragments courts et multiradicaux pendant la propagation et la terminaison, ce qui est à l'origine d'une vitesse de dépôt plus faible dans ce cas que dans le cas d'un système avec oxygène, où les radicaux sont plus longs. Ce système de polymérisation sans oxygène est exploité dans notre travail avec les paramètres suivants : le plasma dans la décharge est généré à une fréquence de 13.6 MHz à 300 W dans un débit d'azote de 1.8 slpm et le

précurseur liquide est amené à l'injecteur à un débit de 0.25 mL min^{-1} (conditions rappelées section 3.3.1.).

L'effet de la composition en gaz sur la polymérisation se traduit donc majoritairement par des vitesses de dépôt plus lentes dans le système N_2/TMDSO que dans le système $\text{N}_2/\text{TMDSO}/\text{O}_2$. La caractérisation chimique et structurale de la surface des films de ppTMDSO peut être effectuée par plusieurs investigations. Quelques aspects comme l'énergie de surface, la rugosité ou la composition chimique du film sont présentés dans les résultats à la section 3.3.1.

Ni l'immobilisation d'enzymes employant des films polymères de ppTMDSO, ni l'incorporation de tels films bioactifs au sein de microcanaux en ppTMDSO n'a encore été reportée dans la littérature. Néanmoins, le deuxième de nos objectifs mentionné ci-avant repose fortement sur la faisabilité démontrée de la réalisation de microcanaux en ppTMDSO. Le concept recherché de microfabrication « bio-intégrante » se base notamment sur ce principe de conception, en visant à incorporer un enzyme comme élément biologique dans le procédé de fabrication de microcanaux.

2.4.2.4.2. Exemple de réalisation de structures microfluidiques : microcanaux en ppTMDSO

Principe de conception

Au cours de la dernière décennie, les plasmas froids et particulièrement la polymérisation assistée par plasma ont rejoint les procédés technologiques existants en termes de microfabrication. Ils apportent de nouvelles alternatives à travers l'utilisation d'un procédé sec, simple et souvent relativement rapide [63].

Dans le but de réaliser un dispositif microfluidique non onéreux en évitant au maximum les étapes manuelles comme l'alignement et le collage, les travaux d'Abbas *et al.* suggèrent l'utilisation des plasmas froids comme outil de microfabrication par voie sèche [15]. La réalisation spécifique de structures microfluidiques de type microcanaux a pu être effectuée au travers d'un dépôt de polymère directement sur une surface microstructurée (méthode PPMS pour *Plasma Polymerization on Micropatterned Substrate*), qui peut être obtenue par dépôt d'une couche sacrificielle (variante PPSL pour *Plasma Polymerization on Sacrificial Layer*) ou

par gravure. Des microcanaux ont été obtenus par simple dépôt RPECVD d'un polymère de ppTMDSO en suivant le principe de l'utilisation de résines sacrificielles (Figure 36).

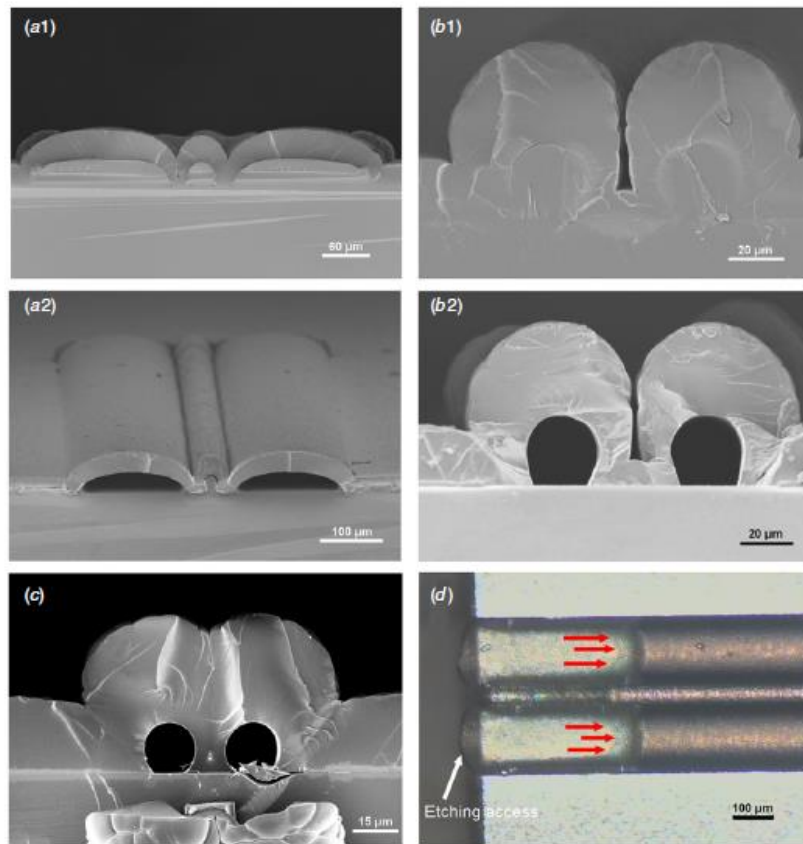


Figure 36. Images obtenue par microscopie électronique des coupes transversales de microcanaux en ppTMDSO réalisés par la méthode PPSL avant (a1, b1) et après (respectivement a2, b2 et c) la dissolution des couches sacrificielles. La progression du solvant responsable de la décomposition de la résine sacrificielle est illustrée en (d) sous microscope optique [15].

Intégration de l'enzyme au sein des microcanaux : vers le concept de fabrication « bio-intégrante »

En montrant que l'utilisation du ppTMDSO est propice à l'immobilisation d'un enzyme, la deuxième partie de notre travail vise à revêtir les parois d'un canal en ppTMDSO par l'intégration d'un protocole d'immobilisation au protocole de microfabrication présenté ci-dessus. C'est cette approche d'intégration du premier protocole au deuxième qui fait appel au concept de fabrication que nous nommerons « *bio-intégrante* » : l'élément biologique est intégré au système pendant et non à la suite de sa conception, ce qui entrevoit éventuellement la possibilité de compresser les opérations (gain de temps) et de mieux maîtriser l'incorporation de l'élément biologique au sein de la structure (gain en précision). Pour fixer les idées, les

travaux de Pereira-Medrano *et al.* [64] ainsi que Song *et al.* [65] peuvent être cités afin d'illustrer l'approche selon laquelle l'immobilisation de l'enzyme s'effectue au sein de circuits microfluidiques déjà conçus. C'est l'approche majoritaire concernant l'immobilisation covalente, pour laquelle plusieurs étapes (incluant les étapes de lavage) sont généralement nécessaires avant d'aboutir à un microréacteur fonctionnel. A l'inverse, Wu *et al.* ont montré que l'intégration d'un élément biologique peut se faire pendant la fabrication des microcanaux (Figure 37) [66], illustrant par là le principe d'une conception *bio-intégrante*. Psoma *et al.* ont également emprunté ce concept pour la fabrication d'un biocapteur [67]. Il permet d'imaginer des protocoles compacts et rapides, précis¹⁴, innovants et adaptés à certaines applications spécifiques, en faisant appel à des procédés de microfabrication « doux » afin de préserver l'entité biologique.

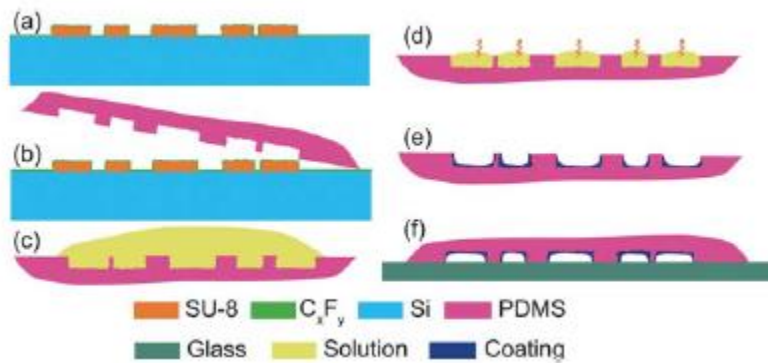


Figure 37. Schéma d'un procédé de fabrication de microcanaux en PDMS faisant appel au concept de conception « bio-intégrante ». Le dépôt biologique (coating) créé après évaporation d'une solution volatile contenant recouvre toute la surface intérieure des microcanaux avant leur « fermeture » [66].

Une tentative de microfabrication *bio-intégrante* de microcanaux en ppTMDSO incorporant un enzyme est présenté dans la section 3.3.2. des résultats.

Ce dernier chapitre bibliographique nous a permis de dégager les considérations majeures qui recoupent l'utilisation des plasmas froids et l'immobilisation enzymatique. Rappelons que la diversité des techniques plasmas permettant de modifier une surface est à l'origine d'une multiplicité des stratégies d'immobilisation d'enzyme. Parmi elles, le piégeage stérique au sein /par des films polymères obtenus par polymérisation est peu reporté en comparaison avec les méthodes faisant intervenir une fonctionnalisation de surface. Cependant, cette méthodologie

¹⁴ Assistance au dépôt de matière biologique par une instrumentation adaptée à l'échelle micrométrique.

permet d'imaginer l'incorporation de l'enzyme dans une structure microfluidique elle-même bâtie de polymère, pourvu que ce dernier présente des caractéristiques permettant sa microstructuration. Ainsi, parmi les objectifs de ce travail, la faisabilité d'une méthode d'immobilisation stérique faisant intervenir un polymère de ppTMDSO demandait à être démontrée. La suite proposait d'intégrer ce procédé comme une étape intégrante de la conception de microcanaux en ppTMDSO suivant le principe de l'utilisation de résines sacrificielles.

Références

-
- [1] Nelson J. M., Griffin E. G., "Adsorption of invertase", *J. Am. Chem. Soc.*, **38**, 1916, 1105–1115.
 - [2] Sheldon R. A., van Pelt S., "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how", *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 2013, 6223–6235.
 - [3] Hanefeld U., Gardossi L., Magner E., "Understanding enzyme immobilisation", *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 2009, 453–468.
 - [4] Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques", *Enzym. Microb. Technol.*, **40**, 2007, 1451–1463.
 - [5] Garcia-Galan C., Berenguer-Murcia A., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., "Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance", *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2011, 2885–2904.
 - [6] Jonkheijm P., Weinrich D., Schröder H., Niemeyer C. M., Waldmann H., "Chemical strategies for generating protein biochips", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 2008, 9618–9647.
 - [7] Situma C., Hashimoto M., Soper S.A., "Merging microfluidics with microarray-based bioassay", *Biomol. Eng.*, **23**, 2006, 213–231.
 - [8] Becker H., Gärtner C., "Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems", *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 2007, 89–111.
 - [9] Ellis J. L., Tomasko D. L., Dehghani F., "Novel dense CO₂ technique for β -galactosidase immobilization in polystyrene microchannels", *Biomacromolecules*, **9**, 2008, 1027–1034.
 - [10] Sia S. K., Whitesides G. M., "Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies", *Electrophoresis*, **24**, 2003, 3563–3576.
 - [11] Diaz-Quijada G. A., Peytavi R., Nantel A., Roy E., Bergeron M. G., Dumoulin M. M., Veres T., « Surface modification of thermoplastics? Towards the plastic biochip for high throughput screening devices", *Lab Chip*, **7**, 2007, 856–862.
 - [12] Nahar P., Wali N. M., Gandhi R. P., "Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand", *Anal. Biochem.*, **294**, 2001, 148–153.

- [13] Heyries K. A., Marquette C. A., Blum L. J., “Straightforward protein immobilization on Sylgard 184 PDMS microarray surface”, *Langmuir*, **23**, 2007, 4523–4527.
- [14] Tran H., Killops K. L., Campos L. M., “Advancements and challenges of patterning biomolecules with sub-50 nm features”, *Soft Matter*, **9**, 2013, 6578–6586.
- [15] Abbas A., Supiot P., Mille V., Guillochon D., Bocquet B., “Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized TMDS for fluidic MEMS technology”, *J. Micromech. Microeng.*, **19**, 2009, 045022.
- [16] Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 2012, 489–511.
- [17] Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., “Protein immobilization strategies for protein biochips”, *Biomacromolecules*, **8**, 2007, 1775–1789.
- [18] Muguruma H., Hoshino T., Matsui Y., “Enzyme biosensor based on plasma-polymerized film-covered carbon nanotube layer grown directly on a flat substrate”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **3**, 2011, 2445–2450.
- [19] Jonchems P., Satyawali Y., Diels L., Dejonghe W., “Enzyme immobilization on/in polymeric membranes: status, challenges and perspectives in biocatalytic membrane reactors (BMRs)”, *Green Chem.*, **13**, 2011, 1609–1623.
- [20] Langmuir I. “Oscillations in ionized gaz”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **14**, 1928, 627–637.
- [21] Denes F. S., Manolache S., “Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science”, *Prog. Polym. Sci.*, **29**, 2004, 815–885.
- [22] Fridman A., “Plasma Chemistry”, Cambridge University Press, 2008, New York, USA. 1024 pages.
- [23] Chu P. K., Chen J. Y., Wang L. P., Huang N., “Plasma-surface modification of biomaterials”, *Mater. Sci. Eng. R: Rep.*, **36**, 2002, 143–206.
- [24] Abbas A., “Fabrication et fonctionnalisation de BioMEMS par plasma froid pour l’analyse de al biocatalyse en spectroscopie térahertz”, *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 27 octobre 2009, 135 pages.
- [25] Tabeling P., “Introduction à la microfluidique”, Edition Belin, 2003, 254 pages.
- [26] Abou Rich S., “Films polymères organosiliciés multifonctionnels déposés et modifiés dans un réacteur duplex en post décharge d’un plasma micro-onde”, *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 10 décembre 2008, 230 pages.
- [27] Yasuda H. K., “Plasma polymerization”, Academic Press, New York, 1985, 435 pages.
- [28] Biederman H., Osada Y., “Plasma polymerization processes: plasma technology, vol. 3”, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1992, 210 pages.
- [29] Muguruma H., “Plasma-polymerized films for biochip design”, *Plasma Process. Polym.*, **7**, 2010, 151–162.

- [30] Siow K. S., Britcher L., Kumar S., Griesser H. J., "Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization – A review", *Plasma Process. Polym.*, **3**, 2006, 392–418.
- [31] Puelo D. A., Kissling R. A., Sheu M. S., "A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on titanium alloy", *Biomaterials*, **23**, 2002, 2079–2087.
- [32] Mason M., Vercruysse K. P., Kirker K. R., Frisch R., Marecak D. M., Prestwich G. D., Pitt W. G., "Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene and polytetrafluoroethylene", *Biomaterials*, **21**, 2000, 31–36.
- [33] Zhang Z., Knoll W., Foerch R., "Amino-functionalized plasma polymer films for DNA immobilization and hybridation", *Surf. Coat. Technol.*, **200**, 2005, 993–995.
- [34] Ben Rejeb S., Tatoulian M., Arefi-Khonsari F., Fischer-Durand N., Martel A., Lawrence J. F., Amouroux J., Le Goffic F., "Functionalization of nitrocellulose membranes using ammonia plasma for the covalent attachment of antibodies for use in membrane-based immunoassay", *Anal. Chim. Acta*, **376**, 1998, 133–138.
- [35] McLean K. M., Johnson G., Chatelier R. C., Beumer G. J., Steele J. G., Griesser H. J., "Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **18**, 2000, 221–234.
- [36] Muguruma H., Hiratsuka A., Karube I., "Thin-film glucose biosensor based on plasma-polymerized film: simple design for mass production", *Anal. Chem.*, **72**, 2000, 2671–2675.
- [37] Gancarz I., Bryjak J., Poźniak G., Tylus W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma", *Eur. Polym. J.*, **39**, 2003, 2217–2224.
- [38] Meyer-Plath A. A., Finke B., Schröder K., Ohl A., "Pulsed and cw microwave plasma excitation for surface functionalization in nitrogen containing-gases", *Surf. Coat. Technol.*, **174**, 2003, 877–881.
- [39] Bryjak M., Gancarz I., Poźniak G., Tylus W., "Modification of polysulfone membranes 4. Ammonia plasma treatment", *Eur. Polym. J.*, **38**, 2002, 717–726.
- [40] Abbas A., Vivien C., Bocquet B., Guillochon D., Supiot P., "Preparation and multi-characterization of plasma polymerized allylamine films", *Plasma Process. Polym.*, **6**, 2009, 593–604.
- [41] Gengenbach T. R., Vasic Z. R., Li S., Chatelier R. C., Griesser H. J., "Correlation of the nitrogen 1S and oxygen 1S XPS binding energies with compositional changes during oxidation of ethylene diamine plasma polymers", *Surf. Interface Anal.*, **24**, 1996, 611–619.
- [42] Lassen B., Malmsten M., "Competitive protein adsorption at plasma polymer surfaces", *J. Colloid Interface Sci.*, **186**, 1997, 9–16.
- [43] Hiratsuka A., Muguruma H., Nagata R., Nakamura R., Sato K., Uchiyama S., Karube I., "Mass transport behavior of electrochemical species through plasma polymerized thin film on platinum electrode", *J. Membr. Sci.*, **175**, 2000, 25–34.
- [44] Davidson M. R., Mitchell S. A., Bradley R. H., "UV-ozone modification of plasma-polymerized acetonitrile films for enhanced cell attachment", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **34**, 2004, 213–219.
- [45] Abbas A., Vercaigne-Marko D., Supiot P., Bocquet B., Vivien C., Guillochon D., "Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **73**, 2009, 315–324.

- [46] Ghasemi M., Minier M. J. G., Tatouliau M., Chehimi M. M., Arefi-Khonsari F., "Ammonia plasma treated polyethylene films for adsorption or covalent immobilization of trypsin: quantitative correlation between X-ray photoelectron spectroscopy data and enzyme activity" *J. Phys. Chem. B*, **115**, 2011, 10228–10238.
- [47] König U., Nitschke M., Menning A., Sperling C., Simon F., Arnhold C., Werner C., Jakobasch H. J., "Plasma modification of polytetrafluoroethylene for immobilization of the fibrinolytic protein urokinase", *Surf. Coat. Technol.*, **116**, 1999, 1011–1015.
- [48] Swaraj S., Oran U., Lippitz A., Friedrich J. F., Unger W. E. S., "Study of influence of external plasma parameters on plasma polymerized films prepared from organic molecules (acrylic acid, allyl alcohol, allyl amine) using XPS and NEXAFS", *Surf. Coat. Technol.*, **200**, 2005, 494–497.
- [49] O'Toole L., Beck A. J., Short R. D., "Characterization of plasma polymers of acrylic acid and propanoic acid", *Macromolecules*, **29**, 1996, 5172–5177.
- [50] Daw R., Candan S., Beck A. J., Devlin A. J., Brook I. M., MacNeil S., Dawson R. A., Short R. D., "Plasma copolymer surfaces of acrylic acid/1,7 octadiene: surface characterization and the attachment of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells", *Biomaterials*, **19**, 1998, 1717–1725..
- [51] Golub M. A., Wydeven T., Cormia R. D., "ESCA study of the effect of hydrocarbon contamination on poly(tetrafluoroethylene) exposed to atomic oxygen plasma", *Langmuir*, **7**, 1991, 1026–1028.
- [52] Griesser H. J., Chatelier R. C., "Surface characterization of plasma polymers from amide, amine and alcohol monomers", *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 1990, 361–384.
- [53] Gancarz I., Bryjak J., Bryjak M., Poźniak G., Tylus W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization I. Allyl alcohol plasma", *Eur. Polym. J.*, **39**, 2003, 1615–1622.
- [54] Muguruma H., Hoshino T., Matsui Y., "Enzyme biosensor based on plasma-polymerized film-covered carbon nanotube layer grown directly on a flat substrate", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **3**, 2011, 2445–2450.
- [55] Muguruma H., "Plasma-polymerized films for biosensors II", *Trends Anal. Chem.*, **26**, 2007, 433–443.
- [56] Heyse P., van Hoeck A., Roeffaers M. B. J., Raffin J.-P., Steinbüchel A., Stöveken T., Lammertyn J., Verboven P., Jacobs P. A., Hofkens J., Paulussen S., Sels B. F., "Exploration of atmospheric pressure plasma nanofilm technology for straightforward bio-active coating deposition: enzymes, plasmas and polymers, an elegant synergy", *Plasma Process. Polym.*, **8**, 2011, 965–974.
- [57] Amorosi C., Mustin C., Frache G., Bertani P., Fahs A., Francius G., Toniazio V., Ruch D., Ball V., Averous L., Michel M., "Design of flexible free standing plasma polymer-based films as hosts for enzyme immobilization", *J. Phys. Chem. C*, **116**, 2012, 21356–21365.
- [58] Supiot P., Vivien C., Granier A., Bousqtié A., Mackova A., Escaich D., Clergereaux R., Raynaud P., Stryhal Z., Pavlik J., "Growth and modification of organosilicon films in PECVD and remote afterglow reactors", *Plasma Process. Polym.*, **3**, 2006, 100–109.
- [59] Mille V., "Conception et réalisation de BioMEMS térahertz dédiés à la spectroscopie de solutions biologiques", *Thèse de doctorat*, Université de Lille 1, soutenue le 28 Novembre 2007, 144 pages.
- [60] Supiot P., Vivien C., Blary K., Rouessac V., "Organosilicon polymers deposition by PECVD and RPECVD on micropatterned substrates", *Chem. Vap. Deposition*, **17**, 2011, 321–326.

- [61] Callebert F., Supiot P., Asfardjani K., Dessaux O., Goudmand P., Dhamelin court P., Laureyns J., “Cold remote nitrogen plasma polymerization from 1.1.3.3-Tetramethyldisiloxaneoxylene–mixture”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **52**, 1994, 1595–1606.
- [62] Wright A. N., Winkler C. A., “Active nitrogen”, Ed. par E. M. Loebl, Academic Press, New York, 1968, 602 pages.
- [63] Rossi F., Bretagnol F., Valsesia A., Colpo P., “Application of plasma processes in nanobiotechnology”, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, **43**, 2008, 277–281.
- [64] Pereira-Medrano A. G., Forster S., Fowler G. J. S., McArthur S. L., Wright P. C., “Rapid fabrication of glass/PDMS hybrid μ IMER for high throughput membrane proteomics”, *Lab Chip*, **10**, 2010, 3397–3406.
- [65] Song Y. S., Shin H. Y., Lee J. Y., Park C., Kim S. W., “ β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose”, *Food Chem.*, **133**, 2012, 611–617.
- [66] Wu T., Suzuki H., Su Y., Tang Z., Zhang L., Yomo T., “Bio-inspired three-dimensional self-patterning of functional coatings for PDMS microfluidics”, *Soft Matter*, **9**, 2013, 3473–3477.
- [67] Psoma S. D., van der Wal P. D., Frey O., de Rooij N. F., Turner A. P. F., “A novel enzyme entrapment in SU-8 microfabricated films for glucose micro-biosensors”, *Biosens. Bioelectron.*, **26**, 2010, 1585–1587.

Chapitre 3

Résultats et Discussion

Chapitre 3

Résultats et Discussion

Les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse sont exposés dans ce chapitre, exception faite d'une publication portée sur la spectroscopie térahertz, introduite en perspective et présentée en annexe de ce mémoire. Les résultats présentent de façon chronologique les études relatives à la compréhension de cinétiques enzymatiques en réacteur microfluidique, à l'élaboration d'un procédé couplés de type réaction-séparation ainsi qu'à l'élaboration d'une méthodologie d'immobilisation d'enzyme conjointe à celle de microcanaux par la technologie des plasmas froids. Chacun des résultats majeurs est présenté sous la forme d'un article scientifique publié, soumis ou simplement en préparation. Un bref descriptif des objectifs posés amorce chaque étude alors qu'une synthèse la clôture.

3.1. Réactions enzymatiques en réacteur à flux laminaire : influence de la miniaturisation des réacteurs sur les cinétiques réactionnelles

Cette étude inaugure ce chapitre de résultats par deux orientations. La première cherche à déterminer les effets spécifiques de la miniaturisation d'un réacteur sur une cinétique réactionnelle relativement simple. Les particularités de la configuration fluidique au sein du microréacteur conjuguées à la spécificité de l'hydrodynamique microfluidique sont traitées dans leur influence potentielle de la cinétique d'une réaction modèle d'hydrolyse rapide à un substrat. La deuxième orientation se focalise sur une réaction d'intérêt, la protéolyse de l'hémoglobine par la pepsine, en s'appuyant sur les notions tirées de la mise en œuvre de la réaction précédente. Des hypothèses sont proposées comme base pour la compréhension de la mécanistique de cette réaction protéolytique en microréacteur.

3.1.1. Modèle réactionnel β -galactosidase / o-NPG : étude cinétique

Introduction

Dans la littérature, divers résultats ou interprétations caractérisent la cinétique enzymatique dans des systèmes microfluidiques [1-5], bien qu'ils ne concordent pas toujours. Ils ne

permettent pas d'apprécier pleinement le potentiel global des microréacteurs pour la conversion par voie enzymatique même si quelques règles générales d'utilisation ont été formulées [6]. La diversité des biocatalyseurs (et donc des mécanismes réactionnels impliqués) ainsi que de leurs substrats rend cette tâche d'autant plus complexe. De ce constat est apparu la nécessité d'investiguer une réaction enzymatique dont la cinétique apparaît, en première approximation, moins complexe que l'est la protéolyse. C'est dans cet esprit que cette première étude a été orientée. Le choix du modèle réactionnel s'est principalement justifié par la relative simplicité du mécanisme réactionnel, par les moyens courants nécessaires à l'analyse d'un produit de réaction ainsi que par l'abondance notable de littérature usant ce modèle¹⁵. L'objectif principal était de tirer des informations essentielles permettant de mieux appréhender un microréacteur. Il visait notamment, *via* la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme, à identifier quelles propriétés fluidiques et quelles caractéristiques imprègnent la cinétique réactionnelle.

Etude expérimentale

Comme première approche expérimentale, l'étude de l'hydrolyse d'un substrat synthétique (*ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside ou *o*-NPG) par la β -galactosidase est présentée sous la forme d'un article scientifique soumis pour publication. Il s'intitule "*Etude cinétique d'une réaction enzymatique en réacteur microfluidique*" :

Kinetic study of an enzyme-catalyzed reaction in a microfluidic reactor

Adil Elagli, Anthony Treizebre, Bertrand Bocquet, Pascal Dhulster, Renato Froidevaux

Manuscrit soumis

¹⁵ Néanmoins, l'enzyme ne provient pas toujours de la même souche bactérienne et ne possède donc pas toujours les mêmes propriétés.

Kinetic study of an enzyme-catalyzed reaction in a co-flow microreactor

Adil Elaghi^{a,b}, Anthony Treizebre^b, Bertrand Bocquet^b, Pascal Dhulster^a, Renato Froidevaux^a

^a*Institut Charles Violette, Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) – EA 1026, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d’Ascq, France*

^b*Institut d’Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) – UMR CNRS 8520, Université Lille 1 – Sciences et Technologies, Villeneuve d’Ascq, France*

Corresponding author: Dr. Renato Froidevaux
Institut Charles Violette, Laboratoire des Procédés Biologiques,
Génie Enzymatique et Microbien
Polytech’Lille, Avenue Paul Langevin
Université Lille 1 - Cité Scientifique
59655 Villeneuve d’Ascq cedex - France
renato.froidevaux@univ-lille1.fr
Phone: +33 328 76 73 90
Fax: +33 328 76 73 56

Abstract

The kinetic study of a β -galactosidase-catalyzed reaction was performed in a co-flow microreactor. Although the residence time used to calculate β -galactosidase kinetic parameters was not sufficient enough to assume complete enzyme-substrate mixing in the microreactor, enzyme initial activity was found to be enhanced at low substrate concentrations whereas slightly declined at high substrate concentrations in comparison to batch. Some important flow-dependent factors are proposed to be influential on the reaction kinetics so that the Michaelis-Menten constant K_m and the maximal velocity V_{max} were determined as apparent parameters. Enhanced affinity combined with a slightly lower V_{max}^{app} were determined in comparison to bench-scale kinetics. These results are discussed by taking into account both gradient-based *interdiffusion* zone and enzyme confinement within the microreactor. The flow parabolic profile relevant to the pressure drop under laminar conditions is discussed as well, suggesting that the yield of the reaction cannot only be regarded as a direct measure of the degree of mixing. These results demonstrate also that

microreaction systems characterized by a high second Damköhler number Da_{II} are not automatically unsuitable for production.

Keywords: microreactor, enzyme reaction, kinetics, laminar flow, diffusion

1. Introduction

The understanding of enzyme-catalyzed reactions is of great importance not only because of their major involvement in biological phenomena but also because of their crucial role and their potential in various engineering processes. Beyond their intrinsic properties, the reaction kinetics of enzyme-catalyzed reactions is also governed by various well-known physicochemical parameters like the hydrogen potential, the reagents concentration, the temperature and more [1]. Informations about how an enzyme reaction is influenced by different reaction conditions are essential to develop efficient enzyme processes. Among them, the hydrodynamic properties of the reaction medium play a crucial role by influencing the mass transfer properties and consequently the enzyme activity. These properties, which are well-characterized by several dimensionless numbers such as the Reynolds, Grashoff or also Péclet numbers [2], determinate the degree of mixing, a crucial parameter in a reaction process [3]. Derived from the microfabrication technologies and increasingly used in various fields, the miniaturized reactors generally impose a diffusion-based mixing because of the strong laminar conditions [4]. The flexibility in design and conception of these reactors brings them properties that might allow new ways in (bio)processes engineering [4-7], in process intensification [8], or more simply in collecting chemical information needed for optimizing reactions [4,9,10]. In addition to the reduction of the volume, the resulting phenomenon of space confinement, which extensively exists in living systems, can be an interesting approach for mimicking certain biological environments [11].

Studying enzymatic reaction at microscale helps the understanding of chemical processes occurring in life activities. Indeed, confined micro- or nanospaces can mimic the confined environments of living system [11,12]. Proteins confined in such spaces can be stabilized by folding forces different from bulk solutions, *i.e.* away from any confining walls [11]. Enzymes can take benefits of space confinement by leading the equilibrium from the unfolded state to the native state [11,13-17]. The effect of nanoconfinement is thus of great importance

in understanding “free state” enzyme kinetics occurring in life activities. Because of the high molecules concentrations and the strong concentration gradients that can be reach in microsystems, a microfluidic platform could represent a close configuration of specific enzyme action medium (proteasome, inside of ribosomes...), where very high concentration of macromolecules may take up as much as 30% of the extracellular medium [11,18]. The level of crowding and confinement may substantially manipulate the space available for enzyme reactions and affect the behavior of an enzyme [11]. Thus, it clearly appears that micro- or nanoconfinement interest not only life processes but also biocatalytic processes. However, the recent development of enzymatic microreactors concerned mainly proteomic and enzymatic biosensors for the analytical sciences [7]. Beyond these fields, reaction engineering might provide solutions to develop enzyme processes at the commercial level and microreaction engineering, in the context of process intensification, is candidate for such technology. On one hand, flow microreactors are gaining growing interest in (bio)chemical transformations for their operating characteristics such as the ability to develop efficient continuous processes [19], to work at elevated temperatures [20] and pressures [21], the possibility to immobilize (bio)catalysts on large surfaces to optimize product-from-enzyme separation and enzyme recycling, the potential integration of reaction monitoring functions [22] or the scalable processing conditions. On the other hand, process intensification could address specific troubles in yields, safety, sustainability or selectivity of specific chemical or enzyme reactions [4,6,7]. Moreover, the limited use of chemicals and energies can reduce cost and environmental impact.

The microreaction devices that have been developed so far can be classified into two types: chip-type and capillary-type microreactors. The first offer several advantages including a strict control of fluid transport by electrokinetic pumping [23] and integration of many advanced and analytical functions [22,24,25]. Although they have been mainly used for the development of bioanalytical tools, recent studies on enzyme kinetics in such devices show that the development of enzyme processes by microfluidics requires a good understanding of both enzyme and substrate behaviors in microspaces, where only diffusion takes place [26]. Diffusion is a process that can easily be neglected at large scales, but rapidly becomes significant at the microscale [26]. Liquid microspace provides interesting characteristics such as short molecular diffusion distances, large specific interfacial area (liquid–liquid or liquid–solid), and small heat capacity, all of which can be expected to promote highly effective (bio)chemical reactions in microchips. As the reaction rate of an enzyme is governed by its

intrinsic activity but also by the availability of the substrate at the enzyme's site, systems with small internal dimensions can overcome diffusional limitations [5]. According to the well-known relationship $t_D \cong y^2/D$ (with t_D the characteristic diffusion time, y the diffusion distance and D the diffusion coefficient), diffusional limitations can be reduced or increased as function of the geometry of the reactor and the molecular weights of the reagents [5,26]. The kinetics of enzymatic reactions can be modulated according to these properties, which can result in interesting approaches in specific bioconversion processes [27].

Several microfluidic reactors have been developed to study enzyme kinetics in continuous-flow solution phase with “free” enzyme or, most frequently, by immobilizing them. In comparison to the notable efforts made to design and study these immobilized enzymatic reactors (IMERs) [7,28-31], only few enzyme reactions in liquid-liquid parallel laminar co-flows have been investigated, where enzyme and substrate are initially injected in the microreactor into separate streams. There is consequently a growing interest in understanding the impact of co-flow configuration on enzyme kinetics for various potential applications, including continuous-flow processes. However, a common crucial question deals about the phenomenon of mixing in microchannels: does a simple T provide sufficient mixing or is a special micromixer warranted? This interrogation can be studied for specific reaction and reactor by considering the ratio between the reaction and the diffusion rates or times, which is described by the second Damköhler number Da_{II} . It provides an estimate of whether enhanced mixing techniques are required because of concentration gradients. Without mixing device, the high concentrations of both enzyme and substrate that can be reached in their respective compartment lead to a high concentration gradient at the beginning of the reaction, *i.e.* at a spatial position where the reagents start to be in contact through an interface. These concentrations respectively reach twice those of batch in the same conditions (in the earlier degree of mixing by diffusion) and can lead to specific reaction behaviors [27]. Nevertheless, it has been shown that small channel width, decreasing enzyme concentration and increasing substrate concentration (with a high diffusivity) can limit mass transfer resistance, *i.e.* decreasing the Da_{II} number [5]. This can be easily represented by inserting Michaelis-Menten kinetic equation in the second Damköhler number (equivalent to t_D/t_r with t_D the characteristic diffusion time and t_r the characteristic reaction time). The equation obtained has been described by Swarts et al. [5]:

$$Da_{II} = \frac{t_D}{t_r} = \frac{y^2 V_{\max}[S][E]}{D (K_m + [S])[S]} = \frac{y^2 V_{\max}[E]}{D (K_m + [S])}$$

with t_D the characteristic time needed for diffusion (s), t_r the characteristic reaction time (s), y the diffusion distance (m), D the diffusion coefficient ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), $V_{\max}$ the maximum enzyme reaction rate ($\mu\text{mol sec}^{-1} \text{g enzyme}^{-1}$), K_m the Michaelis-Menten constant (μM) and $[E]$ and $[S]$ the enzyme and substrate concentrations (g L^{-1}) respectively. Fast reactions rarely occur uniformly in the whole volume so that their rates are no longer defined by inherent kinetics but are limited or favored by diffusional rates [26], depending on the reaction microchannel wide (y) and on reactants molecular weights (or their diffusion coefficient D). In addition, Taylor dispersion effect [2,32,33], resulting from the flow rate difference between the center and the wall of the microchannels, might eventually influence enzyme activity by enhancing enzyme-substrate mixing along the direction of flow. The variation of the flow-rates to control the reaction times addresses a specific change in the flow hydrodynamic profile by accentuating or not its parabolic effect in the center of the channel section, *i.e.* around the enzyme-substrate interface. Consequently, besides the dispersion phenomena based on the rate gradient that is created radially to the flow might also possibly modulate enzyme apparent activity, in particular when using long capillaries or strongly varying flow-rates, which is the case in this work. However, these pressure drop effects have been rarely discussed in research dealing with enzyme kinetics in microreactor.

Several studies have been reported in the literature where enzyme kinetics is either enhanced or declined so that it remains difficult to establish general rules of setting up an enzyme reaction in a microfluidic reactor, each reaction and reactor being specific. The strict effect of diffusion on enzyme activity has already been described by Swarts *et al.* [5]. In the present paper, we propose to discuss the effect of enzyme-substrate interface and microfluidic laminar flow-rate on enzyme kinetic parameters determined from an enzyme-catalyzed reaction performed in a continuous-flow microfluidic reactor. Yamashita *et al.* previously reported a Michaelis-Menten constant (K_m) dependence on the flow-rate and suggested that microfluidics properties influenced the reactivity by a more efficient complex formation combined with a decrease in the apparent activation energy with increasing flow-rate [17]. Herein, the study deals rather about the influence of the co-flow spatial configuration and the impact of varying flow-rate to control the reaction times, which is the case when determining kinetic parameters. The functionality of the reactor and its performance in the hydrolysis of

ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (*o*-NPG) by “free” β -galactosidase is described. The kinetic parameters K_m and V_{max} , typically determined using initial reaction rates calculated for various substrate concentrations, are discussed according to the lack of mixing and the strong parabolic profile that occurred at the higher flow-rates that were used.

2. Material and methods

2.1. Microreactor

The microreactor is constituted by the combination of a microfluidic microsystem with a fused-silica capillary. The microfluidic microsystem has been designed specifically for performing terahertz spectroscopy [34]. This microsystem was manufactured using a glass/silicon/glass technological process. First, a 350 μ m-thick silicon wafer is bonded to a 700 μ m borosilicate glass substrate by thermocompression using BCB (benzocyclobutene, BCB3022-46, Dow Chemical Company) as polymer. Then, microchannels were etched in silicon by a Deep Reactive Ion Etching (DRIE) process. Finally, the microchannels were covered by another BCB-coated glass substrate to get a buried Y-shaped microfluidic circuit. Details on the technological process have already been reported [35]. Its transparency allowed checking the lack of bubbles at the start of the circuit. The design consisted in an 180 μ m-deep and 100 μ m-wide simple laminar flow channel connected with an outlet fused-silica capillaries (75 μ m I.D. x 150 μ m O.D.), where the reaction predominantly took place (Figure 1). The total reaction volume of the system reached 0.825 μ L.

2.2. Experimental procedure and measurements

The hydrolysis of *ortho*-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (*o*-NPG) by β -galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, E.C. 3.2.1.23, 10.4U/mg, MW: 105kDa) from *Aspergillus Oryzae* (Sigma-Aldrich) was chosen as a model reaction to compare its kinetics at microscale with its kinetics at conventional batch scale. Enzyme and substrate solutions were prepared in a 20mM acetate buffer at pH4.5. The reaction was assumed to be stopped by 1M Na₂CO₃. Enzyme and substrate concentrations were the same at microscale and bench-scale series of experiments. The microfluidic experiments were conducted at room temperature ($\sim$ 22°C) and 1mL syringes (Terumo) of enzyme (0.2mg mL⁻¹) and substrate solutions (varying from 0.1mM to 20mM) were placed in the same syringe pump (SyringePump, New Era Pump

System) for inlet rates ranging from $0.250\mu\text{L min}^{-1}$ (99s residence time) to $5\mu\text{L min}^{-1}$ (4.95s residence time). The outlet capillary was immersed in $10\mu\text{L}$ of $1\text{M Na}_2\text{CO}_3$ buffer to inactivate the enzyme (Figure 1). The reaction times were calculated from the flow-rate and the sample collect reached $20\mu\text{L}$ volume for each residence time. For each flow-rate, recovery of the solution from the outlet of the flow channel was started after an initial $30\mu\text{L}$ pre-sending delay to reach steady-state flow in microreactor. Bench-scale experiments were also conducted at room temperature ($\sim 22^\circ\text{C}$) in 2mL reaction volumes and addition of 1mL of $1\text{M Na}_2\text{CO}_3$ ensured reaction stopping.

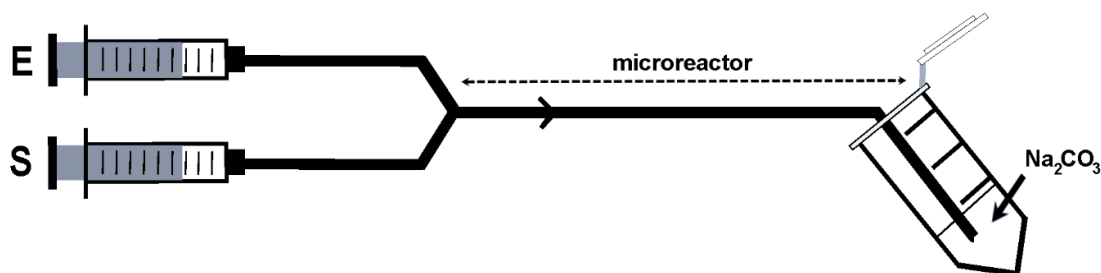


Figure 1. Schematic experimental protocol for microfluidic experiments. *E* and *S* stand for enzyme (β -galactosidase) and substrate (*o*-NPG) respectively. The outlet capillary is immersed in Na_2CO_3 buffer to instantaneously inactivate the β -galactosidase.

The products of the reaction of *o*-NPG are *ortho*-nitrophenol (*o*-NP) and galactose. Since *o*-NP is a colored substance, an UV-VIS detector (WPA Biowave II Biochrom) was used to measure absorbance of approximately $4\mu\text{L}$ sample at 415nm . The nano-spectrophotometer has been calibrated with different *o*-NP concentrations varying from 0 to 1mM . Standard curve for calibration of this spectrophotometer showed 95% reliable absorbance values. The reliability of the syringe pump was also assayed by measuring volumes for each flow rate and comparing them to the theoretical dispensed volumes given by the apparatus. This led to consider again 95% reliable values. Both values were included in the processing of the results.

The initial enzyme activity was determined using 4.95s residence time within the microreactor for microscale experiments and for 5s reaction time for bench-scale experiments. The Michaelis-Menten constant K_m and the maximal reaction rate V_{max} were calculated using the Lineweaver-Burk method.

2.3. Numerical simulations

To model the enzyme and substrate concentration profiles within the microreactor, COMSOL multiphysics was used to simulate substrate-enzyme mixing at different flow-rates by solving the advection-diffusion taking into account the following diffusion coefficient: $0.47 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for β -galactosidase, $6.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for *o*-NPG, $9.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ for *o*-NP, approximated by the Wilke-Chang formula [5,36].

3. Results and discussion

The interval of optimal enzyme concentration was determined at bench-scale by measuring the initial rate of the hydrolysis at fixed substrate concentration (0.4mM) as function of different β -galactosidase concentrations (result not shown). The optimal concentration has to be situated in the linear range of the plots [37]. In this study, 0.2 mg mL^{-1} enzyme concentration was chosen for the next experiments of kinetic parameters determination at both micro and bench-scale.

β -galactosidase activity at bench-scale was measured as function of reaction times at different substrate concentrations (Figure 2a) and compared to the activity obtained for the same reaction times in microreactor (Figure 2b). It clearly appears that the product concentration rapidly increases at short residence times in the microreactor. For the smaller substrate concentrations (0.1-0.4mM), the reaction seems to be rapidly complete, suggesting an enhancement of the rate in comparison to the reaction at bench scale.

3.1. Microfluidic spatial configuration

3.1.1. Effect of concentration gradient and interdiffusion zone

At the beginning of the reaction in microreactor, it can be considered that the specific enzyme-substrate co-flow spatial configuration leads to a strong concentration gradient between the two phases, *i.e.* both enzyme and substrate “compartments” (Figure 3a). A fast beginning of the reaction could be attributed to this diffusion enhanced effect at interface which leads substrate to move in the direction of enzyme and *vice versa*. In comparison with batch reaction, a gradient-based *interdiffusion* occurs in the microreactor whereas mechanical and thermal agitation dominates at bench-scale. The increased surface-area-to-volume ratio

lead to intimate contact between β -galactosidase and its substrate. It can affect the kinetics of the reaction by affecting the kinetics of enzyme-to-substrate binding to form the intermediate complex.

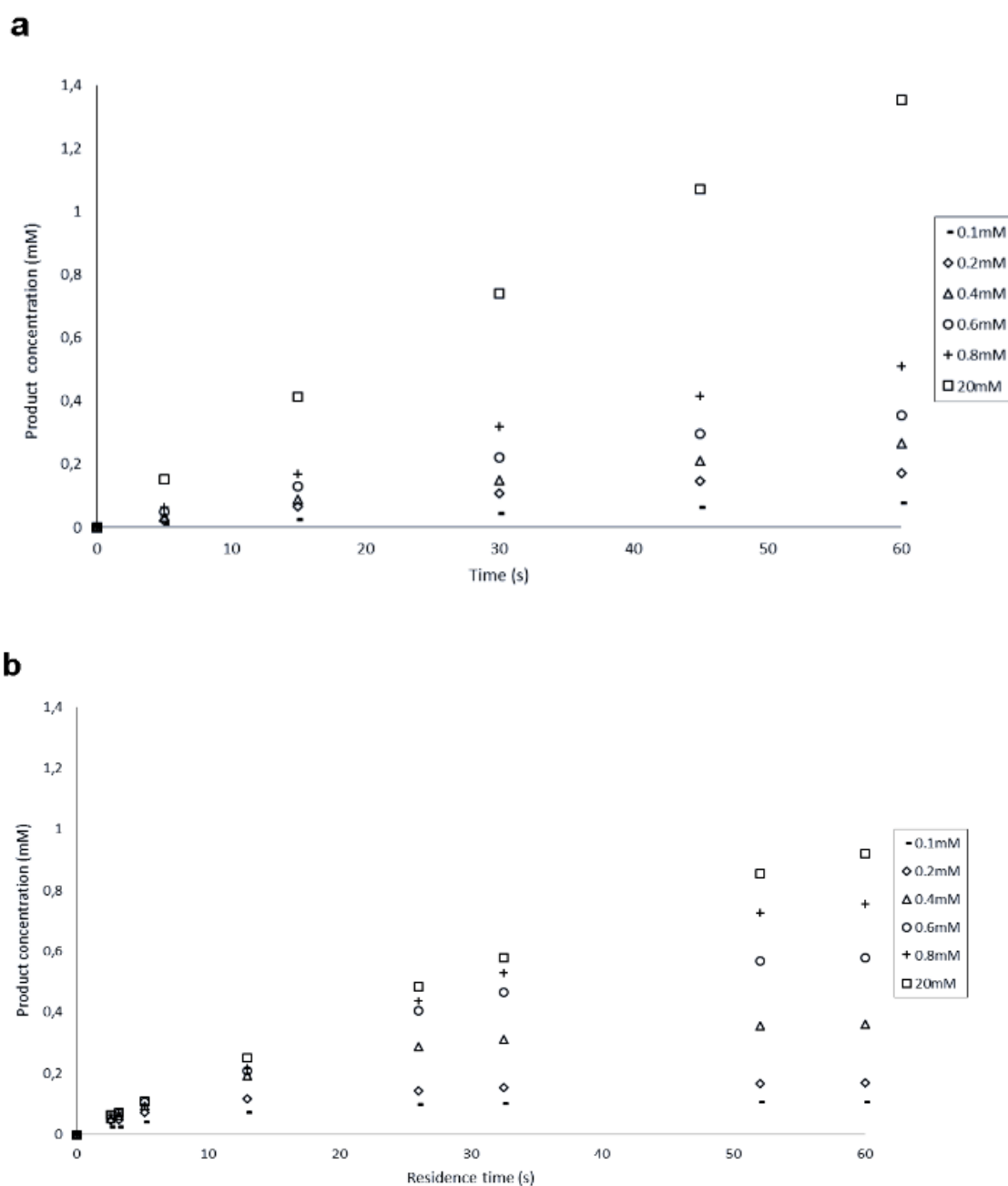


Figure 2. *o*-NP concentration as function of (a) reaction time in batch and (b) residence time in microreactor.

Numerical simulations indicate that, when increasing residence time and due to its higher diffusivity, only the substrate is able to efficiently diffuse (Figures 3b and 3c) whereas the

enzyme stays relatively confined in its compartment due to its low diffusion coefficient (result not shown). However, Muddana *et al.* previously reported that “substrate catalysis enhances single-enzyme diffusion” [38]. Since the reaction is spatially localized around enzyme-substrate interface for short residence times, the consumption of substrate could thus locally enhance enzyme diffusivity. A flow-rate-dependent growing and dispersive interface has to be considered along the flow from the region where the reaction starts. Indeed, substrate radial diffusion in the microchannel governs the enzyme activity and the flow-rate impacts the substrate diffusion as well as the Taylor dispersion effect, connected with the laminar flow parabolic profile. Nevertheless, it can be considered that dispersion sufficiently occurs only if the diffusion time is much smaller than the reaction time ($t_D < t_r$), which signifies that the Da_{II} number must be low. It is not the case for small substrate concentrations (in general $[S] < K_m$). On the basis of the well-known formula $t_D \cong y^2/D$, the typical substrate diffusion time $t_{D(o-NPG)}$ can be approached.

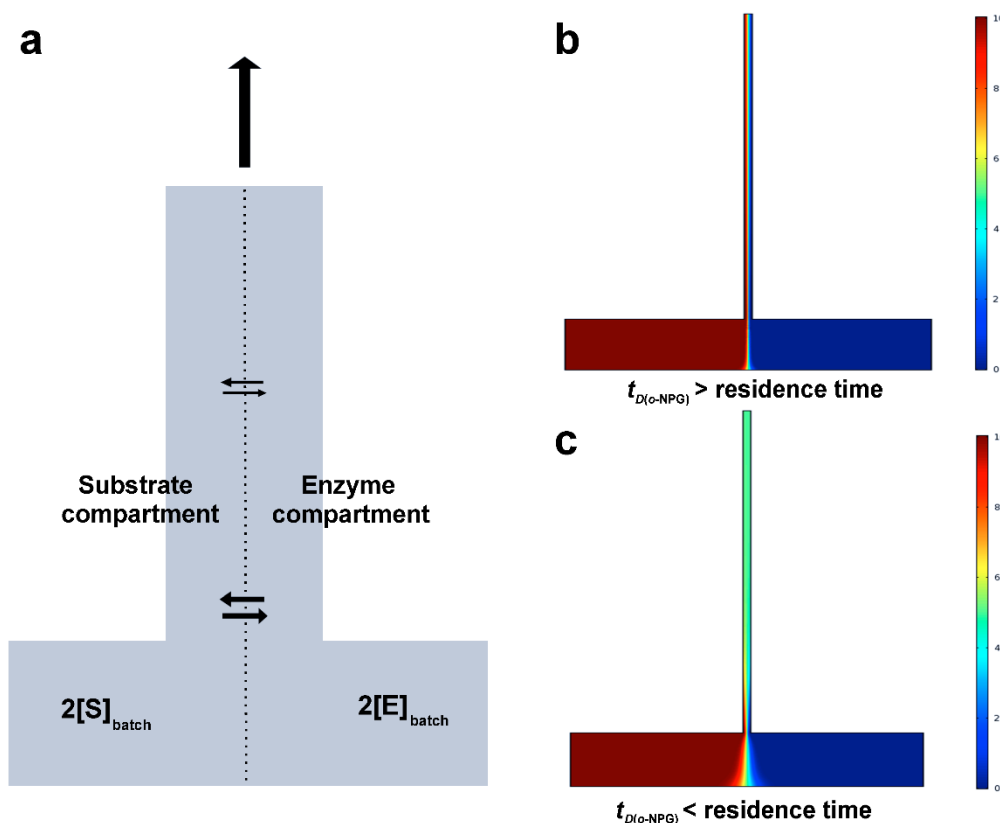


Figure 3. (a) Enzyme and substrate co-flow spatial configuration at the microreactor inlet. The initial concentration gradient results from the compartmentalization of both enzyme and substrate at the reactor inlet where their concentrations before interdiffusion are twice batch concentrations. (b) o-NPG diffusion profile (a.u.) along the microchannel for residence time lower than o-NPG diffusion time and (c) for residence time higher than o-NPG diffusion time.

Based on the internal diameter of the reactor and the diffusion coefficient of *o*-NPG, it can be considered that $t_{D(o\text{-NPG})} \sim 8.8\text{s}$, *i.e.* that this time corresponds to the time needed for the substrate to diffuse from the inner wall of its compartment to the inner wall of enzyme compartment. Thus, it can be considered that residence time lower than $t_{D(o\text{-NPG})}$ signifies that the substrate diffusion is not complete within the reactor and that the enzymes close to the inner wall of their compartment do certainly not take part in the reaction. Note that the minimal residence time investigated to calculate β -galactosidase initial activity was about 5s (see 2.2.), *i.e.* that the residence time was lower than the substrate characteristic diffusion time $t_{D(o\text{-NPG})}$. Figure 3b represents this statement.

3.1.2. Enzyme confinement

In comparison to the reaction at the batch scale, the confinement of β -galactosidase in its compartment constitutes another characteristic specific to the microfluidic system and provides a reaction condition that can also affect the reaction kinetics. Since enzyme diffusivity is lower than substrate diffusivity, the reactive enzyme-substrate interface tends to progressively move in the direction of enzyme (Figures 3b and 3c). For residence times lower than substrate diffusion time $t_{D(o\text{-NPG})}$, mass transfer resistance limits the conversion (Figure 3b). Inversely, conversion is not limited by diffusion if the residence time exceeds the value of $t_{D(o\text{-NPG})}$ (Figure 3c). Substrate diffusivity provides a reactive interface where β -galactosidase crowding can enhance *o*-NPG catalysis velocity. Indeed, by considering that the enzyme stays relatively confined in its compartment, its concentration at this side can reach up to twice its concentration in batch where mixing is considered as ideal. Since the kinetics of an enzyme-catalyzed reaction is strongly dependent of enzyme concentration, enzyme confinement can here locally enhance substrate hydrolysis kinetics in comparison to batch if the enzyme/substrate ratio locally increases (in the enzyme compartment), which can occur particularly at short residence times for low substrate concentration. Although the enzyme molecules that are close to the microchannel wall cannot react at residence times $< y^2/D_{(o\text{-NPG})}$ (Figure 3b), the initial activity in microreactor exceeds that from bench-scale at low substrate concentrations (Figure 2), which hyphenate the role of the “spatially localized” reagent concentration. However, these initial confinement effects (concentration gradient, local *E/S* ratio) might not be the only reason explaining the initial rate differences between batch and microreactor, in particular at low substrate concentrations (low characteristic reaction time t_r compared to the characteristic diffusion time t_D).

3.2. Influence of substrate concentration on enzyme initial activity

In Figure 2, the confusion of the slopes for the substrate concentrations higher than 0.4mM suggests that the initial rate of the substrate hydrolysis rapidly reaches a steady-state when increasing substrate concentration in microreactor. The initial rate of a reaction generally depends on substrate concentration but is independent if this latter is large, all the enzyme being theoretically “saturated” when $[S] \gg K_m$. At substrate concentrations inferior to 0.6mM in the microreactor, the substrate availability for the enzyme seems to not limit the reaction rate (Figure 2b). When increasing substrate concentration, all the enzymes being not “saturated” at high flow-rates (Figure 3b), the substrate could be in excess over the “saturated” enzymes (in the interdiffusion zone) but not over all the enzymes (close to the walls), which could explain the rapid steady-state of the reaction rate slope (Figures 2b). Moreover, when plotting initial β -galactosidase activity as function of substrate concentration, the initial activity steady-state appears clearly from smaller substrate concentrations than in batch (Figure 4).

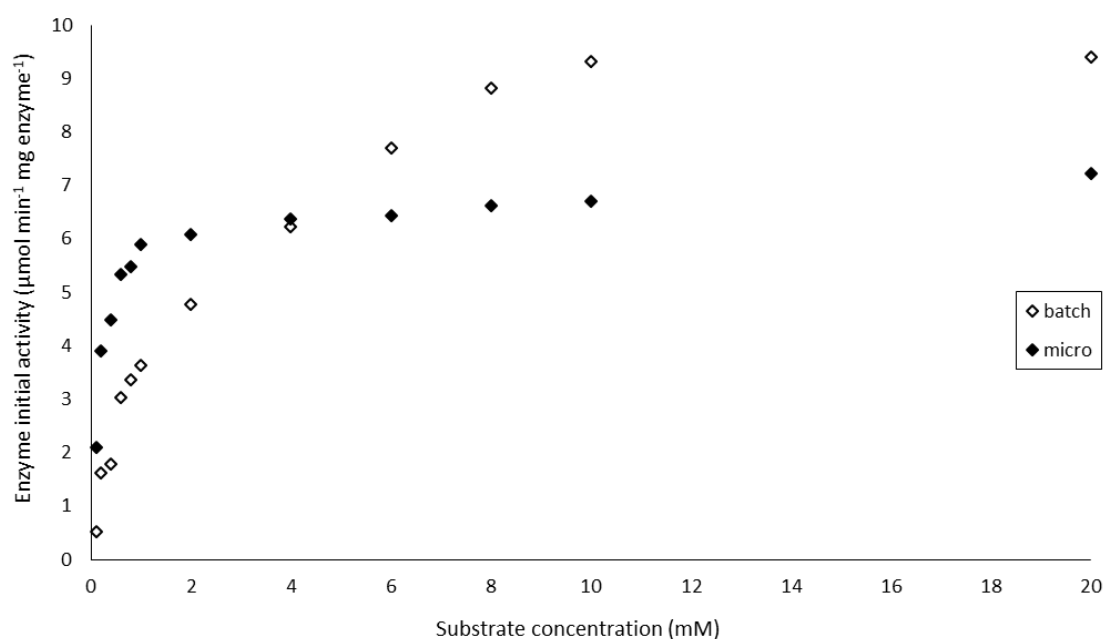


Figure 4. Initial β -galactosidase activity as function of *o*-NPG concentration for both batch and microfluidic experiments.

Then, increasing residence time at these large substrate concentrations allow substrate diffusion in the whole “enzyme compartment”, leading probably to a saturation of all the

enzyme active sites. In addition, a small contribution in slope steady-state could be caused by a steric effect due to an accumulation of product which is generated around the center of the flow before its diffusion. In comparison to batch, the enhancement of the initial activity in microreactor is well observable for the lower substrate concentrations up to $\sim 4\text{mM}$, corresponding to the concentration range connected to the theoretical maximum velocity of the reaction V_{max} (Figure 4). Since initial activity is enhanced in microreactor whereas all the enzymes are probably not “saturated”, the flow-rate is proposed to be another factor influencing the enhancement of the enzyme initial activity compared to batch.

3.3. Influence of the flow-rate on enzyme initial activity

In pressure-driven systems under laminar conditions, the velocity of the flow naturally decreases as it gets closer to the wall and farther from the center. Therefore, the reagents have an increasing residence time in the laminar flow reactor from the center to the side. When reducing flow-rate, this parabolic effect of the flow profile (Poiseuille flow) decreases so that the rate radial gradient of the flow also decreases. The specific interface region gets larger because of interdiffusion, predominantly the substrate diffusion in the “enzyme compartment” since the substrate is much smaller than the enzyme. Inversely, increasing the flow-rate intensifies the parabolic profile of the flow and consequently the dispersion phenomena. This latter could contribute to the higher initial enzyme activity in microreactor than in batch because at residence time $< y^2/D_{(o\text{-NPG})}$, the reaction predominantly occurs at interface between the flow of enzyme and substrate. The rate of the flow in the center of the microchannel, *i.e.* around enzyme-substrate interface for high flow-rates, is much faster than that around the channel walls where the rate is almost zero. In consequence, product dispersion effect at higher flow-rates provides certainly a high yield in the collected samples because the reaction starts and only occurs around interface, which is localized around the center of the flow in the “enzyme compartment” (Figure 5). This localization within the microreactor can be described as an “efficient reaction volume” where the product is mainly generated and collected at high flow-rates (Figure 5). This zone spends the lesser time in the reactor, according to the residence time distribution under laminar conditions. It results certainly in a product concentration in the volume at the outlet of the capillary so that yield cannot only be regarded as a direct measure of the degree of mixing. Thus, this flow-rate effect certainly enhances the initial (apparent) enzyme activity in microreactor compared to that calculated from bench-scale experiments.

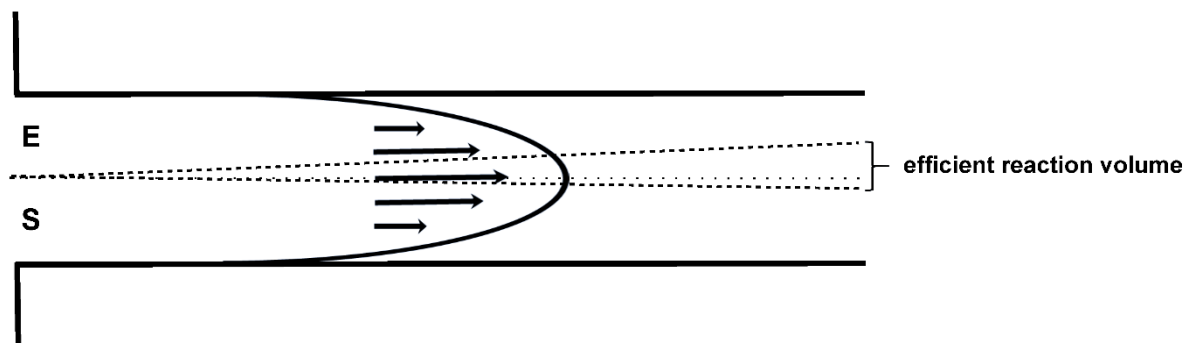


Figure 5. “Efficient reaction volume” relevant to the parabolic profile of the flow in microreactor for residence time $< t_{D(o-NPG)}$. This reactive zone spends the lesser time in the microreactor. *E* and *S* stand for enzyme (β -galactosidase) and substrate (*o*-NPG) respectively.

At residence times $> y^2/D_{(o-NPG)}$, the diffusional limitations decrease and the reaction occurs more homogeneously in the microreactor because of substrate diffusion, which is complete in the whole reactor after approximately 9s ($t_{D(o-NPG)}$, see 3.1.1.). Since the parabolic profile of the flow reduces and substrate diffusion is complete within the microreactor, the parabolic rate gradient does not have sufficiently strong effect anymore on product spatial concentration, the reaction occurring predominantly in the “enzyme compartment”. As a consequence, a reduced reaction rate probably independent from the substrate consumption could occur with increasing residence time. Indeed, the time-dependent mixing at lower flow-rates concerns mainly the diffusion of substrate in the direction of enzyme (Figure 3c). The enzyme-substrate complex and the product formation principally occur in the “enzyme compartment” but not around the center of the flow, which reduces the impact of the residual parabolic profile at lower flow-rates. Thus, increasing residence times allow the product to diffuse in the whole channel.

3.5. Kinetic parameters are apparent

By strongly influencing the initial activity, the enzyme confinement, the flow-rate and the concentration gradient impact the kinetic parameters as well by a synergic effect. The initial rates, typically calculated at high flow-rates, were plotted against the different substrate concentrations according to the Lineweaver-Burk method. In comparison with kinetic

parameters calculated from bench-scale experiments, a lower value of the Michaelis-Menten constant K_m in addition to a slightly lower value of the maximal velocity V_{max} were determined (Table 1). The bench-scale kinetic parameters approach previous reported values [39]. However, considering that the flow may influence the mass transfer properties in microfluidic mode, it is important to consider these values as apparent values that are modulated by (limiting or enhancing) external parameters but not intrinsic ones. Indeed, the explanation of such a kinetic behavior lies in the specificity of the laminar co-flow configuration and the resulting diffusive conditions but not in a modification in any enzyme intrinsic catalytic property. As often with immobilized enzymes systems, the activity can be qualified as “apparent” because of the mixing limitations characterized by the diffusion-reaction regime. Moreover, it is also important to note that, in comparison to batch (ideal mixing conditions), all the enzymes do not take part in the early stage of the reaction (before substrate diffusion is complete within the microchannel) since they are confined in their compartment, even if there is certainly a high enzyme density in the center of the flow. Thus, considering that the initial activity was calculated for $t_r < t_{D(o-NPG)}$, all the enzyme did not react due to the lack of mixing. The measured kinetic parameters from micro-scale experiments reflect thus the enzyme activity in the “efficient reaction volume” but do not rigorously take into account the absence of activity around the microchannel walls. In consequence, a product concentration effect can overestimate the “real” initial enzyme activity (at low substrate concentration, see 3.2.) and consequently decrease the value of K_m . In addition, the slightly lower value of V_{max} can be related to the saturation of the enzymes in this region. Nevertheless, although the calculated initial rate is an apparent velocity, high initial rates leads to a high yield at the outlet of the capillary, suggesting that microfluidics can enhance product recovery at low substrate concentrations in comparison to batch.

	$K_m^{(app)}$ (mM)	$V_{max}^{(app)}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg enzyme}^{-1}$)
Bench-scale	2.56 ± 0.29	9.83 ± 0.52
Microreactor	0.26 ± 0.05	7.76 ± 0.82

Table 1. Kinetic parameters of β -galactosidase at bench-scale (K_m , V_{max}) and in microreactor (K_m^{app} , V_{max}^{app}).

In comparison to our results, those of Swarts et al. do not show an enhancement of the β -galactosidase kinetic parameters [5], probably because of the residence times and the low

flow-rates that were used in combination with the low reactor length, leading to a lower pressure drop than in our case. However, for instance, it remains difficult to surely conclude. Other studies showed an enhancement of enzyme kinetics in solution-phase by using β -glucosidase [17,40]. Moreover, Yamashita et al. already described the strict influence of flow-rate on K_m by varying the channels lengths to control the reaction times [17]. They suggested that the anisotropy of the flow influenced the reactivity of the enzyme *versus* its substrate and showed that the flow-rate dependence of the K_m (the higher the flow-rate, the lower the K_m) was correlated to a flow-rate dependence of the activation energy (the higher the flow-rate, the lower the activation energy). The observation and findings of Yamashita et al. could reasonably be combined with our results to explain the apparent decrease in K_m presented in this study, in comparison to batch. Finally, as developed by certain authors, the conformational changes and both thermal and structural stability that seems to be conferred to macromolecules in confined and crowded microenvironment can also play a role in the expressed activity [17,41,42].

4. Conclusion

In combination with previous results present in the literature, these results reveal that microfluidics influence enzyme (apparent) kinetics, typically calculated from initial activity. The specificity of both reagents distribution and flow regime cause specific effects impacting the apparent activity of enzyme-catalyzed reaction. Firstly, the strong concentration gradient imposes a gradient-based interdiffusion which differs from batch mixing. Intimate contact between the reactants and short diffusion distance could accelerate the reaction at early stage. Then, a probable enhancement of the substrate catalysis velocity for small substrate concentrations could result from the enzyme confinement in its compartment. Indeed, enzyme crowding leads to a region where, in the early degree of mixing, the enzyme can be locally in excess over the substrate. Finally, it has been shown that the laminar flow-rate might promote an “efficient reaction volume” in the center of the flow where the reaction predominantly occurs within the microchannel at short residence times ($< y^2/D$). The appearance of this dispersive region is caused by both concentration gradient and parabolic profile of the flow. This latter is also higher when using long capillaries. However, it is interesting to note that fluid transport can be realized by phenomena that do not involve pressure gradient (electrokinetic pumping) and thus no flow parabolic profile [23]. In this study, the decrease in K_m could thus results from these different synergic effects occurring at high flow-rates: the

enzyme affinity to its substrate might be enhanced (only) in the region around the interfacial “efficient reaction volume”. These effects seem to mask the lack of mixing so that it appears unreasonable to appreciate enzyme kinetics only as the result of the degree of mixing. Compared to batch, a decreasing $V_{\max}$ was obtained in both microfluidic and batch experiments probably caused by the fact that, at short residence times, all the enzyme do not take part in the reaction in microreactor, limited by the time-dependent substrate diffusion. However, the results demonstrate that microfluidic systems which could be characterized by a high Da_{II} number are not automatically unsuitable for production.

The huge versatility in microreactor conception make possible different processing with specific influence on specific enzyme reaction. Although it is well admitted that mass transfer resistance in microreactor can limit enzymatic conversion at short residence times, no efficient general rules characterize the implementation of enzyme reactions in microstructured devices, each reaction and reactor being a specific case. Indeed, numerous studies showed an enhancement of enzyme activity in microreactor whereas others showed the opposite. It is important for a (bio)chemist to efficiently determine what kind of reactor is the most adapted to its goal and microreactors could represent a solution in many cases.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Simon Laurette for assistance in hydrodynamic simulations.

References

- [1] Alberty R. A., *Advances in Enzymology* 2009, Intersciences Publishers.
- [2] Squires T., Quake S., *Rev. Mod. Phys.* 2005, **77**, 977–1026.
- [3] Hartman R. L., McMullen J. P., Jensen K. F., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, **50**, 7502–7519.
- [4] Elvira K. S., Casadevall i Solvas X., Wootton R. C. R., deMello A. J., *Nat. Chem.* 2013, **5**, 905–915.
- [5] Swarts J. W., Kolfschoten R. C., Jansen M. C. A. A., Janssen A. E. M., Boom R. M., *Chem. Eng. J.* 2010, **162**, 301–306.
- [6] Hartman R. L., Jensen K. F., *Lab Chip* 2009, **9**, 2495–2507.

- [7] Miyazaki M., Honda T., Yamaguchi H., Briones M., Maeda H., *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2008, **25**, 405–428.
- [8] Newman S. G., Jensen K. F., *Green Chem.* 2013, **15**, 1456–1472.
- [9] Mitchell M. C., Spikmans V., Manz A., deMello A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2001, **1**, 514–518.
- [10] McMullen J. P., Stone M. T., Buchwald S. M., Jensen K. F., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, **122**, 7230–7234.
- [11] Wang C., Sheng Z.-H., Ouyang J., Xu J.-J., Chen H.-Y., Xia X.-H., *ChemPhysChem* 2012, **13**, 762–768.
- [12] Yu H., Meyvantsson I., Shkel I. A., Beebe D. J., *Lab Chip* 2005, **5**, 1089–1095.
- [13] Zhou H. X., Dill K. A., *Biochemistry* 2001, **40**, 11289–11293.
- [14] Baumketner A., Jewett A., Shea J. E., *J. Mol. Biol.* 2003, **332**, 701–713.
- [15] Ziv G., Haran G., Thirumalai D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, **102**, 18956–18961.
- [16] Ping G., Yuan J. M., Sun Z., Wei Y., *J. Mol. Recognit.* 2004, **17**, 433–440.
- [17] Yamashita K., Miyazaki M., Nakamura H., Maeda H., *J. Phys. Chem. A* 2009, **113**, 165–169.
- [18] Minton A. P., *J. Biol Chem.* 2001, **276**, 10577–10580.
- [19] Lomel S., Falk L., Commenge J. M., Houzelot J. L., Ramdani K., *Chem. Eng. Res. Des.* 2006, **84**, 363–369.
- [20] Zaborenko N., Bedore M. W., Jamison T. F., Jensen K. F., *Org. Process Res. Dev.* 2011, **15**, 131–139.
- [21] Benito-Lopez F., Tiggelaar R. M., Salbut K., Huskens J., Egberink R. J. M., Reinhoudt D. N., Gardeniers H. J. G. E., Verboom W., *Lab Chip* 2007, **7**, 1345–1351.
- [22] Abbas A., Treizebre A., Supiot P., Bourzgui N.-E., Guillochon D., Vercaigne-Marko D., Bocquet B., *Biosens. Bioelectron.* 2009, **25**, 154–160.
- [23] Haswell S. J., Middleton R. J., O’Sullivan B., Skelton V., Watts P., Styring P., *Chem. Commun.* 2001, 391.
- [24] Kim D. L., Lee Y., Koh W.-G., *Sens. Actuators B* 2009, **137**, 305–312.
- [25] Draper M. C., Niu X., Cho S., James D. I., Edel J. B., *Anal. Chem.* 2012, **84**, 5801–5808.
- [26] deMello A. J., *Nature* 2006, **442**, 394–402.
- [27] Elagli A., Laurette S., Treizebre A., Bocquet B., Froidevaux F., *RSC Adv.* 2014, **4**, 3873–3882.
- [28] Honda T., Miyazaki M., Nakamura H., Maeda H., *Adv. Synth. Catal.* 2006, **348**, 2163–2171.
- [29] Song Y. S., Shin H. Y., Lee J. Y., Park C., Kim S. W., *Food Chem.* 2012, **133**, 611–617.

- [30] Anuar S. T., Zhao Y.-Y., Mugo S. M., Curtis J. M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2013, **92**, 62–70.
- [31] Ogończyk D., Jankowski P., Garstecki P., *Lab Chip* 2012, **12**, 2743–2749.
- [32] Datta S, Ghosal S., *Lab Chip* 2009, **9**, 2537–2550.
- [33] Tabeling P., *Lab Chip* 2009, **9**, 2428–2436.
- [34] Laurette S., Treizebre A., Elagli A., Hatirnaz B., Froidevaux R., Affouard F., Duponchel L., Bocquet B., *RSC Adv.* 2012, **2**, 10064–10071.
- [35] Laurette S., Treizebre A., Bocquet B., *J. Micromech. Microeng.* 2011, **21**, 065029.
- [36] Wilke C. R., Chang P., *AIChE J.* 1955, **1**, 264–270.
- [37] Jambovane S., Duin E. C., Kim S.-K., Hong J., *Anal. Chem.* 2009, **81**, 3239–3245.
- [38] Muddana H. S., Sengupta S., Mallouk T. E., Sen A., Butler P. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 2110–2111.
- [39] Gaur R., Pant H., Jain R., Khare S. K., *Food Chem.* 2006, **97**, 426–430.
- [40] Kanno K.-I., Maeda H., Izumo S., Ikuno M., Takeshita K., Tashiroa A., Fujiiac M., *Lab Chip* 2002, **2**, 15–18.
- [41] Yamashita K., Miyazaki M., Yamaguchi Y., Nakamura H., Maeda H., *Chemphyschem* 2007, **8**, 1307–1310.
- [42] Eggers D. K., Valentine J. S., *Protein Sci.* 2001, **10**, 250–261.

Influence des micromélangeurs passifs

Il n'est pas inintéressant de mentionner que la microfabrication de microsystèmes distincts présentant une fonction de mélange passif a été entreprise. L'efficacité de deux mélangeurs de type spiral a été testée (Figure 3-1). Des résultats identiques qu'en absence de ces structures indiquent clairement qu'aucun effet de mélange ne semble être dû à ces motifs. La raison principale suggérée est l'inefficacité de cette fonction aux échelles de temps de réaction fixés (même s'il semble qu'il y ait absence de contraintes diffusionnelles majeures limitant la cinétique à cette échelle de temps de réaction).

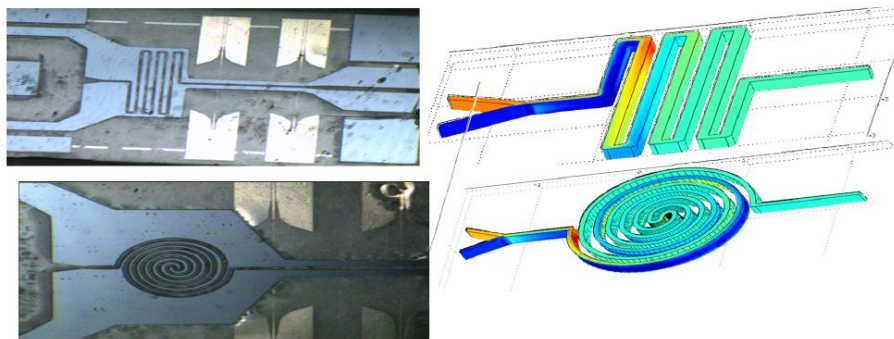


Figure 3-1. Microsystèmes distincts présentant une fonction de mélangeurs passifs.

Synthèse

Cette étude tente de mettre en exergue quelques propriétés et caractéristiques microfluidiques majeures qui semblent influencer la cinétique réactionnelle de la réaction investie. Plusieurs facteurs peuvent être soulignés. La spécificité de la configuration spatiale des fluides conjuguée à celle du régime fluidique en sont à l'origine. Cependant, il est important de noter que les différences exposées entre la cinétique en microréacteur et la cinétique en *batch* relèvent des vitesses initiales calculées pour chaque condition. La considération des facteurs physico-chimiques à l'origine de la modulation cinétique en microréacteur serait prioritairement valable pour des temps de réaction courts (temps de séjour courts à débits élevés), ceux permettant de déterminer la constante de Michalis-Menten K_m et la vitesse maximale de réaction V_{max} . Ces facteurs pourraient être ceux décrits ci-après.

Le *gradient de concentration initial*, dû à la présence de l'interface entre les fluides contenant enzyme et substrat injectés à co-courant, constitue une première des différences majeures avec

l'état (initial) d'une réaction en volume macroscopique. Le mélange des réactifs, enzyme et substrat, s'effectue donc principalement par *interdiffusion*. En volume macroscopique, celui-ci s'effectue par agitation mécanique, thermique mais aussi par diffusion en suivant le principe du mouvement Brownien, notamment décrit par Einstein. Les performances du réacteur microfluidique peuvent être décrites par le second nombre de Damköhler Da_{II} défini dans la section 2.3.4.2.3. et pour rappel par

$$Da_{II} = \frac{y^2}{D} \cdot \frac{(V_{\max} [E])}{K_m + [S]}$$

avec y la distance de diffusion, D le coefficient de diffusion, $V_{\max}$ la vitesse maximale de la réaction enzymatique, K_m la constante de Michaelis-Menten et $[E]$ et $[S]$ les concentrations respectives en enzyme et substrat. Le mélange par *interdiffusion* peut être limitant (vis-à-vis de la réaction) dans le cas où le nombre de Damköhler est élevé, c'est-à-dire si ce temps de mélange est plus élevé que le temps de réaction. C'est souvent le cas lorsque les réactifs sont caractérisés par un coefficient de diffusion faible, en raison de leur haute masse moléculaire. Dans cette étude, la haute diffusivité du substrat pallie la faible diffusivité de l'enzyme. Le fort gradient de concentration initial pourrait (en synergie avec les autres facteurs proposés) conférer à la réaction une vitesse initiale plus élevée qu'en *batch* pour les concentrations en substrat modérées, c'est-à-dire ne dépassant pas fortement la valeur de la constante de Michaelis-Menten. En effet, pour les fortes concentrations en substrat, la faible diffusivité de l'enzyme ne permet pas d'atteindre un état de saturation de tous les sites actifs pour des temps de séjours courts (au cours desquels le substrat n'a pas totalement diffusé dans tout le microcanal). Afin d'apprécier ce paramètre, la diffusion des espèces au sein du microréacteur peut être simulé numériquement par des outils de type COMSOL[®]. L'approximation des temps de diffusion des espèces peut aussi être appréciée par la relation $\tau \sim l^2/D$ avec τ le temps de diffusion caractéristique de l'espèce, D son coefficient de diffusion et l la dimension caractéristique relative au trajet diffusionnel de cette espèce. En considérant l'entièreté de la section du réacteur (diamètre ou largeur), le temps de diffusion caractéristique du substrat de la β -galactosidase est supérieur au temps de séjour imposé pour la mesure des paramètres cinétiques de l'enzyme. Ceci est probablement synonyme d'une relation de type $Da_{II} > 1$. Ainsi, il apparaît clair que ce premier facteur constitue une différence majeure par rapport à la réaction menée en volume macroscopique mais ne peut justifier, seul, la modulation cinétique.

A l'origine du gradient de concentration initial tout juste décrit et en raison de sa faible diffusivité, le *confinement de l'enzyme* dans son « compartiment » constitue un autre facteur qui diffère de la réaction en volume macroscopique. Cette localisation impacte le rapport de concentration (ou le rapport molaire) initial entre l'enzyme et son substrat. Le confinement de l'enzyme est tel que, le substrat diffusant, la réaction a tendance à se dérouler dans des conditions où la concentration en enzyme est supérieure à celle en *batch* (car l'enzyme y est dilué par le « volume de substrat », ce qui n'est pas le cas dans le microréacteur), voire en excès d'enzyme. En considérant que la vitesse d'une réaction enzymatique est proportionnellement influencée par la concentration d'enzyme, ce facteur est susceptible d'augmenter la vitesse initiale en microréacteur. Toutefois, ce facteur reste pertinent pour des temps de réaction relativement courts (ne permettant pas la diffusion efficace de l'enzyme), ceux, encore une fois, utiles à la détermination des paramètres cinétiques (vitesses initiales).

Enfin, un autre facteur spécifique au régime microfluidique semble influencer les paramètres cinétiques (et non la cinétique directement). L'écoulement de Poiseuille au sein du microcanal impose un *profil d'écoulement laminaire parabolique associé à un phénomène de dispersion*. Comme nous l'avons vu dans la partie 2.3.4.2.3., celui-ci gouverne directement la distribution du temps de séjour au sein du réacteur microfluidique. Le centre de la section du canal voyage à une vitesse plus élevée que vers les bords. Ainsi, en rappelant que la réaction démarre à l'interface enzyme-substrat, il semble que les vitesses initiales (calculées pour des débits élevés) soient imprégnées de ce phénomène. Celui-ci rend compte d'un « volume réactionnel efficace » qui ne s'étend pas à toute la section du canal et qui semble à l'origine d'un effet de concentration du produit généré dans la fraction collectée en sortie du microréacteur. La cinétique de la réaction ne semble donc plus se résumer uniquement à l'expression directe du degré de mélange au sein du microréacteur. A la suite de cette considération, la prise en compte des paramètres cinétiques déterminés comme paramètres *apparents* apparaît plus prudente dans l'analyse qui est faite des performances du réacteur microfluidique.

Les résultats semblent indiquer que, pour les temps de détermination des vitesses initiales fixés, la fraction d'enzyme qui participe à la réaction ne recouvre pas la fraction totale circulant dans le microréacteur. La vitesse maximale de la réaction est proportionnelle à la concentration d'enzyme active le long du front de diffusion du substrat. Compte-tenu de la dualité espace-

temps, il apparaît primordial d'avoir une vision analytique *in situ* pour vérifier les hypothèses émises.

Des études spécifiques rapportées dans la littérature ont permis d'avancer, en première approche, les paramètres cruciaux à gérer afin de pouvoir orienter un microréacteur comme un outil de production. La formule de Damköhler illustre logiquement que l'optimisation des concentrations en enzyme et en substrat constitue un critère important, tout comme le dimensionnement du réacteur. Ces facteurs influencent directement la cinétique enzymatique. Par ailleurs, d'autres expérimentations apportent des informations intéressantes lorsqu'elles exposent une dépendance du K_m et de l'énergie d'activation au débit imposé dans le réacteur [3]. En complément de ces éléments, les résultats exposés tentent de montrer la spécificité de certains facteurs. Peu relatés dans la littérature traitant des microréacteurs, d'éventuels autres facteurs relatifs aux forces physiques microscopiques pourraient également contribuer. Certaines études faisant mention à l'anisotropie des interactions solvant-solutés en régime laminaire [3,7] ainsi qu'à la stabilité structurale des protéines en milieu confiné ont été reportées [8]. Ces propriétés sont susceptibles d'influencer la réactivité chimique mais la description de ces phénomènes reste à ce jour partielle et lacunaire. De la même façon, les hypothèses posées dans notre travail demandent à être approfondies. La simple description des facteurs influents proposés en amont ne permet pas d'évaluer rigoureusement leur contribution distincte dans la modulation de la cinétique enzymatique. En ce sens, leur impact ne peut être décrit que de manière globale en considérant leurs effets comme synergiques. Toutefois, il ne paraît pas impossible d'envisager les microréacteurs comme candidats sérieux, dans certains cas, à être des outils de production. La multiplicité des expérimentations devrait permettre de mieux appréhender les effets spécifiques de chaque facteur ainsi que leurs effets synergiques. Des bénéfices pourraient ainsi être tirés au travers de certaines orientations, notamment sur des réactions complexes à maîtriser.

3.1.2. Protéolyse pepsine porcine / hémoglobine bovine : évolution réactionnelle

Introduction

Eclairée par les informations précédemment obtenues, la mise en œuvre de la protéolyse pepsine porcine / hémoglobine bovine en microréacteur a été entreprise. L'objectif fixé était de

déterminer l'influence de la diffusion sur la cinétique et la sélectivité de la réaction protéolytique. La pepsine porcine (enzyme, 35kDa) et l'hémoglobine bovine (64kDa, substrat) constituent des macromolécules dont la diffusivité reste relativement proche et basse ($D \sim 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$). A l'interface des fluides contenant enzyme et substrat injectés au sein du microréacteur, la diffusion des espèces au niveau de la zone d'interdiffusion se révèle plutôt équivalente mais faible (simulations COMSOL® à l'appui dans l'article suivant), si bien que travailler à des débits trop élevés n'est pas une bonne orientation. De façon générale, l'action de l'enzyme n'est pas réduite au substrat initial, les chaînes α et β de l'hémoglobine, mais s'étend à de nombreux peptides générés à l'issue de cette réaction initiale selon le mécanisme défini par Linderstrøm-Lang [9]. Ces peptides dérivés des chaînes initiales α et β de l'hémoglobine sont de nature différente et possèdent donc des diffusivités différentes (en relation avec leur taille). Au fur et à mesure que la réaction avance, la population peptidique devient hétérogène, tout comme la diffusivité des peptides générés. Il sera montré que ce paramètre joue un rôle prépondérant dans la performance du réacteur microfluidique. En effet, au regard des facteurs suggérés influencer les performances d'un procédé (bio)catalytique (section précédente 3.1.1.), le comportement spécifique d'une espèce à haute ou faible diffusivité semble demeurer un critère majeur. Afin de bien appréhender ces aspects dans le cadre de la protéolyse, les mécanismes d'hydrolyse de protéines telles que définies par Linderstrøm-Lang sont introduits au début de l'article présenté dans la section suivante. Ils font intervenir les notions des mécanismes *zipper* et *one-by-one*.

Etude expérimentale et modélisation statistique stochastique

La mise en œuvre, l'analyse et la modélisation de la protéolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine est présentée ci-après sous la forme d'un article scientifique publié dans une revue à comité de lecture international. Son titre est « *Modulation par diffusion de la sélectivité cinétique de la protéolyse enzymatique en réacteur microfluidique : analyse expérimentale et modélisation stochastique* » :

Diffusion based kinetic selectivity modulation of enzymatic proteolysis in a microfluidic reactor: experimental analysis and stochastic modeling

Adil Elagli, Simon Laurette, Anthony Treizebre, Bertrand Bocquet, Renato Froidevaux

RSC Adv., **4**, 2014, 3873–3882

Diffusion based kinetic selectivity modulation of enzymatic proteolysis in a microfluidic reactor: experimental analysis and stochastic modeling

Cite this: *RSC Adv.*, 2014, 4, 3873

Adil Elagli,^{ab} Simon Laurette,^b Anthony Treizebre,^b Bertrand Bocquet^b and Renato Froidevaux^{*a}

Microreactors enable new experimental ways for enzyme engineering. In this context, we show that the liquid–liquid parallel laminar flows in microchannels cause a kinetic selectivity modification of proteolytic enzymatic reaction involving hemoglobin and pepsin, reaction that generates numerous bioactive peptides at different advancement state. Here we show that this diffusion based kinetic modulation induces an altered peptides appearance kinetics for a part of the initial substrate population. Indeed, microfluidic and conventional batch experiments performed in the same reaction conditions lead to strong differences in the resulting peptidic profiles obtained by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Such differences are explained by the laminar flow diffusive conditions inside microchannels and are supported by a stochastic algorithm based on the Michaelis–Menten equation. Several bioactive peptides are identified by mass spectrometry and show the potential of such methodology in peptides screening from a complex proteolysis but also for selective peptides preparation by microfluidics.

Received 21st October 2013
Accepted 24th October 2013

DOI: 10.1039/c3ra46005c

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Microtechnology development has led to the design of new tools for biology and chemistry. With microfluidic systems, configurations for fluid handling are changed and offer new experimental ways to study biomaterial interactions.¹ Reaction chamber size reductions affect fluid transport properties because of diffusion-effect enhancing.² Thermal evacuation is also increased and enables a better temperature control, compared to batch reactions.³ Multifunctional microdevices such as pumping devices,⁴ thermal devices,⁵ microfilters,⁶ micromixers,⁷ or physical probes can be co-integrated with microchannels and can serve as efficient tools, particularly for modern catalytic research or to study interactions in real-time conditions.^{8,9} Microstructured devices can also deal with biology complexity by parallelization or statistical studies.¹⁰ More generally microfluidic configuration reduces reagents consumption due to small microchannel volumes.

Microchannel reaction systems, prepared by micro-fabrication techniques or by microcapillaries assembly or

modification, facilitate the conduction of chemical processes in nanoliter and sub-nanoliter volumes. Following the fast evolution of micro- and nanotechnologies, the possibility to design advanced tools is highly attractive for various applications including high-throughput screening,¹¹ studies on single cell,^{11,12} but also for the rapid search of specific chemical data such as enzyme kinetic constants.^{13–16} Today, bio-processing takes advantage of microfluidics and technological innovations in order to design specific devices. They benefit to enzyme engineering in particular through the use of specific micro-reactors.^{14–18} Microreaction technology constitutes an interdisciplinary area of sciences and engineering and has led to the development of various microreactors. Enzymes are organic catalysts used for the production of useful substances in an environmentally friendly way and have high potential in analytical science and industry.¹⁹ Innovation in process engineering and microreaction devices can serve as efficient tools for the development of enzyme processes. As reaction conditions associated with specific enzymatic reactions are a crucial factor for enzyme activity, many studies focus on conditions which can affect an enzyme reaction. Continuous-flow microfluidic reaction approach provides a good tool to evaluate the impact of reactor miniaturization on enzyme kinetic behavior.

Micro and nanoliters of reactants are a real advantage in performing rapid reactions or analyses by the fact that mass and heat transfer are highly efficient compared to batch systems.^{20–22} Performing reactions in microreactors can be a real advantage due to the large surface to volume ratio. A good example is the

^aLaboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) – EA 1026, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Université Lille 1 – Cité Scientifique, Polytech'Lille, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. E-mail: renato.froidevaux@univ-lille1.fr; Fax: +33 328 76 73 56; Tel: +33 328 76 73 90

^bInstitut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) – UMR CNRS 8520, Université Lille 1 – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

case of liquid–liquid heterogeneous reactions like phase transfer catalysis.²³ Nevertheless, the major challenge remain to realize efficient mixing under laminar flow between two miscible fluids to rapidly create a homogeneous mixture at the beginning of a reaction, *i.e.* at a position in space where the reagents start to be in contact through an interface. In the case of fast reactions in which reagents are initially present in separate streams, reaction rarely occurs uniformly in the whole volume.²¹ Consequently, the rate of continuous laminar flow reaction is no longer defined by inherent kinetics but is limited or favored by diffusional rates, depending on the reaction microchannel wide and on reactants molecular weights.^{22,24} However, diverse microfluidic systems promoting rapid mixing of fluids have been proposed,^{16,25} classified either as active or passive micromixers.^{21,26} In this study, rapid mixing of enzyme and substrate is not the goal, as it will result in homogeneous reactions similar to those taking place in well-mixed conditions in batch. Indeed, as the studied reaction is an enzymatic proteolysis, the main goal remains to take advantage of the strong diffusive conditions in order to conduct a diffusion-dependant reaction that could be modulated in term of kinetic selectivity, *i.e.* in term of peptides appearance kinetics. In fact, because of the huge variety of peptides generated during proteolysis, the control of specific bioactive peptides appearance is desirable. Due to the large number of sequential and parallel reactions occurring during protein hydrolysis by protease, the enzymatic proteolysis constitutes a typical reaction that might be affected by microfluidics and the resulting dominant diffusion effect.

Enzymatic hydrolysis of natural proteins (animal or plant origins) interests food and pharmaceutical industries, especially for functional property improvement of proteins such as taste, solubility, emulsification, gelation,^{27–29} or to obtain biologically active peptides.^{28–31} These bioactive peptides are inactive within the sequence of parent protein and can be released during controlled enzymatic hydrolysis of the proteins.³² Hemoglobin constitutes a good example of protein which can be considered as an attractive source of peptides with several biological properties such as antioxidant,³³ antihypertensive,³⁴ antimicrobial³⁵ and opioid.³⁶ Under controlled conditions, the hydrolysis of bovine hemoglobin by porcine pepsin enables to isolate a vast variety of peptides which are produced at different advancement states of the reaction. Selectivity modulation of this reaction has already been studied by using organic solvents such as alcohols,³⁷ urea or acidic conditions.³⁸ In these conditions, studies have shown that, in the course of hemoglobin hydrolysis, modification of the peptidic populations was due to the modification of the hemoglobin native conformation.³⁹ In fact, hemoglobin hydrolysis involves two main mechanisms depending on its structure: in denatured state, the hydrolysis proceeds by a “zipper” mechanism that leads to the formation and successive cleavage of intermediate peptides whereas in native state, hemoglobin is hydrolyzed in small size peptides according to a “one-by-one” mechanism.^{39,40}

Considering that the hydrolysis of hemoglobin by pepsin is highly modulated by the spatial structure, we hypothesized that a kinetic behavior resulting from exclusive diffusion can

influence the hydrolysis by the same way. Thus, our goal was to modulate the kinetics of the reaction in order to obtain a new kinetic behavior leading to an altered peptides appearance kinetics. Herein, we present thus a new approach of enzymatic proteolysis kinetic selectivity modulating by laminar flow regime specific to microfluidic systems. In the same reaction time and acidic pH conditions, strong kinetic selectivity differences between batch and microfluidic modes appear during denatured hemoglobin hydrolysis by pepsin.

2. Materials and methods

2.1. Reactor microfabrication

The microreactor used in this study was fabricated by a glass/silicon/glass technological process. First, a 350 μm -thick silicon wafer was bonded to a 700 μm borosilicate glass substrate. Then, microchannels were etched in silicon wafer by a Deep Reactive Ion Etching (DRIE) process. Finally, the microchannels were covered by another glass substrate to get a buried Y-shaped microfluidic circuit. The specificity of this technological process is due to its parallel biosensor function. Indeed, combined with an integrated electromagnetic sensor, the obtained microfluidic platform allowed us to perform measurements at sub-THz frequencies.⁴¹ Details on the technological process have already been reported.^{41,42}

2.2. Experimental procedure

The enzymatic reaction was the hydrolysis of bovine hemoglobin (64.5 kDa, Sigma Chemicals Co.) by porcine pepsin (E.C. 3.4.23.1, 3.440 U mg^{-1} , 35 kDa, Sigma Chemicals Co.), protease belonging to the family of aspartic acid proteases and which preferentially catalyzes the cleavage of peptide bonds at the carboxyl side of aromatic and hydrophobic amino acids. This proteolytic reaction leads to the appearance of product molecules called peptides. Hemoglobin was prepared under denaturing conditions at pH3.0 by adding 2 M HCl for a 20 mg mL^{-1} final concentration. All aqueous solutions were prepared in 18.2 M Ω Milli-Q water (Millipore). The introduction of the reagents in the microreactor was achieved by a syringe pump (New Era

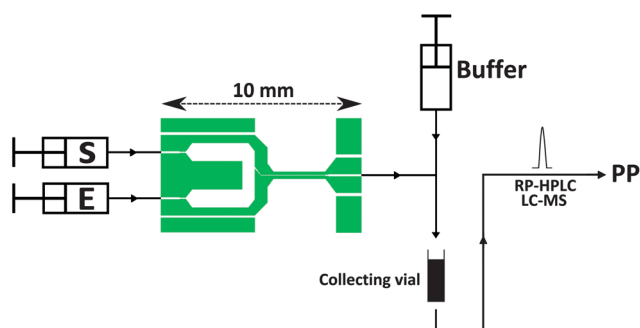


Fig. 1 Experimental protocol for microfluidic mode reaction and analysis. Pepsin (E) and hemoglobin (S) are injected by a syringe pump in the microreactor. The product of the stopped reaction is collected before its chromatographic and mass analysis. PP stands for peptidic profile.

Pump Systems Inc., Farmingdale, NY, USA) (Fig. 1) and the flow rate was fixed for both enzyme and substrate solution at $1 \mu\text{L min}^{-1}$ and next $0.5 \mu\text{L min}^{-1}$ for two distinct hydrolysis experiments, each repeated at least 6 times. The outlet fused-silica capillary ($75 \mu\text{m I.D.} \times 150 \mu\text{m O.D.}$) was in contact with a disodium tetraborate buffer solution (0.32 M , $\text{pH } 9.0$) that caused enzyme denaturation and thus reaction stopping. Recovery of the solution from the outlet of the flow channel was started after an initial $30 \mu\text{L}$ pre-sending delay to reach steady-state flow in microreactor.

2.3. Reversed-phase-HPLC analysis

The produced peptides were analyzed by liquid chromatographic system that consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. Detection of produced peptides was carried out at 215 nm by reverse phase HPLC (RP-HPLC) on a C4-column (Vydak $0.46 \times 25 \text{ cm}$, 3 mm I.D.) for 0.5 mL min^{-1} flow-rate. The mobile phase was water-trifluoroacetic acid ($100 : 0.1$, v/v) as eluent A and acetonitrile-water-trifluoroacetic acid ($60 : 40 : 0.1$, by vol) as eluent B. The applied gradient was 0 – 67% (v/v) B over 30 min , then 67 – 87% (v/v) B over 35 min , and finally 100% B over 25 min . On-line UV absorbance scans were performed between 200 and 400 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm . All common chemicals and reagents were of analytical grade and purchase from Sigma Chemicals Co. and Flandres Chimie.

2.4. LC-MS analysis by one-line UPLC-ESI-MS

The analysis were performed on a Accela UPLC system acquired from Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) that consisted of an autosampler equipped with a column oven and a tray compartment cooler and a quaternary pump with a built-in solvent degasser, all piloted by Xcalibur software. The chromatographic separation was performed on a C4-column (Vydak $0.46 \times 25 \text{ cm}$, 3 mm I.D.). $10 \mu\text{L}$ of samples were injected in a no waste injection mode. The separations were performed using the same solvent gradient as previously described for the simple RP-HPLC analysis. The column oven and tray cooler temperatures were set to 25°C and 4°C respectively. The Accela UPLC system was hyphenated with an Orbitrap Exactive mass spectrometry system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). A flow divider called “splitter” used as the output rate of UPLC is higher than that tolerated by the mass spectrometer. The flow was split to give approximately $100 \mu\text{L min}^{-1}$ directed into the mass spectrometer *via* the electrospray interface. The system was equipped with an ESI interface that was used in positive ionization mode with the following conditions: capillary temperature and voltage at 275°C and 9 V respectively, ion spray voltage at 3.3 kV and tube lens voltage at 95 V . Nitrogen (N_2) was used as sheath gas and helium (He) as auxiliary gas with flow-rates of 20 and 5 arbitrary units. For the MS experiments, full MS scan was applied, for

which the spectra were recorded in the range of m/z 150 – 3000 with a resolution of $30\,000$. An external calibration of the equipment for mass accuracy was carried out the day before the analysis according to the manufacturer guidelines.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of the peptidic profiles

Analysis and comparison of peptidic profiles from hemoglobin hydrolysis by pepsin in batch and microfluidic modes were performed (Fig. 2). Since the retention times result from the reversed-polarity, the x-axis of the chromatograms is relatively comparable to the size of the eluted molecules. In batch mode (Fig. 2B and C), the α - and β -chains of hemoglobin are rapidly hydrolyzed in peptides, eluted between 30 and 43 minutes. As it was previously shown,³⁶ these peptides are called “transient peptides” since they become substrate of the pepsin to give smaller peptides. Linderström-Lang has developed a model to explain these phenomena frequently observed during the hydrolysis of globular proteins, *i.e.* that the pepsin hydrolyzes denatured hemoglobin by a mechanism called “zipper”, a mechanism that involves a rapid conversion of the whole protein in intermediate peptides followed by a progressive cleavage of these intermediates in reduced-size peptides. Moreover, pepsin prefers long substrates when accessible, since it recognizes eight substrate residues,⁴³ which could explain the large increase in intensity of the peaks from 38 to 43 minutes retention time for 15 and 30 seconds reaction in batch mode (frames 1 and 2, Fig. 2B and C). In microfluidic mode (Fig. 2D and E), with the same reaction conditions as in batch mode (pH , concentrations, reaction times), more intact hemoglobin remains in the microreactor and the peptidic profiles strongly differ. For 15 seconds reaction, only peptides between 28 and 38 minutes of retention time are eluted (frame 3, Fig. 2D). After 30 seconds reaction, small final peptides with low retention times from approximately 17 to 28 minutes (frame 4, Fig. 2E) and at 8 minutes (frame 5, Fig. 2E) combined with the absence of a large part of intermediate peptides (from 38 to 43 min of retention time) are indicative that the enzymatic reaction proceeds differently than in batch mode, probably due to the microfluidic flow regime and the diffusional properties of the enzyme, substrate and produced peptides during the reaction. The identification of the peptides present in the hydrolysates can serve in order to understand and propose a model of hydrolysis within the microreactor.

3.2. Identification of bioactive peptides

LC/MS analysis of the peptidic hydrolysates allowed the detection of several biological active peptides previously reported in the literature.^{30,44} Different peptides are produced in the course of hemoglobin hydrolysis by pepsin in the microreactor: hydrophobic peptides are detected for short residence time of enzyme and substrate in the microreactor (15 s which is equivalent to a flow-rate of $1 \mu\text{L min}^{-1}$) whereas small hydrophilic peptides are detected for longer residence time (30 s which is equivalent to a flow-rate of $0.5 \mu\text{L min}^{-1}$).

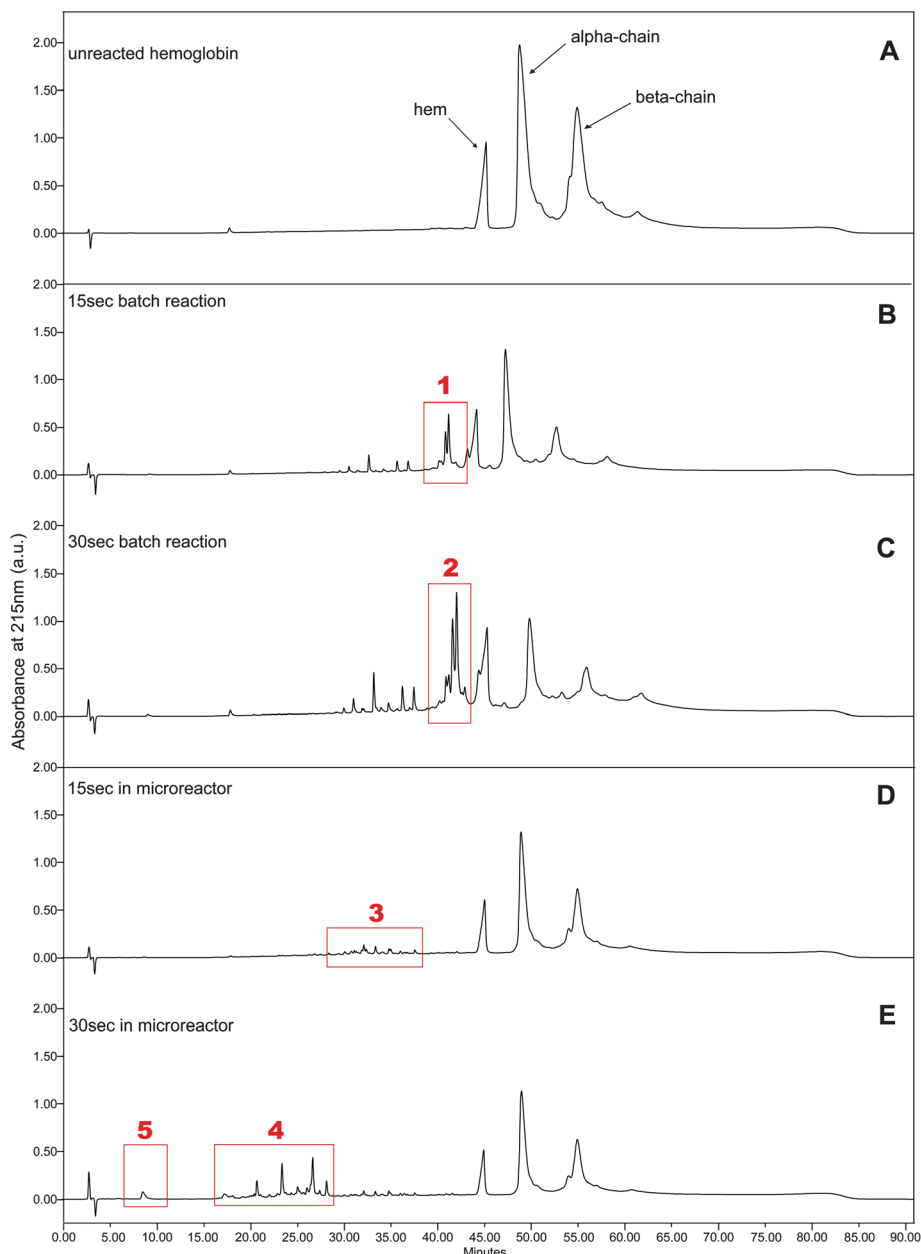


Fig. 2 RP-HPLC chromatograms of unreacted hemoglobin (A) and peptidic hydrolysates from batch (B and C) and microfluidic (D and E) modes. 40 μL samples were fractionated on a C4 column for 15 s reaction (B and D) and 30 s reaction (C and E).

Thank to MS base-peak chromatogram of hemoglobin digestion in microreactor, biological active peptides have been identified in the peptidic profiles (Fig. 2D and E) and are presented in Table 1. The biological active peptides identified for 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ are present in the frame 3 (Fig. 2D) which includes the peptides eluted between 30 and 43 minutes of retention times. An MS base-peak chromatogram of a hemoglobin digestion shows the spectrum of the peptide LVVYPWTQRF originating from the hemoglobin β -chain with a m/z 654.86 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ (1307.71 Da) and called LVV-hemorphin-7 (Fig. 3A).⁴⁴ The peptide VVYPWTQRF called VV-hemorphin-7 was also detected with a m/z 598.31 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ (1194.63 Da) (Fig. 3B).⁴⁴ We identified the antimicrobial peptides α 1–32 at m/z 652.34 $[\text{M} + 5\text{H}]^{5+}$

(Fig. 3C), α 99–106 at m/z 455.79 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$, α 84–98 at m/z 582 $[\text{M} + 3\text{H}]^{3+}$ and β 126–145 at m/z 549.79 $[\text{M} + 4\text{H}]^{4+}$ (Table 1).⁴⁵ In the frame 4 (Fig. 2E), corresponding to the 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow-rate, the peptide β 140–145 was identified with a m/z 399.25 $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$ and is detected in appreciable quantity. This peptide is not detected in batch for the same reaction time (Fig. 2C). Moreover, peptidic products originating from the hydrolysis of the α 1–32 sequence by pepsin have been identified among the peptides present in the frame 4 (Fig. 2E). Identification of the α 1–23 sequence (Fig. 3D) clearly shows that the peptide α 1–32 present at 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ (Fig. 2D, frame 3) was hydrolyzed in α 1–23 (Fig. 2E, frame 4) which is an antimicrobial sequence.³⁵ Finally, it was detected in frame 5 (Fig. 2E) at m/z 654.14 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$

Table 1 Bioactive peptides generated after digestion in batch or microreactor identified by LC-MS analysis

Peptide present in frame	Sequence	Biological activity	Position	Peptide mass [M + H] ⁺ (Da)	Hydrolysis in batch	Hydrolysis in microreactor
3	LVVYPWTQRF (LVV-hemorphin-7)	Opioid	β 31–40	1308.71	Yes	Yes
3	VVYPWTQRF (VV-hemorphin-7)	Opioid	β 32–40	1195.63	Yes	Yes
3	VLSAADKGNVKAAGWK VGGHAAEYGAEALERM	Antimicrobial	α 1–32	3257.70	Yes	Yes
4	VLSAADKGNVKAAGWK KVGGHAAE	Antimicrobial	α 1–23	2237.20	No	Yes
3	KLLSHSL	Antimicrobial	α 99–106	910.56	Yes	Yes
4	LAHRYH	Antimicrobial	β 140–145	797.50	No	Yes
4	SDLHAHKLRLVDPVNF	Antimicrobial	α 84–98	1744.00	No	Yes
3	QADFQKVAVAGVANALAHRYH	Antimicrobial	β 126–145	2196.16	Yes	Yes
5	TSKYR (neokyotorphin)	Antimicrobial	α 137–141	654.14	No	Yes

(653.14 Da) the peptide TSKYR called neokyotorphin which is originated from the α -chain of hemoglobin, while absent for the batch hydrolysates. Indeed, the minimal antimicrobial sequence KYR has been previously identified as a final product of the α -chain hydrolysis.⁴⁶ Its sequence α 137–141 constitutes thus a final peptide derived from the α -chain hydrolysis and is absent from the hydrolysis in microreactor at 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ and from the hydrolysis in the same conditions in batch mode. This bioactive peptide is typically obtained in appreciable quantity in batch after several hours of denatured hemoglobin pepsic hydrolysis.⁴⁷

3.3. Influence of the flow-rate on the evolution of the proteolysis in the microreactor

The two distinct chromatograms (Fig. 2D and E) allow discerning the evolution of the reaction and the peptide appearance kinetics in microfluidics because the peaks areas containing peptide fractions change with the flow-rates. The first peptides generated at 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ are expected to come directly from the α - and β -chains of hemoglobin. According to the “zipper” mechanism occurring in acidic conditions described by Linderstrøm-Lang, a large part of these generated peptides are consumed for 0.5 $\mu\text{L min}^{-1}$ flow-rate. Thus, the global evolution of the proteolysis in the microreactor seems to proceed firstly by the rapid digestion of the initial substrate molecules located close to the interface in intermediate peptides (Fig. 2D, frame 3), whose molecular weights vary between 1.5 and 3.5 kDa approximately (Fig. 4). Then, the proteolysis continues with the hydrolysis of these intermediate peptides just produced and accessible in small final peptides (Fig. 2E, frames 4 and 5). No intermediate peptide of more than 3.5 kDa is observed for these reaction times, suggesting a rapid reaction at the interface. In consequence, the appearance kinetics of these small final peptides in the microreactor appears faster than in batch.

Through their appearance/disappearance, couples of bioactive peptides can serve as markers to monitor the hydrolysis of the first generated peptides in small final peptides: α 1–32/ α 1–23 and LVVh-7/VVh-7. In the 15 first seconds, the population of the first intermediate peptides increases, which results in increasing the peaks areas corresponding to the peptides eluted

between 28 and 38 minutes of retention time. Using the peptide α 1–32 as marker, its kinetic evolution can be monitored through its fraction area evolution. Its concentration decreases with residence time and shows that this peptide is rapidly consumed in order to generate smaller peptides, in particular the peptide α 1–23. This behavior reflects the intermediate character of the peptide α 1–32 (frame 3, Fig. 2D) which is rapidly consumed by pepsin to generate smaller peptides such as the peptide α 1–23 (frame 4, Fig. 2E), whose concentration increases with residence time. The same behavior is observed for the generation of the peptide LVV-h7 and its hydrolysis in VV-h7. For batch experiments of denatured hemoglobin hydrolysis (at acidic pH or in the presence of urea), this kinetic behavior is apparent for longer kinetics.⁴⁸ Peptides present in frames 4 and 5 (Fig. 2E) are produced faster than they could be generated in batch mode. It suggests a rapid proteolysis at the interface of the solution of enzymes and substrates in the microfluidic device.

3.4. Evaluation of the substrate-enzyme mixing by simulation

In order to explain the difference observed between batch and microfluidic configurations, simulations of the substrate-enzyme mixing inside microchannels have been performed with COMSOL Multiphysics software. Substrate and enzyme concentrations are predicted by solving the advection–diffusion equation for the experiment conditions described before (Fig. 5). In this configuration, an interface appears because enzyme and substrate do not mix immediately. We suppose that this interface is the origin of the peptidic profile differences between batch and microfluidic modes.

3.5. Modelisation of the proteolysis in the microreactor

The classic Michaelis–Menten equation provides a highly satisfactory description of enzymatic kinetics for large ensembles of enzyme molecules.⁵⁰ According to the general scheme of enzyme-catalyzed reaction, a substrate S binds reversibly with an enzyme E to form a complex ES which then undergoes unimolecular decomposition to form a product P, and E is regenerated for the next cycle:

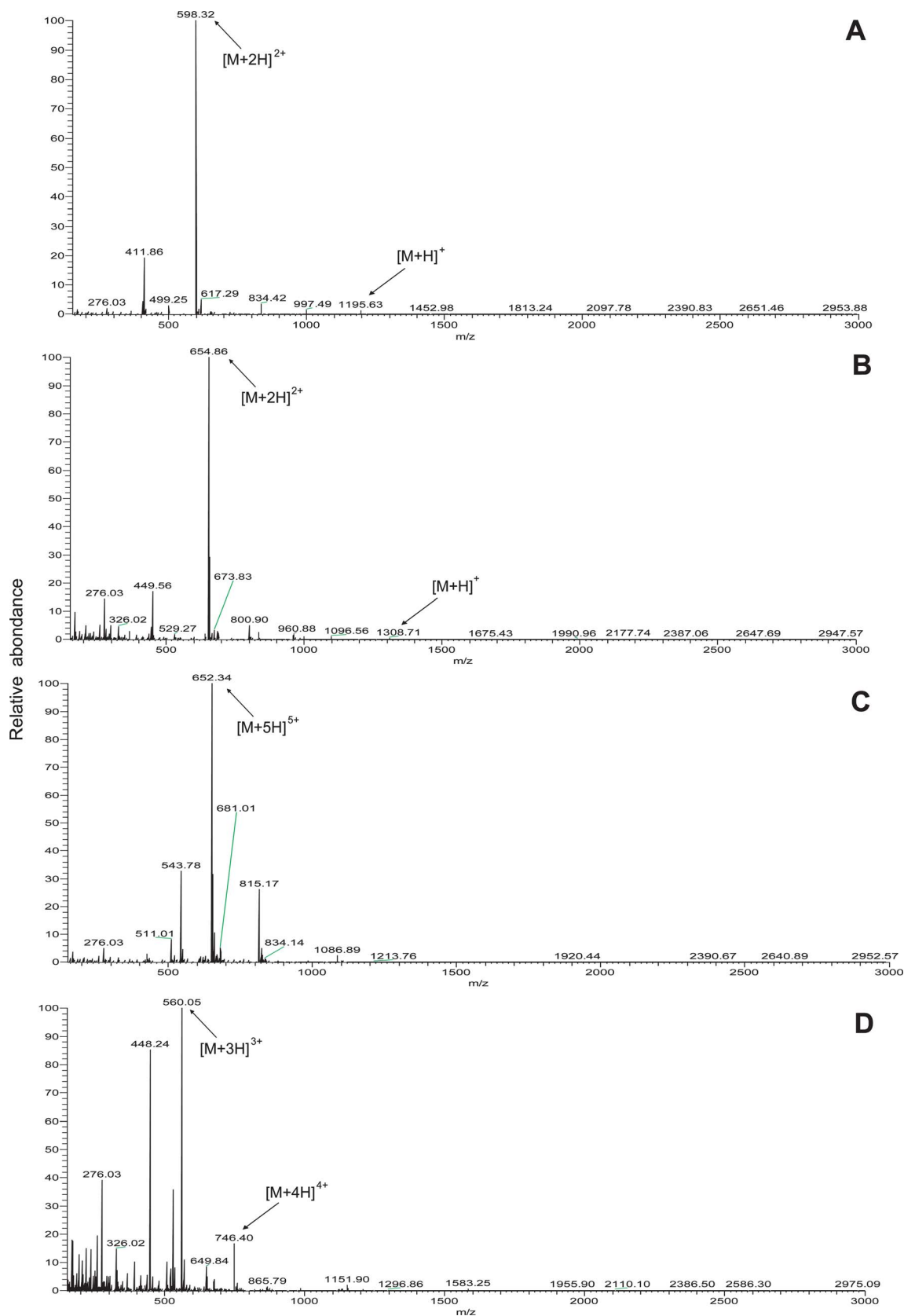


Fig. 3 ESI-MS spectra showing opioid peptides (A and B) and antimicrobial peptides (C and D). (A) LVV-hemorphin 7 (β 31–40) (B) VV-hemorphin 7 (β 32–40) (C) α 1–23 (D) α 1–32. MS measurements were performed in positive ion mode using electrospray ionization (ESI).

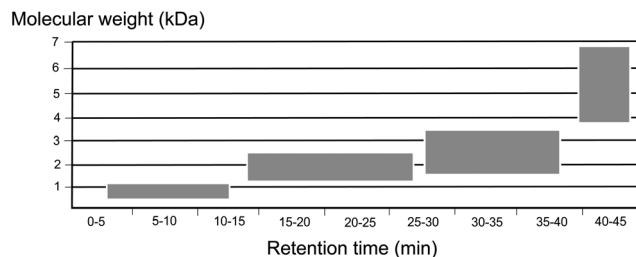


Fig. 4 Average distribution of molecular weight profiles of peptides in hydrolysates as function of their retention time in RP-HPLC.

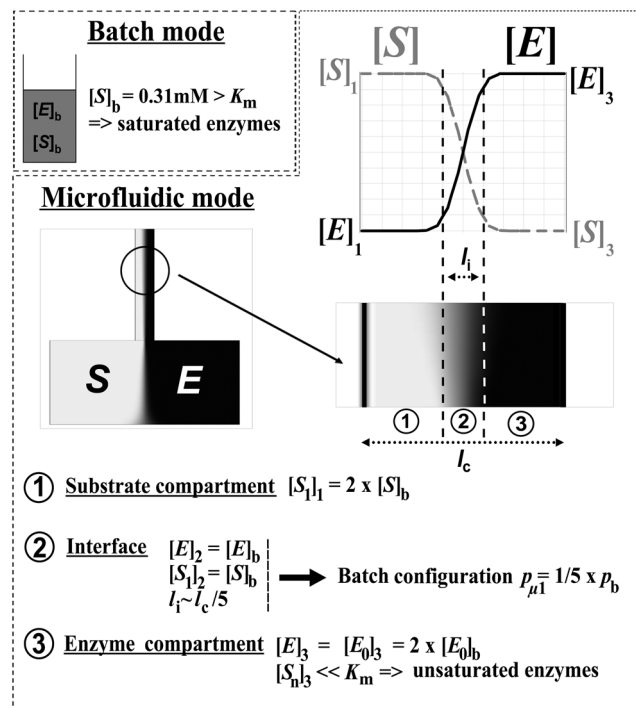
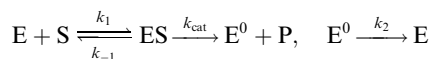
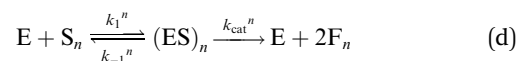
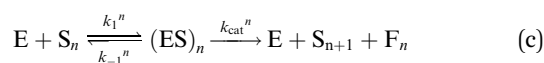
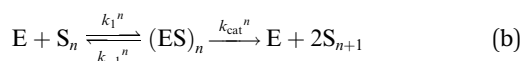
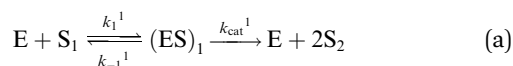


Fig. 5 Substrate and enzyme concentration profile in batch (A) and simulated by COMSOL in microfluidic mode (B). Simulations were performed with a diffusion coefficient $D = 1 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, approximated by the Wilke–Chang formula.⁴⁹ The interface extent is defined when the concentrations of enzyme and substrate are between 10 and 90% of their maximal value.



with k_1 , k_{-1} , k_{cat} and k_2 the complex formation constant, the complex dissociation constant, the catalytic constant and the enzyme regeneration constant respectively. However, considering here a proteolysis, the reaction scheme can be appreciated by:



with k_1^1 , k_{-1}^1 and k_{cat}^1 in (a) and k_1^n , k_{-1}^n and k_{cat}^n in (b), (c) and (d). S_1 represents the first substrate molecules, *i.e.* the initial α - and β -chains of hemoglobin, whereas S_n (with $n \neq 1$) is assumed to represent the substrate of pepsin in reaction (b), (c) and (d). S_{n+1} represents the next substrate molecule which becomes the new S_n that will be hydrolyzed by forming a new complex $(\text{ES})_n$, up to the formation of two final fragments without cleavage site F_n . Thus, the product of reaction (a), (b) or (c), *i.e.* amino acids sequence, is also the substrate of pepsin in reaction (b), (c) and (d). The reactions in (b) and (c) occur up to the whole consumption of the substrate in (d).

Enzymatic reactions kinetics can generally be expressed by the Michaelis–Menten equation as follow:⁵⁰

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} = V_0 = \frac{V_{\text{max}}[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad (1)$$

where V_0 , $[\text{S}]$, $[\text{E}]$, V_{max} and K_m represent the initial rate of product generation, the substrate concentration, the total enzyme concentration, the maximum rate, and the Michaelis–Menten constant ($K_m \equiv (k_{-1} + k_{\text{cat}})/k_1$), respectively. V_0 increases as $[\text{S}]$ increases asymptotically approaching the maximum rate of an enzyme-mediated reaction V_{max} . The substrate concentration at which V reaches half of V_{max} is defined as K_m . Because of the saturation of all the active sites of the enzyme, the initial velocity of the reaction V_0 in eqn (1) cannot be increased infinitely. Hence, the plot of V_0 against $[\text{S}]$ shows the shape of a rectangular hyperbola where, at low substrate concentration ($[\text{S}] \ll K_m$), V_0 varies linearly with the substrate concentration and eqn (1) is simplified to

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}}[\text{S}]}{K_m} = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}][\text{S}]}{K_m} \quad (2)$$

where k_{cat} and $[\text{E}]$ represent the turnover number and the total concentration of enzyme respectively. For high substrate concentrations ($[\text{S}] \gg K_m$), the rate of the reaction is independent of the substrate concentration and eqn (1) is simplified to

$$V_0 = V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{E}] \quad (3)$$

To model the substrate hydrolysis kinetics in microfluidic and batch modes, a stochastic algorithm based on Michaelis–Menten kinetics was used and is depicted in Fig. 6. Some biological phenomena such as enzyme reactions can be appreciated by stochastic approaches.^{51,52} Indeed, the very basic step of every molecular reaction can be described only in terms of its probability of occurrence. Moreover, the diffusion of molecules is a realization of a random walk process called “Brownian motion”. Thus, according to the intrinsic noise, *i.e.* the probabilistic nature of biochemical reactions, the dynamical description below is assumed to represent a discrete and stochastic description inspired by Gillespie algorithm, a

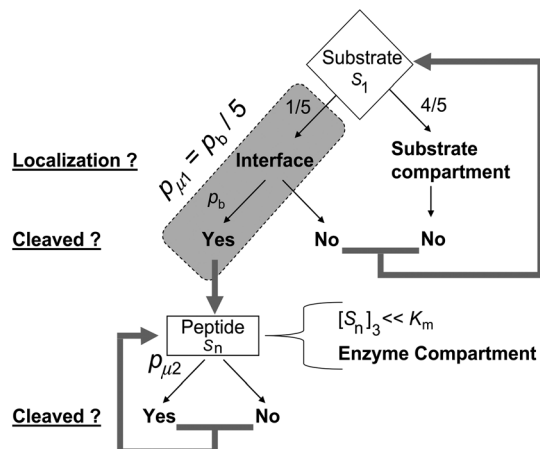


Fig. 6 Algorithm used to compute hemoglobin hydrolysis in microfluidic mode. $[S_n]_3$ represents the substrate concentration in the "enzyme compartment".

Monte-Carlo method. The equivalence between the discrete description and the master equation has been demonstrated by Gillespie,⁵³ who proposed an exact simulation stochastic algorithm to solve the chemical master equations (CMEs). The basic working principles of the Gillespie algorithm derive from the description of the collision of particles in a vessel. Here, the formation of peptides close to the junction where substrate and enzyme are first brought together depends on the diffusivity of both substrate and enzyme. A region where the species are mixed by (inter)diffusion is defined as 1/5 of the whole channel width (Fig. 5). In this interface region, all the diffusive terms in classic ordinary differential equations describing the proteolysis vanish (ODEs are the natural language for representing mass action kinetics and the kinetics of enzyme-catalyzed reactions is usually modeled by a set of coupled differential equations), so the governing equations reduce to those used in the classical Michaelis–Menten analysis.¹³ Moreover, the tricky transformation of ODEs in terms of probabilities implies the use of the constant k_1 which results in a novel approximation (k_1 is commonly approximated between 10^4 and $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{13,52,54} whereas the Michaelis–Menten formula requires just the known constants k_{cat} and K_m .^{55,56} Hence, the dynamical system was considered to follow an equilibrium derived by the usual approximation initially formulated by Briggs–Haldane that the concentration of species is quasi steady-state (QSSA).⁵⁷ Usually considered as valid if $[E] \ll [S] + K_m$, its availability was extended to $[E] \gg [S] + K_m$, renamed by total QSSA (tQSSA).^{58–60} Here, the tQSSA assure the validity of the use of Michaelis–Menten equation and of the following model by the fact that this approximation is at least roughly valid for any substrate and enzyme concentrations,⁶⁰ since the reaction takes place in an environment where substrate molecules can react with non-saturated enzymes (in the enzyme compartment, Fig. 5 and 6).

The underlying assumptions for the modelisation of the peptic hydrolysis were: (i) in batch mode, all the substrate molecule and resulted peptides have the same probability p_b to react with an enzyme molecule; (ii) in microfluidic mode,

reaction probability $p_{\mu 1}$ between a substrate molecule and an enzyme is low because only substrate and enzyme molecules present at the interface between the fluids can react. Since the interface extent l_i is about a fifth of the microchannel width l_c (Fig. 5), and since interface configuration is the same as batch configuration, it comes $p_{\mu 1} = p_b/5$; (iii) in microfluidic mode, once a substrate molecule S_1 is hydrolyzed, the resulting peptides can react with enzymes with a probability $p_{\mu 2} \gg p_b$. Indeed, peptides S_n that are generated during enzymatic hydrolysis are located close to the interface and, due to their smaller size, their diffusivity becomes higher than the initial substrate molecule S_1 (according to the well known relationship between l , τ , and D defined by $\tau \sim l^2/D$, with τ the diffusion time, l the length and D the diffusion coefficient²²). Therefore, they can diffuse to other unsaturated enzyme molecules in the "enzyme compartment" ($[S_n]_3 \ll K_m$, where K_m is the Michaelis constant and considering that the substrate S_1 is hydrolyzed at the interface); (iv) according to the results of mass spectrometry (Table 1), the lengths of the peptides generated in the course of the enzyme reaction are randomly chosen between l_0 (initial length) and $l_0/25$.

Evaluation of probabilities has thus been made using the Michaelis–Menten equation, with the following equation for p_b :

$$p_b \cdot dt = \frac{d[P]_b}{[S]_b} = \frac{k_{\text{cat}}[E]_b}{[S]_b + K_m} dt \quad (4)$$

$[P]_b$, $[S]_b$ and $[E]_b$ are respectively the product, substrate and initial enzyme concentrations in batch mode. From previous studies, $K_m = 0.1 \text{ mM}$ has been chosen.^{55,56} In microfluidic mode, it has been shown that $p_{\mu 1} = p_b/5$ due to the interface extent. Moreover, the probability $p_{\mu 2}$ of products hydrolysis by enzyme in the "enzyme compartment" is given by:

$$p_{\mu 2} \cdot dt = \frac{k_{\text{cat}}[E]_3}{K_m + [S_n]_3} dt \sim \frac{k_{\text{cat}}[E]_3}{K_m} dt = \frac{2k_{\text{cat}}[E]_b}{K_m} dt \quad (5)$$

since: (i) all the enzyme molecules are not saturated ($K_m \gg [S_n]_3$) in the "enzyme compartment"; (ii) the initial enzyme concentration in the enzyme compartment is $[E]_3 = 2 \cdot [E]_b$ because the enzyme compartment volume is half the whole microreactor volume.

Then, a Scilab algorithm has been written to predict the microfluidic and batch peptide contents. At the beginning, the solution is composed of enzymes and N_0 substrate molecules with a l_0 length. For each time step dt , substrate molecules and produced peptides can be cleaved or not, depending on probabilities defined before.

The peptidic profiles were determined after $T = 30 \text{ s}$ for microfluidic and batch modes for $k_{\text{cat}} = 0.5 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7).⁵⁵ Three main points are in good agreement with Fig. 2C and E: (1) in the microfluidic mode, peptides with an intermediate length are very few compared to batch mode, (2) after the same reaction time, there are more small peptides obtained in the microfluidic mode than in the batch mode, (3) the initial substrate molecules are more consumed in batch than in microreactor. However, due to assumptions (i) and (iv), small peptides appearance in batch mode is over-estimated by computation compared to experimental results. Indeed, the p_b probability

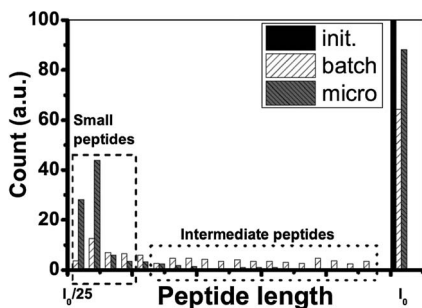


Fig. 7 Microfluidic and batch solution contents after 30 s reaction. Results from Scilab computation.

may depends on the peptide length and preferential cleavage sites exist in proteins.⁴³ Nevertheless, the model presented here is able to give with a good agreement a simple explanation of kinetic behavior differences that are experimentally observed in batch mode and microfluidic flow regime in co-flow configuration.

3.6. Comparison with immobilized pepsin experimental configuration

Previous study about hydrolysis of hemoglobin by immobilized pepsin in microfluidic device has been realized by Stigter *et al.* in 2008.⁶¹ In the same conditions of reaction time, pH and temperature, it was observed that peptidic profiles obtained in microreactor were similar to reaction carrying out in batch. Moreover, no kinetic selectivity modulation was observed when the flow rate of hemoglobin solution varied. These results showed that enzymatic kinetics was not altered with immobilized pepsin, probably due to the saturation of the enzyme molecules by hemoglobin substrate. However, in our study, only the enzymes located close to the interface are able to react with hemoglobin molecules due to the mass-transfer resistance of pepsin and hemoglobin. The other enzyme molecules located in the “enzyme compartment” can be qualified as “unsaturated” since they react with some produced peptides coming from the interface but are unable to react with the initial hemoglobin substrate. Thus, substrate molecules located close to the interface are rapidly and completely digested by pepsin whereas substrate molecules away from the interface are not hydrolyzed. This result indirectly underscores the influence of a parallel co-flow microfluidic configuration on the hydrolysis kinetic selectivity modulation. Diffusion effect is enhanced when the fluids are in co-flow configuration because of the interface effect.

4. Conclusion and perspectives

In summary, this paper demonstrates an attractive approach in modulating the kinetics of enzymatic proteolysis leading to a better control of its kinetic selectivity and which can be an interesting approach to determine the appearance kinetics of certain peptides or accumulate specific small bioactive peptides. We bring out strong kinetic selectivity differences between batch and co-flow microfluidic modes caused by the

diffusion enhanced effect specific to microfluidics. We show that microfluidics causes an acceleration of the enzymatic proteolysis kinetics for a part of the initial substrate population, resulting in a different kinetic selectivity. A mechanism of hydrolysis occurring within the microchannel is proposed as a basis for future studies. The stochastic nature of the model is adapted because the mechanism to be described is based on the interaction of few molecules, in contrast with deterministic models for which the phenomena under consideration involve a large number of molecules and describe thus an average effect.

Microfluidics is therefore a good tool that can modulate an enzymatic proteolysis for the rapid kinetic screening of protein enzymatic digestion and the search of bioactive peptides in combination with LC/MS analysis. Thus, perspectives are to further explore this approach for determining the kinetics of bioactive peptides appearance during hemoglobin hydrolysis by pepsin in order to provide a reliable methodology to guide peptides preparation. Indeed, in batch mode, peptides screening and preparation from hydrolysates can be very slow, typically until 2 hours or more for some hydrolysates containing specific small peptides (neokytorphin in the case of hemoglobin hydrolysis). Thus, a rapid and advanced hydrolysis can be easily realized in parallel laminar co-flow microreactor in order to obtain a rapid production of small size peptides or a rapid kinetic screening of specific peptides appearance. More than time-saving, microfluidics can offer some advantages including greater efficiency, real-time monitoring, possible parallelization for production or on-line optimal extraction or purification.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Gabrielle Chataigné for technical assistance in LC-MS analysis.

References

- 1 J. Berthier and P. Silberzan, *Microfluidics for biotechnology*, Artech House, 2009.
- 2 T. Squires and S. Quake, *Rev. Mod. Phys.*, 2005, **77**, 977–1026.
- 3 G. Velze-Casquillas, C. Fu, M. Le Berre, J. Cramer, S. Meance, A. Plecis, D. Baigl, J.-J. Greffet, Y. Chen, M. Piel and P.-T. Tran, *Lab Chip*, 2011, **11**, 484–489.
- 4 P. D. I. Fletcher, S. J. Haswell and V. N. Paunov, *Analyst*, 1999, **124**, 1273–1282.
- 5 A. I. K. Lao, T. M. H. Lee, I. M. Hsing and N. Y. Ip, *Sens. Actuators, A*, 2000, **84**, 11–17.
- 6 J. Wang, Y. He, H. Xia, L. G. Niu, R. Zhang, Q. D. Chen, Y. L. Zhang, Y. F. Li, S. J. Zeng, J. H. Qin, B. C. Lin and H. B. Sun, *Lab Chip*, 2010, **10**, 1993–1996.
- 7 Y. Tian, Y. L. Zhang, J. F. Ku, Y. He, B. B. Xu, Q. D. Chen, H. Xia and H. B. Sun, *Lab Chip*, 2010, **10**, 2902–2905.
- 8 B.-B. Xu, Y. L. Zhang, S. Wei, H. Ding and H.-B. Sun, *ChemCatChem*, 2013, **5**, 2091–2099.
- 9 A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.-E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko and B. Bocquet, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 154–160.

- 10 L. Liu, B. Sun, J. Pedersen, K.-M. Aw Yong, R. Getzenberg, H. Stone and R. Austin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, **108**, 6853–6856.
- 11 E. Brouzes, M. Medkova, N. Savenelli, D. Marran, M. Twardowski, J. B. Hutchinson, J. M. Rothberg, D. R. Link, N. Perrimon and M. L. Samuels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 14195–14200.
- 12 P. J. Lee, P. J. Hung, R. Shaw, L. Jan and L. P. Lee, *Appl. Phys. Lett.*, 2005, **86**, 223902.
- 13 W. D. Ristenpart, J. D. Wan and H. A. Stone, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3270–3276.
- 14 S. Jambovane, E. C. Duin, S.-K. Kim and J. Hong, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 3239–3245.
- 15 P. Siuti, S. T. Retterer, C. K. Choi and M. J. Doktycz, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1092–1097.
- 16 Y. Xie, D. Ahmed, L. I. Lapsley, S. C. S. Lin, A. A. Nawaz, L. Wang and T. J. Huang, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 7495–7501.
- 17 J. Ji, L. Nie, L. Qiao, Y. Li, L. Guo, B. Liu, P. Yang and H. Girault, *Lab Chip*, 2012, **12**, 2625–2629.
- 18 J. Duan, L. Sun, Z. Liang, J. Zhang, H. Wang, L. Zhang, W. Zhang and Y. Zhang, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1106**, 165–174.
- 19 M. Miyazaki, T. Honda, H. Yamaguchi, M. Briones and H. Maeda, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2008, **25**, 405–428.
- 20 F. E. Valera, M. Quaranta, A. Moran, J. Blacker, A. Armstrong, J. T. Cabral and D. G. Blackmond, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 2478–2485.
- 21 A. J. deMello, *Nature*, 2006, **442**, 394–402.
- 22 M. Brivio, W. Verboom and D. N. Reinhoudt, *Lab Chip*, 2006, **6**, 329–344.
- 23 J. Jovanović, E. V. Rebrov, T. A. Nijhuis, M. T. Kreutzer, V. Hessel and J. C. Schouten, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2012, **51**, 1015–1026.
- 24 J. W. Swarts, R. C. Kolfschoten, M. C. A. A. Jansen, A. E. M. Janssen and R. M. Boom, *Chem. Eng. J.*, 2010, **162**, 301–306.
- 25 W. Buchegger, A. Haller, S. van den Driesche, M. Kraft, B. Lendl and M. Vellekoop, *Biomicrofluidics*, 2012, **6**, 012803.
- 26 N.-T. Nguyen and Z. Wu, *J. Micromech. Microeng.*, 2005, **15**, R1–R16.
- 27 S. Jung, P. A. Murphy and L. A. Johnson, *J. Food Sci.*, 2005, **70**, C180–C187.
- 28 B. Yang, H. S. Yang, J. Li, Z. X. Li and Y. M. Jiang, *Food Chem.*, 2011, **124**, 551–555.
- 29 G. L. Zhao, Y. Liu, M. M. Zhao, J. Y. Ren and B. Yang, *Food Chem.*, 2011, **127**, 1438–1443.
- 30 N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, E. Y. Adje, J. Traisnel, F. Krier, P. Mary, M. Kouach, G. Briand and D. Guillochon, *Peptides*, 2008, **29**, 969–977.
- 31 D. Agyei and M. K. Danquah, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 272–277.
- 32 H. Korhonen, *J. Funct. Foods*, 2009, **1**, 177–187.
- 33 C. Y. Chang, K. C. Wu and S. H. Chiang, *Food Chem.*, 2007, **100**, 1537–1543.
- 34 J. T. Wei and B. H. Chiang, *J. Sci. Food Agric.*, 2009, **89**, 372–378.
- 35 R. Froidevaux, F. Krier, N. Nedjar-Arroume, D. Vercaigne-Marko, E. Kosciarz, C. Ruckebusch, P. Dhulster and D. Guillochon, *FEBS Lett.*, 2001, **491**, 159–163.
- 36 Q. Zhao, I. Garreau, F. Sannier and J. M. Piot, *Biopolymers*, 1997, **43**, 75–98.
- 37 E. Y. Adje, R. Balti, M. Kouach, P. Dhulster, D. Guillochon and N. Nedjar-Arroume, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2011, **49**, 143–153.
- 38 B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume and D. Guillochon, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **29**, 25–30.
- 39 K. Linderstrøm-Lang, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, **35**, 100–116.
- 40 J. Srividhya and S. Schnell, *Comput. Biol. Chem.*, 2006, **30**, 209–214.
- 41 S. Laurette, A. Treizebre, A. Elagli, B. Hatirnaz, R. Froidevaux, F. Affouard, L. Duponchel and B. Bocquet, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 10064–10071.
- 42 S. Laurette, A. Treizebre and B. Bocquet, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, **21**, 065029.
- 43 A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner, *Handbook of proteolytic enzymes*, Elsevier Academic Press, 2nd edn, 2004, vol. 1.
- 44 J. M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart and D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **189**, 101–110.
- 45 N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, K. Miloudi, R. Daoud, F. Krier, M. Kouach, G. Briand and D. Guillochon, *Peptides*, 2006, **27**, 2082–2089.
- 46 L. Catiau, J. Traisnel, V. Delval-Dubois, N. E. Chihib, D. Guillochon and N. Nedjar-Arroume, *Peptides*, 2011, **32**, 633–638.
- 47 B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume and D. Guillochon, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1999, **30**, 201–207.
- 48 R. Froidevaux, B. Lignot, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, B. Coddeville and G. Ricart, *J. Chromatogr., A*, 2000, **873**, 185–194.
- 49 C. R. Wilke and P. Chang, *AIChE J.*, 1955, **1**, 264–270.
- 50 L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333–369.
- 51 B. P. English, W. Min, A. M. van Oijen, K. T. Lee, G. Luo, H. Sun, B. J. Cherayil, S. C. Kou and X. S. Xie, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 87–94.
- 52 W. W. Chen, M. Niepel and P. K. Sorger, *Genes Dev.*, 2010, **24**, 1861–1875.
- 53 D. T. Gillespie, *Physica A*, 1992, **188**, 404–425.
- 54 S. H. Northrup and H. P. Erickson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, **89**, 3338–3342.
- 55 C. K. Mathews, K. E. van Holde and K. G. Ahern, *Biochemistry*, Prentice Hall, 3rd edn, 1999.
- 56 Y. Poojari, A. S. Palsule, S. J. Clarson and R. A. Gross, *Silicon*, 2009, **1**, 37–45.
- 57 G. E. Briggs and J. B. Haldane, *Biochem. J.*, 1925, **19**, 338–339.
- 58 A. Ciliberto, F. Capuani and J. J. Tyson, *PLoS Comput. Biol.*, 2007, **3**, e45, DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030045.
- 59 J. A. M. Borghans, R. J. De Boer and L. A. Segel, *Bull. Math. Biol.*, 1996, **58**, 43–63.
- 60 A. R. Tzafriri, *Bull. Math. Biol.*, 2003, **65**, 1111–1129.
- 61 E. Stigter, G. de Jong and W. van Bennekom, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **619**, 231–238.

Synthèse

La mise en œuvre de la protéolyse en microréacteur a abouti à la génération de populations peptidiques différentes de celles générées en batch pour les mêmes temps de réaction. Ces différences qualitative et quantitative permettent de souligner un déroulement spécifique de la protéolyse en microréacteur, basé sur le mélange par les phénomènes diffusionnels omniprésents. La cinétique de la réaction protéolytique a pu être modulée par ces effets de sorte que la sélectivité de la réaction, directement reliée à sa cinétique, a pu être affectée. En conséquence, des populations peptidiques quantitativement et qualitativement différentes ont été mises en évidence pour les mêmes temps de réaction, en réacteur batch et en microréacteur. Une modélisation basée sur une approche probabiliste a ensuite été menée afin de supporter les résultats expérimentaux.

L'étude suggère qu'un microréacteur peut constituer un outil pouvant être mis à profit pour réaliser (i) un screening cinétique rapide de peptides produits au cours d'une réaction de protéolyse enzymatique ou encore (ii) la préparation sélective de peptides ou population de peptides d'intérêt. Elle montre que la modulation cinétique de la réaction enzymatique peut permettre une maîtrise accrue de la sélectivité au travers d'une maîtrise plus fine des conditions de préparation et des phénomènes de transfert. Au regard des facteurs suggérés influencer les performances d'un procédé (bio)catalytique en microréacteur (section 3.1.1.), le comportement spécifique d'une espèce à haute ou faible diffusivité demeure un critère essentiel. Le dimensionnement du réacteur reste donc un paramètre tout à fait crucial dans l'optique de maîtriser la cinétique d'une réaction.

Références

- [1] Seong G. H., Heo J., "Measurements of enzyme kinetics using a continuous-flow microfluidic system", *Anal. Chem.*, **75**, 2003, 3161–3167.
- [2] Kerby M. B., Legge R. S., Tripathi A., "Measurements of kinetic parameters in a microfluidic reactor", *Anal. Chem.*, **78**, 2006, 8273–8280.
- [3] Yamashita K., Miyazaki M., Nakamura H., Maeda H., "Nonimmobilized enzyme kinetics that rely on laminar flow", *J. Phys. Chem. A*, **113**, 2009, 163–169.
- [4] Swarts J. W., Kolfschoten R. C., Jansen M. C. A. A., Janssen A. E. M., Boom R. M., "Effect of diffusion on enzyme activity in a microreactor", *Chem. Eng. J.*, **162**, 2010, 301–307.

- [5] Miyazaki M., Honda T., Yamaguchi H., Briones M. P. P., Maeda H., “Enzymatic processing in microfluidic reactors”, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **25**, 2008, 405–428.
- [6] Kolfschoten R. C., Swarts J. W., Janssen A. E. M., Boom R. M., “Guidelines for optimal design of coflow enzyme microreactors”, *Chem. Eng. J.*, **172**, 2011, 1072–1077.
- [7] Yamashita K., Yamaguchi Y., Miyazaki M., Nakamura H., Shimidzu H., Maeda H., “Direct observation of long-strand DNA stretching in microchannel flow”, *Chem. Lett.*, **33**, 2004, 628–629.
- [8] Eggers D. K., Valentine J. S., “Molecular confinement influences protein structure and enhances protein thermal stability”, *Protein Sci.*, **10**, 2001, 250–261.
- [9] Linderstrøm-Lang K., “Les phases initiales de la dégradation des protéines par les enzymes”, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1953, 100–116.

3.2. Rôle de l'outil microfluidique dans le couplage réaction-séparation : application à l'extraction liquide-liquide d'une hémorphine à partir de la protéolyse pepsine/hémoglobine

La présente section poursuit la précédente par la mise en œuvre d'un couplage de la réaction de protéolyse à un procédé de séparation sélectif de peptides. L'approche menée tente d'illustrer la spécificité de la microfluidique dans l'élaboration d'un procédé continu de type réaction-séparation, procédé mettant en jeu l'extraction liquide-liquide d'un peptide opioïde. Elle vise également à rendre compte des bénéfices et attraits majeurs qui en découlent, en comparaison avec un procédé de nature similaire réalisé à l'échelle macroscopique. Rejoignant des considérations d'ordre environnemental, la preuve de concept apportée s'inscrit dans une démarche d'intensification de procédés.

Introduction

L'hydrolyse de protéines d'origine agroalimentaire nécessite la prise en compte de procédés séparatifs fiables et efficaces. Au-delà du traitement de matière continu, le couplage de la fonction de séparation à la fonction de biocatalyse est une orientation pouvant répondre à des besoins industriels [1]. Ces besoins recouvrent souvent en premier lieu des considérations économiques. Toutefois, la prise en compte de considérations d'ordre environnemental est de plus en plus d'actualité dans le monde de l'industrie. L'intensification de procédés peut donc servir à satisfaire un double objectif.

La préparation de peptides opioïdes répond à une demande en peptides bioactifs d'origine naturelle [2]. Ces peptides peuvent servir en médecine thérapeutique (parfois comme alternative à l'utilisation d'analogues chimiques, prescrits parfois dans des traitements de la douleur de certains cancers) et en recherche médicale [3-6]. L'activité analgésique ou anti-hypertensive qu'ils exhibent intéresse la pharmacologie et peut ainsi les rendre utiles dans le domaine pharmaceutique [6]. Caractérisés par une forte hydrophobie, cette variété de peptides apolaires regroupe les hémorphines, dérivées par clivages successifs du fragment β 31-40 de la chaîne β de l'hémoglobine bovine. Ils comprennent les peptides LVVh-7, VVh-7, LVVh-6, VVh-6, h-6, LVVh-5, VVh-5, h-5, LVVh-4, VVh-4 et h-4. La cinétique d'apparition de ces peptides en milieu acide (autour de pH 3) montre qu'ils sont générés au sein d'une population très riche et très hétérogène en divers peptides [7]. Les limitations caractérisant la préparation de telles

molécules par extraction liquide-liquide résident principalement dans le nombre d'étapes nécessaires et leur temps caractéristique requis (en considérant l'opération d'extraction seule et sans couplage). Cette technique séparative requiert l'utilisation de solvants apolaires sélectifs (principalement le butan-2-ol et l'octan-1-ol) et implique plusieurs étapes pouvant être longues (surtout pour des volumes élevés) et délicates (automatisation difficile). Ainsi, l'objectif était de mettre en œuvre un système microfluidique comprenant le couplage de la réaction de protéolyse enzymatique à l'extraction liquide-liquide du peptide LVV-h7. En comparaison avec des études antérieures [8-10], celui-ci visait à (i) diminuer le temps de l'ensemble du traitement (en jouant sur la cinétique d'apparition des hémorphines et sur la cinétique d'extraction liquide-liquide) et (ii) raisonner le procédé dans sa consommation de solvant.

Mise en œuvre expérimentale : preuve de concept

Sur la base de la cinétique d'apparition du peptide opioïde LVVh-7 approchée dans l'étude précédente (section 3.1.2.), la mise en œuvre expérimentale d'un procédé couplé de type réaction-séparation combinant protéolyse et extraction liquide-liquide a été entreprise par voie microfluidique. L'étude menée aboutit à une preuve de concept en préparation pour publication comme article scientifique. Le manuscrit s'intitule « *Préparation du peptide opioïde LVV-h7 à partir de protéolyse enzymatique par un éco-procédé microfluidique de type réaction-extraction avec recyclage de solvant* » :

***Sustainable efficient way to prepare the opioid peptide LVV-h7 from enzymatic proteolysis
by a microfluidic reaction-extraction process with solvent recycling***

Adil Elagli, Renato Froidevaux

Manuscrit en préparation

Sustainable efficient way to prepare the opioid peptide LVV-h7 from enzymatic proteolysis by a microfluidic-based reaction-extraction process with solvent recycling

Adil Elagli^{a,b}, Renato Froidevaux^a

^a*Institut Charles Violette, Equipe Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM) – EA 1026, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France*

^b*Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) – UMR CNRS 8520, Université Lille 1 – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France*

Corresponding author: Dr. Renato Froidevaux
Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien
Polytech'Lille, Avenue Paul Langevin
Université Lille 1 - Cité Scientifique
59655 Villeneuve d'Ascq cedex - France
renato.froidevaux@univ-lille1.fr
Phone: +33 328 76 73 90
Fax: +33 328 76 73 56

Abstract

LVV-h7 (LVVYPWTQFR) is a bioactive peptide that can be obtained from blood as waste of food industry, more precisely from hemoglobin hydrolysis by pepsin. This opioid peptide belongs to the hemorphins family and have strong physiological effects that bring its use in pharmaceuticals and various therapeutic treatments attractive, in particular for substituting its costly chemically synthesized analogous. Hemoglobin hydrolysis by pepsin generates a huge variety of peptides among whose LVV-h7 can be purified by liquid-liquid extraction (LLE). Herein, selective preparation of this peptide is proposed by a microfluidic-based continuous reaction-separation process. Hemoglobin hydrolysis in microreactor was firstly coupled to LVV-h7 LLE in octan-1-ol and then coupled to LVV-h7 back LLE in acidic water. This continuous process allowed to prepare pure LVV-h7, as confirmed by liquid chromatography

and mass spectrometry. The microfluidic circuit also allowed octan-1-ol recycling in a closed loop, making this method more sustainable than similar biphasic batch process.

Keywords: enzymatic hydrolysis, bioactive peptide, liquid-liquid extraction, microfluidics, solvent recycling

1. Introduction

Since several years, it has been demonstrated that wastes of agricultural and food processing could be considered as valuable resources.¹ Nowadays, recycling of such products is increasingly regarded as an important procedure that can be conducted at industrial scale.² Among these products, animal blood (or cruor) is underutilized regarding to its abundance and its potential as source of active peptides. Indeed, hemoglobin represents a good protein source that can be treated to improve protein functional property in food,³ or to obtain bioactive peptides,³⁻⁵ which can be shown to have effects on human health.⁶ By using proteolytic enzymes such as pepsin or trypsin,³ a biocatalysis-based treatment of bovine or porcine hemoglobin liberates amino acids sequences with various physiological effects and activities such as antimicrobial,⁷ opioid,^{8,9} antihypertensive,^{9,10} or antioxidant.¹¹ Among them, the opioid and antihypertensive effects of hemoglobin-derived hemorphins are notable.⁹ Among the most known drugs, these opioids works by binding to opioid receptors which are principally localized in the central and peripheral nervous system and the gastrointestinal tract. The opioid peptide LVV-h7 (LVVYPWTQRF) that is released during bovine hemoglobin hydrolysis by pepsin confers interesting analgesic effects to be exploit in pharmaceuticals and therapeutic uses instead of chemically synthetized drugs.¹² Indeed, the use some antibiotics or chemical drugs may be accompanied by side effects, problem of prolonged retention in body tissues and drug-to-drug interactions.¹² Some advantages of bioactive peptides over chemical drugs are high bioactivity and biospecificity to targets, wide spectrum of therapeutic actions, low levels of toxicity, structural diversity and low levels of accumulation in body tissues.^{12,13} In many cases, the hemorphin LVV-h7 has been successfully used in ACE (Angiotensin-converting enzyme) inhibition,⁹ which confers to this peptide a blood pressure regulation capacity. In addition, this peptide shows a high potential in cancer therapeutics due to its cell cytotoxic and antiproliferative effects,¹⁴ but also in Alzheimer's disease therapeutic treatment.¹⁵ Indeed, a role

in learning and memory has also been reported,⁹⁻¹⁶ which hyphenates the strong impact of LVV-h7 on various physiological processes.

Manufacturing pharmaceutical-grade bioactive peptides from peptidic hydrolysates remains tricky and costly so that fractionation and isolation of these peptides are principally performed for peptide enrichment.¹² However, purification of the peptide LVV-h7 can be realized through its strong hydrophobic properties that allows its solubilization in organic solvents, *i.e.* that selective liquid-liquid extraction (LLE) can be performed. Classical batch LLE is one of the most used method to enrich or purify a wide range of compounds. Purifying this intermediate peptide strongly depends on its appearance-disappearance kinetics during hemoglobin hydrolysis by pepsin.¹⁷ Several approaches have thus been tried to develop extraction-based process. Froidevaux *et al.* proposed a biphasic reactor in order to purify this peptide in the course of hemoglobin hydrolysis.^{18,19} However, the main disadvantages were the slow extraction kinetics that was diffusion-dependent (avoiding emulsion and immobilized pepsin deactivation by the solvent) and the elevated volumetric ratio between organic phase (butan-2-ol:octan-1-ol, 80:20, v:v) and aqueous phase, which consumes a high solvent volume. However, recycling of a biological waste as bovine blood reasonably implies the development of a sustainable process, especially for uses for which natural products are preferred over chemically synthesized analogous. To overcome the low partition coefficient, enhance extraction efficiency and decrease the solvent volume, Vanhoute *et al.* proposed an ion pairing-based extraction process to enrich LVV-h7 fractions.²⁰ However, the selectivity was very poor and the resulting LVV-h7-containing fraction was not a pharmaceutical-grade product in term of purity. Clearly, classical LLE remain a powerful first choice method due to the high selectivity that can be reached to LVV-h7 target molecules. Nevertheless, classical LLE suffers from some difficulties like strong emulsification, automation and continuous processing difficulties, use of large amounts of organic solvents (costs, safety risks, environmental considerations), introduction of impurities and amount of time that is non negligible.

Intensification of (bio)chemical processes aiming at the effective use of raw materials and energy increasingly may involve miniaturization of chemical reactors and platforms and the use of continuous-flow processes.²¹ Microstructured devices can serve as efficient tools to perform continuous-flow processes with high performances or specific benefits compared to batch processes, with the advantages of easy scale up, improved sustainability with reduced waste at low energy consumption but also easy process control and automation with inherent reactor

safety.^{21,22} Process intensification at this scale could address specific troubles in yields, safety, sustainability or selectivity of specific chemical or enzyme reactions.^{22,23} Moreover, the limited use of chemicals and energies can reduce cost and environmental impact.²³ Thus, performing LLE in microstructured devices can be attractive. As example, microfluidics offers designs that allow using three-phase laminar flow to provide efficient back extraction by double liquid-liquid interface area.^{24,25} Microfluidics brings a huge surface-to-volume ratio, the specific interfacial area of multiphase systems can be considered in the range of 5000-30000 m² m⁻³.²⁶ Enhancement of mass-transfer performances at microscale combined with a huge specific interfacial area between two immiscible fluids could allow efficient extraction-based process as well as impressively reducing its time in comparison to batch. In addition, microfluidics not only allows fast extraction of a solute from a complex mixture but also theoretically allows a continuous reaction-extraction process to be performed in a continuous-flow laminar reactor.²⁷ However, obtaining a stable liquid-liquid interface between two immiscible fluids as well as separating phases remains challenging even if some interesting approaches have been reported.²⁷⁻²⁹

In this work, we rely on the existed strategy of laminar flow LLE but promote this technology in a different manner by applying it to (i) perform a continuous-flow reaction-separation process for LVV-h7 preparation in one-step and (ii) drastically minimize the solvent volume. Peptides preparation from proteolysis has been shown to be selective by using a microfluidic reactor.³⁰ The proteolysis is a complex reaction that generates a huge variety of peptides including the opioid peptide LVV-h7, whose selective extraction can be achieved using octan-1-ol at optimized reaction time. The modulation of the proteolysis kinetic selectivity previously reported showed that LVV-h7 extraction can be optimally performed, in term of appearance kinetics, around 15 seconds residence time in the microfluidic reactor.³⁰ Herein, the process distinguishes this work from previous by the coupling of: (i) hemoglobin hydrolysis by pepsin in microreactor, (ii) LVV-h7 selective extraction by octan-1-ol and (iii) LVV-h7 back extraction from octan-1-ol in acidic water. Since the boiling point of octan-1-ol is very high (~192°C) and an adsorption-desorption process involves a discontinuous step, direct coupling of back extraction has been adopted to allow pure LVV-h7 recovery in water. Recycling of the depleted solvent after back extraction was performed in a closed circuit to obtain a low organic phase/aqueous phase volumetric ratio.

2. Experimental protocol

Reaction. On the basis of a previous study, the proteolysis reaction time was fixed at 15 s.³⁰ Due to the reaction mechanism involved in the microfluidic reactor, this time was sufficient for the pepsin to generate the peptide of interest LVV-h7 while allowing a short residence time and avoiding small hydrophilic peptides to appear.³⁰ Figure 1 describes the experimental protocol. Syringes containing denatured hemoglobin (2% w/v) and pepsin (2.5% w/w) were thus placed in the same syringe pump (New Era Pump Systems, Farmingdale, NY, USA) fixed at a flow-rate of $1\mu\text{L min}^{-1}$. A T-connector was used to put in contact the flow of enzyme and substrate in a capillary (150 μm I.D. x 75 μm O.D.) with an adjusted length to allow 15 s reaction. The hydrolysate after 15 s reaction is denoted as sample 1 (Figure 1).

Extraction. Another T-connector was used for the coupling of the last capillary to the LLE capillary. Octan-1-ol was chosen as solvent due to the high selectivity of polar alcohol solvent for LVV-h7. Octan-1-ol was pumped by a peristaltic pump at a flow-rate of $20\mu\text{L min}^{-1}$. The biphasic flow was recovered in a 1.5mL tube after 15 s residence time of the octan-1-ol flow. The two phases immediately separate at the outlet of the capillary (150 μm I.D. x 75 μm O.D.) to form a biphasic mixture in the tube. RP-HPLC analysis performed from the organic phase (sample 2, Figure 1) revealed the good selectivity of octan-1-ol (result not shown).

Back extraction. As the density of octan-1-ol is much lower than that of water, a capillary was immersed in organic phase to pump the solvent. By using another T-connector, octan-1-ol was connected to acidic water (pH3.0) in another capillary (150 μm I.D. x 75 μm O.D.) to perform back LLE. The same peristaltic pump as previously described was used to pump octan-1-ol at $20\mu\text{L min}^{-1}$. This back extraction consisted in recovering LVV-h7 in acidic water (sample 3, Figure 1) pumped at $6\mu\text{L min}^{-1}$. Moreover, this module was suited to LVV-h7 recovery in one-step in comparison to other methods. Indeed, octan-1-ol boiling point is very high and the coupling of a selective adsorption process involves a desorption step.

Depleted solvent recycling. Recycling of depleted octan-1-ol phase is described in Figure 1. This recycling module allowed keeping a fixed volume of solvent to be processed continuously. The limitation of such a recycling system lies in the need to employ efficient pumping systems to allow a large interval of flow-rates. In this study, we were limited to a minimum of $20\mu\text{L min}^{-1}$ by the peristaltic pump. Nevertheless, using such an off-chip system facilitates phase

separation when the fluids behavior within microchannels have not been studied or are not predicted, since several flow patterns can exist (annular, bubbly, parallel, slug...).^{31,32}

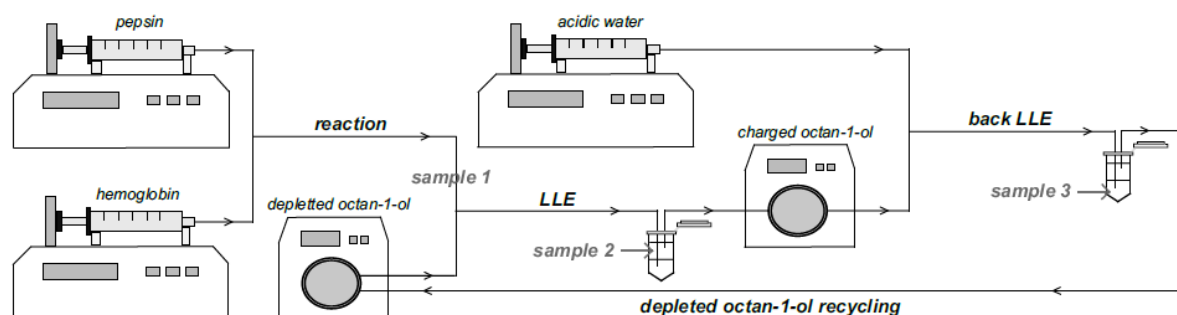


Figure 1. Experimental protocol for continuous preparation of LVV-h7 from pepsic hydrolysis of bovine hemoglobin. Sample 1 refers to the hydrolysate after 15 s reaction, sample 2 corresponds to the octan-1-ol phase after LLE and sample 3 is the aqueous phase containing the peptide LVV-h7 recovered after both LLE and back LLE.

3. Results and discussion

Figure 2a represents the chromatogram of the unreacted hemoglobin. The chromatogram in Figure 2b shows the peptides generated during hemoglobin hydrolysis by pepsin for 15 s residence time (sample 1, Figure 1). In comparison with the peptides generated in the same conditions in a batch reactor, LVV-h7 is produced in microreactor among a lower diversity of peptides,³⁰ *i.e.* that the kinetics of hemoglobin hydrolysis in microreactor increases the selectivity for LVV-h7 around 15 s residence time. The absence of a large amount of intermediate peptides leads to a good selectivity for the target peptide obtained during the LLE process. Indeed, partition in octan-1-ol of hydrophobic intermediate peptides is reduced, which might reduce non-selective extraction. LLE time was also largely decreased due to the moderate molecular weight of LVV-h7 (~1308 Da) leading to a rapid diffusion in laminar conditions and the large surface-to-volume ratio that characterize microfluidic systems. From independent experiments, it was assumed that LVV-h7 partition coefficient in octan-1-ol (~0.04 as calculated from Vanhoute *et al.*)²⁰ was reached around 15 s residence in the LLE module (result not shown). Back LLE was performed in order to provide one-step continuous preparation of LVV-h7. Figure 2d represents the chromatogram of the sample after back LLE, denoted as sample 3 in Figure 1.

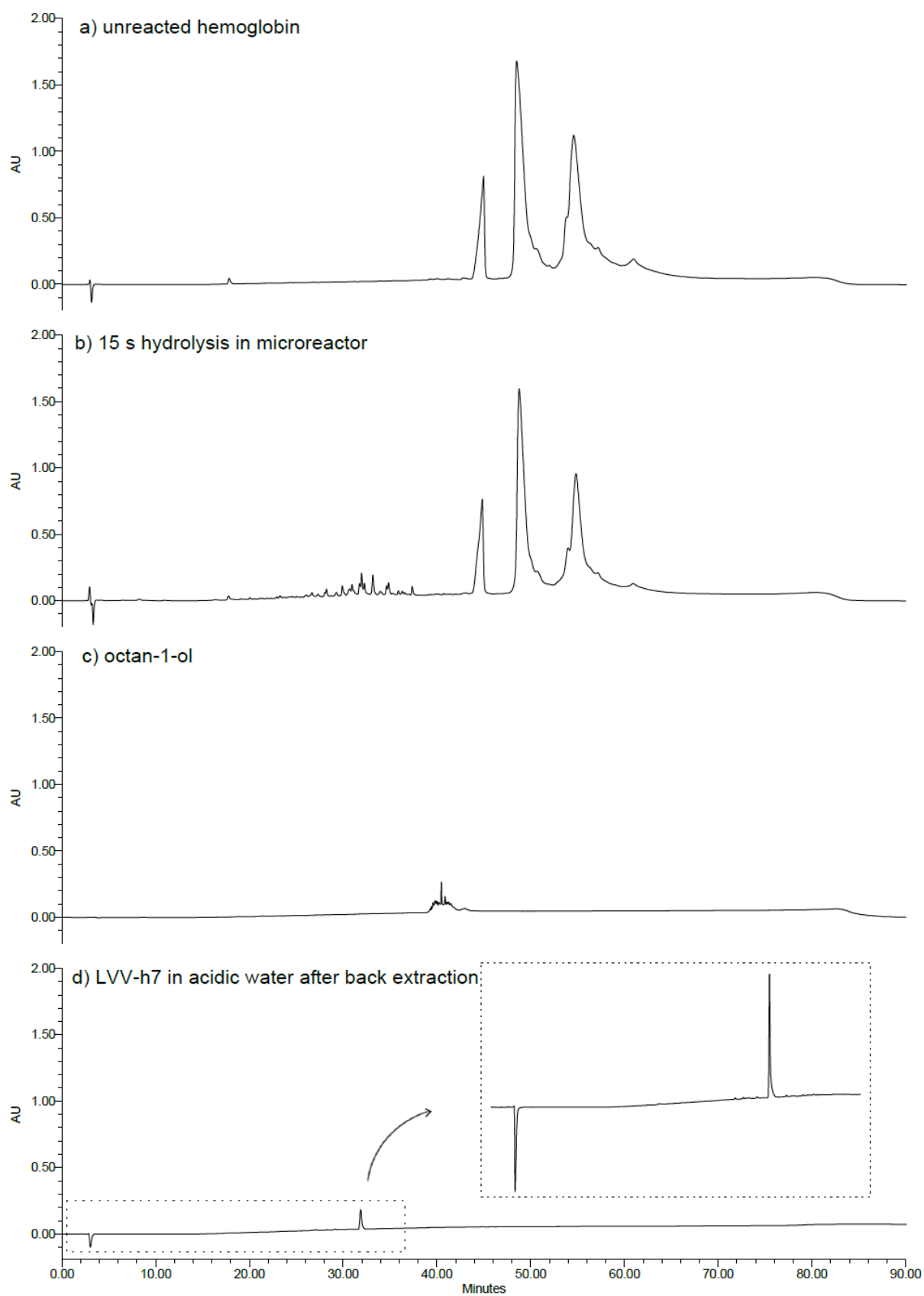


Figure 2. RP-HPLC chromatogram of a) unreacted hemoglobin, b) 15 s hydrolysate in microreactor (sample 1), c) pure octan-1-ol and d) LVV-h7 recovery after back LLE (sample 3). 40 μ L samples were fractionated on a C4 column in a) and b) and 50 μ L in c) and d).

LVV-h7 is eluted around 32 minutes of retention time. MALDI-TOF analysis of sample 3 reveals the elevated purity of the peptide (Figure 3) and its sequence was confirmed by MALDI-TOF-TOF (result not shown). It is interesting to note the absence of hem in sample 3 (Figure 1), which avoid any pretreatment of hemoglobin to remove the hem.³³

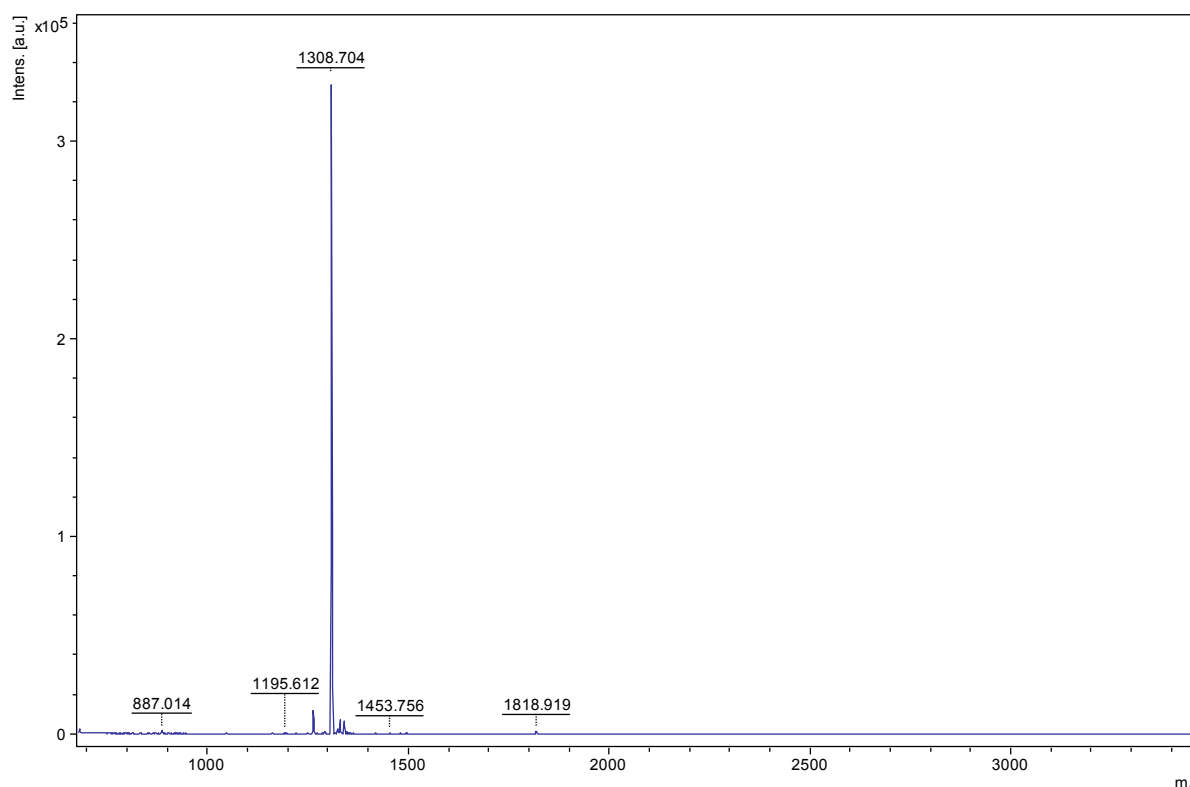


Figure 3. MALDI-TOF spectrum of sample 3 showing the purity of LVV-h7 recovered after back extraction.

By comparing our result with those of Vanhoute *et al.*,²⁰ the good selectivity of octan-1-ol allowed to obtain a good purity, which was not achieved by the ion-pairing system. However, this latter could be preferred in the case of LVV-h7 enrichment with poor selectivity but not in the case of manufacturing a pharmaceutical-grade compound. Moreover, avoiding the use of an ion-pairing system allows avoiding any desalination step. Indeed, process intensification in LVV-h7 preparation involves *de facto* developing sustainable as well as easier production processes. As traditional scale-up generally implies the use of a larger extracting solvent volume in batch extraction-based processes, the proposed microfluidic protocol allows increasing the feed volume (hemoglobin) while keeping a constant volume of extracting solvent (octan-1-ol). The parallelization of such a system, described as “numbering-up”, could reasonably answer to higher productivity in a safer way than the batch way. By recycling octan-1-ol, the use of a

minimal solvent volume in a closed circuit led to an organic phase/ aqueous phase volumetric ratio largely decreased in comparison with a batch process, while allowing fast and continuous LVV-h7 recovery. This ratio can be approximated and compared with that of Froidevaux *et al.*¹⁹ In their process, they used 450mL of aqueous phase against 80mL of organic phase. In this study, only ~120µL was necessary against 4mL of aqueous phase. The process was stopped after 4mL feed volume but both process duration and depleted solvent reusability should be studied.

4. Chemical analyzes

Reversed-phase-HPLC

The liquid chromatographic system consisted in a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millenium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. Detection of produced peptides was carried out at 215nm by reverse phase HPLC (RP-HPLC) on a C4-column (Vydak 0.46x25cm, 3mm I.D.) for 0.5mL min⁻¹ flow-rate. The mobile phase was water/trifluoroacetic acid (100:0.1, v/v) as eluent A and acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (60:40:0.1, by vol.) as eluent B. The applied gradient was 0-67% (v/v) B over 30min, then 67-87% (v/v) B over 35min, and finally 100% B over 25min. On-line UV absorbance scans were performed between 200 and 400nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2nm. All common chemicals and reagents were of analytical grade and purchase from Sigma Chemicals Co. and Flandres Chimie.

MALDI-TOF mass spectrometry

The sample was loaded on a ground steel MALDI target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) following the dried droplet method. Briefly, 1 µl of MALDI matrix (10 mg/ml cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in a mixture of 40/60 of water and acetonitrile with 0.1% TFA) and 1 µl of sample were mixed together on the MALDI target and allowed to dry. The MS (positive reflectron mode) and MS/MS (lift mode) measurements were performed in automatic mode on an AUTOFLEX™ Speed TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) running FlexControl™ 3.0 software (Bruker Daltonics). External calibration over the 1,000-3,500 mass range was performed using the [M+H]⁺ monoisotopic ions from bradykinin 1-7, angiotensin I, angiotensin II, substance P, bombesin and adrenocorticotrophic hormone (clips 1–17 and clips

18–39) from a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). Each MS spectrum was acquired by accumulating data from 500 laser shots with a 25 kV accelerating voltage, a 26.3 kV reflector voltage and a 120 ns pulsed ion extraction. Peptide fragmentation was performed by automatic method of the manufacturer. Typically, precursor ions were accelerated to 8 kV and selected in a timed ion gate. Metastable ions generated by laser-induced decomposition were further accelerated by 19 kV in the lift cell and their masses were measured in reflectron mode. For precursor and daughter ions, each MS/MS spectrum was produced by accumulating data from 200 and 1,000 laser shots, respectively. MS and MS/MS spectra were processed using Flexanalysis™ 3.3 and BioTools 3.4 software packages (Bruker Daltonics). Fragmentation pattern of peptides was deduced from matching of amino acid sequences (Uniprot access numbers: P02070 & P01966) of each chain of bovine haemoglobin to the MS/MS spectra using BioTools 3.4.

5. Conclusion

From this preliminary study, two concrete and significant advantages of microfluidic processing over batch in LVV-h7 preparation can be resumed. Firstly, operating in continuous-flow conditions easily allowed efficient coupling of hemoglobin hydrolysis with LLE and back LLE. The high selectivity for LVV-h7 in microreactor combined with lower extraction time than macroscopic processing were highly attractive benefits. Secondly, solvent recycling in a closed microfluidic circuit contributed to drastically minimize octan-1-ol volume. The process could further be intensified by immobilizing pepsin on the wall of the microreactor after a study of the reaction kinetic selectivity in this conditions. To conclude, this work aimed not only at hyphenate the potential of microfluidics in specific peptide preparation from protein hydrolysis but also at promote microfluidic-based LLE. Taking into account the huge potential of microfluidics in process intensification, new processes and designs allowing solvent saving and environment preservation are welcome and this works fits into this context.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Christophe Flahaut for technical assistance in mass spectrometry analysis. The MALDI-TOF mass spectrometry facility used for this study was funded by the region Nord/Pas-de-Calais, The University of Lille 1 and the Centre National de la Recherche Scientifique.

References

- (1) L. A. Pfaltzgraff, M. De bruyn, E. C. Cooper, V. Budarin and J. H. Clark, *Green Chem.*, 2013, **15**, 307–314.
- (2) M. Narodoslawsky, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2013, **91**, 2021–2028.
- (3) O. L. Tavano, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 2013, **90**, 1–11.
- (4) M. J. In, H. J. Chae and N. S. Oh, *Bioresour. Technol.*, 2002, **84**, 63–68.
- (5) N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, Yaba Adje E., J. Traisnel, F. Krier, P. Mary, M. Kouach, G. Briand and D. Guillochon, *Peptides*, 2008, **29**, 969–977.
- (6) H. Biesalki, L. O. Dragsted, I. Elmadfa, R. Grossklaus, M. Müller, D. Schrenk, P. Walter and P. Weber, *Nutrition*, 2009, **25**, 1202–1205.
- (7) N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, K. Miloudi, R. Daoud, F. Krier, M. Kouach, G. Briand and D. Guillochon, *Peptides*, 2006, **27**, 2082–2086.
- (8) J.-M. Piot, Q. Zhao, D. Guillochon, G. Ricart and D. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, **189**, 101–110.
- (9) I. Gomes, C. S. Dale, K. Casten, M. A. Geigner, F. C. Gozzo, E. S. Ferro, A. S. Heimann and L. A. Devi, *AAPS J.*, 2010, **12**, 658–668.
- (10) I. Fruitier-Arnaudin, M. Cohen, S. Bordenave, F. Sannier and J.-M. Piot, *Peptides*, 2002, **23**, 1465–1470.
- (11) C.-Y. Chang, K.-C. Wu and S.-H. Chiang, *Food Chem.*, 2007, **100**, 1537–1543.
- (12) D. Agyei and M. K. Danquah, *Biotechnol. Adv.*, 2011, **29**, 272–277.
- (13) V. Marx, *Chem. Eng. News*, 2005, **83**, 17–24.
- (14) E. Y. Blishchenko, O. V. Sazonova, O. A. Kalinina, O. N. Yatskin, M. M. Philippova, A. Y. Surovoy, A. A. Karelin and V. T. Ivanov, *Peptides*, 2002, **23**, 903–910.
- (15) H. John, S. John and W. G. Forssmann, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 797–803.
- (16) J. Lee, A. L. Albiston, A. M. Allen, F. A. Mendelsohn, S. E. Ping, G. L. Barrett, M. Murphy, M. J. Morris, S. G. McDowall and S. Y. Chai, *Neuroscience*, 2004, **124**, 341–349.
- (17) R. Froidevaux, B. Lignot, N. Nedjar-Arroume, D. Guillochon, B. Coddeville and G. Ricart, *J. Chrom. A*, 2000, **873**, 185–194.
- (18) R. Froidevaux, D. Vercaigne-Marko, R. Kapel, D. Lecouturier, S. Chung, P. Dhulster and D. Guillochon, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2006, **81**, 1433–1440.
- (19) R. Froidevaux, M. Vanhoute, D. Lecouturier, P. Dhulster and D. Guillochon, *Process Biochem.*, 2008, **43**, 431–437.

- (20) M. Vanhoute, R. Froidevaux, A. Vanvlassenbroeck, D. Lecouturier, P. Dhulster and D. Guillochon, *J. Chrom. B*, 2009, **877**, 1683–1688.
- (21) S. G. Newman and K. F. Jensen, *Green Chem.*, 2013, **15**, 1456–1472.
- (22) S. Lomel, L. Falk, J. M. Commenge, J. L. Houzelot and K. Ramdani, *Chem. Eng. Res. Des.*, 2006, **84**, 363–369.
- (23) S. J. Haswell and P. Watts, *Green Chem.*, 2003, **5**, 240–249.
- (24) K. K. R. Tetala, J. W. Swarts, B. Chen, A. E. M. Janssen and T. A. van Beek, *Lab Chip*, 2009, **9**, 2085–2092.
- (25) X. Mu, Q. Liang, P. Hu, K. Ren, Y. Wang and G. Luo, *Microfluid. Nanofluid.*, 2010, **9**, 365–373.
- (26) K. Jähnisch, V. Hessel, H. Löwe and M. Baerns, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 406–446.
- (27) A. Aota, K. Mawatari and T. Kitamori, *Lab Chip*, 2009, **9**, 2470–2476.
- (28) Y. Lu, Y. Xia and G. Luo, *Microfluid. Nanofluid.*, 2001, **10**, 1079–1086.
- (29) J. G. Kralj, H. R. Sahoo and K. F. Jensen, *Lab Chip*, 2007, **7**, 256–263.
- (30) A. Elagli, S. Laurette, A. Treizebre, B. Bocquet and R. Froidevaux, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 3873–3882.
- (31) J. Jovanović, E. V. Rebrov, T. A. Nijhuis, M. T. Kreutzer, V. Hessel and J. C. Schouten, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2012, **51**, 1015–1026.
- (32) Y. Zhao, G. Chen and Q. Yuan, *AIChE J.*, 2006, **52**, 4052–4060.
- (33) J. F. Ontiveros, R. Froidevaux, P. Dhulster, J.-L. Salager and C. Pierlot, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 2014, **454**, 135–143.

Synthèse

A la lecture des informations tirées de l'étude de la protéolyse enzymatique en microréacteur (section 3.1.2.), nous avons cherché à tirer bénéfice de la sélectivité cinétique intéressante envers le peptide opioïde LVV-h7. Offerte par l'outil microfluidique, l'opportunité de couplage de l'opération catalytique à l'opération de séparation était très attrayante. Elle proposait de travailler en flux continu tout en permettant une opération d'extraction liquide-liquide mais également de « dés extraction » liquide-liquide.

En comparaison avec des procédés similaires réalisés à une échelle conventionnelle, des bénéfices notables peuvent être tirés de cette expérience. L'efficacité du couplage et la rapidité (en termes de cinétique) de l'opération d'extraction liquide-liquide du peptide LVV-h7 peuvent être soulignées. Mentionnons ensuite que la spécificité de l'écoulement laminaire a autorisé les opérations d'extractions consécutives et par cette occasion une contraction des micro-opérations nécessaires à l'obtention du produit final. Enfin, il convient d'appuyer sur la réduction importante du volume de solvant lorsque l'on considère le *ratio feed/* solvant, c'est-à-dire le *ratio* des quantités de matière (n) défini par $n_{\text{hémoglobine}}/n_{\text{octan-1-ol}}$. L'opportunité de « décharger » le solvant du peptide en continu a en effet permis son recyclage.

La preuve de concept apportée souligne quelques-uns des bénéfices que peut procurer l'utilisation de la microfluidique comme outil accompagnant la séparation d'un produit, voire l'ensemble de sa préparation. Le potentiel de cet outil dans le champ de l'intensification des procédés ne demande finalement qu'à être exploité. En adoptant une démarche responsable, la prise en compte des technologies de ce type nécessite néanmoins des objectifs clairs et ambitieux, comme la préparation/ purification de molécules/ substances à haute valeur ajoutée (plutôt qu'un enrichissement pour lequel le coût de mise en œuvre ne serait probablement pas rentable face à des installations conventionnelles déjà en place).

Références

[1] Woodley J. M., Breuer M., Mink D., "A future perspective on the role of industrial biotechnology for chemicals production", *Chem. Eng. Res. Des.*, **91**, 2013, 2029–2036.

[2] Agyei D., Danquah M. K., "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides", *Biotechnol. Adv.*, **29**, 2011, 272–277.

- [3] Blishchenko E. Y., Sazonova O. V., Kalinina O. A., Yatskin O. N., Philippova M. M., Surovoy A. Y., Karelin A. A., Ivanov V. T., “Family of hemorphins: co-relations between amino acid sequences and effects in cell cultures”, *Peptides*, **23**, 2002, 903–910.
- [4] John H., John S., Forssmann W. G., “Kinetic studies on aminopeptidase M-mediated degradation of human hemorphin LVV-h7 and its N-terminally truncated products”, *J. Pept. Sci.*, **14**, 2008, 797–803.
- [5] Lee J., Albiston A. L., Allen A. M., Mendelsohn F. A., Ping S. E., Barrett G. L., Murphy M., Morris M. J., McDowall S. G., Chai S. Y., “Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats”, *Neuroscience*, **124**, 2004, 341–349.
- [6] Gomes I., Dale C. S., Casten K., Geigner M. A., Gozzo F. C., Ferro E. S., Heimann A. S., Devi L. A., “Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules”, *AAPS J.*, **12**, 2010, 658–668.
- [7] Froidevaux F., Lignot B., Nedjar-Arroume N., Guillochon D., Coddeville B., Ricart G., “Kinetics of appearance of hemorphins from bovine hemoglobin peptic hydrolysates by a direct coupling of reversed-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry”, *J. Chrom. A*, **873**, 2000, 185–194.
- [8] Froidevaux R., Vercaigne-Marko D., Kapel R., Lecouturier D., Chung S., Dhulster P., Guillochon D., “Study of a continuous reactor for selective solvent extraction of hemorphins in the course of peptic hemoglobin hydrolysis”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 2006, 1433–1440.
- [9] Froidevaux R., Vanhoute M., Lecouturier D., Dhulster P., Guillochon D., “Continuous preparation of two opioid peptides and recycling of organic solvent using liquid-liquid extraction coupled with aluminum oxide column during hemoglobin hydrolysis by immobilized pepsin”, *Process Biochem.*, **43**, 2008, 431–437.
- [10] Vanhoute M., Froidevaux R., Vanvlassenbroeck A., Lecouturier D., Dhulster P., Guillochon D., “Ion-pairing separation of bioactive peptides using an aqueous/ octan-1-ol micro-extraction system from bovine hemoglobin complex hydrolysates”, *J. Chrom. B*, **877**, 2009, 1683–1688.

3.3. La technologie des plasmas froids pour la conception de systèmes à enzymes immobilisés

Cette ultime section de résultats décrit le développement d'une méthodologie innovante d'immobilisation d'enzyme en réponse à un double objectif. D'une part, la mise au point d'un protocole fiable, reproductible, rapide et s'intégrant aisément dans les procédés de microfabrication les plus courants était visée. La biocompatibilité du procédé plasma et la nature du polymère organosilicié de ppTMDSO devait ainsi répondre aux perspectives de développement conjoint (i) d'un microréacteur à enzyme immobilisé ainsi que (ii) de la couche sensible d'un système intégré d'analyse sub-térahertz. D'autre part, en raison des propriétés de micro-structuration douce du matériau employé, l'extension du concept d'immobilisation à la conception complète de microréacteurs de type IMERs ouvrait la voie à une microfabrication « bio-intégrante ».

3.3.1. Elaboration d'une méthodologie d'immobilisation d'enzyme par piégeage stérique par un film polymère de ppTMDSO obtenu par polymérisation assistée par plasma

Introduction

Il existe dans la littérature une panoplie de méthodologies d'immobilisation enzymatique de nature variée [1-4]. L'élaboration d'un système à enzyme immobilisé requiert parfois une stratégie d'immobilisation particulière afin de rendre compte d'une performance optimale. Dans d'autres cas, des critères de rapidité, de simplicité de réalisation ou encore de coût sont à satisfaire.

Dans la perspective d'élaboration d'un microréacteur ou d'un biocapteur, diverses contraintes peuvent se poser. En effet, la stratégie d'immobilisation adoptée dépend en général fortement des matériaux mis en œuvre et des procédés de microfabrication. L'ingénierie de surface à l'échelle de tels dispositifs micrométriques requiert l'utilisation d'outils performants et adaptés à la conception d'interfaces robustes. Aussi, certaines applications indiquent qu'il est indispensable de développer des protocoles adaptés aux évolutions technologiques constantes dans ce segment. Dans ce contexte, l'élaboration d'une méthodologie d'immobilisation non conventionnelle a été entreprise. Celle-ci visait à mettre en œuvre un procédé plasma froid afin de concevoir des films polymères piégeant/ incluant l'enzyme. L'objectif était double : (i)

bénéficier d'un protocole fiable, rapide, simple et s'intégrant aisément dans un protocole de microfabrication et (ii) tirer profit des propriétés de microstructuration du polymère afin d'étendre le concept d'immobilisation à celui de microfabrication complète d'un microréacteur de type IMER (*IMmobilized Enzyme Reactor*). Le premier point devait permettre la conception « propre » et rapide d'une interface robuste pouvant être mise à profit comme paroi réactive d'un microréacteur ou couche sensible d'un biocapteur. En adoptant une technique douce, le second point visait à concevoir un réacteur microfluidique à enzymes immobilisés exclusivement *via* l'utilisation du ppTMDSO comme matériau.

Elaboration du protocole expérimental, validation et étude cinétique

Un protocole a été mis au point et validé par une étude cinétique qualifiant l'activité de la β -galactosidase immobilisée vis-à-vis du substrat synthétique *o*-NPG (*ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside). Il est présenté sous la forme d'un article scientifique, soumis et accepté pour publication dans un journal à comité de lecture international, avec comme titre « *Immobilisation enzymatique facile par piégeage par un film mince organosilicié déposé par plasma* » :

Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film

Adil Elagli, Kalim Belhacene, Céline Vivien, Pascal Dhulster, Renato Froidevaux, Philippe Supiot

J. Mol. Catal. B Enzym., **110**, 2014, 77–86



Facile immobilization of enzyme by entrapment using a plasma-deposited organosilicon thin film



Adil Elagli^{a,b,1}, Kalim Belhacene^{a,b,1}, Céline Vivien^a, Pascal Dhulster^b, Renato Froidevaux^b, Philippe Supiot^{a,*}

^a Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) – UMR CNRS 8520, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

^b Institut Charles Viollette (ProBioGEM team) – EA 1026, Université Lille Nord de France – Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2014

Received in revised form

22 September 2014

Accepted 23 September 2014

Available online 30 September 2014

Keywords:

β-Galactosidase

Entrapment

TMDSO

Plasma polymer

Diffusion

ABSTRACT

Over the years, immobilization of biologically active species such as enzymes onto solid support gave rise to a wide range of analytical and industrial applications. The development of fast, simple and efficient immobilization strategies is becoming of great importance in specific Biological Micro-Electromechanical Systems (BioMEMS) manufacturing. Thus, the current work focuses on an original methodology and mild procedure for β-galactosidase immobilization. Using as support either silicon or a thin film obtained from polymerization of 1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (ppTMDSO) deposited by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition in afterglow mode, the strategy developed here consisted in adsorption of β-galactosidase followed by its overcoating by the same siloxane plasma polymer. After sample washing, the enzymes were characterized to be efficiently entrapped within the porous polymer matrix while allowing the penetration and hydrolysis of the synthetic substrate *ortho*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (*o*-NPG) with stability over at least 8 assays. The entrapment procedure allowed obtaining bio-fonctionnal coatings where β-galactosidase was expected to be included in the plasma-polymerized films while preserving its native structure and its activity. This latter was modulated by mass transfer limitations of the substrate according to the thickness of the ppTMDSO coatings. The dry-process-based-preparation of such a thin bio-functional film (from ~200 nm to ~650 nm) is fast and compatible with biochip or microreactor fabrication processes while avoiding the use of lot of chemicals and multi-step treatments commonly encountered in enzyme immobilization procedures.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the years, immobilization of enzyme molecules onto solid supports gave rise to a wide range of analytical or industrial applications. Because of the huge potential of proteins in various fields such as protein microarrays, biosensors, microreactors and drug discovery, approaches to immobilize enzymes are widely investigated [1]. This is due to their unique properties in terms of specificity, mild reaction conditions and stereoselectivity, which provide numerous applications ranging from high volume catalysis down to

ultra-sensitive biosensors [2,3]. Enzyme immobilization can provide greater thermal and operational stability than their soluble forms. It also allows enzymes to be held in place throughout the reaction, following which they are easily separated from the products, making it easy to recycle the biocatalyst and consequently providing cost-reduced protocols. Furthermore, for proteomic investigations, enzyme grafting reduces also the auto-digestion of proteolytic enzymes. As a consequence and following the dynamic evolution of micro- and nanobiotechnologies, the development of various types of enzyme interactions with material surfaces leads to a growing interest in understanding and controlling the immobilization strategies [4–7].

The immobilization of proteins on surfaces can be accomplished by both physical and chemical methods. Different approaches are commonly encountered such as bio-affinity binding, covalent binding, carrier-free cross-linking, physical adsorption, and entrapment [8]. Both bio-affinity interaction and physical adsorption involve usually a reversible interaction under specific conditions

* Corresponding author at: Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie, Avenue Poincaré, BP 60069, Université Lille 1 – Cité Scientifique, 59652 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Tel.: +33 320 43 6581; fax: +33 320 43 41 58.

E-mail address: philippe.supiot@univ-lille1.fr (P. Supiot).

¹ These authors contributed equally to this work.

and may lead therefore to reversible immobilization. Attachment of enzymes by a chemical procedure involves the formation of strong covalent or coordination bonds between the protein and the immobilization support. The chemical attachment involves more drastic conditions for the immobilization reaction than a physical attachment or entrapment. This can lead to a significant loss in enzyme activity. In addition, covalent and coordinate bonds formed between the protein and the support can lead to a change in the structural configuration of the immobilized protein [5]. Such a change in the enzymatic structure may lead to reduced activity, unavailability of the active site of an enzyme for the substrates or a shift in optimum pH, which can be resumed by a reduced binding ability [5]. Functional groups, such as amines, carboxylates, thiols, or hydroxyls, in the side chain of exposed amino acids in the protein are used in the formation of irreversible linkages with surfaces [9]. Because multiple copies of the same functional group usually exist on protein surface, covalent immobilization is usually not selective [10]. When the protein contains just one copy of the reactive functional group, oriented immobilization can be achieved, which is usually realized through selective chemical reactions or by protein engineering [11]. In other words, covalent immobilization requires a good control over the orientation.

Unfortunately, protein engineering and enzyme immobilization still remain costly, sometimes long and tricky. Oriented immobilization methods that maintain the native structure or proper orientation of the enzyme are desirable in order to allow further optimal binding to their substrates. Moreover, new “green” and fast methodologies are welcome to overcome the huge use of reagents and solvents but also multi-step chemical treatments which are trickier to integrate in a microfabrication process, one of the motivations for this work.

Physical methods of immobilization are generally milder since they include the attachment of protein to surfaces by various interactions such as electrostatic, hydrophobic/hydrophilic and van der Waals forces [5]. The major advantage in this methodology is that it avoids multi-step chemical treatments commonly encountered in chemical procedure, and can be therefore an interesting approach in micro/nanobiofunctional layer conception for Biological Micro Electro Mechanical Systems (BioMEMS) manufacturing. In this context, entrapment in polymeric materials has also been the subject of notable efforts [12]. Following the fast evolution of microfluidics and nanotechnology, the elaboration of efficient enzyme immobilization processes is becoming of great interest for the development of new and original analytical tools or microreactors [7,13–15]. The immobilization of biologically active species constitutes therefore a crucial step in the fabrication of BioMEMS for which the potential application fields may concern biological, biochemical and medical analysis, environmental investigations or clinical diagnosis.

The efficiency of immobilized enzyme depends strongly on both the attachment strategy and the material used as a carrier matrix. Over the last few years, plasma polymerized materials have been successfully used as supports for immobilization of biologically active species with covalent linkages [16–20], by adsorption [21], or by entrapment [22]. The increasing use of plasma polymers is mainly due to their biocompatibility and easy chemical activation. Additional advantages rise from their high thermal stability, good mechanical properties, and resistance against organic solvents [23].

Polymerization induced by Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (PECVD) is a powerful way to deposit materials of various kinds on the basis of a common precursor [24]. When used in interaction with biological material, the major advantage of this process is that it can be realized at moderate temperature, dry state, and mild conditions, especially in afterglow mode conditions. Organosilicon thin films deposited by Chemical Vapor Deposition have been the subject of considerable efforts in the last years in a wide set of applications including

enzyme immobilization [25]. Recently, cold plasma polymerization of 1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (TMDSO) by Remote Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (RPECVD) has shown its potentiality in BioMEMS conception and has been successfully used for the simple fabrication of microchannels [26,27]. In the context of BioMEMS manufacturing, we present a fast, innovative, and bio-compatible method for the rapid conception of bioactive coatings using plasma polymerized 1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (ppTMDSO) as carrier matrix. Here, the fabrication of a bio-functional micro/nanolayer is realized either by addition of enzymes to the coating precursor in an afterglow reactor (one step immobilization) or by combining enzyme adsorption with an overcoating by a controlled thickness of ppTMDSO (two-step immobilization). Because of the highly branched and cross-linked polymer network structure of plasma polymerized films [28], the enzymes are expected to be entrapped in the growing polymer network (one-step procedure) or are overcoated by the polymer layer (two-step procedure). Herein, the study focuses mainly on the two-step procedure consisting in the coating of adsorbed enzymes by a porous polymer deposition using plasma technology. Since adsorption could be a reversible mechanism, the polymer deposit could protect the enzyme from leaching and retain them while allowing access to the substrate molecules. Using β -galactosidase as enzyme, we aim to develop a facile immobilization procedure in order to fabricate a bio-functional layer where the enzymes are expected to be included into the polymer matrix while preserving their native structure and their activity. RPECVD technology was used for plasma assisted polymer deposition. In addition, we investigate this methodology in continuous-flow dynamic mode in a top-down approach for further potential integration of this process in a BioMEMS microfabrication protocol. The main reactions investigated were the hydrolysis of two synthetic substrates, *ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*o*-NPG) and resorufin- β -D-galactopyranoside (RBG), by β -galactosidase.

2. Materials and methods

2.1. Materials

β -Galactosidase (β -D-galactoside galactohydrolase, E.C. 3.2.1.23, 10.4 U/mg, MW: 105 kDa) from *Aspergillus oryzae* was purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. Two synthetic β -galactosidase substrates purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. were employed: *ortho*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (*o*-NPG, $C_{12}H_{15}NO_6$, MW: 301.3 g/mol) was prepared in 0.02 M acetate buffer for UV/vis measurements and sensitive fluorogenic resorufin- β -D-galactopyranoside was employed in 0.1 M phosphate buffer (RBG, $C_{18}H_{17}NO_8$, MW: 375.3 g/mol) for spectrofluorimetric measurements. 1,1,3,3-Tetramethyldisiloxane solution (TMDSO, MW: 124.33 g/mol, grade 97%) purchased from ABCR & Co. (Germany) was used as precursor (monomer solution) for plasma assisted polymerization. Enzymes solutions were prepared (i) directly in the monomer with 10% absolute ethanol, used as co-solvent, (ii) in 0.02 M acetate buffer (pH 4.5), or (iii) in absolute ethanol only. In order to inactivate the enzymes in experiments where the feasibility of the process was tested, 1 M Na_2CO_3 solution was prepared to inactivate β -galactosidase. All aqueous solutions were prepared in Milli-Q pure deionized water (Millipore) with a resistivity of 18.2 m Ω cm. Immobilization experiments were carried out on single side polished silicon wafers ((100) oriented, p-doped, resistivity <1 Ω cm), obtained from Siltronix (France). Silicon wafers were firstly cut with dimensions of about 1 cm $\times$ 1 cm and degreased by ultrasonication in acetone and ethanol for 5 min each, then dried under nitrogen stream.

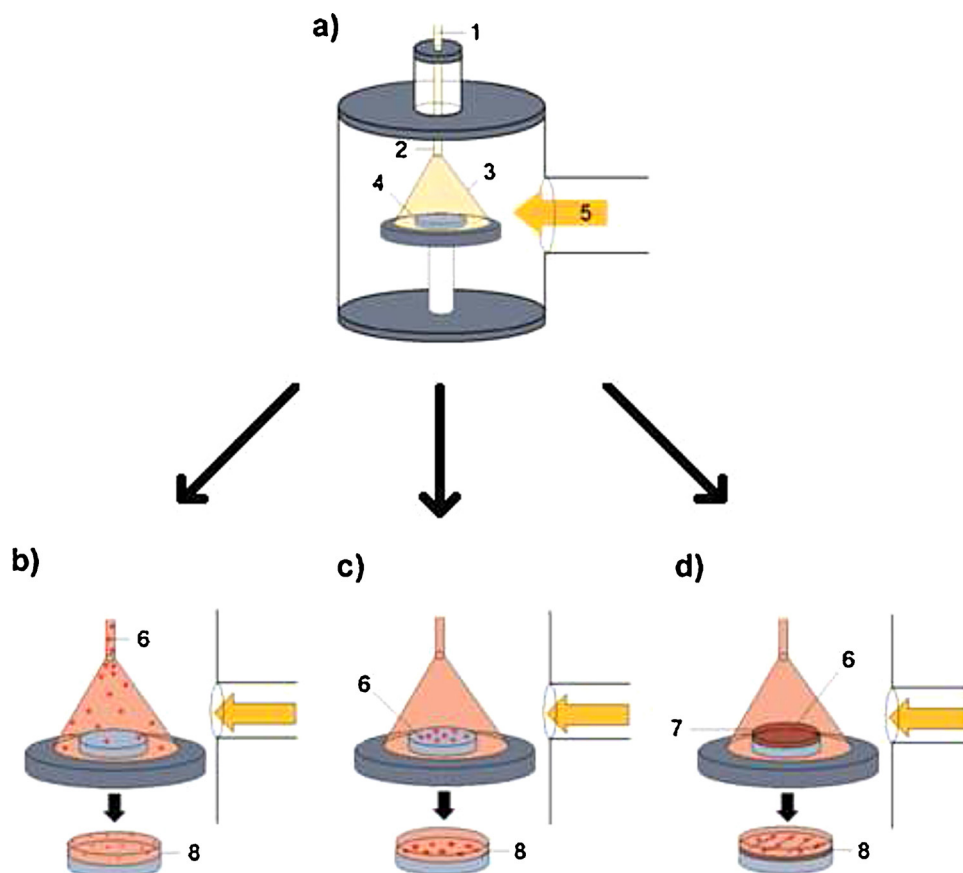


Fig. 1. Schemes of (a) the RPECVD setup used to generate ppTMDSO polymer and of the related processes, (b) vaporization of TMDSO monomer solution containing the enzyme, (c) enzyme adsorbed on the silicon substrate and coated by a ppTMDSO film, (d) enzyme adsorbed on a pre-deposited ppTMDSO film subsequently coated by a second ppTMDSO film. The enzymes were prepared directly in the precursor monomer (procedure (i)), in 0.02 M acetate buffer (procedure (ii)) or in absolute ethanol (procedure (iii)). The procedure (i) was applied in (b) whereas procedures (ii) and (iii) were both applied in (c) and in (d) leading to five different samples. (1) Precursor vapor feeding, (2) injector, (3) plasma assisted polymerization area, (4) substrate, (5) N_2 -plasma remote afterglow (N atom active flux, mainly), (6) β -galactosidase, (7) pre-deposited ppTMDSO thin film, (8) resulting sample

2.2. Experimental setup and polymer deposition method

Organosilicon films were prepared by “cold” Remote Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition (RPECVD) in afterglow of a nitrogen (N_2) plasma (flow rate of 1.8 standard liter per minute) (Fig. 1a) whose typical operation conditions was previously described [29]. The liquid precursor (TMDSO monomer) was pumped from the reservoir by a peristaltic pump at 0.25 mL min^{-1} and injected by a 1 mm diameter aluminum tubular injector placed at 2.5 cm from a silicon substrate. Note that no nitrogen or oxygen was used as carrier gas. The monomer contains the Si–O–Si bridge required to obtain a polysiloxane-like structure. The RF glow-discharge (helical coupling device [30], 13.56 MHz, 300 W) in N_2 generates N active atoms flowing to the late afterglow where the deposition takes place under a total pressure of 5.2 mbar, measured by a capacitive gauge (Pfeiffer). Decomposition of the monomer in the reaction cone leads to its partial polymerization. Deposition times of the resulting films were 5, 10, 15, and 20 min for SEM thickness analysis and varied from 1 to 30 min for various enzyme catalytic assays.

2.3. Experimental procedures for enzyme immobilization and sample washing

β -Galactosidase was prepared using 3 different strategies in order to compare its activity as function of different coating methodologies (Fig. 1). Thus, the enzyme was either (i) directly

solubilized in TMDSO monomer solution with 10% ethanol as co-solvent before polymerization (β -Gal-ppTMDSO, Fig. 1b), (ii) solubilized in 0.02 M acetate buffer and adsorbed either on silicon (Si- β -Gal_B-ppTMDSO, Fig. 1c) or on a $\sim 200 \text{ nm}$ pre-deposited ppTMDSO thin film (Si-ppTMDSO- β -Gal_B-ppTMDSO, Fig. 1d) before its overcoating by another ppTMDSO film, or (iii) adsorbed either on silicon (Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMDSO, Fig. 1c) or on a $\sim 200 \text{ nm}$ pre-deposited ppTMDSO thin film (Si-ppTMDSO- β -Gal_{EtoH}-ppTMDSO, Fig. 1d) from an absolute ethanol-enzyme mixture before its overcoating by the polymer. Adsorption was carried out by $10 \times 2 \mu\text{L}$ deposits with micropipette or syringe of the solubilized enzyme (in acetate buffer) or the ethanol-enzyme mixture prepared at 3 mg mL^{-1} final concentration. To control the adsorbed enzyme quantity in (iii) (ethanol is rapidly evaporated), different weightings (Sartorius ISO 9001 microbalance) were realized for each experiment. An amount of about $60.0 \pm 5.0 \mu\text{g}$ of β -galactosidase was deposited on the support for each experiment. Then, the samples were directly exposed to the afterglow flux without any washing. After immobilization, all the samples containing β -galactosidase were finally washed with $3 \times 3 \text{ mL}$ of 0.02 M acetate buffer, as well as between each activity assay. The amount of non-immobilized β -galactosidase was detected due to fluorescence emission of aromatic compounds of so-called aromatic amino acids (mostly tryptophan and tyrosine) and measured by Perkin-Elmer Luminescence spectrophotometer LS 50B. Excitation was fixed at 280 nm and emission was recorded at 340 nm.

2.4. Enzymatic activity assays

β -Galactosidase activity was investigated with two different synthetic substrates. Since ONP is a colored product easy to analyze, the hydrolysis of *o*-NPG in galactose and ONP was firstly investigated. The coloration is detectable at basic pH in presence of Na_2CO_3 . Batch reactions were mainly carried out in presence of excess of substrate (10 mM) in 10 mL total volume. For each measure, 1 mL sample was mixed with 0.5 mL Na_2CO_3 1 M and absorbance was read at 415 nm (UV/visible spectrophotometer, Ultraspec-1100 pro, Amersham Biosciences). For immobilized and “free state” enzyme kinetic parameters determination, *o*-NPG concentrations varied from 0.5 to 10 mM.

In a second part, the RBG sensitive fluorogenic substrate was used in order to study the enzyme behavior on shorter time kinetics with higher sensitivity. The activity was monitored by measuring the amount of product formed using a continuous spectrofluorimetric assay. Measurements of the fluorescence emission were performed by Perkin-Elmer Luminescence spectrophotometer LS 50B. Excitation and emission were fixed at 571 nm and 590 nm respectively. The immobilized support (1 cm²) was directly installed without hindering the excitation laser beam in a 1 cm quartz cuvette which was filled up with 3 mL of 26.65 μM RGB solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). The emission intensity increase at 590 nm was continuously recorded for a period of 3600 s at 22 °C. All samples were assayed similarly.

Finally, a handmade continuous-flow reactor was implemented by setup of an immobilized β -galactosidase support (1.5 cm²), prepared using the procedure (iii), within a $\sim$ 0.5 cm inner diameter tube. A continuous flow-rate containing 10 mM of *o*-NPG was applied in the channel containing the support. 36 samples of 1 mL were collected in eppendorf tubes containing 0.5 mL Na_2CO_3 1 M for flow-rates varying from 0.145 to 2 mL min⁻¹. Absorbance was read at 415 nm (UV/visible spectrophotometer, Ultraspec 1100 pro, Amersham Biosciences).

2.5. Material characterization techniques

The chemical bonding states of as-deposited ppTMDSO films were investigated by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy using a Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer. The deposits were analyzed under specular reflection mode with an angle of 45° in the spectral range 4000–400 cm⁻¹. The spectra were collected and processed with the manufacturer-supplied software.

Water contact angles were measured using a GBX Digidrop. The analyses were performed by deposition of deionized water droplets on single side polished silicon wafers and on $\sim$ 500 nm thick as-deposited ppTMDSO thin films.

A Zeiss Gemini Ultra 55 FEG type instrument was used to perform scanning electron microscopy (SEM) measurements for evaluating the thicknesses of the deposits after samples transversal cleaving. Structural aspects of the samples were also evaluated before and after enzyme catalytic assays.

A multimode/Nanoscope IIIA (Digital Instruments) was used to probe the surface topography, and evaluate both protein adsorption and polymer coatings. 3D topography allowed also appreciating the structural aspect of the samples. The images were acquired in tapping mode, in air at room temperature, using a commercially available Si_3N_4 tip with a 10 nm radius curvature. For each sample, AFM scans (50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ and 500 nm $\times$ 500 nm) were performed in various surface positions to check the surface uniformity. Data analysis was carried out using the freely available WSxM software [31]. It allowed calculating both the average root-mean-square (RMS) roughness, corresponding to the standard deviation of the heights (Z values in nm) in a three-dimensional

AFM map, and the peak-to-valley distance (P–V), corresponding to the mean roughness depth or Z maximal value.

3. Results

3.1. FTIR analysis and SEM-assisted thicknesses determination of ppTMDSO coatings

FTIR spectroscopy was used to study the chemical composition of as-deposited ppTMDSO films (Fig. 2). The spectrum features indicates that the monomer (Fig. 2b) underwent partial decomposition during plasma-assisted polymerization [24]. The resulting plasma-polymer is formed by the fragmentation, recombination, reorganization and cross-linking of the excited and broken monomer units following a complex mechanism [30,32]. Typical band assignments of ppTMDSO films FTIR spectra can be found in literature [33]. Vibrational absorption bands in the range 1100–1000 cm⁻¹ reveal the Si–O–Si stretching mode. Bands at 1150–930 cm⁻¹ confirm nitrogen fixation in the film. Si–C stretching modes are mainly located around 880–600 cm⁻¹. Multiple absorption peaks around 3000 cm⁻¹ can be assigned to the stretching modes of methyl (C–H groups). Deformation modes of CH_3 are revealed at 1400–1300 cm⁻¹. Some small contributions from N–H around 3600–3400 cm⁻¹, correlatively with N inclusion, and from Si–H and C $\equiv$ N stretching modes at 2250 cm⁻¹ are also detected. These characteristics are consistent with the features of film grown from polymerization in RPECVD in our setups under O_2 poor reactive media. FTIR spectra of as-deposited ppTMDSO films and ppTMDSO films overcoating β -galactosidase, which were deposited according to the procedure (iii), were similar and no specific signal was detected from the entrapped enzyme. These two statements suggest that the enzyme does not significantly affect the chemical composition of the deposited polymer. Additionally, it is worth noting that after more of 72 h of immersion either in water or in acetate buffer 0.02 M pH 4.5, the as-deposited ppTMDSO film revealed no degradation. This suggests a good chemical stability of the film.

Investigation on 500 nm thick deposits revealed $83 \pm 2^\circ$ water contact angle (Fig. 2a), suggesting a moderate hydrophobicity of the polymer film, but considered as sufficiently hydrophobic for biological applications such as biomolecular adsorption [34]. Determination of thin films thicknesses were carried out by SEM after transversal cleaving of the samples. Deposition times of 10, 20 and 30 min correspond respectively to the average thicknesses (on the whole support area) of 204 ± 20 nm, 502 ± 27 nm, and 658 ± 35 nm. The growth-rate varies from 0.34 to 0.42 nm s⁻¹ for deposition times larger than 10 min. These values correspond to O_2 -free RPECVD conditions to limit the possible oxidative effects

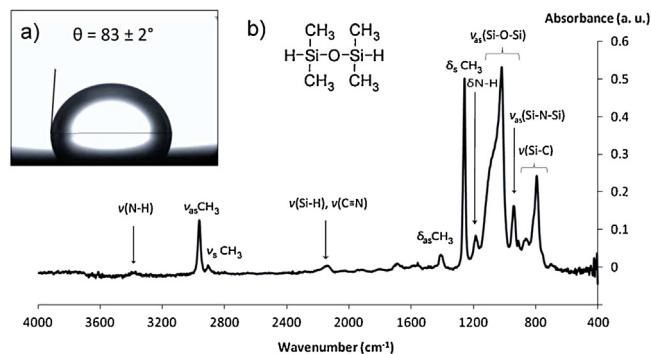


Fig. 2. FTIR spectra of 500 nm thick as-deposited ppTMDSO film and, as insets, (a) water droplet on 500 nm thick ppTMDSO for contact angle measurement ($\theta = 83 \pm 2^\circ$) and (b) semi-developed formula of the TMDSO monomer.

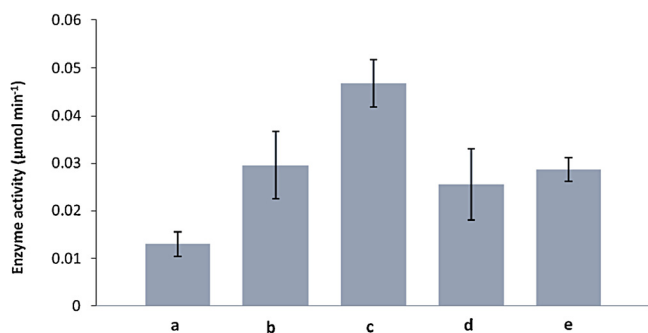


Fig. 3. Immobilized β -galactosidase activity level after 1 h for (a) enzyme and monomer solution after plasma-assisted polymerization (β -Gal-ppTMDSO), (b) polymer-coated enzyme after adsorption from acetate buffer on silicon ($\text{Si-}\beta$ -Gal_B-ppTMDSO), (c) polymer-coated enzyme after adsorption from absolute ethanol on silicon ($\text{Si-}\beta$ -Gal_{EtoH}-ppTMDSO) (d) polymer-coated enzyme after adsorption on a 200 nm thick ppTMDSO from acetate buffer ($\text{Si-ppTMDSO-}\beta$ -Gal_B-ppTMDSO) and (e) polymer-coated enzyme after adsorption on a 200 nm thick ppTMDSO layer from absolute ethanol ($\text{Si-ppTMDSO-}\beta$ -Gal_{EtoH}-ppTMDSO). For each preparation, β -galactosidase is overcoated by a $\sim$ 200 nm thick ppTMDSO film.

of oxygen containing radicals and moderate N atom flux to preserve the monomer and the enzyme skeletons as much as possible. These growth-rates are about 30–40 times smaller than those typically obtained in presence of O_2 as carrier gas and with a 2450 MHz microwave plasma with the same power (about $14\text{--}16\text{ nm s}^{-1}$ [24]). The absence of oxygen leads to the decrease of the deposition rate [29] while the 13.56 MHz plasma excitation frequency is known to lead to weaker N atom concentrations than under 2450 MHz [35]. These two factors are sufficient to explain the low film growth rate.

3.2. Comparison of β -galactosidase activity levels between one- and two-step immobilization procedures

3.2.1. One-step entrapment

In the procedure (i) where enzyme and liquid monomer are associated, the enzyme and polymer are simultaneously deposited during 10 min to obtain a ppTMDSO film of approximately 200 nm. Monomer fragmentation and recombination form a layer where enzyme molecules are supposed to be physically incorporated within the growing polymer network. The major inconvenience of this process is that it requires high enzyme concentration because most of the enzyme molecules are wasted, either in the reactor or by the bad solubility in the strong a polar precursor solution, even with the use of ethanol as a co-solvent. Moreover, the quantity of entrapped enzymes is not controlled and the activity level after 10 min deposition is lower than in the procedures (ii) and (iii) (Fig. 3a). However, simultaneous addition of enzyme by atomization and coating precursor could be a good technical solution but only if the polymer presents a chemical compatibility with the solvent of enzyme [21].

3.2.2. Two-step entrapment

The previously described processes, (ii) and (iii), are used. The β -galactosidase is adsorbed and then overcoated by a $\sim$ 200 nm ppTMDSO film (procedures (ii) and (iii)), which results in a “sandwich” where the enzyme is physically included. This simple two-step immobilization method does not involve any chemical reaction between the activated monomer and the enzyme that could affect its activity, except if strong bonds between the enzyme and the plasma-polymerized film such as covalent bindings are formed [36]. Enzyme quantities are more precisely controlled than in the first procedure where β -galactosidase and liquid monomer were associated. The differences in activity levels (Fig. 3b–e)

between the procedures can be explained by the crucial role of both enzyme solvent and adsorption support.

3.2.2.1. Role of the enzyme solvent. Adsorption of β -galactosidase is firstly achieved from acetate buffer (procedure (ii)) and secondly, in parallel, from absolute ethanol (procedure (iii)). Indeed, the main goal remains to keep a clean carrier surface after β -galactosidase adsorption, taking into account that the drying efficiency is specific for a solvent. Acetate buffer evaporation at moderate temperature for long time (in order to avoid enzyme denaturation) promotes the appearance of large “coffee-ring” enzyme depositions which creates strong leveling inducing a brittle adherence of the polymer. Since covalent attachment of the growing ppTMDSO on clean silicon is stronger than attachment on adsorbed enzymes, the spot of β -galactosidase must not be too large to maintain the ppTMDSO adherence on the support. In addition, the enzyme deposition retains certainly more water traces than simple hydration shells around enzymes, which reinforce the brittle character of the polymer film overcoating the β -galactosidase. Indeed, adhesion of ppTMDSO on moistened surfaces is poor. Consequently, more enzyme molecules are lost during the first washing sequence and the activity level is lower than that using absolute ethanol as solvent for enzyme adsorption. The deposition of β -galactosidase from ethanol would hence be preferred even if it does not involve a real kinetic-dependent adsorption mechanism due to its fast vaporization. This volatile solvent allows to avoid the presence of moisture or water traces on the surface during the plasma polymerization. However, in this case, since enzyme solubility in ethanol is lower than in water, some intermolecular aggregates appear in solution. Nevertheless, residual activity of free β -galactosidase does not decrease after pre-solubilization or in presence of ethanol (result not shown) suggesting ethanol tolerance capacity of the β -galactosidase [37]. In addition, using a mixture enzyme-ethanol ($\text{Si-}\beta$ -Gal_{EtoH}-ppTMDSO, procedure (iii)) seems to be the best methodology to maximize the immobilization performance and thus the activity level (Fig. 3c).

3.2.2.2. Role of the nature of the adsorption support. The adsorption capacity of β -galactosidase onto ppTMDSO and silicon as supports was investigated by both $\text{Si-ppTMDSO-}\beta$ -Gal_B-ppTMDSO (Fig. 3d) and $\text{Si-ppTMDSO-}\beta$ -Gal_{EtoH}-ppTMDSO (Fig. 3e) preparations. In these cases, enzyme activities were lower than for both $\text{Si-}\beta$ -Gal_B-ppTMDSO and $\text{Si-}\beta$ -Gal_{EtoH}-ppTMDSO respectively, especially when using ethanol as solvent. This can be due to the crucial role of the adsorption surface which allows or not a good adsorption capacity and the enzyme to be adsorbed in a good structural conformation. As revealed by Fig. 3, this effect has as much impact on the enzyme activity as the choice of the solvent. However, a moderate effect on enzyme activity when using acetate buffer as solvent is notable. In comparison with ethanol, this can be due to the greater enzyme leaching when using the buffer as solvent (see Section 3.2.2.1), which may act in favor of a low visible solvent-support combination effect. In fact, the solvent plays a crucial role in the adsorption mechanism. Due to the brittle adherence of the polymer favored by the water traces in the $\text{Si-ppTMDSO-}\beta$ -Gal_B-ppTMDSO preparation, the enzymes that are not well adsorbed and protected against desorption by the ppTMDSO thin film can logically be desorbed. The buffer can also play a protective role against enzyme aggregation and adsorption when the surface properties disadvantage the β -galactosidase in term of thermodynamics. It can thus prevent the enzyme adsorption by favoring hydrophilic interactions with water instead of hydrophobic interactions with the support surface. In the case of enzyme deposition from ethanol, and considering its fast evaporation, enzyme-enzyme and enzyme-support interactions are predominant and lead to a more impacting role of the nature of the support. Nevertheless, it should be

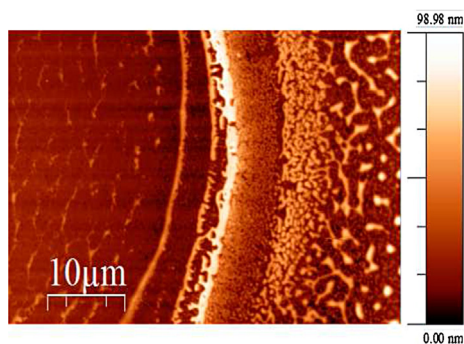


Fig. 4. AFM surface topography ($30\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$) of β -galactosidase adsorbed on silicon after drying of ethanol.

considered that the β -galactosidase re-solubilization in the washing buffer before the activity assays may involve a re-organization of some enzyme molecules within the polymer. Thus, the effective role of the chemical nature of the support is in fact the effect of the complex solvent-support combination. The ability of β -galactosidase to retain its activity on a surface results, apart from its intrinsic properties, from a complex balance between the forces involved in its repartition such as van der Waals forces and electrostatic, acido-basic and steric effects.

The effect of the nature of the support is clearer when using ethanol as solvent. Depending on its isoelectric point (pI), an enzyme can be adsorbed easily or not, according to the overall electrical charge of the surface [4,38]. Negatively charged protein (*A. oryzae* β -galactosidase pI ~ 4.6 [39]) is more easily adsorbed onto a positively charged surface by coulombic interactions. The ppTMSO thin film is more hydrophobic than silicon, as revealed by contact angle determination and FTIR measurements characterized by the presence of methyl functions. Enzyme activity of Si-ppTMSO- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO preparation was not higher than the Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO preparation (Fig. 4), probably due to the enzyme repartition on the hydrophobic ppTMSO film. When amino acids containing hydrophobic side groups are exposed at the surface of the enzyme, hydrophobic interactions can cause a dehydration of the protein surface and a shift in its structure so that the molecules rearrange each other or on the material surface to minimize the free energy [40–42], which can cause a loss in enzymatic activity [43]. This hydrophobic association can also lead to an unfolding of the hydrophobic core toward the surface so that hydrophobic supports are considered to be not always suitable for immobilized enzymes applications except using lipases [4]. However, since enzymes are amphiphilic in nature, having both hydrophilic and hydrophobic amino acids capable of interactions at a solvent-material interface, retention of immobilized enzyme activity is not just a simple matter of rendering a material more hydrophilic [4,34]. Indeed, structural changes can occur due to the competitive hydrogen bonding between a hydrophilic surface, hydrophilic amino acid groups and water, resulting in a loss of enzyme conformation [4,44,45]. Thus, the β -galactosidase adsorption performances are as important as its ability to retain its activity. Nevertheless, using a single-step adsorption procedure directly on silicon (Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO) is the best methodology to retain enzyme activity (Fig. 3c) but also to avoid multi-step in the process.

3.3. AFM and SEM investigations of the immobilized β -galactosidase for Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO samples

In this section, the characterization of immobilized β -galactosidase samples were realized on the Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO structure after their preparation based on the procedure (iii). AFM

Table 1

RMS roughness and P–V maximal value of different samples calculated from $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ images by WSxM software.

Preparation	RMS roughness (nm)	P–V maximal value (nm)
Si- β -galactosidase	1.24	15.20
Si-ppTMSO	2.88	26.94
Si- β -galactosidase-ppTMSO	1.11	9.59

measurements were performed in order to determine the structural aspects, the surface topography, and the RMS roughness values related to the polymer as well as each step of the immobilization process. The images have the same Z-scale (26.5 nm) for direct comparison purpose. SEM analysis was carried out to visualize the uniformity of the deposits and to evaluate the efficiency of the adsorption procedure.

Due to the drying effect of ethanol, β -galactosidase (1022 amino acids) rearrangement on silicon reveals some aggregates logically derived from those formed in ethanol (Fig. 3, right side) but also small clusters with height around 10–15 nm, suggesting a deposition of larger protein assemblies (Fig. 4, left side and Fig. 5a). 3D images of coated enzymes suggest a uniformity of the peak-to-valley (P–V) distance throughout the polymer surface (Fig. 5c). The protein molecules seem to be arranged laterally on silicon when they are not deposited in aggregate form, which suggest a crucial role of protein–protein and protein–surface interactions. It exists probably a balance between coulombic interaction and aggregation forces among β -galactosidase molecules that creates a relative homogeneous film. The protein repartition on the surface strongly depends on the β -galactosidase solvent. Nevertheless, the RMS roughness measurements confirms that both silicon-enzyme and silicon-enzyme-polymer preparations do not change drastically the roughness (Table 1). In addition, P–V separation of both preparations is almost the same, suggesting a uniformity of enzyme deposition and overcoating. In contrast, the silicon-polymer preparation shows a RMS roughness higher value as well as the P–V separation value, which drastically increases (Fig. 5b). In fact, chains mobility is strongly influenced by the surface adherence in terms of exposed atoms or functions. Indeed, the polymer has greater affinity with silicon than with the enzymes surface. This favors local reorganizations of the polymer chains each other around enzymes at the early growth of the layer and results in a more homogeneous film. In contrast, in absence of enzyme, chains mobility is reduced because of the strong mutual affinity of the polymer chains. Thus, both RMS roughness and P–V separation values are larger because no reorganization of the film occurs.

SEM images of entrapped β -galactosidase are presented in Fig. 6. They suggest that the enzyme is well overcoated when deposited either in aggregate (Fig. 6a) or in a thin film form (Fig. 6b).

3.4. Influence of the film thickness on β -galactosidase activity

From here, and since the β -galactosidase activity was higher for Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMSO preparation (Fig. 3c), the activity assays of immobilized β -galactosidase were thus realized with samples prepared only from the procedure (iii) with enzymes adsorbed from ethanol and overcoated but exclusively on silicon. The influence of the deposit thicknesses on the enzyme retention was firstly investigated by fluorescence and was then correlated to enzyme activity. Enzyme activity was analyzed as function of different ppTMSO deposit thicknesses (Fig. 7). The homogeneity of the polymer layer is function of the geometry of the reactor. Presently, the precursor feeding was perpendicular to the N_2 flux (Fig. 1a). Thus, the thicknesses of the obtained deposits showed some gradients on the samples of $1.5\ \text{cm}^2$ area. This was due to the injector-to-sample distance and injector dimensions. This may allow a certain amount

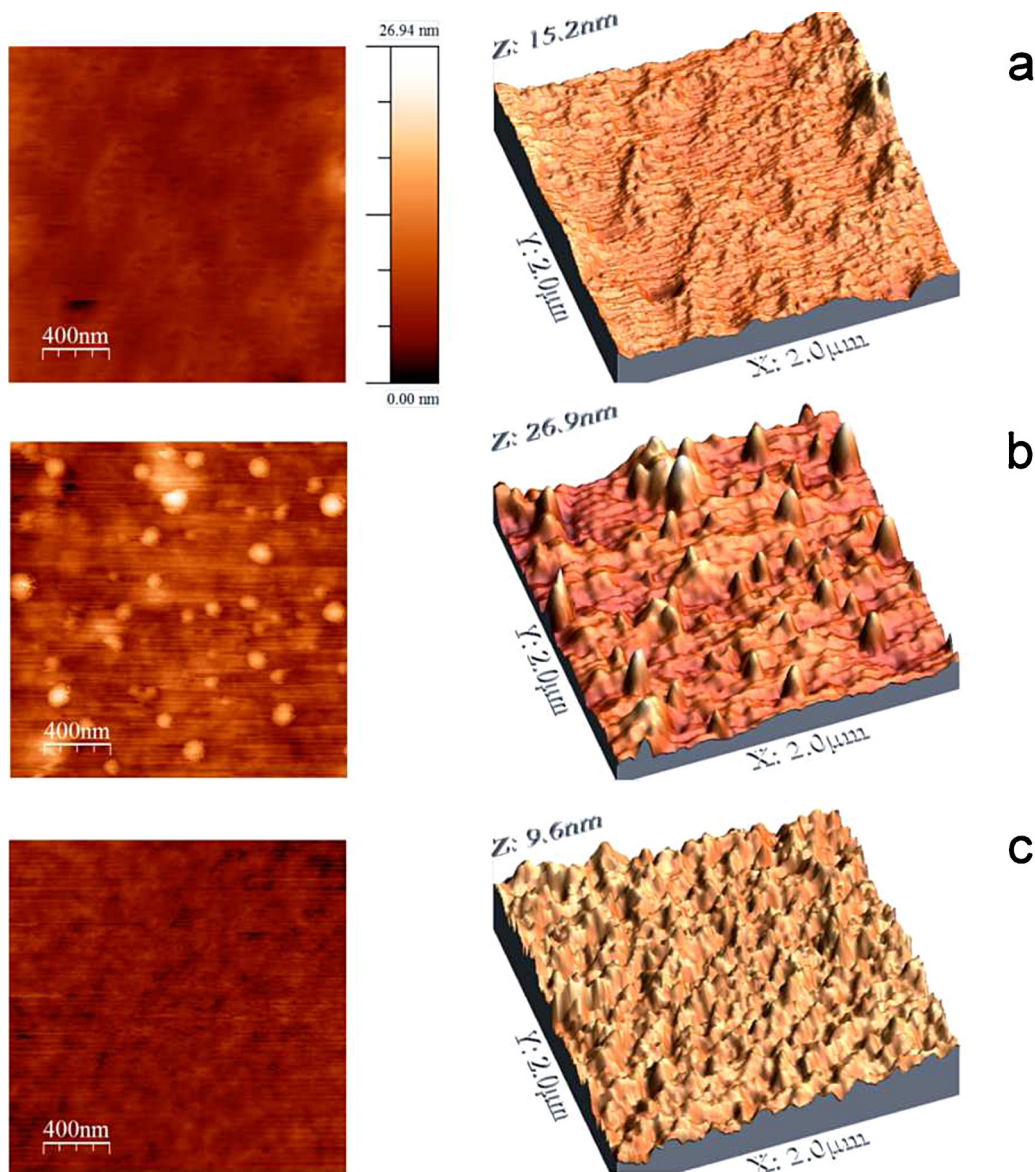


Fig. 5. AFM surface topography ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) of different steps and surfaces of the adsorption from ethanol-overcoating immobilization process: (a) adsorbed β -galactosidase on silicon, (b) $\sim 200\ \text{nm}$ thick ppTMDSO polymer deposited on silicon and (c) β -galactosidase overcoated by $\sim 200\ \text{nm}$ thick ppTMDSO layer (Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMDSO).

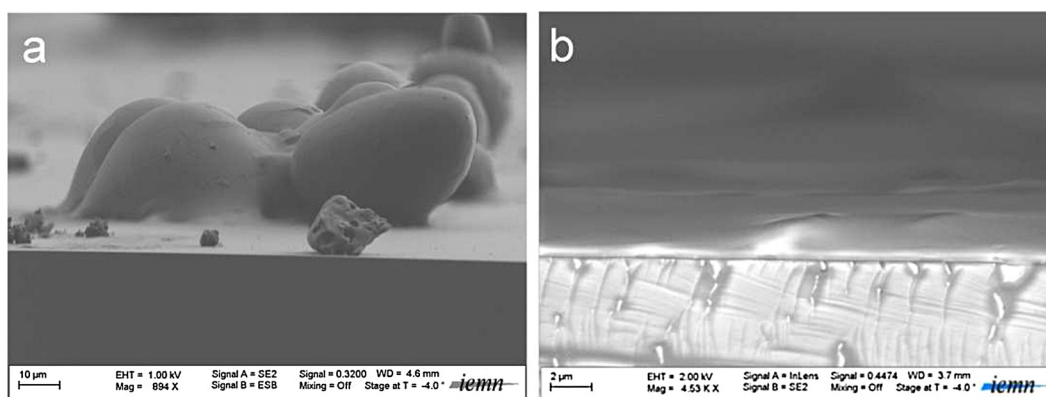


Fig. 6. MEB images of polymer-coated β -galactosidase (Si- β -Gal_{EtoH}-ppTMDSO structure): (a) large localized coated enzyme aggregates and (b) small enzyme clusters. The particles in front of the aggregates in (a) results from cleaving operation.

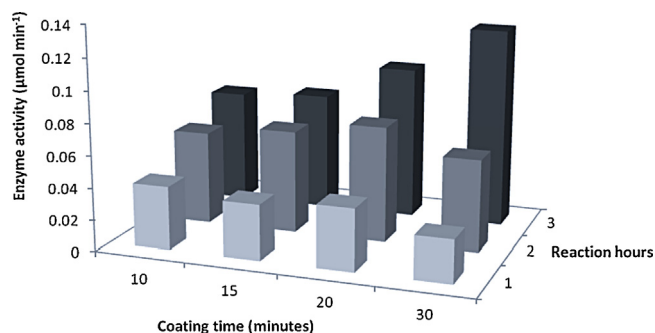


Fig. 7. Immobilized β -galactosidase activity as function of coating thickness for 1, 2 and 3 h of reaction.

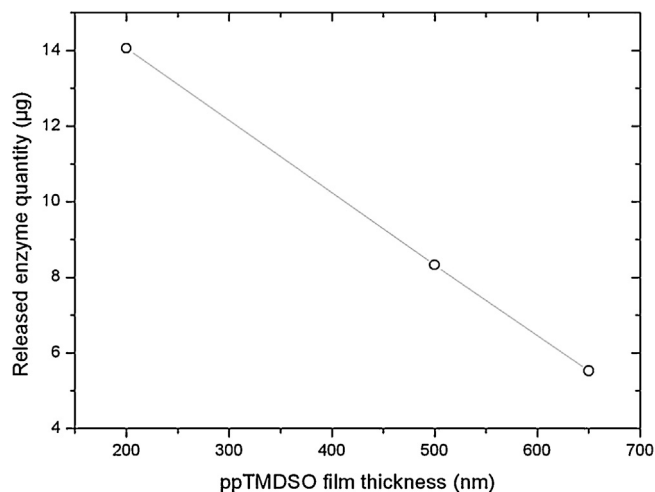


Fig. 8. Dependence vs. ppTMDSO overlayer thickness of the released enzyme quantity (μg) in 3×3 mL of washing sequence just after plasma polymerization and just before activity assay.

of enzymes to be released due to the relative thickness decrease at the edges of the coated sample. This phenomenon can be reduced by increasing the ppTMDSO deposition time: the thicker the polymer film is the fewer β -galactosidase is released (Fig. 8). Note that this release shows a linear dependence on the film thickness and would be stopped for values larger than 950 nm under this assumption. However, the enzyme molecules are mainly adsorbed in the center of the sample because of the drying effect of ethanol (Fig. 4). Enzyme activity gets larger for long time kinetics and larger polymer layer thicknesses because the enzyme molecules are more efficiently entrapped (Fig. 7). For optimal reactions, the polymer deposition time has to be chosen as a compromise between entrapment efficiency and substrate diffusion time.

Using spectrofluorimetry for evaluating the kinetics on shorter time, the influence of the thicknesses was investigated in terms of diffusional limitations, which are often associated with enzyme entrapment. Indeed, the hydrolysis of *o*-NPG analyzed by UV/vis spectrophotometry is not sensitive enough to analyze short times kinetics. Since *o*-NPG and RBG have a relative similar molecular weight (301.3 g/mol for *o*-NPG vs. 375.3 g/mol for RBG), investigations on 1 h kinetics were realized by the resorufin fluorescence kinetics monitoring at 590 nm (Fig. 9). Both considered values of polymer layer thicknesses (~ 200 and ~ 500 nm) induce small diffusional limitations and increasing mass-transfer resistances in terms of RBG diffusion seem to occur with increasing polymer thickness. This is shown by the curve slope at origin, i.e. the initial enzyme velocity, which decreases when the film thickness increases, indicating a diffusion-limited transport of the

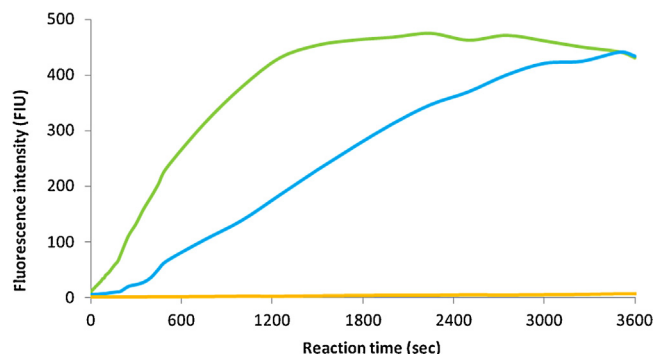


Fig. 9. 1 h monitoring of fluorescent product (resorufin) auto-degradation (yellow) and production at 590 nm by spectrofluorimetry for ~ 200 nm film thickness (green) vs. ~ 500 nm film thickness (blue). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

reactive substrate through the polymer matrix toward the immobilized enzyme. However, longer time kinetics reveals that more enzymes seem to be entrapped in the thicker ppTMDSO layers (Fig. 7). Thus, the polymer film thickness seems to constitute a key parameter that influences the retention of enzyme molecules in the polymer carrier matrix as well as the enzyme reaction kinetics.

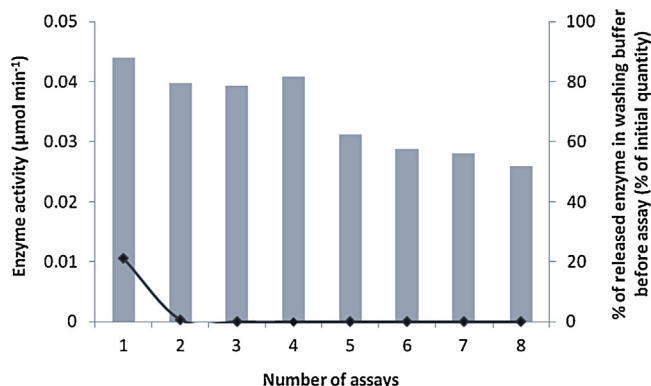
3.5. Kinetic parameters determination

The determination of kinetic parameters for the immobilized enzyme is directly influenced by the mass transfer limitations due to the polymer when the reaction starts. Contrary to batch reaction where activity is maximum at the beginning of the reaction and decreases with decreasing substrate concentration, immobilized enzyme activity slowly increases according to the diffusion of the substrate molecules inside the polymer matrix. Then, activity increases with time and substrate diffusion before its decrease according to substrate consumption. Thus, mass transfer limitations make difficult to compare the initial rate of both batch and immobilized enzyme reaction by taking into account the same initial time (tangent at (0,0) of the curve of product concentration as function of reaction time). Moreover, in the same way as mass transfer limitations, numerous factors can influence the rate of a reaction such as species mobility, enzyme orientation or also charge interactions between the material and the substrate (a boundary or Nernst layer for example) [4]. Since partitioning and mass transfer effects strongly influence the velocity of a reaction but also the optimal operational pH and the apparent substrate affinity, the denomination of apparent $V_{\text{m}}^{\text{app}}$ and apparent $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ seems to be more appropriate.

According to the Lineweaver-Burk method, the kinetic parameters of *o*-NPG hydrolysis were calculated and are presented in Table 2. Lower Michaelis-Menten constant $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ but also maximal reaction velocity $V_{\text{m}}^{\text{app}}$ values were obtained for immobilized β -galactosidase in comparison with free β -galactosidase, whose kinetic parameters were consistent with literature [46]. $K_{\text{m}}^{\text{app}}$ and $V_{\text{m}}^{\text{app}}$ of immobilized β -galactosidase are smaller than K_{m} and V_{max} values of free enzyme, suggesting an improved apparent affinity combined with a drop of the maximal rate. Less substrate is sufficient to reach the declining value of maximal velocity when the β -galactosidase is entrapped in the ppTMDSO. In fact, as often in entrapped enzyme system, this plasma-polymerized thin film acts as a barrier that reduces the exchange between the enzyme and its substrate. Thus, less substrate is available for the β -galactosidase, which leads to the decrease in velocity. The kinetic parameter of a reaction depends on all the initial rates calculated for various substrate concentrations. Taking into account that diffusional limitations and enzyme retention in the polymer matrix influence

Table 2Kinetic parameters (K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m) for free and immobilized β -galactosidase for ~ 200 nm polymer coating thickness.

	K_m^a (mM)	V_{max}^a ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	V_{max}^a ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg enz}^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Free β -galactosidase	2.23	0.59	9.83	1.72	0.77
Immobilized β -galactosidase	0.74	0.07	1.52	0.26	0.35

^a Apparent coefficients K_m^{app} , V_{max}^{app} are considered in the latter case.**Fig. 10.** Immobilized β -galactosidase activity (left scale, histogram) as function of number of assays. The relative stability of the enzyme amount can be appreciated according to the released enzyme quantity (right scale, points connected by the black curve) determined by spectrofluorimetry before each assay in washing acetate buffer.

enzyme initial activity, it is important to note that these presented kinetic parameters in Table 2 are specific to the immobilized configuration with ~ 200 nm polymer coating thickness. Moreover, the released enzymes leached from the support must not be considered in the specific activity appreciation. Thus, the apparent specific enzyme activity can be calculated by taking into account these enzymes leached from the plasma-polymerized film during the washing sequence just after the polymer deposition and just before the first activity assay (Table 2). These results were confirmed by the expression of the catalytic constant K_{cat} , which translate the turnover of the enzyme during the reaction (turn-over number) and by the catalytic efficiency K_{cat}/K_m , which reflects the specificity of the enzyme for a substrate. The K_{cat} value of the immobilized enzyme is lower than for the free enzyme, surely due to the diffusional barrier which limits β -galactosidase accessibility for the substrate. The gap between the catalytic efficiency values of the free and immobilized forms, a factor of two, is not so large as that shown by both V_{max} and K_{cat} (a factor of ~ 6.5). It is due to the smaller K_m value for the immobilized enzyme, showing that the immobilization process leads to a two-time decrease of the β -galactosidase efficiency.

3.6. Stability of the enzyme activity

The reproducibility of the results obtained after immobilization was investigated to appreciate the enzyme stability (Fig. 10). The first assay exhibited a maximum of activity after which a very slow decrease took place during 8 assays. The amount of released β -galactosidase leached from the ppTMDSO film is about 23% for the first washing sequence but fall to 0% before each consecutive assay, suggesting an enzyme entrapment efficient enough to keep the same amount of β -galactosidase included in the polymer for each assay (Fig. 10, black curve, right scale). The substrate and product transfers through the polymer “membrane” can influence, after a certain time, the exchange properties by modifying the film porosity itself. Substrate and product molecules can be adsorbed or retained within the polymer and therefore block their diffusion. Indeed, product (*o*-NP) appears progressively during the washing sequences of the samples. Note that a five months old sample

was assayed and exhibited the same activity level as as-deposited sample, suggesting a good stability of the film and of the coating-to-enzyme interface over the time. It shows also that the decrease in activity is mainly related to a modification of the mass transfer properties since this phenomenon appears before any degradation of the surface of the assayed samples.

A continuous-flow reactor was implemented in a top-down perspective (result not shown). As stability is a key factor for the use of Immobilized Enzyme Reactors (IMERs), the dynamic mode of continuous flow reactor was used in order to appreciate the efficiency of the immobilization in terms of stability and because mechanical constraints exist when a flow-rate is applied to this kind of system. Using overcoated β -galactosidase support, 36 samples of 1 mL were collected in eppendorf tubes for a flow-rate of $0.250 \text{ mL min}^{-1}$. Activity stability around $0.02 \mu\text{mol min}^{-1}$ was achieved after 5–10 collected samples. This configuration shows that a microfluidic transposition is possible since the flow does not disturb the exchange between immobilized enzymes and free substrate. The reaction was effective for a large interval of flow-rates (varying from $0.145 \text{ mL min}^{-1}$ to 2 mL min^{-1}), suggesting efficiency and exchange good enough for top-down perspective. Moreover, diffusion enhanced effect specific to microfluidics can greatly influence matter exchange through the polymer film for low weight substrate molecules.

The conservation modes of the prepared immobilized β -galactosidase samples were also evaluated in different ways. Keeping a sample dry seems to constitute the most simple and efficient conservation mode. However, alternation between dry (conservation) and wet (assay) state between each assay could affect the polymer structure and can also modify the properties of substrate and product transfer by causing a progressive blocking of the exchange.

4. Conclusion and perspectives

In summary, cold plasma technology allows fast immobilization of enzymes while retaining their activity after several assays. The immobilization procedure described here is simple, mild, fast, and allows obtaining thin films of various thicknesses with different deposit strategies. Since adsorption is a reversible mechanism, enzyme overcoating was performed in order to optimize its retention and activity stability. The thickness of the deposit seems to constitute a key parameter that influences the retention of enzyme molecules in the polymer matrix as well as the enzyme kinetics. Finally, the enzyme immobilization is not limited by the nature of the polymer and another polymer or various ppTMDSO pre- or post-treatments can improve enzyme entrapment and mass transfer performances.

Since plasma-polymerized films are suitable for the design of an interface between biological components and physical transducers, such a methodology of enzyme inclusion is a fast and facile procedure that can be incorporated in a microdevice fabrication in order to obtain a bio-fonctionnal coating. Remote afterglow cold plasma technology could bring an interesting deposition technique in the fabrication of functionalized microfluidic MEMS. As lab-on-a-chips, IMERs and BioMEMS are part of the new tools in chemistry and biology, the methodology presented here is easily compatible with such fields while preventing the use of various and numerous hazardous

solvent commonly encountered in enzyme immobilization protocols. Further investigations and optimizations of the technological process as well as improvement of enzyme activity stability will certainly enable the development of new biofunctional coatings for specific microfluidic applications. Integration of this technology in microsystems for patterning bio-functional coatings in ppTMDSO microfluidic channels fits into this context [27].

Acknowledgments

We are grateful to Christian Malas and David George for their help in RPECVD experiments, Dominique Deresmes for AFM technical assistance and Christophe Boyaval for SEM measurements.

References

- [1] L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.* 109 (2009) 4025–4053.
- [2] E.-L. Ticu, D. Vercaigne-Marko, R. Froidevaux, A. Huma, V. Artenie, D. Guillochon, *Process Biochem.* 40 (2005) 2841–2848.
- [3] H. Muguruma, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 433–443.
- [4] J.N. Talbert, J.M. Goddard, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 93 (2012) 8–19.
- [5] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 453–468.
- [6] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–6307.
- [7] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511.
- [8] R.A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223–6235.
- [9] F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules* 8 (2007) 1775–1789.
- [10] J.N. Yewle, Y. Wei, D.A. Puelo, S. Daunert, L.G. Bachas, *Biomacromolecules* 13 (2012) 1742–1749.
- [11] P.-C. Lin, D. Weinrich, H. Waldmann, *Macromol. Chem. Phys.* 211 (2010) 136–144.
- [12] K.A. Heyries, C.A. Marquette, L.J. Blum, *Langmuir* 23 (2007) 4523–4527.
- [13] S.D. Psoma, P.D. van der Wal, O. Frey, N.F. de Rooij, A.P.F. Turner, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1582–1587.
- [14] T. Honda, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Maeda, *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 2163–2171.
- [15] T. Honda, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Maeda, *Chem. Commun.* (2005) 5062–5064.
- [16] K.S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H.J. Griesser, *Plasma Process. Polym.* 3 (2006) 392–418.
- [17] M. Ghasemi, M.J.G. Minier, M. Tatoulian, M.M. Chehimi, F. Arefi-Khonsari, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 10228–10238.
- [18] A. Abbas, D. Vercaigne-Marko, P. Supiot, B. Bocquet, C. Vivien, D. Guillochon, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 73 (2009) 315–324.
- [19] I. Gancarz, J. Bryjak, M. Bryjak, G. Poźniak, W. Tylus, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 1615–1622.
- [20] I. Gancarz, J. Bryjak, G. Poźniak, W. Tylus, *Eur. Polym. J.* 39 (2003) 2217–2224.
- [21] C. Amorosi, C. Mustin, G. Frache, P. Bertani, A. Fahs, G. Francius, V. Toniazio, D. Ruch, V. Ball, L. Averous, M. Michel, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 21356–21365.
- [22] P. Heyse, A. van Hoeck, M.B.J. Roeflaers, J.-P. Raffin, A. Steinbüchel, T. Stöveken, J. Lammertyn, P. Verboven, P.A. Jacobs, J. Hofkens, S. Paulussen, B.F. Sels, *Plasma Process. Polym.* 8 (2011) 965–974.
- [23] P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang, *Mater. Sci. Eng. R: Rep.* 36 (2002) 143–206.
- [24] P. Supiot, C. Vivien, K. Blary, V. Rouessac, *Chem. Vap. Depos.* 17 (2011) 321–326.
- [25] T. Hayakawa, M. Yoshinari, K. Nemoto, *Biomaterials* 25 (2004) 119–127.
- [26] V. Mille, N.-E. Bourzgui, C. Vivien, P. Supiot, B. Bocquet, *J. Micromech. Microeng.* 18 (2008) 125026.
- [27] A. Abbas, P. Supiot, V. Mille, D. Guillochon, B. Bocquet, *J. Micromech. Microeng.* 19 (2009) 045022.
- [28] H. Muguruma, *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 151–162.
- [29] F. Callebort, P. Supiot, K. Asfardjani, O. Dessaux, P. Gourmand, P. Dhamicourt, J. Laureyns, *J. Appl. Polym. Sci.* 52 (1994) 1595–1606.
- [30] C. Foissac, J. Kristof, A. Annusova, P. Veis, P. Supiot, *Plasma Sources Sci. Technol.* 21 (2012) 055021.
- [31] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A.M. Baro, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007) 013705.
- [32] V. Krishnamurthy, I.L. Kamel, *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* 27 (1989) 1211–1224.
- [33] S. Abou Rich, V. Mille, C. Vivien, S. Godey, P. Supiot, *Plasma Process. Polym.* 7 (2010) 775–784.
- [34] C.P. Stallard, K.A. McDonnell, O.D. Onayemi, J.P. O’Gara, D.P. Dowling, *Biointerfaces* 7 (2012) 31.
- [35] P. Merel, M. Tabbal, M. Chakar, M. Moisan, M. Ricard, *Plasma Sources Sci. Technol.* 7 (1998) 550–556.
- [36] M.M. Bilek, D.R. McKenzie, *Biophys. Rev.* 2 (2010) 55–65.
- [37] Z. Wu, M. Dong, M. Lu, Z. Li, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 63 (2010) 75–80.
- [38] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106.
- [39] P. Urrutia, B. Rodríguez-Colinas, L. Fernández-Arrojo, A.O. Ballesteros, L. Wilson, A. Illanes, F.J. Plou, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 1081–1087.
- [40] C. Czeslik, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 235–239.
- [41] Y. Moskovitz, S. Srebnik, *Biophys. J.* 89 (2005) 22–31.
- [42] A. Kondo, F. Murakami, K. Higashitani, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 889–894.
- [43] S.S. Pai, T.M. Przybycien, R.D. Tilton, *Langmuir* 26 (2010) 18231–18238.
- [44] C.C. You, M. De, G. Han, V.M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12873–12881.
- [45] C.H. Yu, A. Al-Saadi, S. Shih, L. Giu, K.Y. Tam, S.C. Tsang, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 537–543.
- [46] R. Gaur, H. Pant, R. Jain, S.K. Khare, *Food Chem.* 97 (2006) 426–430.

Proposition : application du protocole à l'immobilisation de la pepsine et à la mise en œuvre de la protéolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine immobilisée

La méthodologie décrite a été appliquée au traitement par hydrolyse de l'hémoglobine par la pepsine immobilisée. Ce cas implique l'immobilisation d'un enzyme de taille moléculaire plus faible que son substrat (initial). Intuitivement, il paraît clair que la conversion de l'hémoglobine dans son état natif est impossible. Le principe gouvernant l'efficacité de la méthode d'immobilisation par piégeage stérique implique un rapport de taille inverse, c'est-à-dire que l'enzyme soit de taille moléculaire plus importante que son substrat. La pénétration du substrat au sein de la matrice polymérique tridimensionnelle renfermant l'enzyme est en effet indispensable.

Des résultats préliminaires confirment qu'aucun peptide n'est produit par l'hydrolyse de l'hémoglobine native (pH 4,5) par la pepsine immobilisée. En revanche, l'incubation de la pepsine immobilisée en présence d'hémoglobine dénaturée (pH 3) révèle une faible production de peptides. La raison est probablement que la dénaturation de l'hémoglobine induit une structure tridimensionnelle lui conférant la capacité de pénétrer dans le film polymère. Cette pénétration est selon toute vraisemblance partielle car la longueur des chaînes α et β de l'hémoglobine limite certainement leur mobilité au sein du polymère de TMDSO. La cinétique d'hydrolyse reflète d'ailleurs les contraintes diffusionnelles fortes qui accompagnent la pénétration des chaînes initiales de l'hémoglobine ainsi que la diffusion des substrats intermédiaires ou produits finaux générés. De plus, un phénomène similaire à un « colmatage de la membrane de ppTMDSO » par des fragments peptidiques est probable. Celui-ci met certainement en jeu des phénomènes d'interactions, d'adsorption et de piégeage de substrat ou de produit conduisant en partie à un effet de stockage (de la même façon que pour l'*o*-NPG, décrit dans l'article).

Les résultats permettent néanmoins d'émettre une hypothèse quant à la répartition de l'enzyme au sein du film. Rigoureusement, le protocole met en jeu un recouvrement par le polymère de la pepsine adsorbée sur support de silicium (selon la procédure (iii) décrite dans l'article présenté). En considérant que les chaînes de l'hémoglobine dénaturée ne diffusent pas entièrement dans la couche mince recouvrant la pepsine, il est possible de supposer que cette dernière n'est pas uniquement confinée sous cette couche qui la recouvre mais éventuellement incluse dans celle-ci. La « solubilisation partielle » de la pepsine physiquement immobilisée en

contact avec le milieu aqueux pourrait lui conférer une mobilité diffusionnelle réduite mais suffisante à une probable réorganisation spatiale. En d'autres termes, la matrice tridimensionnelle que représente le polymère serait susceptible de piéger d'éventuels enzymes désorbés du support de silicium. Ce paramètre pourrait aussi bien intervenir dans le cas de la β -galactosidase, en prenant en compte que ses dimensions ne lui autorisent pas la même « mobilité partielle » que la pepsine.

Synthèse

La méthodologie mise au point a permis de vérifier qu'un procédé faisant intervenir les plasmas froids est propice à l'immobilisation d'enzyme. La fixation covalente d'enzymes sur des films fonctionnalisés obtenus par des procédés plasma a déjà été largement rapportée [5-9]. Dans ce travail, la stratégie d'immobilisation a consisté à piéger l'enzyme par un film polymère mince et poreux déposé par un procédé de polymérisation assistée par plasma. Le choix du procédé et des matériaux s'est fait en accord avec les perspectives de développement d'un protocole propice au domaine de la microfabrication, mais également avec les perspectives de conception *bio-intégrante* d'IMERs (section 3.3.2.).

La spécificité de la procédure d'immobilisation développée met en exergue les rôles cruciaux que jouent le solvant de l'enzyme et la nature du support. D'un côté, la nécessité de disposer d'un état de surface complètement anhydre a imposé un choix judicieux du solvant dans lequel l'enzyme est mis en solution. L'utilisation de l'éthanol absolu comme solvant d'adsorption de la β -galactosidase a permis de satisfaire cette contrainte en n'affectant pas l'adhérence du polymère. En conséquence, le dépôt par adsorption de l'enzyme sous forme d'agrégat est à l'origine d'une répartition et d'une structuration de l'enzyme sur le support tout à fait caractéristique : (i) l'inhomogénéité de la taille des agrégats crée une rugosité moyenne importante sur toute la surface du support et (ii) l'évaporation rapide de l'éthanol induit une répartition hétérogène de l'enzyme sur le support, contribuant également au développement de la rugosité moyenne de la surface. Le second point indiquant la répartition hétérogène de l'enzyme peut s'expliquer par la combinaison de deux composantes :

- *le comportement de l'éthanol au séchage*, mettant en jeu une rétraction et un séchage rapide des gouttes déposées contenant la β -galactosidase, provoquant leur rassemblement vers le centre du support ;

- la cinétique d'adsorption de l'enzyme insolubilisé dans l'éthanol, connectée à la première composante, qui est donc très rapide.

La taille maximale des agrégats de β -galactosidase présents à la surface du silicium (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres) ne semble pas perturber le processus de dépôt si ce n'est que ce dernier se révèle non conforme (Annexe 3). En parallèle, des zones pauvres en agrégats révèlent la présence locale probable de fines couches d'enzyme. Cependant, l'efficacité de l'immobilisation stérique de la β -galactosidase est conditionnée par la taille de l'enzyme et il semble que son organisation en agrégats prévienne un relargage trop important.

D'un point de vue cinétique, la faible valeur de la constante de Michaelis-Menten K_m combinée à la diminution de la vitesse maximale de la réaction V_{max} suggère qu'une saturation des enzymes immobilisés se produit à une concentration en substrat largement plus faible que dans les conditions de l'enzyme libre. Cet aspect cinétique est fortement dépendant de l'épaisseur du polymère, qui influence la rétention d'enzymes. En ce sens, il est fortement probable que les paramètres K_m et V_{max} évoluent avec l'augmentation de l'épaisseur du film. De même, plus l'épaisseur de celui-ci augmentera, plus sa charge en solutés grandira également, ce qui influencera la vitesse d'échange avec le milieu [10]. Par conséquent, les paramètres cinétiques présentés en amont semblent spécifiques à la configuration du film déposé en termes d'épaisseur, mais aussi en termes d'énergie de surface et de rugosité.

Fort de la faisabilité démontrée du procédé d'immobilisation, nous avons donc envisagé l'intégration de celui-ci dans le processus de microfabrication d'un microcanal par le même matériau polymère.

3.3.2. Conception *bio-intégrante* de microcanaux en ppTMDSO à enzyme immobilisé : preuve de concept

Introduction

La diversité des microréacteurs et l'évolution technologique constante qui accompagne leur conception ne permet pas de faire ressortir une méthodologie d'immobilisation enzymatique parfaitement adaptée aux contraintes de microfabrication. Sans faire mention aux avantages et

inconvenients de chaque méthode, il ressort cependant de la littérature que l'immobilisation covalente est la technique dominante, alors que l'adsorption est parfois préférée comme alternative simple, « propre » (sans utilisation de solvants polluants ou nocifs) et peu coûteuse. Pour la conception d'IMERs, l'immobilisation chimique de l'enzyme requiert souvent plusieurs étapes de fonctionnalisation et n'intervient, dans la majorité des cas, qu'à la suite des étapes de microfabrication [11-12]. L'adsorption de l'enzyme sur les parois du réacteur est une méthode qui s'intègre aisément dans un protocole de fabrication [13], mais elle s'avère être globalement moins efficace que la première et peu contrôlable. Le protocole présenté dans la section précédente montre que le « maintien » de l'adsorption d'un enzyme par un film polymère poreux permet de limiter le relargage tout en constituant potentiellement une étape intégrante d'un protocole de microfabrication. La nature du ppTMDSO et ses propriétés de structuration à l'échelle micro- et nanométrique permettent d'étendre le concept d'immobilisation à un concept de microfabrication *bio-intégrante*. En s'appuyant sur la biocompatibilité du procédé plasma et du polymère, un protocole de conception d'IMER exclusivement par la technologie plasma peut être défini. Sa mise au point propose, pour certaines applications, une alternative à l'usage de techniques de microfabrication « dures » souvent longues et coûteuses.

Dans cet objectif, une étude préliminaire abordant la faisabilité d'un procédé de fabrication intégrant l'élément biologique a été menée. Sur la base d'une méthodologie de réalisation de microcanaux microfluidiques employant des résines sacrificielles [14], l'objectif à atteindre consistait à obtenir un microcanal entièrement en ppTMDSO dont la paroi supérieure présenterait des enzymes immobilisés. Le protocole d'immobilisation mis au point a donc été intégré au protocole de microfabrication de canaux microfluidiques afin d'aboutir à une seule et même réalisation.

Etude de faisabilité et preuve de concept

En reprenant un brevet comme base de travail [15], l'objectif fut d'abord de valider la construction d'une structure superposée *résine-ppTMDSO- β -galactosidase* sur un *wafer* en silicium. Pour ce faire, un masque a été réalisé afin de permettre la création de motifs simples formant les microcanaux et leurs réservoirs à leurs extrémités. La faisabilité du protocole devait être montrée par la réalisation complète de microcanaux à enzyme immobilisé, c'est-à-dire à la suite du dépôt du capot de ppTMDSO sur la structure résine-polymère-enzyme afin d'assurer l'étanchéité du circuit. Enfin, la validation du concept de microfabrication *bio-intégrante* devait

passer par une libération complète des canaux dans le but d'assurer une circulation microfluidique.

La méthodologie adoptée peut être décrite de façon chronologique par la schématisation en coupe transversale des différentes étapes de traitements et de dépôts qui la composent (Figure 39). Ces étapes sont chronologiquement et succinctement décrites par la suite.

1. Préparation du substrat par sonication et chauffage

substrat en silicium/ quartz

2. Etape "résine"

dépôt ~ 12 µm de résine AZ4562

3. Etape "résine-ppTMDSO"

dépôt d'un film de TMDSO d'une épaisseur moyenne ~ 750 nm

4. Etape "résine-ppTMDSO-enzyme"

dépôt des spots d'enzyme

5. Etape "résine-ppTMDSO-enzyme-ppTMDSO"

dépôt d'un film de TMDSO d'une trentaine de micromètres d'épaisseur

6. Dissolution de la résine sacrificielle : accès au microcanal

évacuation de la résine sacrificielle par dissolution par l'acétone

Figure 39. Schématisation en coupe transversale des différentes étapes de traitements et de dépôts pour la microfabrication bio-intégrante de canaux microfluidiques en ppTMDSO.

Préparation du substrat

Avant toute étape de dépôt, le substrat (silicium ou quartz) est traité par sonication dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol, pour une durée de 5 minutes par solution. Après ce traitement désorbant aux ultrasons, le substrat est chauffé sur plaque chauffante à 200 °C pendant 5 minutes afin d'éliminer toute trace résiduelle de solvant.

Etape « résine »

L'étape de résinage a permis de concevoir des couches sacrificielles avec différents paramètres de largeur (50,100, 250 et 500 µm) et de longueur (2, 3, 5 et 10 mm) d'épaisseur identique (~12

µm) sur différents substrats, en quartz et silicium (Figure 40). Ces motifs ont été réalisés par photolithographie à partir d'un masque conçu à cet effet.¹⁵ La résine AZ4562 a été employée. Elle a été développée après insolation UV à travers le masque à l'aide d'une solution gravante, le développeur AZ351B.

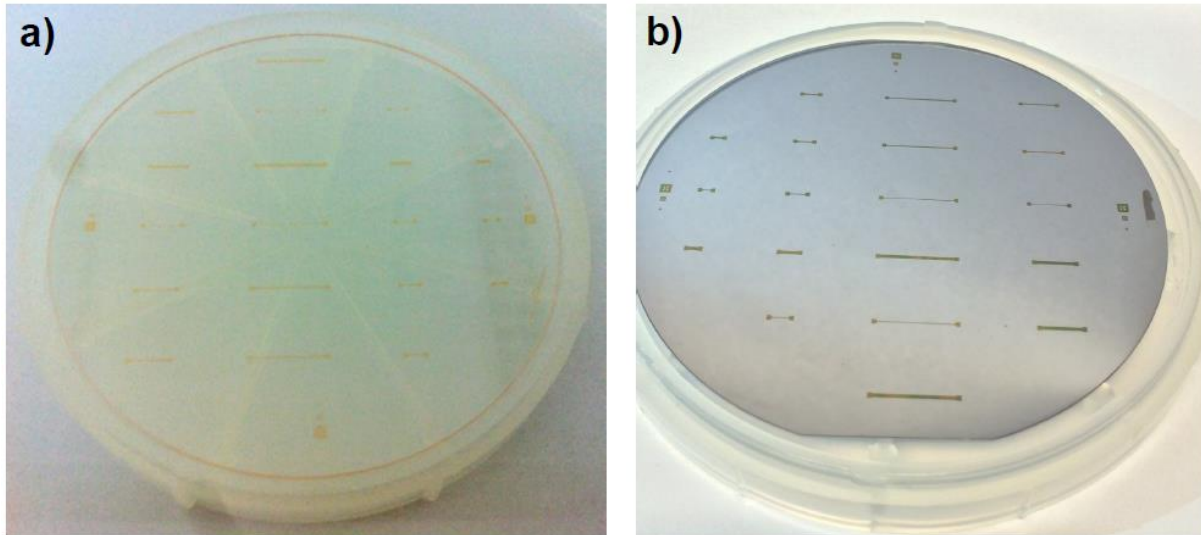


Figure 40. Photographies des wafers (3 pouces) en quartz (a) et silicium (b) sur lesquels a été déposée la résine sacrificielle formant les futurs microcanaux.

Etape « résine-ppTMDSO »

A la suite du processus de photolithographie et de révélation, un dépôt plasma avec un système réactionnel $N_2/TMDSO/O_2$ a été réalisé pleine plaque en « masquant » un futur accès aux puits. En réalité, ce dépôt RPECVD constitue le dépôt permettant le piégeage de l'enzyme comme décrit dans la partie 3.3.1. L'ordre de construction de la structure a en effet imposé le dépôt d'un film d'environ 800 nm d'épaisseur avant celui de l'enzyme (Figure 41), à l'inverse du protocole précédent. En dehors de la valeur du débit de monomère de TMDSO (5 sccm), tous les paramètres de ce dépôt sont regroupés dans un tableau récapitulatif (Annexe 4).

¹⁵ Il est à noter qu'un profil « casquette » de la résine insolée a été obtenu. Ceci est dû aux paramètres fixés lors de l'insolation étant donné que nous avons cherché à obtenir des motifs à flancs inclinés (obliques autour de 45°). Cette forme était recherchée afin de limiter un effet d'ombrage des flancs droits de la résine lors de la polymérisation plasma. Cependant, une inversion involontaire du paramètre responsable de la forme des flancs des motifs a logiquement engendré une inversion dans la forme de ceux-ci, c'est-à-dire que les motifs se présentent « à l'envers ». Ceci étant, l'expérience a été poursuivie et la structure n'a a priori pas trop souffert de ce désagrément.

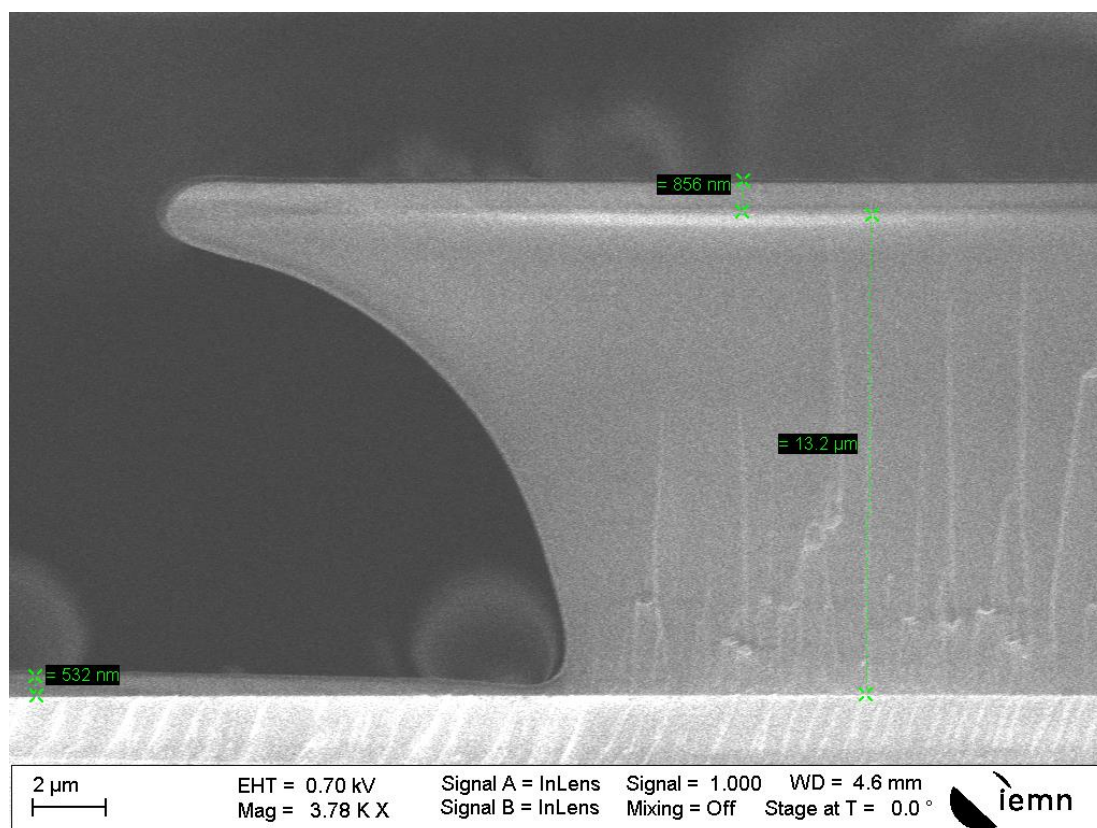


Figure 41. Cliché obtenu par MEB d'un flanc de la structure résine-ppTMSO. L'épaisseur du film polymère montre une inhomogénéité spatiale principalement due à un effet d'ombrage par les extrémités de la résine.

Etape « résine-ppTMSO- β -galactosidase »

Le dépôt de la β -galactosidase sur la structure *résine-ppTMSO* a impliqué l'utilisation d'une technologie adaptée au dépôt de matière à l'échelle de la structure micrométrique. En collaboration avec une équipe de l'IEMN et notamment S. Lamant, nous avons opté pour l'emploi d'un système *inkjet*, système d'impression 3D. Après des étapes d'optimisation de plusieurs paramètres nécessaires à une éjection correcte des gouttelettes contenant l'enzyme (concentration d'enzyme, formulation et viscosité de la solution aqueuse), une structure à étages (i) résine, (ii) polymère et (iii) enzyme a pu être conçue (Figure 42). La concentration d'enzyme retenue a été de 3% (p/ V) soit 30 mg mL⁻¹. Le volume de chaque goutte éjectée était de 30 pL. L'épaisseur de la couche de polymère préalablement déposée a été limitée à ~800 nm dans le but de conserver des propriétés de mouillage suffisantes. En effet, nous avons constaté qu'au-delà d'une épaisseur de 1 μ m, les propriétés du film (hydrophobie, rugosité) ne conféraient plus suffisamment d'adhérence à la goutte éjectée de l'imprimante vis-à-vis du film de ppTMSO.

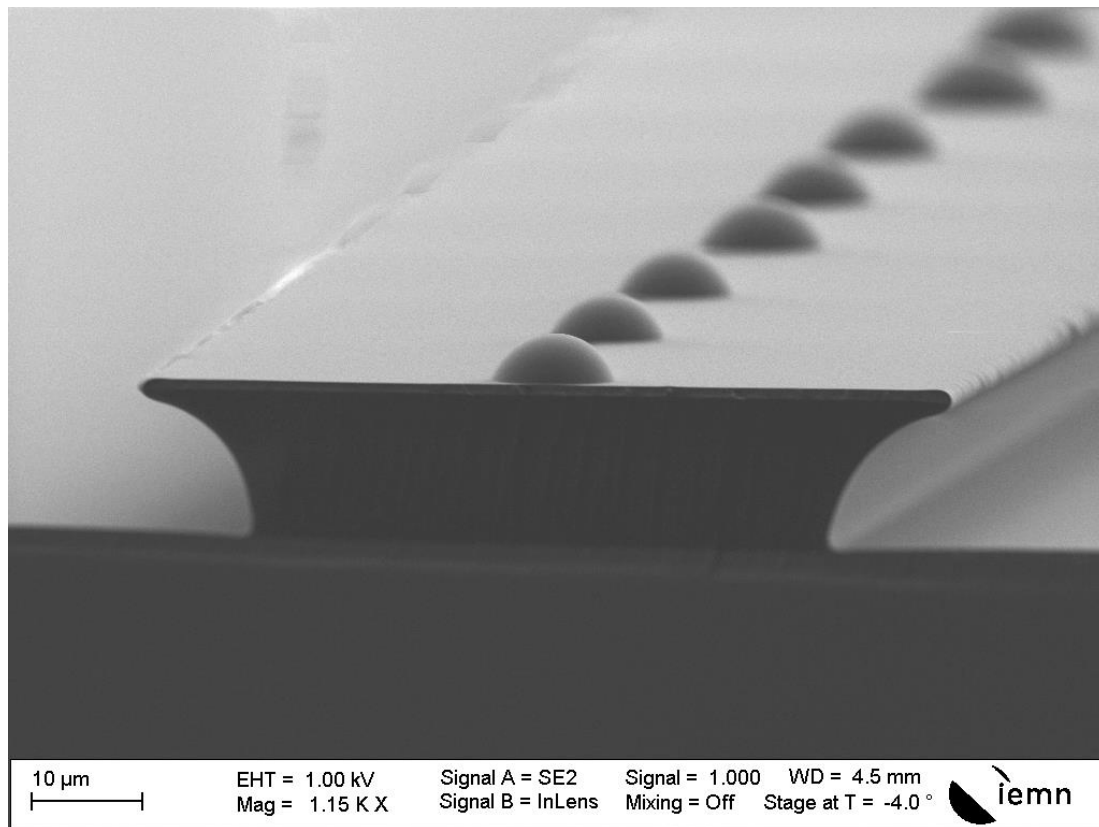


Figure 42. Cliché obtenu par MEB de la structure résine-ppTMDSO- β -galactosidase. Le dépôt d'enzyme révèle une structuration sous forme de « dôme » en raison d'un faible étalement dû au caractère hydrophobe du film.

Compte-tenu du caractère relativement hydrophobe du polymère déposé (angle de contact autour de 85°, partie 3.3.1.), notons que la structuration de l'enzyme s'approchait d'un « dôme » compact. En effet, en comparaison avec des dépôts d'enzyme sur une surface plutôt hydrophile, les spots présentaient une largeur moins importante (étalement faible) et une hauteur plus marquée (Annexe 5). L'effet « *coffee ring* » caractéristique des dépôts sur surfaces hydrophiles (Annexe 6) n'était donc pas visible lorsque l'enzyme a été déposé sur les films de ppTMDSO.

De la même façon, nous avons opté pour la disposition de spots d'enzymes avec un espace inter-goutte suffisamment élevé afin de permettre une bonne adhérence à la couche supérieure de ppTMDSO (capot) qui est déposée pendant l'étape suivante (Figure 43). Des tests préliminaires ont en effet révélés qu'un espace inter-goutte trop faible n'autorisait pas une adhérence solide du capot de polymère (Figure 39, étape 5). Une tentative de dépôt d'un film de TMDSO sur une surface présentant un film continu d'enzyme a confirmé notre choix : des gouttes coalescentes déposées sur substrat hydrophile (silicium traité par un plasma d'oxygène)

ne permettent absolument pas l'adhérence du film au substrat, la désorption des enzymes recouvertes par le film entraînant son décollement (Annexe 7).

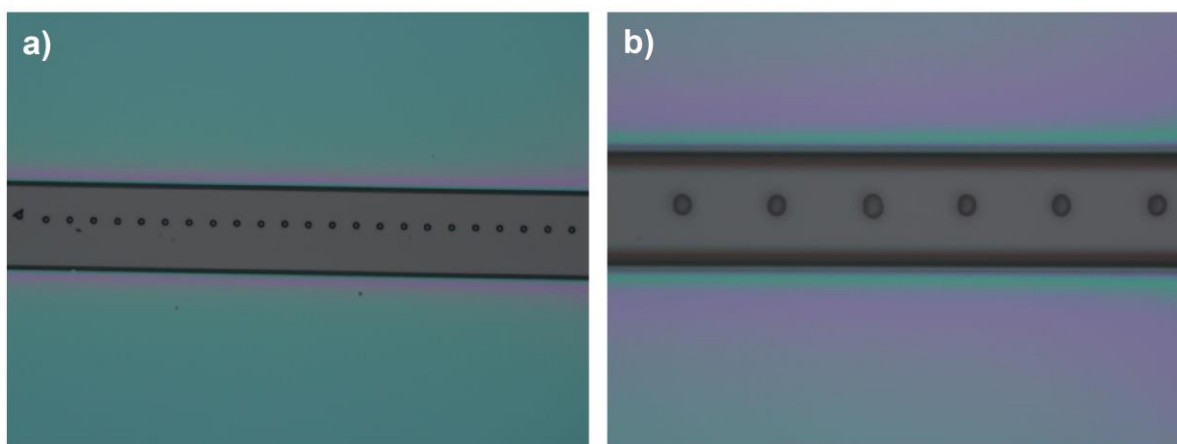


Figure 43. Clichés optiques présentant la structure résine-ppTMDSO-β-galactosidase vue de dessus en prévision de canaux de a) 250 μm et b) 100 μm de largeur.

Etape « résine-ppTMDSO-β-galactosidase-ppTMDSO »

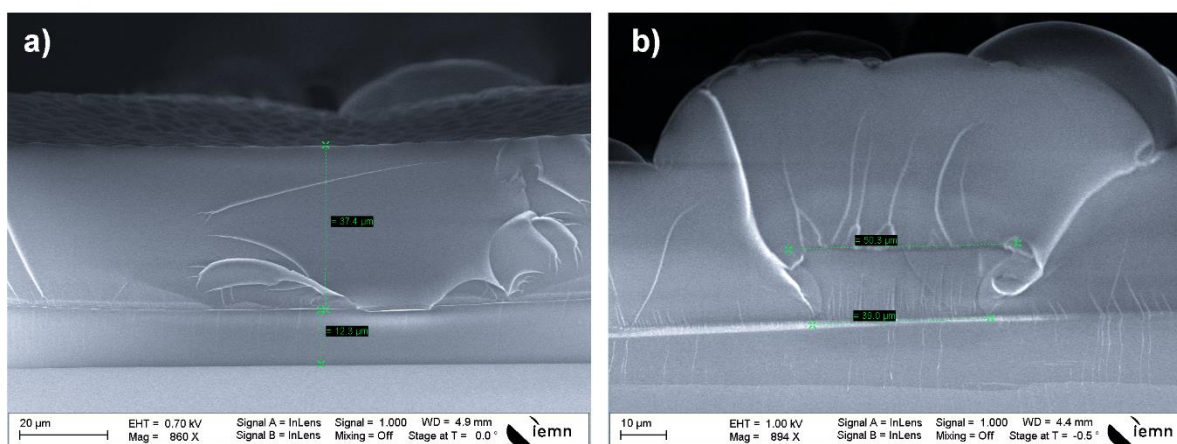


Figure 44. Clichés obtenus par MEB de tranches de la structure finale après clivage transversal. a) Le capot de ppTMDSO d'une épaisseur de 37 μm recouvre la résine d'une douzaine de micromètres. b) En raison du profil « casquette », la largeur supérieure de la résine atteint 50 μm alors que sa largeur inférieure se limite à environ 40 μm.

Un capot de ppTMDSO est ensuite réalisé par un dépôt d'une trentaine de micromètres de polymère sur la structure résine-polymère-enzyme (Figure 44). Les paramètres de dépôt, indiqués section 2.4.2.4.1., sont rappelés dans un tableau récapitulatif (Annexe 4). Nous avons opté pour une épaisseur relativement élevée (plus de deux fois l'épaisseur de résine) afin d'éviter des contraintes de cisaillement et assurer une bonne résistance mécanique à la

dissolution de la résine (la tension de vapeur de l'acétone peut sensiblement affaiblir le capot) et à la circulation microfluidique.

Libération des canaux par dissolution de la résine et circulation microfluidique

A l'aide de l'acétone comme révélateur, l'évacuation de la résine des canaux par dissolution (pendant quelques heures selon la taille des canaux) a pu être accomplie et la circulation microfluidique permise (Figure 45). Cette dernière s'effectue par capillarité après dépôt d'une goutte de liquide dans le réservoir à l'entrée du canal.

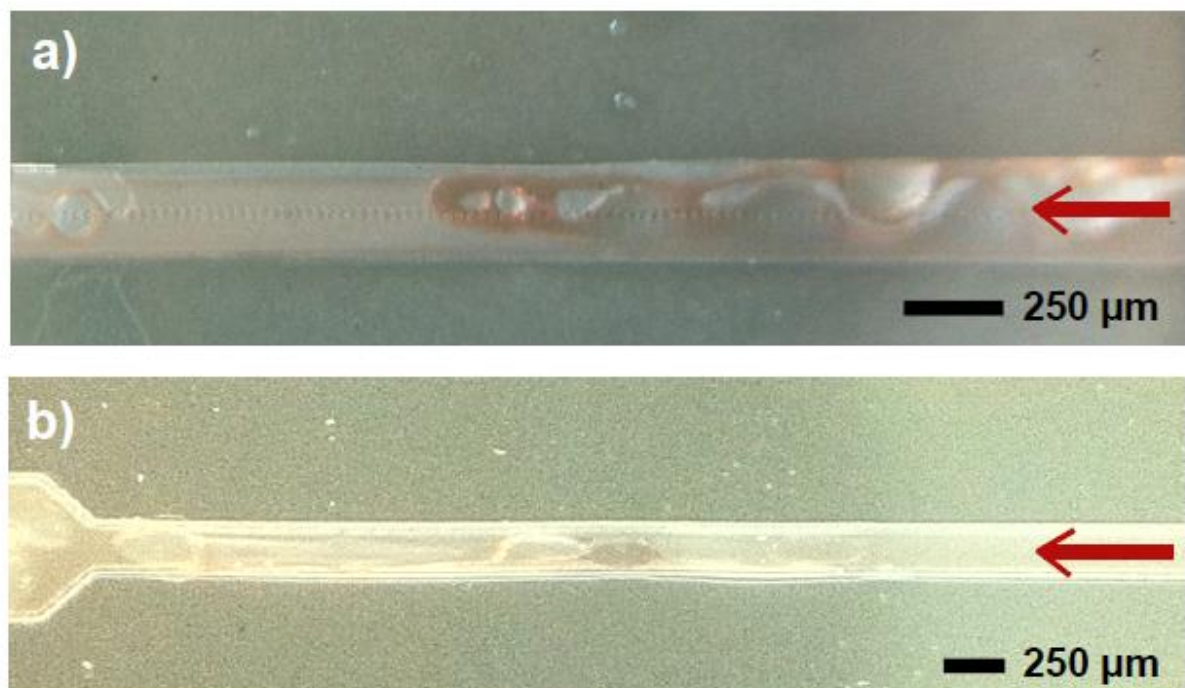


Figure 45. Images optiques illustrant l'évacuation de la résine des microcanaux par dissolution à l'acétone. a) La résine se dissout progressivement et ne semble pas affecter la structure des spots d'enzyme. b) L'entrée du canal à droite de l'image est libérée de la résine. Le sens de progression du solvant est schématisé par la flèche rouge.

Synthèse

La mise en place d'un procédé de microfabrication demande en général l'utilisation de nombreux bâtis et la réalisation de quelques étapes délicates, alors qu'elles sont parfois manuelles comme l'alignement ou le collage. Parmi les techniques dominantes, on connaît les techniques de gravure et les procédés de réplcation basés sur le moulage à base d'un matériau polymère. Les principaux inconvénients de ces techniques sont leur faible flexibilité pour une

adaptation à différents matériaux pour la couche inférieure, la nécessité d'utiliser plusieurs masques photolithographiques (ce qui multiplie les étapes coûteuses en temps) et donc la nécessité d'utiliser des méthodes d'alignement et de liaison des différentes couches fabriquées. Généralement, ces différentes étapes nécessitent en outre divers traitements thermiques ou chimiques pouvant conduire au désalignement d'une tranche par rapport à une autre. A la lecture de ces contraintes, la technique qui permet une fabrication simple, rapide et peu coûteuse de microcanaux sur un côté d'une tranche de silicium ou de quartz est la technique utilisant un matériau sacrificiel.

Dans le but de concevoir un microréacteur à enzyme immobilisé, cette technique utilisant une résine sacrificielle a été mise à profit dans ce travail. L'originalité par rapport aux autres techniques de fabrication d'IMERs repose sur la contraction du nombre des opérations du procédé de fabrication et l'incorporation précise de l'élément biologique pendant son déroulement. En effet, l'objectif était de réaliser des structures microfluidiques incorporant un enzyme de façon à limiter les étapes courantes en (i) microfabrication et (ii) immobilisation enzymatique. D'une part, la réalisation des canaux a autorisé une alternative à des étapes longues et coûteuses. D'autre part, le protocole d'immobilisation enzymatique par voie sèche a permis d'éliminer certaines étapes utilisant des solvants, étapes couramment rencontrées dans les protocoles de greffage d'enzymes suivant une fonctionnalisation de surface. Enfin, mentionnons que la faisabilité et la preuve de concept du protocole de microfabrication *bio-intégrante* demandent à être étendues à une validation d'un point de vue catalytique. En effet, si la circulation microfluidique au sein de la structure a été démontrée dans ces conditions, des essais catalytiques et des analyses cinétiques confirmeront l'intérêt que portent les microcanaux réalisés selon cette méthodologie.

Références

- [1] Wong L. S., Khan F., Micklefield J., "Selective covalent protein immobilization: strategies and applications", *Chem. Rev.*, **109**, 2009, 4025–4053.
- [2] Sassolas A., Blum L. J., Leca-Bouvier B. D., "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors", *Biotechnol. Adv.*, **30**, 2012, 489–511.
- [3] Sheldon R. A., van Pelt S., "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how", *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 2013, 6223–6235.

- [4] Rusmini F., Zhong Z., Feijen J., "Protein immobilization strategies for protein biochips", *Biomacromolecules*, **8**, 2007, 1775–1789.
- [5] Siow K. S., Britcher L., Kumar S., Griesser H. J., "Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization – A review", *Plasma Process. Polym.*, **3**, 2006, 392–418.
- [6] Ghasemi M., Minier M. J. G., Tatouliau M., Chehimi M. M., Arefi-Khonsari F., "Ammonia plasma treated polyethylene films for adsorption or covalent immobilization of trypsin: quantitative correlation between X-ray photoelectron spectroscopy data and enzyme activity" *J. Phys. Chem. B*, **115**, 2011, 10228–10238.
- [7] Abbas A., Vercaigne-Marko D., Supiot P., Bocquet B., Vivien C., Guillochon D., "Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **73**, 2009, 315–324.
- [8] Gancarz I., Bryjak J., Bryjak M., Pozniak G., Tylus W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization I. Allyl alcohol plasma", *Eur. Polym. J.*, **39**, 2003, 1615–1622.
- [9] Gancarz I., Bryjak J., Pozniak G., Tylus W., "Plasma modified polymers as a support for enzyme immobilization II. Amines plasma", *Eur. Polym. J.*, **39**, 2003, 2217–2224.
- [10] Thomsen M. S., Nidetzky B., "Microfluidic reactor for continuous flow biotransformations with immobilized enzymes: the example of lactose hydrolysis by a hyperthermophilic β -glycoside hydrolase", *Eng. Lif. Sci.*, **8**, 2008, 40–48.
- [11] Pereira-Medrano A. G., Forster S., Fowler G. J. S., McArthur S. L., Wright P. C., "Rapid fabrication of glass/PDMS hybrid μ IMER for high throughput membrane proteomics", *Lab Chip*, **10**, 2010, 3397–3406.
- [12] Song Y. S., Shin H. Y., Lee J. Y., Park C., Kim S. W., " β -Galactosidase-immobilised microreactor fabricated using a novel technique for enzyme immobilisation and its application for continuous synthesis of lactulose", *Food Chem.*, **133**, 2012, 611–617.
- [13] Wu T., Suzuki H., Su Y., Tang Z., Zhang L., Yomo T., "Bio-inspired three-dimensional self-patterning of functional coatings for PDMS microfluidics", *Soft Matter*, **9**, 2013, 3473–3477.
- [14] Abbas A., Supiot P., Mille V., Guillochon D., Bocquet B., "Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized TMDS for fluidic MEMS technology", *J. Micromech. Microeng.*, **19**, 2009, 045022.
- [15] Abbas A., Supiot P., Guillochon D., Bocquet B., "Method for making microchannels on a substrate, and substrate including such microchannels", WO/2010/097548, 2010.

Chapitre 4

Conclusions et perspectives

Chapitre 4

Conclusions et perspectives

Ce chapitre clôture le manuscrit suivant deux axes. Le premier propose un récapitulatif des résultats obtenus durant ce travail de thèse. Il rappelle notamment les concepts majeurs qui ont été développés dans un souci d'interdisciplinarité. En premier lieu, des éclairages essentiels soulignent les potentialités de la microfluidique comme outil de préparation de molécules d'intérêt. Les éléments apportés tentent de répondre à la problématique posée en s'inscrivant dans une démarche allant de la compréhension vers l'intensification de procédés. Dans le même esprit, les aspects technologiques ayant trait à la conception de microdispositifs à enzymes immobilisés sont ensuite rappelés. Enfin, en mentionnant les efforts parallèles de développement d'un système analytique intégré, des perspectives d'études sont soumises, qu'elles soient transversales ou intrinsèques à chaque thème. De façon plus générale et au travers de nos résultats, les éléments de réponse rapportés dans le deuxième axe comme conclusion générale espèrent répondre aux interrogations soulevées en introduction du manuscrit.

Synthèse du manuscrit – conclusion préliminaire

Etude microcinétique de la catalyse enzymatique en microréacteur

La première partie de ce manuscrit visait à asseoir la problématique posée en établissant un rapport bibliographique touchant aux principaux thèmes abordés. Celui-ci a d'abord permis de dégager un bref état de l'art de la technologie microfluidique en catalyse, notamment enzymatique. En soulignant les potentialités importantes de la microfluidique en génie des procédés, les travaux entrepris ont alors tenté d'apporter un éclairage utile à la mise en œuvre d'enzymes en microréacteurs. Au travers de la première étude traitant de la détermination de paramètres cinétiques, il est ainsi rappelé que les phénomènes de mélange à cette échelle sont gouvernés par l'hydrodynamique laminaire mêlant diffusion et convection. Au sein de tels écoulements, la compartimentalisation (initiale) des réactifs conjuguée au phénomène de dispersion souligne la singularité du microréacteur comme outil fonctionnant en flux continu. La compréhension et le contrôle de ces phénomènes peuvent permettre de mieux appréhender certaines réactions et de mieux maîtriser le procédé de préparation d'un produit par voie

microfluidique. La modulation de la cinétique réactionnelle créée dans notre étude est en effet typiquement reliée au dimensionnement du microréacteur et aux conditions d'écoulement. Dans un esprit de production, la grande panoplie des paramètres pouvant être optimisés (particulièrement les dimensions du réacteur) permet d'entrevoir une large fenêtre d'optimisation de certains procédés biocatalytiques. En effet, compte-tenu des mécanismes réactionnels impliqués dans des réactions comme la protéolyse enzymatique, une modification de la cinétique peut entraîner une modification de la sélectivité.

Dans le cas de la protéolyse enzymatique, la recherche de conditions permettant d'affecter la sélectivité de la réaction était justement visée. La modulation cinétique créée dans les conditions du réacteur microfluidique a permis de moduler en conséquence la sélectivité cinétique de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine par la pepsine porcine. Une approche stochastique a alors été appliquée à la modélisation de la protéolyse en microréacteur afin de rendre compte d'une démarche statistique autorisant une meilleure appréciation des résultats expérimentaux. En affectant la cinétique d'apparition de certains peptides, l'emploi d'un microréacteur suggère qu'il constitue un outil adapté à la mise en œuvre de réactions protéolytiques en permettant d'entrevoir une maîtrise plus fine de sa cinétique. Il démontre aussi que la préparation de peptides avec une sélectivité améliorée et dans des conditions intensifiées est possible (par rapport au *batch*).

La microfluidique comme outil pour l'écoconception de procédés couplés

Rappelons que l'utilisation d'un réacteur à flux laminaire permet de travailler dans des conditions de flux continu. Ainsi, à la lecture de la modulation de la sélectivité cinétique de la protéolyse, un couplage de la réaction enzymatique à la séparation sélective d'un peptide a été élaboré. Il visait à tirer profit du régime d'écoulement et du flux continu afin d'opérer une extraction continue d'un peptide opioïde issu de l'hydrolyse pepsique de l'hémoglobine bovine tout en recyclant le solvant d'extraction. La préparation de l'hémorphine LVV-h7 a été réalisée en une étape par le couplage de la réaction protéolytique à deux extractions liquide-liquide consécutives couplées : la première par l'octan-1-ol suivie de la seconde par l'eau acidifiée. La récupération du peptide LVV-h7 a montré une haute sélectivité ainsi qu'une pureté élevée du produit, indiquant que des stratégies de purification de peptides à partir de mélanges peptidiques complexes comme les hydrolysats sont possibles. La preuve de concept décrite permet effectivement d'envisager la mise en place de procédés continus de type réaction-séparation

traitant de la purification de molécules à haute valeur ajoutée. Alors que les stratégies d'enrichissement en peptides (purification partielle) satisfont généralement certaines demandes comme ce peut être parfois le cas dans le domaine agroalimentaire, le mode de travail expérimenté permet de répondre à des attentes plus spécifiques en termes de pureté que l'on retrouve souvent en cosmétique ou chez les industries pharmaceutiques. Le concept développé propose par ailleurs la possibilité de recycler le solvant d'extraction en boucle fermée, ce qui autorise une diminution drastique du volume de solvant en comparaison avec un procédé *batch*. Ainsi, des considérations économique et environnementale sont susceptibles d'être satisfaites. Elles constituent le point d'orgue de l'intensification de procédés.

Immobilisation d'enzyme et plasma froid pour le développement de réacteurs microstructurés

La deuxième grande partie bibliographique s'est attachée à exposer la technologie des plasmas pour l'immobilisation d'enzymes en mettant l'accent sur l'utilisation des plasmas froids. En prenant en compte les avantages de travailler en microréacteur à flux continu, l'élaboration d'une méthodologie d'immobilisation enzymatique a été entreprise. Elle a sollicité une étape de polymérisation assistée par plasma d'un précurseur organosilicié. L'utilisation de la technologie des plasmas froids s'est justifiée au travers de sa spécificité (i) dans l'obtention de revêtements fonctionnels mais aussi (ii) comme outil de microfabrication de canaux microfluidiques. En premier lieu, la conception de surfaces bioactives était visée. L'élaboration d'un protocole rapide, simple et s'intégrant aisément dans les processus de microfabrication les plus courants a été réalisé. Le piégeage stérique de la β -galactosidase par un film de ppTMDSO d'une centaine de nanomètres a ainsi été effectué par voie sèche avec succès. Comme second objectif, les propriétés de microstructuration du polymère de TMDSO ont permis d'étendre le protocole d'immobilisation mis au point au développement d'un protocole de fabrication *bio-intégrante* de microcanaux. Rappelons que l'on entend par le terme « *bio-intégrante* » l'intégration d'un élément biologique, ici l'enzyme, pendant le protocole de fabrication. Via l'usage d'outils adaptés (à cet effet mentionnons l'impression 3D), cette approche tend à diminuer le temps du protocole dans son ensemble tout en permettant une maîtrise accrue de l'incorporation de l'élément biologique. L'étape de dépôt de matériel biologique s'avère également particulièrement cruciale lors du développement de systèmes de type biocapteur, systèmes dans lesquels l'élément biologique est immobilisé à proximité du transducteur physique du signal.

Développement d'un système électromagnétique intégré : potentialité des ondes térahertz

L'intégration d'un système électromagnétique à un réacteur microfluidique peut tout d'abord servir à satisfaire des besoins d'ordre analytique. Nous avons relaté en introduction et dans le chapitre bibliographique l'importance de bénéficier de systèmes de détection. Une analyse en temps réel permet effectivement une acquisition de données cruciales affinant particulièrement les étapes d'optimisation et améliorant potentiellement le suivi, la sûreté voire la sécurité d'un procédé. La technologie microélectronique facilite l'intégration d'éléments d'analyse au sein d'une plateforme microfluidique, qu'elle constitue un microréacteur ou non. Des antécédents dans les trois laboratoires montrent que l'intégration d'un tel élément a fait l'objet d'un fort développement avec comme objectif la mise au point d'un système d'analyse aux fréquences sub-térahertz. Les propriétés des ondes à ces fréquences permettant une spectroscopie non invasive et en temps réel, ce système montre ainsi une potentialité intéressante dans le suivi cinétique de réactions biocatalytiques. Le passage des ondes émises au travers d'un microcanal est une solution technologique développée en raison de la forte absorption de l'eau à ces fréquences. Physiquement, le traitement des données permet d'apprécier le phénomène d'hydratation à l'échelle moléculaire. Cette étude a notamment fait l'objet d'une publication (Annexe 1).

Outre l'aspect spectroscopique relevant du caractère analytique, une dimension originale peut être donnée à la technologie mise au point. En effet, l'énergie transmise aux molécules circulant dans le microcanal est de nature à interagir avec les liaisons de faibles énergies telles les liaisons hydrogène. En considérant la couche d'hydratation comme une caractéristique primordiale intervenant dans la stabilité structurale de molécules, il est possible de penser qu'une interaction onde THz-molécule influence plus ou moins sensiblement la structure tridimensionnelle des molécules circulant dans le canal microfluidique. Ainsi, il peut être envisagé une autre forme de technologie réactionnelle afin d'orienter la sélectivité de la protéolyse enzymatique : affecter la conformation d'une protéine par un rayonnement térahertz peut être imaginé comme un moyen de moduler la cinétique et donc la sélectivité de la réaction. Cet outil pourrait ainsi être vu comme une forme originale de « pilotage réactionnel » en temps réel.

Perspectives générales

La convergence des différentes orientations exprimées dans ce travail permet d'imaginer diverses poursuites d'études et d'expérimentations. Rappelons que les enjeux majeurs regroupent (i) la maîtrise de la cinétique et de la sélectivité des réactions protéolytiques, (ii) le couplage de procédés enzymatiques à des procédés séparatifs, (iii) l'écoconception de procédés séparatifs raisonnés, (iv) le développement de techniques analytiques intégrées, (v) l'immobilisation de l'enzyme ou encore (vi) la conception de microréacteurs enzymatiques.

Tout d'abord, il paraît nécessaire de poursuivre les efforts de compréhension des cinétiques enzymatiques en réacteur microfluidique. Une approche microcinétique plus poussée passant par des simulations dynamiques du comportement des espèces au sein de microréacteurs affinerait notre compréhension. Cette démarche permettrait de compléter des informations acquises par la voie expérimentale tout en proposant un moyen efficace d'optimiser les paramètres en jeu (dimensions des réacteurs, débits optimaux à appliquer, optimisation de la concentration des réactifs pour assurer une conversion maximale...). Naturellement, elle passe par une diversification des compétences et des spécialistes.

Plus spécifiquement à la réaction de protéolyse enzymatique, la détermination précise de la cinétique d'apparition de différents peptides devrait être une orientation intéressante. En effet, en jouant sur la sélectivité cinétique de la réaction, il s'agirait de déterminer si la préparation de certains peptides est plus pratique et efficace en microréacteur que dans des installations classiques. Dans une optique de préparation, il serait attrayant de vérifier si la productivité de certains peptides pourrait être améliorée, en prenant en compte que l'augmentation des volumes de production passe par la parallélisation des unités réactionnelles. Enfin, par extension, le microréacteur pourrait potentiellement jouer le rôle d'un outil de screening rapide de peptides générés à partir de réactions protéolytiques.

Le couplage de l'opération de protéolyse à des opérations de séparation sélective de peptides ou populations de peptides mérite également d'être étudié davantage. Le bénéfice de travailler en flux continu offre en effet la possibilité de coupler voire d'intégrer diverses micro-opérations séparatives au réacteur microfluidique. Des procédés d'extraction liquide-liquide peuvent notamment être étudiés pour récupérer d'autres peptides sur la base du concept développé dans ce travail. Ceci dit, la versatilité d'un procédé de fabrication d'un microréacteur permet

d'imaginer toute sorte de structures et de *designs* afin d'intégrer diverses fonctions de séparation de produits mais aussi de mélange ou encore d'analyse.

Les motivations originelles de détection d'interactions moléculaires par spectroscopie térahertz s'inscrivent dans ce contexte. La potentialité de ce mode de détection dans le suivi de réactions enzymatiques passe par l'utilisation d'une technologie simple à base de guides d'ondes mise au point dans notre laboratoire. La conception indépendante de la fonction électromagnétique guidée et du circuit microfluidique (assemblage des substrats en amont de la gravure des canaux) confère un avantage notable à la technologie mise au point. Elle peut ainsi être intégrée à des microréacteurs afin, dans un premier temps, de déterminer les entités et paramètres observables dans des conditions de réaction. A l'heure actuelle, le point critique de cette spectroscopie à basse fréquence (domaine sub-térahertz de l'ordre de 0.1 THz) reste la sensibilité envers les entités trop fortement diluées. Dans un premier temps, l'augmentation de la sensibilité des mesures pourrait être améliorée par l'immobilisation de l'enzyme à proximité du transducteur physique qui est une ligne de propagation métallique, la ligne de Goubau.

La méthodologie d'immobilisation développée dans notre travail est susceptible d'être mise à profit dans ce dernier cas. Elle a notamment été conçue afin d'être compatible avec le procédé de microfabrication du microsystème d'analyse térahertz. Dans cette optique, la localisation du dépôt de l'enzyme d'intérêt pourrait être réalisée à l'aide du système d'impression jet d'encre déjà employé dans notre travail¹⁶ car la ligne de propagation électromagnétique est nanométrique. Cette perspective introduit le concept d'un système où un biocapteur serait couplé à un microréacteur. Cette synergie microréacteur-biocapteur s'inscrit dans l'évolution des réacteurs microfluidiques comme réacteurs microstructurés avancés assurant les rôles primordiaux de réaction, détection et séparation. Ce tryptique, présenté au chapitre 2.3.4.3.3., résume bien la mutation qui se profile dans les domaines de la (bio)catalyse et des biotechnologies.

Enfin, il apparaît primordial de tester les performances des réacteurs à enzyme immobilisé fabriqués en ppTMDSO. Si leur conception *bio-intégrante* a pu être réalisée avec succès, des tests d'activité confirmeront l'intérêt de cette méthodologie de conception. L'emploi de nouveaux matériaux encore mieux adaptés et plus flexibles pourrait permettre de maîtriser

¹⁶ Dépôt d'enzyme au niveau de la résine sacrificielle détaillée dans la section 3.3.2.

d'avantage certaines étapes ou certains paramètres. L'utilisation de plasmas atmosphériques permettrait également de minimiser le temps de travail ou d'augmenter la cadence des expérimentations tout en s'affranchissant d'un système de pompage énergivore, coûteux et souvent bruyant.

Conclusion générale – l'intensification des procédés passe par...

...la miniaturisation des réacteurs

Le cœur de notre démarche consistait notamment à tendre vers une intensification des procédés mis en jeu. Rappelons que des enjeux essentiels motivent le développement de l'intensification des procédés (Figure 39). La *compétitivité des industries chimiques et biotechnologiques* est notamment engagée sur ce terrain. L'intensification des procédés autorise potentiellement une meilleure occupation de l'espace ainsi qu'une durée de traitement et un coût réduits. Elle permet de produire des substances généralement à haute valeur ajoutée en s'engageant à conserver un niveau de production élevée ou en procédant à la demande. Ces améliorations profondes devraient permettre de réduire une méfiance sociétale croissante qui semble exister vis-à-vis des industries « lourdes » et améliorer en même temps leur image par une prise de conscience de l'impact des activités humaines sur l'environnement et par extension sur la santé humaine. Ainsi, le *développement durable* se pose comme un autre enjeu de taille. De ce point de vue, l'impact le plus immédiat concerne la sûreté des installations industrielles, ce qui concerne plutôt l'industrie chimique. La mise en œuvre de microréacteurs vise pour l'instant essentiellement la conduite de réactions dangereuses comme celles fortement exothermiques ou encore explosives. À terme, l'intensification pourra néanmoins répondre à d'autres défis comme la maîtrise des consommations énergétiques, des consommations de matières et autres solvants toxiques, la réduction des émissions et des déchets ainsi que la préservation des ressources naturelles.

Les microdispositifs peuvent prétendre à l'intensification de procédés de différentes manières. La démarche classique consiste à opérer des transferts de procédés d'une échelle macroscopique vers une échelle miniaturisée sans en changer la nature. Elle vise essentiellement à améliorer un procédé existant en intensifiant les conditions opératoires mais sans changer la nature même du procédé. L'objectif principal est en premier lieu et généralement d'augmenter la productivité de celui-ci. Une autre démarche est permise par la spécificité des conditions microfluidiques

notamment caractérisée par une grande surface de contact interfaciale. Elle concerne la mise en œuvre de procédés originaux voire nouveaux régis par des phénomènes de transfert plus difficiles ou délicats à atteindre en conditions macroscopiques (évacuation thermique, forte pression...). Elle concerne par ailleurs l'implantation d'appareils permettant de combiner, de coupler ou d'intégrer plusieurs opérations (réactions, opérations de séparations diverses, détection de différentes natures) au sein d'un même équipement voire sur un même support.

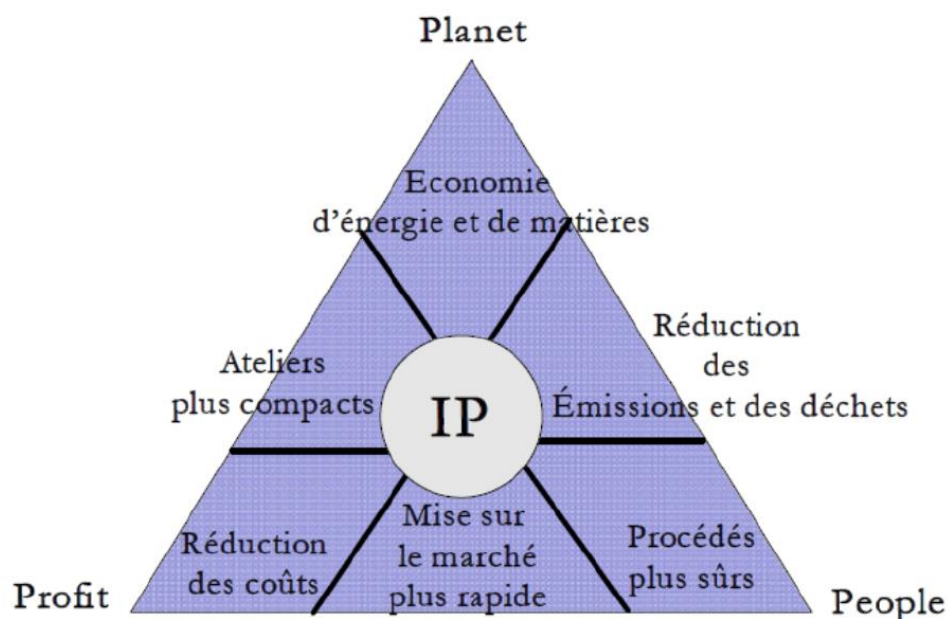


Figure 39. L'intensification des procédés (IP) et ses enjeux essentiels encadrés par le concept des 3P (People, Planet, Profit).

La problématique de la montée en échelle pour l'augmentation de la production se pose alors différemment à l'échelle de la microfluidique. En effet, les approches envisageables sont (i) le dimensionnement du réacteur¹⁷ et (ii) la parallélisation des réacteurs optimisés.

Les microprocédés ont pour objectif d'ouvrir des possibilités nouvelles pour la recherche aussi bien que pour l'industrie en s'inscrivant dans une démarche de qualité, de sécurité, d'innovation et d'intensification. Cependant, encore aujourd'hui, le développement de microsystèmes nécessite des investissements que peu d'institutions de recherche publique peuvent supporter seules. C'est pourquoi la multiplicité des preuves de concept dans ce domaine peut servir à démocratiser la pratique des microprocédés chimiques. Par ailleurs, des tests répétés en

¹⁷ Cette approche reste limitée dans le but de maintenir des conditions d'écoulement propices.

laboratoire et au niveau pilote sont aujourd'hui nécessaires pour valider les performances de ces nouveaux outils potentiels de production et estimer leurs véritables avantages techniques et leur intérêt économique par rapport aux procédés existants. Au-delà des enjeux scientifiques, l'implantation de ces dispositifs dépendra notamment des bénéfices économiques qui pourront en être tirés par rapport à des installations souvent déjà en place. Aujourd'hui, le marché principal de cette technologie émergente est celui de l'industrie chimique (raffinage pharmaceutique, cosmétique) et commence à percer dans les secteurs des biotechnologies et de l'environnement. A plus long terme, la technologie des microréacteurs pourrait également atteindre le secteur agroalimentaire.

Enfin, rappelons que l'optimisation des paramètres réactionnels à l'échelle laboratoire reste une étape clef reposant notamment sur l'aspect analytique et la caractérisation du flux sortant. L'intégration d'éléments analytiques, permise par les microtechnologies, est susceptible d'offrir une analyse en ligne précieuse à l'optimisation, au contrôle constant et rapide des procédés mis en œuvre et donc à la sécurité. Cette approche permet par ailleurs d'envisager l'introduction d'outils et d'éléments de contrôle inhérent à l'automatisation d'un procédé lors du transfert de technologie vers les échelles pilote et industrielle.

...l'intégration de fonctions utiles à la maîtrise et au pilotage de micro-opérations

Outre les bénéfices liés à la miniaturisation, le couplage de la technologie microfluidique avec différentes techniques permet d'accéder à une palette plus large d'outils. Citons par exemple le couplage avec les techniques d'activation pour le chimiste (photochimie, microondes...) ou encore avec des éléments chauffant ou d'analyse. Cette vision propose une sophistication des dispositifs microfluidiques afin de (i) permettre des expérimentations multiparamétriques utiles à l'optimisation d'un procédé et (ii) tendre vers des plateformes multifonctionnelles. A terme, il est en effet imaginable que la *quasi*-totalité du procédé de préparation d'un produit soit prise en charge au sein d'une même plateforme microfluidique (réaction (bio)catalytique, purification du produit, analyse du degré de pureté...). Cette vision repose aussi sur une stratégie de réduction des coûts de production et de maintenance de procédés apparentés traditionnels. Paradoxalement, un frein à ce développement repose toutefois sur le coût encore relativement élevé de tels investissements et à leur faible implantation au niveau industriel et académique.

Parallèlement, l'intensification des procédés devrait se faire grâce au développement des techniques de modélisation et de conception assistée par ordinateur des procédés. La compréhension et la maîtrise des phénomènes physico-chimiques à cette échelle est effectivement primordiale.

...le développement de méthodologie et de protocoles adaptés aux enjeux posés

Sur la base des enjeux posés par la démarche d'intensification (Figure 1), des protocoles/méthodologies propices ou adaptés à certaines contraintes se développent. Lorsqu'ils interviennent dans la conception de microsystèmes, ils peuvent toucher à différents niveaux et en réponse à diverses motivations. Parmi ces dernières, citons comme exemples (i) la contraction des étapes de fabrication, (ii) la volonté de travailler dans des conditions plus « propres » et moins énergivores en temps, coût et matière, (iii) la nécessité de travailler avec de nouveaux matériaux et (iv) l'assemblage/ l'intégration de matériaux de différentes natures (dont de nature biologique) à l'échelle microscopique.

Malgré les évolutions récentes des techniques de microfabrication, des améliorations restent nécessaires pour permettre aux microdispositifs de s'implanter à coût réduit, en particulier sur la nature des matériaux employés et sur les méthodes de conception. Dans ce contexte, rappelons certains avantages de la technologie plasma employée dans ce travail :

- travail à température ambiante ;
- disponibilité des matériaux (nombreux monomères organosiliciés et organiques) ;
- matériaux formés généralement biocompatibles ;
- pas de couche d'adhésion nécessaire, pas de collage ni d'alignement.

Une intensification des procédés de conception assistés par plasma peuvent apporter encore davantage de bénéfices comme le travail à pression atmosphérique ou l'utilisation de microjets plasma.

Face aux nouveaux enjeux économiques et environnementaux, la mise au point de nouvelles méthodes et le développement de protocoles faisant appel à une chimie plus « verte » se posent parmi les solutions technologiques et techniques. Le défi touche non seulement la fabrication des outils eux-mêmes mais aussi les phases de développement associées à leur utilisation et aux applications visées. En effet, outre les aspects de microfabrication, la diminution d'émission de

déchets et de l'emploi de solvants conjuguée à la recherche de nouvelles voies de synthèse et de préparation s'inscrit également dans ce contexte.

En conclusion, le domaine des microsystemes doit entrer dans une phase de maturation où un tri devra s'effectuer parmi le grand nombre de technologies et de matériaux disponibles. Des systèmes de liaison entre échantillons macroscopiques et microsystemes devraient également faire l'objet de développements de plus en plus concrets. En considérant l'évolution impressionnante des dispositifs miniaturisés dans le secteur de l'analyse et de la santé (biocapteurs, BioMEMS, Lab on Chips...), il n'est pas impossible d'entrevoir une augmentation significative de l'utilisation de microréacteurs avancés. En effet, la rupture technologique qu'ils proposent par rapport à des installations réputées traditionnelles est susceptible d'apporter de nombreux bénéfices, ce que symbolise la formule « *smaller, cheaper, safer* ». Du point de vue de l'utilisateur, il existe toutefois une forme de conservatisme liée au manque de visibilité, ce qui peut freiner le développement de tels outils. Le défi est d'opérer les bons changements et d'élaborer des choix stratégiques dès maintenant afin de rester compétitif au cours des prochaines années et de prétendre à une petite part du grand marché des nouvelles technologies.

Annexes

Annexe 1

Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem

Simon Laurette, Anthony Treizebre, Adil Elagli, Basak Hatirnaz, Renato Froidevaux, Frédéric Affouard, Ludovic Duponchel, Bertrand Bocquet

RSC Adv., **2**, 2012, 10064–10071

Cite this: *RSC Advances*, 2012, 2, 10064–10071www.rsc.org/advances

PAPER

Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem

Simon Laurette,^a Anthony Treizebre,^a Adil Elagli,^{ad} Basak Hatirnaz,^{ab} Renato Froidevaux,^d Frederic Affouard,^c Ludovic Duponchel^b and Bertrand Bocquet^{*a}

Received 29th June 2012, Accepted 23rd August 2012

DOI: 10.1039/c2ra21320f

We herein present a microfluidic system dedicated to THz spectroscopy of aqueous solutions. This device is able to reach a state of the art sensitivity of 5 mg mL⁻¹, while requiring only small sample quantities and a low power source. Hydration of BSA, lysozyme and chymotrypsin proteins is studied inside microchannels and hydration numbers are computed, showing that the developed system is well suited for quantitative analysis. Moreover, coupled with advanced chemometrics algorithms, this system can become a tool for fundamental research and for the understanding of biochemical processes. Here, the hydration shell structure is discussed by chemometric analysis of the measured absorption spectra. Two spectral behaviours are observed and can be explained by Molecular Dynamics simulations. This methodology could be considered as a key element of a lab-on-a-chip for biological liquid metrology.

Introduction

Terahertz spectroscopy, which deals with electromagnetic waves in the 100 GHz–10 THz frequency band,¹ is now known to be of great interest to the biological and chemical sciences.^{2,3} Numerous studies have shown that terahertz waves could detect molecular signatures in gases, distinguish healthy and cancerous tissues⁴ or probe DNA hybridization.⁵ Conformational changes in proteins can also be observed with this real-time, marker-free and non-ionizing technique.^{6,7}

However, studying liquids with THz waves is difficult due to the significant THz absorption by water, resulting from the excitation of both water dipolar moments and the hydrogen bond network. For instance, sending a 1 THz wave through a 1 mm-wide water sample divides its power by 10⁹. To circumvent this problem it is possible to use more powerful THz sources,⁸ with however the risk of sample heating. Performing reflection spectroscopy is another way to overcome this issue but data extraction, based on the reflected signal phase analysis, is complex.^{9,10} Finally, a third way is to reduce the sample volume, which enables us to perform transmission measurements with the usual integrable and low-power sources.^{11–14} In this case, accurate volume control of the solutions is needed and this is

why microfluidic systems have already been proposed to perform THz spectroscopy.^{15–17}

Here, we demonstrate that integrating THz waveguides directly into the microfluidic system makes it possible to reach a higher sensitivity than previously developed microfluidic systems dedicated to THz spectroscopy, in which the spectroscopy and fluidic aspects are less intimately integrated. With this configuration, it is possible to get sensitivity in the state of the art conventional setups, with the added benefits brought by microfluidics: (i) to consume small sample quantities, (ii) to accurately control sample injection and measurement in a real-time way and (iii) to be integrated in a multiparametric, multiprobe and multifunctional microfluidic platform.

Previous studies have shown that protein hydration, which is the interaction between a protein and water, plays an important role in protein function.^{18,19} Moreover, intermolecular interactions of hydrated proteins with sugars could be involved in the fascinating biopreservation phenomenon.^{20,21} Studying hydration with THz spectroscopy has been done previously and has shown that the behaviour of water molecules changes in the vicinity of the protein.^{22,23} These water molecules are usually referred to as “bound water” or “hydration water”, whereas water molecules far from the proteins are designated as “bulk water”. The bound water properties depend on protein surface chemistry, as the water behaviour around the hydrophilic and hydrophobic sites is different. Furthermore, backbone and side-chain hydration regions are also expected to be distinguishable.²⁴ From a THz spectroscopy point of view, the absorption of the hydration water decreases, compared to bulk water, due to the rigidity of the hydrogen bonds, which is increased between protein and water.^{9,25–29} However, some studies show that the hydration shell absorption around proteins seems to increase due to collective vibrations.^{30,31} A clear understanding of these

^aInstitute of Electronics Microelectronics and Nanotechnology (IEMN) - UMR CNRS 8520, University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France.

E-mail: bertrand.bocquet@univ-lille1.fr

^bRaman and Infrared Spectroscopy Laboratory (LASIR) - UMR CNRS 8516, University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

^cUnité Matériaux et Transformations (UMET) - UMR CNRS 8207 - UFR de Physique - Bat P5 - University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

^dLaboratory of Biological Processes, Enzymatic and Microbial Engineering (ProBioGEM EA 1026), University of Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

phenomena requires more THz measurements, comparison with other spectroscopy techniques and the use of computational molecular dynamics simulations.

This paper deals with sub-THz measurements on aqueous solutions of lysozyme and Bovine Serum Albumin (BSA), which are commonly used in THz spectroscopy. First, the microsystem used will be presented. Then, measurement sensitivity will be discussed and the measured data will be used to characterize the hydration of the two proteins by computing their hydration number (number of water molecules in the hydration shell). In a third part, chemometrics algorithms will be introduced to improve hydration characterization. Lastly, the hurdles to overcome, should one wish to increase the measurement frequency in the microsystem, will be discussed.

1 THz microfluidic system

To perform liquid-absorption measurements, a two-function microsystem has been developed. On the one hand, a microfluidic circuit drives the samples toward the analysis area. On the other hand, an integrated electromagnetic circuit guides the THz waves through the sample to be analyzed. The whole system is presented in Fig. 1 (left) and each function is detailed in the following sections. This microsystem is based on a glass/silicon/glass technological process. Glass is used to ensure both the transparency of the microsystem and the wave propagation with low losses ($\tan\delta \sim 5 \times 10^{-3}$ at 300 GHz). To fabricate the microchannels, silicon has been chosen for its rigidity and its low losses in the terahertz range ($\tan\delta \sim 10^{-4}$ at 400 GHz). In contrast with glass, silicon can be accurately deep-etched, resulting in well defined narrow channels. This is crucial, because power absorption depends exponentially on the microchannel width. The use of silicon will also be useful for future

microelectronic component integration to get a fully autonomous lab-on-chip for biological metrology. All the technological parameters and steps used to manufacture the BioMEMS have previously been reported.³² The independence of microfluidic and electromagnetic design has to be emphasized. Indeed, these two circuits can be modified independently without changing the technological process parameters, leading to a strong versatility in function design. This is due to the process where the whole silicon wafer is reported on the glass wafer (with THz waveguides). Then, silicon deep-etching is performed and leads to a high-density microchannel network with thin walls (width = 200 μm), which is an important refinement to limit absorption of the empty microsystem. With this clean-room process, 23 microsystems can be realized on a 3-inch glass wafer.

The THz waveguide

To guide the electromagnetic wave, a single-wire propagation line has been used. This so-called “Planar Goubau Line” (PGL) enables the quasi-TEM propagation of the THz waves in a surface-wave configuration called “Goubau mode”. In this configuration, the electromagnetic fields are strongly confined around the metallic wire, whose width can be decreased down to the micrometer-scale.³³ The confinement of THz waves can reach several micrometers, which corresponds to the energy exponential decay length perpendicular to the Goubau line. This confinement depends on the wire width and on the dielectric permittivity of the propagative medium (air/glass, silicon/glass or liquid/glass).

Here, the Goubau mode is excited by an external Vector Network Analyzer (VNA), dedicated to coplanar waveguide excitations in the 0–110 GHz and 140–220 GHz frequency bands. This is the reason why a coplanar-waveguide/Goubau-line transition has previously been developed.³⁴ The Goubau line and coplanar transitions are represented in Fig. 1 (upper right).

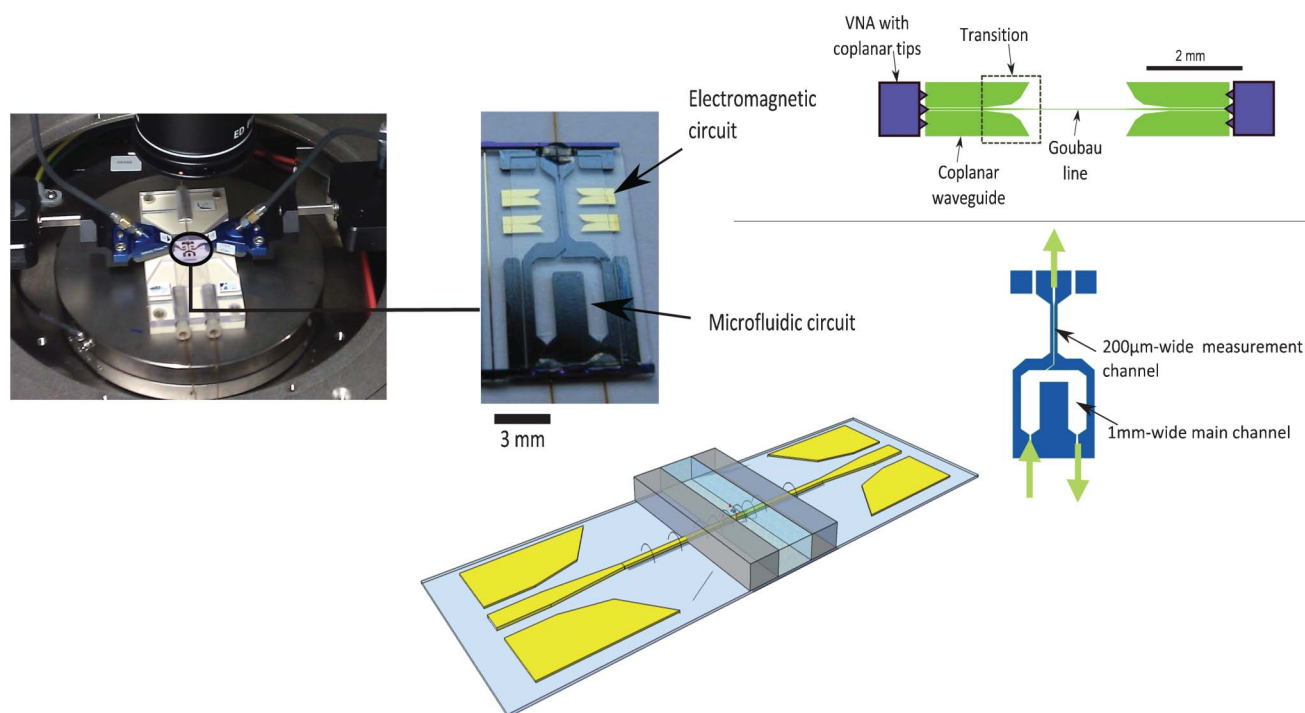


Fig. 1 THz BioMEMS with electromagnetic and microfluidic circuits.

This electromagnetic circuit is made by gold deposition on a transparent glass wafer. The Goubau line width is 5 μm wide and 500 nm thick, and propagation losses are from 2 dB mm^{-1} to 3 dB mm^{-1} in the 50–220 GHz frequency band.³³ Propagation on Goubau lines has been achieved for higher frequencies up to 800 GHz³⁵ and measured losses at 0.63 THz were about 0.6 dB mm^{-1} .³⁶ Computations show that propagation on Goubau lines is possible in the 0.8–2 THz frequency band.³⁷

The microfluidic circuit

To drive the sample, the 200 μm -deep microchannels are made with silicon walls sandwiched between two glass wafers.

The microfluidic circuit is composed of a 1 mm-wide main channel and a 200 μm -wide measurement channel, where the THz probing will occur. Fig. 1 (bottom right) shows this two-channel configuration, which allows both a quick injection of the probed samples and a measurable transmitted signal through the 200 μm -wide sample.

The system technological process characterization has shown that pressures up to 37 bars can be applied inside the BioMEMS. Such a microsystem has already been used to probe enzymatic reactions in real-time³⁸ and to characterize ethanol hydration layers.³⁹ Measurements on proteins are presented in the next section. They will show that the BioMEMS is an adapted tool to perform quantitative physical analysis of the hydration phenomenon directly in a chip.

2 Protein hydration studies

Material and methods

Lyophilized powder of BSA (66, 43 kDa), α -chymotrypsine from bovine pancreas (EC 3.4.21.1; 24 kDa) and lysozyme from chicken egg white (EC 3.2.1.17; 14, 6 kDa) purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. have been solubilised in pure deionised Milli-Q water (Millipore, resistivity: 18 $\text{M}\Omega\text{ cm}$) at different concentrations and from independent weightings. All solutions were prepared with a total volume of 5 mL and were clear and without precipitates.

Measurements have been carried out by an Agilent XF8510 VNA in the 0–110 GHz frequency band. The raw obtained parameters are the complex transmission parameter S_{21} and the complex reflection parameter S_{11} . Transmitted and reflected powers can be deduced from the squared modulus of these parameters. The chronological order of sample injection has been randomly chosen in order to avoid any measurement bias. Between each measurement, water is injected as a reference sample in order to check measurement reproducibility.

Measured S_{21} parameters are shown in Fig. 2 for BSA solutions. The uncertainty concerning the S_{21} parameter measurement is $\delta S_{21} \sim 0.02\text{ dB}$. The corresponding S_{11} parameters are not shown because they are below -10 dB on the whole frequency band and their dependence on BSA concentration is weak compared to S_{21} .

Absorption extraction protocol

Since the electromagnetic propagation mode is a quasi-TEM mode, it can be assumed that the transmitted power P_t through the system is

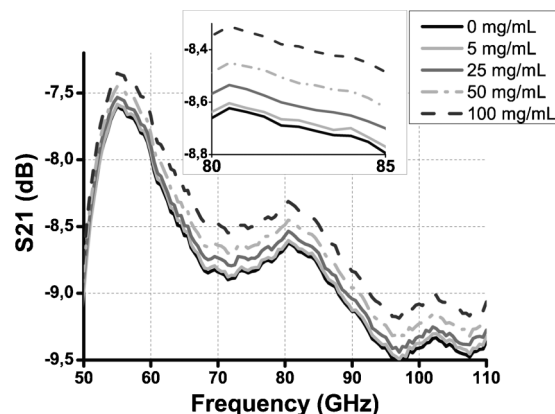


Fig. 2 S_{21} transmission parameter as a function of frequency for several BSA concentrations. Measurement uncertainty is $\delta S_{21} \sim 0.02\text{ dB}$. Inset: zoom on the 80–85 GHz frequency band.

$$P_t = P_i \exp(-K) \quad (1)$$

where P_i is the incident power and K represents the total losses in the system. The K contributions can be from the sample in the microchannel and from the losses k of the empty microsystem. If it is assumed that these two contributions are independent, it can be written that

$$P_t = P_i \exp(-\alpha L + k) \quad (2)$$

where α is the sample absorption and L the sample width (and thus the measurement channel width). The incident and transmitted power can be expressed as functions of S -parameters with

$$\frac{P_t}{P_i} = \frac{|S_{21}|^2}{1 - |S_{11}|^2} \quad (3)$$

The sample absorption is thus given by

$$\alpha = -\frac{1}{L} \left[\ln \left(\frac{|S_{21}|^2}{1 - |S_{11}|^2} \right) - k \right] \quad (4)$$

This extraction protocol suffers from several assumptions, such as neglecting internal reflections and their dependence on the sample inside the microchannels. However, since sample absorption is high, these reflections are weak, as can be shown by numerical computations. Moreover, k is an unknown offset. This is the reason why the next results will be given in arbitrary units. However, the previous assumptions do not affect the quantitative differential analysis that will be done, and a calibration protocol of the system allows us to get the quantitative absorption values, as will be shown in Section 3.

Water/protein solution absorption

Fig. 3 shows the absorption of BSA and lysozyme solutions as a function of protein concentration for a frequency of 100 GHz. Increasing the protein concentration decreases the solution absorption. This is due to replacement of water molecules by proteins whose absorption is negligible in this frequency range.

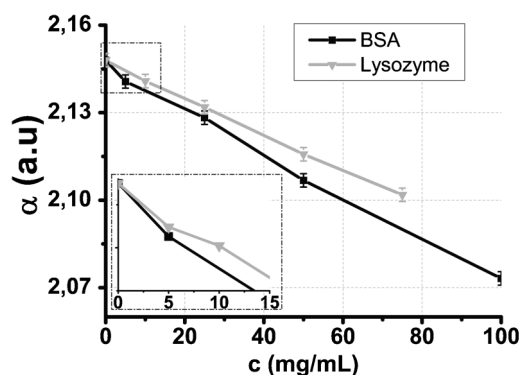


Fig. 3 0.1 THz absorption of BSA/water and lysozyme/water solutions as a function of protein concentration.

The absorption of a 5 mg mL^{-1} protein concentration can be detected and is the sensitivity of the microsystem for protein spectroscopy. This value has to be compared with previous sensitivities obtained in terahertz spectroscopy in microfluidic systems: a 100 mg mL^{-1} sensitivity was obtained by George *et al.*¹⁶ and a 50 mg mL^{-1} sensitivity by Kitagawa *et al.*²⁷ For studies that do not use microfluidic systems, sensitivities are in the order of magnitude of 5 mg mL^{-1} when measuring absorption. The most significant literature studies give the following sensitivities with corresponding molar fractions x_m :

- 60 mg mL^{-1} ($x_m = 3.1 \times 10^{-3}$) for sugar/water solutions by Arikawa *et al.*⁹
- 30 mg mL^{-1} ($x_m = 11.6 \times 10^{-3}$) for alcohol solutions by Jepsen *et al.*^{10,40}
- 10 mg mL^{-1} ($x_m = 12.6 \times 10^{-3}$) for lysozyme solutions by Vinh *et al.*²³
- 2 mg mL^{-1} ($x_m = 0.93 \times 10^{-6}$) for Subtilisin Carlsberg protein dissolved in dioxan organic and apolar solvent by Mickan *et al.*²⁶
- around 1 mg mL^{-1} ($x_m = 1.9 \times 10^{-6}$) for λ_{6-85} protein in water by Ebbinghaus *et al.*⁴¹

In comparison with these studies, one advantage of microfluidics is that the required sample volume decreases. Indeed, considering the $200 \text{ }\mu\text{m}$ -deep and $200 \text{ }\mu\text{m}$ -wide microchannel and considering that the field extent around the Goubau line is below $100 \text{ }\mu\text{m}$, the sample volume probed is below $V = 200 \text{ }\mu\text{m} \times 200 \text{ }\mu\text{m} \times 200 \text{ }\mu\text{m} = 8 \text{ nL}$. For BSA, the concentration sensitivity of 5 mg mL^{-1} ($x_m = 1.35 \times 10^{-6}$) in the V volume leads to a 0.6 picomole detection threshold. A previously reported result for THz spectroscopy with microfluidics without integrated probes obtained a 10 picomole detection limit.¹⁶

The normalized absorption of each BSA/water and lysozyme/water solution is given as a function of concentration and of frequency in Fig. 4 in the 50 – 110 GHz frequency band. A very good agreement is found between these curves and the results from Kitagawa *et al.*²⁷ thus validating the absorption extraction protocol and enabling us to perform hydration quantitative analysis.

Hydration number of proteins

As previously stated, the decrease in solution absorption α when protein concentration c (mg mL^{-1}) is increased is due to water

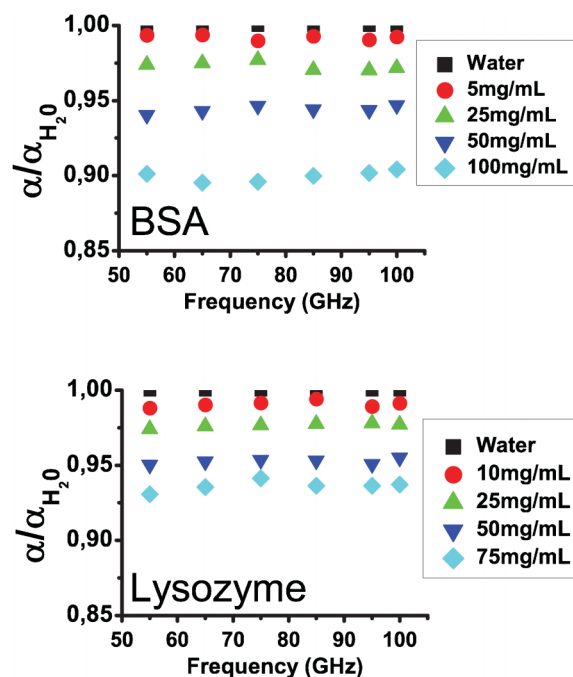


Fig. 4 Normalized absorption of BSA/water and lysozyme/water solutions as a function of frequency and concentration.

molecule replacement by protein. The absorption decrease is called $\Delta\alpha = \alpha_{\text{H}_2\text{O}} - \alpha = \alpha_{\text{prot}}$, where $\alpha_{\text{H}_2\text{O}}$ is the water solution absorption. With x as the protein volume fraction, it becomes $\Delta\alpha = x\alpha_{\text{H}_2\text{O}}$. Besides, x can be expressed as a function of the partial specific volume of the protein⁴² V_s : $x = cV_s$. However, experimentally, the measured absorption decrease is higher than the computed $\Delta\alpha$ using the previous expressions. This can be explained by assuming that water molecules in the vicinity of the protein (hydration water) no longer absorb the electromagnetic waves. This assumption^{13,39} will be discussed experimentally in the next section. In this case, for a solution volume V :

$$\Delta\alpha = \alpha_{\text{prot}} + \alpha_{\text{hydr}} = x\alpha_{\text{H}_2\text{O}} + x_{\text{hydr}}\alpha_{\text{H}_2\text{O}} \quad (5)$$

where $x_{\text{hydr}} = N_{\text{hydr}}M_{\text{H}_2\text{O}}/(VN_A\rho_{\text{H}_2\text{O}})$ is the hydration water volume fraction in solution. $M_{\text{H}_2\text{O}}$ is the water molar weight, N_A is the Avogadro number, $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ is the water density and N_{hydr} is the number of hydration water molecules in solution. With N_h the hydration number (number of hydration water molecules in the first hydration shell per protein) and N_{prot} the number of protein molecules in solution, it becomes $N_{\text{hydr}} = N_{\text{prot}}N_h$. Considering that $N_{\text{prot}}/V = cN_A/M_{\text{prot}}$, with M_{prot} being the protein molar weight, it becomes:

$$N_h = \left(\frac{\Delta\alpha}{\alpha_{\text{H}_2\text{O}}} - cV_s \right) \times \frac{M_{\text{prot}}\rho_{\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}c} \quad (6)$$

Thus, N_h uncertainties can be computed with the following formula:

$$\delta N_h = \frac{M_{\text{prot}}\rho_{\text{H}_2\text{O}}}{cM_{\text{H}_2\text{O}}\alpha_{\text{H}_2\text{O}}} \delta\alpha \quad (7)$$

where $\delta\alpha$ are absorption uncertainties. δN_h decreases when protein molar weight decreases and when concentration increases. This is why the solution concentrations used for computing N_h will be 50, 75 and 100 mg mL⁻¹. Fig. 5 shows the computed hydration numbers as a function of frequency and solution concentration. Results for BSA and lysozyme are in good agreement with previous studies^{23,28,43–45} and validate the N_h computing method, which can be used for other solvated proteins. Thus, chymotrypsin/water solutions have been analyzed with this extraction process. The corresponding hydration numbers N_h are given in Fig. 5.

It can be observed that N_h seems to depend on frequency. However, N_h uncertainty margins overlap on the entire frequency band and their intersection should give the best estimation for N_h . Besides, the computed N_h decreases when the protein concentration increases. Actually, this is due to hydration shells overlapping: when protein density increases, a hydration water molecule can be shared between several proteins and the $N_{\text{hydr}} = N_{\text{prot}}N_h$ equation is no longer respected. Moreover, we will show in the next part that the model used is approximate and only quantifies the number of water molecules in the direct vicinity of the proteins (first hydration layer). However, it has been largely used in literature^{25–28} and gives a good approximation of the N_h order of magnitude from THz spectroscopy of proteins.

The hydration of proteins can thus be quantitatively probed in the microsystem. Moreover, due to the accuracy and sensitivity of the developed microsystem, it can also become a tool to increase our understanding of bio-chemical phenomena. Indeed, the next part will show that a combination of microsystem measurements and chemometrics algorithms leads to a better understanding of hydration processes.

3 Ethanol hydration insight

Several previous studies have focused on characterizing alcohol/water mixtures in the THz spectrum.^{10,25} Compared to proteins, which have a limited solubility, when working with alcohol one can produce a continuum of samples with concentrations spanning from pure water to pure alcohol. As a result, large

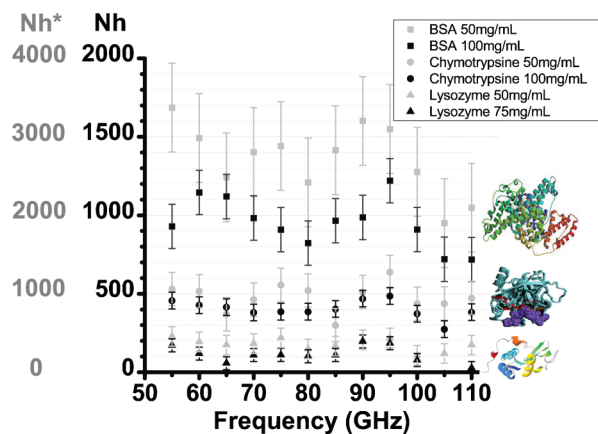


Fig. 5 Hydration number N_h for lysozyme, BSA and chymotrypsin as a function of frequency and protein concentration. N_h^* is the corrected hydration number, as defined in Section 3.

datasets can be generated for further analysis. In this part, the sub-THz spectroscopy of alcohol/water mixtures is presented. First, the absorption of the mixtures will be given. Then, the full measurement dataset will be analyzed by chemometrics algorithms in order to extract maximum information from the measured broadband data. From that, an improved model of solvated molecule hydration will be postulated.

Alcohol/water mixture absorption

Ethanol/water, isopropanol/water and propanol/water mixtures have been prepared with alcohol volume ratios x from 0 to 1 in steps of 0.05. Ethanol, propanol and isopropanol are from Carlo Erba Reagents. Pure deionised water is obtained from a Barnstead Easy-Pure RoDi purification system with a resistivity of 18.2 M Ω cm.

By a calibration step, using absorption Debye models for alcohol and water from previous studies,^{46–48} the absorptions of the injected mixtures are obtained as shown in Fig. 6. As observed for the protein study, increasing the alcohol content decreases the solution absorption. Indeed, water molecules are progressively replaced by alcohol molecules, whose absorption is weaker. As already observed, pure isopropanol absorption is weaker than propanol absorption, which is weaker than ethanol absorption. It is possible to use the measured absorptions to characterize alcohol hydration number in quite a similar way as presented in the previous section. This study has already been reported for ethanol/water mixtures.³⁹

Here, the study goes further, using multivariate analysis *i.e.* exploiting simultaneously all frequencies in the spectral domain. Note that in the next section, the raw (non-calibrated) absorption dataset will be used.

Linear decomposition of the dataset

Measured absorption spectra are rather flat and do not show obvious features that can be considered as molecular signatures. However, it is possible to apply advanced algorithms to these spectra to better characterize the measured mixtures. These algorithms, coming from the field of chemometrics, are commonly used for vibrational spectroscopy.^{49–51} Their goal here is to decompose the solution spectra as a sum of the pure spectral contributions of each solution component, multiplied by the component volume ratio:

$$\alpha = \sum_{i=1}^n x_i \alpha_i \quad (8)$$

where n is the number of components in the solution, x_i the volume ratio of the i^{th} component and α_i the absorption spectrum of the i^{th} component. This decomposition of the spectra is only possible with highly sensitive, low-noise and reproducible measurements because the algorithm extracts the maximum information from the spectra details. Thus, the chosen frequency band (10–90 GHz) corresponds to the measurements' higher signal to noise ratio. Note that, due to some multiple wave reflections in the microsystem, some ripples appear in the absorption spectra. However, since they hardly depend on the probed liquid inside the microchannels, their influence on the chemometrics algorithms is negligible.

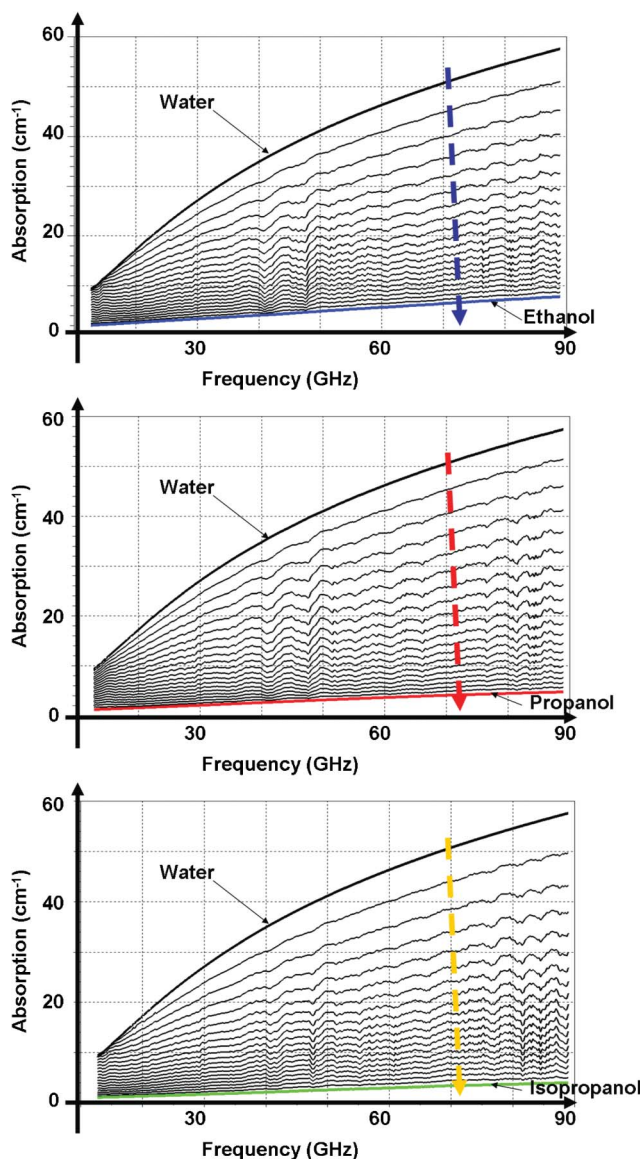


Fig. 6 Ethanol/water, propanol/water and isopropanol/water mixture absorptions as a function of frequency for several ethanol volume ratios. The arrow indicates the increase of alcohol volume ratio in steps of 0.05.

The first step in the decomposition is to determine the number n of pure components observable in the spectral dataset. This is made by using a Principal Component Analysis (PCA) algorithm, based on singular value decomposition.⁵² Then, an iterative algorithm (MCR-ALS : Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares^{53–55}) is used to decompose the whole dataset to determine x_i for each mixture and α_i for each frequency. Methodology concerning this study has been reported elsewhere.⁵⁶ Here we want to present the study results in the case of ethanol/water mixtures. They show that four species can be observed in the absorption spectrum of an ethanol/water mixture. The spectra of each component, and the corresponding volume fraction in each mixture are given in Fig. 7 (left). Note that the absorption spectra are non-calibrated. Indeed, they correspond to the convolution of the liquid calibrated absorption and the microsystem instrument function. However, the instrument function does not depend on the liquid inside the

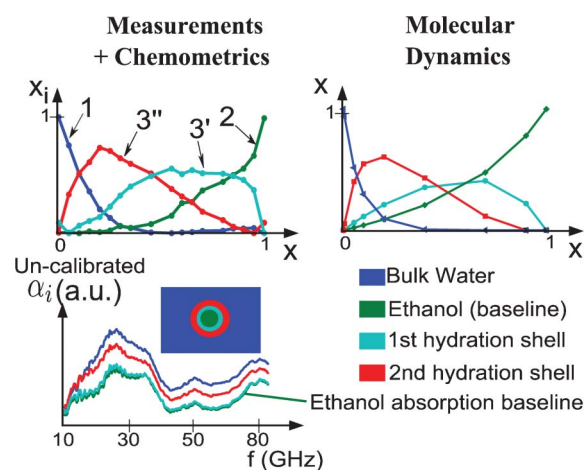


Fig. 7 Decomposition of the measurement dataset by MCR-ALS. Concentration of the four species as a function of ethanol volume ratio. Non-calibrated absorption of the four species as a function of the frequency.

microchannels and so, the differences observed between the non-calibrated absorption spectra are directly correlated to the liquid calibrated absorption spectra.

Component 1 disappears when the ethanol volume ratio increases. The concentration of component 2 increases with ethanol volume ratio. The highest absorption in the whole frequency band is the component 1 absorption, whereas the lowest one is the component 2 absorption. As a consequence, component 1 is bulk water and component 2 is ethanol. Components 3' and 3'' show more complex behaviour. They correspond to the hydration shell of ethanol. 3' is the first hydration layer, strongly linked to ethanol, and whose absorption is quite the same as ethanol (far below water) and 3'' is the second hydration layer with an intermediate absorption. To validate this explanation, Molecular Dynamics (MD) simulations have been performed for the ethanol/water mixtures using the DL POLY program.⁵⁷ The all-atom optimized potentials for liquid simulations (OPLS) force-field⁵⁸ was used to model the intra and intermolecular interactions of ethanol molecules. Rigid water molecules were modeled using the TIP4P/2005 force-field.⁵⁹ Results of MD are shown in Fig. 7 (right) and show a very good agreement with the chemometrics results. The whole methodology used for MD simulations has been reported elsewhere.⁶⁰ Investigations on isopropanol/water and propanol/water give the same behaviours.

The conclusion of such a study is that two hydration layers can be probed in the investigated frequency band. The first layer absorption is very weak, whereas the second layer absorption is an intermediate between water and ethanol. Since the absorption of water molecules directly linked to the solvated molecule is negligible compared to bulk water, the computed N_h in the previous section appears to be an approximation of the number of water molecules in the first hydration layer. Extending the MCR-ALS results to solvated proteins (protein volume ratio is x), the number of water molecules in the whole hydration shell (first and second layer) can be estimated by writing the absorption of a diluted protein solution :

$$\alpha = x\alpha_{\text{prot}} + x_{\text{hydr1}}\alpha_{\text{hydr1}} + x_{\text{hydr2}}\alpha_{\text{hydr2}} + (1 - x - x_{\text{hydr1}} - x_{\text{hydr2}})\alpha_{\text{H}_2\text{O}} \quad (9)$$

where ‘hydr1’ and ‘hydr2’ stand for the first hydration layer and the second hydration layer, respectively, and thus $x_{\text{hydr}} = x_{\text{hydr1}} + x_{\text{hydr2}}$. As a consequence, eqn (6) becomes:

$$N_h = \left(\frac{\Delta\alpha}{\alpha_{\text{H}_2\text{O}}} - cV_s \right) \times \frac{M_{\text{prot}}\rho_{\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{H}_2\text{O}}c} \quad (10)$$

$$= N_h^* \left(1 - \frac{\alpha_{\text{hydr2}}x_{\text{hydr2}}}{\alpha_{\text{H}_2\text{O}}x_{\text{hydr}}} \right)$$

where N_h^* is the corrected hydration number, corresponding to the whole hydration shell. Indeed, the previously computed hydration number underestimates the total quantity of hydration water molecules. To estimate this bias, the $\alpha_{\text{hydr2}}/\alpha_{\text{H}_2\text{O}}$ ratio can be approximated by 0.6 ± 0.05 , considering Fig. 7. Moreover, $x_{\text{hydr2}}/x_{\text{hydr}}$ can be computed in the case of ethanol from previous studies³⁹ where the water molecule distribution function is presented. In this case, when assuming a spherical hydration shell model with $x = 0.02$ (low ethanol concentration with no hydration shells overlapping), $x_{\text{hydr2}}/x_{\text{hydr}} \sim 0.8$. Note that this value is close to the one given by MD simulations in Fig. 7 for a small ethanol volume ratio. As a consequence, it seems that the corrected hydration number N_h^* is twice the one obtained (N_h) by the model used in the previous section (Fig. 5).

Further work will be dedicated to increasing the investigated frequencies. However, the transmitted signal decreases when frequency increases and will limit the use of the microsystem beyond 220 GHz. This can be explained by the substrate mode phenomenon: beyond a critical frequency (around 180 GHz in the microsystem), the whole electromagnetic wave is no more guided by the Goubau line but progressively by the substrate and thus it is no longer entirely detected in the transmitted signal. This drawback can be overcome by integrating corrugated Goubau lines in the microsystem.⁶¹ Since Vector Network Analyzers are now able to deliver frequencies of up to 1 THz, the described study has to be extended to 1 THz, in order to look at the frequency dependence of hydration probing in the microfluidic system.

Another perspective of this work is to study the influence of pH on protein hydration shells.⁶² Here, protein were dissolved in pure deionised water in order to avoid the presence of supplementary ions, which could interact with THz waves. However, the next work will be to modify the solution pH and to observe the variations in hydration properties, as a function of the iso-electric point of the protein, for instance. Hydration characterization could also lead to protein conformation monitoring by THz waves in the microsystem.

Conclusion

These studies have demonstrated that the developed microsystem is able to reach a sensitivity comparable to the sensitivity obtained with macroscale setups, with the added benefits of using small sample quantities. This sensitivity makes it possible to perform quantitative analysis of the protein hydration. The use of chemometrics algorithms on our measurements improves our understanding of the hydration bio-chemical phenomenon. They enable us to clarify the extraction model chosen for computing the hydration number. Indeed, we believe chemometrics is well suited to exploring and analyze high-throughput

measurement data obtained by the “lab-on-a-chip” approach. This combination hints at a new way to develop liquid metrology platforms dedicated to biology, liquid physics or chemistry.

References

- 1 M. Tonouchi, *Nat. Photonics*, 2007, **1**, 97–105.
- 2 P. H. Siegel, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, 2004, **52**, 2438–2447.
- 3 A. McIntosh, B. Yang, S. Goldup, M. Watkinson and R. Donnan, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 2072–2082.
- 4 C. Yu, S. Fan and E. Pickwell-MacPherson, *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2012, **2**, 33–45.
- 5 M. Nagel, F. Richter, P. Haring-Bolivar and H. Kurz, *Phys. Med. Biol.*, 2003, **48**, 3625–3636.
- 6 A. Markelz, S. Whitmire, J. Hillebrecht and R. Birge, *Phys. Med. Biol.*, 2002, **47**, 3797–3805.
- 7 A. G. Markelz, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2008, **14**, 180–190.
- 8 D. M. Leitner, M. Gruebele and M. Havenith, *HFSP J.*, 2008, **2**, 314–323.
- 9 T. Arikawa, M. Nagai and K. Tanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 2008, **457**, 12–17.
- 10 U. Moller, D. G. Cooke, K. Tanaka and P. U. Jepsen, *J. Opt. Soc. Am. B*, 2009, **26**, A113–A125.
- 11 J. Kindt and C. Schmittenmaier, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 10373–10379.
- 12 T. Globus, D. Woolard, T. Crowe, T. Khromova, B. Gelmont and J. Helser, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 2006, **39**, 3405–3413.
- 13 J. Xu, K. Plaxco and S. Allen, *Protein Sci.*, 2006, **15**, 1175–1181.
- 14 C. C. Cooksey, B. J. Greer and E. J. Heilweil, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **467**, 424–429.
- 15 V. Mille, N. Bourzgui, F. Medjdoub and B. Bocquet, *European Microwave Conference*, 2004, **1**, 169–172.
- 16 P. A. George, W. Hui, F. Rana, B. G. Hawkins, A. E. Smith and B. J. Kirby, *Opt. Express*, 2008, **16**, 1577–1582.
- 17 V. Matvejev, C. De Tandt, W. Ranson, J. Stiens, R. Vounckx and D. Mangelings, *Prog. Electromagn. Res.*, 2011, **121**, 89–101.
- 18 P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon and R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 14408–14413.
- 19 H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson and R. D. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 5129–5134.
- 20 N. Jain and I. Roy, *Protein Science*, 2009, **18**, 24–36.
- 21 A. Lerbret, F. Affouard, P. Bordat, A. Hedoux, Y. Guinet and M. Descamps, *J. Non-Cryst. Solids*, 2011, **357**, 695–699.
- 22 M. Heyden and M. Havenith, *Methods*, 2010, **52**, 74–83.
- 23 N. Vinh, S. Allen and K. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 8942–8947.
- 24 B. Jana, S. Pal and B. Bagchi, *J. Chem. Sci.*, 2012, **124**, 317–325.
- 25 Y. I. Khurgin, V. A. Kudryashova and V. A. Zavizion, *Radiotekhnika I Elektronika*, 1996, **41**, 737–743.
- 26 S. P. Mikan, J. Dordick, J. Munch, D. Abbott and X. C. Zhang, *Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering*, 2002, **4937**, 49–61.
- 27 J. Kitagawa, T. Ohkubo, M. Onuma and Y. Kadoya, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **89**, 041114.
- 28 J. Xu, K. Plaxco and S. Allen, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 24255–24259.
- 29 S. Pal, J. Peon and A. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 1763–1768.
- 30 U. Heugen, G. Schwaab, E. Brundermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner and M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 12301–12306.
- 31 B. Born and M. Havenith, *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves*, 2009, **30**, 1245–1254.
- 32 S. Laurette, A. Treizebre and B. Bocquet, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, **21**, 065029.
- 33 A. Treizebre and B. Bocquet, *Int. J. Nanotechnol.*, 2008, **5**, 784–795.
- 34 A. Treizebre, B. Bocquet, Y. S. Xu and R. G. Bosisio, *Microwave Opt. Technol. Lett.*, 2008, **50**, 2998–3001.
- 35 L. Dazhang, J. Cunningham, M. Byrne, S. Khanna, C. Wood, A. Burnett, S. Ershad, E. Linfield and A. Davies, *Applied Physics Letters*, 95, year.

- 36 D. Gacemi, J. Mangeney, T. Laurtent, J. Lampin, T. Akalin, K. Blary, A. Degiron, P. Crozat and F. Meng, *Opt. Express*, 2012, **20**, 8466–8471.
- 37 S. Laurette, A. Treizebre, N. Bourzgui and B. Bocquet, *Prog. Electromagn. Res. Lett.*, 2012, **30**, 49–58.
- 38 A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N. E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko and B. Bocquet, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **25**, 154–160.
- 39 S. Laurette, A. Treizebre, F. Affouard and B. Bocquet, *Appl. Phys. Lett.*, 2010, **97**, 111904.
- 40 P. U. Jepsen, U. Moller, F. Eichhorn, H. Merbold, J. R. Folkenberg and S. J. Clark, *2007 Conference On Lasers & Electro-optics/quantum Electronics and Laser Science Conference*, 2007, **1–5**, 1740–1741.
- 41 S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner and M. Havenith, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 20749–20752.
- 42 K. Gekko and H. Noguchi, *J. Phys. Chem.*, 1979, **83**, 2706–2714.
- 43 M. Suzuki, J. Shigematsu and T. Kodama, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 7279–7282.
- 44 T. Yoshida, H. Inagaki, H. Kamyu and I. Ueda, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 256–260.
- 45 K. Yokoyama, T. Kamei, H. Minami and M. Suzuki, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 12622–12627.
- 46 T. Sato and R. Buchner, *J. Chem. Phys.*, 2003, **118**, 4606–4613.
- 47 T. Sato and R. Buchner, *J. Phys. Chem. A*, 2004, **108**, 5007–5015.
- 48 J. Barthel and R. Buchner, *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63**, 1473–1482.
- 49 N. Gracia, S. Thomas, F. Thibault-Starzyk, O. Lerasle and L. Duponchel, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2011, **106**, 210–215.
- 50 C. Ruckebusch, A. D. Juan, L. Duponchel and J. Huvenne, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2006, **80**, 209–214.
- 51 C. Ruckebusch, L. Duponchel, J. P. Huvenne and J. Saurina, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **515**, 183–190.
- 52 E. Malinowski, *Factor analysis in chemistry*, Wiley-Interscience, New York, 2nd edn, 1992.
- 53 R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1995, **30**, 133–146.
- 54 A. de Juan and R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **500**, 195–210.
- 55 S. Navea, A. de Juan and R. Tauler, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5592–5601.
- 56 L. Duponchel *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, submitted.
- 57 W. Smith, C. W. Yong and P. M. Rodger, *Molecular Simulation*, 2002, **28**, 385–471.
- 58 W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell and J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11225–11236.
- 59 J. L. F. Abascal and C. Vega, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 234505.
- 60 F. Affouard *et al.*, *Journal of Physical Chemistry B*, submitted.
- 61 S. Laurette, A. Treizebre and B. Bocquet, *IEEE Trans. Terahertz Sci. Technol.*, 2012, **2**, 340–344.
- 62 S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, M. Gruebele, D. M. Leitner and M. Havenith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 2374–2375.

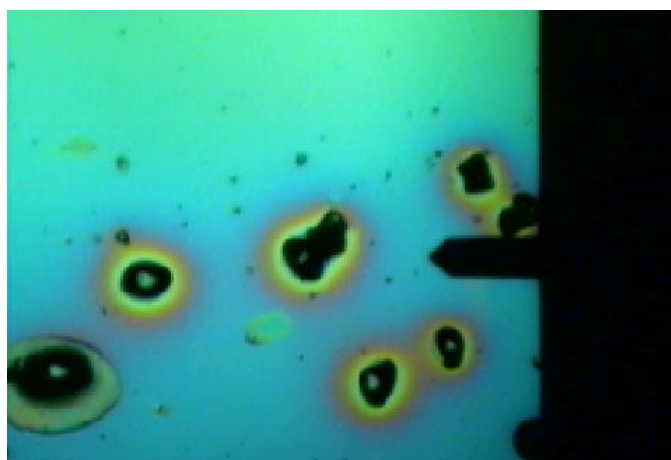
Annexe 2

Les douze principes de la « chimie verte » formulés par P. Anastas et J. Warner dans « *Green chemistry: theory and practice* », Oxford University Press, New York, 1998.

- ✓ Prévention : limiter la pollution à la source plutôt qu'avoir à éliminer les déchets.
- ✓ Economie d'atomes : optimiser l'incorporation des réactifs dans le produit final.
- ✓ Conception de synthèses chimiques moins dangereuses qui utilisent et conduisent à des produits peu ou pas toxiques.
- ✓ Conception de produits chimiques plus sûrs, efficaces et moins toxiques.
- ✓ Réduction de l'utilisation de solvants et d'auxiliaires.
- ✓ Réduction de la dépense énergétique.
- ✓ Utilisation de matières premières renouvelables en substitution aux matières fossiles.
- ✓ Réduction des produits dérivés pouvant notamment générer des déchets.
- ✓ Utilisation de la catalyse.
- ✓ Conception des substances en intégrant leur mode de dégradation finale.
- ✓ Mise au point de méthodes d'analyse en temps réel pour prévenir la pollution.
- ✓ Développement d'une chimie sécuritaire pour prévenir les accidents, explosions, incendies ou rejets.

Annexe 3

Cliché optique d'une zone du support de silicium présentant quelques agrégats de β -galactosidase immobilisés sous un film polymère de ppTMDSO d'environ 200 nm d'épaisseur. L'irisation dégradée colorée autour des dépôts de protéines est révélatrice d'une épaisseur variable caractéristique d'un dépôt non conforme. La pointe visible à gauche correspond à une partie de la sonde utilisée en AFM (largeur de la pointe Brücker NCHVA : 40 μm ; longueur : 110 μm ; résolution d'image ~ 10 nm).



Annexe 4

Paramètres de dépôt pour la réalisation du capot de ppTMDSO.

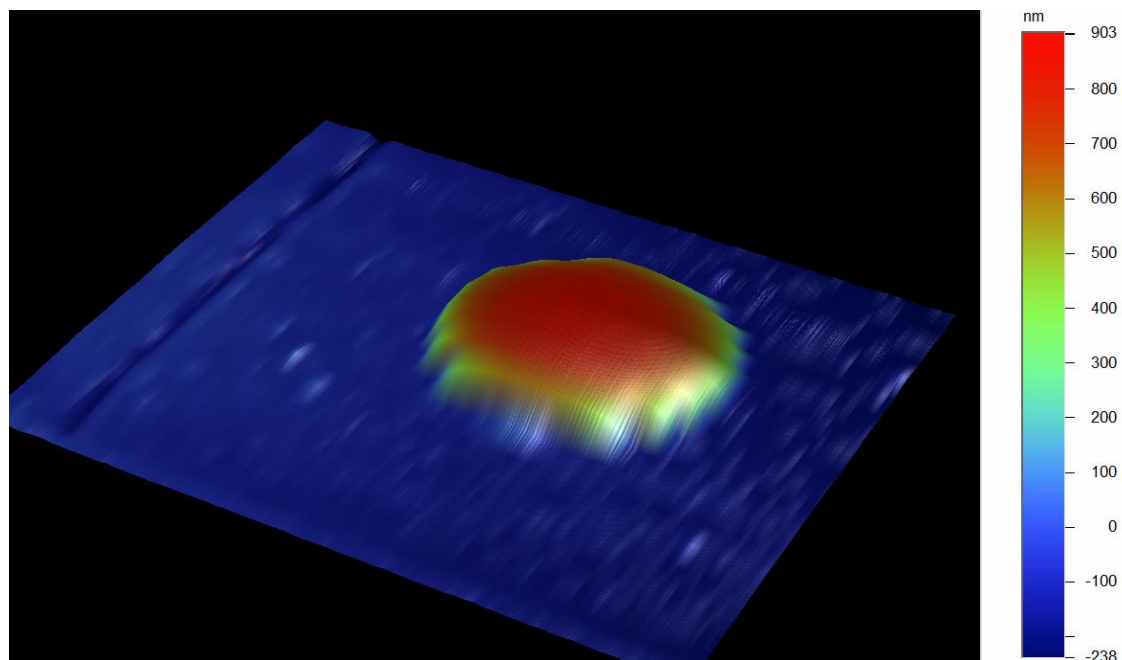
<i>Paramètres de dépôt</i>	<i>Valeurs</i>
Pression résiduelle	$\sim 5 \cdot 10^{-2}$ mbar
Pression de marche	5 mbar
Gaz plasmagène (N ₂)	1.8 slpm ^a
Gaz de transport (O ₂)	25 sccm ^b
Précurseur (TMDSO)	20 sccm ^b
Puissance transférée au plasma	200 W
Prétraitement	plasma N ₂ : 5 min
Traitement	plasma N ₂ /O ₂ : 40 min (vitesse de dépôt ~ 750 nm min ⁻¹)

^a standard liter per minute

^b standard cubic centimer per minute

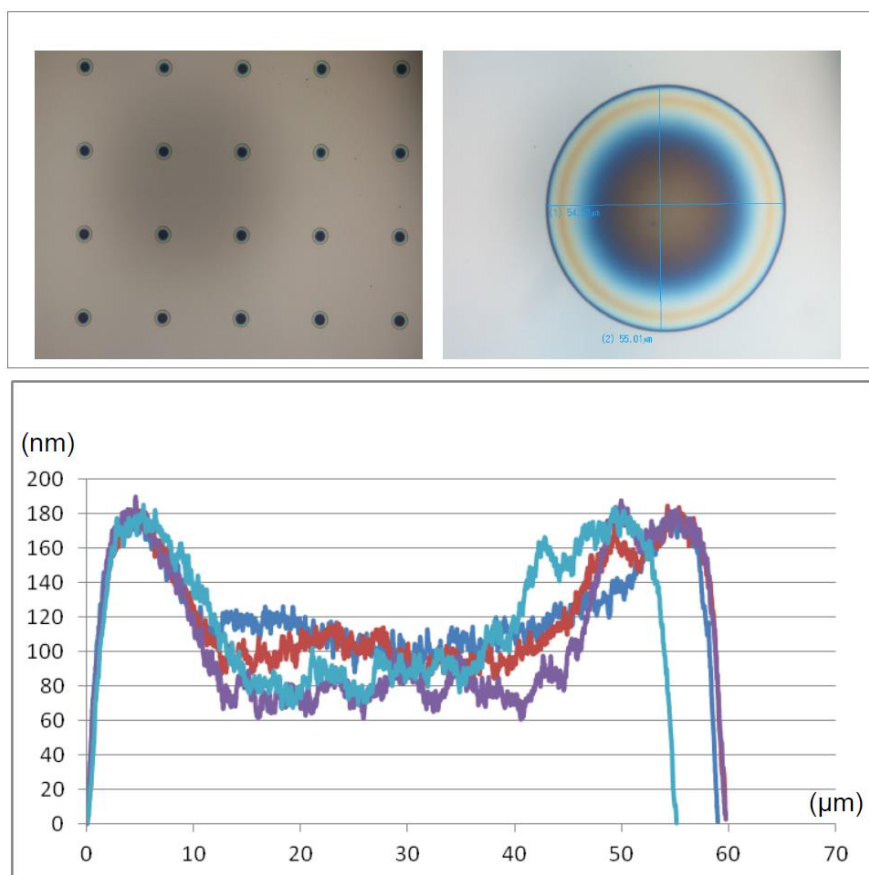
Annexe 5

Image obtenue par profilométrie d'un spot de β -galactosidase déposé par impression 3D sur un film de ppTMDSO d'environ 500 nm.



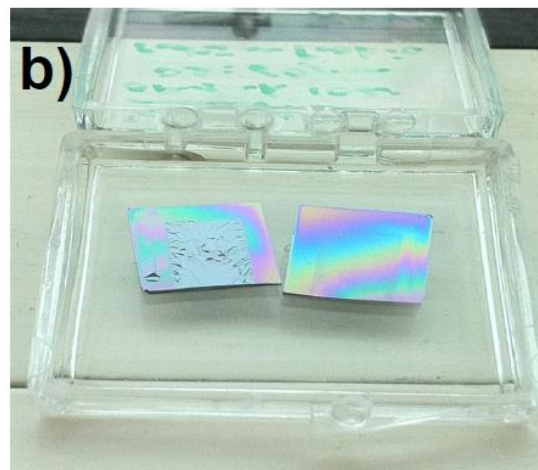
Annexe 6

Effet « *coffee ring* » des dépôts sous forme de spots de β -galactosidase sur substrat de silicium non traité.



Annexe 7

a) Coalescence des gouttes imprimées contenant la β -galactosidase et b) décollement du film de ppTMDSO couvrant le film d'enzyme dû à la désorption des enzymes en milieu aqueux.



Liste des Figures

Figure 1. Influence du pH sur l'activité d'un enzyme.

Figure 2. Influence de la température sur l'activité d'un enzyme.

Figure 3. Niveaux d'énergie d'activation (E_{act}) en absence et en présence de catalyseur.

Figure 4. Emplacement du champ TeraHertz dans le spectre électromagnétique et comportement des molécules soumises à son rayonnement.

Figure 5. Suivi de l'évolution d'une tumeur implantée chez une souris par imagerie TeraHertz in vivo. La tumeur a été implantée dans un environnement lipidique.

Figure 6. Représentation schématique d'un système de mesure pour la spectroscopie TeraHertz en domaine temporel (THz-TDS).

Figure 7. Modes et activités moléculaires dans la gamme de fréquence TeraHertz.

Figure 8. Schéma représentant les modes variés de la dynamique d'une macromolécule et leur échelle de temps approximative. Les modes de vibration basses fréquences intra- et intermoléculaires représentés en vert sont susceptibles d'être sondés aux fréquences TeraHertz (THz). La détection des modes vibrationnels localisés dans des groupes fonctionnels, représentés par une flèche rouge, relève plutôt du domaine infrarouge (IR).

Figure 9. Couche(s) d'hydratation d'une (bio)molécule en milieu aqueux. La dynamique des molécules d'eau et des liaisons hydrogène est représentée par les flèches noires et la dynamique structurale de la macromolécule par les flèches jaunes (modifié).

Figure 10. Coefficient d'absorption de l'eau à 292K en fonction de la fréquence.

Figure 11. Dispositif expérimental pour la spectroscopie TeraHertz en environnement microfluidique et absorption de solutions de BSA (Bovine Serum Albumine) de différentes concentrations pour des fréquences allant de 0.5 à 2.5 THz.

Figure 12. Illustration humoristique de l'importance des forces capillaires avec le changement d'échelle.

Figure 13. Diagramme de Venn illustrant les différents aspects couverts par les BioMEMS, *Lab on chips* et μ TAS.

Figure 14. Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Figure 15. Illustration de la dualité espace-temps en microréacteur. La variable représente la concentration d'un réactif [29].

Figure 16. Système microfluidique intégré permettant des réactions enzymatiques en parallèle. a) configuration du microsystème, b) schématisation de la circulation microfluidique et du mélange, c) photographie du système. 11 réactions peuvent avoir lieu dans 11 microréacteurs différents localisés sur la même puce microfluidique.

Figure 17. Les quatre grandes classes de microréacteurs et leurs principales caractéristiques.

Figure 18. Classification des principaux types de micromélangeurs (adapté).

Figure 19. Modes d'écoulement en microcanaux et distribution du temps de séjour (DTS) des espèces injectées à co-courant dans un système A) monophasique et B) biphasique (eau/ huile) générant des gouttelettes. DTS respectif des espèces injectées en écoulement C) monophasique et D) segmenté (adapté).

Figure 20. Dispersion d'une sonde fluorescente au sein d'un canal microfluidique rectangulaire de $250\ \mu\text{m} \times 70\ \mu\text{m}$ soumis à un écoulement laminaire.

Figure 21. Digestion de protéines dans un microréacteur prenant en charge des « gouttelettes » de $2\ \mu\text{L}$. L'enzyme digestif (trypsine) est immobilisé dans un disque de gel d'agarose.

Figure 22. Schématisation d'un dispositif microfluidique dont l'architecture permet de générer un gradient de concentration linéaire dans quatre chambres réactionnelles (C1, C2, C3 et C4). Le dispositif, mettant en jeu la formation de gouttelettes à l'entrée des chambres, permet le déroulement de quatre réactions en parallèle pour la détermination rapide de paramètres cinétiques. Inlet I : substrat (resorufin- β -D-galactopyranoside) ; Inlet II : buffer ; Inlet III : enzyme (β -galactosidase) ; Inlet IV : huile.

Figure 23. Bénéfices potentiels pouvant être tirés de la mise en place de procédés continus.

Figure 24. Exemple de micro-opérations (MUOs) pouvant être réalisées par voie microfluidique.

Figure 25. Schéma synthétique illustrant le concept des « 3P » : *People* (social), *Planet* (écologique), *Profit* (économique).

Figure 26. Augmentation des volumes de production selon deux stratégies opposées de montée en échelle : *scale-up* « versus » *numbering-up*.

Figure 27. Représentation schématique illustrant les défis à relever (encadrés francs) pour la conception de réacteurs microstructurés avancés à enzymes immobilisés. Les opportunités et perspectives visées rejoignent les conditions globales posées par le concept d'intensification (encadré précédé d'une « vanne » en position fermée).

Figure 28. Exemples de voies d'activation du silicium pour la fonctionnalisation. La surface du silicium (Si (111)) peut être traitée par de l'acide fluorhydrique (HF) ou par un plasma d'oxygène.

Figure 29. Exemple d'immobilisation enzymatique sur une surface aminée par couplage par (A) carbodiimide et (B) glutaraldéhyde.

Figure 30. Illustration des différentes étapes d'un procédé de dépôt chimique en phase vapeur (CVD).

Figure 31. Les différentes zones d'un plasma sous écoulement en RPECVD.

Figure 32. Représentation schématique de l'immobilisation covalente d'un enzyme (trypsine) sur un film polymère d'allylamine (ppAA) obtenu par polymérisation plasma.

Figure 33. Schéma représentant l'élaboration d'un biocapteur ampérométrique où la glucose oxydase est immobilisée par adsorption/ recouvrement par un film sur des nanotubes de carbone (CNT) préalablement traités par un plasma d'azote.

Figure 34. Schéma de principe du réacteur RPECVD pour le dépôt de ppTMDSO (IS : ionisation secondaire ; d : distance ; TMDSO : TetraMéthylDiSiloxane).

Figure 35. Mécanisme simplifié de la polymérisation plasma de TMDSO par la technique RPECVD en présence d'azote et d'oxygène.

Figure 36. Images obtenue par microscopie électronique des coupes transversales de microcanaux en ppTMDSO réalisés par la méthode PPSL avant (a1, b1) et après (respectivement a2, b2 et c) la dissolution des couches sacrificielles. La progression du solvant responsable de la décomposition de la résine sacrificielle est illustrée en (d) sous microscope optique.

Figure 37. Schéma d'un procédé de fabrication de microcanaux en PDMS faisant appel au concept de conception « *bio-intégrante* ». Le dépôt biologique (coating) créé après évaporation d'une solution volatile contenant recouvre toute la surface intérieure des microcanaux avant leur « fermeture ».

Figure 38. Microsystèmes distincts présentant une fonction de mélangeurs passifs.

Figure 39. Schématisation en coupe transversale des différentes étapes de traitements et de dépôts pour la microfabrication bio-intégrante de canaux microfluidiques en ppTMDSO.

Figure 40. Photographies des wafers (3 pouces) en quartz (a) et silicium (b) sur lesquels a été déposée la résine sacrificielle formant les futurs microcanaux.

Figure 41. Cliché obtenu par MEB d'un flanc de la structure résine-ppTMDSO. L'épaisseur du film polymère montre une inhomogénéité spatiale principalement due à un effet d'ombrage par les extrémités de la résine.

Figure 42. Cliché obtenu par MEB de la structure résine-ppTMDSO- β -galactosidase. Le dépôt d'enzyme révèle une structuration sous forme de « dôme » en raison d'un faible étalement dû au caractère hydrophobe du film.

Figure 43. Clichés optiques présentant la structure résine-ppTMDSO- β -galactosidase vue de dessus en prévision de canaux de a) 250 μm et b) 100 μm de largeur.

Figure 44. Clichés obtenus par MEB de tranches de la structure finale après clivage transversal. a) Le capot de ppTMDSO d'une épaisseur de 37 μm recouvre la résine d'une douzaine de micromètres. b) En raison du profil « casquette », la largeur supérieure de la résine atteint 50 μm alors que sa largeur inférieure se limite à environ 40 μm .

Figure 45. Images optiques illustrant l'évacuation de la résine des microcanaux par dissolution à l'acétone. a) La résine se dissout progressivement et ne semble pas affecter la structure des spots d'enzyme. b) L'entrée du canal à droite de l'image est libérée de la résine. Le sens de progression du solvant est schématisé par la flèche rouge.