

UNIVERSITE DE LILLE I – SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Ecole Doctorale Sciences Pour l'Ingénieur

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Micro et Nanotechnologie, Acoustique et Télécommunication

Présentée par

Kalim BELHACENE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Conception de BioMEMS assistée par plasma froid : Nouvelles approches

N° d'ordre : 41994

Institut Charles Viollette EA 7394

Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien, IUT A – Polytech'Lille, France

Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie

IEMN, UMR CNRS 8520, France

Soutenue le 11 mars 2016, devant le jury composé de :

Mme. Farzaneh AREFI-KHONSARI	Professeur (Université de Paris VI - UPMC)	Rapporteur
M. Loïc BLUM	Professeur (Université de Lyon 1 – ICBMS)	Rapporteur
M. Thierry MAUGARD	Professeur (Université de la Rochelle – LIENSs)	Examinateur
M. Pascal DHULSTER	Professeur (Université de Lille 1 – ICV ProBioGEM)	Examinateur
M. Philippe SUPIOT	Professeur (Université de Lille 1 – IEMN)	Directeur de thèse
M. Renato FROIDEVAUX	Professeur (Université de Lille 1 – ICV ProBioGEM)	Directeur de thèse
M. Anthony TREIZEBRE	Maitre de conférences (Université de Lille 1 – IEMN)	Invité
Mme. Céline VIVIEN	Maitre de conférences (Université de Lille 1 – IEMN)	Invitée

Résumé

L'avènement de la micro et de la nanotechnologie a créé un bouleversement dans beaucoup de domaine touchant aussi bien la vie courante, que les domaines industriels ou de recherches. La réduction des échelles permet une intégration de plus en plus poussée de fonctions et d'applications donnant accès à un potentiel d'utilisations quasi infini. Dans le domaine de la recherche, les enjeux économiques (quantité de matière employée) et écologiques (traitement des déchets, risques chimiques) vont directement dans le sens de cette miniaturisation afin de permettre l'obtention de procédé d'analyse plus sûr, plus propre et moins couteux. Pour aller dans ce sens, cette thèse présente la mise en place d'un nouveau procédé de conception de BioMEMS assistée par plasma froid. En clair, cette thèse a pour objectif le développement d'un microdispositif conçu à partir d'un matériau non toxique, le Tetramethyldisiloxane (TMDSO), à l'aide de la technologie, simple et rapide, de dépôt de couche mince assisté par plasma, et intégrant un élément biologique, une enzyme, pour la réalisation de réaction catalytique. Le développement de ce microdispositif a dû se faire par l'étude et la validation des différentes étapes de conception définissant la méthodologie de travail. Pour cela, dans un premier temps, un protocole d'immobilisation et d'intégration de l'enzyme, ici la β-galactosidase, dans le TMDSO polymérisé par plasma (ppTMDSO), a été développé afin de vérifier et valider la capacité de ce polymère à retenir les enzymes et donc conserver sa fonction biologique pour plusieurs séquences d'utilisation. Ensuite, une évaluation de l'activité catalytique de l'enzyme immobilisée a été entreprise lors de la mise en place de réaction en condition statique puis en condition continue d'alimentation, à l'échelle millifluidique, validant d'une part le protocole d'immobilisation et mettant en évidence le caractère biocompatible du ppTMDSO. Dans un troisième temps, une descente en échelle a été réalisée avec la conception d'un microréacteur en silicone, à enzyme immobilisée par le ppTMDSO, afin d'évaluer l'influence du passage à l'échelle microfluidique sur la catalyse enzymatique et de comprendre les phénomènes liés à la diffusion et la réaction des espèces au sein du dispositif. Enfin, dans la dernière partie de l'étude, la conception d'un microcanal entièrement conçu en ppTMDSO et intégrant l'enzyme, a été réalisée afin de d'étudier la faisabilité d'une méthodologie « bio-integrante » pour la création d'un BioMEMS. L'utilisation d'une méthodologie bio-integrante, ayant recours à un procédé simple et rapide à mettre en œuvre, peut être considéré comme une alternative prometteuse pour le développement de nouveaux outils de recherches.

Mots-clés: *enzyme, cinétique, microréacteur, microfluidique, immobilisation enzymatique, polymère, microcanaux, plasma froid, BioMEMS*

Abstract

The advent of micro and nanotechnology has created an upheaval in many area affecting both everyday life, as industrial areas or research. Reducing scales allows integration of increasingly advanced functions and applications with access to an almost infinite potential uses. In the field of research, economic issues (amount of material used) and ecological (waste treatment, chemical hazards) go straight in the direction of this miniaturization to allow the process of obtaining analytical process safer, cleaner and less expensive. To move in this direction, this work presents the development of a new design process BioMEMS assisted by cold plasma. Clearly, this work aims at developing a microdevice designed from a non-toxic material, tetramethyldisiloxane (TMDSO), using technology, simple and fast, thin film deposition enhanced by plasma and incorporating a biological component, an enzyme, for carrying out catalytic reaction. The development of this microdevice had to do with the study and to validate of the various stages of design defining the methodology. In a first step, an immobilization protocol and integration of the enzyme, the β-galactosidase in our case, inside the plasma polymerized TMDSO (ppTMDSO), was developed to verify and validate the ability of this polymer to retain enzymes and thus retained its biological function for several sequences of use. Then, an evaluation of the catalytic activity of the immobilized enzyme was undertaken during the implementation of closed reactor in reaction batch-type reactor and then open reaction in continuous flow-type reactor, with the millifluidic scale, validating a share the immobilization protocol and highlighting the biocompatible nature of ppTMDSO. Thirdly, a reducing of scale was made with the design of a silicon microreactor ppTMDSO with the immobilized enzyme to assess the influence of the transition to the microfluidic scale enzyme catalysis and understand phenomena related to the diffusion and reaction of the species within the device. Finally, in the last part of the study, the design of a microchannel designed entirely in ppTMDSO and incorporating the enzyme, was conducted to study the feasibility of a method "bio-integrated" to the creation of a BioMEMS. The use of bio-integral methodology, utilizing a simple and rapid method to implement, can be considered as a promising alternative for the development of new research tools.

Keywords: *enzyme, kinetics, microreactor, microfluidics, enzyme immobilization, polymer, microchannels, cold plasma, BioMEMS*

Remerciements

Ces trois années de thèse ont été pour moi une expérience inoubliable et un enrichissement personnel aussi bien scientifique que social et je dédie cette partie remerciement à toutes les personnes ayant eu cet impact positif sur moi.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse, qui, sans leur confiance je n'aurais jamais pu vivre cette expérience. Je remercie le professeur Renato Froidevaux pour son expertise dans le domaine du génie enzymatique, le suivi constant de l'avancée du travail et les nombreuses réflexions et idées apportées qui ont permis l'avancée du sujet. Dans un contexte d'élargissement des perspectives du travail, je te remercie de m'avoir témoigné ta confiance en me faisant découvrir la Roumanie, à travers le programme d'échange Brancusi, ce qui m'a permis de découvrir la ville de Iasi, dans laquelle je garderai toujours d'excellent souvenirs (et que je recommande à tous de visiter). Enfin merci pour ton ouverture d'esprit et ton humour face à mes blagues (souvent pas drôle) et surtout pour les matchs de badminton, que je n'ai jamais gagné face à toi mais j'y arriverai ! Je remercie évidemment très chaleureusement le Professeur Philippe Supiot pour son soutien, sa présence, ses compétences et pour m'avoir fait découvrir et surtout fait comprendre les domaines de la physique des plasmas et la micro/nanotechnologie, domaines qui étaient inconnus pour moi auparavant. Je te remercie d'avoir permis l'aboutissement de ce sujet, même si parfois les conditions expérimentales n'étaient pas en notre faveur (rappel sur le précurseur contaminé). Merci de l'investissement apporté dans ce travail et d'avoir su dépasser les frontières de la discipline des plasmas en intégrant l'aspect génie enzymatique.

Je vous remercie tous les deux pour ces trois années de thèse (+ le stage), j'espère que vous garderez un aussi bon souvenir de moi que celui que j'ai de vous.

Je tiens à remercier les membres du jury qui vont examiner ce travail et apporter leurs éléments de réflexion afin de permettre une avancée positive du sujet mais également de leur participation active lors des comités de thèse qui m'ont permis de me conforter dans mes pistes de réflexion et de faire évoluer ce sujet dans le bon sens. Je remercie le professeur Pascal Dhulster, directeur de l'Institut Charles Viollette, d'apporter son expertise dans le développement et le génie des procédés, mais également un remerciement particulier pour le fait de m'avoir accueilli et permis de travailler au sein de l'équipe de recherche ProbioGEM. Je remercie également Farzaneh Arefi-Khonsaki, professeure à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris, d'apporter ses connaissances et un regard expert dans le domaine des traitements par plasma. Merci également à Thierry Maugard, professeur à l'Université de la Rochelle, pour son expertise dans le domaine du génie enzymatique, garante d'une discussion constructive sur le travail accompli. Je remercie évidement le professeur Loïc Blum, de l'Université de Lyon 1, d'une part d'avoir accepté d'examiner ce travail et d'apporter vos connaissances et éléments de réflexion en génie enzymatique et conception de microsystèmes et d'autre part, pour la discussion téléphonique que nous avons eue de cela un an me permettant de ressortir quelques pistes de réflexion pour l'aboutissement de ce sujet. Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Céline Vivien et Anthony Treizebré, que

j'ai tenu à inviter dans ce jury de thèse, pour ses années d'accompagnement sur le sujet et pour tous les conseils prodigués pour la résolution des difficultés rencontrées, les succès, surtout la bonne humeur.

J'exprime toute ma reconnaissance envers les chercheurs, techniciens, ingénieurs qui m'ont aidé à l'évolution du sujet. Un grand merci également à Sébastien Lamant, expert en dépôt jet d'encre, futur docteur, et son fameux « splouch » pour qualifier le dépôt d'une nano goutte d'enzyme. Merci également à Christian Malas et Garrett Curley, les « Macgyver » du bâtit plasma du P₃, merci d'avoir pris soin de la bête. Dans l'équipe ProbioGEM, je remercie Max Bechet pour sa bonne humeur quotidienne et Corinne Boistel, la maman du labo, auprès de laquelle je m'excuse pour le non port de lunette.

Je tiens à exprimer toute mon affection envers le personnel de ProbioGEM pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Je remercie Dominique Vercaigne-Marko pour les missions d'enseignements confiées, Naima Nedjar pour la bonne humeur matinale, Krasimir Dimitrov toujours bien entouré, Benoit Cudennec monsieur « c'est génial », Rozen Ravallec-Plenaut la plus belle MCF du labo, Francois Krier pour les moments dans le public du restaurant « la maison du chasseur » en Roumanie, Christophe « S » Flahaut, François Lennau, Francois Coutte (allez Paris !) et toute l'équipe de Déinobiotics dont Hugo, Marjorie, Guillaume.

A présent, je tiens à remercier l'ensemble des doctorants pour ces trois (voire plus pour certains) merveilleuses années. On dit que rire équivaut à un steak, je comprends mieux alors ma prise de poids : c'est à cause de vous ! Vous êtes des gens formidables.

Une pensée aux anciens doctorants, Amirouche (Monsieur « tu comprends ! »), Marwan (Docteur Q), Cédric (le Démon), Thibaut (le Breton) et bien évidement mister Adil (chef, boss, mister plasma, Walker ou Tucker au choix), l'un des meilleurs doctorants avec qui j'ai pu bosser, « trouver la parade » pour l'aboutissement de cette thèse et se balancer les répliques du film « *CLIFFHANGER* » merci pour tout, et bon courage pour la suite.

Bon courage à ceux qui continu l'aventure de la thèse : Juliette (Caco2, *les STC1 sont mortes*, poupoupou!), Alexandra (choupinette), Delphine P (hey mon esstraction!), Oumaima (la sportive), Luiz (Luigi), Mickael (l'homme bonnet), Yazen (Président), Ahmed (Général), Qassim (Professeur), Sabrine, Ameen, Alaa, Debarun, Taki (l'Unique), rendez-vous pour un Footsal ou un Laser game. Pour clôturer la liste de cette folle bande d'irresponsables, je ne peux oublier le fameux Rémi Pry...non Przz...non....enfin Rémi P, le plus vieux doctorant que je connaisse, fan de Lens, avec qui j'ai vécu le master, le stage et la thèse. Seconde moitié du duo Tic & Tac du labo, merci pour ces années de fou rire sur tout et n'importe quoi, tu vas déprimer sans moi mais on se retrouvera pour des soirées avec cagoule ou des ANR P ;-). Pour te rappeler les quelques bons souvenirs vécus, voici quelques mots clefs (*grenouille, « wé mais d'accord quoi ! », horodateur, alligator, pamplemousse, bouchon, ensemencer une boite de pétri, Cliffhanger, la Plage ...)* et surtout « t'inquiète pas ! ».

Je souhaite un bon courage aux nouveaux venus Barbara, Maxime, Justine, Sandy, Antoine et Cyril, ne vous laissez pas faire et faites attention à vos ordinateurs ;) et une petite dédicace à tous les inconnus du hall de Polytech'Lille (*l'épouvantail, le crabe ou la plante verte, le rodeur à moustache*).

J'adresse également mes remerciements envers mes amis qui m'ont soutenu et encouragés toutes ses années. Merci à l'équipe du vendredi soir au Flunch, Maureen l'insoumise, Samir prénom, Larbitch et Jalal machin, désolé de mon manque de ponctualité aux rendez-vous :p. Merci également aux plus anciens Sami (le nouveau Toulousain), Kamel (l'instit fan de Michael Jackson), Lise (la rongée), Mamianne et Garry (le vieux chauve).

Pour conclure, je remercie toute ma famille pour le soutien et les encouragements depuis toujours. Je dédie ce travail à la nouvelle génération Adam, Ilan, Célina et Sofiane, votre oncle vous aime.

« Du besoin nait l'invention » Jim Carrey (Disjoncté - 1996)

Abréviations et acronymes

AFM	Microscopie à Force Atomique (Atomic Force Microscopy)
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
BioMEMS	Système Biologique MicroElectroMechanique
β-gal	β-galactosidase
CVD	Dépôt Chimique en phase Vapeur (Chemical Vapor Deposition)
DC	Courant Direct (Direct Current)
FTIR	Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourier (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy)
GHz	GigaHertz
IMER	Réacteur à Enzyme immobilisées (IMmobilized Enzyme Reactor)
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MHz	MegaHertz
ONPG	ortho-NitroPhenyl-β-D-Galactopyranoside
PDL	Post-Décharge Lointaine
PDMS	PolyDiMethylSiloxane
PECVD	Dépôt Chimique en phase Vapeur assistée par plasma (Plasma Enhanced CVD)
pН	potentiel Hydrogéne
ppTMDSO	Tetramethyldisiloxane polymérisé par plasma (plasma-polymerized TMDSO)
P-V	Ecart Pic-Vallée (Peak-to-Valley)
RBG	Resorufin- β -D-Galactosidase
RF	Radio-fréquence
RPECVD	Dépôt Chimique en phase Vapeur assistée par plasma en post-décharge (Remote PECVD)
Si	Silicium
slpm	Litre standard par minute (standard liter per minute)
sccm	Centimètre cube par minute (standard cubic centimeter per minute)
TMDSO	1,1,3,3-TetraMethylDiSiloxane
UV	Ultra-Violet
[E]	Concentration en enzyme
[E] ₀	Concentration initiale en enzyme
[S]	Concentration en substrat
$[S]_0$	Concentration initiale en substrat
[P]	Concentration en produit
[P] ₀	Concentration initiale en produit
k _{cat}	Constante catalytique
Km	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Vitesse maximale de réaction
Vi	Vitesse initiale de réaction

Table des matières

PARTIE I. INTRODUCTION	1
I.1. Contexte de la thèse	2
I.2. Problématiques et enjeux	5
PARTIE II. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
II.1. Microsystème et BioMEMS	9
II.1.1. Miniaturisation des systèmes : nouvelle voie d'analyse	9
II.1.1.1. Problèmes actuels des gros volumes	9
II.1.1.2. Intérêts de la réduction d'échelle	10
II.1.1.3. Conditions hydrodynamiques en microfluidique	11
II.1.2. Techniques de microfabrication	14
II.1.2.1. Techniques dures	14
II.1.2.2. Techniques douces	15
II.1.3. Applications des microsystèmes : les BioMEMS	16
II.1.3.1. Outils Analytiques	17
II.1.3.2. Concept de bio-intégration des microsystèmes : Biocapteurs	18
II.2. Les catalyseurs biologiques : les enzymes	20
II.2.1. Généralités	20
II.2.2. Fonctions des enzymes : outils de biocatalyse	20
II.2.3. Conditions environnementales de la réaction	21
II.2.3.1. Influence de la température	21
II.2.3.2. Influence du pH	21
II.2.3.3. Influence du solvant	22
II.2.3.4. Réaction enzymatique	22
II.2.3.4.1. Comportement de la réaction enzymatique	22
II.2.3.4.2. Constantes de réaction	24
II.2.3.4.3. Représentations graphiques des résultats	25
II.2.4 Immobilisation d'enzyme : les méthodes conventionnelles	27
II.2.4.1. Immobilisation par interaction chimiques : liaisons covalentes	27
II.2.4.1.1. Interactions covalentes sur support	27

II.2.4.1.2. Immobilisation par réticulation	28
II.2.4.2. Immobilisation physique de l'enzyme	29
II.2.4.2.1. Adsorption	29
II.2.4.2.2. Inclusion et confinement	30
II.2.5. Catalyse enzymatique hétérogène	31
II.2.5.1. Phénomènes diffusionnels	31
II.2.5.2. Phénomènes de partage	32
II.2.5.3. Encombrement stérique	33
II.2.6. Catalyse enzymatique par la β-galactosidase	33
II.2.5.1. Généralités	33
II.2.5.2. Détermination de l'activité enzymatique de la β-galactosidase	34
II.2.5.2.1. L'ONPG (o-nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside)	34
II.2.5.2.2. La RBG : resorufin-β-D-galactopyranoside	35
II.2.5.3. Immobilisation de la β-galactosidase : quelques exemples	36
II.3. Dépôt chimique assisté par plasma	37
II.3.1. Généralités	37
II.3.2. Applications des plasmas	38
II.3.2.1. Traitement de surface : gravure	38
II.3.2.2. Modifications de surface	38
II.3.2.3. Dépôt chimique en phase vapeur	39
II.3.3. Dépôt de couche mince polymérisée par plasma	40
II.3.3.1. Mécanismes réactionnels	40
II.3.3.2. Fonctionnalisation des surfaces	42
Amination des surfaces	42
Carboxylation des surfaces	42
Autres fonctionnalisations chimiques	43
II.3.3.3. Fonctionnalisation enzymatique des films polymérisés par plasm	иа : 13
II 2 4 Cas de TMDSO	43 11
11.5.4. Cas au 1 MD50	44

II.3.4.1. Conditions expérimentales	45
II.3.4.2. Mécanismes de polymérisation du TMDSO	46
II.3.4.3. Conception de microstructure en ppTMDSO	59
PARTIE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	51
Chapitre.1. Immobilisation de la β-galactosidase par plasma froid : étude de faisabilité	53
1.1. Méthodologie d'immobilisation	53
1.2. Etude de la méthode « indirecte » par adsorption-recouvrement	54
1.2.1. Stratégie	54
1.2.2. Mise en place de la méthodologie « indirecte »	55
1.2.2.1. Conditions experimentales	55
1.2.2.2. Caractérisations de l'immobilisation par la méthode indirecte	62
1.2.3. Préparation des échantillons et détermination de l'activité de la β-galactosid	lase
immobilisée	67
1.3. Etude de la méthode « directe »	70
1.3.1. Conditions expérimentales	71
1.3.2. Caractérisations de l'immobilisation directe	75
1.3.3. Evaluation de l'efficacité de l'immobilisation	76
Conclusion	77
Chapitre 2. Etude de la catalyse enzymatique de la β-galactosidase immobilisée par ppTMDSO	le 79
2.1. Etude de la stabilité de la catalyse enzymatique	79
2.1.1. En condition statique	79
2.1.1.1. Conditions experimentales	79
2.1.1.2. Resultats	80
2.1.2. En flux continu	85
2.1.2.1. Conditions experimentales	85
2.1.2.2. Resultats	87
2.2. Etude des paramètres cinétiques	88
2.2.1. En condition statique	88

2.2.2. En flux continu	91
Influence du temps de séjour de l'ONPG	94
Conclusion	97
Chapitre 3. Conception d'un microcanal à β-galactosidase immobilisée	99
3.1. Description du concept	<i>99</i>
3.2. Conditions experimentales	99
3.3. Mise en œuvre de la réaction enzymatique dans le microréacteur	110
3.3.1. Conditions expérimentales	110
3.3.2. Etude de la réaction enzymatique	112
3.3.3. Détermination des constantes catalytiques	116
3.4. Etude des phénomènes de diffusion et de réaction au sein du microréacteur	120
3.4.1. Simulation des phénomènes dans le système	120
3.4.2. Calculs des paramètres du système	125
3.4.2.1. Diffusion des molécules dans la pseudo-couche limite	126
3.4.2.2. Diffusion des molécules dans la couche de ppTMDSO	128
Conclusion	136
Chapitre 4. Conception d'un BioMEMS à β -galactosidase immobilisée par le ppTMDSO	137
4.1. Concept	137
4.2. Design de microstructures en ppTMDSO	137
4.3. Intégration de la β-galactosidase au design du microcanal	139
4.4. Conception de microcanaux en ppTMDSO à enzyme immobilisée	143
Conclusion	150
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	151
Synthèse des résultats	152
Perspectives	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXE	173

I. Introduction

Cette partie replace le contexte de la thèse en mettant en avant les avancées passées de la recherche et les perspectives scientifiques apportées par le développement du sujet étudié. L'accent sera plus particulièrement mis sur les deux grands axes d'études que sont la conception de BioMEMS et leurs applications et la contribution de la technologie plasma impliquée dans les traitements de surface, la polymérisation et le design de microstructures.

I.1. Contexte de la thèse

Le développement de la micro et nanotechnologie a permis, depuis plusieurs décennies, d'améliorer l'intégration de plus en plus de composants et systèmes. Ceux-ci ont permis d'augmenter le nombre de fonctions et d'applications de la plupart des domaines actuels, tels que la médecine (implants auditifs, *pacemaker...*), la télécommunication (smartphone, tablette, drone...), ou encore l'automobile (radar de recul, caméra embarquée, écran tactile intégré ...). Ces progrès techniques semblent prendre de plus en plus de place dans nos vies à mesure qu'ils diminuent en taille.

Le domaine analytique n'est pas exclu de ces avancées technologiques qu'apporte la réduction d'échelle. L'avènement de la micro et nanotechnologie a permis le développement d'un nombre impressionnant et souvent improbable d'outils ouvrant le champ à des possibilités d'analyses jusque-là inaccessibles à l'échelle conventionnelle. Ces outils souvent appelés MEMS (*MicroElectroMechanical Systems*) sont décrits, de par leur dénomination, comme des **systèmes** comprenant un ou plusieurs éléments **mécaniques**, qui est le plus souvent un canal **micro**fluidique pour le transport de composés et d'un ou plusieurs composants **électroniques** conférant une/des fonction(s) additionnelle(s) au systèmes (détection, chauffage, pompe, transducteur ...). Ces microsystèmes sont utilisés en tant que systèmes d'application à l'échelle micrométrique (*Lab on chips*) ou encore comme plateforme analytique (*Microarrays*, μTAS). Entre 1974 et 2014, le nombre de publication traitant du développement et de la conception de MEMS est passé de 1 document publié par an à plus de 15000 documents publiés par an avec une croissance annuelle constante (Figure 1).



Figure 1. Evolution annuelle du nombre de documents scientifiques relatifs aux MEMS (BioMEMS, Microdevices µTAS, Lab on Chips, Microarrays) (source Scopus)

Dans la famille des MEMS, nous nous sommes intéressés aux BioMEMS (*BiologicalMEMS*) dans lesquels un élément biologique est intégré et participe activement à la fonction du MEMS. L'élément biologique, appelé biorécepteur, peut être de nature très varié. On retrouve aussi bien des cellules (Ming, 2009), des anticorps (Desmet, 2013) ou encore des enzymes (Xiong, 2013). Chaque biorécepteur est sélectionné spécifiquement en fonction de l'utilisation et de l'information recherchée qui en découlera (taux de glucose, insuline, réaction au stress...). Dans le cas des enzymes, elles présentent un intérêt particulier pour l'analyse d'une réaction ou d'un environnement particulier. Elles constituent des catalyseurs biologiques pouvant favoriser une réaction ou permettre l'étude d'un substrat particulier grâce à son interaction enzyme-substrat et la réponse du produit résiduel obtenu. Ainsi, l'enzyme intégrée à de tels microsystèmes permet de réaliser des réactions enzymatiques avec de très faibles volumes, mais également d'obtenir une mine d'informations sur un environnement (milieu réactionnel, organisme vivant...) grâce à la grande variété d'enzymes pouvant être utilisées.

Pour l'obtention de tels systèmes, l'intégration d'enzyme doit être contrôlée et stable durant l'utilisation ou la conservation. Ainsi, la mise en place de protocoles solides pour cette « bio-fonctionnalisation » constitue une étape importante de la conception. C'est pourquoi, dans le déroulement de la thèse, un effort tout particulier a été porté sur cette intégration avec le développement d'une technique d'immobilisation mettant en jeu l'inclusion de l'enzyme sous un film de polymère déposé par plasma.

L'existence de nombreux protocoles, bien maitrisés, de conception de microstructures et microsystèmes a soulevé la question du choix de la technologie plasma pour la mise en œuvre de telles structures.

La technologie plasma est déjà bien connue pour des applications dans le traitement de surface notamment en médecine (Junkar, 2013, Chua, 2012) ou en industrie (Huang, *1996*). L'action de bombardement ou d'adsorption des espèces générées par une décharge électrique (plasma) provoque des modifications de la nature de la surface traitée afin de lui conférer les propriétés souhaitées (hydrophobie, rupture de liaison, greffage de fonctions, création de sites radicalaires, groupements fonctionnels) (Elkin, 1999, Hall, 2012, Michelmore, 2013).

La grande variabilité de ces procédés, notamment dans les conditions opératoires (nature du plasma, gaz utilisé, puissance...) (Mackova, 2004, Abbas, 2009d, Callebert, 1994), permet d'explorer les propriétés de dépôts à partir de composés spécifiques additionnés aux espèces activées du plasma par procédé CVD (Chemical Vapor Deposition) (Ozaydin-Ince, 2012) afin d'augmenter le champ de modifications de la surface en apportant de nouvelles fonctions réactives (fonction amine, carboxylique,...) et de transformer une surface inerte en surface fonctionnalisée (Airatsuki, 2004). La polymérisation par plasma, notamment, permet d'apporter cette fonctionnalisation à une surface en y déposant un revêtement ou film issu de la fragmentation suivie d'une recombinaison d'un précurseur injecté dans la décharge (PECVD (Plasma Enhanced CVD)) ou dans la post-décharge (RPECVD (Remote PECVD)) plasma, qui, en fonction de la composition du précurseur et du gaz plasmagène, permettra le dépôt d'un film proposant de nombreuses espèces fonctionnalisables (NH2, COOH...). Pour exemple, nous pouvons citer les travaux d'Abbas qui ont réalisé des revêtements d'allylamine, polymérisé en décharge dans un plasma d'azote, servant à immobiliser de la trypsine pour l'hydrolyse de substrat. Le film d'allylamine avait pour effet d'apporter des groupements aminés servant de points d'accroche pour les enzymes et obtenir des films bio-fonctionnalisables pour la réalisation d'hydrolyse enzymatique (Abbas, 2009c, Supiot, 2011).

La polymérisation plasma a également permis la mise en place de protocoles de conception de microstructures assistées par plasma. En effet, les études effectuées sur les modes de dépôt et de polymérisation (Callebert, 1994, Lo, 2010) ont mis en évidence la possibilité de concevoir des microstructures en réalisant des dépôts de polymère sur des structures prédéfinies (Abbas, 2009b) et de produire des microcanaux utilisables pour la circulation de liquide. Le précurseur utilisé pour la conception de ces microcanaux fut le 1,1,3,3, tetramethyldisiloxane, un monomère organosilicé déjà bien connu (Abou Rich, 2010, Kupareva, 2013, Essakhi, 2011) et largement mentionné pour ses applications (Bocquet, 2004, Nguyena, 2007, Inagaki, 1994).

La conception de microstructures via l'utilisation de précurseurs polymérisés par plasma ouvre une nouvelle voie dans le développement d'outils de plus en plus utilisés (biosensors, BioMEMS....) (Ozaydin-Ince, 2012, Abbas, 2009a) grâce à une méthodologie simple, rapide, sèche et à coût modéré, complémentaire des procédés déjà existants (gravure, collage...). L'approche originale adoptée dans cette thèse fut d'utiliser les méthodes de polymérisation par plasma, pour l'immobilisation d'enzyme

afin d'obtenir un polymère biofonctionnel. Le polymère déjà considéré pour l'obtention de microstructures, sera utilisé pour la conception d'un microcanal intégrant l'enzyme en son sein, donnant ainsi un microcanal à activité enzymatique (microréacteur de type IMER (*Immobilized Enzyme Reactor*)). La polyvalence de la méthode de conception permettra d'adapter la structure aux besoins de l'analyse souhaitée.

Pour la réalisation de l'objectif de conception de BioMEMS assistée par plasma, une combinaison de trois domaines de compétence a été mise en jeu (Figure 1).

- L'aspect physique des matériaux et la polymérisation par technologie plasma développé au sein de l'équipe P2M, de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) (P3, Université Lille 1)
- L'aspect génie des procédés et catalyse enzymatique développé au sein de l'équipe ProBioGEM de l'Institut Charles Viollette (Polytech'Lille, Université Lille1)
- L'aspect conception de microstructures et micro/nanotechnologie développé au sein de l'équipe BioMEMS (IEMN, Université Lille 1)



Figure 2. Combinaison interdisciplinaire exploitée et développée au cours de la thèse

I.2. Problématiques et enjeux

Pour répondre aux objectifs de la thèse traitant de la « Conception de BioMEMS assistée par plasma froid », la mise en place d'une méthodologie de travail originale et raisonnée a dû être entreprise. Le découpage en trois grandes parties des travaux a été fait en gardant à l'esprit la validation de la faisabilité du procédé de conception.

Ainsi, les parties devaient répondre aux problématiques suivantes :

- La technologie d'immobilisation d'enzyme par inclusion dans un polymère déposé par la technologie des plasmas froids était-elle faisable ? Si oui, dans quelles conditions ?
- Quelle est l'influence des conditions de réactions sur le catalyseur enzymatique (réactions en système discontinu, continu et en microfluidique/continu) ?
- La conception d'un biocapteur enzymatique totalement en polymère déposé par plasma est-elle envisageable ?

Pour tenter de répondre à ces interrogations, la stratégie adoptée fut tout d'abord d'évaluer le potentiel d'utilisation du ppTMDSO (*plasma polymerized TetraMethylDiSilOxane*) dans le cadre de l'immobilisation d'enzyme (**Chapitre 1**) ainsi que de déterminer son impact sur l'activité enzymatique dans le cadre de réaction en réacteur discontinu de type *batch* et en réacteur ouvert de type *flux continu* (**Chapitre 2**).

Ensuite, une approche de conception d'un microsystème en PDMS à enzyme immobilisée par le ppTMDSO a été entreprise afin de valider la faisabilité et l'application de l'immobilisation par plasma froid à des conditions microfluidiques (**Chapitre 3**). Un effort sur la compréhension des mécanismes de réaction enzymatique et du comportement des espèces au sein du microsystème, a été fourni à cette étape avancée de conception.

Enfin, une perspective de développement d'un microsystème à enzyme immobilisée totalement en ppTMDSO a été évaluée (**Chapitre 4**). Pour cela, les méthodologies de conception de microcanaux par l'utilisation d'une résine sacrificielle et le dépôt d'enzyme par la technologie d'impression jet d'encre (dépôt de microspots d'enzyme) ont été employées. Ce couplage a permis la réalisation de microcanaux en ppTMDSO, contenant les enzymes, incluses dans le réseau du polymère.

L'ensemble des résultats obtenus, lors du développement de ces différentes étapes, sera détaillé et discuté dans la partie *Résultats et discussions* du manuscrit. Avant tout, une partie *Etude bibliographique* est proposée afin de présenter au lecteur les éléments nécessaires à la compréhension du sujet traité et sa place dans la littérature scientifique actuelle

II.1. Microsystème et BioMEMS

Ce chapitre va s'attacher à décrire l'état de l'art des principaux concepts de cette thèse : la conception de BioMEMS, le traitement plasma et l'immobilisation d'enzymes. Cette première partie s'intéresse au principe de la réduction d'échelle dans un cadre général et ses apports dans la mise en œuvre d'outils analytiques, puis, se concentrera sur les méthodes courantes employées pour la conception de ces outils et enfin se focalisera sur les BioMEMS et leurs applications.

II.1.1. Miniaturisation des systèmes : nouvelle voie d'analyse

II.1.1.1. Problèmes actuels des gros volumes

L'industrialisation et la montée en échelle de procédé ont permis de réaliser plusieurs avancées en termes d'efficacité et de productivité. La majeure partie de ces procédés reposent sur l'utilisation de réacteurs et mettent en jeu des procédés de type *batch* c'est-à-dire des procédés discontinus (Hartman, 2009, Valera, 2010, Vaccaro, 2014). Cependant, dans le cadre de l'étude d'une réaction ou d'un environnement réactionnel complexe (organisme vivant), l'utilisation de ce genre de méthodologie soulève plusieurs problèmes :

- Contrôle de la réaction et mesure en ligne: dans un volume réactionnel important de quelques millilitres aux centaines de litres, la connaissance du mécanisme de réaction est primordiale pour le « contrôle » d'une réaction. Ainsi, l'utilisation d'outils de mesure en ligne est indispensable pour l'obtention des paramètres intrinsèques à un système (pH, température, concentration en oxygène...) et la montée en échelle (passage des millilitres aux litres) laisse place à des mesures globales plutôt qu'à des mesures localisées
- Consommation énergétique et matérielle : les procédés discontinus de type batch, à grande échelle, posent les conditions d'utilisation de volumes importants de réaction, et donc nécessite l'emploi de matériels adaptés (cuves à grande contenance, résistance de chauffage, système de refroidissement...) ce qui représente un coût non négligeable
- Passage du discontinu au continu : pour une réelle efficacité d'un procédé et notamment pour l'obtention d'un produit « purifié », des systèmes d'extraction, de séparation, purification ou encore de filtration doivent être adaptés à ce procédé et donc nécessitent une réflexion et une méthodologie parfois remettant en question toute l'approche du procédé (Lomel, 2006, Elvira, 2013)

D'autres contraintes s'appliquent lors de l'utilisation de procédés à gros volumes, notamment le problème des mélanges et la répartition des réactifs au sein du volume réactionnel, la quantité limitée d'échantillons disponible, la sûreté du procédé lors de la manipulation de réactifs dangereux ou explosifs, l'accessibilité et la précision des mesures en début de réaction, etc...

Malgré les avantages que propose l'utilisation de gros volumes (productivité) pour la réalisation d'une réaction, le recours à de tels volumes réactionnels, et particulièrement pour une visée analytique, présente des impératifs de contrôle parfois délicats à mettre en place. C'est dans cette optique de contrôle raisonné d'une réaction qu'intervient la microfluidique avec ses avantages décrits dans la partie suivante.

II.1.1.2. Intérêts de la réduction d'échelle

Le passage aux échelles réduites permet d'apprécier une nouvelle voie d'accomplissement de procédés. Les intérêts (DeMello, 2006, Jasanek, 2006) les plus notables sont :

- Les volumes de réaction employés. En effet, la mise en place de procédés à l'échelle micro voire nano-fluidique permet la minimisation de l'utilisation de solvant et de réactifs nécessaires à la réalisation de réactions ou d'analyses. L'intégration de systèmes d'analyse à cette échelle permet de plus l'emploi de substances rares ou en quantité limitée. L'utilisation de quantités faibles permet de rendre un procédé plus sûr (vis-à-vis de solvants dangereux, toxiques) et plus écoresponsable vis-à-vis de l'environnement (Newman, 2013, Lerou, 2010).
- Le rapport surface/volume augmenté. Grâce aux configurations internes du microsystème et au diamètre extrêmement faible des canaux, les phénomènes de surface prennent le dessus sur l'impact du volume de réaction permettant d'améliorer les phénomènes de transfert aussi bien moléculaire que thermique (dissipation thermique aux parois). Certaines études ont montré des rapports surface/volume allant jusque 50000m²/m³ (Hessel, 2004).
- L'étude de réaction sur des temps très courts de réaction. En fonction des conditions opératoires choisies, il est possible d'étudier une réaction sur les toutes premières secondes voire millisecondes de réaction de manière très précise et, avec un système adapté, de réaliser des analyses en direct de cette réaction, donnant ainsi accès à des phénomènes et conditions impossibles à analyser en volume important.

L'emploi de microréacteurs permet d'apprécier une nouvelle dimension dans la compréhension des réactions catalytiques et de génie de procédé. Non seulement de nouvelles conditions expérimentales peuvent être entreprises « sans risques » (température, pression, solvant) mais de nouvelles

méthodologies de mise en place de procédés peuvent être entreprises, telles que le criblage à haut débit (Scheidtmann, 2001) dans un microsystème unique ou dans une parallélisation de plusieurs unités.

De nombreuses réalisations de réaction à l'échelle micrométrique ont déjà mis en évidence ces avantages, notamment le rapport surface/volume (Hisamoto, 2001, Jovanovic, 2012), les rendements de réaction, (Pommela, 2013) ou encore la possibilité d'effectuer des réactions d'extraction liquide-liquide (Lu, 2011, Aota, 2009).

Les avantages cités ci-dessus ne considèrent que l'utilisation de micro volumes. A cela s'ajoute l'éventail des configurations et des fonctionnalités associables à ces microréacteurs, telles que la multi compartimentation des réactions (Suiti, 2012), l'ajout de capteurs (Abbas, 2009a), micro-pompes, micro-mélangeurs (Jambovane, 2009).

Cependant, le recours à la réduction d'échelle n'est pas adapté à tous les procédés et plus particulièrement aux procédés de production, principalement du fait de l'utilisation de faibles volumes ou encore le problème des mélanges du fait du temps séjour moyen très court. Cependant, une montée en échelle vis-à-vis du nombre d'unités de production a été entreprise pouvant dans certains cas résoudre les problèmes de productivité.

II.1.1.3. Conditions hydrodynamiques en microfluidique

La dimension multi-analyse ou l'intensification des procédés par un passage aux conditions microfluidiques nécessite une compréhension poussée de la mécanique des fluides à cette échelle. Les dimensions appliquées dans ces conditions se placent à des niveaux compris entre le millimètre et le micromètre voire le nanomètre.

Afin de comprendre les phénomènes physiques d'écoulement au sein des microsystèmes, l'utilisation des notions fondamentales d'hydrodynamiques déjà connues peut être transposée aux conditions microfluidiques.

La caractérisation de l'écoulement en microfluidique est très souvent définie par l'expression du nombre de Reynolds *Re* calculé à partir de l'équation suivante :

$$Re = rac{
ho UL}{\eta}$$

Avec ρ la masse volumique du liquide, η la viscosité dynamique du liquide, U la vitesse de l'écoulement et L la longueur caractéristique de l'écoulement. Ce rapport traduit l'impact des forces d'écoulement sur les forces de viscosité liées à l'écoulement.

La caractérisation de l'écoulement se fait donc via la valeur de la grandeur Re avec :

- *Re* << 1, les forces d'inertie du liquide sont négligeables par rapport aux forces de viscosité. On qualifie parfois cet écoulement comme régime de Stockes
- Re > 1, les forces d'inertie commencent à prendre l'ascendant sur les forces de viscosité, conduisant à un régime qualifié de laminaire
- Re > 2000, les forces d'inertie deviennent très importantes conduisant à une instabilité du système donnant un régime qualifié de turbulent

Dans le cas d'écoulement laminaire, le transfert massique dans les microcanaux peut être apprécié par le nombre de Peclet (Pe) :

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

Avec U la vitesse de l'écoulement, L la longueur caractéristique et D le coefficient de diffusion d'une espèce. Ce rapport traduit l'influence de l'écoulement vis-à-vis de la diffusion moléculaire, et notamment avec, pour un canal de petite taille (L très petit), une importance accrue du phénomène de diffusion.

Le coefficient de diffusion D est défini par la relation de Stokes-Einstein (Einstein, 1956):

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

Avec k la constante de Boltzmann, T la température, R le rayon hydraulique de la molécule et η la viscosité dynamique.

Le temps de diffusion τ d'une espèce peut être approximé par la relation suivante :

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

Enfin, la première loi de Fick sur le flux doit être mentionnée :

$$J = -D\nabla C$$

Avec J le flux de matière, D le coefficient de diffusion et VC le gradient de concentration de l'espèce.

Au sein du microcanal, la dispersion des espèces se fait selon la distribution des champs de vitesse avec une vitesse plus importante au centre du canal et décroissante jusqu'à être quasi nulle aux parois. La Figure 1 met en évidence ce phénomène via l'utilisation de marqueurs fluorescents.



Figure 1. Illustration de la dispersion de la fluorescence au sein d'un microcanal (Devasenathipathy, 2001)

La répartition hétérogène des espèces au sein du microcanal pose le problème de mélange dans le cadre de réactions en continu, avec une répartition hétérogène des espèces (Datta, 2009). Le changement de configuration du microcanal et notamment le recours au micro mélangeur permet de diminuer ce phénomène de dispersion des espèces et donc améliore l'homogénéité d'une réaction (Figure 2).



Figure 2. Etude du mélange d'espèces injectées en co-courant dans un microcanal (Xiong, 2013)

La technologie microfluidique ouvre de nouvelles portes à la mise en place de procédés catalytiques et d'intensification, efficaces et plus sûrs. Le *design* de la structure du canal est un facteur clé pour la bonne mise en œuvre du procédé. Des outils de conception doivent être capables de répondre aux attentes en termes de robustesse et de rigueur imposées par la réaction. Ces outils de microfabrication vont être listés dans la partie suivante.

II.1.2. Techniques de microfabrication

L'accès aux conditions microfluidiques décrites ci-dessus et donc le design de ces microsystèmes nécessite des contrôles très précis et minutieux des conditions de fabrication. Un panel d'approche de microfabrication a été développé depuis plusieurs décennies, et est encore en perpétuelle évolution actuellement. En fonction des besoins, on peut distinguer deux approches très utilisées pour l'obtention de ces microdispositifs, les techniques dures, telles que la gravure dans les matériaux, et les techniques douces faisant appel aux polymères et substances plastiques.

II.1.2.1. Techniques dures

Ces techniques reprennent le principe de reproduction du motif désiré, du microsystème, sur un matériau dur (Quartz, verre, silicium...) par une succession d'étapes de conception décrite ci-après.

La première étape consiste en un premier *design* des structures souhaitées sur le matériau dur, via un procédé de photolithographie. Dans cette étape, une résine, le plus souvent photosensible, est déposée sur le matériau puis soumise à une insolation UV à travers un masque comportant les motifs des structures souhaitées afin de « marquer » la résine. Cette insolation va modifier les propriétés de solubilité de la résine et rendre la résine soluble ou insoluble aux solvants en fonction du type de résine utilisée. Les résines « positives » insolées vont être libérées par le solvant et inversement pour les résines négatives. Après élimination de la résine au développement, le matériau présente les structures en résine à sa surface.

En seconde étape, la gravure du matériau est effectuée soit par l'action d'une solution réactive qui attaque le support à l'endroit non protégé par la résine (par une solution d'acide fluorhydrique ou d'hydroxyde de potassium) soit par l'action d'un bombardement de la surface par des espèces réactives en phase gazeuse (plasma).

Enfin, afin d'obtenir une structure parfaitement étanche, par exemple pour un microcanal, une étape de collage sur support est réalisée. Le collage est réalisé soit par l'utilisation de colle chimique, par fusion (collage à haute température) ou encore collage anodique (application d'un champ électrique pour augmenter les forces électrostatiques entre les deux surfaces).



Figure 3. Exemple de biocapteur microfluidique à glucose en verre (Xiong, 2013)

Avant l'étape de collage, un dépôt peut être effectué au niveau du matériau gravé afin de lui conférer une propriété particulière telle qu'une couche d'isolant, des semi-conducteurs ou encore des polymères.

II.1.2.2. Techniques douces

Ces techniques font appel aux méthodes d'ablations laser ou encore de réplications. Elles mettent en jeu des matériaux souples de type PMMA (PolyMethylMethAcrylate) ou encore le PDMS (PolyDiMethylSiloxane), qui sont, dans les méthodes de réplications, déposés sur un moule contenant l'empreinte en relief de la structure désirée. Après polymérisation, le matériau est démoulé et collé sur un matériau dur par collage. Le collage est très souvent réalisé de manière irréversible par traitement de la surface du matériau (ex plasma d'oxygène).



Figure 4. Dispositif microfluidique en PDMS (Jambovane, 2009)

Les techniques de microfabrication dures sont de moins en moins utilisées, par rapport aux techniques douces, du fait de leur coût de fabrication et de la complexité des étapes de mise en œuvre. Les techniques douces permettent d'obtenir des microdispositifs rapidement, en un minimum d'étapes et de contraintes.

II.1.3. Applications des microsystèmes : les BioMEMS

En premier lieu, dans l'avènement des microdispositifs, le terme MEMS était le plus couramment employé pour désigner les catégories d'outils issus de la microélectronique et microtechnologique. Ces MEMS ou *Micro Electro Mechanical Systems* étaient utilisés pour des analyses physiques ou chimiques. On retrouvait cette technologie dans énormément de domaines, tels que le domaine médical, automobile, alimentaire ou encore de télécommunication.

Dans ces MEMS, on retrouve une sous-catégorie spécialisée dans l'intervention d'un élément biologique dans la conception ou dans l'application du système. Cette sous-catégorie appelée BioMEMS (*Biological MEMS*) regroupe des outils variés tels que les biocapteurs, les laboratoires sur puce, µTAS (*micro total analysis systems*), etc.

Ces BioMEMS se servent du comportement biochimique ou physique d'un élément biologique quelconque (anticorps, protéine, sucre, cellule...) face à un évènement, un contact ou un stimulus, pour émettre une réponse adaptée au phénomène rencontré (libération médicamenteuse, catalyse enzymatique, cascade de réactions, choc électrique...), le tout réalisé dans un microsystème, adapté avec tous les avantages qui ont été définis dans §.II.1.1.2.

Le BioMEMS devient un outil adaptable et même spécialisable dans une ou plusieurs fonctions simultanées et peut répondre à de nombreuses attentes.

II.1.3.1. Outils analytiques

Le terme BioMEMS regroupe de nombreux systèmes d'analyses à usages divers et variés en fonction de leurs composants électroniques, mécanique et biologique. On distingue de nombreux types de BioMEMS, parmi les plus connus :

- *Lab-on-chips* ou laboratoire sur puce qui sont des microsystèmes très élaborés qui peuvent permettre des fonctions de séparation, d'analyse, de culture cellulaire, d'échantillons le tout géré par un système microfluidique (Figure 5).
- *Biosensors* ou biocapteurs disposant d'un biorécepteur immobilisé sur un transducteur, va convertir le signal biochimique de la réaction biologique en un signal électrique, via le transducteur. Le transducteur peut être optique, électrochimique, acoustique, calorimétrique ou encore piézoélectrique.
- *Implantables devices* ou dispositifs implantables, directement en contact avec un organe ou un autre composant tissulaire. Souvent employés dans le cas d'interface pour la libération médicamenteuse (Figure 5).
- Microarrays ou micropuces se basent souvent sur la reconnaissance moléculaire pour émettre un signal directement perceptible (souvent par fluorescence). Dans cette catégorie, on connait les puces à ADN, à protéines ou encore à saccharides.



Figure 5. Dispositif de distribution de médicament implantable (gauche) (Meng, 2012), et Lab on chip BioMag pour le marquage par anticorps anti CD45 humain du sang (Maleki, 2012)

Les avancées actuelles en termes de réduction d'échelles (Mandon, 2013) et d'intégration allongent constamment la liste des microsystèmes conçus et de leur possibilité d'applications (Zhang, 2009, Bashir 2004, Andersson, 2003).

II.1.3.2. Concept de bio-intégration des microsystèmes : Biocapteurs

Pour la thèse, une catégorie de BioMEMS nous intéresse particulièrement ; il s'agit des biocapteurs ou *biosensors*. Comme décrit ci-dessus, ceux-ci se composent d'un élément biologique couplé à un transducteur ayant pour rôle de traduire le signal biochimique de l'élément biologique en un signal visuel, électrique, mécanique ou autre. La Figure 6 schématise la composition d'un biocapteur décrit par Trans-Minh (1991).



Figure 6. Schéma de principe de la composition d'un biocapteur (DSP : Digital Signal Processor / <u>A/N : Analogic/Numeric)</u>

Ils permettent ainsi d'obtenir des informations sur une molécule cible (Muguruma, 2011), un environnement (Andreescu & Marty, 2006), ou encore un organisme via des mesures *in vivo*.

Dans le cas des biocapteurs enzymatiques, l'élément biologique entrant en jeu est l'enzyme et l'élément analytique ou analyte sera le substrat. Ainsi, le principe d'un biocapteur enzymatique sera de déterminer la concentration en substrat d'un environnement via la mesure de la réaction enzymatique par le

transducteur. En règle générale, le transducteur mesurera le produit issu de la dégradation du substrat par l'enzyme.

Dans certains cas, le biorécepteur (ou enzyme) sera en contact intime avec le transducteur. Ce dernier aura pour rôle d'une part transmettre les éléments d'informations issues de la réaction enzymatique et d'autre part pouvoir effectuer des mesures « en ligne ».

Les premiers biocapteurs à enzyme remontent à 1962, dans les travaux de Clark et Lyons dans lesquels la glucose oxydase a été immobilisée sur des électrodes pour la mesure de la concentration en glucose dans un échantillon. Depuis, le développement de biocapteurs à enzyme immobilisée n'a cessé de connaitre un accroissement avec le développement de nouvelles techniques d'immobilisation, qui seront détaillées dans cette partie « Etude Bibliographique », et dans l'utilisation d'une grande variété d'enzymes pour élargir le champ d'analyse. Ainsi des panoplies de biocapteurs enzymatiques ont été créées, telles que des biocapteurs à cholestérol (Arya, 2008), glucose (Wang, 2008) ou encore pour le sang (Malhotra, 2003) et bien d'autres encore (Sassolas, 2012).

La conception de biocapteur ne semble pas connaître de limites d'application hormis l'imagination du concepteur et le besoin suscité. Dans cette perspective, le développement futur de nouvelles méthodologies de conception de biocapteur permettrait de résoudre des problèmes d'applications ou ouvrirait le champ à de nouvelles perspectives.

II.2. Les catalyseurs biologiques : les enzymes

Cette partie est consacrée à l'élément biologique intégré : l'enzyme. Pour cela, les bases des réactions catalytiques faisant intervenir des enzymes vont être détaillées en partant des propriétés des molécules d'enzymes jusqu'à leur interaction avec le substrat en passant par l'impact de l'environnement sur les mécanismes réactionnels. Enfin, nous nous focaliserons sur les principes de l'immobilisation et plus particulièrement sur l'immobilisation de la β -galactosidase, enzyme modèle utilisée tout au long de cette thèse pour la conception du BioMEMS.

II.2.1. Généralités

Les enzymes sont des catalyseurs des systèmes biologiques et sont de nature protéique. Elles interviennent spécifiquement dans les réactions métaboliques afin de faciliter et d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de réaction, via une activation énergétique. Elles possèdent une spécificité de substrat via la structure de leur site actif où se produit, dans un premier temps, la fixation du substrat par des liaisons faibles puis sa catalyse. Au niveau d'un métabolisme, les enzymes participent aux phénomènes de régulation (homéostasie) pour adapter ce métabolisme aux situations rencontrées (ex : stress).

II.2.2. Fonctions des enzymes : outils de biocatalyse

Les enzymes sont classées en six groupes en fonction du type de réaction réalisée :

- EC1 Oxydoréductases : enzymes intervenant dans une réaction mettant en jeu un donneur et un accepteur d'électrons
- EC2 Transférases : enzymes intervenant dans le transfert d'un groupement
- EC3 Hydrolases : enzymes intervenant dans la coupure des liaisons avec fixations de radicaux H et OH issus de l'eau
- EC4 Lyases : enzymes intervenant dans la coupure de liaisons par d'autres modes que l'hydrolyse
- EC5 Isomérases : enzymes intervenant dans les réactions d'isomérisation des molécules
- EC6 Ligases : enzymes intervenant dans la condensation de deux molécules couplée à la rupture d'une liaison à haut potentiel d'hydrolyse.

La grande variété de réactions catalysée par les enzymes permet leurs utilisations dans plusieurs domaines d'application, tels que l'industrie agroalimentaire, la chimie fine, la santé.

II.2.3. Conditions environnementales de la réaction

L'activité enzymatique dépend évidemment des conditions physico-chimiques de l'environnement dans lequel la réaction est mise en œuvre. Les principales conditions influençant la réaction sont la température, le pH et la composition du milieu.

II.2.3.1. Influence de la température

La température de mise en œuvre d'une réaction a une influence sur l'énergie globale d'activation de cette réaction. La valeur de température pour laquelle l'activité enzymatique est maximale est appelée température optimale. La valeur d'activité obtenue sera directement favorisée par la montée en température, influençant l'agitation thermique des molécules jusqu'à une limite après laquelle cette activité va chuter brutalement, témoignant le plus souvent d'une dénaturation thermique de l'enzyme (figure 1)



Figure 1. Variation typique de l'activité de l'enzyme en fonction de la température

II.2.3.2. Influence du pH

La valeur du pH va également avoir une influence sur l'activité enzymatique obtenue. Le pH va principalement jouer sur l'ionisation des acides aminés qui constituent la molécule d'enzyme et donc sa conformation spatiale la rendant plus ou moins active. Le maximum d'activité représente la valeur de

pH optimal de l'enzyme. Contrairement à la température, la zone de pH d'activité est étroite. En dehors de cette zone, l'activité décroît rapidement à cause des effets de l'ionisation sur la protéine, le substrat ou encore de la dégradation irréversible de l'enzyme aux pH extrêmes.



Figure 2. Variation de l'activité de l'enzyme en fonction du pH

II.2.2.3. Influence du solvant

Les solvants adéquats pour la bonne fonction des enzymes sont majoritairement aqueux afin de permettre la bonne structuration de l'enzyme et sa flexibilité dans l'espace. Cependant, la catalyse de certaines enzymes (lipases, etc.) est réalisée préférentiellement dans des solvants organiques, utilisés comme milieux favorables pour des réactions spécifiques (transestérification, aminolyse, ...) (Klibanov, 2001)

II.2.3.4. Réaction enzymatique

II.2.3.4.1. Comportement de la réaction enzymatique

L'enzyme intervenant au cours de la réaction va influer sur l'énergie d'activation chimique globale et permettre de diminuer l'énergie nécessaire aux molécules pour réagir. Ainsi, une plus grande quantité de molécules pourra réagir et donc favoriser la vitesse de réaction (Figure 3).



Figure 3. Influence des enzymes sur l'énergie d'activation d'une réaction catalytique

L'enzyme n'est pas consommée au cours de la réaction et est retrouvée intacte dans le bilan final de la réaction, comme établi dans l'équation de Michaelis Menten (1913). Brièvement, le substrat S se fixe de façon réversible sur l'enzyme E pour former le complexe ES et le transformer en un complexe EP et enfin, libère un produit P et l'enzyme E. Chaque étape de la réaction est associée à des constantes d'association (k_1 , k_{cat}) et de dissociation (k_{-1}) des complexes formés, comme le décrit le schéma cidessous (Figure 4).

$$E + S \stackrel{k_1}{\underset{k_{-1}}{\longleftrightarrow}} ES \stackrel{k_{cat}}{\longrightarrow} E + P$$

Figure 4. Equation de réaction enzymatique.

La cinétique de réaction enzymatique est généralement exprimée sous la forme de l'équation de Michaelis-Menten (Illanes, 2008) suivante :

 $-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot [E][S]}{K_m + [S]} = V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$ Figure 5. Equation de Michaelis Menten de la cinétique de réaction enzymatique
Dans cette équation, V_0 représente la vitesse initiale de réaction, [S] et [E] les concentrations initiales en substrat et enzyme. L'écriture de l'équation de Michaelis-Menten peut changer en fonction des conditions opérationnelles et notamment des concentrations en substrat S avec deux cas :

Si [S] << K_m, V₀ est directement influencée par la concentration en substrat, donnant :

$$V_0 = \frac{V_{max}.[S]}{K_m}$$

Si [S]>> K_m, V₀ varie indépendamment de la concentration en substrat, donnant :

$$V_0 = \frac{V_{max}.[S]}{[S]} = V_{max}$$

II.2.3.4.2. Constantes de réaction

Pour apprécier le comportement d'une réaction enzymatique, la détermination des constantes catalytiques est nécessaire. Ces constantes catalytiques ou paramètres cinétiques sont associés à la réaction de l'enzyme dans des conditions réactionnelles fixées initialement (substrat, milieu, température, etc.) et peuvent varier en cas de changement de ces conditions. Ainsi, lors de la mise en œuvre d'une réaction enzymatique en conditions non conventionnelles (cas de l'immobilisation), il est intéressant de déterminer ces paramètres cinétiques pour juger de l'impact de la condition de réaction sur l'activité de l'enzyme. Les paramètres cinétiques les plus couramment rencontrés sont V_{max} , K_m , $V_{max spécifique}$, k_{cat} et k_{cat}/K_m .

 V_{max} représente la vitesse maximale de réaction (nombre de moles de substrat transformé par unité de volume et par unité de temps) atteinte par l'enzyme en concentration saturante en substrat [S] et K_m, appelé aussi constante de Michaelis Menten, correspondant à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié du V_{max}.

Cette constante de Michaelis-Menten est également détaillée par l'équation suivante :

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1}$$

Le V_{max} peut également être exprimé sous la forme :

 $V_{max} = k_{cat} \cdot [E]$

dans laquelle k_{cat} représente le turnover de l'enzyme c'est-à-dire le nombre de moles de substrat transformé par unité de temps et par mole d'enzyme.

 $V_{max \ spécifique}$ correspond à la valeur de V_{max} rapporté à la quantité massique d'enzyme entrant en réaction. Enfin, la constante de spécificité de la réaction k_{cat} / K_m reflète la spécificité globale d'une enzyme visà-vis du substrat.

II.2.3.4.3. Représentations graphiques des résultats

Les paramètres cinétiques principaux de l'enzyme (V_{max} et K_m) peuvent être déterminés graphiquement à partir de la représentation de Michaelis-Menten (Figure 6) mais il est difficile d'apprécier précisément les valeurs de V_{max} et de K_m .



A partir d'une linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten (1), il est possible de remonter à ces valeurs de constante de réaction (2).

Cette équation permet une linéarisation des valeurs de vitesse obtenues.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} (2)$$

Elle se décline comme l'équation d'une droite de type y=ax+b avec y=1/V et x=1/S. La représentation graphique de cette équation, appelée représentation de Lineweaver-Burk, se décrit comme une droite de pente K_m/V_{max} qui coupe l'axe des abscisses en un point -1/K_m et l'axe des ordonnées 1/V_{max} (Figure 7).



Figure 7. Représentation graphique de Lineweaver-Burk

Cette représentation est très utilisée car simple à mettre en œuvre, mais elle n'est pas la seule méthode de détermination graphique des paramètres cinétiques d'une enzyme. La représentation de Hanes et Woolf (1932), (Leskovac, 2004) ou encore celle d'Eadie Hofstie (1942) conviennent également pour ces déterminations (Figure 8).



Figure 8. Représentation graphique d'Eadie Hofstie (gauche) et d'Hanes et Woolf (droite)

II.2.4. Immobilisation d'enzyme : les méthodes conventionnelles

L'immobilisation enzymatique consiste en la création d'une association stable entre l'enzyme et un support défini, et d'éviter, autant que possible, la fuite de l'enzyme au cours de l'utilisation de ce support. Cette association peut être de nature chimique ou physique en fonction de la méthode d'immobilisation. Cela permet d'assurer une stabilité de stockage, vis-à-vis de la conservation de l'interaction avec le support et une stabilité réactionnelle vis-à-vis de la conservation de l'activité enzymatique (Mateo, 2007).

Un développement massif de méthodologie d'immobilisation variée a permis d'obtenir un large panel d'utilisation de la catalyse enzymatique tout en diminuant le coût lié à l'utilisation de l'enzyme (Garcia-Galan, 2011). Il existe 4 grands types d'immobilisation (adsorption covalente, réticulation, inclusion, adsorption physique) définis par les conditions d'interaction avec le support d'immobilisation.

II.2.4.1. Immobilisation par interactions chimiques : liaisons covalentes

II.2.4.1.1. Interactions covalentes sur support

Cette méthode consiste en la formation d'une liaison covalente, c'est-à-dire mettant en œuvre des interactions de forte énergie, entre des groupes fonctionnels de l'enzyme proposés par les chaînes latérales des acides aminés (type amine primaire -NH₂, acide carboxylique -COOH, thiols -SH, ou encore hydroxyle OH) et le support.

L'utilisation d'agents pontants, tels que le glutaraldehyde, est très courante pour créer cette interaction forte et, de plus, conférer une meilleure liberté stérique des enzymes vis-à-vis du support. Le schéma cidessous (Figure 9) présente une stratégie d'immobilisation, sur support activé, d'enzyme par la fonctionnalisation grâce au glutaraldehyde et le carbodiimide, permettant de créer des liaisons amines ou encore imines stables.



Figure 9. Immobilisation d'enzyme sur un support via deux agents pontants ; le carbodiimide (A) et le glutaraldéhyde (B) (Sassolas, 2012)

II.2.4.1.2. Immobilisation par réticulation

Cette méthodologie consiste à établir des liaisons covalentes intermoléculaires par l'intermédiaire d'agents pontants polyfonctionnels (glutaraldéhyde), afin d'obtenir des macrostructures insolubles. On retrouve par exemple les CLEs (*Cross Linked Enzymes*), les CLEAs (*Cross Linked Enzyme Aggregates*) ou encore les CLECs (*Cross Linked Enzyme Cristals*) (Figure 10) (Sheldon & van Pelt, 2013, Hanefeld, 2009).





II.2.4.2. Immobilisation physique de l'enzyme

II.2.4.2.1. Adsorption

Contrairement à l'adsorption par liaison covalente, l'immobilisation par adsorption physique fait intervenir uniquement les groupements fonctionnels de l'enzyme et du support, afin d'établir des liaisons de faible énergie (van der Waals, hydrophobe, hydrogène, ionique...).



Figure 11. Principe d'adsorption des enzymes selon le modèle de Langmuir (1932) (Rabe, 2011)

Cette méthode d'immobilisation a l'avantage d'être la plus simple à mettre en œuvre par simple contact enzyme-support, mais avec quelques contraintes opérationnelles à prendre en compte, notamment, le temps de contact enzyme-support, la surface disponible, ou encore la concentration de l'enzyme et les conditions environnementales de l'immobilisation (pH, température, solvant...).

L'inconvénient majeur de cette méthode est bien évidemment la désorption de l'enzyme lors de son utilisation. Les forces en présence peuvent ne pas résister aux contraintes physiques et/ou chimiques du milieu réactionnel et entraîner le relargage des enzymes.

II.2.4.2.2. Inclusion et confinement

Dans les méthodes d'immobilisation par inclusion et confinement, l'enzyme est prisonnière à l'intérieur d'une matrice de type gel ou polymère (inclusion) ou dans un volume défini de type membrane ou microcapsule (confinement).



e.g. in SiO₂ sol gel

Figure 12. Encapsulation d'enzyme au sein d'une matrice gel (Sheldon 2013)

La grande majorité des matrices d'immobilisation sont obtenues par copolymérisation, ou procédé solgel, d'un matériau (polysaccharides, alginates, carraghenanes...) et de l'enzyme. La porosité ou la réticulation du matériau permet l'obtention des milieux dans lesquels les molécules de substrat peuvent circuler et permettre l'hydrolyse enzymatique. La nature des matériaux utilisés sera dépendante de la nature de l'enzyme et de l'utilisation visée. (Sassolas, 2012).

Le confinement de l'enzyme dans des microcapsules se fait également, le plus souvent, par des méthodes de polymérisation, dans lesquelles, l'enzyme en solution dans un monomère hydrophile est dispensée, le plus souvent sous forme de goutte, dans une phase organique pour l'obtention de bille.

L'immobilisation par confinement peut également s'appliquer aux membranes semi-perméables pour une utilisation en tant que membrane catalytique (Jonchems, 2011), permettant de combiner une hydrolyse de substrat et un procédé de filtration pour l'obtention d'une sélectivité intéressante de molécules produites.

L'immobilisation d'enzyme peut se faire par différentes approches ayant chacune ses caractéristiques propres et devant être adaptées aux contraintes liées à l'utilisation finale. Dans le cadre d'une immobilisation d'enzyme par plasma, le choix doit tenir compte des contraintes liées à la polymérisation du précurseur, les conditions de dépôt du monomère, la nature du support ou encore la stabilité de l'immobilisation pour une utilisation en test d'activité enzymatique.

La mise en œuvre de la catalyse dans les conditions d'immobilisation va entraîner un impact plus ou moins important sur la réaction, et donc, sur l'interprétation de l'activité enzymatique résiduelle obtenue. Il s'agit dans ce cas d'une catalyse hétérogène.

II.2.5. Catalyse enzymatique hétérogène

Une catalyse est dite hétérogène lorsque le réactif et le catalyseur sont dans deux phases distinctes. On l'observe notamment dans l'immobilisation enzymatique où le catalyseur (enzyme) se trouve au niveau ou à l'intérieur d'un support hors de la solution contenant le substrat.

Cette mise en œuvre en conditions hétérogènes va entraîner plusieurs phénomènes liés au transfert de matière selon le mode d'immobilisation de l'enzyme (en surface ou dans une matrice), la répartition de l'enzyme (densité en surface ou dans le volume) ou encore l'accessibilité du substrat vis-à-vis de l'enzyme (gradient de concentration d'espèces). On recense trois principaux phénomènes liés au transfert de matière.

II.2.5.1. Phénomène diffusionnel

La réaction enzymatique sera conditionnée par l'approvisionnement du substrat vers le site actif et la migration des molécules de produit(s) dans la solution. Ces déplacements reposent sur des phénomènes de transport par diffusion. On distingue deux types de transport associés à la diffusion :

- Transfert de matières externes associé au transport des molécules par diffusion (souvent associée à la convection) de la solution vers une surface et inversement
- Transfert de matières internes associé au transport des molécules à l'intérieur d'une matrice par diffusion

Dans le cas du transfert de matière, le transport diffusionnel (dans un modèle monodimensionnel) sera défini par la relation suivante :

$$J = k_L A (S_{sol}-S_{surf})$$

Dans laquelle, J est la quantité de matière (mol.s⁻¹) traversant la surface d'échange A, k_L le coefficient de transfert de matière (m.s⁻¹), et S, la concentration en substrat dans la solution (sol) et au niveau de la surface (surf). En reprenant l'équation de Michaelis-Menten (1) et en comparant la vitesse de réaction par rapport au flux de matière, trois cas de figure se présentent :

- J>> Vi : la réaction est nettement plus faible que la diffusion. On introduit ici le nombre de Damkholer Da :

$$Da = V_{max}/K_m.k_L$$

où kL>> Vmax/Km, donc Da<<1 traduit un régime de limitation cinétique

- J<<Vi : la réaction est nettement plus rapide que la diffusion. Dans ce cas, nous avons un Da>>1 traduisant un régime de limitation diffusionnelle externe.
- J~Vi : la réaction est du même ordre de grandeur que la diffusion. On se trouve ici dans un régime de diffusion-réaction entraînant un gradient de concentration entre la solution est la surface qui apparaît notamment autour des couches limites voisines des parois.

II.2.5.2. Phénomène de partage

Les phénomènes de partage sont observés dans le cas d'interaction des molécules avec la surface ou le microenvironnement de l'enzyme immobilisée. Des interactions de faible énergie peuvent se créer avec

des charges présentent au niveau de la surface et les molécules présentent en solution. Ces phénomènes de partage peuvent provoquer localement des variations de pH, liées à la modification des charges en surface ayant interagit avec les molécules, pouvant entraînant ainsi une variation de l'activité de l'enzyme. De plus, ces interactions peuvent également induire une accumulation du substrat dans le microenvironnement de l'enzyme, favorisant l'interaction enzyme-substrat et donc la constante de Michaelis, ou cas inverse, une répulsion du substrat en défaveur de l'enzyme et donc de cette constante.

II.2.5.3. Encombrement stérique

L'efficacité catalytique est conditionnée par l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme immobilisée. Cette accessibilité peut être perturbée en cas de gêne stérique liée à l'immobilisation. La gêne stérique peut être causée par l'orientation de l'enzyme sur ou dans la matrice d'immobilisation, la taille du substrat plus ou moins importante, les contraintes diffusionnelles liées à la matrice d'immobilisation (accessibilité vers la surface et dans la matrice).

Toutes ces contraintes associées à l'immobilisation doivent être prises en compte lors de l'étude de la catalyse et plus particulièrement lors du calcul des paramètres cinétiques de l'enzyme immobilisée.

Dans nos études, nous avons utilisé une enzyme bien connue, la β -galactosidase tant du point de vue de sa structure et de son mode de réaction que de sa mise en œuvre dans divers procédés d'immobilisation.

II.2.6. Catalyse enzymatique par la β-galactosidase

La réalisation de la thèse s'est focalisée sur l'utilisation d'une enzyme modèle, la β -galactosidase provenant de la souche *Aspergillus oryzae* et sur l'étude de son activité enzymatique dans différentes conditions de mise en œuvre de sa réaction (nature des substrats, conditions d'immobilisation, conditions de réaction en catalyse homogène et hétérogène). Le choix d'un modèle simple d'enzyme paraissait la méthodologie la plus logique à adopter afin de valider le procédé et la preuve de concept.

II.2.6.1. Généralités

La β -galactosidase ou β -D-galactoside galactohydrolase (E.C. 3.2.1.23) est une hydrolase d'origine bactérienne de la souche *Aspergillus oryzae*. Elle possède 4 sous-unités catalytiques et une masse

moléculaire de 105kDa (Urrutia, 2013). Cette enzyme est très couramment utilisée et bien caractérisée (Park, 1979) dans les réactions d'hydrolyse de substrats synthétiques comme l'ONPG (o-Nitrophenyl Galactose) (Carrara & Rubiolo, 1996) ou encore le lactose pour des applications industrielles (Jurado, 2002).



Figure 13. Structure 3D de la β-galactosidase d'Aspergillus oryzae (http://www.rcsb.org)

Par sa simplicité de mise en œuvre de la réaction enzymatique, la β -galactosidase a fait l'objet de nombreuses études et particulièrement dans le cadre d'immobilisation sur une grande variété de matériaux, tel que des silicates (Panaro-Mariotti, 2008), de la gélatine (Sungur & Akbulut, 1994), du polymère de Méthacrylate (Sun, 2010) ou encore sur des nanoparticules magnétiques (Pan, 2009).

II.2.6.2. Détermination de l'activité enzymatique de la β-galactosidase

Le pHi de la β -galactosidase se situe aux environs de 4 et son pH optimal autour de 5. Pour la mise en œuvre des réactions enzymatiques, un tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5 a donc été choisi. Deux substrats synthétiques ont été employés pour l'évaluation de l'activité enzymatique.

II.2.6.2.1. L'ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)

L'ONPG est un substrat synthétique composé d'un noyau o-nitrophenyl (ONP) lié à un galactose. En solution en présence de la β -galactosidase, ce substrat s'hydrolyse et libère l'ONP qui, en milieu basique, révèle une coloration jaune (Figure 14) dosable au spectrophotomètre à 415nm.



Figure 14. Réaction d'hydrolyse de l'ONPG par la β-galactosidase

L'utilisation du substrat synthétique ONPG permet d'une part d'observer directement si l'activité enzymatique est présente ou non (changement de couleur du milieu réactionnel de l'incolore au jaune), par son hydrolyse, et d'autre part de doser rapidement cette activité par mesure au spectrophotomètre à 415nm, de la concentration en ONP libérée.

L'intensité mesurée à 415nm étant proportionnelle à la concentration en ONP libérée, il est possible de remonter à cette concentration via la loi de Beer-Lambert (1852) suivante :

$$A = \varepsilon. l. C$$

Avec, A l'absorbance mesurée à 415nm de la solution, ε le coefficient d'extinction molaire du produit ONP (L.cm⁻¹.mol⁻¹), *l* la distance du trajet optique (cm) et C la concentration finale en produit de la solution (mol.L⁻¹). Ainsi, il sera possible de retrouver les quantités de substrat hydrolysées au cours d'une réaction enzymatique catalysée par la β -galactosidase dans son tampon.

II.2.6.2.2. La RBG : resorufin-β-D-galactopyranoside

Afin de descendre dans les sensibilités de mesure de l'activité enzymatique, et notamment dans le microsystème, un autre substrat synthétique a été employé, sur le même principe que l'ONPG mais ne

libérant pas un chromophore, après réaction, mais un fluorophore, détecté au spectrofluorimetre. Il s'agit de la resorufin- β -D-galactopyranoside, qui en solution en présence de la β -galactosidase, s'hydrolyse en un galactose et une molécule de resorufin (Figure 15), détectable pour un couple de longueur d'onde d'excitation/émission de 571/590nm.

Ce substrat synthétique est déjà bien connu et employé dans le cadre de mesure en microsystème, pour l'étude de réaction d'hydrolyse de la β -galactosidase (Hadd, 1997, Jambovane, 2009)





La détermination de la concentration en produit obtenue se fait selon le même principe que la méthodologie employée pour l'ONPG, via la relation de Beer-Lambert.

II.2.6.3. Immobilisation de la β -galactosidase : quelques exemples

La β -galactosidase immobilisée a souvent été utilisée pour des objectifs de production dans des réacteurs de type industriel (Ladero, 2003, Gaur, 2006), grâce à une grande variété de support d'immobilisation (Gûrdas, 2012, Vasilevaa, 2012), tel que les membranes ou des résines. Ces immobilisations permettent de minimiser les coûts de production associés au recyclage d'enzyme et le recours aux procédés de séparation enzyme/produit en fin de réaction.

Cependant, l'utilisation de la β -galactosidase ne se limite pas qu'aux applications de production. Son immobilisation a également été mise en œuvre dans le cadre d'étude de réaction catalytique ou de mise au point de nouveaux procédés d'immobilisation (Eggertson, 1999, Wu, 2010) permettant une rapide validation de la biocompatibilité et une détermination aisée de l'impact du procédé sur la réponse catalytique. Parmi ces méthodes d'immobilisation, la technologie de traitement plasma a souvent été employée et a permis l'obtention de surfaces bio-fonctionnalisées (Wu, 2010, Amorosi, 2012).

II.3. Dépôt chimique assisté par plasma

Cette partie s'intéresse à une technologie de polymérisation utilisée pendant les travaux de thèse : le procédé de dépôt de couche mince polymérisé par plasma. Afin de mieux comprendre le choix de la méthodologie employée, un rappel sur le principe du plasma et des dépôts de polymère sera effectué dans cette partie. Elle mettra en évidence les avantages de ce procédé aussi bien en termes de facilité de mise en œuvre que d'applications multiples en passant par la combinaison de la méthode de dépôt avec des éléments biologiques, pour se concentrer dans la dernière partie sur le ppTMDSO, l'un des éléments centraux de cette thèse.

II.3.1. Généralités

Le plasma, aussi considéré comme le 4^{ème} état de la matière, est constitué d'un gaz partiellement ionisé composé de diverses espèces réactives notamment d'ions, atomes, électrons et molécules excitées. Ce milieu chargé en atomes/molécules/ions excités est à l'origine d'émissions lumineuses résultant de leur relaxation radiative.

Ces plasmas sont générés lors du passage d'un gaz dans un champ électrique qui provoque des collisions entre particules (notamment les espèces neutres lourdes et les électrons) provoquant ainsi un changement de composition initiale du gaz (Langmuir, 1928).

Du point de vue thermodynamique, dans un système en équilibre thermique, la vitesse des trois espèces de particules (électrons, ions et particules neutres) est décrite par la distribution de Maxwell, permettant d'exprimer leur énergie cinétique moyenne selon l'expression suivante

$$E = \frac{1}{2}m\nu^2 = \frac{3}{2}kT$$

avec m la masse d'une particule, v^2 la vitesse quadratique moyenne de la particule, k la constante de Boltzmann et T la température du gaz. La valeur de température T du gaz permet de qualifier deux types de plasmas : les plasmas thermiques et les plasmas froids.

Les plasmas thermiques, le plus souvent de type arc électrique, générés à pression atmosphérique (haute pression), entrainent une densité importante de particules $(10^{14}-10^{19} \text{ particules/cm}^3)$, et un grand nombre de collisions entre les particules ce qui provoque une élévation des températures des molécules (électrons, ions, neutres) pouvant être de l'ordre de 15000 à 25000K d'où l'appellation thermique.

Les plasmas dits « froids » sont produits, quant à eux, sous pression réduite de gaz, mais aussi à la pression atmosphérique hors régime d'arc, n'entrainant pas d'élévation excessive de la température du gaz. Les particules en présence sont hors équilibre thermodynamique (echelle des énergies : $E_{\text{électrons}} >> E_{\text{ions}} \sim E_{\text{neutres}}$) et donc avec une densité de particules plus faible que dans les plasmas thermiques (10⁹-10¹² particules/cm³). Le gaz plasmagène et les ions restent ainsi à température relativement faible (300-600K).

Les décharges plasma sont générées via le passage du gaz dans un champ électrique intense induit par un générateur de puissance. Ces décharges sont souvent de type basses fréquences (BF 25-450kHz), radiofréquences (RF 1MHz-0,5GHz) ou micro-ondes (2,45GHz) (Koch, 1992). Le type de fréquence appliquée va définir le plasma par son influence sur les particules le composant (oscillations autour de sa position d'équilibre) et donc avoir un effet sur les conditions de transfert d'énergie entre les électrons et les espèces lourdes, et le bombardement du substrat de dépôt.

II.3.2. Applications des plasmas

II.3.2.1. Traitement de surface : gravure

L'une des applications importantes des plasmas réside dans la modification physique des substrats de dépôt par action du bombardement des espèces réactives sur ce dernier. Cette action est plus connue sous le nom de gravure. La fonction et le type de gravure seront dépendants de l'énergie appliquée au plasma mais également à la nature du plasma utilisé via l'action des ions mis en jeu. On peut distinguer plusieurs types de gravures (Tabeling, 2003).

- Gravure physique : met en œuvre l'impact direct des espèces sur le substrat de dépôt (approche balistique)
- Gravure chimique : met en jeu la diffusion et la réaction des espèces sur le substrat
- Gravure physico-chimique : couplage des deux types de gravures précédentes

II.3.2.2. Modifications de surface

L'utilisation de différents gaz pour la génération du plasma peut permettre la modification des propriétés d'hydrophilie ou d'hydrophobie d'une surface traitée grâce à l'apport des espèces réactives spécifiques.

Ainsi pour apporter ou améliorer le caractère hydrophile d'une surface, la mise en jeu de plasma oxygénés ou chlorés sera choisie. Pour un caractère hydrophobe, des modifications par plasma fluoré seront préférées. Ces modifications de surface ne font intervenir que les espèces réactives du plasma mais peuvent être obtenues également par dépôt chimique de composés couplé au traitement plasma. C'est le cas des dépôts chimiques en phase vapeur pour le dépôt de couches minces, procédé qui nous intéresse dans le cadre de cette thèse.

II.3.2.3. Dépôt chimique en phase vapeur

Parmi l'éventail d'utilisations que propose le traitement plasma (Pankaja, 2014, Chua, 2002), on retrouve les méthodologies de dépôt de matériau (CVD *Chemical Vapor Deposition*) sur un substrat, sous forme de couches. Les molécules du matériau, aussi appelé précurseur, sont entrainées jusqu'à la surface du substrat où les espèces s'adsorbent et réagissent afin de former une couche solide du matériau déposé. Les étapes de dépôt du matériau sont décrites dans le schéma suivant.



Figure 1. Principe de dépôt d'un matériau déposé par procédé CVD sur un substrat

Il existe une grande variété de techniques issues du procédé CVD, chacune dépendante des conditions de dépôt des matériaux, telles que les LPCVD (*Low Pressure CVD*), APCVD (*Atmospheric Pressure CVD*), ALCVD (*Atomic Layer CVD*).

Dans notre cas d'étude, nous utilisons la technique de RPECVD (*Remote Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition*), autrement dit, un dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma. Les vapeurs du précurseur vont être entraînées dans l'écoulement du plasma et réagir au niveau de la surface du substrat comme décrit dans la Figure 1. Ce mode de dépôt permet d'obtenir des couches reproductibles de matériau déposé par plasma.

Les conditions de dépôt en CVD sont fortement dépendantes des paramètres expérimentaux choisis, qui vont influencer le comportement de dépôt des espèces réactives ou leur mobilité à la surface du substrat. Parmi les paramètres les plus influents, on retrouve la pression de marche qui va avoir une influence sur les réactions en phase gazeuse (plasma et précurseur), la puissance utilisée qui jouera un rôle sur la dissociation des espèces et donc leur quantité produite, la géométrie du réacteur en ce qui concerne les paramètres de transport des espèces, et enfin la température du substrat qui aura une influence sur la mobilité des espèces à la surface du substrat (Robertson, 2002) et donc leur quantité finale restante sur le substrat.

II.3.3. Dépôt de couche mince polymérisée par plasma

II.3.3.1. Mécanismes réactionnels

Dans le cadre de dépôt de couche mince d'un précurseur polymérisé via un procédé PECVD, la formation de la couche mince à la surface du substrat s'effectue en deux étapes.

A partir d'un précurseur organique, polymérisable ou non, les molécules de monomère sont envoyées au sein du plasma afin d'y subir une activation et une fragmentation entrainant la formation de radicaux libres issus du monomère. Puis, la recombinaison des espèces activées s'effectue à la surface du substrat comme décrit en II.3.2.3. (Figure 1).

Le schéma suivant décrit le mécanisme de dépôt de monomère polymérisé par plasma (Abou Rich, 2008) (Figure 2).



Figure 2. Mécanismes de polymérisation par plasma

Cette technique permet ainsi d'obtenir toutes sortes de couches polymérisées, simplement et rapidement et à des températures relativement basses (plasmas froids). Les couches obtenues s'organisent de manière désordonnées à cause du comportement aléatoire des espèces réactives déposées à la surface du substrat. La composition hétérogène en espèces activées du film peut conduire à des réactions parasites au contact de l'atmosphère, entrainant un vieillissement du polymère (Goullet, 2000).

Le mode dépôt par PECVD peut se réaliser selon deux modes d'injection du précurseur. Soit l'injection du précurseur se fait directement dans la décharge plasma, on parle de PECVD directe, soit elle se fait hors de la décharge ou post-décharge, et l'on parle alors ici de RPECVD (Galerie, 2002).

Dans le cas de la PECVD, les réactions peuvent se réaliser dans différents types de réacteurs :

- *Capacitif* : le plasma est généré entre deux électrodes, la cathode où sera appliquée la puissance et l'anode, servant de masse mais également de porte-substrat
- *Haute densité/basse pression RF inductif* : permettant d'obtenir des plasmas de forte densité électronique à très basse pression à partir d'un champ inductif et non capacitif
- *Haute densité/basse pression Micro-onde* : dans ce cas la décharge est entretenue par un champ micro-onde et non radiofréquence

Concernant la RPECVD, le substrat est en dehors du champ de création du plasma, dans la zone de postdécharge. L'avantage de cette technique réside dans des conditions de dépôt plus douces sur le substrat en évitant les températures élevées, les bombardements ioniques ou encore les effets des radiations énergétiques UV (Lucovshy, 1991, Kulisch, 1993, Korsec, 1995), causés par la décharge directe. La

post-décharge lointaine (PDL) reste néanmoins un milieu riche en molécules excitées (radicaux libres...).

Ainsi, les espèces réactives sont formées au niveau de la décharge, puis sont transportées par le flux jusqu'à l'enceinte du réacteur et réagissent avec les molécules de monomère, généralement associées avec un gaz de transport, puis se déposent à la surface du substrat, permettant de meilleures conditions de dépôt hors décharge (Korsec, 1995, Lucovsky & Tsu, 1987). Les espèces déposées peuvent réagir entre elles, ou avec celles arrivant en phase gazeuse, pour former le film final.

II.3.3.2. Fonctionnalisation des surfaces

La fonctionnalisation des surfaces fait intervenir des gaz spécifiques qui vont permettre le greffage de fonctions à la surface du support. Cette méthode permet de conférer à la surface des propriétés fonctionnelles, telles que des points de greffage pour des groupements chimiques ou des molécules. Dans le cadre de l'obtention de surfaces bioactives par l'intermédiaire d'un film fonctionnel déposé par plasma, l'utilisation de polymère est très souvent choisie (Muguruma, 2010). Ces films doivent offrir des propriétés en termes de stabilité mécanique, thermique ou encore de résistance vis-à-vis de solvant organique (Siow, 2006).

Dans le cadre de la thèse, l'intérêt s'est porté sur la fonctionnalisation des surfaces pour l'immobilisation d'enzyme. Pour le greffage d'enzyme, la mise à disposition de site d'accroche de type amine, hydroxyle, carboxyle ou encore aldéhyde est nécessaire (Puelo, 2002). L'ajout d'un intermédiaire (type *spacer*) est souvent employé pour éviter les problèmes de dénaturation ou de gêne stérique (Mason, 2000).

Amination des surfaces

Le plus souvent obtenue par un traitement plasma d'ammoniac, d'azote ou d'azote/hydrogène (N_2/H_2) (Meyer-Plath, 2003), cette technique permet d'apporter une quantité importante de fonctions aminées à la surface ou encore d'augmenter des ratios atomiques N/C et O/C lors de l'ajout d'argon au plasma (Bryjak, 2002).

La principale fonctionnalisation par des groupements aminés intervient dans le dépôt de films de polymère aminé, tels que le butylamine (Gancarz, 2002), l'éthylène diamine (Gengenbach, 1996) ou encore l'allylamine (Abbas, 2009d). Plusieurs cas d'immobilisation d'enzyme sur les surfaces aminées ont été rapportés dans la littérature (Muguruma, 2000, Abbas, 2009c, Ghasemi, 2011).

Carboxylation des surfaces

L'utilisation de plasmas de mono ou de dioxyde de carbone est la plus rencontrée. Des dépôts de films polymérisés d'acide acrylique ou d'acide propanoique (Swaraj, 2005, O'Toole, 1996) permettent également d'obtenir ces surfaces fonctionnelles. Les groupements disponibles sont favorables à l'immobilisation de cellules ou encore d'enzymes (Konig, 1999).

Autres fonctionnalisations chimiques

Les fonctions hydroxyles ou aldéhydes sont généralement très peu utilisées car présentent peu d'intérêt pour la fixation de biomolécules. Cependant quelques cas confirment les possibilités d'utilisation de ces fonctions pour l'immobilisation d'enzymes (Gancarz, 2003).

II.3.3.3. Fonctionnalisation enzymatique des films polymérisés par plasma : inclusion

En plus des méthodes conventionnelles d'immobilisation d'enzyme à la surface de films polymérisés par plasma, d'autres méthodologies d'immobilisation d'enzyme par inclusion au sein d'un polymère déposé par plasma ont été retrouvées. Les travaux de Muguruma,ont mis en évidence la possibilité d'immobiliser des enzymes par adsorption sur un film polymérisé par plasma suivi d'un recouvrement par un second film (Muguruma, 2011) (Figure 3).



Figure 3. Elaboration d'un biocapteur ampérométrique à glucose oxydase sur des nanotubes de carbone (Muguruma, 2011)

D'autres méthodologies d'inclusion d'enzyme à l'intérieur même du polymère en croissance ont été décrites par Heyse (2011) pour l'immobilisation de la glucose oxydase et de la lipase au sein d'un polymère d'acétylène (Figure 4).



Figure 4. Immobilisation de la glucose oxydase dans un polymère d'acétylène polymérisé par plasma (Heyse, 2011)

Les procédés de traitement de surface par plasma apportent des aspects innovants dans les domaines d'obtention de surfaces bioactives. Le couplage polymérisation/immobilisation permet un gain de temps et d'étape dans ces procédés de conception. Un troisième aspect peut être apporté par la technologie de la polymérisation par plasma : la microstructuration.

Le procédé de polymérisation par RPECVD a déjà été largement employé pour la réalisation de couches minces de polymères organosilicés issues de différents précurseurs microstructurants, tels que le l'HMDSO (HexaMethylDiSiloxane) (Zenasni, 2003), le TEOS (TetraEthOxySilane) (Frenck, 1991), le HMDSN (HexaMethylDiSilazane) (Frenck, 1991) ou encore le TMDSO (TetraMethylDiSiloxane) (Callebert, 1994).

II.3.4. Cas du TMDSO

Dans le cadre de la thèse, nous nous sommes intéressés à l'obtention d'une couche mince d'un polymère organosilicé, le ppTMDSO, formée au niveau d'une post décharge lointaine d'un plasma d'azote et déposée sur un substrat.

II.3.4.1. Conditions experimentales

Le TMDSO a été choisi comme monomère/précurseur de dépôt. Sa formule semi-développée est représentée ci-dessous :

$$\begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ H - \stackrel{\prime}{Si} \cdot O - \stackrel{\prime}{Si} \cdot H \\ \stackrel{\prime}{CH}_3 \quad CH_3 \end{array}$$

Cette molécule a fait l'objet de nombreuses études concernant son dépôt par plasma (Callebert, 1994) qui ont révélées son potentiel d'utilisation dans de nombreux domaines expérimentaux, tels que la conception de microstructures (Supiot, 2011, Mille, 2008), comme membrane de séparation de gaz (Inagaki, 1994) ou encore le traitement de surface (Tiwari, 2011, Huang, 1996).

Les conditions expérimentales utilisées ont été établies par les travaux de Callebert (1994) lors de la mise en œuvre d'un dépôt de TMDSO en post décharge d'azote. Les auteurs ont étudié notamment l'influence du débit de monomère sur la vitesse de croissance du film pour des paramètres fixes de débit d'azote (1600sccm), de puissance (300W) et de pression de marche 420Pa. Il a été montré que la vitesse de croissance du polymère est influencée par le débit de monomère mais également par le gaz de transport du monomère (Callebert, 1993).



Figure 5. Représentation schématique de la configuration du réacteur utilisé pour les dépôts en RPECVD

Le schéma de la Figure 5 représente la configuration adoptée pour les dépôts en post-décharge. L'ensemble se compose d'un coupleur micro-onde où sera produit le plasma, un tube de décharge pour le transport du flux du plasma jusqu'à la chambre réactionnelle où la post décharge va rencontrer les molécules monomères et provoquer la polymérisation de celui-ci. La pression de marche à l'intérieur du réacteur est régulée par une pompe à vide gérée électroniquement.

L'écoulement d'un plasma d'azote dans le tube de décharge connaît 3 états illustrés dans le schéma suivant (Figure 6) :



Figure 6. Zones caractéristiques de l'écoulement d'un plasma d'azote

Le flux initial d'azote s'écoule dans le tube de décharge jusqu'à la première zone appelée « zone de décharge » soumise au champ électrique dans laquelle le plasma est généré avec les caractéristiques décrites dans la partie II.3.1. (forte densité de particules, température voisin de 1000K...). Ensuite, la « zone d'ionisation secondaire » qui correspond à une ré-ionisation du gaz quittant la décharge. Elle ne diffère pas fondamentalement en composition en espèces excitées de la zone de décharge, mais les concentrations en espèces énergétiques sont au moins dix fois plus faibles. Enfin la « zone de post-décharge lointaine », dans laquelle le milieu n'est constitué que d'espèces neutres (les ions et les électrons se recombinant rapidement hors plasma), donnant une température relativement faible (300K environ).

II.3.2.4.2. Mécanismes de polymérisation du TMDSO

Les travaux de Callebert (Callebert 1993) concernant la polymérisation du TMDSO s'intéressent aux mécanismes de fragmentation/recombinaison du monomère dans la PDL d'azote.

Les différentes analyses effectuées mettent en évidence un schéma possible comprenant 3 étapes importantes pour la constitution de la couche mince polymérisée. Ces étapes sont résumées dans la Figure 7.



Figure 7. Mécanismes de polymérisation du TMDSO dans la PDL d'azote

L'étape d'initiation met en jeu la molécule de TMDSO entrant en collision avec un ou deux atomes d'azote provocant une fragmentation de celle-ci, résultant au final de cette étape à la création de 3 molécules radicalaires filles. Le radical $(CH_3)_2Si=O$ est un acteur important dans le processus de polymérisation (Tobita & Tajima, 1990).

Durant l'étape de propagation, la fragmentation se poursuit. Les atomes d'azote réagissent cette fois avec les fonctions méthyles des molécules obtenues après l'étape d'initiation. Cette étape donne naissance à de nouvelles fonctions radicalaires Si, Si-O-Si et Si-O, ainsi que des radicaux méthyles. Dans le cas où le TMDSO est mélangé avec l'oxygène, en tant que gaz de transport, une recombinaison intermédiaire peut se produire entre les radicaux Si-O⁻ pour former des groupements Si-O-Si-O⁻. Ces chaînes étant plus longues, elles permettent d'observer une vitesse de croissance plus importante qu'en absence d'oxygène.

Enfin dans l'étape de terminaison, les fragments produits dans l'étape précédente se recombinent afin de former le film de polymère réticulé.

La recombinaison en polymère se fait par les liaisons entre les Si et un site radicalaire d'oxygène libre, formant ainsi des chaines de type Si-O[°].

Les Si radicalaires peuvent également créer des liaisons avec les fonctions méthyles ou amines (de l'azote). Des recombinaisons peuvent également se produire entre les fonctions méthyles et azote pour former des radicaux de type 'CN. En présence d'oxygène de transport, des recombinaisons de type Si-OH peuvent se produire.

Les analyses spectroscopiques et notamment par Infrarouge à Transformée de Fourier (Figure 8-9) des films obtenus permettent d'apprécier la présence des différentes espèces composant le film de ppTMDSO.



Figure 8. Spectres infrarouges superposés du monomère de TMDSO liquide (trait plein) et du TMDSO polymérisé par plasma (pointillé) déposé (Abou-Rich, 2010)

Peak position	Assignments ^{a)}
cm ⁻¹	
3 600–3 400	v(O-H), free Si-OH, H-
	bonded OH
3 3 4 3	ν (N–H)
2 969	v_a (C–H), Si–CH ₃
2 907	ν_s (C–H), CH ₃
2 1 3 5	v(Si-H)
2 100-2 300	v(Si–H), H–SiO ₃ , H–SiO ₂ Si
	or H-SiOSi
1725	v(C=O)
1665	C=C
1 4 4 3	$\delta_a(CH_2)$, Si-CH ₂ -CH ₂ -Si
1 412	$\delta_a(CH_3)$, Si-CH ₃
1352	$\delta_a(CH_2)$, Si $-CH_2-Si$
1260	$\delta_s(CH_3)$, Si $-CH_3$
1160	δ(N–H), Si–NH–Si
1 100-1 000	$\nu_{a}(Si-O-Si)$, $\nu_{a}(Si-O-C)$
1030	$\omega(CH_2)$, Si-(CH ₂)n-Si, n=1,2
917-940	va(Si–N–Si), Si–NH–Si
885-750	$\rho(CH_3)$ and $\nu(Si-C)$, $Si-(CH_3)n$,
	n=1,2,3
900	$\rho(CH_3)$ and $\nu(Si-C)$, $Si-(CH_3)_2$
850	$\rho(CH_3)$ and $\nu(Si-C)$, $Si-(CH_3)_3$
800	$\rho(CH_3)$ and $\nu(Si-C)$, $Si-(CH_3)_2$
760	$\rho(CH_3)$ and $\nu(Si-C)$, $Si-(CH_3)_3$
700	ν(Si-C)
600-620	$\nu_{s}(Si-C)$
560	vs(Si-O-Si)
440	ρ(Si–O–Si)

a)ν: stretching, δ: bending, ρ: rocking, ω: wagging, subscript a: asymmetric, subscript s: symmetric mode.

II.3.2.4.3. Conception de microstructure en ppTMDSO

Dans le cadre de la thèse, le choix du ppTMDSO ne s'est pas fait aléatoirement. Ce matériau, en plus de présenter des caractères de polymérisation connus et définis, présente des propriétés en termes de structuration intéressante et démontrée.

Les travaux de Mille (Mille, 2008) révèlent le potentiel de conception de microstructures à partir du ppTMDSO pour la conception de BioMEMS.

Figure 9. Positionnement des bandes spectrales infrarouge pour le ppTMDSO (Abou-Rich, 2010)

Ensuite, les travaux d'Abbas (Abbas, 2009b) démontrent la faisabilité de conception de microcanaux en ppTMDSO grâce à un dépôt de polymère sur une résine, puis par libération de la résine sacrificielle permet l'obtention de cavités à l'intérieur du polymère, donnant la microstructure finale (Figure 10).



Figure 10. Conception de microstructure dans le ppTMDSO par utilisation d'une résine sacrificielle (*Abbas*, 2009b)

Les travaux de Supiot (2011) ont également démontré la possibilité de conception de microstructures à partir d'un dépôt de ppTMDSO.

L'étape d'intégration d'élément biologique au processus de conception de ces microstructures est un enjeu clef de cette thèse. Le but est de prouver la compatibilité entre l'immobilisation d'enzyme par le ppTMDSO, la conception de microstructure intégrant l'enzyme et l'étude du signal résultant de l'activité de l'enzyme immobilisée. Toutes ces étapes devant mener à une nouvelle approche de conception d'un BioMEMS assistée par plasma froid.

Chapitre 1. Immobilisation de la β-galactosidase par plasma froid : étude de faisabilité

L'approche de conception originale d'un BioMEMS par la technologie des plasmas froids, développée ici, pose la question de l'intégration de l'élément biologique au sein de cette conception. En effet, l'idée du « tout intégré » séduit par les nombreux avantages qu'elle apporte notamment dans les aspects de rapidité et de facilité d'obtention de dispositifs. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la mise en place d'un protocole permettant d'immobiliser la β -galactosidase par inclusion au sein du ppTMDSO. Deux approches ont été étudiées, l'une consistant en une immobilisation de la β galactosidase par adsorption sur un support suivi d'un recouvrement par un film de ppTMDSO et l'autre consistant en la solubilisation de la β -galactosidase dans le précurseur liquide afin d'inclure celle-ci dans le ppTMDSO au cours du processus de polymérisation.

1.1. Méthodologie d'immobilisation

La technologie des plasmas froids a déjà montré la possibilité de réaliser des dépôts de couches minces grâce à une grande variété de monomères utilisés (Fanelli, 2012, Zenasni, 2003) mais aussi par la possibilité de fonctionnalisation de ces films par des espèces réactives ou encore des enzymes (Muguruma, 2011, Abbas, 2009c, Ghasemi, 2011).

Dans la perspective de conception d'un microdispositif (type BioMEMS) par plasma froid, le recours à un matériau polymérisé par plasma doit présenter un aspect applicatif pour la création de microstructures ou une utilisation dans les conditions micro voir nanométriques. C'est ainsi que l'orientation vers l'utilisation d'un polymère de ppTMDSO (plasma polymerized 1,1,3,3, tetramethyldisiloxane) s'est avérée une alternative tout à fait justifiable par sa maîtrise aussi bien en terme de polymérisation par plasma en conditions connues (Callebert, 1994, Essakhi, 2011) que par sa possible application en conception de microstructures (Abbas, 2009b).

Dans les étapes de conception assistée par plasma froid, une étude de biocompatibilité entre un élément biologique et le polymère synthétisé par plasma s'avère nécessaire. Pour cela, il a fallu déterminer la faisabilité et les limites de cette combinaison entre le polymère et cet élément biologique mais également l'impact de celle-ci sur les deux éléments en présence (stabilité polymère, activité enzymatique résiduelle).

Pour l'élément biologique, le choix s'est porté sur l'utilisation de la β -galactosidase grâce à la facilité de mise en œuvre de réaction catalytique simple par l'hydrolyse de l'ONPG (Sun, 2010, Pan, 2009). Ceci nous a permis d'évaluer l'influence du dépôt plasma sur la β -galactosidase par mesure de son

activité enzymatique par rapport à des conditions optimales d'utilisation (enzyme en solution) (Carrara, 1996).

Les critères d'évaluation de l'efficacité de la méthode de conception se sont basés sur la simplicité de la mise en œuvre de l'immobilisation d'une part et la stabilité de l'activité enzymatique d'autre part.

Deux méthodologies d'immobilisation par inclusion furent envisagées (i) la méthode dite « indirecte » consistant en un dépôt de l'enzyme sur un support puis son immobilisation, par recouvrement, grâce au dépôt d'une couche de ppTMDSO et (ii) la méthode dite « directe » qui a consisté à inclure l'enzyme durant la phase de polymérisation du ppTMDSO.

1.2. Etude de la méthode « indirecte » par adsorption-recouvrement

1.2.1. Stratégie

Cette méthode a été envisagée car elle nécessite très peu d'étapes et limite également l'emploi de produits chimiques, s'inscrivant ainsi dans une perspective de mise au point d'un procédé de conception propre et économique.

Pour cela, un dépôt de β -galactosidase, préalablement mise en solution dans un solvant, est réalisé sur un support (de type verre, silicium ou aluminium) puis un recouvrement par une couche de ppTMDSO, produit au sein d'une enceinte réactionnelle sous vide contrôlé, est effectué (Figure 1)

Plusieurs paramètres entrent en jeu dans l'optimisation des conditions de polymérisation et de dépôt du précurseur dans l'enceinte du réacteur (II.3.). La plupart de ces paramètres furent choisis dans la continuité de l'optimisation des conditions réactionnelles déjà réalisée dans les précédents travaux effectués au sein du laboratoire (Abou-Rich, 2010). Le débit de précurseur, ainsi que la durée du traitement conditionnent directement l'épaisseur du film déposée sur l'enzyme et par conséquent la capacité de rétention de l'enzyme par le film et le degré d'efficacité d'immobilisation du procédé.

Une étude a également dû être réalisée sur la préparation des substrats de dépôt (silicium, verre), ainsi que sur la formulation de la β -galactosidase, pour leur utilisation dans le cadre d'une immobilisation par un polymère hydrophobe. Les conditions doivent tenir compte des contraintes liées au dépôt (dépôt des espèces, adhésion du film) et de la bonne tenue du film, qui nécessite un substrat de dépôt propre et présentant le minimum d'humidité de surface.

Pour terminer, afin de valider la viabilité du procédé, la caractérisation physique du polymère et l'évaluation des performances catalytiques de l'enzyme immobilisée ont été réalisées.

Ainsi, la logique suivie pour évaluer la faisabilité de notre méthodologie d'immobilisation fut, dans l'ordre:

- Contrôler le dépôt et l'épaisseur de ppTMDSO déposé sur le substrat
- Maîtriser la formulation de la β-galactosidase pour obtenir des conditions de tenue du film optimales
- Evaluer la stabilité du film en présence de l'enzyme
- Evaluer la quantité de β-galactosidase immobilisée sur le substrat de dépôt

1.2.2. Mise en place de la méthodologie « indirecte »

1.2.2.1. Conditions experimentales

Etape 1 : dépôt de la β -galactosidase sur le substrat

Dans cette étape, le substrat de dépôt va subir un nettoyage afin de limiter les éléments parasites pouvant interférer avec l'enzyme, le plasma ou encore le dépôt de ppTMDSO, et permettre une bonne accroche du film. Pour cela, un carré (1x1cm) de silicium (Siltronix) subit un lavage dans de l'acétone dans un bain à sonication pendant 5 minutes, puis un second lavage dans l'éthanol, toujours sous sonication, pendant 5 minutes. Ensuite, l'échantillon est séché sous un flux d'azote (Alphagaz) puis déshydraté à 200°C, pendant 10 minutes sur une plaque chauffante. Enfin, il est conservé avant utilisation et dépôt de la β -galactosidase.

La β -galactosidase (E.C. 3.2.1.23., M.W. 105kDa) (Sigma-Aldrich Chemical Co.) utilisée provient de la souche *Aspergillus oryzae*, est solubilisée dans une solution de tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5, à une concentration de 3mg.ml⁻¹. Un volume de 20µl est reparti sur le substrat de silicium à l'aide d'une micropipette (Figure 1).



Figure 1. Dépôt de la β -galactosidase dans le tampon acétate de sodium sur un échantillon de silicium

Etape 2 : recouvrement par le TMDSO polymérisé par plasma

Pour l'immobilisation par adsorption recouvrement, nous avons effectué un dépôt de ppTMDSO audessus du film d'enzyme suivant les étapes décrites dans la figure 2 :



Figure 2. Principales étapes d'immobilisation de la β-galactosidase déposée sur silicium à la micropipette (a), puis mise dans l'enceinte réactionnelle (b) pour être recouverte par un film de ppTMDSO (c)

Les mécanismes de polymérisation du TMDSO (M.W. 124.33 g.mol⁻¹) (Sigma Aldrich Chemical Co.) par une post décharge lointaine d'un plasma d'azote (Alphagaz) ont été décrits par Callebert (Callebert,1994), notamment la fragmentation des groupements du TMDSO par les espèces excitées du plasma puis leur recombinaison sous différentes formes afin de former un polymère plasma donnant un revêtement sur un substrat de dépôt (cf chapitre II.3).

Dans cette phase de faisabilité, le réacteur utilisé pour le dépôt est décrite dans le schéma suivant :



Figure 3. Schéma du réacteur plasma froid pour le dépôt de ppTMDSO en post décharge lointaine

Le réacteur se compose d'un coupleur-plasma excité par un générateur microonde 2450 MHz (RF), sous une puissance de 200W, dans lequel les molécules d'azote, introduites avec un débit de 1,8 slpm, sont transformées en espèces excitées puis transportées via le tube de décharge jusqu'à l'intérieur du réacteur (post-décharge lointaine) où elles rencontrent le mélange TMDSO-gaz porteur. Leur réorganisation sur la surface permet de former un polymère de ppTMDSO.

Après dépôt de la β -galactosidase sur le substrat, celui-ci est mis en place au sein de l'enceinte réactionnelle sous une pression d'environ 2.10⁻³mbar, ce qui permet d'éliminer l'air apporté lors du chargement de l'échantillon mais également de préparer l'enceinte du réacteur à la mise en pression de fonctionnement lors du dépôt.

L'azote est injecté dans le réacteur puis, à l'aide d'une décharge RF (2450 MHz), le plasma est amorcé. Dès lors, une pression de marche de 5mBar est appliquée et régulée, par une jauge capacitive Pfeiffer, durant toute la procédure de traitement plasma pour obtenir un procédé stable en pression. Un prétraitement du réacteur et de l'échantillon est effectué durant 5 minutes sous flux de PDL d'azote. Ensuite, le précurseur, accompagné d'oxygène (Alphagaz) comme gaz de transport à 25sccm, est introduit via un injecteur au centre de la PDL entrant en contact avec le gaz activé et permettant la transformation du TMDSO.

La réaction entre le TMDSO et la post-décharge entraîne l'apparition d'un cône de polymérisation (Figure 4) recouvrant totalement le porte-échantillon et le substrat contenant l'enzyme.



Figure 4. Cliché typique du cône de polymérisation apparu en chambre réactionnelle après envoi du monomère dans la PDL d'un plasma excité à 2450 MHz

Le TMDSO est introduit à un débit de 20sccm régulé par un débitmètre massique MKS, offrant une croissance du film stable d'environ 750nm/min. Un contrôle de l'épaisseur déposée en fonction du temps de dépôt est effectué afin de mesurer la vitesse de croissance du film à la surface du substrat de dépôt (figure 5). Pour les échantillons, un temps de dépôt d'une minute et demi a été choisi afin d'obtenir une épaisseur moyenne de 1µm de ppTMDSO.



Figure 5. Variation de l'épaisseur du dépôt de ppTMDSO à un débit de 20sccm en fonction du temps <u>de traitement</u>

La figure 5 permet de rendre compte d'une vitesse de croissance du film d'environ 700nm sur la première minute de dépôt. Ensuite, la vitesse de croissance semble diminuer pour des durées du traitement plus longues (environ 550nm/min pour un traitement de 5 minutes). Cette diminution de la vitesse de croissance peut être due à l'établissement d'un régime stationnaire du système réactif ou/et à une augmentation de la température du substrat avec la durée du traitement conduisant à une mobilité accrue des espèces (II.3.).

Après dépôt de polymère, l'apport en précurseur et en oxygène est stoppé, ainsi que le gaz plasmagène pour éviter des phénomènes de post-traitement pouvant modifier la couche de ppTMDSO nouvellement déposée (Ghali, 2014). Le réacteur est ensuite remis à faible pression pour éliminer les éventuelles vapeurs de précurseur encore présentes dans l'enceinte puis amené lentement à pression atmosphérique pour récupérer l'échantillon. Ce dernier sera placé dans un récipient hermétique afin d'éviter des dépôts d'impuretés (poussières).

Après dépôt de ppTMDSO, nous obtenons un recouvrement homogène du film d'enzyme comme observé dans la figure 6.


Figure 6. Echantillon obtenu après recouvrement des enzymes par le ppTMDSO

Etape 3 : lavage des echantillons

Après dépôt du ppTMDSO, nous effectuons un lavage des échantillons obtenus afin d'éliminer d'éventuelles molécules d'enzyme non immobilisées. Pour cela, nous incubons les échantillons dans une solution d'acétate de sodium 0,02M pH4,5 pendant 10minutes, sur un plateau oscillant.

Les échantillons obtenus sont présentés dans la figure 7 :



Figure 7. Echantillon de silicium avec la β-galactosidase immobilisée après lavage

Nous avons constaté un décollement du ppTMDSO à l'endroit exact où l'enzyme a été déposée. Cela tend à prouver une incompatibilité polymère-enzyme avec le décollement du film des substrats de dépôt présentant des traces d'humidité en surface.

En effet, les interactions entre les radicaux $Si-O_x$ provenant de la fragmentation du TMDSO dans la post-décharge du plasma, et les fonctions Si du substrat de silicium sont gênés par la présence d'eau en surface créant une affinité moindre (Mille, 2008). De plus, le caractère hydrophobe du TMDSO sera incompatible avec la couche d'enzyme plutôt hydrophile.

Ainsi, un changement a dû être employé afin de permettre le dépôt de l'enzyme tout en évitant le décollement du polymère durant les expériences de détermination de l'activité enzymatique.

Un autre solvant a dû être choisi selon les critères suivants :

- Non dénaturant pour l'enzyme
- Compatible avec le ppTMDSO : choix d'un solvant ayant des éléments retrouvés dans la composition du ppTMDSO (-OH, -CH₃)
- Anhydre

Après avoir éliminé plusieurs solvants possibles du fait de leur toxicité (méthanol, benzène...), le choix s'est arrêté sur l'éthanol absolu (Sigma Aldrich Chemical Co.) car, en plus de ne pas être toxique, celuici peut facilement être retiré du substrat par évaporation, sans laisser de traces. Ainsi, après retrait de l'éthanol, seule la β -galactosidase devait rester adsorbée sur le support.

Un dépôt de 20μ L d'une solution d'éthanol absolu contenant la β -galactosidase à une concentration de 3mg/mL est effectué à la micropipette permettant obtenir une quantité d'enzyme déposée égale à 60μ g. Après évaporation de l'éthanol, cette quantité a été validée par pesée sur une microbalance (Sartorius ISO 9001) du substrat contenant la β -galactosidase séchée. Une valeur de $60\pm0.5\mu$ g de β -galactosidase a été confirmée. Pour des raisons pratiques, le silicium et le verre ont été choisis afin de pouvoir s'adapter aux appareils de mesures et aux dispositifs expérimentaux.

Les analyses MEB (Microscopie Electronique à Balayage, Zeiss Gemini Ultra 55 FEG) permettent d'apprécier la répartition de l'enzyme après séchage de l'éthanol (Figure 8). Une répartition de l'enzyme sur toute la surface du substrat de dépôt est ainsi observée. L'éthanol permet un étalement des 20µL déposés sur toute la surface du substrat. Cependant, il a été constaté lors de l'évaporation de l'éthanol, un effet d'entraînement centripète du spot d'éthanol pouvant provoquer une concentration des espèces durant le séchage.

Cependant, il a été constaté lors de l'évaporation de l'éthanol, un effet d'entrainement centripète du spot d'éthanol pouvant provoquer une concentration des espèces durant le séchage.



Figure 8. Cliché MEB de la répartition de la β -galactosidase sur un substrat de silicium

Les analyses au MEB ont révélé également la présence de structures plus importantes d'enzyme. La molécule de β -galactosidase possédant un diamètre d'environ 16nm (Miller 1924, Schilling, 2002), ces structures correspondent à des agrégats plus ou moins importants d'enzyme. Ces agrégats, formés lors de la mise en solution de la β -galactosidase dans l'éthanol et de l'évaporation (Wang, 2012), sont de tailles variables allant de quelques microns à plus d'une cinquantaine de microns traduisant l'agrégation possible de plusieurs milliers de molécules d'enzyme entre elles. Cet effet d'agrégation est un phénomène bien connu car l'éthanol est très souvent utilisé dans le cadre de techniques de précipitation de protéines décrits par Englard et Seifter (1990) pour la formation de structures importantes aisément séparables par purification (Marino, 2015, Bianca, 2014).

1.2.2.2. Caractérisation de l'immobilisation par la méthode indirecte

Après recouvrement par le ppTMDSO, des analyses de l'état de surface par MEB (Figure 9) et de topologie de surface par mesure AFM (*Atomic Force Microscopy*, mulitmode/Nanoscope IIIA Digital Instrument) (Figure 10) révèlent plusieurs phénomènes apparaissant notamment au niveau de l'organisation du ppTMDSO et de la β -galactosidase à la surface du substrat de dépôt.



Figure 9. Clichés MEB de l'état de surface de la β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO

Concernant les images obtenues par analyse MEB, nous constatons une répartition homogène du polymère autour de l'enzyme à la surface du silicium. Le polymère semble avoir totalement recouvert la β -galactosidase de manière uniforme, en ne laissant qu'en apparence une surface plane de l'échantillon. Cependant, certaines parties présentent des agrégats de taille importante (environ 100µm), montrant plutôt un phénomène d'enrobage des agrégats par le polymère. De plus, on constate que cet enrobage est uniforme sur tout l'agrégat même au niveau des zones que l'on pourrait considérer comme « zones d'ombrage » où l'on attendait une absence de dépôt.

La réorganisation des espèces et leur mobilité au niveau de la surface (II.3.) peuvent expliquer ce phénomène d'enrobage autour des enzymes. Par conséquent, cette analyse nous permet de penser que le polymère semble se réorganiser lorsqu'il est au contact de la β -galactosidase qui apparaît alors totalement enveloppée par une couche de ppTMDSO.



Figure 10. Clichés AFM du ppTMDSO seul (gauche) et du ppTMDSO+β-galactosidase (droite)

Les analyses AFM (Figure 10) confirment la tendance d'une organisation différente du polymère de ppTMDSO en comparant les images d'un dépôt sur un silicium vierge (gauche) et sur un silicium contenant la β-galactosidase (droite) obtenues par le logiciel WSxM. En effet, sur silicium vierge, le polymère semble se déposer et s'organiser de manière anisotrope mettant en évidence l'apparition de reliefs importants en surface d'une vingtaine de nanomètres d'écart Pic-Vallée et une rugosité de surface de 2,88 nm. Par comparaison, lorsque le polymère est déposé sur un silicium contenant la β-galactosidase, nous observons une légère diminution de la rugosité apparente de surface et de la valeur RMS (Pic-Vallée= 14,50nm/ RMS : 1,13 nm), suggérant une possible influence de l'état de surface sur le comportement de dépôt du ppTMDSO, probablement dû à un effet de l'éthanol accompagnant l'enzyme. L'état de surface, comme cité en II.3., a une grande influence sur la mobilité des espèces en surface du substrat et donc un impact sur la formation du film. La présence d'éthanol, apporté lors du dépôt de l'enzyme, a modifié l'état de surface du silicium (même après évaporation) ce qui peut expliquer la variation de rugosité observée. Un effet possible est le rejet de substance adsorbée par entrainement durant l'évaporation de l'éthanol.

Une analyse Infrarouge en FTIR (*Fourier Transformed Infrared spectroscopy*) grâce à un spectromètre (Perkin-Elmer Spectrum One spectrometer) en réflexion spéculaire à 45° (dépôt sur Al poli) ou en transmission (dépôt sur Si), sur une échelle spectrale de 4000-400cm⁻¹, a été réalisée dans le but de vérifier un éventuel changement au niveau du ppTMDSO lors de l'immobilisation des enzymes. Le spectre infrarouge de la β -gal n'est pas présenté car seules deux bandes à 3000cm⁻¹ et à 3500cm⁻¹ nous intéressent, correspondant respectivement aux vibrations des liaisons OH et NH caractéristiques de la présence de l'enzyme (Husaina, 2011). Celui du précurseur est visible sur la figure 6. (§II.3.2.4.2.). Les

spectres ont été réalisés sur des échantillons ayant a) 1μm de ppTMDSO déposé seul sur le silicium et b) 1μm de ppTMDSO recouvrant la β-gal déposée sur silicium (Figure 11).



figure 11. Spectre infrarouge réalisé sur le ppTMDSO seul (haut) et recouvrant la β-galactosidas déposée sur silicium (bas)

Les deux spectres révèlent la présence de bandes caractéristiques du ppTMDSO avec la présence des groupements Si-O-Si (1110-1000cm⁻¹). Ces groupements correspondent aux fonctions initialement présentes dans la structure du précurseur décomposé, telles que les groupements CH₃ (1400-1300 cm⁻¹), Si-C (880-600 cm⁻¹), ainsi qu'aux groupements caractéristiques d'une recombinaison avec les espèces excitées du gaz plasmagène correspondant aux éléments Si-N (1150-930cm⁻¹), C=N (2250 cm⁻¹) ou encore NH (3600-3400cm⁻¹) (détaillé dans la partie II.3.). De plus, concernant l'échantillon contenant l'enzyme, nous n'observons aucune différence significative avec le spectre de l'échantillon sans enzyme

particulièrement au niveau des bandes correspondant aux fonctions azotées et acide (domaines 3600-3400, ¹644 et 1552 cm⁻¹) caractéristiques de notre enzyme (Wu, 2013). Ceci peut-être lié à la présence d'interférences dans ce dernier domaine qui gêne le travail d'identification.



Figure 12. Comparaison des angles de contact ppTMDSO/tampon acétate de sodium (gauche) et $ppTMDSO + \beta$ -gal/tampon (droite)

Une analyse de l'angle de contact, mesuré au goniomètre (GBX Digidrop), a permis de comparer de l'hydrophobie de surface du ppTMDSO seul et du ppTMDSO contenant la β -galactosidase recouverte par le polymère (Figures 12). En ce qui concerne l'échantillon sans enzyme, le polymère possède une hydrophobie peu marqué avec un angle de contact d'environ 83°. Le caractère hydrophobe/hydrophile peu marqué provient des groupements carbonés, tels que les groupements CH₃ compensées partiellement par des groupements pouvant présenter un caractère polaire Si-O, Si-H. En ce qui concerne l'échantillon contenant l'enzyme, on ne constate pas de différence, traduisant le fait que la présence de la β -galactosidase sous le ppTMDSO n'influence pas l'hydrophobie de la surface du polymère. La faible rugosité des films déposés marque une absence d'influence sur la mouillabilité de leur surface par l'eau.

Le lavage des substrats contenant la β -galactosidase immobilisée a été réalisé dans une solution tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5, pendant 10 minutes, sous agitation.



Figure 13. Clichés MEB de l'état du ppTMDSO + β -gal après lavage

Sur les observations réalisées sur la β -galactosidase recouverte par le ppTMDSO (Figure 13), le processus de dépôt du polymère ne semble pas être gêné par l'enzyme. Le lavage des substrats a également permis de mettre en évidence une bonne tenue du polymère au lavage validant la bonne stabilité du film pour l'immobilisation, en dépit de son caractère modérément réticulé.

1.2.3. Préparation des échantillons et détermination de l'activité de la β-galactosidase immobilisée

A cette étape de travail, l'efficacité de notre méthodologie d'immobilisation a été mesurée, grâce à la détermination de la quantité de β -galactosidase relarguée lors de l'utilisation du substrat supportant l'enzyme.

Etude du relargage de l'enzyme

Lors de l'immobilisation de la β-galactosidase deux questions se sont posées :

- L'enzyme est-elle bien immobilisée ?
- L'immobilisation est-elle stable dans le temps ?

Pour répondre à ces questions, nous avons évalué la quantité d'enzyme relarguée au cours du temps.

A cette fin, les échantillons contenant la β -galactosidase immobilisée, par une épaisseur de 1 μ m de ppTMDSO, sont immergés dans 3mL d'une solution tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5 sous agitation pendant 10 minutes. La solution de lavage est ensuite récupérée pour déterminer la quantité

d'enzyme éventuellement relarguée. Cette étape de lavage est réalisée autant de fois que nécessaire jusqu'à ce que la quantité d'enzyme mesurée devient nulle. Enfin, afin de confirmer l'absence d'enzyme relarguée, l'activité enzymatique est mesurée dans chaque solution de lavage.

Un prélèvement de 100 μ L de chaque solution de lavage est effectué puis mélangé dans 3mL d'une solution d'ONPG 10mM dans le tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5. Après 10 minutes, la réaction est arrêtée par ajout de 1,5mL de Na₂CO₃ 1M, puis l'absorbance est mesurée à 415nm au spectrophotomètre (UV/visible spectrophotometer, Ultraspec-1100 pro, Amersham Biosciences). Cette absorbance permet de déterminer la concentration en enzyme dans la solution de lavage, grâce à la mesure de l'activité enzymatique reportée sur une droite étalon exprimant l'évolution de la vitesse initiale en fonction de la quantité de β -galactosidase (Figure 14).



Figure 14. Gamme de la vitesse initiale de réaction Vi (μmol/min) en fonction de la quantité de βgalactosidase utilisée pour l'hydrolyse de 10mM d'ONPG



Figure 15. Evaluation de la quantité d'enzyme relarguée au cours des séquences de lavage

La Figure 15 montre que les étapes de lavage conduisent au relargage en moyenne d'une dizaine de microgramme de β -galactosidase sur les 60µg initialement déposés. Cependant, après 3 lavages, aucune enzyme ne semble être relarguée témoignant d'une bonne stabilité du polymère de ppTMDSO dans lequel est incluse l'enzyme, malgré son caractère peu réticulé.

Des images MEB des échantillons après lavages ont été réalisées afin d'évaluer l'état de surface (Figure 16).



Figure 16. Cliché MEB du polymère autour d'agrégats d'enzyme après 8 lavages

Ces images révèlent la présence de fissures voir de décollements du polymère à quelques endroits de l'échantillon. On observe bien sur la Figure 16-droite, des fissures autour d'une structure qui était probablement un agrégat d'enzyme. Ainsi, ces fissures sont très certainement dues aux fragilités causées

par la présence des agrégats volumineux de β -galactosidase sous le ppTMDSO et qui ont entrainé la rupture du polymère lors du lavage. Pour pallier aux problèmes de rupture du ppTMDSO observés, une étude du relargage a été réalisée en faisant varier l'épaisseur du film de polymère.



Figure 17. Influence de l'épaisseur du ppTMDSO sur le relargage moyen de la β-galactosidase durant le lavage

L'étude de l'influence de l'épaisseur du ppTMDSO sur la quantité d'enzyme relarguée a révélé que cette quantité est inversement proportionnelle à l'épaisseur déposée (Figure 17). En effet, les résultats montrent bien que pour une même quantité d'enzyme déposée (60µg), les faibles épaisseurs (200nm) ont tendance à laisser « fuir » plus d'enzyme que les épaisseurs plus importantes (600 nm et +), traduisant bien l'impact de l'épaisseur du film sur la capacité de rétention de l'enzyme (Elagli, 2014).

Ainsi, la méthodologie d'immobilisation « indirecte » de la β -galactosidase par le ppTMDSO a permis d'obtenir, en quelques étapes simples, des films capables de piéger les enzymes par recouvrement et de les retenir sur plusieurs séquences de lavages.

1.3. Etude de la méthode « directe »

Dans cette partie, l'inclusion directe de la β -galactosidase au processus de polymérisation plasma du monomère liquide a été étudiée. Pour cela, nous avons étudié la solubilisation de la β -galactosidase dans le monomère ppTMDSO.

1.3.1. Conditions experimentales

Etape 1 : solubilisation de la β -galactosidase dans le TMDSO liquide

Le TMDSO liquide est un solvant très apolaire et non miscible à l'eau, ce qui en fait un très mauvais milieu pour solubiliser la β -galactosidase. Nous avons donc étudié l'utilisation d'un co-solvant pour faciliter la solubilisation de l'enzyme. Afin de rester dans les mêmes conditions que celles utilisées en \$1.2.2.1., nous avons gardé l'éthanol comme co-solvant car, d'une part il présente une meilleure capacité de solubilisation de l'enzyme que le TMDSO (Figure 18) et d'autre part, il ne gêne pas la polymérisation du précurseur en post-décharge comme observée précédemment.

Pour réaliser cette solubilisation, nous avons préparé des solutions mères de β -galactosidase solubilisée dans le TMDSO ou l'éthanol comme solvant, à différentes concentrations (1, 3, 5 et 16 mg/mL). Après 1 heure d'incubation à 4°C, les solutions sont centrifugées à 4500 rpm pendant 2 minutes puis le surnageant est dosé au spectrophotomètre à 280nm pour déterminer la concentration en enzyme solubilisée.



Figure 18. Proportion de β -galactosidase (mg/mL) solubilisée dans l'éthanol et dans le TMDSO liquide en fonction de la concentration initiale en enzyme (mg.ml⁻¹)

On observe que l'éthanol possède une capacité de solubilisation de la β -galactosidase meilleure que le TMDSO. On observe une limite de solubilité de la β -galactosidase dans le TMDSO équivalente à 0,17 mg d'enzyme/mL. L'éthanol présente une capacité de solubilisation plus élevée d'environ 1,30 mg/mL d'enzyme.

Pour la suite de nos études, une solution mère de β -galactosidase de 5mg/mL dans l'éthanol a été choisie. La solution de monomère liquide a été testée pour une polymérisation avec 10% d'éthanol devant servir pour le transport de l'enzyme. L'étape suivante va permettre de juger de l'influence de l'éthanol sur la polymérisation du TMDSO.

Etape 2 : Polymérisation du monomère contenant l'enzyme

Dans les conditions classiques de dépôt (Callebert, 1994), le TMDSO est introduit, sous forme de vapeur, au sein de la post-décharge plasma, le tout régulé par un débitmètre massique. Cependant, ce mode de dépôt ne peut être employé dans le cas étudié à présent car la vapeur ne peut entrainer la β -galactosidase trop lourde. Nous avons donc étudié l'utilisation d'une pompe péristaltique au sein du réacteur pour faire circuler le mélange TMDSO + enzyme selon le schéma de la Figure 19.



Figure 19. Configuration utilisée pour le transport du mélange TMDSO/β-galactosidase au sein du réacteur plasma pour polymérisation.

Dans ces conditions, nous avons employé un réacteur couplé à un générateur 13,56MHz, pour générer un plasma d'azote (Alphagaz) à un débit de 1,8slpm. Cette fréquence d'excitation permet un meilleur dosage de la production des atomes d'azote dans la décharge (Merel, 1998). Nous souhaitions en effet être dans des conditions peu énergétiques pour limiter les effets thermiques sur l'enzyme. La solution de TMDSO liquide, stockée dans une bouteille étanche, est pompée à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit fixe de 0,25mL/min pour être envoyée directement dans la post-décharge lointaine d'un plasma d'azote ce qui évite l'emploi d'un gaz de transport comme l'oxygène. Le mélange est maintenu sous agitation durant tout le processus de dépôt grâce à un agitateur magnétique. Le dépôt s'effectue sur des substrats d'aluminium de 25mm de diamètre, nettoyés comme dans les conditions précédentes (acétone, éthanol, déshydratation §1.2.2.1.).

Les conditions de dépôt du polymère sont les suivantes :

Puissance	Pression de	Débit de	Temps de dépôt	Débit d'azote	
générateur (W)	marche (mbar)	monomère	(minutes)	(slpm)	
		(mL/min)			
300	5	0.25	10	1.8	

Tableau 1. Conditions opératoires de dépôt du TMDSO

Sous l'effet du vide du réacteur, le mélange sera instantanément vaporisé et permettra la formation du cône de polymérisation au contact de la post-décharge (Figure 20).



Figure 20. Clichés du réacteur utilisé (gauche) et du cône de polymérisation obtenu (droite)



Après 10 minutes de dépôt, les échantillons obtenus se présentent sous cette forme :

Figure 21. ppTMDSO+ β-galactosidase déposée sur un substrat d'aluminium

Nous constatons la présence « d'irisations » sur le dépôt. Ces irisations correspondent à différents niveaux d'épaisseur du polymère déposé. En effet, on observe une disposition concentrique autour d'un point qui correspond à l'endroit de sortie de l'injecteur de précurseur pouvant suggérer un dépôt sous la

forme d'un dôme. Les mesures d'épaisseur ont dégagée une vitesse de dépôt moyenne d'environ 40nm.min⁻¹ (contre 700nm.min⁻¹ pour la méthode indirecte).

1.3.2. Caractérisation de l'immobilisation directe

Des analyses en infrarouge ont été effectuées afin d'évaluer la composition du film seul et avec 10% d'éthanol absolu (Figure 22).



Figure 22. Spectre infrarouge du ppTMDSO sans éthanol et avec 10% d'éthanol

Dans les deux cas, les spectres infrarouges, semblables, témoignent d'une polymérisation. En effet, nous obtenons les bandes caractéristiques des fragments de TMDSO entre 500 et 1500cm⁻¹. Les bandes aux

alentours de 3000-3500 cm⁻¹ correspondant majoritairement au groupement de type OH comme caractérisé par Callebert (1994) apparaissent modérément dans le second spectre ce qui tend à montrer que l'ajout d'éthanol en proportion modérée ne gêne pas la polymérisation.

Cependant, plusieurs événements contraignants ont été constatés lors du dépôt par la méthode « directe », ce qui nous a obligés à revoir nos conditions opératoires.

• Gel du capillaire d'envoi du précurseur

Lors de l'apport du précurseur liquide avec la pompe péristaltique, il existe une différence importante de pression entre l'amont et l'aval de la pompe péristaltique. En effet, en amont, la pression est quasiatmosphérique tandis qu'en aval, la pompe est soumise à une pression de marche de 5 mbar (Figure 19). Cette différence de pression entre les deux compartiments entraine un changement d'état du TMDSO sous forme solide, formant des cristaux à l'intérieur et à l'extérieur du capillaire (eau atmosphérique) provoquant un arrêt du dépôt. Un réchauffement manuel (pression mécanique) du capillaire était alors effectué afin d'éviter son bouchage (solution temporaire).

• Dépôt de l'enzyme au niveau du capillaire

Le capillaire d'entraînement du mélange TMDSO/enzyme présentait des traces de dépôt de l'enzyme à l'intérieur des parois (visibles dans le capillaire transparent utilisé). La vaporisation du TMDSO n'entraînait plus l'enzyme dans le capillaire, ce qui a causé son adsorption sur la surface des parois internes du capillaire.

Ces problèmes nécessitaient une reconfiguration technique pour permettre un approvisionnement continu du mélange.

1.3.4. Evaluation de l'efficacité de l'immobilisation

Les échantillons récupérés ont été lavés dans une solution de tampon acétate de sodium 0,02M pH 4,5, pendant 10 minutes, sous agitation, afin d'éliminer l'enzyme non immobilisée.

Un premier dosage spectrophotométrique à 280nm des eaux de lavage n'a révélé aucun relargage d'enzyme pouvant signifier soit une immobilisation efficace soit une absence d'enzyme immobilisée ou encore une inactivation des enzymes suite à cette procédure. Les tests de réaction enzymatique, dans 15mL de substrat ONPG 10mM dans le tampon acétate de sodium 0,02M pH 4,5 pendant une heure, révéleront la présence ou non d'enzyme immobilisée.

Le protocole d'évaluation de l'activité enzymatique dans les échantillons a été réalisé suivant le protocole décrit dans le schéma suivant :



Figure 23. Protocole de dosage de l'activité enzymatique des échantillons

Les résultats obtenus, après une heure d'incubation des échantillons dans la solution de substrat, n'ont montré aucune trace d'activité enzymatique suggérant l'absence d'enzyme immobilisée. Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence d'enzyme immobilisée par cette méthodologie de dépôt.

Premièrement, comme souligné précédemment, il a été observé des traces d'enzyme sur les parois du capillaire d'alimentation du TMDSO, notamment au niveau de l'interface de vaporisation du précurseur. Les enzymes n'étant pas entraînées par la vapeur de TMDSO, celles-ci restent piégées dans le capillaire et ne sont donc pas déposées. Il s'agit très certainement de la raison principale au non-dépôt de l'enzyme dans ces conditions d'expériences. Une méthodologie de parallélisation du transport de l'enzyme et du monomère pourrait résoudre ce problème comme celle employée par Heyse pour le dépôt d'enzyme couplé à la polymérisation plasma (Heyse, 2011).

Deuxièmement, les enzymes sont immédiatement dispersées au niveau du cône de polymérisation (Figure 20) et déposées sur le substrat de dépôt. Cependant, le cône de dispersion étant développé sur un grand volume et le substrat d'aluminium représentant une petite surface de dépôt, la majorité de l'enzyme ne sera pas déposée mais plutôt envoyée directement sur les parois du réacteur ou aspirée par la pompe à vide. Une méthodologie de micro-plasma à pression atmosphérique comme celle décrite dans l'article de Huang (Huang, 2013), pourrait permettre de pallier au problème de dispersion d'enzyme en localisant le dépôt.

Conclusion

Deux méthodologies ont été étudiées pour l'obtention de films polymérisés contenant la β -galactosidase immobilisée.

D'une part, nous avons testé l'inclusion de l'enzyme directement au processus de polymérisation du TMDSO et d'autre part, l'immobilisation de l'enzyme par le ppTMDSO après polymérisation. Les résultats obtenus ont montré que l'immobilisation d'enzyme par adsorption puis recouvrement permet d'obtenir les meilleurs résultats en matière de simplicité du procédé, de contrôle des étapes, de reproductibilité et d'efficacité d'immobilisation. Ainsi cette méthodologie a été adoptée pour la suite des travaux visant à l'inclusion de l'enzyme dans un polymère synthétisé par plasma pour la conception de BioMEMS.

Chapitre 2. Etude de la catalyse enzymatique de la β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO

L'étude de l'immobilisation de la β -galactosidase par le ppTMDSO déposé par plasma froid a permis de cribler un certain nombre de paramètres nécessaires à la bonne tenue de l'enzyme (solvant, conditions plasma...). Après avoir caractérisé cette immobilisation de manière physique (MEB, AFM, IRTF), et l'impact des conditions d'immobilisation sur l'activité enzymatique, cette partie va concerner l'étude de l'influence de l'immobilisation sur la cinétique enzymatique. Pour cela, nous avons déterminé et comparé les constantes catalytiques issues des cinétiques enzymatiques misent en œuvre sous deux conditions de la solution de substrat, l'une statique et l'autre continu.

2.1. Etude de la stabilité de la catalyse enzymatique

2.1.1. En condition statique

Dans cette étude, l'objectif est de vérifier la biocompatibilité du ppTMDSO et de valider la méthode d'immobilisation par plasma à travers une étude des performances catalytiques de la β -galactosidase immobilisée. Pour cela, nous avons mis en œuvre un protocole de mesure de l'activité enzymatique à l'intérieur d'un réacteur fermé de type « *batch* », nous permettant d'étudier la stabilité de réaction et l'activité enzymatique résiduelle.

2.1.1.1. Conditions experimentales

L'étude de la stabilité de l'immobilisation a été entreprise à travers la mesure de l'activité enzymatique sur plusieurs tests successifs. Celle-ci a été déterminée en condition statique dans un volume réactionnel fixe d'ONPG de 10mL à une concentration de 10mM.



Figure 1. Principe du test d'activité enzymatique en condition statique

Les échantillons sont préparés dans les conditions opérationnelles d'immobilisation décrites précédemment (chapitre 1). Les enzymes (60µg) sont recouvertes par un film de ppTMDSO d'épaisseur de 1 µm, obtenu dans le réacteur de dépôt excité à 2450 MHz.

Les échantillons sont lavés et immergés dans 10mL d'une solution d'ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside) 10mM préparée dans un tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5 sous agitation pendant une heure. Durant la réaction, des prélèvements de 300 μ L sont effectués et mélangés à 150 μ L de Na₂CO₃ 1M afin de stopper la réaction (Figure 2) et de doser la quantité d'ONP (o-Nitrophenol) en solution au spectrophotométre à 415nm.









Figure 3. Cinétique de production d'ONP par la β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO dans une solution d'ONPG 10mM

Les résultats montrent tout d'abord que la β -galactosidase immobilisée conserve son activité sous le polymère de ppTMDSO déposé par plasma. En effet, la concentration en ONP augmente de manière régulière au cours du temps (normalisée avec la dégradation du substrat en solution). Ensuite, l'évolution croissante de la concentration en ONP obtenue permet d'apprécier le caractère global de la réaction avec une diffusion du substrat à travers le film de ppTMDSO, suivi d'une hydrolyse et enfin une libération de l'ONP dans le volume réactionnel.

Cette linéarité nous permet d'apprécier la pente de la droite et ainsi de déterminer la vitesse de réaction de l'enzyme immobilisée.

$$A = \varepsilon. l. C_{ONP} \quad (1)$$

Avec :

A : absorbance mesurée ε : coefficient d'extinction molaire (L.mol⁻¹.cm⁻¹)

1 : longueur du trajet optique (cm)

 C_{ONP} : concentration du produit (mol.L⁻¹)

$$Vi = \frac{C_{ONP}}{V * t} \quad (2)$$

Avec :

Vi : Vitesse de réaction (mol.min⁻¹ ou µmol.min⁻¹) C_{ONP} : Concentration finale en ONP

V : volume d'échantillon (L) (300µL prélevés)

t : temps de réaction (min)

En utilisant le coefficient d'extinction molaire de l'ONP, calculé à l'aide d'une gamme étalon de l'ONP et de la loi de Beer-Lambert (1), nous avons pu déterminer la concentration en ONP dans les prélèvements. A partir de cette concentration, de la durée de la réaction et du volume de l'échantillon prélevé, nous avons calculé la vitesse de la réaction enzymatique (2). Nous obtenons ainsi une activité enzymatique moyenne d'environ 0,042µmol/min soit 20 fois inférieure à la valeur moyenne calculée pour 100µg d'enzyme libre en solution (0,89µmol/min déterminée dans les mêmes conditions opératoires (10mM en ONPG dans le tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5).

La différence d'activité pourrait s'expliquer par les phénomènes de contraintes diffusionnelles du substrat (ONPG) à travers le film recouvrant l'enzyme. Ces contraintes diffusionnelles sont

fréquemment rencontrées dans le cadre d'immobilisation enzymatique à l'aide de polymère (Teles & Fonseca, 2008). Ces contraintes ont une influence sur l'activité catalytique de l'enzyme, comme montrée dans les travaux de Yuan (Yuan, 2005) dans lesquels la cellulase avait été immobilisée dans des membranes de Polyvinyl Alcool. Cette immobilisation a montré une diminution de l'activité apparente de la celullase de 35% par rapport à la cellulase libre principalement due à ce phénomène de contraintes diffusionnelles gênant l'accessibilité du substrat au site actif de l'enzyme. On retrouve ce phénomène dans les travaux de Moreno-Cortez (Moreno-Cortez, 2015) pour l'immobilisation de la papaïne.

Dans notre cas, la β-galactosidase immobilisée n'est pas en contact direct avec le substrat qui est en solution, l'épaisseur du film de ppTMDSO limitant son accessibilité. Afin d'être hydrolysé, l'ONPG doit tout d'abord diffuser vers la surface du polymère créant une première contrainte diffusionnelle externe. Puis, au sein du polymère, nous avons une contrainte de diffusion interne où les molécules de substrat doivent diffuser, principalement par gradient de concentration afin d'atteindre l'enzyme. Une fois l'ONPG hydrolysé, le produit de la réaction (ONP), s'accumule au niveau de l'enzyme et du polymère, pouvant créer des phénomènes de partage, influençant ainsi l'activité enzymatique. Après production de l'ONP, un gradient contraire à celui du substrat, permet une diffusion vers l'extérieur du polymère et un relargage dans la solution de réaction (Figure 4).



Figure 4. Schématisation du phénomène de diffusion de l'ONP et l'ONPG au sein du ppTMDSO

L'agitation permet d'une part d'avoir une concentration en substrat à l'interface solution/polymère, proche de la concentration dans la solution et d'autre part, limiter l'accumulation du produit à l'interface.

Une autre explication de la différence d'activité serait que des molécules d'enzymes immobilisées ne soient pas actives ou restent inutilisées du fait de la présence d'agrégats lors du dépôt sur le substrat de silicium pouvant créer des phénomènes d'encombrement stérique. En effet, l'agrégation conduit le plus souvent à l'inactivation des enzymes par gêne stérique ou par inaccessibilité des sites actifs (Hanefeld, 2009, Sheldon & van Pelt. 2013).

La difficulté d'accessibilité de la β -galactosidase par l'ONPG et l'état structural de l'enzyme immobilisée représentent donc deux facteurs limitants pour déterminer l'activité enzymatique. Pour ces raisons, nous avons choisi le terme d'activité enzymatique effective car la valeur mesurée témoigne de la capacité réactionnelle de la β -galactosidase dans ces conditions précises d'immobilisation (incluse dans le polymère de ppTMDSO).

Les échantillons sont ensuite lavés dans une solution tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5 puis immergés de nouveau dans une solution d'ONPG 10mM afin de remesurer l'évolution de la cinétique enzymatique au cours du temps. Le protocole de prélèvement et de dosage est le même que celui décrit précédemment. Huit répétitions ont ainsi été effectuées.



Figure 5. Evolution de l'activité enzymatique en fonction du nombre d'essais réalisés

Après une séquence de 8 essais, les résultats montrent une conservation de l'activité démontrant la bonne stabilité de la β -galactosidase immobilisée. Cependant, nous observons une diminution progressive de l'activité enzymatique apparente de l'échantillon lors de la succession des tests d'activité. L'activité enzymatique passe progressivement de 0,042 μ mol/min à 0,026 μ mol/min soit une diminution de 43%

après 8 tests. Un dosage de l'activité enzymatique dans les solutions de lavage n'a pas mis en évidence d'activité de la β -galactosidase après le premier lavage.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution progressive de l'activité :

- Le relargage de la β -galactosidase durant la réaction. Etant donnée la difficulté de mesurer précisément la quantité d'enzyme immobilisée dans le polymère après chaque test d'activité, nous nous sommes focalisés sur la présence de l'enzyme éventuellement relarguée dans la solution d'ONPG. Ainsi, un prélèvement de la solution de substrat a été réalisé et maintenu à température ambiante pendant 10 minutes afin d'évaluer si la réaction se poursuit. En tenant compte de l'auto-dégradation de l'ONPG, nous avons observé que l'ONPG ne subissait pas d'hydrolyse enzymatique, ce qui suggérait bien l'absence de β -galactosidase relarguée dans la solution d'ONPG.

- La seconde hypothèse serait le colmatage du polymère au cours des expériences. Le ppTMDSO joue le rôle d'une membrane perméable à l'ONPG et à l'ONP tout en empêchant l'enzyme d'être relarguée dans le milieu. Cependant, durant la diffusion, des interactions hydrophobes ONPG-polymère et ONP-polymère peuvent se produire, notamment par l'intermédiaire du noyau nitrophényl de l'ONPG et des groupements methyl ou siloxane du ppTMDSO. L'apparition d'une coloration jaune dans chaque solution de lavage, avant l'utilisation de l'échantillon, semble confirmer la présence de l'ONP dans le polymère, voire de l'ONPG non hydrolysé. Le colmatage est un phénomène très courant dans le cadre de diffusion de molècules dans une membrane (Bittner, 2013).

- La dernière hypothèse pourrait être une réorganisation de l'enzyme au sein du polymère. Etant donné la présence d'agrégats lors du dépôt de la β -galactosidase sur le support de silicium, une dispersion et une solubilisation partielle ou totale de ces agrégats peuvent avoir lieu lors du contact avec la solution aqueuse d'ONPG. L'enzyme solubilisée acquiert alors une mobilité lui permettant d'atteindre les pores du polymère (Figure 6) sans les traverser. Ainsi, il est possible que l'enzyme y demeure dans une position rendant le site actif inaccessible pour le substrat, causant la diminution de l'activité entre chaque essai (Rodrigues, 2013).



Figure 6. Schématisation de la resolubilisation des agrégats d'enzyme au sein du ppTMDSO

Etant donné que le suivi en temps réel *in situ* de l'activité de l'enzyme immobilisée ainsi que la détermination de sa conformation active ou inactive s'avère très difficile dans ces conditions, cette hypothèse ne peut qu'être évoquée. Bien évidemment, la mesure de l'activité enzymatique résulte de contraintes liées aux hypothèses évoquées ci-dessus. D'autre part, la diminution de l'activité enzymatique demeure un phénomène courant dans la littérature lors de la mise en œuvre de réaction catalytique en conditions d'immobilisation (Asif-Nawaz,2015, Kishore, 2012).

2.1.2. En flux continu

Dans cette étude, la réaction a été réalisée grâce à l'alimentation en continu de la solution de substrat à la surface de l'échantillon contenant l'enzyme immobilisée pour obtenir une production continue en produit (Ticu, 2005, Mariotti, 2008, Ogonczyk, 2012). Cette étude constitue une étape nécessaire dans la perspective de conception d'un BioMEMS vis-à-vis d'une réaction continue mais également pour un suivi en ligne des phénomènes réactionnels (Hadd, 1997).

Pour cela, nous avons évalué :

- Le comportement de la réaction enzymatique en flux continu (activité enzymatique résiduelle)
- La stabilité de l'immobilisation sur plusieurs séquences de test d'activité

2.1.2.1. Conditions experimentales

La méthodologie utilisée pour cette étude se base sur la conception d'un compartiment devant accueillir un substrat de silicium sur lequel la β -galactosidase est immobilisée par le ppTMDSO. Le schéma suivant décrit la configuration du « réacteur enzymatique » :

Le réacteur permet d'injecter la solution d'ONPG, devant recouvrir totalement le substrat de silicium, puis de récupérer séquentiellement des fractions de 300µL du produit (ONP) en sortie dans un Eppendorf contenant 150µL de Na₂CO₃ 1M.



Le schéma suivant décrit la configuration du « réacteur enzymatique » :

Figure 7. Configuration du réacteur utilisé pour l'étude en flux continu

Le réacteur se compose de deux lames de plexiglass entre lesquelles deux joints d'étanchéité sont placés autour du silicium, afin d'éviter toutes fuites de l'ONPG hors du réacteur, et de cloisonner le passage du substrat uniquement au niveau de la surface contenant l'enzyme immobilisée. Le compartiment peut recevoir un échantillon de silicium de 1x1cm, pour un volume total hors silicium d'environ 200μ l (170μ l avec un échantillon de silicium de 300μ m d'épaisseur).

La solution d'ONPG préparée dans un tampon acétate de sodium, à une concentration de 10mM est injectée en continu à l'aide d'un pousse seringue à un débit fixe de 100μ l.min⁻¹. Des fractions de 300μ l sont collectées successivement toutes les 3 minutes, mélangées au Na₂CO₃ 1M puis dosées au spectrophotomètre à 415nm afin d'apprécier l'évolution de la vitesse de la réaction au cours des prélèvements.

2.1.2.2. Résultats





Figure 8. Cinétique de réaction de la β -galactosidase immobilisée en flux continu pour un débit de <u>100µl.min⁻¹. La solution d'ONPG est à 10mM</u>

L'analyse du comportement de la réaction met en évidence une hydrolyse de l'ONPG tout au long de la durée de mise en œuvre du procédé. Pour les premiers prélèvements, on observe une augmentation progressive de la vitesse de réaction mesurée, due certainement à l'effet de diffusion des molécules à travers le film, déjà constaté en §2.1. Ensuite, la vitesse de réaction tend vers un plateau, traduisant une phase stationnaire de diffusion-réaction en mode continu Nous avons déterminé la vitesse moyenne de la réaction effective dans la phase stationnaire de la cinétique. Nous obtenons une vitesse moyenne de 0,038µmol.min⁻¹, pour une concentration initiale en ONPG de 10mM, un débit de 100µl.min⁻¹ et pour une durée de 3 minutes. On constate que cette valeur est très proche de celle trouvée pour la réaction en condition statique (0,042µmol.min⁻¹) traduisant une influence non significative du mode de mise en œuvre de la réaction.

Le réacteur est lavé par un passage de 3ml de tampon acétate de sodium 0,02M pH 4,5 à un débit de 100µl.min⁻¹ pendant 30 minutes. Puis l'échantillon est testé sur plusieurs séquences d'essais (4 fois), dans les mêmes conditions que précédemment (ONPG 10mM, 100µl.min⁻¹, 300µl collectés) afin de voir comment évolue l'activité enzymatique.



Figure 9. Evolution de l'activité enzymatique mesurée sur 4 séquences d'essais d'activité pour 10mM d'ONPG envoyé à 100µl.min⁻¹ dans le réacteur enzymatique

Les résultats obtenus montrent une conservation de l'activité enzymatique de la β -galactosidase sur plusieurs séquences d'activité. En effet, on constate que l'activité enzymatique décroit 28% sur les essais effectués (contre 25% après 5 essais en condition statique). Il semblerait que les mêmes phénomènes, responsable de la chute de l'activité enzymatique en condition statique, interviennent dans la mise en œuvre en flux continu.

2.2. Etude des paramètres cinétiques

2.2.1. En condition statique

Nous avons déterminé les paramètres cinétiques de la β -galactosidase immobilisée (K_m, V_{max}, k_{cat}) et les avons comparés avec ceux de l'enzyme libre (Zhou & Chen. 2001, Sun, 2010). Une gamme de concentrations en ONPG de 0, 0,5, 1, 2, 5 et 10mM, a été testée dans les mêmes conditions expérimentales que dans la mise en œuvre de la réaction (tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5, 10ml, sous agitation). L'étude des paramètres cinétiques est comparée à ceux obtenus avec l'enzyme libre, à 100µg de β -galactosidase en solution dans son tampon acétate de sodium 0,02M pH4,5.

A partir d'une représentation de Lineweaver-Burk, nous avons pu obtenir directement la valeur de l'inverse du K_m , par l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses, et la valeur de V_{max} , par l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées.

La valeur de V_{max} obtenue correspond à la vitesse maximale de la réaction enzymatique en condition de concentration saturante en substrat et le Km, appelé également constante de Michaelis, est la concentration minimale en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction correspond à la moitié de la valeur de V_{max} . Ces deux valeurs sont les principales pour juger de la performance catalytique de la β-galactosidase comme décrite dans l'étude de Carrara & Rubiolo (1996). D'autres valeurs ont également été calculées, telles que le V_{max} spécifique, traduisant la valeur de V_{max} en fonction de la concentration en □-galactosidase active. Cette valeur est très importante car elle donne un meilleur aperçu de la différence de l'activité enzymatique entre la
-galactosidase immobilisée et libre, mais elle est également délicate à calculer car elle se base sur la quantité d'enzyme active dans la réaction, ce qui est difficile à déterminer dans le cas d'une immobilisation et particulièrement dans notre cas d'étude. Pour déterminer au mieux cette valeur de V{max} spécifique, nous avons considéré que la totalité de la galactosidase immobilisée est active, ce qui revient à utiliser la quantité d'enzyme immobilisée calculée après lavage. Ensuite, la constante k_{cat} a été calculée. Elle traduit l'efficacité de la catalyse c'est-à-dire la fréquence à laquelle l'enzyme exerce son acte catalytique ou encore appelée « turn-over ». Et enfin, la constante de spécificité k_{cat} /K_m a été calculée, révélant la spécificité globale de l'enzyme pour le substrat. Tous ces paramètres nous ont permis de comparer les performances catalytiques de la β galactosidase immobilisée et libre. L'ensemble de ces paramètres nous permettront d'évaluer les performances catalytiques de la β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO.



Figure 10. Représentation de Michaelis Menten à partir des données expérimentales obtenues pour la β-galactosidase libre (orange) et immobilisée (bleu)



Figure 11. Représentation de Lineweaver Burk à partir des données experimentales pour la β galactosidase libre (orange) et immobilisée (bleu)

Les valeurs des paramètres cinétiques sont résumées dans le tableau suivant

	\mathbf{K}_{m}	V_{max}	\mathbf{V}_{\max}	k _{cat}	k_{cat}/K_m
	(mM)	(µmol.min ⁻¹)	(µmol.min ⁻¹ .mg enz ⁻¹)	(s ⁻¹)	$(mM^{-1}.s^{-1})$
β -gal en solution	$1,90 \pm 0,86$	$1,05 \pm 0,95$	10,52	18,41	9,68
β-gal immobilisée	$0,74 \pm 0,2$	0,07 ± 0,01	1,52	2,66	3,59

<u>Tableau 1. Constantes catalytiques pour la β-galactosidase en solution et immobilisée par le</u> ppTMDSO en condition statique

Concernant les valeurs de V_{max} mesurées, la β -galactosidase immobilisée ne conserve qu'environ 7% de son activité enzymatique maximale par rapport à la β -galactosidase libre dans les mêmes conditions réactionnelles. Cette variation peut s'expliquer par l'impact des conditions d'immobilisation (sous un film) et ses conséquences en termes d'accessibilité de l'enzyme par le substrat après diffusion à travers le ppTMDSO, et de sites actifs de l'enzyme disponibles ou non, sur les performances catalytiques de la β -galactosidase comme démontré dans l'étude de Cirillo (2014) qui révèle l'impact des conditions d'immobilisation sur l'activité apparente de l'enzyme immobilisée dans des polymères. Cette valeur de V_{max} ne peut témoigner directement de l'activité de l'enzyme immobilisée mais reflète plutôt la réaction enzymatique en elle-même dans les conditions d'immobilisation. La diminution de la valeur de V_{max} peut également être due à une dénaturation de la β -galactosidase déposée sous forme d'agrégat. La $V_{maxspé}$, calculée en fonction de la quantité d'enzyme mise en jeu au cours de la réaction est environ 7

fois inférieure pour l'enzyme immobilisée par rapport à l'enzyme libre. Cette variation peut s'expliquer par les conditions d'immobilisation qui ne permettent pas nécessairement de mettre en jeu toutes les molécules d'enzyme initialement déposées (présence d'agrégats, accessibilité de l'enzyme).

Concernant le K_m , nous constatons une faible variation, 1,9 μ M_{libre} contre 0,74 μ M_{imb}, les conditions d'immobilisation ne semblent donc pas avoir d'effet significatif sur l'affinité de la β -galactosidase immobilisée pour l'ONPG. Cependant, la valeur de Km obtenue montre une amélioration de cette affinité de la β -galactosidase en condition immobilisée. Cette amélioration est probablement due à l'effet du microenvironnement de l'enzyme au sein du film dans lequel le substrat est directement concentré après diffusion.

 k_{cat} est environ 7 fois plus faible pour la β -galactosidase immobilisée vis-à-vis de l'enzyme en solution. Cela tend à confirmer l'impact de l'immobilisation sur la catalyse enzymatique. Cette diminution rejoint la variation observée dans le calcul du $V_{maxspé}$ car la valeur de k_{cat} est directement calculée à partir du $V_{maxspé}$ rapportée à la masse moléculaire de la β -galactosidase (105kDa).

En ce qui concerne k_{cat} /K_m, l'immobilisation révèle une diminution d'environ 2,5 fois par rapport à l'enzyme libre. En tenant compte des valeurs obtenues pour k_{cat} et K_m, la spécificité globale de la \Box -galactosidase pour l'ONPG ne semble être que légèrement affectée par les conditions d'immobilisation.

Les calculs des paramètres cinétiques et donc des performances catalytiques, montrent que notre méthodologie d'immobilisation influence très peu l'affinité de l'enzyme pour l'ONPG, et par conséquent révèle une préservation de la conformation active de l'enzyme. Cependant, l'ensemble des calculs sont impactés par les phénomènes limitant l'accessibilité du substrat vers le site actif (impact du polymère, état d'agrégation des enzymes en surface) et le relargage du produit (diffusion à travers le polymère), ainsi que par la quantité d'enzyme mise en œuvre dans la réaction catalytique.

2.2.2. En flux continu

Les échantillons ont été testés avec différentes concentrations en ONPG pour un même débit de 100μ L/min et pour un même volume collectés (300μ L/3min). Les conditions réactionnelles restent les mêmes pour les différentes concentrations (0,5, 1, 2, 5 et 10mM). Le graphique ci-dessous montre l'évolution de la concentration en ONP obtenue pour les différentes concentrations initiales en ONPG testées.



Figure 12. Evolution de la concentration moyenne en ONP produite dans chaque prélèvement pour les différentes concentrations initiales en ONPG testées pour un débit de 100µl.min⁻¹ et un temps de <u>séjour de 3 minutes</u>

Pour les concentrations en substrat de 0,5 à 2mM, la concentration en ONP reste constante tout au long de la réaction d'hydrolyse. Concernant les concentrations de 5 et 10mM, la stabilité des concentrations en ONP obtenue n'est atteinte qu'au bout de la 4^{ème} et 5^{ème} fraction respectivement.



Figure 13. Représentation de Michaelis de la vitesse initiale de réaction moyenne obtenue pour les différentes concentrations initiales en ONPG utilisées



Figure 14. Représentation de Lineweaver Burk des vitesses initiales de réaction moyennes en fonction des différentes concentrations en ONPG

Sur la représentation Michaelienne (Figure 13) (Vi en fonction de la concentration initiale en ONPG), nous observons une augmentation de la vitesse initiale de la réaction jusqu'à atteindre progressivement un plateau correspondant au V_{max} . Grâce à la représentation de Lineweaver Burk (Figure 14), nous pouvons apprécier les constantes catalytiques de la β -galactosidase immobilisée (Tableau 2).

	K _m	V _{max}	V _{maxspé}	k _{cat}	k_{cat}/K_m
	(mM)	(µmol.min ⁻¹)	(µmol.min ⁻¹ .mg enz ⁻¹)	(s^{-1})	$(mM^{-1}.s^{-1})$
β-gal Imb	$4,01 \pm 1,4$	$0.06\pm0,01$	10,01	17,51	4,36

Nous obtenons un V_{max} de 0,06 µmol/min pour l'expérience en flux continu contre 1,05 µmol/min pour la β-galactosidase libre et 0,07 µmol/min pour la β-galactosidase immobilisée testée en condition statique (Tableau 1). Les conditions d'immobilisation influencent les performances catalytiques de la β-galactosidase, que l'on soit en statique ou continu (Elagli, 2014). Concernant le V_{max} spécifique obtenu (10,01 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹), en comparant à la valeur obtenue dans des conditions de réaction en flux continu avec la β-galactosidase et l'ONPG comme substrat (Elagli. 2015) (7,76 ± 0,82 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹), nous nous retrouvons dans les mêmes ordres de grandeur.

Le calcul du V_{max} spécifique révèle une équivalence entre les expériences en solution (10,52 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹) et immobilisée en flux continu (10,01 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹). Cependant, une grande différence de V_{max} spécifique apparaît dans la mise en œuvre de la réaction avec la \Box -galactosidase immobilisée dans les deux types de mises en œuvre (statique : 1,52 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹ vs. continue : 10,01 µmol.min⁻¹.mg enz⁻¹), suggérant un impact significatif du flux continu de la solution de substrat sur la catalyse enzymatique. Cette variation peut s'expliquer par les différentes concentrations en \Box -galactosidase immobilisée (60µg en condition statique et 6µg en flux continu). Cette différence de quantité d'enzyme immobilisée permet très certainement de diminuer la quantité d'agrégats déposés, améliorant la répartition de l'enzyme et ainsi limitant les effets de gêne stérique.

Concernant le K_m, nous observons une faible variation lorsque la \Box -galactosidase immobilisée est mise en œuvre en flux continu (4,01mM), par comparaison avec l'enzyme immobilisée en condition statique (0,74mM) et en solution (1,90mM). Sous condition statique, nous avons constaté une amélioration du K_m par rapport aux conditions d'enzyme libre, liée probablement à une accumulation du substrat au niveau du microenvironnement de l'enzyme. Dans le cas du flux continu, l'accumulation du substrat semble être moins importante car l'effet de l'alimentation du substrat provoque un renouvellement plus rapide en substrat et produit dans le microenvironnement pouvant influencer la valeur de K_m et expliquer l'augmentation observée. Cependant, au vu de la variation modérée de ce K_m, la mise en œuvre de la réaction avec la \Box -galactosidase en solution ou après immobilisation n'influence pas l'affinité de l'enzyme pour l'ONPG.

Concernant les autres paramètres cinétiques (Tableau 2), nous obtenons une valeur de k_{cat} similaire à l'enzyme libre ($k_{cat imb}$ 17,51 s⁻¹ vs $k_{cat libre}$ 18,41 s⁻¹), et une constante d'efficacité de la réaction k_{cat} /K_m (4,36 s⁻¹.mM⁻¹) 2 fois inférieure à celle obtenue pour l'enzyme libre (9,68 s⁻¹.mM⁻¹). En comparant avec les valeurs obtenues en condition batch immobilisée (3,59 s⁻¹mM⁻¹), nous obtenons quasiment la même valeur qu'en flux continu (82%). Ainsi, la mise en œuvre de la réaction catalytique par la β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO en condition d'alimentation continue a principalement révélé un impact des conditions d'immobilisation sur le V_{max} de la réaction par rapport à l'enzyme en solution.

Influence du temps de séjour de l'ONPG

Une étude de l'influence du débit de la solution d'ONPG sur la cinétique de la □-galactosidase a été menée en flux continu. Le but de cette étude a été d'évaluer l'influence du temps de séjour du substrat, dans le réacteur, sur la cinétique de la réaction ainsi que sur les paramètres cinétiques effectifs de l'enzyme (Seong, 2003, Chaoqi & Philipobbard. 2011). Pour cela, le même protocole que celui mis en

œuvre en §2.2.3. a été utilisé à 4 débits différents. Ces débits étaient 50, 100, 150 et 200μ l.min⁻¹, correspondant respectivement à des temps de séjour de l'ONPG de 6, 3, 2 et 1,5 minutes.



Figure 15. Evolution de la quantité moyenne d'ONP mesurée en fonction du temps de séjour et de la concentration initiale en ONPG

La Figure 15 montre l'évolution de la concentration en ONP obtenue pour différents temps de séjour en ONPG. Nous constatons immédiatement que le taux de conversion est directement fonction du temps de séjour (plus le temps de séjour est long, meilleure est la production) et de la concentration en ONPG (plus la concentration initiale en ONPG est élevée, plus la concentration en ONP obtenue est importante) comme observée dans l'étude de Chaoqi & Philipobbard pour la production de biodiesel à l'aide de bactéries. A partir des valeurs de concentration en ONP, nous avons tracé l'évolution de la vitesse en fonction de la concentration en ONPG pour chaque temps de séjour utilisé (Figure 16). Nous observons une cinétique de type Michaelienne pour chaque débit.




Figure 16. Représentation Michaelienne Vi=f ([ONPG]₀) de l'influence du temps de séjour de l'ONPG (6', 3', 2' et 1,5') sur la vitesse initiale de réaction

Le calcul des paramètres cinétiques pour chaque temps de séjour a été effectué à l'aide de différentes concentrations initiales en ONPG (0,5, 1, 2, 5 et 10mM). Puis, à partir de la représentation de Lineweaver-Burk (Figure 15), les différentes constantes (V_m , V_{max} spécifique, K_m , k_{cat} et k_{cat} / K_m) ont été calculées (Tableau 3).



Figure 15. Représentation de Lineweaver-Burk des valeurs moyennes de vitesse initiale de réaction en fonction des concentrations en ONPG

La représentation en double inverse de Lineweaver-Burk révèle une variation des valeurs de la pente, se traduisant par l'obtention de différentes valeurs de K_m .

Temps de	V_{max}	$V_{\text{maxspé}}$	K _m	k _{cat}	k_{cat} / K_m
séjour (min)	(µmol.min ⁻¹)	(µmol.min ⁻¹ .mg ⁻²)	(mM)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹ .mM ⁻¹)
6	$0,059 \pm 0,001$	9,998	$5,98 \pm 0,96$	17,33	2,89
3	$0,057 \pm 0,003$	9,502	$4,49 \pm 0,85$	16,49	3,67
2	$0,052 \pm 0,002$	8,703	3,29 ± 1,11	15,10	4,58
1,5	$0,054 \pm 0,002$	9,102	3,12 ± 1,09	15,80	5,06

Tableau 3. Constantes catalytiques calculées pour les différents temps de séjour employés

Nous constatons que la variation du temps de séjour influence peu la cinétique réactionnelle de la β -galactosidase immobilisée. Nous obtenons un V_{max} moyen de 0,055 μ mol.min⁻¹ et un $V_{maxspé}$ moyen d'environ 9,326 μ mol.min⁻¹.mg⁻² d'enzyme.

Concernant le K_m , le changement de débit semble avoir une légère influence sur l'expression de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. En effet, lorsque le débit augmente, la valeur du K_m a tendance à diminuer. L'hypothèse du gradient de diffusion de l'ONPG et de l'ONP à l'interface solution/polymère pourrait expliquer cette variation : le renouvellement du substrat, favoriserait la libération du produit vers la solution. Cependant, l'ordre de grandeur de la variation du K_m reste faible et compte tenu des incertitudes peut être considéré comme constant.

La constante catalytique k_{cat} ne varie quasiment pas, donnant un k_{cat} moyen de 16.18 s⁻¹. Enfin, la constante d'efficacité k_{cat}/K_m varie légèrement en fonction du temps de séjour (6' : 2,889 s⁻¹.mM⁻¹ jusque 5,065 s⁻¹.mM⁻¹).

Par conséquent, la gamme de débits étudiés n'a révélé qu'une très faible influence sur les différentes constantes cinétiques calculées. La variation des débits a montré logiquement que le temps de contact de l'ONPG commandait directement le taux de production du produit ONP mais sans réelle influence sur la fonction catalytique de la β -galactosidase immobilisée.

Conclusion

Dans les deux cas d'évaluation des performances catalytiques de la β -galactosidase immobilisée par le ppTMDSO, les résultats obtenus ont montré une conservation de l'activité enzymatique sur plusieurs séquences d'utilisation avec une légère diminution entre chaque utilisation. Par comparaison avec la réaction utilisant la β -galactosidase immobilisée mise en œuvre en condition statique, le flux continu semble avoir un impact sur la cinétique de la réaction. Cette étude a permis de valider la biocompatibilité du ppTMDSO pour l'immobilisation de biomolécules et sa versatilité dans le mode d'utilisation (continu ou statique) confortant également le choix porté sur le ppTMDSO en tant de que matériau pour la conception d'un BioMEMS.

Chapitre 3. Conception d'un microcanal à β-galactosidase immobilisée

Dans la voie de conception du BioMEMS, une validation à l'échelle microfluidique s'avère nécessaire. Ce chapitre va donc s'intéresser à la conception d'un microréacteur enzymatique en associant les méthodes conventionnelles de microfabrication et la stratégie d'immobilisation développée précédemment. Une étude de la réaction enzymatique suivie d'une approche de la compréhension des phénomènes d'écoulement et de diffusion à l'intérieur du microréacteur seront également proposées.

3.1. Description du concept

Nous avons étudié la faisabilité de l'immobilisation de la β -galactosidase par inclusion dans un réseau polymère de ppTMDSO obtenu par plasma froid, et la mise en œuvre de la catalyse enzymatique hétérogène. Dans les deux types de conditions (statique et continue), nous avons montré une bonne réactivité et stabilité de l'enzyme sur plusieurs cycles réactionnels, démontrant la biocompatibilité du procédé d'immobilisation, ainsi que le potentiel d'application du ppTMDSO pour le piégeage stérique de biomolécules d'intérêt.

Dans la voie de conception d'un BioMEMS grâce à l'utilisation du plasma froid et du ppTMDSO, le passage à l'échelle micro était primordial. Avant d'opter pour une microfabrication totale, uniquement avec le ppTMDSO en tant que matériau micro structurant (Bocquet, 2004, Nguyena, 2007, Mille, 2008), l'étude de l'immobilisation à l'échelle micrométrique a été entreprise. Plusieurs questions se sont posées lors du passage de l'échelle « macro » à l'échelle de microstructure :

- L'immobilisation de l'enzyme par le ppTMDSO est-elle réalisable à l'échelle micrométrique?
- Comment se comporte la réaction enzymatique à cette échelle (activité, stabilité, paramètres cinétiques...)?
- Quelles sont les limites de la conception ?

Pour répondre à ces questions, la réalisation d'un microréacteur à β -galactosidase immobilisée par le ppTMDSO a été entreprise. Pour cela, nous avons intégré notre procédure d'immobilisation de la β -galactosidase par le ppTMDSO à l'intérieur d'un microcanal en PDMS conçu par un procédé déjà bien connu et maitrisé (Meng, 2011)

3.2. Conditions experimentales

La stratégie a été de concevoir séparément le microcanal en PDMS et la surface contenant l'enzyme immobilisée et de les associer ensemble à l'étape finale (Figure 1). Le microcanal en PDMS, de taille définie, devait permettre le branchement de connectiques de chaque côté afin d'y injecter la solution de substrat et de récupérer le produit à la sortie, le tout géré par un pousse-seringue (Figure 1).



Figure 1. Photo du microdispositif final avec les connectiques (gauche) et de sa mise en place en condition opérationnelle connectée avec un pousse-seringue (droite)

L'autre élément se compose d'un support, type lame de verre sur lequel l'enzyme sera déposée puis recouverte par le ppTMDSO selon la méthodologie présentée dans le chapitre 1. Enfin, les deux éléments sont combinés pour obtenir le microréacteur enzymatique.

Conception du microcanal en PDMS

Les techniques de conception de microcanaux en PDMS sont déjà bien connues et définies dans la littérature comme par exemple dans les travaux de Fu (2015) car elles sont très couramment utilisées pour la production de micro dispositifs et systèmes d'analyse. De nombreuses applications du PDMS en tant que matériau de conception sont déjà recensées telles que des plateformes analytiques (Feng, 2015) ou pour la détermination de constantes catalytiques (Jambovane, 2009). La méthodologie de conception de microcanaux consiste en un dépôt du gel de PDMS sur un moule qui, après durcissement, laisse son empreinte dans le gel (Figure 2).

Le *design* choisi de notre microdispositif devait répondre à certaines attentes (taille, entrée et sortie, possibilité de travailler en flux continu...) pour la conception du microréacteur enzymatique.

Le choix s'est porté sur le design de microcanaux de 4 longueurs différentes (2, 3, 5 et 10mm), de 3 largeurs différentes (100, 250 et 500µm) et une hauteur fixe de 20µm. Ainsi, un masque a été fabriqué avec les empreintes des canaux finaux (Figure 3). Pour concevoir le moule servant à fabriquer les canaux en PDMS, nous avons suivi les étapes suivantes :



Figure 2. Etapes de conception de microcanaux en PDMS par la méthode de réplication sur moule

Sur un wafer de silicium (Siltronix) préalablement nettoyé à l'acétone, éthanol puis déshydraté à 200°C, une résine photosensible AZ4562 (MicroChemical GmbH) est déposée uniformément à l'aide d'un *spincoater* à 1250 tours.min⁻¹, pendant 40 secondes, afin d'obtenir une épaisseur d'environ 12µm. Après un passage au recuit sur plaque chauffante, pendant 3 minutes à 110°C, le wafer est soumis à une insolation UV à travers le masque comportant les motifs des canaux voulus. La résine étant « positive », l'insolation rendra les parties insolées solubles dans le développeur et laissant intactes les parties non exposées, protégée par le masque, correspondant aux microcanaux. Après insolation, le wafer est plongé dans une solution de révélation basique (AZ351b) afin d'éliminer la résine insolée. Environ 2 minutes d'incubation suffisent pour révéler les microcanaux finaux (Figure 3).



Figure 3. Photographies du masque employé pour la conception des microcanaux (gauche) et des microcanaux en résine conçus sur un wafer en silicium par le procédé de photolithographie (droite)

Le wafer est ensuite soumis à un procédé de gravure profonde des surfaces exposées du silicium, dit « procédé Bosch », par plasma SF₆ sur une profondeur d'environ 20μ m. Les parties sur lesquelles les microcanaux en résine sont présents restent non affectées par la gravure. Après la gravure, la résine est éliminée à l'acétone puis le wafer subit un dépôt par PECVD (plasma C₄F₈) d'une fine couche (quelques nanomètres) de matériau de type téflon qui permettra un décollement facilité du futur PDMS (Figure 2).

Enfin, le PDMS liquide est préparé par un mélange (10/1 p/p) du pré polymère Sylgard 184 et son durcisseur. Les deux substances sont agitées vigoureusement puis dégazées dans une enceinte sous vide afin d'éliminer les bulles d'air et rendre le mélange translucide. Une fois dégazé, le PDMS est coulé sur le moule, préalablement disposé dans une boite de Pétri, et mis à durcir dans une étuve 1h à 80°C. Une fois le mélange polymérisé sur le moule, le PDMS est décollé de la surface puis chaque microcanal est découpé de manière individuelle pour utilisation.

Pour finaliser la conception du canal, le PDMS subit un traitement type corona (plasma filamentaire dans l'air ambiant) afin de pouvoir être collé sur une lame de verre (Figure 4 gauche). Le traitement corona consiste en une activation par plasma des espèces à la surface du PDMS afin de favoriser leurs interactions avec une autre surface permettant ainsi le collage, phénomènes détaillés dans l'étude de Ding (2012). L'étanchéité du canal est vérifiée par l'injection d'un colorant (Figure 4 droite) permettant de visualiser le confinement du liquide.



Figure 4. Photo du traitement corona appliqué sur le PDMS et sur le verre (gauche) et mis en évidence de l'étanchéité des microcanaux finaux par un colorant rouge (droite)

Pour réaliser l'étape finale vers le microréacteur enzymatique, deux considérations ont dû être prises en compte :

- Le collage du canal sera effectué sur une lame de verre (pour de futures observations sous microscope) contenant la β-galactosidase immobilisée recouverte par 1µm de ppTMDSO
- Le PDMS devra supporter le passage du substrat et du produit sans adsorber ces molécules

Des tests de collage sur des lames de verre avec l'enzyme immobilisée par le ppTMDSO ont été effectués afin de vérifier si le polymère pouvait gêner l'adhésion du PDMS traité par corona. Le PDMS ainsi durci subit un traitement corona puis est mis en contact avec la surface de ppTMDSO. Les vérifications d'étanchéité ont confirmé que l'enzyme et le ppTMDSO n'entraveront pas l'adhésion du PDMS, nous permettant d'obtenir un canal fonctionnel.

Les travaux de Toepke & Beebe (2006) et de Wang (2012) ont mis en évidence la possibilité d'adsorption et de diffusion de biomolecules (Nile Red, Mannitol, Diazépam...) à l'intérieur du PDMS. Dans notre situation, cette possible diffusion de l'enzyme, du substrat et/ou du produit rendrait l'utilisation du PDMS inadaptée pour permettre la conception d'un microréacteur enzymatique où aucune fuite de molécules ne doit apparaître. Pour empêcher les diffusions à l'intérieur du PDMS, un traitement de sa surface a été effectué via le dépôt d'une couche « vitrifiée » de ppTMDSO. Cette couche vitrifiée résulte d'un dépôt classique d'une couche de ppTMDSO de 500nm dans les conditions opérationnelles citées précédemment (plasma micro-onde 2450MHz, débits : N₂/1.8slpm, O₂/25sccm, TMDSO /20sccm, 45 secondes) suivi d'un post-traitement de 2 minutes en post-décharge d'un plasma N₂/O₂. Ce traitement va permettre d'éliminer certaines fonctions du ppTMDSO, dont les fonctions CH₃, donnant un polymère de composés. Ainsi cette couche imperméabilisante limitera (voire empêchera)

le passage de molécule du milieu liquide vers le PDMS. Le schéma ci-dessous résume les étapes de dépôt de la couche de ppTMDSO post-traitée.



Figure 5. Représentation schématique du dépôt suivi du post-traitement d'une couche de ppTMDSO sur le microcanal en PDMS avant collage sur lame de verre

Une étude de diffusion d'une molécule fluorescente (Fluorescéine, Sigma Aldrich Chemical Co.) à l'intérieur du PDMS a été entreprise avec et sans couche de ppTMDSO vitrifiée. L'étude a consisté en la mise en circulation à l'intérieur d'un microcanal en PDMS d'une solution de fluorescéine durant 1 heure à un débit de 10µl.min⁻¹, suivie d'un rinçage du canal est effectué par une solution d'eau contenant 10% d'éthanol (10µl.min⁻¹/10 minutes). Les deux microcanaux avec et sans la couche de ppTMDSO vitrifiée sont analysés sous microscope à fluorescence afin de détecter les traces d'une éventuelle diffusion de molécules fluorescentes dans le PDMS. Les images ci-dessous résument la mise en œuvre de l'étude et les résultats obtenus.



Figure 6. Observations sous microscope à épifluorescence du microcanal remplit par la solution de fluorescéine (gauche) et vidé de cette solution (droite).



Figure 7. Observation au microscope à épifluorescence des microcanaux en PDMS sans (témoin gauche) et avec post-traitement (droite) après lavage de la fluorescéine (le contour du canal a été redessiné en blanc pour plus de clarté de l'image)

L'image de remplissage du canal par la solution de fluorescéine (Figure 6 gauche) nous permet, de par l'étanchéité du canal et la bonne circulation du liquide durant toute l'expérimentation, de valider le procédé de conception de microcanaux en PDMS. Après vidange du canal, les observations au microscope révèlent la présence de fluorescence sur les parois du microcanal montrant une possible adsorption/diffusion de molécules fluorescentes (Figure 6 droite). Un rinçage à l'eau/éthanol a permis d'éliminer totalement ces traces de fluorescence, ce qui laisse à penser qu'il s'agissait donc d'une adsorption réversible de la molécule de fluorescéine aux parois et non d'une diffusion (Figure 7).

Ainsi, le dépôt de la couche de ppTMDSO post-traitée a permis de s'assurer de l'absence de diffusion de molécules à l'intérieur même du PDMS permettant une quantification plus juste du produit synthétisé dans les futures réactions enzymatiques en microsystème.

Immobilisation de la β -galactosidase par le ppTMDSO dans le microsystème

Cette partie concerne l'intégration de l'élément biologique (la β -galactosidase) dans le microsystème. Le but est de coupler la méthodologie d'immobilisation par le ppTMDSO et la conception du microsystème en PDMS. La conception du microdispositif à β -galactosidase immobilisée est détaillée dans le schéma suivant.



Figure 8. Représentation schématique résumant l'immobilisation de la β-galactosidase et la conception du microdispositif

Pour ce faire, $2\mu l$ d'une solution de β -galactosidase (3mg.ml⁻¹ dans l'éthanol) sont déposés, à l'aide d'une micropipette, sur une lame de verre (spot d'environ 1cm de diamètre) (A). L'enzyme est ensuite recouverte par une couche de $1\mu m$ d'épaisseur de ppTMDSO dans les conditions citées dans le chapitre 1. Le microcanal en PDMS est également recouvert par une couche de ppTMDSO post-traitée (§3.2.1) (B). Ensuite ces deux parties subissent un traitement par corona durant 20 secondes (C) puis sont mises

en contact pour le collage (D). Enfin les capillaires en silice (75 μ m diamètre interne, 10cm de long) sont ajoutés afin de permettre l'injection et la récupération de la solution (E). Nous obtenons ainsi le microréacteur à β -galactosidase immobilisée par le ppTMDSO.

Caractéristiques du microréacteur à ß-galactosidase immobilisée

Nous avons étudié les caractéristiques du microsystème à β -galactosidase immobilisée par le ppTMDSO nouvellement créé. Le schéma ci-dessous résume les dimensions de celui-ci.



Figure 9. Dimensions principales du microcanal (dimensions en µm)

Le dispositif se compose de deux grands réservoirs au niveau desquels seront branchées les connectiques pour la circulation des solutions. La seconde partie est composée de chaque côté d'une réduction pour un entraînement de la solution dans la troisième partie qui constitue un microcanal de 3000 μ m de long sur 100 μ m de large. La configuration de ce dispositif est liée à des questions pratiques au niveau du *design* même du masque dans le procédé de photolithographie (§3.2.1). Cependant, sur le principe même de conception d'un microcanal, cette configuration ne diffère pas en efficacité par rapport à un simple canal rectiligne ou toutes autres configurations simples.

Concernant le dépôt de la β -galactosidase, ne disposant pas à l'époque d'un système opérationnel de micro-dépôt localisé, l'enzyme est déposée sous forme d'un spot de 2µl qui s'étale sur un diamètre d'environ 1cm.

Etant données les dimensions du microcanal, il est évident que toutes les molécules d'enzyme déposées ne seront pas sollicitées pour la réaction car se situant en dehors de la zone de passage des solutions.

Cependant, du fait que la β -galactosidase se répartit de manière quasi homogène sur tout le spot, il est possible d'estimer une quantité d'enzyme par unité de surface, en prenant en compte que le microcanal s'inscrit dans le spot entier (Figure 10).

Connaissant sa surface, nous pouvons estimer la quantité d'enzyme potentiellement en contact avec le substrat lors des réactions enzymatiques. Sachant que nous déposons 2μ l d'une solution à $3mg.ml^{-1}$, nous avons donc $6\mu g$ de β -galactosidase repartis sur un spot d'1cm de diamètre ou 78,5mm² de surface moyenne. La surface totale du microcanal faisant 12,7mm², nous pouvons estimer la quantité d'enzyme au niveau du microcanal à environ $1\mu g$.



Figure 10. Représentation de la répartition du spot de β -galactosidase par rapport au microcanal (dimensions en μ m)

Le débit choisi (10µ1.min⁻¹) pour les réactions enzymatiques et la caractérisation dans le microdispositif nous permettent d'évaluer le régime d'écoulement, notamment grâce au calcul du nombre de Reynolds (Re) grâce à la formule suivante :

$$Re = \frac{UL}{v}$$

Avec U, la vitesse caractéristique du fluide ou débit (m.s⁻¹), L la dimension caractéristique (m) et v la viscosité cinématique du fluide (m².s⁻¹). En considérant le flux conservatif, on peut assimiler l'écoulement dans le microcanal à une succession de canaux de section S = a x b (a : largeur ; b : hauteur).

Pour un débit Q de 10μ l.min⁻¹ ou 1.67. 10^{-10} m.s⁻¹, on calcule la vitesse d'écoulement pour chaque section du microcanal (Figure 9) telle que :

- Section 1 : $S_1 = 2000 \mu m x 20 \mu m = 4,0.10^4 \mu m^2 = 4,0.10^{-8} m^2$
- Section 2 : $S_2 = 700 \mu m \times 20 \mu m = 1,4.10^4 \mu m^2 = 1.4.10^{-8} m^2$
- Section 3 : $S_3 = 100 \mu m x 20 \mu m = 2,0.10^3 \mu m^2 = 2,0.10^{-9} m^2$

$$U = \frac{Q}{S} = \frac{1.67 * 10^{-10}}{S}$$
$$U_1 = 4,2.10^{-3} \text{m.s}^{-1} \qquad U_2 = 12.10^{-2} \text{m.s}^{-1} \qquad U_3 = 8,4.10^{-2} \text{m.s}^{-1}$$

On obtient les vitesses moyennes sur les différentes sections U_1 , U_2 et U_3 . On constate que la section 1 impose la vitesse la plus faible et donc le temps de séjour le plus long.

La valeur de v pour l'eau à 20°C est égale à $1,0.10^{-6}$ m².s⁻¹.

La dimension caractéristique L est ce que l'on qualifie le diamètre hydraulique. Elle correspond au rapport :

$$L = \frac{4 \text{ surface section}}{p\acute{e}rim\acute{e}tre} = \frac{4 \text{ hauteur * largeur}}{2 \text{ hauteur + 2 largeur}} = \frac{2 * \text{ hauteur * largeur}}{(\text{hauteur + largeur})}$$
$$= 2 * \left(\frac{1}{\left(\frac{1}{\text{hauteur}}\right) + \left(\frac{1}{\text{largeur}}\right)}\right)$$

Les valeurs de L pour chaque section sont donc :

Section 1 : Largeur >> hauteur ; $L1 = 2 * hauteur = 2* 20.10^{-6} m = 40.10^{-6} m$

Section 2 : Largeur >> hauteur ; $L1 = 2 * hauteur = 2* 20.10^{-6} m = 40.10^{-6} m$

Section 3 :
$$L3 = 2 * \left(\frac{1}{\left(\frac{1}{20}\right) + \left(\frac{1}{100}\right)}\right) = 2 * \left(\frac{1}{\frac{6}{100}}\right) = 33.10^{-6} m$$

Enfin, on calcule l'intervalle des calculs de Reynolds correspondant aux différentes sections :

$$\left(\frac{4.2.10^{-3} * 40.10^{-6}}{1.10^{-6}}\right) < Re < \left(\frac{8.4.10^{-2} * 33.10^{-6}}{1.10^{-6}}\right)$$
$$0.2 < Re < 2.8$$

Le calcul du nombre de Reynold, dans nos conditions réactionnelles de microsystème et de débit, nous permet d'obtenir un intervalle de valeur de *Re* compris entre 0,2 et 2,8 en fonction de la section du microcanal. Cette valeur nous place en conditions de régime d'écoulement laminaire et particulièrement en écoulement de Stokes. Dans ce régime de Stokes, les forces de viscosité sont prépondérantes par rapport aux vitesses d'écoulement du fluide dans le système ce qui nous permet d'atteindre des vitesses d'écoulement du fluide au voisinage des parois du microcanal quasi-nulles.

3.3. Mise en œuvre de la réaction enzymatique dans le microréacteur

3.3.1. Conditions expérimentales

Pour suivre la réaction enzymatique, un autre substrat synthétique a été choisi à la place de l'ONPG. Le choix s'est porté sur la resorufin- β -D-galactopyranoside (RBG) (Sigma Aldrich Chemical Co.), un substrat combinant un galactose et la resorufin (Figure 11), un produit fluorescent plus sensible à la détection que l'ONP et souvent employé pour la mesure de cinétique enzymatique en conditions microfluidiques comme dans les travaux de Seong (2008).

Le principe d'utilisation de ce substrat est le même que le l'ONPG : la molécule de substrat non fluorescente (RBG) sera clivée, en présence la β -galactosidase, pour libérer une molécule de galactose et une molécule de resorufin détectable par spectrofluorimétrie pour un couple de longueurs d'onde d'excitation/émission de 571/590nm.



Figure 11. Réaction de la resorufin-β-D-galactopyranoside avec la β-Galactosidase

Le substrat est injecté d'un côté du microdispositif via un pousse-seringue (New Era Syringe Pump) à un débit fixe de 10μ l.min⁻¹ et le produit de la réaction est récupéré à sa sortie. Le produit de réaction est collecté et analysé par spectrofluorométrie. Les valeurs d'intensité de fluorescence sont comparées à une gamme étalon d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en resorufin (Figure 12).



Figure 12. Gamme d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en resorufin

A partir des concentrations en resorufin obtenues, il sera ainsi possible de remonter aux vitesses de réaction effectives dans le microsystème (concentrations en produit récupérées/unité de temps).

L'étude complète de la réaction enzymatique dans le microréacteur se compose de plusieurs parties :

- Etude du comportement de la réaction (relargage, stabilité)
- Etude des paramètres cinétiques

- Compréhension des phénomènes au sein du microdispositif

3.3.2. Etude de la réaction enzymatique

Avant toutes expérimentations, le microsystème subit un lavage afin d'éliminer tout relargage de la β galactosidase durant la réaction. Pour cela, 1ml de solution tampon acétate de sodium 0,02M pH 4,5, sont injectés via le pousse-seringue à un débit de 100µl.min⁻¹. En sortie du microdispositif, la solution est collectée pour mesurer la quantité d'enzyme potentiellement relarguée. Etant donné que nous travaillons avec une quantité de β -galactosidase immobilisée très faible (~1µg), une détermination par spectrofluorométrie à 280nm a dû être réalisée, avec l'aide d'une gamme étalon d'intensité de fluorescence en fonction d'une concentration en β -galactosidase en nanogramme/litre (Figure 13). Les étapes de lavage sont répétées jusqu'à ne plus détecter de relargage de l'enzyme.



Figure 13. Gamme d'intensité de fluorescence (UIF) en fonction de la concentration en β galactosidase en solution



Figure 14. Quantité de β-galactosidase relarguée mesurée au cours des lavages du microdispositif. MC1, MC2 et MC3 correspondent aux trois microdispositifs utilisés pour cette étude.

La Figure 14 met en évidence la présence de β -galactosidase dans les eaux de lavage au premier lavage. Un dosage par spectrofluorimétrie a permis de quantifier ce relargage sur trois microsystèmes identiques (dimensions, quantité moyenne d'enzyme). En moyenne, 100ng de β -galactosidase ont été perdus, ce qui représente environ 10% de la quantité initialement présente (Figure 14). Cette étape de lavages montre la très bonne stabilité du microréacteur enzymatique avec seulement 10% de relargage ainsi qu'une absence d'enzyme après le second/troisième lavage du microdispositif.

L'étape de suivi de la stabilité du microsystème a ensuite été réalisée sur 5 séries de tests successifs. La réaction est menée avec une solution de RBG à 10μ M, injectée dans le microdispositif à un débit de 10μ l.min⁻¹. Pendant 10 minutes, un volume total de 100μ l de solution de substrat RGB est envoyé dans le microsystème puis le produit est collecté dans un Eppendorf pour être mesuré au spectrofluorimètre pour le calcul de la concentration en resorufin produite. Au total, 10 fractions de 100μ l sont collectées, afin d'évaluer l'évolution de la concentration en resorufin produite dans le microréacteur.



Figure 15. Mise en œuvre de la réaction en microsystème par injection de la solution de RGB par le pousse-seringue (gauche) et collecte de la resorufin dans un Eppendorf (droite)

Le graphique suivant (Figure 16) présente les résultats obtenus sur 5 séries de test effectués sur le même microréacteur. Entre chaque test d'activité, le microréacteur est rincé par injection de 100µl d'eau distillée à un débit de 10µl.min⁻¹, vidé par injection d'air et enfin une nouvelle solution de RBG est injectée.



Figure 16. Evolution de la vitesse initiale de réaction de la β-galactosidase, calculée pour chaque fraction collectée, pour 5 tests de réaction consécutifs

La Figure 16 montre que le microréacteur enzymatique conserve sa capacité d'hydrolyse de RGB, même après 5 utilisations, ce qui confirme l'efficacité de notre méthodologie d'immobilisation par le ppTMDSO et son adaptation réussie aux conditions microfluidiques. D'autre part, la réponse réactionnelle est progressive pour les 5 tests, avec des concentrations en produit obtenues croissantes dans les premiers prélèvements (exemple test 1: $0,22.10^{-5}\mu$ mol.min⁻¹ pour le premier prélèvement puis $1,75.10^{-5}\mu$ mol.min⁻¹ au 4^{ème} prélèvement). Comme observé dans l'étude en flux continu en conditions millifluidiques, ce temps de latence est très certainement une résultante de l'effet de diffusion des molécules de substrat et de produit à travers le ppTMDSO. En effet, les limitations diffusionnelles, créées par la couche limite et par le film, limitent l'accessibilité du substrat vers l'enzyme ainsi que la libération du produit expliquant les faibles valeurs lors des premiers prélèvements, phénomène retrouvé dans les travaux traitant de l'encapsulation de la papaïne dans une matrice (Moreno-Cortez, 2015, Koha & Pishko, 2005, Wu & Sheng 2005).

Ensuite, l'activité résiduelle observée diminue sur les 3 premiers tests (passage de 1,8.10⁻⁵µmol.min⁻¹ à 1,1.10⁻⁵µmol.min⁻¹) puis semble se stabiliser à une valeur de Vi constante (1,1.10⁻⁵µmol.min⁻¹). Cette diminution d'activité peut être due à deux phénomènes principaux au sein du microréacteur enzymatique: (i) la mobilité de la β -galactosidase au sein du polymère, pouvant entrainer une réorganisation moléculaire possible de l'enzyme au sein du réseau lors de la réalisation des essais successifs (Hanefeld .2009, Rodrigues,2013); (ii) le colmatage partiel du film de ppTMDSO par la RGB et/ou la resorufin, ce qui a pour conséquence de limiter voir d'empêcher la diffusion de ces molécules dans le film. En effet, il a été constaté une adsorption possible mais réversible en surface du ppTMDSO (§ 3.2.1.).

Ces résultats démontrent que nous avons conçu, avec succès, un microdispositif à β -galactosidase immobilisée robuste, avec une capacité de réutilisation clairement prouvée, et stable du point de vue du maintien de la fonction biologique révélé par l'obtention de valeurs d'activité enzymatique reproductibles.

Comme constaté précédemment (III.2.), l'immobilisation de l'enzyme par le ppTMDSO a mis en évidence une diminution de l'activité enzymatique après plusieurs répétitions d'utilisation soit due aux modifications de la stabilité de l'enzyme immobilisée soit au relargage de l'enzyme comme proposé dans les travaux de Cirillo traitant de l'immobilisation de la pepsine dans les polymères (2014).

A partir des concentrations en produit obtenues à l'état stationnaire, il a été possible de calculer la vitesse de réaction Vi, c'est-à-dire la quantité de resorufin produite par unité de temps, pour chaque essai mais également ce que nous appellerons le débit molaire de réaction Φ , qui traduit la vitesse de réaction en fonction de la surface active avec laquelle le substrat réagit.

$$Vi = \frac{[RBG](\mu M) * Vol \ collécté(L)}{temps \ de \ reaction(min)} = \frac{[RBG] * 100.10^{-6}}{10}$$
$$\phi = \frac{Vi \ (\mu mol. min^{-1})}{surface \ de \ reaction(m^2)} = \frac{Vi}{1.25.10^{-5}}$$

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4	Test 5	
[resorufin] (µM)	1,80	1,46	1,02	1,11	1,12	
Vi (µmol.min ⁻¹)	1,80.10-5	1,46.10-5	1,02.10-5	1,11.10-5	1,12.10 ⁻⁵	
Φ (µmol.min ⁻¹ m ⁻²)	1,44	1,29	0,84	0,88	0,89	
Tableau 1 Tableau des concentrations en reservéin obtenues neur 5 tests conségutifs des vitesses						

<u>Tableau 1. Tableau des concentrations en resorufin obtenues pour 5 tests consécutifs, des vitesses</u> initiales de réaction et des flux molaires

Entre le 1^{er} et le 5^{ème} test, l'activité enzymatique de la β -galactosidase dans le microdispositif a diminué de 37% jusqu'à se stabiliser à environ 1,1.10⁻⁵ µmol.min⁻¹. et environ 0,9 µmol.min⁻¹.m⁻².

L'obtention d'un état stationnaire de la concentration en resorufin témoigne de la stabilité du microréacteur fabriqué et de la stabilité de la β -galactosidase au sein du réseau de polymère de ppTMDSO. La présence de contraintes diffusionnelles, souvent inhérentes aux méthodes d'immobilisation au sein de matrice, ainsi que de phénomènes de réorganisation moléculaire de l'enzyme et de colmatage du film, rendent compte d'une « phase d'adaptation » du microréacteur enzymatique pendant la mise en œuvre de la réaction enzymatique avant l'obtention de la phase stationnaire.

3.3.3. Détermination des constantes catalytiques

Nous avons étudié les paramètres cinétiques de la β -galactosidase en se basant sur le protocole de Seong (2008). Pour cela, différentes concentrations en substrat RBG (5, 10, 20, 50 et 100 μ M) ont été injectées au sein du microdispositif à un débit fixe de 10 μ l.min⁻¹. Les concentrations en produit resorufin sont mesurées en sortie par spectrofluorométrie. Le graphique suivant représente les cinétiques d'apparition en produit pour les différentes concentrations testées.



Figure 18. Evolution des concentrations moyennes en resorufin obtenues dans les fractions collectées pour différentes concentrations initiales en RBG testées (5, 10, 20, 50, 100µM)

Les résultats montrent la présence d'une phase pré-stationnaire (entre les 1^{eres} et les 4^{eres} fractions) suivie d'une phase stationnaire de concentration en resorufin produite. Cette phase stationnaire semble plus tardive lorsque des concentrations en substrat élevées (50 et 100μ M) sont utilisées, avec l'apparition du plateau vers les dernières fractions collectées (fractions 6-7).

A partir des valeurs de concentrations obtenues à l'état stationnaire, nous avons tracé la représentation Michaelienne vi=f([RBG]₀) ainsi que la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk, en fonction des concentrations initiales en substrat [RBG]₀.





Figure 19. Représentation de Michaelis (haut) et de Lineweaver Burk (bas) des valeurs de vitesse initiale de réaction en fonction des concentrations initiales en RBG

La représentation de Michaelis (haut) montre que Vi augmente jusqu'à $52.10^{-6}\mu$ mol.min⁻¹ puis commence à s'infléchir pour une valeur de concentration supérieure à 50μ M utilisée pour tendre vers un plateau qui n'est pas observable dans les conditions de concentrations en RGB utilisées. Les concentrations testées nous permettent néanmoins de tracer la représentation de Lineweaver Burk (bas) pour calculer les valeurs de V_{max} et K_m effectifs. Le tableau suivant résume les valeurs des paramètres cinétiques de la β-galactosidase immobilisée, comparées avec celles de 10µg de β-galactosidase en solution testée avec les mêmes concentrations en RBG.

	K _m	V _{max}	V _{maxspé}	k _{cat}	k _{cat} /K _m
	(µM)	(10 ⁻³ µmol.min ⁻	(µmol.min ⁻¹ .mg ⁻²)	(s^{-1})	$(\mu M^{-1}.s^{-1})$
		1)			
Libre	453,1±130	51,7±11	5,2	9,0	0,022
Immobilisée	511,2±112	0,57±0,07	0,6	1,0	0,002

<u>Tableau 2. Principales constantes catalytiques obtenues pour la β -galactosidase libre et immobilisée</u> en microsystème

Il est important de rappeler que le calcul de ces paramètres se base sur le fait que l'on considère que toutes les enzymes immobilisées sont actives et participent à la réaction.

Concernant le K_m , nous obtenons des valeurs semblables entre l'enzyme libre et immobilisée, confirmées dans les travaux de Hadd (Hadd, 1997). Comme nous l'avons observé dans l'étude à l'échelle macrofluidique, la mise en œuvre de l'immobilisation par le ppTMDSO n'a pas d'influence significative sur le K_m .

Concernant le V_{max} , nous constatons un facteur d'environ 90 entre les conditions libre et immobilisée. Cette variation importante est causée principalement par la quantité de β -galactosidase immobilisée et par le phénomène de contraintes diffusionnelles. Dans le premier cas, le V_{max} est directement en rapport avec la quantité d'enzyme réagissant au cours de la réaction. En considérant que la totalité des molécules d'enzyme immobilisée participe à la réaction, seul 0,864µg de β -galactosidase immobilisée intervient contre les 10µg utilisés en condition libre. Le calcul du $V_{maxpé}$ permet de réduire la différence de 90 à 8,6. Il semblerait également que le passage à l'échelle microfluidique accroisse l'impact des phénomènes de limitations diffusionnelles. En effet, il faut rappeler qu'à cette échelle et ce débit, nous sommes en écoulement laminaire dans lequel les forces d'entrainement du liquide sont négligées par rapport aux forces de viscosité. Ainsi la vitesse de déplacement du fluide aux parois du microsystème est quasi nulle laissant un temps de déplacement des molécules plus long (diffusion dans la couche limite), également observé dans les travaux de Devasenathipathy & Santiago (Devasenathipathy & Santiago, 2001) ou encore dans ceux de Song (2003). Pour les autres constantes, nous observons le même niveau de différence entre les deux conditions (env. 9 fois plus important en condition libre qu'en immobilisée) témoignant de l'impact de la méthodologie d'immobilisation sur la réaction enzymatique.

Pour conclure, cette étude a montré l'adaptation réussie du protocole d'immobilisation de la β galactosidase par le ppTMDSO aux conditions microfluidiques pour l'obtention d'un microréacteur enzymatique. L'impact de l'immobilisation sur l'activité enzymatique a également été retrouvé, sans doute dû aux effets de contraintes de diffusion des molécules à travers le réseau du polymère.

3.4. Etude des phénomènes de diffusion et de réaction au sein du microréacteur

Cette partie est consacrée à l'étude des phénomènes se déroulant à l'intérieur du microréacteur lors de la réaction enzymatique. Ne disposant pas de moyens de mesure *in situ* ni de suivi en temps réel du déplacement des différents éléments (substrat, produit, enzyme) au sein du ppTMDSO, nous allons tenter d'apporter quelques éléments d'analyse plus poussés en se basant sur les résultats obtenus dans les études effectuées.

3.4.1. Simulation des phénomènes dans le système

Pour interpréter les phénomènes de diffusion et de réaction dans le microréacteur, il est important de considérer certaines conditions intrinsèques au système.

Ainsi, on considérera tout d'abord que nous avons toujours la même quantité de β -galactosidase active qui participe aux réactions catalytiques mises en œuvre dans le microréacteur. Ensuite, les concentrations en produit mesurées en sortie de canal, prises durant la phase stationnaire, constituent une moyenne globale de production dans l'ensemble du microsystème. N'ayant pas accès aux concentrations de produit à un instant t précis dans le microsystème, nous ne pouvons raisonner qu'en terme de moyenne globale de concentration stationnaire. Enfin, étant donné que nous n'avons pas accès à la concentration en produit dans le microenvironnement de l'enzyme, on considérera, pour les calculs, la concentration en produit mesurée en sortie.

Le schéma suivant représente le phénomène global de diffusion du substrat et de libération du produit dans la solution de réaction, pour le temps de séjour imposé par le débit à l'intérieur du microsystème.



Figure 20. Représentation schématique du phénomène de diffusion du substrat à travers le ppTMDSO et du relargage du produit dans la solution d'alimentation (S_0 : [*RBG*]₀, P_f : [*resorufin*]_{mesurée}]

Le substrat RGB diffuse à travers le ppTMDSO grâce au gradient de concentration en faveur de la diffusion vers l'intérieur du film et le produit resorufin diffuse vers l'extérieur du polymère selon un autre gradient de diffusion qui l'entraîne vers le *bulk*. A partir des concentrations expérimentales en produit obtenues, nous avons constaté qu'environ 10% de la concentration initiale en substrat étaient consommés (§3.3.2. Figure 17). La concentration initiale en RGB (S_o) est celle utilisée pour l'expérimentation de la réaction, P_o est la concentration initiale en produit de réaction, considérée comme nulle à t₀ et P_f la concentration en produit à la sortie du microsystème.

La solution de substrat est envoyée au sein du microsystème à un débit de 10μ l.min⁻¹, sur une surface de 1266μ m², pour un volume total de $0,237\mu$ l, donnant un temps de passage de 1,4 secondes.

Connaissant la quantité de produit formée pour un temps de réaction donné, nous obtenons la capacité réactionnelle de la β -galactosidase immobilisée au sein du microsystème en μ mol.min⁻¹. Les valeurs retenues pour le calcul des vitesses de réaction ont été prises au moment où la cinétique est à l'état stationnaire, c'est-à-dire au moment où la valeur de P_f est constante au cours des prélèvements (et par corrélation la vitesse de réaction de l'enzyme immobilisée). A partir des différentes valeurs de concentrations, les paramètres cinétiques effectifs ont été calculés et notamment le V_{max} (pmol.min⁻¹). Nous appellerons le flux molaire surfacique Φ (μ mol.s⁻¹.m⁻²) le nombre de mole de substrat ayant diffusé, transformé en produit et ressorti du polymère durant l'intervalle correspondant au temps de passage dans le réacteur et à la surface active du dispositif.

A partir des données obtenues, une modélisation sur COMSOL Multiphysics[©] 5.2 a été entreprise afin de comprendre les phénomènes physiques se produisant dans le microdispositif. Ne disposant par des

données propres au ppTMDSO, la modélisation a été réalisée sur un matériau apparenté à celui-ci : le PDMS.



Le design du système choisi pour la simulation est la suivante :

Figure 21. Modélisation du système sur COMSOL avec en abscisse la longueur du canal et en ordonnée les dimensions caractéristiques du système

Le système se compose d'un canal de 20µm de hauteur et longueur 3 mm dans lequel circule la solution de substrat, d'un film de polymère poreux de 1µm d'épaisseur, d'un volume contenant la β -galactosidase d'épaisseur 500 nm (volume fictif dans lequel le substrat et le produit circulent librement suivant la direction perpendiculaire à l'interface (Figure 20)) et d'une épaisseur de verre représentant le support d'immobilisation. Le fluide considéré est de l'eau dans laquelle on injecte le substrat qui va diffuser au travers du polymère, rencontrer et réagir avec l'enzyme. Le modèle calcule les phénomènes d'écoulement, le transport par diffusion et la cinétique. La quantité d'enzyme n'est pas considérée. La présence de l'enzyme est matérialisée par un terme de réaction en surface auquel est associé une constante de réaction k=8 s⁻¹, valeur typique de ce type de réaction, choisie itérativement pour obtenir une consommation voisine de 10% du substrat. Le modèle réactionnel utilisé est le modèle simple S + E \Box P. Les paramètres associés au transport par diffusion seront décrits dans la suite de ce chapitre.

Les paramètres imposés sont une vitesse d'écoulement initiale V=0,042m.s⁻¹ correspondant à la section A du réacteur expérimental. Une concentration en entrée de réacteur en RGB de 100 \Box M est choisie pour ce calcul. Ce dernier paramètre n'influence pas le calcul de l'écoulement, du fait de la faiblesse de la concentration. Le code résout alors l'équation de Navier-Stokes pour un fluide incompressible (eau),

non pesant du fait des faibles dimensions du système, en s'appuyant sur un solveur non linéaire. Nous ne détaillerons pas cette partie, mais renvoyons le lecteur à l'ouvrage de Padet (1990).

Une première appréciation des phénomènes d'écoulement au sein du microcanal est réalisée en représentant les champs de vitesse (Figure 22) obtenus.



Figure 22. Simulation et représentation 2D par Comsol des champs de vitesse d'écoulement du fluide à l'intérieur du microdispositif

Nous constatons que la vitesse décroît à l'approche des parois du canal validant l'ordre de grandeur de la valeur du nombre de Reynolds définissant l'écoulement laminaire au sein du microréacteur enzymatique. A partir de cette simulation, nous pouvons estimer le gradient de vitesse depuis le centre du canal. À partir de l'échelle des champs de vitesse, on peut considérer que le fluide demeure à 80% et 50% de sa vitesse maximale à des distances d'environ 5 et 2 μ m de la surface des parois, respectivement. La simulation impose bien une vitesse d'écoulement nulle à l'intérieur du polymère et du volume d'enzyme, montrant que le déplacement du substrat et du produit se fait bien par diffusion des molécules dans cette zone. Un calcul du nombre de Péclet, défini au paragraphe § II.1.1.3 nous renseignerait sur le rapport des vitesses de convection et de diffusion des molécules. Nous devons donc procéder au calcul du coefficient associé à cette dernière.

Une modélisation du comportement de diffusion des molécules de substrat et du produit a été réalisée.



Figure 23. Simulation de la distribution du substrat à l'équilibre dans le microcanal (l'écoulement du fluide de droite vers la gauche)



Figure 24. Simulation de la distribution du produit à l'équilibre dans le microcanal (l'écoulement du fluide de droite vers la gauche)

Dans les deux cas, nous constatons une répartition discontinue des molécules dans la couche limite, le polymère et le volume d'enzyme.

Concernant le substrat, pendant l'écoulement du fluide, les molécules diffusent à travers la couche limite en premier dès l'entrée du canal faisant apparaître une concentration maximale dès les premiers instants. Ensuite, cette concentration décroît proportionnellement avec la circulation du fluide. Notons cependant que cette variation reste modérée (~10% de la concentration initiale), compte tenu de nos conditions de réaction. Cette variation de concentration peut s'expliquer par le gradient de concentration en substrat qui diminue au fur et à mesure de l'avancement du liquide (progression très lente à cause de l'écoulement). En entrée du canal, la quantité de substrat (S₀) est très supérieure à celle du produit puis, le substrat tend à se « raréfier » aux abords de la sortie du microcanal car il aura diffusé et réagi avec l'enzyme pour donner le produit.

Dans le cas du produit, nous constatons le phénomène inverse avec une absence de produit à l'entrée et une accumulation, au niveau du volume d'enzyme, croissante en fonction de l'avancement dans le microcanal traduisant la raréfaction du substrat et réduction progressive du gradient de produit au sein du polymère du fait de l'accumulation, elle-même progressive, de celui-ci au voisinage de la paroi liée à la faible diffusion vers l'intérieur du canal.

Ces variations de concentrations témoignent du gradient de concentrations des espèces créé d'une part par la pseudo-couche limite générée par l'écoulement et, dans une moindre mesure d'autre part par la couche de polymère.

La réaction de conversion du substrat en produit par l'enzyme intervient également dans le phénomène de gradient via la diminution de la concentration en substrat au profit de l'accroissement de la quantité de produit. Cette question n'est pas discutée dans ce travail.

3.4.2. Calculs des paramètres du système

Afin de rendre compte du transport du substrat et de celui du produit, nous allons précéder à l'évaluation de la contribution de la diffusion, via le calcul de D, le coefficient de diffusion. Le schéma ci-dessous (Figure 25) montre la structure simplifiée mettant en évidence la pseudo-couche limite d'épaisseur e₁, dans laquelle la vitesse du fluide est inférieure à 50% de sa vitesse maximale, et le film de ppTMDSO recouvrant l'enzyme, d'épaisseur e₂. On ne peut en effet pas parler de couche limite au sens de sa définition en milieu confiné de si petite taille. Les molécules de RGB (substrat) doivent donc avant tout parcourir successivement les épaisseurs e₁ et e₂, avant d'atteindre l'enzyme.

Le produit, la resorufin, doit, quant à elle, parcourir le chemin inverse pour rejoindre le flux et quitter le réacteur.



Figure 25. Schématisation de la diffusion des molécules de substrat et produit à travers les différentes couches de diffusion

3.4.2.1. Diffusion des molécules dans la pseudo-couche limite

A partir des informations fournies par la modélisation, il est possible d'apprécier le coefficient de diffusion du substrat et du produit, et d'estimer le temps correspondant nécessaire aux molécules pour traverser cette première couche e₂.

La relation de Stockes-Einstein va nous permettre de calculer premièrement le coefficient de diffusion des molécules.

$$D = \frac{kT}{6\pi R_h \mu}$$

Avec :

- D : coefficient de diffusion de la molécule (substrat ou produit) dans l'eau (m².s⁻¹)
- k : Constante de Boltzmann $(1.38.10^{-23} \text{m}^2.\text{kg}.\text{K}^{-1}.\text{s}^{-2})$
- T : Température (K) : (293,16 K)
- R_h: le rayon hydrodynamique de la molécule (m)
- μ : viscosité dynamique du fluide (Pa.s ou (m⁻¹.kg.s⁻²).s)

Les données extraites de la littérature [27-28] permettent d'estimer le $D_{\beta\text{-galactosidase}}= 2,7.10^{-7} \text{cm}^2.\text{s}^{-1}$. Grace à cette valeur, nous pouvons remonter au rayon hydraulique et au diamètre de l'enzyme via la relation Stockes-Einstein. Ainsi, pour la β -galactosidase (assimilée à une molécule sphérique), nous

obtenons un rayon d'environ 8nm et donc un diamètre de 16nm. Cette valeur nous permet donc de définir une limite supérieure des pores du polymère retenant l'enzyme. Le ppTMDSO possède donc des pores de taille inférieure à 16nm. Le logiciel ChemSketch nous permet de redessiner la molécule de substrat RGB et de produit resorufin dans une conformation active et de déterminer leur volume molaire.

Pour la resorufin, nous avons obtenu un volume molaire de 1,43.10⁻⁴m³.mol⁻¹ et pour la RBG 2,15.10⁻⁴m³.mol⁻¹.

Volume molecule
$$(m^3) = \frac{(volume molaire (m^3.mol^{-1}))}{nombre d'Avogadro (mol^{-1})}$$

Le calcul conduit aux valeurs :

 $Vol_{resorutin} = 0,238.10^{-27} m^3 = 0,238 nm^3 \text{ et } Vol_{RBG} = 0,357.10^{-27} m^3 = 0,357 nm^3.$

En considérant la forme des molécules comme sphérique, nous pouvons déterminer leurs rayons r via la formule :

$$r = \sqrt[3]{\frac{(3Vol)}{4\pi}}$$

Les valeurs correspondantes sont $r_{esorufin} = 0,384$ nm et $r_{RBG} = 0,440$ nm.

A partir de ces valeurs, nous pouvons calculer le coefficient de diffusion de chaque molécule dans l'eau via la relation de Stockes-Einstein.

Nous obtenons $D_{resortin} = 5,6.10^{-10} \text{ m}^2 \text{.s}^{-1}$ et $D_{RBG} = 4,9.10^{-10} \text{m}^2 \text{.s}^{-1}$.

Ces valeurs correspondent aux ordres de grandeurs observés dans la littérature, $D_{resorufin} = 4,8.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ ¹ et $D_{RBG} = 4,3.10^{-10} \text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et témoignent que les deux molécules du système ont des coefficients de diffusion très similaires comme ceux calculés dans l'article de Schilling (2002). Une valeur de $5.10^{-10} \text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour les deux molécules constitue donc une bonne approximation. Compte tenu de ces valeurs de coefficient de diffusion et du profil de vitesse calculé, la recherche de la condition pour laquelle le nombre de Péclet devient voisin de l'unité conduit à une distance à la surface de l'ordre de 500 nm pour une vitesse d'écoulement locale de 0,001 m.s⁻¹. On voit donc que la convection est largement dominante dans le réacteur.

Il serait donc nécessaire de réduire la vitesse significativement (un facteur 10) pour favoriser la diffusion entre les parois et le fluide. Celle-ci devient dominante dans les derniers 100 nm voisins de la surface

du polymère. Ces coefficients de diffusion permettent de déterminer le temps de diffusion τ des molécules de resorufin et RBG sur une distance de 1 \Box m séparant la couche mince de ppTMDSO d'un point où la vitesse d'écoulement est égale 50% de la vitesse maximale, par la relation :

$$\frac{1}{\tau}(s^{-1}) = \frac{D(m^2 \cdot s^{-1})}{e^2(m^2)}$$

Avec :

- τ : temps de diffusion (s)
- D : le coefficient de diffusion de la molécule (m².s⁻¹)
- e_1 : la distance parcourue (m) (1 μ m)

Ainsi, nous obtenons : $\tau_{resorufin} = \tau_{RBG} = 2 ms$

Les molécules de RBG et de resorufin mettent environ 2ms pour traverser la pseudo-couche limite d'eau créée par les conditions de l'écoulement dans le microcanal dans l'hypothèse d'une diffusion pure. Parallèlement, l'élément de fluide en ce point aura parcouru la même distance en 1ms dans la direction du flux de l'écoulement.

Par ailleurs, les calculs du rayon de la β -galactosidase, de RGB et de la resorufin ont permis de mettre en évidence un intervalle de taille de pores permettant le passage des molécules de substrat et de produit et empêchant le relargage de l'enzyme. Nous pouvons ainsi considérer que le ppTMDSO possède une taille de pore supérieure à 0,8-1nm mais inférieure à 16nm. D'autre part, en plus d'avoir des tailles très voisines, le substrat et le produit diffusent quasiment à la même vitesse, à l'intérieur de la pseudo-couche limite.

3.4.2.2. Diffusion des molécules dans la couche de ppTMDSO

Cette partie va tenter d'expliquer le comportement de diffusion des molécules au sein du ppTMDSO grâce aux résultats obtenus lors des expérimentations.



Figure 25. Représentation du comportement de l'écoulement au sein du microcanal

Le schéma ci-dessus reflète le comportement d'écoulement du fluide au sein du microcanal, dans les conditions expérimentales d'écoulement. Pour un écoulement laminaire dans le microcanal, nous obtenons un profil de type parabolique du front de progression du liquide. La vitesse est maximale au centre du canal et decroit à l'approche des parois sur une distance $l_{\rm f}$.

La répartition des molécules de substrat se fait selon le modèle suivant rendant compte de la conservation de la masse de substrat (sa concentration) dans le champ de vitesse du fluide au travers de la dérivée

totale par rapport au temps de [S] $\left(\frac{D[S]}{Dt}\right)$:

$$\frac{D[S]}{Dt} = \frac{\partial[S]}{\partial t} + \vec{\nabla}. ([S], \vec{v})$$

avec $[S]. \vec{v} = -Ds. \vec{V}[S] + \vec{v}. [S]. Ds$ est le coefficient de diffusion du substrat.

La réécriture de cette équation conduit à :

$$\frac{D[S]}{Dt} = \frac{\partial[S]}{\partial t} - Ds.\frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} + v_y.\frac{\partial[S]}{\partial y}$$

A l'équilibre de réaction du système et dans les zones où la vitesse v_y devient faible (à proximité de la paroi), les vitesses de diffusion et de réaction dans le système sont égales, donc :

$$\phi = -Ds_{eau} \cdot \frac{\partial[S]}{\partial x} = -Ds_{ppTMDSO} \cdot \frac{\partial[S]}{\partial x} = \phi_m \cdot \frac{[S]}{Km + [S]}$$

Avec, au niveau de la paroi inférieure du canal (coté polymère) :

Les termes $-Ds_{eau} \cdot \frac{\partial[S]}{\partial x}$ et $-Ds_{ppTMDSO} \cdot \frac{\partial[S]}{\partial x}$ correspondent respectivement au flux de diffusion venant du volume du canal pour $x = l_f$ (apport externe) et au flux de diffusion dans le polymère ppTMDSO pour $x = l_f + l_p$. Le troisième terme $\phi_m \cdot \frac{[S]}{Km + [S]}$ est lui associé à la vitesse de réaction et est homogène à un flux.

Dans l'hypothèse linéaire, l'équation précédente devient :

$$+\frac{Ds_{eau}}{e_1} \cdot \Delta[S]_2 = +\frac{Ds_{ppTMDSO}}{e_2} \cdot \Delta[S]_1 = \phi_m \cdot \frac{[S]}{Km + [S]}$$

Pour h₁, le coefficient de diffusion du substrat dans le ppTMDSO

$$h_1 = \frac{Ds_{ppTMDSO}}{e_2} = \frac{[m]^2 * [s]^{-1}}{[m]} = [m] \cdot [s]^{-1}$$

$$\frac{Ds_{ppTMDSO}}{e_2} \cdot \Delta[S]_1 = h\Delta[S]_1 = \phi_m \cdot \frac{[S]}{Km + [S]}$$

A l'équilibre du système, le flux de diffusion est égal à la vitesse de réaction effective, d'où :

$$\phi = h(S_0 - S) = \phi_m \cdot \frac{[S]}{Km + [S]} \tag{1}$$

Avec :

- Φ : flux de matière surfacique (mol.s⁻¹.m⁻²)
- S_0 : concentration en substrat initiale (mol.m⁻³)
- S : concentration en substrat au niveau de l'interface ppTMDSO/enzyme (mol.m⁻³)
- Φ_m : flux de matière surfacique maximale (mol.s⁻¹.m⁻²) estimé expérimentalement
- K_m : constante de Michaelis déterminée expérimentalement
- h: coefficient de transport (m.s⁻¹)

Sur la base du phénomène de diffusion-réaction et d'une modélisation par COMSOL, il a été possible de réaliser une prédiction de la concentration en produit obtenue en fonction de la concentration en substrat utilisée pour la réaction. Les paramètres nécessaires à ces calculs sont la concentration initiale en substrat, les coefficients de diffusion du substrat et produit dans l'eau (calculés antérieurement) et

dans le film polymère considéré comme une membrane. Ces valeurs seront évaluées et montrées comme égales à $D_{resorifine} \sim D_{RBG} \sim 5.10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ dans le paragraphe suivant. Rappelons que le coefficient de réaction k d'ordre un a été pris, pour rendre compte d'une consommation de l'ordre de 10% du substrat, égal à 8 s⁻¹.

Les résultats de calcul, s'appuyant sur ces hypothèses, peuvent être donnés à une constante près et comparés aux résultats expérimentaux. Pour cela, les valeurs ont été normalisées à $1 \square M$ pour la concentration initiale en RBG de 20 $\square M$. Notons que le modèle fournit une valeur de $4 \square M$ pour cette condition



Figure 26. Concentration en resorufin obtenue expérimentalement (orange) et simulée par modélisation COMSOL (bleu) en fonction de la concentration initiale en RBG

La comparaison des valeurs expérimentales obtenues et simulées par modélisation révèle une bonne correspondance de l'allure des courbes pour les faibles concentrations en RBG initiales et marque une proportionnalité constante pour la courbe calculée. Cependant, nous constatons une déviation à partir de 50μ M utilisée et qui s'accentue à 100μ M. Il semblerait donc que les expériences aux concentrations importantes en substrat révèlent un phénomène de diminution de la production en resorufin.

A partir de ces valeurs expérimentales et simulées de concentration en substrat et en produit obtenus, il a été possible de retrouver les valeurs des vitesses initiales de réaction et d'en déduire les valeurs de flux de matières surfaciques Φ . La comparaison est montrée ci-dessous sous la forme d'une représentation en Eadie-Hofstee de Φ en fonction de $\Phi/[RBG]_0$.


Figure 27. Représentation d'Eadie-Hofstee des Φ expérimentaux (bleu) et modélisée (vert) en fonction $du \Phi / [RBG]$

Dans la représentation d'Eadie-Hofstee, on observe également la déviation entre les points expérimentaux (ajout de la valeur à 200 μ M testée) (courbe bleue de la Figure 27). On constate une forte déviation de la courbe bleue des points expérimentaux par rapport à la linéarité dans le domaine étudiée, ce qui confirme que nous sommes loin d'une situation classique du cas de l'enzyme libre qui selon la théorie conduit à un droite décroissante. Il est également remarquable de constater la faible valeur obtenue pour le point correspondant à la plus faible du rapport $\Phi/[RBG]_0$ (associée à $[RBG]_0 = 200\mu$ M).

La courbe verte de la Figure 27 s'obtient en se basant sur la relation :

$$\phi = \phi_m \cdot \frac{[S]_0}{Km + [S]_0}$$

Et en représentant la courbe $\phi = f\left(\frac{\phi}{[S]_0}\right)$ en prenant des valeurs de $[S]_0$ permettant de décrire le cas théorique et expérimental [RBG]_0 =200µM. Il faut avant tout résoudre le problème de l'indétermination concernant ϕ_m et Km, même si l'exploitation classique nous a fourni des valeurs apparentes à partir de celles indiquées dans le tableau 2 du §3.3.3. Les valeurs apparentes sont donc Km= 511µM=0,511 mol/m⁻³ et $\phi_m = 0,75\mu$ mol.s⁻¹.m⁻² = 7,50.10⁻⁷mol.s⁻¹.m⁻². La figure 27 montre que le schéma résultant de cette courbe ne décrit pas celui montré par l'expérience et suggère une discussion supplémentaire permettant notamment de voir l'influence éventuelle du paramètre h caractérisant la membrane en ppTMDSO.

En se basant sur l'équation (1) de diffusion-réaction, nous pouvons estimer différentes valeurs de h correspondant, tout d'abord, le mieux au modèle « idéal » de réaction. Il faut pour cela la transformer. On obtient dans un premier temps:

$$\phi = h(S_0 - S) \quad \Rightarrow S = S_0 - \left(\frac{\phi}{h}\right)$$
 (2)

On remplace S dans la seconde équation (1) pour faire apparaître la variable ϕ et le paramètre h:

$$\phi = \phi_m \cdot \frac{\left(S_0 - \left(\frac{\phi}{h}\right)\right)}{Km + S_0 - \left(\frac{\phi}{h}\right)} = \frac{\phi_m \cdot S_0 \left(1 - \left(\frac{\phi}{S_0 \cdot h}\right)\right)}{Km \left(1 + \frac{S_0}{Km} - \left(\frac{\phi}{h \cdot Km}\right)\right)} = \frac{\phi_m}{Km} * \frac{S_0 \left(1 - \left(\frac{\phi}{S_0 \cdot h}\right)\right)}{1 + \frac{S_0}{Km} \cdot \left(1 - \frac{\phi}{S_0 \cdot h}\right)}$$
$$\phi = \frac{\phi_m}{Km} * \frac{S_0 \left(1 - \left(\frac{1}{h} \cdot \frac{\phi}{S_0}\right)\right)}{1 + \frac{S_0}{Km} \left(1 - \frac{1}{h} \cdot \frac{\phi}{S_0}\right)} \tag{3}$$

Le facteur $\frac{\phi_m}{Km}$ n'est pas celui déduit de l'exploitation des courbes cinétiques. Nous pouvons également réécrire (3) avec l'hypothèse de simplification $Km \gg S_0$ et hS₀ >> ϕ qui renvoit au cas limite des plus fortes concentrations, sous la forme :

$$\phi = \frac{\phi_m}{\kappa_m} * S_0 \left(1 - \left(\frac{1}{h}, \frac{\phi}{S_0}\right) \right)$$
(4)

Qui devient :

$$\frac{1}{\phi} = \left(\frac{Km}{\phi_m} + \frac{1}{h}\right) \cdot \frac{1}{S_0} \tag{5}$$

Nous obtenons une droite de type y = ax avec a (pente) $= \frac{Km}{\phi_m} + \frac{1}{h}$.

La valeur de la pente vaut a=6,81.10⁵ s.m⁻¹. En réécrivant (3) après substitution de $\frac{\phi_m}{\kappa_m}$ par l'expression :

$$\frac{Km}{\phi_m} = \left(a - \frac{1}{h}\right)^{-1} \tag{6}$$

On obtient la forme finale de (3) :

$$\phi = \frac{S_0}{a - \frac{1}{h}} \frac{1 - \left(\frac{1}{h} \frac{\phi}{S_0}\right)}{1 + \frac{S_0}{Km} \left(1 - \frac{1}{h} \frac{\phi}{S_0}\right)}$$
(7)

Un calcul auto cohérent à partir de (7) permet d'extraire les valeurs de $\Box \Box$ et permet la comparaison avec celles fournies par l'expérience, en considérant les rapports expérimentaux Φ/S_{O} , en affinant la

valeur de *h*. Différents ordres de grandeurs ont ainsi été calculés et représentés dans le graphique cidessous (Figure 28).



Figure 28. Simulation des Φ en fonction de $\Phi/[RBG]$ pour différentes valeurs de coefficient de <u>transport h</u>

Pour obtenir ces modélisations, nous avons utilisé différents ordres de grandeur de coefficient de transport $(1.10^{-5} \text{m.s}^{-1} \text{ jusqu'à } 1.10^{-4} \text{m.s}^{-1})$ et retenu la meilleure valeur se superposant le mieux aux prédictions du modèle concernant les valeurs de Φ . On remarque que la plupart des valeurs utilisées se recoupent bien et approchent assez fidèlement de la tendance du modèle dans la région des fortes valeurs de Φ/S_O (points bleus).

En affinant la valeur de h, on constate que celle qui se rapproche le plus du modèle équivaut à h= 4,3.10⁻⁵ m.s⁻¹ comme coefficient de transport au sein du ppTMDSO pour reproduire la courbe des plus faibles valeurs (points verts). Afin de tenter d'expliquer la différente conséquente entre la courbe verte et les points expérimentaux correspondants, nous avons procédé à un affinement supplémentaire en considérant une variation de de la valeur de h en fonction de la variable Φ/S_0 La recherche d'un accord avec les données expérimentales obtenues nous a permis de déterminer des valeurs de coefficient de transport *h* en fonction de Φ/S_0 (Figure 29).

Partie III. Résultats et Discussions



Figure 29. Evolution du coefficient de transport h expérimental en fonction de $\Phi/[RBG]_0$

La représentation Figure 29 met en évidence qu'expérimentalement, le coefficient de transport h semble affecté par la valeur de Φ/S_0 et plus particulièrement par la concentration initiale utilisée en substrat RBG. En effet, on remarque que pour les faibles concentrations en substrat (donc les valeurs importantes de Φ/S_0), les valeurs de h sont stables et voisines de 4,3.10⁻⁵ m.s⁻¹. Lorsque la concentration en substrat testée augmente, la valeur de h diminue de manière importante (passage de 4,3.10⁻⁵ à 5.10⁻⁸m.s⁻¹). Cette chute brutale du coefficient de transport témoigne d'une limitation diffusionnelle évolutive des molécules à travers le polymère. L'hypothèse la plus vraisemblable à ce phénomène pourrait être celle d'un colmatage du polymère aux fortes concentrations en substrat testées avec un piégeage des molécules limitant la circulation.

L'effet du lavage du microréacteur et la reprise en concentration plus faible en substrat (10-20 μ M) n'a pas permis de retrouver les valeurs de vitesses initiales suggérant un colmatage irréversible du polymère après un essai en fortes concentrations en substrat. Ainsi, dans nos conditions de conception du microréacteur, il est préférable de rester en concentration faible en substrat (inférieure à 50 μ M).

Pour approcher au mieux la vitesse de diffusion des molécules au sein du polymère, nous avons utilisé la valeur du coefficient de transport h en faible concentration en substrat soit $h=4,3.10^{-5}$ m.s⁻¹ :

$$h_1 = \frac{Ds_{ppTMDSO}}{e_1}$$

$$Ds_{ppTMDSO} = h_1 * e_1 = 4,3.10^{-5} * 1.10^{-6} = 4,3.10^{-11} m^2. s^{-1}$$

Puis, on peut calculer le temps de diffusion à travers le ppTMDSO :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{Ds_{ppTMDSO}}{e_1^2} = \frac{4,3.10^{-11}}{(1.10^{-6})^2} = 43 \ s^{-1}$$
$$\tau = \frac{1}{43} = 23ms$$

Ainsi, une molécule de resorufin (ou de RBG) met environ 23ms pour traverser la couche de 1µm de ppTMDSO, temps long devant celui associé à la diffusion dans l'eau (2ms), estimé antérieurement. Nous voyons donc que dans nos conditions, ce sera, sans surprise, la membrane de polymère que sera la plus influente dans la diffusion des substrats et produits.

Conclusion

Pour résumer les calculs de transport-cinétique effectués dans cette partie, nous avons pu déterminer, à partir des données obtenues expérimentalement à l'état stationnaire, les valeurs de coefficient de diffusion dans le ppTMDSO ainsi que le temps nécessaire pour diffuser dans le polymère. Par comparaison avec les temps de diffusion des molécules dans une épaisseur d'eau d'épaisseur 1 m, voisine de la paroi (~2ms) et dans le film de même épaisseur du polymère (~23ms) confirmant une diffusion plus rapide dans l'eau. En revanche, Ce calcul et la modélisation par COMSOL Multiphysics[®] montrent clairement que les molécules diffusent avec des temps plus longs dans le volume d'eau lorsque l'on augmente la distance à la paroi, l'écoulement devenant rapidement par ailleurs très dominant par rapport à la diffusion. Enfin, nous avons pu montrer par le modèle qu'un processus de colmatage est probablement à l'origine de la perte d'efficacité du microsystème lorsque lors de son utilisation à fortes concentrations de substrat. Ces constatations confirment les hypothèses proposées tout au long de l'explication des résultats obtenus à savoir l'implication de contraintes diffusionnelles lors des expériences de réaction enzymatique. Ces contraintes sont au niveau du polymère mais également non négligeable au niveau de la couche pseudo-limite résultant de l'écoulement.

Chapitre 4. Conception d'un BioMEMS à β-galactosidase immobilisée par le ppTMDSO

Après la validation du procédé d'immobilisation par plasma froid et sa mise en œuvre dans un microcanal en PDMS, ce dernier chapitre s'intéressera à la conception de microcanaux en ppTMDSO par un procédé de couche sacrificielle. En premier lieu, ce chapitre traitera de la mise en place du protocole nécessaire à l'obtention de ces microcanaux, puis une perspective d'inclusion de la β -galactosidase dans le protocole de conception sera envisagée afin d'obtenir un microcanal à enzyme immobilisée.

4.1. Concept

L'immobilisation de la β-galactosidase par le ppTMDSO a permis d'obtenir des surfaces biofonctionnelles. Une stabilité de l'activité enzymatique sur plusieurs séquences de tests a été démontrée, que ce soit en flux continu ou statique. Cependant, le véritable challenge dans la conception d'un BioMEMS par la méthode des plasmas froids réside dans une conception totale et intégrée d'un microréacteur enzymatique en polymère déposé par plasma. La conception de telle structure a déjà été montrée par le passé avec l'obtention de structure (Supiot, 2011, Mille, 2008) et particulièrement de microcanaux conçus en TMDSO polymérisé en décharge plasma dans les travaux d'Abbas (Abbas, 2009b) et de Bocquet (2004). L'originalité apportée à cette méthode de conception de microstructures, en plus du changement de conditions de dépôt plasma (polymérisation en post décharge), se place dans l'intégration de l'enzyme au processus de fabrication, qui permettra d'apporter une fonction définie au microsystème.

Pour parvenir à l'obtention du microréacteur enzymatique, deux études ont été menées :

- L'intégration de la β-galactosidase au *design* du microréacteur
- La conception de microcanaux en ppTMDSO à enzyme immobilisée

4.2. Design de microstructures en ppTMDSO

Pour la conception de microstructure en ppTMDSO déposé en post-décharge plasma, nous avons décidé de se baser sur le *design* simple d'un microcanal. Le schéma ci-dessous décrit le *design* adopté pour ce microcanal (Figure 1).



Figure 1. Design final désiré d'un microcanal à enzyme immobilisée en ppTMDSO

Celui-ci se compose de deux réservoirs connectés entre eux par un microcanal de dimensions variables. Plusieurs dimensions du microcanal central (longueur et largeur) ont été étudiées (2, 3, 5 et 10mm de longueur, et 100, 250 et 500µm de largeur).

Afin de réaliser ces microstructures, nous nous sommes basés sur la méthode brevetée (EP 2401224 A1) décrite par Peeni (2006) et reprise par Abbas (Abbas, 2009b) dans laquelle la structure du microcanal est réalisée sur un wafer de silicium, par l'utilisation d'une résine sacrificielle photosensible, insolée puis révélée par un développeur (méthode décrite lors de la confection du moule pour le PDMS (Chapitre 3.). Pour la bonne tenue des microcanaux finaux, les résines choisies furent de l'AZ4562 ou de l'AZ9200, résines dites « positives » car les parties non insolées de la résine ne sont pas éliminées lors de la révélation. Le schéma ci-dessous résume les principales étapes de conception de ces microcanaux par la méthode de la « couche sacrificielle » (Figure 2).



Figure 2. Etapes de conception de microcanaux en ppTMDSO par la méthode de la « couche sacrificielle »

Les conditions du dépôt de ppTMDSO par plasma furent les mêmes que ceux décrits dans le Chapitre 3. avec une différence dans l'épaisseur déposée. Précédemment, seul 1µm de ppTMDSO fut utilisé alors que pour la conception de microcanaux sur résine, une épaisseur d'environ 20µm est préférée, pour obtenir une structure suffisamment résistante.

4.3. Intégration de la β-galactosidase au design du microcanal

Après avoir conçu les microcanaux en ppTMDSO, l'étape suivante dans la méthodologie de réalisation du BioMEMS est l'intégration de l'enzyme (β-galactosidase).

Pour cela, nous avons combiné les méthodologies d'immobilisation de la β -galactosidase par dépôtrecouvrement et de conception des microcanaux en ppTMDSO développées dans le paragraphe précédent, pour réaliser l'intégration de la β -galactosidase au processus de conception du microréacteur. Le protocole mis en place est décrit dans le schéma ci-dessous (Figure 3).



Figure 3. Etapes de conception de microcanaux en ppTMDSO à enzymes immobilisées

Sur les microcanaux en résine, une première couche de ppTMDSO d'environ 1 μ m d'épaisseur est déposée servant de couche de soutien de l'enzyme. En effet, dans la méthodologie d'immobilisation précédemment décrite, la β -galactosidase était emprisonnée entre le silicium (ou le verre) et une couche de ppTMDSO ce qui a eu pour conséquence une absence de relargage de l'enzyme hors du réseau de polymère. Cependant, dans la configuration actuelle du microcanal, la β -galactosidase ne peut être déposée directement sur la résine car celle-ci sera éliminée dans l'étape de libération du canal. Ainsi, cette première couche, appelée « couche de soutien », permettra de garder l'enzyme emprisonnée au sein du polymère même après la libération de la résine.

Ensuite, le dépôt de l'enzyme doit s'effectuer de manière très précise et localisée au niveau du microcanal. Précédemment, nous utilisions un dépôt « classique » de 2µL réalisé à la micropipette d'une solution enzymatique, engendrant une répartition de l'enzyme sur toute la surface du substrat en silicium. Lors de la conception des canaux en PDMS, la localisation précise des molécules d'enzyme ne nous semblait pas indispensable à régler dans un premier temps.

En effet, nous nous sommes surtout attachés à valider la mise en œuvre de l'immobilisation par le ppTMDSO à l'échelle microfluidique.

Dans la voie d'optimisation du dépôt de la β -galactosidase, et particulièrement dans l'amélioration de la localisation et de la quantité d'enzyme déposée, une méthodologie d'impression de type « jet d'encre » nous a été proposée par l'équipe BioMEMS de l'IEMN. Celle-ci consistait, après optimisation des paramètres, en un dépôt de microspots d'enzyme sur une surface (Figure 4). Les avantages de cette technique étaient d'obtenir une localisation très précise des spots de β -galactosidase, une dimension contrôlée de quelques micromètres de diamètre mais également une maitrise de la quantité (quelque picolitre). Ainsi, avec cette technique, nous minimisons les pertes de β -galactosidase causées lors du dépôt grossier à la micropipette et de plus, nous améliorons considérablement la précision de répartition de l'enzyme, ce qui devient un paramètre crucial à ces échelles de manipulation.

Par manque de temps, cette méthodologie n'a pu être appliquée à la conception du microréacteur en PDMS (Chapitre 3) mais se place tout à fait dans une perspective d'optimisation de celui-ci.

Une optimisation de la formulation de la solution de β -galactosidase et de l'épaisseur de ppTMDSO a permis de déterminer des conditions adéquates pour un dépôt sur le polymère. Ainsi, une concentration finale en enzyme de 30mg.ml⁻¹ dans le tampon acétate de sodium 0,02M a été utilisée. Les dépôts ont ensuite consisté en des spots de 30pL effectués sur une couche de 1µm d'épaisseur de ppTMDSO.



Figure 4. Spots de β-galactosidase déposés par impression jet d'encre sur du silicium (gauche x20) et du ppTMDSO (droite x100) visualisés sous microscope optique

Les images de la Figure 4 montrent les dépôts réalisés par impression jet d'encre de la solution de β -galactosidase. Elles révèlent l'obtention de spots d'un diamètre de 60 μ m pour 30pL de solution déposés.

Des images MEB ont été effectuées sur un des dépôts de β -galactosidase réalisés sur des microcanaux en résine (par-dessus lesquels avait été déposé environ 1 μ m de la couche de soutien en ppTMDSO).



<u>Figure 5. Cliché MEB d'un dépôt de β-galactosidase réalisé par impression « jet d'encre » sur une</u> <u>couche de résine sacrificielle</u>

Les spots de β -galactosidase déposés adoptent une forme de dôme. Cette forme est causée par l'hydrophobie modérée de la couche de soutien de ppTMDSO recouvrant la résine (86° mesuré pour l'angle de contact au goniomètre).



Figure 6. Images prises par microscopie optique de spots de β -galactosidase déposé par impression jet d'encre sur la résine + couche de soutien en ppTMDSO

Les images de la Figure 6 montrent l'aspect final des spots de β -galactosidase déposés sur les canaux en résine sacrificielle.

Afin de maximiser l'adhérence de la future couche de ppTMDSO devant recouvrir le canal, un espacement intergoutte de $100\mu m$ (entre les centres de deux gouttes successives) a été choisi. Une couche de $30\mu m$ de ppTMDSO a ensuite été déposée, servant de « capot supérieur » au canal.



Figure 7. Clichés MEB d'une coupe transversale (gauche) d'un microcanal en ppTMDSO + résine et du dessus de ce même microcanal (droite)

Sur les clichés MEB réalisé sur un microcanal non libéré (Figure 7), nous pouvons distinguer la structure globale du futur microcanal ainsi que l'apparition de déformations en surface du canal dues aux spots de β -galactosidase déposés (droite). La résine de cette série de microcanaux a montré des flancs obliques inversés ou « profil en casquette » à cause d'une inversion de masque lors du traitement par photolithographie, provoquant cette forme atypique du profil de la résine. Cependant, cette configuration n'a en rien gêné le dépôt du capot de ppTMDSO sur la résine. Elle a uniquement entrainé des zones d'ombrages où le polymère s'est déposé, par « engouffrement », dans les recoins de la résine comme le montre le cliché MEB de la Figure 7 (gauche). Les failles observées sur les clichés MEB proviennent du processus de clivage.

4.4. Conception de microcanaux en ppTMDSO à β-galactosidase immobilisée

Pour la réalisation de microcanaux en résine, le ppTMDSO est déposé avec une épaisseur beaucoup plus importante (20-30µm) afin de permettre une bonne tenue de la structure du microcanal et d'éviter les phénomènes de détérioration lors de l'utilisation du microréacteur enzymatique.

Après dépôt du ppTMDSO, le wafer contenant les microcanaux est incubé dans une solution de révélation afin d'éliminer la résine et ainsi libérer les microcanaux (Figure 2).

Différentes tailles de microcanaux ont été réalisées comprenant 4 longueurs (2, 3, 5 et 10mm) et 3 largeurs (100, 250 et 500 μ m). L'élimination de la résine s'effectue sous agitation lente (environ 50 oscillations par minute) dans une solution de révélation contenant 1/3 de révélateur basique AZ351b dans l'eau (v/v) pendant un maximum de 5 heures, avec un suivi horaire par microscopie optique, de la libération. Les images Figures 8 à 11 montrent les observations faites au microscope optique de la libération de la résine dans les microcanaux, après 5 heures d'incubation dans le révélateur.



Figure 8. Microcanaux en ppTMDSO de longueur 2mm et de largeur 100 (gauche), 250 (centre) et



Figure 9. Microcanaux en ppTMDSO de longueur 3mm et de largeur 100 (gauche), 250 (centre) et 500µm (droite).



Figure 10. Microcanaux en ppTMDSO de longueur 5mm et de largeur 100 (gauche), 250 (centre) et 500µm (droite).



Figure 11. Microcanaux en ppTMDSO de longueur 10mm et de largeur 100 (gauche), 250 (centre) et 500µm (droite).

Ces images révèlent deux phénomènes au cours de la libération de la résine. On constate, tout d'abord, que la résine ne semble pas être totalement éliminée dans tous les microcanaux, même après 5 heures d'incubation dans la solution de révélation.

Il apparaît que seules les petites longueurs de canaux (2 et 3 mm) semblent être totalement libérées en ne laissant que quelques traces de résine encore présentes au sein des microcanaux. Pour les longueurs plus importantes, la libération semble s'être arrêtée. En effet, on constate que la libération semble s'être faite de manière latérale au niveau du réservoir, puis par diffusion à l'intérieur du canal. Plus la largeur du canal est fine, plus la progression du révélateur se fait difficilement comme nous pouvons le voir en comparant les largeurs de 100µm et 250µm des canaux de longueurs 5 et 10mm. Différentes tentatives ont été mises en œuvre afin de résoudre ce problème d'arrêt de la libération parmi lesquelles le renouvellement toutes les heures de la solution de révélation, le changement de concentration (1/3, 2/3, révélateur pur), une incubation plus longue (8h), un prétraitement de la résine (insolation supplémentaire). Ces tentatives n'ont pas permis d'améliorer significativement cette étape de libération de la résine, révélant ainsi une limite dans le procédé de conception de microcanaux par méthode de couche sacrificielle avec ce type de résine.

Des clichés réalisés au MEB, sur des coupes transversales effectuées au centre de microcanaux de 5 et 10mm de long (Figures 12 et 13) ont permis de mettre en évidence la présence de la résine sur les longueurs élevées de canaux mais également une déformation de la structure du microcanal au niveau de la partie supérieure sur canal (capot).



Figure 12. Coupe transversale d'un microcanal de longueur 5mm et de largeur 250µm observé au <u>MEB (vue de face (gauche) et tiltée (droite))</u>



<u>Figure 13. Coupe transversale d'un microcanal de longueur 10mm et de largeur 500µm observé au</u> <u>MEB (vue de face (gauche) et tiltée (droite))</u>

Sur ces coupes observées au MEB, nous constatons clairement la présence de résine à l'intérieur du canal (face silicium). De plus, une déformation sur le dessus du canal, pouvant correspondre à un soulèvement du polymère par-dessus la résine, est clairement visible. Il semblerait qu'en plus d'une élimination latérale (lente) de la résine par la solution de libération, celle-ci diffuse par-dessus, entre la résine et le polymère, ce qui crée les déformations du capot du microcanal. Ainsi, même si la solution de révélation parvient à diffuser dans tout le microcanal, le renouvellement constant de celle-ci s'avère nécessaire pour une attaque efficace de la résine. La mise au point d'un système de circulation de la solution de révélation dans ces canaux améliorerait certainement la libération de ceux-ci.

Concernant les microcanaux de longueur inférieure à 3mm, la libération semble s'être effectuée correctement.



<u>Figure 14. Coupe transversale d'un microcanal de longueur 3mm et de largeur 500µm observée au MEB (vue</u> <u>tiltée loin (gauche), tiltée proche (centre), et face (droite))</u>



Figure 15. Coupe transversale d'un microcanal de longueur 3mm et de largeur 250µm observée au MEB (vue tiltée loin (gauche), tiltée proche (centre), et face (droite))



<u>Figure 16. Coupe transversale d'un microcanal de longueur 3mm et de largeur 100µm observée au MEB (vue</u> <u>tiltée loin (gauche), tiltée proche (centre), et face (droite))</u>

Sur les images MEB des canaux de longueur 3mm (Figures 14 à 16), nous n'observons plus la présence de résine au niveau du microcanal, confirmant bien la libération totale de la résine. Cependant, on retrouve le phénomène de déformation du capot du microcanal encore une fois probablement due à l'infiltration de la solution de libération par-dessus la résine (Figures 14 et 15). Le phénomène est encore plus visible au niveau des réservoirs des canaux où l'on constate clairement ce soulèvement. Au niveau du canal de 100µm (Figure 16), nous n'observons pas ce phénomène de soulèvement, qui est cependant observé au niveau des réservoirs, laissant penser que cette déformation se produira principalement au niveau des largeurs importantes de la structure. Malgré cette déformation observée lors de la libération du microcanal, celui-ci garde néanmoins son intégrité.

Une validation de la bonne libération et de l'intégrité du canal a été réalisée en visualisant la diffusion d'une goutte de solution de fluorescéine, observée sous microscope à épifluorescence. Le remplissage total du canal par la goutte devait nous renseigner sur l'état interne du canal.



<u>Figure 17. Fluorescéine remplissant un microcanal de longueur 2mm de long et de largeur 500µm</u> <u>observée sous microscope à épifluorescence</u>



<u>Figure 18. Fluorescéine remplissant un microcanal de longueur 3mm de long et de largeur 100µm</u> <u>observée sous microscope à épifluorescence</u>



<u>Figure 19. Fluorescéine remplissant un microcanal de longueur 3mm de long et de largeur 250µm</u> <u>observée sous microscope à épifluorescence</u>

Les images (Figures 17 à 19) montrent que la goutte de solution de fluorescéine a totalement rempli les microcanaux de longueurs 2 et 3mm, suggérant ainsi la bonne libération de la résine, et par conséquent de leur capacité à être utilisés pour l'acheminement de liquide.

Cette méthodologie a ainsi permis de concevoir différentes gammes de microcanaux dans lesquels la circulation d'un liquide a pu être mise en évidence. Cependant, cette conception a également montré des limites, notamment vis-à-vis de la libération de la résine à l'intérieur des canaux de longueurs supérieures à 3mm. Des déformations ont également été mises en évidence lors de la libération de la résine mais n'entrainant pas de rupture de la structure du microcanal, prouvant ainsi la robustesse de notre méthodologie de conception. Il a donc été démontré qu'une conception de microcanaux solides en ppTMDSO est clairement réalisable pour une utilisation en microfluidique.

Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mettre en place un nouveau procédé de conception d'un microcanal à β -galactosidase immobilisée grâce à la technologie de polymérisation des plasmas froids. L'originalité de notre approche était d'associer la possibilité de concevoir des microstructures avec le ppTMDSO, déjà montrées par le passé, et d'y incorporer le catalyseur enzymatique (Elagli, 2014). Cette combinaison a permis de concevoir des microcanaux intégrants la β -galactosidase dans sa structure tout en minimisant les étapes de conception.

Par comparaison aux techniques de microfabrication existantes, notre méthodologie nous permet de nous affranchir de contraintes (i) de fabrication (alignement, gravure) et (ii) d'immobilisation (fonctionnalisation, greffage, solvant) qui sont souvent couteuses et contraignantes. Cependant, notre méthodologie a montré quelques limites (tailles des canaux) et contraintes (durée de libération de la résine) qui peuvent être résolues par une étude plus approfondie sur la nature de la résine sacrificielle.

Si la conception « bio intégrante » de microstructure à β -galactosidase immobilisée par la méthode des plasmas froids est validée dans ce chapitre, elle demande à être confirmée par les essais catalytiques et l'étude du comportement de l'enzyme immobilisée dans ces conditions afin de confirmer les caractères biocompatible et biofonctionnel du microréacteur.

Cette dernière partie clôture le manuscrit, en exposant, de manière succincte, les principaux résultats obtenus et en soulignant les découvertes majeures. Elle permet également de répondre aux questions soulevées par la problématique énoncée dans l'introduction. Enfin, quelques idées de réflexion seront soumises dans le but de résoudre les difficultés rencontrées mais également des perspectives de recherche et de développement seront proposées afin de permettre l'évolution future du sujet.

1. Synthèse des résultats

Ce travail de thèse avait pour objectif la conception de BioMEMS assistée par plasmas froids. Le challenge de cette thèse fut d'utiliser les connaissances et les compétences développées par les différentes unités de recherche et de les associer pour la réalisation du projet. Ainsi, en combinant la conception de microstructures, des approches de génie enzymatique et la physicochimie des matériaux déposés par plasma, nous devions être capables de concevoir un BioMEMS.

Pour réaliser ce mariage atypique de disciplines, une méthodologie originale et réfléchie devait être mise en place. Pour cela, en se basant sur les domaines de compétences de chaque unité de recherche, le choix s'est porté sur l'utilisation d'un matériau structurant synthétisé par plasma permettant la conception de microstructures et donc possiblement d'un microsystème : le ppTMDSO. Pour apporter l'aspect biologique nécessaire à l'obtention d'un BioMEMS, le pari a été fait de tenter d'intégrer une enzyme modèle, la __galactosidase, dans les étapes de conception du microdispositif.

Dans un premier temps, nous avons mis en œuvre une méthodologie d'immobilisation de la galactosidase grâce à la technologie des plasmas froids. Nous avons mis en évidence la capacité de rétention de l'enzyme dans le cadre d'une immobilisation par adsorption suivie d'un recouvrement par le ppTMDSO. L'étude du relargage de l'enzyme sur plusieurs séquences de lavage a révélé une capacité de rétention d'environ 90% de la quantité d'enzyme initialement déposée. Une tentative d'inclusion de l'enzyme directement dans le précurseur liquide a révélé des difficultés de solubilisation dues au caractère apolaire du précurseur et une difficulté de dépôt de la □-galactosidase sur le substrat de silicium.

Ensuite, nous avons mis en œuvre la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'ONPG, substrat synthétique, par la
_-galactosidase immobilisée, en condition statique puis continu d'alimentation. Cette étude nous a permis de valider le caractère biocompatible du ppTMDSO déposé par plasma mais également d'apprécier l'impact de cette immobilisation sur l'activité de la
_-galactosidase.

Ainsi, en condition statique, l'enzyme semblait ne conserver qu'environ 15% de son activité catalytique $(k_{cat} = 2,61 \text{ s}^{-1})$ par rapport à son activité dans des conditions optimales de réaction $(k_{cat} = 18,41 \text{ s}^{-1} \square$ -galactosidase en solution) ce qui traduit un impact assez conséquent de la procédure d'immobilisation sur l'activité de l'enzyme. Cette activité demeure néanmoins tout à fait significative. L'étude en flux continu a révélé une constante catalytique $(k_{cat} = 17,51 \text{ s}^{-1})$ semblable aux conditions optimales $(k_{cat} = 18,41 \text{ s}^{-1})$. La mise en œuvre de la réaction semble être adéquate avec l'utilisation de ce type de méthodes d'immobilisation et de polymère de ppTMDSO. Dans les deux types de réacteurs, nous obtenons une très bonne stabilité de l'immobilisation de la β -galactosidase par le ppTMDSO, avec la conservation de plus de 50% de l'activité initiale après des séquences allant jusqu'à 8 utilisations.

Troisièmement, nous nous sommes intéressés à la mise en œuvre de la procédure d'immobilisation dans le cadre de la conception d'un microréacteur enzymatique. L'objectif se situait, (i) dans la transposition de l'immobilisation par plasma de l'échelle macroscopique à l'échelle microscopique et microfluidique et (ii) d'avancer dans la voie de conception du BioMEMS en obtenant un microsystème à 🗆galactosidase intégrée capable de réaliser et de conserver une activité catalytique. En intégrant notre procédure d'immobilisation assistée par plasma de l'enzyme à une des étapes de microfabrication, nous avons pu obtenir un microréacteur à -galactosidase immobilisée capable d'hydrolyser un substrat synthétique (resorufin-D-galactopyranoside), avec une conservation de 11% de l'activité catalytique par rapport aux conditions optimales. Pour mieux comprendre les phénomènes se déroulant au sein du microsystème, une étude du comportement des molécules en présence a été entreprise. Une modélisation sur COMSOL Mulitphysics[©] a permis de mettre en évidence qualitativement la diffusion des molécules de substrat (RGB) et de produit (resorufin) au sein du réseau constitué par le polymère. L'absence de produit à l'entrée du microcanal contrairement au substrat, et inversement au niveau de la sortie du canal, témoigne d'un gradient de diffusion régi par les concentrations des espèces en chaque point du microcanal. En considérant la taille moléculaire du substrat et du produit, nous avons calculé leur temps de diffusion au sein de la couche limite à 1 \Box m de la paroi (2ms) et pour traverser 1µm de ppTMDSO (20ms). La modélisation et la représentation graphique des valeurs de flux surfacique de matière ont mise en évidence la présence d'une variation des coefficients de transport affectée par la concentration en substrat utilisée pour la réaction. Cette variation des coefficients de transport est vraisemblablement due à un colmatage du polymère aux fortes concentrations en substrat. Le couplage des deux outils de modélisation, l'un de cinétique l'autre de convection-diffusion permet d'apprécier plus concrètement le fonctionnement du BioMEMS et d'envisager un travail d'optimisation. On voit donc que l'on peut améliorer le transfert vers l'enzyme en favorisant la diffusion, donc en réduisant la vitesse de l'écoulement.

Enfin, nous avons conçu un microcanal en ppTMDSO, contenant la β -galactosidase immobilisée, potentiellement capable de réaliser des réactions catalytiques. En ayant recours à une résine sacrificielle, il a été possible de concevoir des microcanaux de différentes dimensions mais la libération de ceux-ci a révélé des difficultés d'évacuation de la résine, notamment sur les grandes dimensions de canaux. Les microcanaux de longueurs inférieures ou égales à 3mm ont ainsi pu être libérés, montrant une limite dans l'utilisation de cette technique.

Pour le dépôt de l'enzyme, le recours à une méthode de dépôt par impression de type jet d'encre a été entrepris permettant de déposer, de manière localisée et précise, des spots de taille micrométrique de β -galactosidase emprisonnée entre deux épaisseurs de ppTMDSO.

Malgré l'absence de tests d'activité réalisés sur ces structures, la bonne tenue générale du microcanal à enzyme immobilisée, lors de la mise en œuvre de la circulation d'un fluide, laisse un bon espoir sur la preuve de concept du microdispositif bio-intégré.

L'obtention d'un IMER (*IMmobilized Enzyme Reactor*) en associant la stratégie de microfabrication avec le PDMS et l'immobilisation par le ppTMDSO, nous permet d'envisager le développement d'un BioMEMS à cette étape de fabrication, dès lors qu'un système de détection est intégré.

En tant qu'outil de microfabrication, le ppTMDSO a montré néanmoins quelques limites d'utilisations principalement dues aux contraintes de la résine utilisée dans l'étape de fabrication. Cependant, quelques modifications apportées au procédé de microfabrication, au niveau de l'étape de libération de la résine, pourraient accroître le potentiel d'utilisation de ce matériau.

2. Perspectives

La validation de l'utilisation de la technologie des plasmas froids pour la conception de BioMEMS a pu être partiellement obtenue dans ces travaux de thèse. Cependant, il n'en demeure pas moins que quelques améliorations semblent nécessaires voire indispensables afin d'exploiter pleinement ce potentiel applicatif. Ainsi, trois principaux concepts peuvent vraisemblablement être approfondis :

2.1. La méthodologie d'immobilisation

Tout au long de l'étude sur l'immobilisation, la méthodologie de dépôt a pu paraître « grossière » notamment avec l'utilisation d'une micropipette et la distribution aléatoire de l'enzyme sur le substrat de dépôt.

Pour remédier à cette contrainte, le recours à la méthodologie de micro dépôts a montré, dans la dernière partie du manuscrit, la possibilité de contrôler de manière très précise ces paramètres pouvant être considérés comme critiques.

De plus, la présence d'agrégats d'enzyme sur le substrat de dépôt, suggère une hétérogénéité de répartition de l'enzyme. L'utilisation d'un agent pontant ou d'une pré-fonctionnalisation des surfaces avant dépôt favoriserait l'obtention d'une couche de type mono moléculaire d'enzyme, évitant les phénomènes de gènes stériques pouvant se produire dans le cas d'agrégats. Cependant, la configuration d'un film d'enzyme ne garantirait en rien une amélioration significative de l'activité catalytique.

Enfin, la méthodologie d'immobilisation développée dans ces travaux de thèse ne se limite pas uniquement à l'utilisation du ppTMDSO. De nombreux précurseurs pourraient être employés pour le développement de films biofonctionnels à enzyme et notamment l'utilisation de précurseur biosourcé issus de coproduit de l'agroalimentaire dérivé de l'Isosorbide dont quelques tests ont été réalisés dans le cadre de l'immobilisation de la β -galactosidase par la méthode d'adsorption-recouvrement et qui ont donné un bon potentiel d'utilisation.

2.2. La phase de conception du BioMEMS

L'étape manquante de ce travail de thèse pour l'obtention d'un BioMEMS, est l'intégration d'un élément de détection au *design* du microsystème. Les résultats ont été obtenus d'une manière indirecte, nécessitant des prélèvements suivis d'une analyse photométrique. Pour améliorer et faciliter cette étape d'analyse, l'intégration d'un détecteur semble indispensable, soit par la mise en place d'un transducteur directement à l'intérieur du microcanal, qui dans notre cas serait un transducteur de type optique (fibre optique), soit par la mise en place d'une fenêtre de détection permettant le suivi par un appareil de mesure externe (microscope).

Comme souligné dans la conclusion générale, l'une des difficultés majeures rencontrées lors de la conception fut la libération de la résine dans les microcanaux en ppTMDSO. Le changement au niveau du protocole expérimental de la résine employée permettrait une meilleure évacuation des canaux.

Dans l'étude de la réaction en conditions microfluidiques, la configuration adoptée pour l'obtention d'un microréacteur enzymatique, fut un microcanal simple permettant l'entrée du substrat et la récupération

du produit en sortie. D'autres configurations peuvent être employées permettant une grande variété d'utilisation. Ainsi, par exemple, il est possible d'imaginer un microréacteur avec plusieurs microcanaux intégrant différentes enzymes, pouvant servir d'outil de criblage catalytique.

On ne pourra également pas faire l'économie d'un travail de compréhension des effets de la configuration d'immobilisation de l'enzyme. L'outil COMSOL Multiphysics[®] de modélisation du BioMEMS a montré ses potentiels pour améliorer notre appréhension des phénomènes dans ce milieu réactionnel en écoulement ou non. Il permettra également de rechercher une structure et des conditions plus performantes.

2.3. Les applications potentielles

Durant le travail de thèse, la validation de la conception du BioMEMS s'est faite via l'intégration de la β -galactosidase au sein du microdispositif. Cette enzyme fut utilisée pour valider la méthodologie et le concept d'immobilisation via l'étude d'une réaction catalytique simple. Dans une approche de valorisation de la méthode développée, l'utilisation d'autres types d'enzymes pourrait être envisagée.

L'application industrielle de ce genre de technologie ne semble pas pertinente même si les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la possibilité de concevoir une mini unité de production stable et réutilisable. Cependant, l'application analytique semble être plus prometteuse notamment pour l'utilisation en tant microsystème bio-intégré pour le criblage rapide d'échantillons. L'application analytique ne nécessite pas nécessairement l'utilisation d'un microcanal à enzyme intégrée. L'utilisation de la méthodologie d'immobilisation développée ici ouvre la possibilité de l'immobilisation d'enzyme au niveau des puits d'une microplaque, par exemple, pour un criblage en volume fixe.

[Abbas, 2009a] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet "Cold plasma functionalized terahertz bioMEMS for enzyme reaction analysis", *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2009, 154–160

[Abbas, 2009b] A. Abbas, P. Supiot, V. Mille, D. Guillochon, B. Bocquet, « Capillary microchannel fabrication using plasma polymerized tmds for fluidic mems technology », *J. Micromech. Microeng.* 19, 2009, 045022

[Abbas, 2009c] Abbas A., Vercaigne-Marko D., Supiot P., Bocquet B., Vivien C., Guillochon D., "Covalent attachement of trypsin on plasma polymerized allylamine", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 73, 2009, 315–324

[Abbas, 2009d] A. Abbas, C. Vivien, B. Bocquet, D. Guillochon, P. Supiot, "Preparation and multicharacterization of plasma polymerized allylamine films" *Plasma Process. Polym.* 6, 2009, 593–604

[Abou-Rich, 2008] Abou-Rich S, « Films polymères organolsilicés multifonctionnels déposé 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, 239p

[Abou-Rich, 2010] Abou Rich Sami, Vianney Mille, Celine Vivien, Sylvie Godey, Philippe Supiot, « Kinetics of RPECVD organosilicon polymer post-treatment in a N2/O2 microwave plasma remote afterglow", *Plasma Process. Polym*, 7, 2010, 775–784

[Amorosi, 2012] Cédric Amorosi, Christian Mustin, Gilles Frache, Philippe Bertani, Ahmad Fahs, Grégory Francius, Valérie Toniazzo, David Ruch, Vincent Ball, Luc Averous, Marc Michel, "Design of Flexible Free Standing Plasma Polymer-Based Films As Hosts for Enzyme Immobilization", *J. Phys. Chem. C*, 116, 2012, 21356–21365

[Anderson & Van den Berg, 2003] Andersson H., Van den Berg A., « Microfluidic devices for cellomics: a review », *Sens. Actuators B: Chemical*, 92, 2003, 315–325

[Andrescu & Marty, 2006] Andreescu S, Marty JL. « Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications », *Biomol Eng*, 23, 2006, 1-15

[Aota, 2009] Aota A., Mawatari K., Kitamori T., « Parallel multiphase microflows: fundamental physics, stabilization methods and applications », *Lab Chip*, 9, 2009, 2470–2476

[Arya, 2008] Arya SK, Datta M, Malhotra BD., « Recent advances in cholesterol biosensor », *Biosens Bioelectron*, 23, 2008, 1083–100

[Airatsuka, 2004] Atsunori Airatsuka, Hitoshi Muguruma, Kyong-Hoon Lee, Isao Karube, "Organic plasma process for simple and substrate-independent surface modification of polymeric biomems devices », *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 2004, 1667–1672

[Bashir, 2004] Bashir R., « BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 2004, 1565–1586

[Bocquet, 2004] Bertrand Bocquet, Nour-Eddine Bourzgui, Yannick Guhel, Vianney Mille, Céline Vivien, Philippe Supiot, « Design of silicon-ppTMDS bioMEMS by cold RPECVD", *Microfluidics, Biomems, and Medical Microsystems ii, spie, Bellingham, wa,* 2004

[Bittner, 2006] A.M. Bittner, "Clusters on soft matter surfaces", *Surface Science Reports*, 61, 2006, 383–428

[Bryjak, 2002] Bryjak M., Gancarz I., Poźniak G., Tylus W., "Modification of polysulfone membranes 4. Ammonia plasma treatment", *Eur. Polym. J.*, 38, 2002, 717–726

[Callebert, 1994] F. Callebert, P. Supiot, K. Asfardjani, O. Dessaux, P. Goumand, P. Dhamelincourt, J. Laureyns, "Cold remote nitrogen, plasma polymerisation from 1.1.3.3-tetramthyldisiloxane–oxygen mixture, *Journal of Applied Polymer Science*, 52, 1994, 1595-1606

[Callebert, 1993] F. Callebert, P. Supiot, P. Goudmaud, O. Dessaux, « 11th International Symposium on plasma chemistry », *Loughborough*, 1993, 1493

[Carrara & Rubiolo, 1996] Carrara, C.R. and Rubiolo, A.C., "Determination of kinetics parameters for free and immobilized β-galactosidase". *Process Biochem.* 31, 1996, 243–248

[Chaoqi & Philipobbard, 2011] Manxiao Chaoqi, Jeffrey Philipobbard, "Biodiesel production using *Aspergillus niger* as a whole cell biocatalyst in a packed-bed reactor", *GCB Bioenergy*, 3, 2011, 293–298

[Chua, 2012] P.K. Chua, J.Y. Chena, L.P. Wanga, N. Huang, "Plasma-surface modification of biomaterials", *materials science and engineering*, 36, 2012, 143–206

[Cirillo, 2014] Giuseppe Cirillo, Fiore Pasquale Nicoletta, Manuela Curcio, Umile Gianfranco Spizzirri, Nevio Picci, Francesca Iemma, "Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand", *Reactive & Functional Polymers*, 83, 2014, 62–69

[Clark & Lyons, 1962] Clark LC, Lyons C., « Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery », *Ann N Y Acad Sci*, 102, 1962, 29–45

[Datta & Ghosal, 2009] Datta S., Ghosal S., « Characterizing dispersion in microfluidic channels », *Lab Chip*, 9, 2009, 2537–2550

[**DeMello, 2013**]**DeMello A. J.,** « Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems », *Nature,* 442, 2006, 394–402Cloe Desmet, Loîc J. Blum, Christophe A. Marquette, "Multiplex microarray ELISA versus classical ELISA, a comparison study of pollutant sensing for environmental analysis », *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 15, 2013, 1876–1882

[Devasenathipathy & Santiago, 2001] Devasenathipathy S., Santiago J., « Microscale diagnostic techniques », *Springer*, New York, USA, 2001

[Ding, 2012] Ding, J.-L., Chang, H.-L, Chen, F.-L., Hong, S.-J., Yuan, W.-Z., "A kind of PDMS surface modification method by means of corona discharge", *Journal of Functional Materials and Devices*, 18, 2012, 187-191

[Einstein, 1956] Einstein A., « Investigations on the theory of Brownian movement », New York, Dover, 1956

[Elagli, 2014] A. Elagli, K. Belhacene, C. Vivien, P. Dhulster, R. Froidevaux, P. Supiot, "Facile immobilization of enzyme by entrapment using plasma-deposited organosilicon thin film", *J. of Mol. Cat. B: Enzym*, 110, 2014, 77-86

[Elkin, 1999] B. Elkin, J. Mayer, B. Schindler, U. Vohrer, "Wettability, chemical and morphological data of hydrophobic layers by plasma polymerization on smooth substrates", *Surface and Coatings Technology*, 1999, 116–119, 836–840

[Elvira, 2013] Elvira K. S., Casadevall-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

[Eggertson, 1999] Michael J. Eggertson, Douglas B. Craig " β -galactosidase assay using capillary electrophoresis laser induced Fluorescence detection and resorufin- β -D-galactopyranoside as substrate", *Biomed. Chromatogr.* 13, 1999, 516–519.

[Englard & Seifter, 1990] Sasha Englard and Sam Seifter, "Precipitation Techniques, Methods in Enzymology", *Academic Press, Inc.*, Vol 182, 1990

[Essakhi, 2011] Adil Essakhi, Brigitte Mutel, Philippe Supiot, Axel Lofberg, Sebastien Paul, Veronique Lecourtois, Valerie Meille, Isabelle Pitault, Elisabeth Bordes-Richard, « Coating of structured catalytic reactors by plasma assisted polymerization of tetramethyldisiloxane », *Polymer Engineering and Sciences*, 51, 2011, 940-947

[Fanelli, 2012]Fiorenza Fanelli, Sara Lovascio, Riccardo d'Agostino, Francesco Fracassi, "Insights into the Atmospheric Pressure Plasma- Enhanced Chemical Vapor Deposition of Thin Films from Methyldisiloxane Precursors", *Plasma Process. Polym*, 9, 2012, 1132–1143

[Feng, 2015] Hongtao Feng, Weiliang Shu, Xi Chen, Yuanyuan Zhang, Yi Lu, Liping Wang, Yan Chen, "Development of a microfluidic platform with integrated power splitting waveguides for optogenetic neural cell stimulation" *Biomed Microdevices*, 17, 2015, 101

[Frenck, 1991a] H.L. Frenck, E. Oesterschulze, R. Beckmann, W. Kulisch, R. Kassing, *Mater. Sci. Eng. A*, 139, 1991, 394

[Frenck, 1991b] H.L. Frenck, C. Rau, S. Bürkner, R. Beckmann, W. Kulisch, R. Kassing, « 10th symposium on plasma Chemistry », Bochum, vol.3, 1991, 24-28

[Fu, 2015] Qitao Fu, Jeffrey Weng, Chye Ho, Pushkar D. Kanhere, Lin Li, Zhong Chen, "Hydrophobic sol-gel coatings based on polydimethylsiloxane for self-cleaning applications", *Materials & Design*, 86, 2015, 855–862

[Galerie, 2002] A. Galerie, « Traitements de surface en phase vapeur », *Hermes Sciences, Lavoisier*, 2002

[Gancarz, 2003] 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

[Garcia-Galan, 2011] 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*, 53, 2011, 2885–2904

[Gaur, 2006] Ruchi Gaur, Hema Pant, Ruchi Jain, S.K. Khare, "Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β-galactosidase", *Food Chemistry*, 97, 2006, 426–430

[Gengenbach, 1996] 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 éthylène diamine plasma polymers", *Surf. Interface Anal.*, 24, 1996, 611–619

[Ghali, 2014] N.E. Ghali, C. Vivien, B. Mutel, A. Rives, Surf. Coat. Technol., 259, 2014, 504-516

[Ghasemi, 2011] Ghasemi M., Minier M. J. G., Tatoulian 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

[Goullet, 2000] A. Goullet, C. Vallée, A. Granier, G. Turban, « Optical spectroscopic analyses of OH incorporation into SiO₂ films deposited from O₂/tetraethoxysilane plasmas », *Journal Vaccum Science Technology A* Vol18, 2000, p2452-2458

[Gurdas, 2012] Sevim Gürdaş, Hacı Ali Güleç, Mehmet Mutlu, "Immobilization of Aspergillus oryzae β -galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism", *Food Bioprocess Technol*, 5, 2012, 904–911

[Hadd, 1997] Andrew G. Hadd, Daniel E. Raymond, John W. Halliwell, Stephen C. Jacobson, and J. Michael Ramsey, "Microchip device for performing enzyme assays", *Anal Chem*, 69, 1997, 3407-3412

[Hall, 2012] Colin J. Hall, Peter J. Murphy, Hans J. Griesser, "Hydroxyl radical etching improves adhesion of plasma-deposited a SiO_xC_yH_z films on poly (methylmethacrylate) », *Plasma Process Polym*. 9, 2012, 398–405

[Hanefeld, 2009] Ulf Hanefeld, Lucia Gardossi, Edmond Magner, "Understanding enzyme immobilisation", *Chem. Soc. Rev.*, 38, 2009, 453–468

[Hartman, 2009] Hartman R. L., Jensen K. F., « Microchemical systems for continuous-flow synthesis », *Lab Chip*, 9, 2009, 2495–2507

[Hessel, 2004] Hessel V., Hardt S., Löwe H., « Chemical micro-process engineering – Fondamentals, modeling and reactions », *Wiley-VCH*, Weinheim, 2004

[Heyse, 2011] 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

[Hisamoto, 2001] Hisamoto H., Saito T., Tokeshi M., Hibara A., Kitamori T., « Fast and high conversion phasetransfer synthesis exploiting the liquid-liquid interface formed in a microchannel chip », *Chem. Commun.*, 2001, 2662–2663

[Huang, 2013] Chun Huang, Yi-Ming Sun, Ching-Yuan Tsai, Shin-Yi Wu, Su-Chen Chang, Ya-Chi Chang, "Micro-patterned atmospheric pressure plasma-deposited cell non-adhesive coatings", *Surface & Coatings Technology*, 231, 2013, 53–57

[Huang, 2012] Daoyang Huang, Rung-Ywan Tsai and Fang C. Ho, "Plasma polymerization deposited transparent protective coating for plastic display window", SPIE vol. 2892, 2012

[Illanes, 2008] Illanes A., « Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications », *Springer Science Business Media B.V.*, 2008, 398

[Inagaki, 1994] N. Inagaki, S. Tasaka, H. Abe, "Adsorption of carbon dioxide in plasma polymers prepared from silicon compounds and carbon dioxide separation membrane », *Polymer Bulletin*, 33, 1994, 709-715

[Jambovane, 2009] Jambovane S., Duin E. C., Kim S.-K., Hong J. W., « Determination of kinetic parameters, Km and k_{cat}, with a single experiment on a chip », *Anal. Chem.*, 81, 2009, 3239–3245

[Jasanek, 2006] Jasanek D., Franzke J., Manz A., « Scaling and the design of miniaturized chemicalanalysis systems », *Nature*, 442, 2006, 374–380

[Jonchems, 2011] 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

[Jovanovic, 2012] 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

[Junkar, 2012] Ita Junkar, Uro Cvelbar, Marian Lehocky, « Plasma treatment of biomedical materials", *materials and technology*, 45, 2012, 221–226

[Jurado, 2002] Jurado, E., Camacho, F., Luzon, G., Vicaria, J. M., "A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a beta-galactosidase from Kluyveromyces fragilis". *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 2002, 300-309

[Kishore, 2012] Devesh Kishore, Mahe Talat, Onkar Nath Srivastava, Arvind M. Kayastha, "Immobilization of β -galactosidase onto Functionalized Graphene Nano-sheets Using Response Surface Methodology and Its Analytical Applications", *PLoS ONE*, vol7, issue 7, 2012

[Klibanov, 2001] Alexander M. Klibanov, « Improving enzymes by using them in organic solvent", *Nature*, 409, 2001

[Koch & Capitelli, 1992] A.W. Koch, M. Capitelli, C. Corse, plasma technology, Eds. Plnum Press, New York, 1992, 109

[Koba & Pishko, 2005] Won-Gun Koha, Michael Pishko, "Immobilization of multi-enzyme microreactors inside microfluidic devices », *Sensors and Actuators B*, 106, 2005, 335–342

[Konig, 1999] Konig 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

[Korzec, 1995] D. Korzec, D. Theirich, K. Traub, F. Werner, J. Engemann, « Remote and direct microwave plasma deposition of HMDSO films: comparative study », *Surf. Coat. Technol.* 74/75, 1995, 67-74

[Kulisch, 1993] W. Kulisch, Surf. Coati. Technol., 59, 1993, 193-201

[Kupareva, 2013] Antonina Kupareva, Päivi Mäki-Arvela, Henrik Grénman, Kari Eränen, and Dmitry Yu. Murzin, « Base-catalyzed transformations of tetramethyldisiloxane », *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 2013, 10080–10088

[Ladero, 2003] M. Ladero, M.T. Perez, A. Santos, F. Garcia-Ochoa, "Hydrolysis of lactose by free and immobilized β -galactosidase from *thermus sp. strain t2*", *biotechnology and bioengineering*, vol. 81, no. 2. 2003

[Langmuir, 1928] Langmuir I. "Oscillations in ionized gaz", Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 14, 1928, 627–637

[Lerou, 2010] Lerou J. J., Tonkovitch A. L., Silva S., Perry S., McDaniel J., « Microchannel reactor architecture enables greener processes », *Chem. Eng. Sci.*, 65, 2010, 380

[Leskovac, 2004] Leskovac V., « Comprehensive Enzyme Kinetics », *Kluwer Academic Publishers*, 2004, New York, 451 pages

[Lo, 2010] Chia-Hao Lo, Meng-Hsuan Lin, Kuo-Sung Liao, Manuel De Guzman, Hui-An Tsai, Vincent Rouessac, Ta-Chin Wei, Kueir-Rarn Lee, Juin-Yih Lai, « Control of pore structure and characterization of plasma-polymerized SiOCH films deposited from octamethylcyclotetrasiloxane (omcts)", *Journal of Membrane Science*, 365, 2010, 418–425

[Lomel, 2006] 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

[Lu, 2011] Lu Y., Xia Y., Luo G., « Phase séparation of parallel laminar flow for aqueous two phase systems in branched microchannel », *Microfluid. Nanofluid*, 10, 2011, 1079–1086

[Lucovsky & Tsu, 1987] G. Lucovsky, D.V. Tsu, J. Vac. Sci. Technol.A, 5, 1987, 2231

[Lucovsky, 1991] G. Lucovshy, D.V. Tsu, R.A. Rudder, R.J. Markunas, J.L. Vossen, W. Kern, « Thin Film Processes II » *Academinc Press, San Diego*, Chapter IV-2, 1991

[Mackova, 2004] A. Mackova, V. Perina, Z. Stryhal, J. Pavlik, M. Svec, A. Quede, P. Supiot, G. Borvon, A. Granier, P. Raynaud, « The combined study of the organosilicon films by RBS, ERDA

and AFM analytical methods obtained from PECVD and PACVD », *Surface Science*, 566–568, 2004, 1143–1146

[Maleki, 2012] Maleki T., Fricke T., Quesenberry JT., Todd P.W., Leary J.F., « Point-of-care, portable microfluidic blood analyzer system », *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems X, Proc. of SPIE*, Vol. 8251, 2012

[Malhotra & Chaubey, 2003] Malhotra BD, Chaubey A., « Biosensors for clinical diagnostics industry », *Sens Actuators B Chem*, 2003, 91, 117–27

[Mandon, 2013] Mandon C.A., Berthuy O.I., Corgier B.P., LeGoff G.C., Faure P., Marche P.N., Blum L.J., Marquette C.A., « Polymer adhesive surface as flexible generic platform for multiplexed assays biochip production », *Biosensors and Bioelectronics*, 39, 2013, 37

[Marino, 2015] M. A. Mariño, S. Freitas and E. A. Miranda," Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *trichoderma harzianum* P49P11, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 32, 2, 2015, 325-333

[Martins, 2014]Bianca C. Martins, Robson Rescolino, Diego F. Coelho, Beatriz Zanchetta, Elias B. Tambourgi, Edgar Silveir, "Characterization of Bromelain from Ananas Comosus Agroindustrial Residues Purified by Ethanol Factional Precipitation", *Chemical Engineering Transactions*, 37, 2014, 781-786

[Mason, 2000] 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

[Mateo, 2007] 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

[Meng, 2011] Long Meng, Feiyan Caia, Qiaofeng Jin, Lili Niu, Chunxiang Jiang, Zhanhui Wang, Junru Wu, Hairong Zheng, "Acoustic aligning and trapping of microbubbles in an enclosed PDMS microfluidic device", *Sensors and Actuators B*, 160, 2011, 1599–1605

[Meng, 2012] Ellis Meng, Tuan Hoang, « MEMS-enabled implantable drug infusion pumps for laboratory animal research, preclinical, and clinical applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 2012, 1628–1638

[Merel, 1998]P. Merel, M. Tabbal, M. Chakar, M. Moisan, M. Ricard, Plasma Sources Sci. Technol. 7 (1998) 550–556.

[Meyer-Plath, 2003] 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

[Michaelis & Menten, 1913] L.Michaelis and M.L. Menten, Biochem. Z., 49, 1913, 333-369

[Mechelmore, 2013] Andrew Michelmore, David A. Steele, Jason D. Whittle, James W. Bradley and Robert D. Shorta, «Nanoscale deposition of chemically functionalised films via plasma polymerisation », *RSC Adv.*, 3, 2013, 13540–13557

[Mille, 2008] V. Mille, N. E. Bourzgui, C. Vivien, P. Supiot, B. Bocquet, «ppTMDS as a new polymer technology for a high throughput bioMEMS design », *J. Micromech. Microeng.* 18, 2008, 125026

[Miller, 1924] Miller, C. C. "Proceedings of the Royal Society of London". Series A, *Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, The Royal Society*, 106, 1924, 724-749

[Moreno-Cortez, 2005] Iván E. Moreno-Cortez, Jorge Romero-García, Virgilio González-González, Domingo I. García-Gutierrez, Marco A. Garza-Navarro, Rodolfo Cruz-Silva, "Encapsulation and immobilization of papain in electrospun nanofibrous membranes of PVA crosslinked with glutaraldehyde vapour", *Materials Science and Engineering C*, 52, 2015, 306–314

[Muguruma, 2010] Muguruma H., "Plasma-polymerized films for biochip design", *Plasma Process*. *Polym*, 7, 2010, 151–162

[Muguruma, 2000] 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
[Muguruma, 2011] Muguruma H., Hoshino T., Matsui Y., « Enzyme biosensor based on plasmapolymerized filmcovered carbon nanotube layer grown directly on a flat substrate », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 3, 2011, 2445–2450

[Nawaz, 2015] Muhammad Asif Nawaz, Haneef Ur Rehman, Zainab Bibi, Afsheen Aman, Shah Ali Ul Qader, "Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix", *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4, 2015, 250–256

[Newman & Jensen, 2013] Newman S. G., Jensen K. F., « The rôle of flow in green chemistry and engineering », *Green Chem.*, 15, 2013, 1456–1472

[Nguyena, 2007] Q.T. Nguyena, D. Langevin, B. Bahadori, F. Callebert, P. Schaetzel, "Sorption and diffusion of volatile organic components in a membrane made by deposition of tetramethyldisiloxane in cold remote-plasma", *Journal of Membrane Science*, 299, 2007, 73–82

[Ni, 2009] Ming Ni, Wen Hao Tong, Deepak Choudhury, Nur Aida Abdul Rahim, Ciprian Iliescu, Hanry Yu, "Cell culture on Mems Platforms: a review", *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2009, 5411-5441

[Qayyum, 2011] Qayyum Husaina, Shakeel Ahmed Ansari, Fahad Alam, Ameer Azam," Immobilization of *Aspergillus oryzae* galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism", *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 2011, 37–43

[Ogonczyk, 2012] D. Ogonczyk, P. Jankowski and P. Garstecki, "Functionalization of polycarbonate with proteins; open-tubular enzymatic microreactors", *Lab Chip*, 12, 2012, 2743–2748

[O'Toole, 1996] O'Toole L., Beck A. J., Short R. D., "Characterization of plasma polymers of acrylic acid and propanoic acid", *Macromolecules*, 29, 1996, 5172–5177

[Ozaydin-Ince, 2012] Gozde Ozaydin-Ince, Anna Maria Coclite and Karen K. Gleason, "CVD of polymeric thin films: applications in sensors, biotechnology, microelectronics/organic electronics, microfluidics, MEMS, composites and membranes », *Rep. Prog. Phys.* 75, 2012, 016501

[Padet, 1990] J. Padet, « Fluides en écoulement, méthodes et modèles », Ed. Masson, Paris, 1990 (ISBN 2-225-82092-9

[Pan, 2009] Chenliang Pan, Bing Hu, Wei Li, Yo Sun, Hong Ye, Xiaoxiong Zeng, "Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -D-galactosidase by covalent attachment onto

magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles", *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, 61, 2009, 208-215

[Panaro Mariotti, 2008] Marcela Panaro Mariotti, Hideko Yamanaka, Angela Regina Araujo, Henrique Celso Trevisan, "Hydrolysis of Whey Lactose by Immobilized β-galactosidase", *Braz. arch. biol. technol.* v.51 n.6, 2008, 1233-1240

[Pankaja, 2014] S.K. Pankaja, C. Bueno-Ferrera, N.N. Misraa, V. Milosavljevica, C.P. O'Donnellb, P. Bourkea, K.M. Keenera and P.J. Cullena, « Applications of cold plasma technology in food packaging », *Trends in Food Science & Technology* 35, 2014, 5-17

[Park, 1979] Y. K. Park, "Production and characterization of β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*" *-Journal of Food Science*, Vol44, Issue 1, 1979, 100–103

[Peeni, 2006] Peeni B A, Lee M L, Hawkins A R and Woolley A T, "Sacrificial layer microfluidic devices fabrication", *Electrophoresis*, 2006, 27, 4888–4895

[Pommela, 2013] 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

[Puelo, 2002] 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

[Rabe, 2011] Michael Rabe, Dorinel Verdes, Stefan Seeger, "Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces", *Advances in Colloid and Interface Science* 162, 2011, 87–106

[Roberge, 2008] 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

[Robertson, 2002] J. Robertson, « Diamond like amorphous carbon, a review of material science and engineering », Vol.37, 2002, 129-281

[Rodrigues, 2013] Rafael C. Rodrigues, Claudia Ortiz, Angel Berenguer-Murcia, Rodrigo Torres, Roberto Fernandez-Lafuente, "Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization", *Chem. Soc. Rev.*, 42, 2013, 6290

[Sassolas, 2012] Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D., « Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors », *Biotechnology Advances*, 30, 2012, 489–511

[Scheidtmann, 2001] 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

[Schilling, 2002] E. A. Schilling; A. E. Kamholz, P. Yager, Analytical Chemistry, 74, 2002, 1798-1804

[Seong, 2003] Gi Hun Seong, Jinseok Heo, and Richard M. Crooks, "Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System", *Analytical Chemistry*, 2003

[Song, 2003] 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

[Sheldon & van Pelt, 2013] Sheldon R. A., van Pelt S., "Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how", *Chem. Soc.Rev.*, 42, 2013, 6223–6235

[Siuti, 2012] Siuti P., Retterer S. T., Choi C.-K., Doktycz M. J., « Enzyme reactions in nanoporous, picoliter volume containers », *Anal. Chem.*, 84, 2012, 1095–1097

[Sun, 2010] Sufang Sun, Lingyun Dong, Xiaobing Xu, Shigang Shen, "Immobilization of β galactosidase from Aspergillus Oryzae on Macroporous PolyGMA Newly prepared", *International Journal of Chemistry*, vol.2, No.1, 2010

[Sungur, 1994] Sibel Sungur, Ural Akbulut, "Immobilization of β-galactosidase onto Gelatin by Glutaraldehyde and Chromium (III) Acetate", *J.Chem. Tech. Biotechnol*, 59, 1994, 303-306

[Siow, 2006] 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

[Supiot, 2011] P. Supiot, C. Vivien, K. Blary, and V. Rouessac, « Organosilicon polymers deposition by PECVD and RPECVD on micropatterned substrates », *Chem. Vap. Deposition*, 17, 2011, 321–326

[Swaraj, 2005] 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 molécules (acrylic acid, allylalcohol, allyl amine) using XPS and NEXAFS", *Surf. Coat. Technol.*, 200, 2005, 494–497

[Tabelling, 2003] Tabeling P., "Introduction à la microfluidique", Edition Belin, 2003, 254

[Teles & Fonseca, 2008] F.R.R. Teles, L.P. Fonseca, "Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors", *Materials Science and Engineering C*, 28, 2008, 1530–1543

[Ticu, 2005] Elena-Loredana Ticu, Dominique Vercaigne-Marko, Renato Froidevaux, Anca Huma, Vlad Artenie, Didier Guillochon, "Use of a protease-modified-alumina complex to design a continuous stirred tank reactor for producing bioactive hydrolysates", *Process Biochemistry*, 40, 2005, 2841–2848

[Tiwari, 2011] S. Tiwari, M. Sharma, S. Panier, B. Mutel, P. Mitschang, J. Bijwe, « Influence of cold remote nitrogen oxygen plasma treatment on carbon fabric and its composites with specialty polymers », *J Mater Sci*, 46, 2011, 964–974

[Tobita & Tajima, 1990] S. Tobita, S. Tajima, Organic Mass Spectrom. 25, 1990, 39

[Toepke & Beebe, 2006] M.W. Toepke, D. Beebe, "PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications" *Lab on a Chip*, 6, 2006, 1484-486

[Trans-Minh, 1991] C.Trans-Minh, « Les Biocapteurs », édition Masson, Collection mesure physique, 1991

[Urrutia, 2013] Paulina Urrutia, Bárbara Rodriguez-Colinas, Lucía Fernandez-Arrojo, Antonio O. Ballesteros, Lorena Wilson, Andrés Illanes, Francisco J. Plou, "Detailed Analysis of Galactooligosaccharides Synthesis with β -galactosidase from Aspergillus oryzae", J. Agric. Food Chem. 61, 2013, 1081–1087

[Vaccaro, 2014] Vaccaro L., Lanari D., Marrocchi A., Strappaveccia G., « Flow approaches towards sustainability », *Green Chem.*, 16, 2014, 3680–3704

[Valera, 2010] 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

[Vasilevaa, 2012] Nastya Vasilevaa, Vladislav Iotova, Yavor Ivanovb, Tzonka Godjevargovab, Nana Kotia, « Immobilization of β-galactosidase on modified polypropilene membranes » *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 2012, 710–719

[Wang, 2008] Wang J., « Electrochemical glucose biosensors », Chem Rev, 2008, 108, 814-25

[Wang, 2012] Jack D. Wang, Nicholas J. Douville, Shuichi Takayama, Mohamed Elsayed, "Quantitative Analysis of Molecular Absorption into PDMS Microfluidic Channels", Annals of Biomedical Engineering, 2012

[Wang & Graciela, 2012] Yi Wang, Graciela W. Padua, "Formation of zein spheres by evaporationinduced self-assembly", *Colloid Polym Sci*, 290, 2012, 1593–1598

[Wu, 2010] Zhuofu Wu, Mengxing Dong, Ming Lu, Zhengqiang Li, "Encapsulation of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* based on "fish-in-net" approach with molecular imprinting technique", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63, 2010, 75–80

[Wu, 2013] Zhuofu Wu, Zhi Wang, Buyuan Guan, Xue Wang, Ye Zhang, Yu Xiao, Bo Zhi, Yunling Liu, Zhengqiang Li, Qisheng Huo, "Improving the properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via encapsulation in aggregated silica nanoparticles", *New J. Chem.*, 37, 2013, 3793

[Wu, 2005] Lili Wu, Xiaoyan Yuan*, Jing Sheng, "Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning", *Journal of Membrane Science*, 250, 2005, 167–173

[Xiong, 2013] Meng Xiong, Bingu Jia, Dong Zhang, Jing Juanxu, Hong Yuanchen, Hui Zhong, « Glucose microfluidic biosensors based on reversible enzyme immobilization on photopatterned stimuli-responsive polymer", *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 2013, 229–234

[Zenasni, 2003] A. Zenasni, P. Raynaud, S. Sahli, S. Rebiai, Y. Segui, Surface and coating technology, vol. 174-175, 2003, 162-165

[Zhang & Ozdemir, 2009] Zhang Y., Ozdemir P., « Microfluidic DNA amplification: a review », *Anal. Chim. Acta*, 638, 2009, 115–125

[**Zhou & Chen, 2001**] Quinn Z.K. Zhou, Xiao Dong Chen, "Immobilization of β-galactosidase on graphite surface by Glutaraldehyde", *Journal of Food Engineering*, 48, 2001, 69-74

Annexe

Contributions scientifiques:

Articles:

- ✓ Facile immobilization of enzyme by entrapment using plasma deposited organosilicon thin film, Adil Elagli*, Kalim Belhacene*, Céline Vivien, Pascal Dhulster, Renato Froidevaux, Philippe Supiot, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 110, 2014, 77–86
- Simple eco-friendly β-galactosidase immobilization on functionalized magnetic particles for lactose hydrolysis, Kalim Belhacene, Elena Florentina Grosu, Alexandra Cristina Blaga, Pascal Dhulster, Mariana Pinteala, Renato Froidevaux, <u>Environmental Engineering and Management Journal Vol.14, No.3, 2015, 631-638</u>
- ✓ Sustainable efficient way for opioid peptide LVV-h7 preparation from enzymatic proteolysis in a microfluidic-based reaction-extraction process with solvent recycling, Adil Elagli, Kalim Belhacene, Pascal Dhulster, Renato Froidevaux, Journal of Chromatography B, 1020, 2016, 24–28
- ✓ Improved methodology for enzyme immobilization in a microsystem for continuous flow reaction, Kalim Belhacene, Adil Elagli, Céline Vivien, Anthony Treizebré, Pascal Dhulster, Philippe Supiot, Renato Froidevaux, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (Soumis)

Communication orale:

✓ International Congress of Chemical Engineering, Immobilization of enzyme by entrapment in polymer thin film synthesized by RPECVD, 2014, Iasi, Roumanie

Communication poster:

- ✓ 10th European Congress of Chemical Engineering, 3rd European congress of Applied Biotechnology, 5th European Process Intensification Conference, 2015, Nice, France
- ✓ 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses, 2014, Lille, France
- ✓ 9th European Congress of Chemical Engineering and 2nd European Congress of Applied Biotechnology, 2013, The Hague, Pays Bas.
- ✓ Adebiotech-SFGP, 2012, Romainville, France
- ✓ 9th European Symposium on Biochemical Engineering Science, 2012, Istanbul, Turquie.
- ✓ International conference on plasma medicine, 2012, Orléans, France

Autres:

- ✓ Monitorat 1ère année Licence, Chimie-Biochimie, IUT A, Lille 1 (2 ans)
- ✓ Encadrement d'une stagiaire roumaine, débouchant sur une publication
- ✓ Participation au programme Brancusi d'échange international Franco-Roumain, Stage à Institut de Chimie Macromoléculaire Petru Poni, Iasi, Roumanie