

Université de Montréal

Développement d'un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée en vue d'un couplage en ligne à un système d'électrophorèse capillaire

Par
Georgiana Gusetu

Département de chimie
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Octobre, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Développement d'un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée en vue d'un
couplage en ligne à un système d'électrophorèse capillaire

présenté par :
Georgiana Gusetu

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Kevin J. Wilkinson	Président-rapporteur
Dr. Dominic Rochefort	directeur de recherche
Dr. Karen C. Waldron	co-directeur de recherche
Dr. Jean-François Masson	membre du jury

Mémoire accepté le : _____

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'étudier l'efficacité de la microencapsulation, technique d'immobilisation d'enzymes utilisée pour la réalisation des nouveaux biocapteurs électrochimiques. Généralement, l'analyte d'intérêt produit ou consomme des électrons, et la réponse électrochimique est mesurée, afin d'identifier ou quantifier l'analyte. Dans le développement d'un biocapteur, il est désirable de quantifier la conversion du substrat (analyte) et/ou la formation de produit de réaction enzymatique. Les similarités structurales entre le substrat et le produit de réaction dans les réactions redox demandent que la technique utilisée pour les identifier soit très sélective. Le haut pouvoir de résolution de l'électrophorèse capillaire (EC) pour des séparations rapides de produits similaires en fait une méthode de choix, spécialement quand le substrat et le produit peuvent être suivis pendant et après la réaction catalysée par l'enzyme immobilisée. Un choix judicieux du substrat, compte tenu de son comportement en EC peut fournir des informations autant sur l'activité de l'enzyme que sur l'efficacité de la microencapsulation. Pour cette raison, nous avons choisi le substrat *o*-phenylènediamine qui est oxydé par la laccase, pour former le produit 2,3-diaminophenazine, tout en réduisant l'oxygène en eau.

Pour commencer, nous avons préparé les microcapsules et évalué l'impact de la microencapsulation sur le comportement de l'enzyme. Ensuite, nous avons développé une méthode de séparation en EC afin de quantifier la conversion de l'OPD en DAP par la laccase libre. La même méthode d'analyse a été utilisée pour caractériser la laccase immobilisée dans les microcapsules. Par la suite, afin de suivre la réaction enzymatique, un microréacteur à base d'enzyme microencapsulée a été couplé hors ligne au système d'EC. Finalement, nous avons essayé l'implémentation du système en ligne et les résultats préliminaires seront présentés.

Mots clés : Laccase, microencapsulation, enzymes immobilisées, microréacteur en ligne, électrophorèse capillaire, ortho-phenylènediamine, 2,3-diaminophenazine, 2-hydroxy-3-aminophenazine.

ABSTRACT

The principal objective of this research project is to study the efficiency of microencapsulation, technique used for enzyme immobilization in order to create new types of electrochemical biosensors. Generally, the target analyte involved either produces or consumes electrons and the electrochemical response is measured to identify or quantify the analyte. In the development of a biosensor, it is desirable to quantify the conversion of substrate (analyte) and/or the formation of product of the enzymatic reaction. The structural similarity between substrate and product in redox reactions means that the technique used to determine these species must be very selective. The high resolving power of capillary electrophoresis (CE) for rapidly separating similar compounds is thus an attractive method, particularly if substrate and product can both be monitored during or following the reaction catalyzed by microencapsulated enzyme. A judicious choice of substrate with respect to its behaviour in CE separations can help provide information on enzyme activity as well as microencapsulation efficiency. To achieve this, we chose the substrate *o*-phenylenediamine (OPD), which is oxidized by laccase to form the product 2,3-diaminophenazine (DAP) concomitant with the reduction of molecular oxygen to water.

We firstly prepared the microcapsules and evaluate the impact of microencapsulation on the behaviour of the enzyme. After that, we developed a CE based separation method to quantify the conversion of OPD to DAP by free laccase. We also used the CE method to characterize laccase immobilized in microcapsules. Subsequent, the microencapsulated laccase was packed into a microreactor format permitting its off-line coupling with CE as a means to follow the enzymatic reaction. Finally, we tried to implement the on-line system and the preliminaries results are presented.

Keywords: Laccase, microencapsulation, immobilized enzymes, on-line microreactor, capillary electrophoresis, ortho-phenylenediamine, 2,3-diaminophenazine, 2-hydroxy-3-aminophenazine.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1. <i>Les biocapteurs.....</i>	<i>2</i>
1.1.1 <i>Le glucomètre.....</i>	<i>3</i>
1.2 <i>Méthodes d'immobilisation d'enzymes.....</i>	<i>6</i>
1.2.1 <i>L'adsorption.....</i>	<i>9</i>
1.2.2 <i>La réticulation.....</i>	<i>9</i>
1.2.3 <i>Les liaisons covalentes et ioniques.....</i>	<i>10</i>
1.2.4 <i>L'emprisonnement dans une matrice.....</i>	<i>11</i>
1.2.5 <i>L'emprisonnement dans une membrane : la microencapsulation.....</i>	<i>12</i>
1.3 <i>Les microréacteurs enzymatiques.....</i>	<i>17</i>
1.3.1 <i>Montages en-ligne des microréacteurs enzymatiques.....</i>	<i>17</i>
1.4 <i>La laccase.....</i>	<i>19</i>
1.4.1 <i>L'activité enzymatique de la laccase.....</i>	<i>22</i>
1.4.2 <i>Techniques pour évaluer les paramètres cinétiques de la laccase.....</i>	<i>24</i>
1.4.2.1 <i>Loi de Michaelis-Menten.....</i>	<i>26</i>
1.4.2.2 <i>Évaluation de l'activité enzymatique en utilisant la cellule à oxygène.....</i>	<i>28</i>
1.4.2.3 <i>Évaluation de l'activité enzymatique en utilisant l'absorption moléculaire UV-Vis.....</i>	<i>30</i>
1.5 <i>L'électrophorèse capillaire pour des applications quantitatives.....</i>	<i>31</i>
1.6 <i>Objectifs généraux.....</i>	<i>35</i>
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	37
2.1. <i>Provenance des produits.....</i>	<i>38</i>
2.2 <i>Préparation des microcapsules par agitation mécanique.....</i>	<i>39</i>
2.3 <i>Évaluation des paramètres cinétiques.....</i>	<i>42</i>
2.3.1 <i>Spectrophotométrie.....</i>	<i>42</i>
2.3.2 <i>Cellule à oxygène.....</i>	<i>43</i>
2.4 <i>Développement de la méthode d'analyse par électrophorèse capillaire.....</i>	<i>44</i>
2.5 <i>Le microréacteur enzymatique.....</i>	<i>47</i>

2.6 Développement du montage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire	49
CHAPITRE 3 RÉSULTATS DES ÉTUDES CINÉTIQUES	53
3.1 Effet de l'encapsulation sur l'activité de la laccase	54
3.1.1 Effet du substrat sur l'activité enzymatique de la laccase libre	55
3.2 Effet de l'encapsulation sur le pH de l'activité enzymatique maximale	56
3.3 Efficacité de l'encapsulation de la laccase	59
3.4 Études cinétiques	63
CHAPITRE 4 DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE EC POUR LA QUANTIFICATION DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE.....	70
4.1 Optimisation de la méthode EC : mode d'électrophorèse et détection	71
4.2 Choix du tampon	73
CHAPITRE 5 QUANTIFICATION DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE.....	79
5.1 Quantification de la réaction enzymatique	80
5.2 Étude de la réaction enzymatique de la laccase libre	82
5.3 Étude de la réaction enzymatique de la laccase encapsulée et à travers le	84
microréacteur enzymatique	84
5.4 Développement du montage en ligne du microréacteur enzymatique couplé au système d'électrophorèse capillaire	91
CHAPITRE 6 CONCLUSIONS.....	98
RÉFÉRENCES	104
ANNEXES	110

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Schéma du fonctionnement d'un biocapteur adapté de la référence ^[4]. Le biocatalyseur (a) converti le substrat (S) en produit (P). La réaction est détectée par le transducteur (b) qui la converti en un signal électrique. Le signal du transducteur est amplifié (c), transformé (d) et affiché (e).2
- Figure 2.** Schéma d'un biocapteur Clark pour la détermination du glucose ^[2] représenté par : a : anode d'argent; b : cathode de platine; c,d : anneaux en caoutchouc; e : gel électrolyte; f : membrane en Teflon; g : glucose oxydase sur support en nylon; h : membrane en cellophane; M1 : cellophane : M2 : Teflon.5
- Figure 3.** Détection du glucose par l'intermédiaire d'un médiateur tel que le ferrocène. La GOx oxyde le glucose en acide gluconique, tout en réduisant le ferrocène, qui lui, est oxydé à une électrode de travail.6
- Figure 4.** Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes (représentées par E) par adsorption (A), adsorption-réticulation (B), réticulation par agent réticulant (C), liaison covalente (D), emprisonnement (E) et microencapsulation (F), adapté de la référence ^[8].8
- Figure 5.** Exemple de molécules utilisées pour la réaction de réticulation des enzymes : glutaraldehyde, hexamethyl diisocyanate et 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzène. 10
- Figure 6.** Exemple de microcapsules obtenues par condensation interfaciale, contenant des érythrocytes hémolysés, dans une suspension en eau, publié dans l'article de T. M. Chang dans la revue Science ^[13]. 13
- Figure 7.** Évolution du nombre de publications sur la microencapsulation à partir de l'année 1963 jusqu'au présent. Source : SciFinder Scholar, 2009. 14
- Figure 8.** Exemple de microcapsules sous forme de sphère creuse et de sphère remplie avec matrice de polymère, adapté de la référence ^[15]. 15
- Figure 9.** Répartition statistique des publications internationales entre les années 1970 et 2009, liées à la microencapsulation dans les divers domaines d'application. Source : SciFinder Scholar. 16

Figure 10. Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique, adapté de la référence ^[28]	20
Figure 11. Représentation des oxydations enzymatiques catalysées par la laccase A. en absence ou B. en présence de médiateurs chimiques.	21
Figure 12. Structure des formes réduite (ABTS ²⁻) et oxydée (ABTS ^{•-}) de l'ABTS, tiré de la référence ^[38]	23
Figure 13. Réaction d'oxydation de l'ortho-phenylènediamine catalysée par la laccase et le produit de réaction, le 2,3-diaminophénazine.....	24
Figure 14. Schéma de l'avancement d'une réaction chimique du point de vue énergétique en comparant la réaction catalysée par les enzymes et la réaction non catalysée ^[26] . A, B, C, D, E sont des étapes transitoires de la réaction enzymatique.....	25
Figure 15. Équation d'une réaction enzymatique de type Michaelis-Menten, tirée de la référence ^[26]	26
Figure 16. Dépendance de la vitesse initiale vis-à-vis de la concentration du substrat pour une réaction obéissant à l'équation de Michaelis-Menten.....	27
Figure 17. Schéma de la cellule à oxygène, tiré de la référence ^[40] . La membrane semi-perméable en Téflon sépare la cellule de l'électrode et permet le passage de l'oxygène qui est réduit à l'électrode de travail.	29
Figure 18. Schéma général d'un système d'électrophorèse capillaire tiré de la référence ^[41]	32
Figure 19. Schéma de la synthèse des microcapsules par agitation mécanique.	40
Figure 20. Mécanisme de réticulation des fonctions amines du PEI par le dichlorure de décanedioyle, qui est à la base de la formation de la membrane des microcapsules.	41
Figure 21. Schéma montrant la fabrication du microréacteur enzymatique.....	47
Figure 22. Photo montrant le microréacteur enzymatique vu au stéréomicroscope.	48
Figure 23. Schéma montrant le cheminement de la réaction enzymatique à travers le microréacteur ainsi que les étapes préalables à	

- l'analyse de l'échantillon en électrophorèse capillaire. Les étapes d'opération sont : **1.** 50 L OPD (2 mM) dans le tampon acétate (50 mM, pH 4,5); **2.** Rinçage avec 100 L tampon **3.** Collecte des produits de réaction et solution de rinçage (150 L) **4.** Injection en EC 49
- Figure 24.** Schéma du montage en ligne proposé pour l'étude de l'efficacité du microréacteur enzymatique. 50
- Figure 25.** Photo montrant la réalisation du couplage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire, par l'intermédiaire de la vanne Valco. 51
- Figure 26.** Photo montrant l'utilisation du cartouche du capillaire adapté pour le couplage EC – spectrométrie de masse à la réalisation du montage en ligne du microréacteur et le système de séparation. 52
- Figure 27.** Exemple de microcapsules marquées avec FITC, ayant un diamètre de 50 nm, tel que vues avec un microscope confocal. 54
- Figure 28.** Effet du pH sur la vitesse initiale de l'oxydation enzymatique de l'OPD en présence de la laccase libre ($4,3 \times 10^{-5}$ mM Lcc, OPD 2mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E = -0,6$ V vs Ag/AgCl). 57
- Figure 29.** Effet du pH sur la vitesse initiale de l'oxydation enzymatique de l'OPD en présence de la laccase encapsulée (1,5 mg/mL capsules sèches dans 2,8 mL de solution, concentration finale OPD 5mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E = -0,6$ V vs Ag/AgCl). 59
- Figure 30.** Mesure de l'activité enzymatique de la laccase encapsulée (174,5 mg capsules humides) et l'OPD (6 mM) dans un tampon acétate 50 mM pH 4,5. La consommation d'oxygène en fonction du temps est convertie en unités d'activité (U). 61
- Figure 31.** Courbe de Michaelis-Menten obtenue par mesures spectrophotométriques pour la laccase libre avec l'OPD comme substrat, dans un tampon acétate 0,050 M, pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 4,46 [\text{OPD}] / (0,96 + [\text{OPD}])$ 64
- Figure 32.** Courbe de Michaelis-Menten obtenue en utilisant la cellule à oxygène pour la laccase libre avec l'OPD comme substrat, dans un tampon acétate 0,050 M, pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 3,63 [\text{OPD}] / (1,09 + [\text{OPD}])$ 64
- Figure 33.** Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase encapsulée avec l'OPD comme substrat dans un tampon McIlvaine 0,050 M, pH

- 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,30$
 $[OPD] / (0,50 + [OPD])$ 65
- Figure 34.** Pour la même concentration de substrat, les vitesses initiales des deux réactions enzymatiques diffèrent par un facteur de 2,6. En multipliant la quantité de microcapsules par un facteur de 2,6, tout en gardant la même concentration de substrat, on obtient la quantité théorique (de départ) de laccase encapsulée nécessaire pour obtenir la même vitesse initiale que pour la laccase libre. 66
- Figure 35.** Spectre UV du pic de *o*-phenylènediamine (OPD 6 mM) pris par l'intermédiaire du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent. 72
- Figure 36.** Spectre UV du pic de 2-hydroxy-3-aminophénazine (DAP 5 mM) pris par l'intermédiaire du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent. 72
- Figure 37.** Électrophorégrammes montrant les temps de migration de deux solutions : OPD 2 mM et DAP 1mM dans un tampon phosphate de sodium/acide acétique 50 mM, pH 6,2..... 74
- Figure 38.** Électrophorégramme montrant les temps de migration d'une solution d'OPD et DAP dans un tampon phosphate de sodium/acide acétique 50 mM, pH 6,2..... 74
- Figure 39.** Électrophorégrammes montrant les temps de migration d'un échantillon d'OPD 6 mM dans un tampon acétate 50 mM, ayant un pH = 5,0. Le même échantillon a été injecté trois fois de suite, dans les mêmes conditions de séparation. 76
- Figure 40.** Électrophorégrammes montrant les temps de migration d'une solution d'OPD et DAP dans un tampon acétate pH = 4,25. 77
- Figure 41.** Courbe d'étalonnage du DAP obtenue en représentant les aires des pics ($n = 2$) en fonction des concentrations des solutions standard. L'équation de la régression linéaire est : Aire = $(143 \pm 3,90)$ [DAP] + $(13,3 \pm 5,39)$, avec un $R^2 = 0,996$ 81
- Figure 42.** Courbe d'étalonnage de l'OPD obtenue en représentant les aires des pics ($n = 2$) en fonction des concentrations des solutions standard. L'équation de la régression linéaire est : Aire = $(93 \pm 5,0)$ [OPD] + $(8,3 \pm 14)$, avec un $R^2 = 0,98$ 81
- Figure 43.** Suivi de la progression de la réaction enzymatique entre l'OPD et la laccase libre en électrophorèse capillaire. Conditions de réaction enzymatique : OPD 6 mM, tampon acétate 50 mM, pH 4,5, laccase libre (0,94 U/mL). Conditions de séparation :

- injection 3 nL, tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 2,5, voltage 20 kV..... 82
- Figure 44.** Progression de la réaction enzymatique mise en évidence par la consommation de l'OPD. Conditions de réaction enzymatique : OPD 6 mM, tampon acétate 50 mM, pH 4,5, laccase libre (0,94 U/mL). Conditions de séparation : injection 3 nL, tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 2,5, voltage 20 kV. 83
- Figure 45.** Électrophorégramme d'un échantillon d'OPD 2 mM passé à travers le microréacteur enzymatique, dans lequel on peut observer la présence du produit secondaire, l'HAP. 86
- Figure 46.** Spectre UV du pic de hydroxy-2-amino-3-phénazine (HAP) pris par l'intermédiaire du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent. 87
- Figure 47.** Recouvrement du DAP à travers le microréacteur enzymatique. En amont : échantillon de DAP 3mM analysé directement en électrophorèse capillaire et en aval: échantillon de DAP 3mM passé à travers le microréacteur enzymatique et par la suite analysé en électrophorèse capillaire. 89
- Figure 48.** Stabilité d'un microréacteur enzymatique sur un intervalle de temps de 30 jours, mesurée en quantifiant le DAP. Conditions de réaction : 2,1 mg microcapsules, 50 L OPD 2 mM, tampon acétate 50 mM pH 4,5. 90
- Figure 49.** Électrophorégramme d'un échantillon après la réaction enzymatique en utilisant une injection de 60 nL. 91
- Figure 50.** Schéma du micro-montage utilisé pour effectuer les essais avec les différents diamètres internes des capillaires. 1 et 2 : capillaires de différents diamètres comme détaillé dans le tableau 6. 92
- Figure 51.** Schéma du deuxième montage en-ligne proposé pour l'étude de l'efficacité du microréacteur enzymatique. 94
- Figure 52.** Schéma du micro-montage utilisé pour tester le fonctionnement de l'assemblage en T. 95
- Figure 53.** Photo montrant l'utilisation du cartouche du capillaire adapté pour le couplage EC – spectrométrie de masse à la réalisation du montage en ligne par l'intermédiaire du T..... 96

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Les valeurs de l'activité enzymatique (U/mL) de la laccase libre mesurées par spectrophotométrie et la cellule à oxygène par rapport aux deux substrats choisis. 55
- Tableau 2.** Valeurs des vitesses initiales de la réaction enzymatique de la laccase libre en présence de différentes solutions tampon ayant un pH de 4,5. 58
- Tableau 3.** Valeurs des vitesses initiales de la réaction enzymatique de la laccase encapsulée en présence de différentes solutions tampon ayant un pH de 4,5. 58
- Tableau 4.** Comparaison des paramètres cinétiques de la laccase libre et microencapsulée, pour le substrat OPD. 65
- Tableau 5.** Valeurs de l'efficacité et de la résolution des séparations en électrophorèse capillaire en fonction de diverses valeurs du pH de la solution tampon utilisée. 78
- Tableau 6.** Pourcentage de l'efficacité de conversion du substrat (OPD 2mM) en produit de réaction DAP par la laccase encapsulée. 84
- Tableau 7.** Valeurs du potentiel appliqué et le temps de fonctionnement atteint lors de l'utilisation des capillaires ayant des différents diamètres internes. Solution tampon : phosphate de sodium 25 mM, pH 2,5. 93
- Tableau 8.** Valeurs du voltage appliqué et le temps de fonctionnement atteint lors de l'utilisation du montage en T. 95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Symbole/Abréviation	Signification
[S]	Concentration du substrat
A	Aire de l'électrode
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3éthylbénzothiazoline-6-sulphonique)
ABTS ^{•+}	Forme oxydée de l'ABTS
B	Épaisseur de la membrane de téflon
BCA	Acide bicinchoninique
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CZE ou FSCE	Électrophorèse capillaire en solution libre
$d.e.$	Diamètre externe
$d.i.$	Diamètre interne
DAP	2,3-diaminophénazine
E	Champ électrique
ϵ	Constante diélectrique du milieu
ECS	Électrode de calomel saturé
F	Constante de Faraday
FAD	Coenzyme flavine adénine dinucléotide
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GOx	Glucose oxydase
HAP	2-hydroxy-3-aminophénazine
I_d	Courant associé à la réduction d'oxygène
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Chemin optique
MECK	(Micellar electro-kinetic chromatography) Électrophorèse capillaire en milieu micellaire
μ_{eof}	Mobilité électroosmotique
μ_{ep}	Mobilité électrophorétique
v	Vitesse initiale (mol/s)
N	Nombre de plateaux théoriques
OPD	Ortho-phénylènediamine
$P(O_2)$	Pression d'oxygène
PDA	Photodiode array (barette de diode)
PEI	Polyéthylèneimine
P_m	Perméabilité du téflon à O ₂
PPD	<i>p</i> -phénylènediamine

q	Charge électrique de l'ion
r	Rayon hydrodynamique de l'analyte
Span [®] 80	Monoléate de sorbitan
V_0	Vitesse initiale
v_{app}	Vitesse apparente des analytes
V_c	Volume de la cellule à mesure
V_{enz}	Volume de la solution d'enzyme dans la cellule
V_{max}	Vitesse maximale
ξ	Potentiel zêta
E	Coefficient d'absorptivité molaire de l'ABTS ^{•-}
η	Viscosité du milieu

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu mes Professeurs, Karen C. Waldron et Dominic Rochefort qui m'ont accordé toute leur confiance et leur soutien pour l'accomplissement de ce projet de recherche. Au delà du travail scientifique j'ai eu l'occasion et le privilège de découvrir deux personnalités fortes qui savent partager leur passion pour la chimie. Je voudrais les remercier aussi pour toute leur compréhension, leur disponibilité et l'expression de leurs qualités humaines qui m'ont rendu toute cette période très agréable et propice au travail.

Une aide précieuse, et un remerciement spécial va aussi à mes deux « marraines dans la chimie » et amies, Alexandra Furtos et Mariana Beldianu qui m'ont encouragé et m'ont aidé quand j'en avais particulièrement besoin.

Les groupes de recherche dirigés par mes deux coordonnateurs ont été une très belle expérience et je les remercie sincèrement par cette voie. Les discussions et les réunions de groupe m'ont enrichie autant sur le plan des connaissances scientifiques que sur le plan humain en découvrant de nombreuses particularités culturelles.

Un grand merci va aussi à Karine Gendron et Mihaela Cibian pour les belles heures partagées dans le laboratoire et dans le temps libre. J'ai aussi eu l'occasion de découvrir en elles de vraies amies.

Je remercie particulièrement ma mère Silvia et mon père Neculai pour tous les valeurs et l'éducation qu'ils ont su me transmettre; leur aide a été et reste très précieuse pour l'accomplissement de mes projets scientifiques et pas seulement. Je remercie mon frère Gabriel qui a toujours été un modèle à suivre pour moi.

Je remercie mon mari Andrei pour son soutien inestimable.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1. Les biocapteurs

Les biocapteurs électrochimiques reposent sur des électrodes modifiées qui utilisent un agent biologique pour la génération d'un signal proportionnel à la concentration en analyte d'une solution complexe. Le fonctionnement des biocapteurs consiste dans la reconnaissance moléculaire d'un analyte (souvent appelé *substrat*) par une biomolécule comme une enzyme, un anticorps/antigène, un microorganisme, une cellule, etc ^[1]. La réponse est transmise à un transducteur (par exemple une électrode) qui la convertit en un signal facilement mesurable et dont la magnitude est proportionnelle à la concentration de l'analyte mesuré (figure 1). Selon le type de transduction sur lesquels ils sont basés, les biocapteurs peuvent être potentiométrique, ampérométrique, capacitif, optique, thermique ou encore de masse ^[2]. Les biocapteurs électrochimiques sont souvent basés sur la catalyse enzymatique d'une réaction qui produit ou consomme des électrons. Les enzymes impliquées dans ces réactions sont appelées enzymes redox. L'analyte d'intérêt est impliqué dans la réaction enzymatique et une réponse électrochimique est mesurée et utilisée pour l'identification et la quantification de l'analyte ^[3].

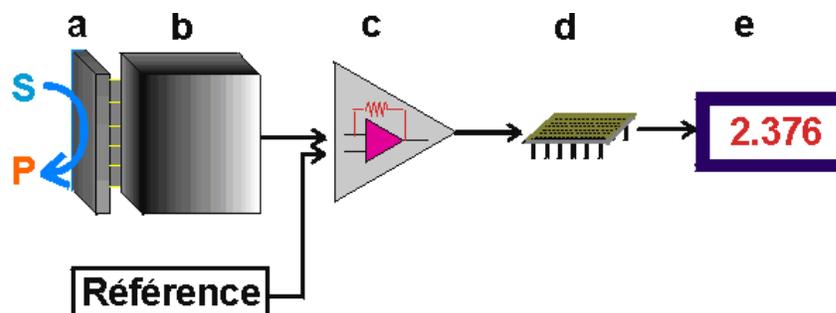


Figure 1. Schéma du fonctionnement d'un biocapteur adapté de la référence ^[4]. Le biocatalyseur (a) converti le substrat (S) en produit (P). La réaction est détectée par le transducteur (b) qui la convertit en un signal électrique. Le signal du transducteur est amplifié (c), transformé (d) et affiché (e).

L'étude des biocapteurs s'est développée grâce aux avantages qu'ils présentent par rapport aux méthodes d'analyse conventionnelles, ainsi qu'à la grande

diversité des domaines d'application. Le premier domaine où les biocapteurs ont été utilisés, a été le domaine médical [2]. La complexité des échantillons à analyser et le besoin d'un temps d'analyse aussi court que possible, ont imposé l'apparition des nouvelles méthodes d'analyse capables de combler ces besoins. L'élément de reconnaissance biologique des biocapteurs leur confère une grande sélectivité envers l'analyte, ce qui les rend très utiles pour l'analyse des échantillons complexes, car des étapes de préparation préliminaire d'échantillons peuvent être éliminées. Un autre avantage des biocapteurs est leur capacité de miniaturisation et donc leur portabilité, les mesures pouvant être prises directement sur les sites d'échantillonnage, ce qui s'avère très utile pour les analyses environnementales ou biomédicales. La possibilité d'effectuer des analyses *in vivo* des divers métabolites, médicaments et protéines est un autre atout pour l'utilisation des biocapteurs [5]. Dans les années récentes, le champ d'applications des biocapteurs s'est élargi; l'industrie alimentaire donne beaucoup plus d'intérêt à la qualité de ses produits d'où le besoin des méthodes d'analyse fiables et rapides. L'industrie militaire consacre aussi des ressources importantes à la recherche dans le domaine de la défense biologique et chimique, contribuant ainsi au développement des nouveaux types de biocapteurs [2]. Toutefois, l'application la plus connue et la plus commercialisée des biocapteurs est le glucomètre [6].

1.1.1 *Le glucomètre*

Le premier capteur qui avait un composant biologique dans sa structure a été présenté à l'Hôpital pour les enfants de Cincinnati en 1962 par Clark et Lyons et était destiné à la détermination du glucose [2]. Le glucose a une importance spéciale due à son implication dans les processus métaboliques humains. Les personnes diabétiques ne produisent pas assez d'insuline dans le pancréas pour contrôler adéquatement le niveau de glucose dans leur sang. Le besoin des personnes diabétiques de mesurer le niveau de glucose plusieurs fois par jour, a mené à la fabrication d'un dispositif portatif à réponse rapide, connu sous le nom

de glucomètre. Le glucomètre est un biocapteur électrochimique dont l'agent de reconnaissance est une enzyme : la glucose oxydase (GOx). Celle-ci catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique tout en réduisant l'oxygène en peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire de la coenzyme flavine adénine dinucléotide (FAD). Dans les premiers biocapteurs, l'oxygène était utilisé comme agent d'oxydation. Il était réduit électrochimiquement à une électrode de platine, comme dans la cellule à oxygène de Clark (figure 2) , qui fut inventée en 1953 [2]. La réaction d'oxydation du glucose, catalysée par la GOx mène à la formation de l'acide gluconique:



À l'électrode :



ou



Un potentiel de $-0,7 \text{ V}$ vs ECS est appliqué entre la cathode de platine et l'anode d'argent pour réduire l'oxygène et le courant enregistré est proportionnel à la concentration d'oxygène. La concentration de glucose est alors proportionnelle à la consommation d'oxygène, donc à la diminution du courant.

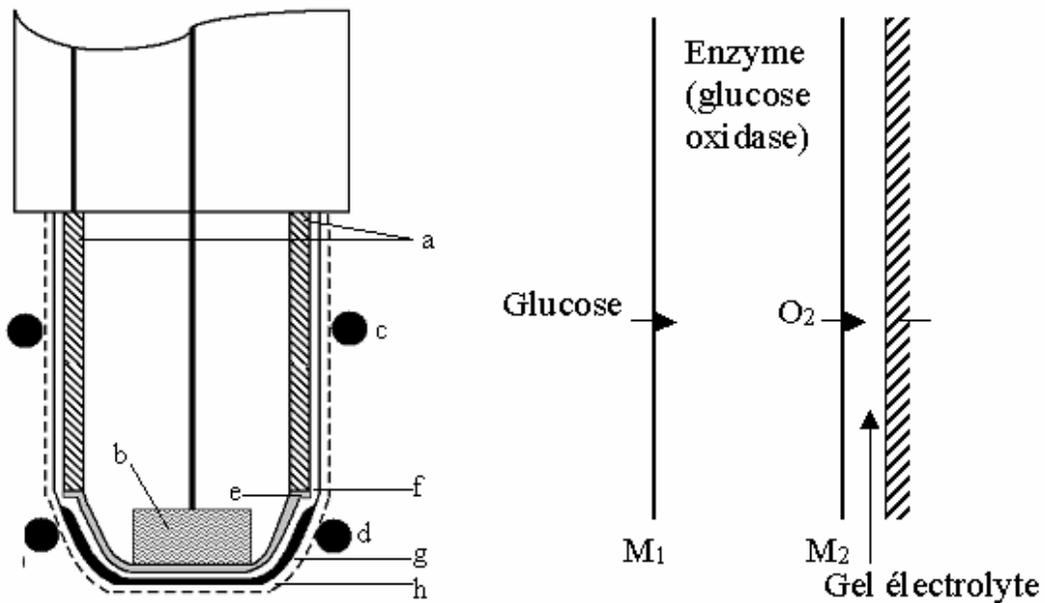


Figure 2. Schéma d'un biocapteur Clark pour la détermination du glucose ^[2] représenté par : a : anode d'argent; b : cathode de platine; c,d : anneaux en caoutchouc; e : gel électrolyte; f : membrane en Teflon; g : glucose oxydase sur support en nylon; h : membrane en cellophane; M1 : cellophane : M2 : Teflon.

Le substrat (la solution de glucose) et l'oxygène peuvent traverser la première membrane et réagissent avec l'enzyme pour former les produits. Seulement l'oxygène peut traverser la deuxième membrane pouvant ainsi être mesuré à l'électrode. Ce biocapteur a été premièrement breveté en 1970 et mis en vente en 1974. Cependant, la reconversion du peroxyde d'hydrogène à une électrode demande un potentiel élevé (-0,7 V) ^[7] et pour cette raison une nouvelle génération de biocapteurs pour la détermination du glucose a été mise en place. La deuxième génération de biocapteurs (trouvés sur le marché actuellement) sont basés sur l'utilisation d'un médiateur redox comme le ferrocène, qui a le rôle de transporter les électrons entre le glucose oxydase et l'électrode (figure 3). Ainsi, pour doser le glucose, il suffit d'appliquer un potentiel (+0,16 V vs l'électrode de calomel saturée - ECS) qui permet d'oxyder le médiateur réduit qui est généré par l'enzyme. La différence de courant enregistrée entre les électrodes de travail est convertie en concentration afin de doser le glucose dans le sang.

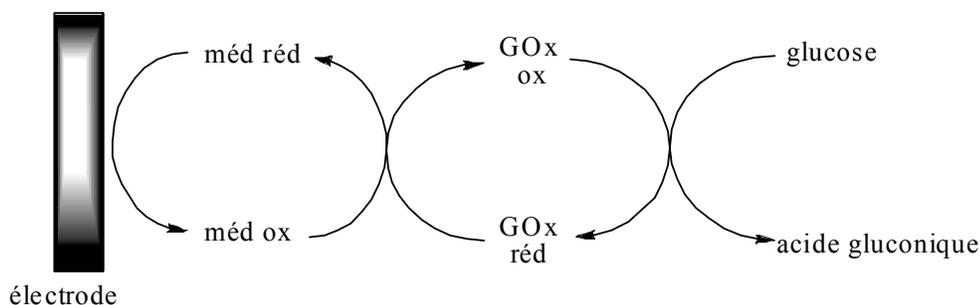


Figure 3. Détection du glucose par l'intermédiaire d'un médiateur tel que le ferrocène. La GOx oxyde le glucose en acide gluconique, tout en réduisant le ferrocène, ce dernier, à son tour, est oxydé à une électrode de travail.

Malgré la grande variété des domaines d'application et les avantages que les biocapteurs présentent, en pratique le domaine d'applications des biocapteurs est restreint puisque les biomolécules sont des espèces très fragiles, et leur immobilisation dans des biocapteurs affecte l'activité de l'enzyme immobilisée.

1.2 Méthodes d'immobilisation d'enzymes

Pour qu'un biocapteur soit fiable, il faut que la composante biologique (dans le cadre de ce projet, les enzymes) soit convenablement attachée au transducteur^[8]. Ce processus est connu sous le nom d'immobilisation. Comme déjà dit, cette étape est une étape critique dans la conception des biocapteurs, parce qu'elle doit répondre à plusieurs exigences : retenir solidement l'agent bioactif sur le support à la proximité du transducteur, lui préserver le pouvoir catalytique et lui permettre des échanges rapides avec le milieu (analyte). Idéalement, la méthode d'immobilisation choisie doit protéger l'enzyme des composés du milieu extérieur pour lui offrir une bonne stabilité aux changements de pH, température, force ionique et concentrations, mais sans empêcher la reconnaissance moléculaire^[9].

Les méthodes d'immobilisation d'enzymes utilisées à date sont très nombreuses et diverses. Chaque méthode présente des avantages et désavantages, et selon l'application envisagée, la méthode la plus appropriée est choisie. Les méthodes

d'immobilisation peuvent être classées selon la nature des interactions des enzymes avec le support ^[2]. Les quatre principales approches utilisées pour l'immobilisation des enzymes sont : l'adsorption sur une surface solide, la réticulation par l'intermédiaire des agents de réticulation, la liaison covalente et ionique avec un support insoluble et l'emprisonnement dans un gel polymérique (matrice) ou dans des microcapsules (figure 4).

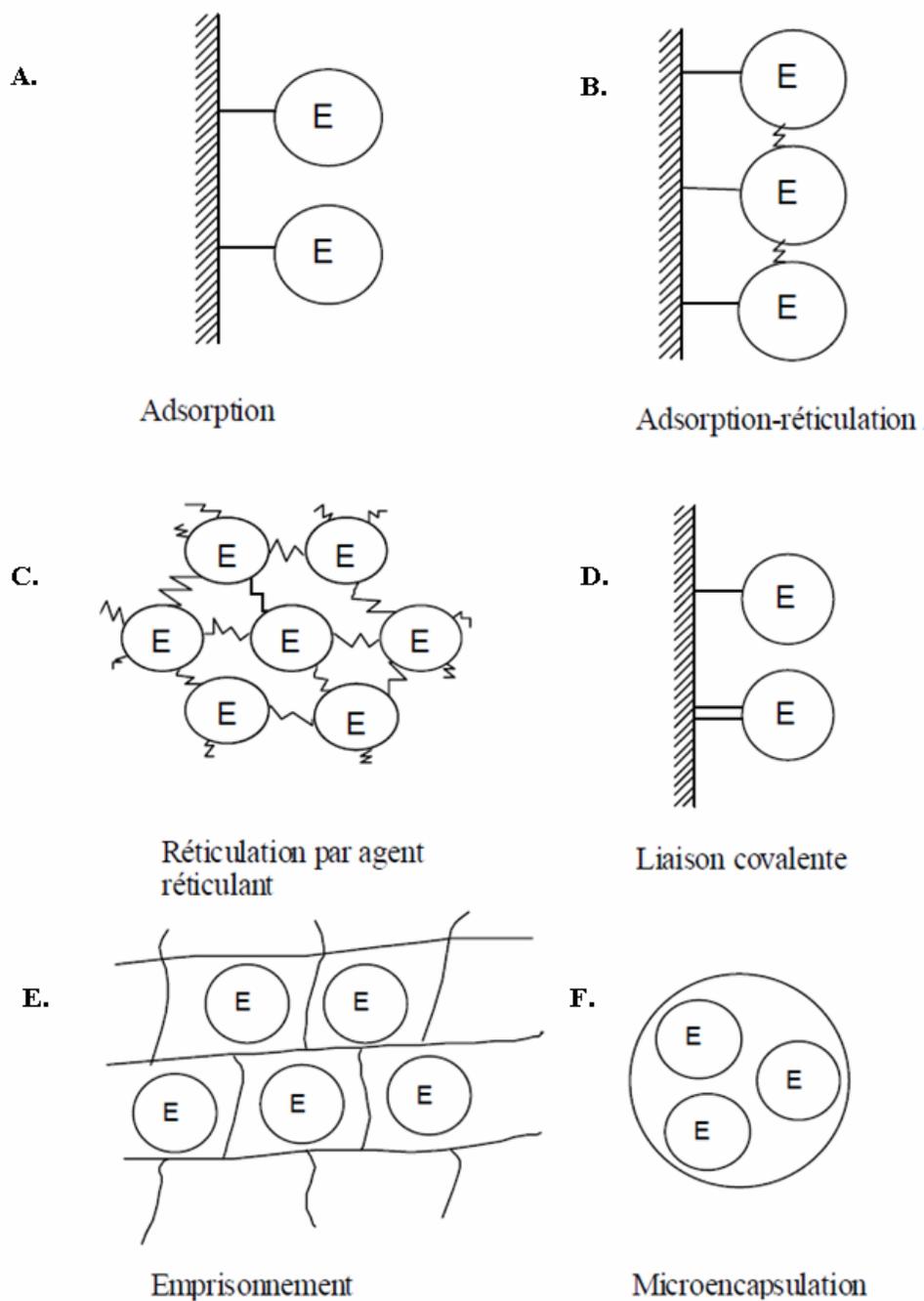


Figure 4. Principales méthodes d'immobilisation d'enzymes (représentées par E) par adsorption (A), adsorption-réticulation (B), réticulation par agent réticulant (C), liaison covalente (D), emprisonnement (E) et microencapsulation (F), adapté de la référence ^[9].

1.2.1 *L'adsorption*

L'adsorption est la plus simple et la plus ancienne méthode d'immobilisation d'enzymes. Beaucoup de substances comme l'alumine, la cellulose, le charbon, le gel de silice, le collagène et le verre adsorbent les enzymes sur leur surface ^[2]. Le plus important avantage de l'adsorption c'est qu'aucun réactif n'est utilisé et il n'y a pas d'étape de nettoyage. Un autre avantage de cette méthode c'est que la structure de l'enzyme est très peu affectée par l'immobilisation, par rapport aux méthodes où une liaison chimique est impliquée dans l'immobilisation. Les enzymes immobilisées par adsorption sont principalement retenues sur le support par des forces physiques (Van der Waals), mais d'autres mécanismes de rétention comme des ponts d'hydrogène et des effets hydrophobes sont également impliqués ^[9]. Les désavantages de cette méthode d'immobilisation sont dues au fait que les liaisons entre le support et l'enzyme sont faibles; en conséquence les enzymes peuvent être délogées lors des processus de lavage et les liaisons sont susceptibles aux changements lors d'une modification du pH, de température, de force ionique ou même de concentration de substrat ^[9].

1.2.2 *La réticulation*

Cette méthode utilise des agents bifonctionnels qui induisent une réticulation intermoléculaire entre les enzymes et le support solide ou entre les enzymes elles-mêmes, augmentant ainsi la quantité d'enzymes immobilisées ^[2]. Différents agents bifonctionnels sont utilisés pour la réticulation (voir figure 5), mais le glutaraldéhyde est l'agent de réticulation le plus fréquemment utilisé. Il forme un pont entre deux fonctions amines primaires des enzymes grâce à ses deux extrémités aldéhyde qui sont très réactives. Généralement, la réticulation forme des agrégats insolubles de haute masse molaire ce qui nuit aux enzymes et limite la diffusion du substrat aux sites actifs des celles-ci ^[9].

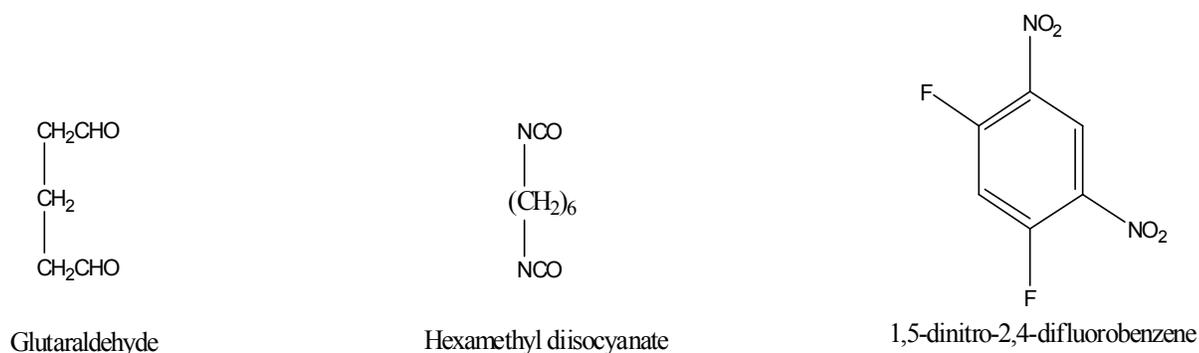


Figure 5. Exemple de molécules utilisées pour la réaction de réticulation des enzymes : glutaraldehyde, hexamethyl diisocyanate et 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzène.

1.2.3 Les liaisons covalentes et ioniques

La liaison covalente entre l'enzyme et le support utilisé pour l'immobilisation est réalisée par l'intermédiaire des groupes cystéine, des fonctions thiols ou des amines primaires. Ceux-ci sont connus pour leur affinité avec des matériaux comme l'or et le platine avec lesquels ils forment des liaisons covalentes ^[10]. Cette méthode d'immobilisation d'enzymes est connue sous le nom de liaisons par autoassemblage. L'immobilisation par liaison covalente peut également être faite en utilisant une molécule de liaison entre le support et l'enzyme. Cette immobilisation est plus souvent faite entre un support « activé » qui va ensuite réagir avec un groupement NH, SH, OH ou COOH de l'enzyme. Le couplage a lieu généralement à des températures basses, dans un milieu ayant une force ionique basse et à un pH proche du pH optimal de l'enzyme ^[2]. La réaction peut se passer en présence du substrat ou d'un inhibiteur qui a le rôle de protéger le site actif de l'enzyme pendant la réaction d'immobilisation. Quant à la méthode d'immobilisation par liaison ionique, elle est basée sur l'attraction provoquée par des charges opposées ^[11]. L'attachement de l'enzyme au support est moins fort que par la liaison covalente et le couplage est soumis à des interférences provoquées par d'autres ions. Les avantages de l'immobilisation par liaison sont d'assurer une forte rétention de l'enzyme à la surface du support, ce qui empêche

la perte de l'enzyme pendant l'utilisation, mais l'inconvénient majeur est qu'elle n'assure pas la protection de l'enzyme du milieu extérieur ^[9]. Un autre désavantage de cette méthode d'immobilisation (valable aussi pour l'adsorption) consiste dans une faible densité de protéines à la surface d'immobilisation, mais ce problème est contourné par l'utilisation des supports poreux où l'aire de surface est très élevée ($\geq 350 \text{ m}^2/\text{g}$). Il y a aussi la possibilité qu'une orientation problématique (blocage du site actif) de l'enzyme se produise, suite à son attachement au support solide. Ceci dépend de la proximité du site actif par rapport aux points de liaison sur le support, ce qui est influencé directement par la structure spatiale de l'enzyme. Ces divers problèmes peuvent être surmontés en utilisant une méthode d'immobilisation des enzymes comme la microencapsulation, un type d'emprisonnement de l'enzyme.

1.2.4 L'emprisonnement dans une matrice

Cette méthode consiste dans l'inclusion de l'enzyme dans une matrice polymérique de type gel lorsque ce gel est préparé dans une solution contenant l'enzyme ^[2]. Le gel peut former des billes ou des fibres et peut être inerte (alginate) ou actif dans la transduction (polymère conducteur) ^[11].

Les alginates sont des polysaccharides obtenus à partir d'une famille d'algues brunes et qui ont un large spectre d'applications dans des diverses industries : alimentaire, chimique et pharmaceutique, grâce à leur capacité de former des gels. La gélification de l'alginate de sodium est basée sur le remplacement des ions monovalents Na^+ par des ions bivalents Ca^{2+} . Les gels synthétisés par ce type de réaction peuvent être instables en présence d'ions de même charge que ceux qui participent à la formation du gel ^[11]. Par exemple, les billes d'alginate qui sont durcies grâce aux ions Ca^{2+} commencent à se désintégrer graduellement en présence d'une concentration élevée en ions Na^+ qui entrent en compétition avec les Ca^{2+} . Lorsque l'alginate est utilisé seul, les pores des billes ou les pores des

gels sont trop grands pour retenir des molécules de la taille des enzymes et celle-ci s'en échappent, menant à une perte continue de l'activité du polymère ^[11].

Les polymères conducteurs sont impliqués dans l'immobilisation des enzymes, et également dans la transduction lorsqu'ils sont utilisés dans des biocapteurs. Leurs applications sont connues au niveau de la conception des biocapteurs électrochimiques et des biopiles. Par exemple, des enzymes ont été immobilisées dans les compartiments d'une biopile en utilisant des polymères redox sur lesquels ont été liés des complexes d'osmium ^[12]. Le polymère utilisé pour l'immobilisation de l'enzyme contribuait aussi au transfert électronique à l'intérieur de la pile.

La méthode d'immobilisation d'enzymes par inclusion dans une matrice permet l'immobilisation d'une grande quantité d'enzymes, mais la méthode présente aussi des désavantages. La matrice de gel forme une barrière qui ralentit la diffusion du substrat aux sites actifs des enzymes et la mobilité des enzymes à l'intérieur de la matrice est réduite ^[2]. De plus, il y a une perte d'enzyme à travers les pores de la matrice, si ceux-ci ont une taille qui le permet. Les conséquences consistent dans une diminution de la sensibilité et un retardement de la réponse du biocapteur, surtout pour des molécules ayant une masse molaire élevée. Ces inconvénients peuvent être surmontés en combinant l'emprisonnement des enzymes avec la réticulation ^[9].

1.2.5 L'emprisonnement dans une membrane : la microencapsulation

Cette méthode d'immobilisation d'enzymes a été utilisée pour la conception du premier glucomètre ^[13], décrit dans la section 1.1.1. Dans cette application d'immobilisation, la membrane utilisée est une membrane macro, comme une membrane à dialyse, mais l'utilisation des membranes micro, comme pour les microcapsules, connaît un réel succès. Cette méthode est aussi appelée

microencapsulation. Les microcapsules peuvent être des liposomes, des micelles ou faites à partir de polymère.

Le concept de la microencapsulation d'éléments bioactifs est apparu suite au besoin d'utilisation d'agents fragiles et de les protéger du milieu extérieur par une barrière physique semi-perméable. Le concept fut appliqué pour la première fois par Thomas Chang dans le but de synthétiser des cellules artificielles ^[14]. Dans son premier article publié en 1964, il présentait une méthode d'encapsulation d'une solution aqueuse contenant une protéine, dans une membrane polymérique semi-perméable, afin de permettre des applications *in vitro* et *in vivo*. Les essais *in vivo* ont permis le contrôle de la concentration de l'urée dans le corps, en injectant de l'uréase ainsi encapsulée, directement dans le sang.

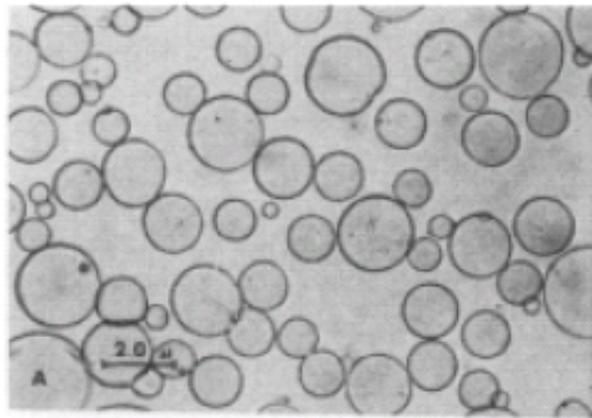


Figure 6. Exemple de microcapsules obtenues par condensation interfaciale, contenant des érythrocytes hémolysés, dans une suspension en eau, publié dans l'article de T. M. Chang dans la revue Science ^[14].

La procédure de synthèse des microcapsules par condensation interfaciale utilisée par Chang consistait en trois étapes : a) la dispersion mécanique d'une solution aqueuse contenant les protéines, dans un solvant organique; b) l'ajout dans le mélange, tout en continuant l'agitation mécanique, d'un agent réticulant qui permet la formation de la membrane semi-perméable à l'interface de la phase aqueuse et organique, et c) le transfert de microcapsules dans un milieu aqueux, après une centrifugation préalable. Les microcapsules obtenues sont des sphères

ayant un diamètre variable entre 1 et 100 μm , tout dépendant de la vitesse d'agitation initiale, et avec une épaisseur de la paroi variant en fonction de la concentration initiale des solutions utilisées.

Grâce à la microencapsulation, plusieurs problèmes liés à l'immobilisation par les autres méthodes sont éliminés [2]. L'enzyme est protégée du milieu extérieur par la membrane semi-perméable qui la maintient dans un environnement aqueux favorable. L'enzyme garde ainsi une bonne stabilité par rapport aux changements de température et pH permettant ainsi la prolongation de sa durée de vie. Elle peut être immobilisée en grande quantité tout en évitant les modifications chimiques apportées aux enzymes par les méthodes d'immobilisation par liaison, modifications chimiques qui peuvent désactiver l'enzyme. Les microcapsules peuvent être déposées sur différents supports, permettant l'immobilisation des enzymes à proximité du transducteur, ce qui offre une maximisation de la sensibilité du biocapteur. La grande variété des polymères synthétiques et naturels disponibles permet l'utilisation des microcapsules pour des applications diverses, comme les applications *in vivo* [15]. Depuis la première publication de la méthode de Chang, la microencapsulation a connu une grande évolution (figure 7), grâce aux nouvelles techniques développées et aux nouveaux domaines d'application trouvés.

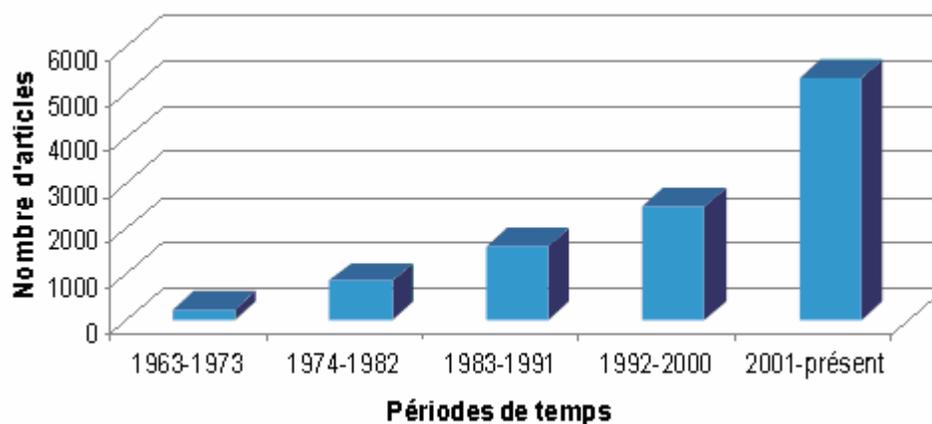


Figure 7. Évolution du nombre de publications sur la microencapsulation à partir de l'année 1963 jusqu'au présent. Source : SciFinder Scholar, 2009.

Les procédés de microencapsulation employés à date sont très divers et peuvent être divisés en trois grandes catégories: 1) procédés chimiques : polymérisation et polycondensation interfaciale; 2) procédés mécaniques : encapsulation assistée par fluides supercritiques, fusion-extrusion, gélification de gouttes, congélation de gouttes, lit d'air fluidisé, nébulisation et 3) procédés physico-chimiques : gélification thermique, évaporation/extraction de solvant, coacervation simple et complexe ^[16]. Les microcapsules produites (figure 8) peuvent être des sphères creuses, à l'intérieur desquelles les particules (molécules, poudre, autres microcapsules) se trouvent dans un milieu aqueux, ou bien elles peuvent être des sphères remplies d'une matrice de polymère, dans lequel les particules sont dispersées ^[16].

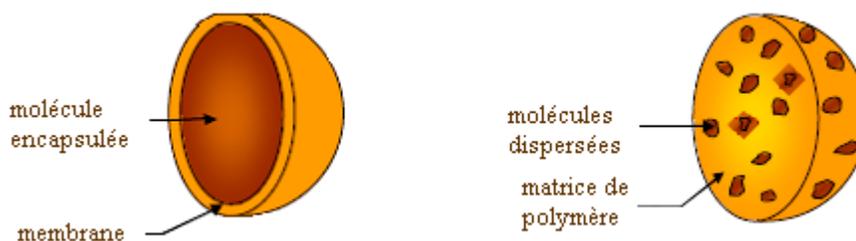


Figure 8. Exemple de microcapsules sous forme de sphère creuse et de sphère remplie avec matrice de polymère, adapté de la référence ^[16].

Selon les particules encapsulées, il existe des applications de la microencapsulation dans les domaines les plus divers : l'industrie pharmaceutique (médicaments), alimentaire (additifs, colorants et enzymes probiotiques), textile (colorants), cosmétique (parfums et essences) et l'agriculture (engrais et pesticides). La figure 9 nous en offre un aperçu, en se basant sur le nombre de publications scientifiques liées aux applications de la microencapsulation, entre 1970 et 2009.

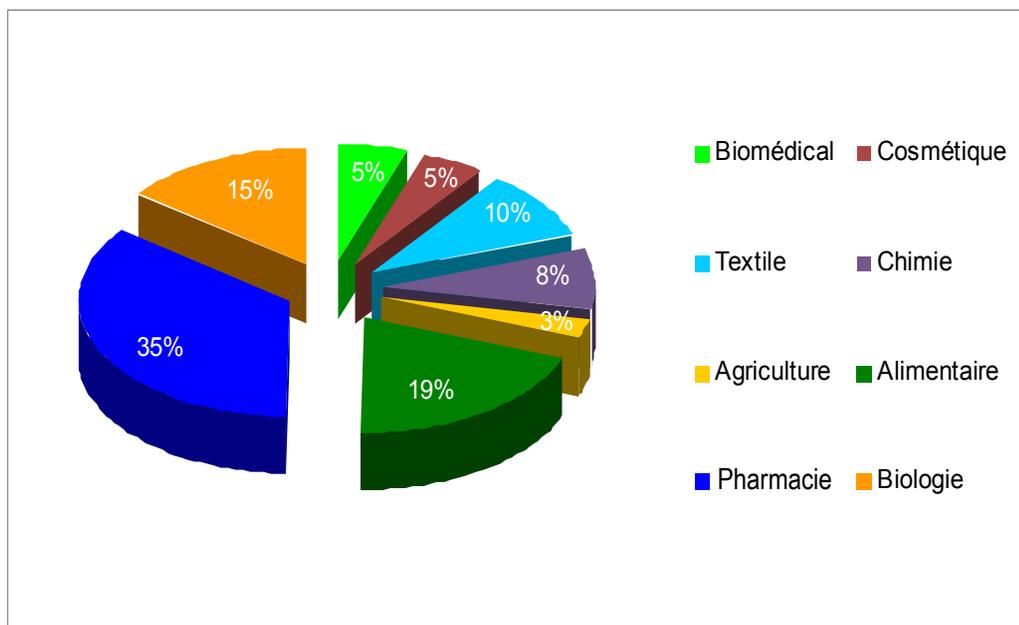


Figure 9. Répartition statistique des publications internationales entre les années 1970 et 2009, liées à la microencapsulation dans les divers domaines d'application. Source : SciFinder Scholar.

La grande variété des polymères synthétiques et naturels disponibles permet l'utilisation des microcapsules dans des applications particulièrement intéressantes, comme par exemple la synthèse des microcapsules permettant le contrôle de la libération des particules d'intérêt enfermées. La libération du principe actif peut durer de quelques heures jusqu'à plus de six mois. Deux exemples de polymères biodégradables utilisés sont les dérivés des acides lactiques et glycoliques ^[17] et la poly-epsilon-caprolactone ^[18]. La libération de la molécule d'intérêt se produit soit par rupture de la microcapsule, soit par diffusion lente et progressive des particules à travers la membrane extérieure. Ce procédé a rapidement trouvé beaucoup d'applications dans le domaine médical (libération contrôlée des médicaments) et aussi dans le domaine agricole, alimentaire, textile et cosmétique. Une autre application intéressante de la microencapsulation est représentée par l'encapsulation des cellules vivantes, utilisées pour le traitement de diverses maladies comme le cancer, le diabète, les affections du système nerveux central ou les déséquilibres endocrinologiques ^[19].

1.3 Les microréacteurs enzymatiques

Les microréacteurs sont des systèmes de réaction en miniature, qui sont conçus en combinant des techniques de microtechnologie et ingénierie de précision ^[8]. Ils sont des dispositifs qui ont des applications dans des divers domaines : synthèse organique, industrie, médecine et biotechnologie. Les microréacteurs enzymatiques ont été développés afin de faciliter le travail de routine dans la réalisation d'analyses biochimiques et pour leurs applications dans la biocatalyse. Dans la grande majorité, les microréacteurs enzymatiques sont des capillaires, remplis avec l'enzyme immobilisée. Comme pour les biocapteurs, une étape critique dans la conception des microréacteurs enzymatiques est l'immobilisation des enzymes, car l'immobilisation affecte les caractéristiques des enzymes, limitant ainsi le nombre des possibles applications des microréacteurs à une échelle commerciale. Les applications analytiques des microréacteurs enzymatiques peuvent être divisées en trois catégories ^[8]. La première utilise les microréacteurs afin de transformer un analyte difficile à mesurer dans une forme plus facilement analysable, en se basant sur le pouvoir biocatalytique des enzymes. L'exemple le plus édifiant de cette catégorie est le grand nombre des microsystèmes utilisés pour la digestion des protéines, pour les convertir en peptides, plus facile à analyser. La deuxième catégorie inclut les microréacteurs conçus pour la caractérisation du point de vue cinétique des différents systèmes enzyme-substrat ^[20]. La troisième catégorie est basée sur l'utilisation des microréacteurs enzymatiques pour des études quantitatives des réactions enzymatiques dans les biocapteurs ^[8, 21, 22].

1.3.1 Montages en-ligne des microréacteurs enzymatiques

L'utilisation des réacteurs enzymatiques à base d'enzymes immobilisées offre comme avantage principal une plus grande stabilité des enzymes par rapport aux changements de température, de pH ou dans la présence de solvants organiques, sans toutefois affecter de façon significative l'activité enzymatique de celles-ci

[23]. En utilisant les microréacteurs enzymatiques, l'enzyme d'intérêt peut être utilisée plus longtemps autant qu'elle est encore active, tout en réduisant les coûts et le temps d'analyse, offrant en même temps la possibilité de fonctionnement des microréacteurs en mode continu. Le grand avantage réside dans la séparation physique du produit de l'enzyme (donc absence des molécules d'enzyme dans la solution), ce qui facilite davantage le dosage du produit. Tous ces facteurs améliorent la précision et la reproductibilité de la méthode analytique choisie [23]. L'automatisation et la facilité de contrôle des montages en ligne ont mené à l'apparition des microréacteurs enzymatiques couplés en ligne aux systèmes analytiques comme la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et l'électrophorèse capillaire (EC). Les montages en ligne permettent la combinaison de la spécificité de la réaction enzymatique avec la sélectivité, rapidité et reproductibilité de la méthode d'analyse. Ainsi la sensibilité du système de détection est considérablement améliorée et la détermination de composés à niveau de traces dans des matrices complexes devient possible [23]. Toutefois, il existe des problèmes qui se posent au niveau de l'utilisation des montages en ligne des microréacteurs enzymatiques. Premièrement, les divers substrats utilisés lors des réactions enzymatiques peuvent rester liés non-spécifiquement à l'enzyme et/ou au support solide, menant ainsi aux élargissements des pics supplémentaires [24]. Un autre problème qui se pose consiste dans le fait que, tout dépendant de la méthode d'immobilisation choisie, la diffusion du substrat au site actif de l'enzyme peut être inférieure à la vitesse de réaction enzymatique proprement-dite, et alors le système entier fonctionne sous conditions de limitation diffusionnelle. Bien que ces systèmes (CLPH et EC) soient connus pour leur rapidité d'analyse, cet avantage ne peut pas être exploité en pratique dans ces couplages en ligne où la vitesse de réaction enzymatique est limitée par la vitesse de diffusion du substrat. [23]

Les méthodes d'immobilisation d'enzymes disponibles sont très nombreuses (voir section 1.2) et l'évaluation de leurs performances est faite par rapport à l'influence qu'elles manifestent sur l'enzyme elle-même (stabilité, durée de vie,

activité enzymatique, désactivation ou régénération) et aussi par rapport aux applications analytiques possibles. En fonction du type de procédé utilisé pour l'immobilisation de l'enzyme à l'intérieur du microréacteur, les méthodes d'immobilisation sont classifiées en deux catégories : immobilisation "*in situ*" or "*in batch*". La première catégorie comprend toutes les méthodes par lesquelles les enzymes sont immobilisées directement dans un capillaire pré-rempli avec le support, tandis que la deuxième catégorie réunit toutes les méthodes où les enzymes sont d'abord immobilisées sur le support et ensuite compactées dans le capillaire. Après avoir immobilisé l'enzyme à l'intérieur du microréacteur, celui-ci est utilisé dans l'application pour laquelle il a été conçu. Les montages en ligne utilisant des microréacteurs enzymatiques sont divisés en deux catégories : montages pré-colonne et post-colonne. Les montages pré-colonne sont utilisés pour des applications très diverses : purification des échantillons, pré-traitement enzymatique des analytes afin de réaliser des cartes peptidiques ^[25], synthèse en ligne des composés chirales ou achirales ^[26] et études cinétiques des réactions enzymatiques ^[20]. Les montages post-colonne sont utilisés surtout à des fins de détection; après avoir séparé les analytes, ceux-ci sont davantage convertis, à travers le microréacteur, à des produits qui ont une meilleure absorbance, fluorescence ou des propriétés électrochimiques, qui les rendent plus facilement détectables ^[23].

1.4 *La laccase*

Les enzymes étant des éléments de reconnaissance très utilisés dans les biocapteurs, nous avons choisi la laccase comme biomolécule à étudier. Elle sera utilisée dans ce projet pour déterminer l'efficacité de la microencapsulation et pour modéliser son comportement dans des microréacteurs enzymatiques.

La laccase est une enzyme oxydoréductase qui se trouve en quantité importante dans des diverses plantes et champignons. Le site actif de l'enzyme comporte quatre ions cuivriques qui sont classés en trois types qui dépendent de leur

ligands dans l'enzyme et de leur fonction, car chaque type de cuivre est impliqué dans un processus différent de la conversion du substrat ^[27]. Le cuivre de type 1 est lié à une fonction thiol et présente une forte bande d'absorption à 600 nm (couleur bleue). Le second est le cuivre de type 2. Les deux derniers (type 3) sont étroitement associés et forment un centre diamagnétique par un pont métallique de type Cu-(OH)-Cu. L'oxydation du substrat a lieu à l'emplacement du cuivre de type 1 (Cu_{T1}), puis le transfert électronique se fait via l'enzyme jusqu'au site des cuivres de type 2 et 3 (Cu_{T2} et Cu_{T3}) où la réduction de l'oxygène a lieu ^[28] (figure 10).

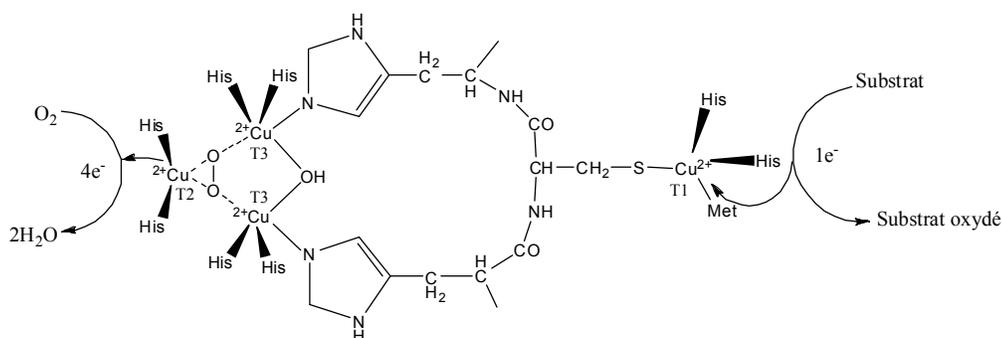


Figure 10. Structure chimique d'une portion du site actif de la laccase montrant l'emplacement des atomes de cuivre impliqués dans la réaction enzymatique, adapté de la référence ^[29].

La laccase réduit l'oxygène en eau (et non pas en peroxyde) catalysant des oxydations sur une gamme étendue de diphénols, polyphénols, phénols substitués, o- et p-quinones, aminophénols et phénylènediamines. Elle peut oxyder le Mn(II) en Mn(III), qui à son tour attaque bon nombre de substrats. Ces oxydations produisent souvent des radicaux qui évoluent par des réactions secondaires (polymériques) non enzymatiques à l'origine de produits colorés ^[27]. La laccase est connue pour le rôle important qu'elle joue dans la dégradation des phénols ce qui la rend très utile dans la décontamination des eaux industrielles ^[30]. Les dérivés polymériques polyphénoliques qui résultent suite à l'oxydation enzymatique sont généralement insolubles et facilement séparables par filtration ou sédimentation. Cette application de la dégradation des composés phénoliques par la laccase s'utilise aussi dans l'industrie alimentaire, pour la stabilisation des

brevages divers comme les jus de fruits, les vins et les bières ^[31]. Présentement, la plus importante application technologique de la laccase se trouve dans l'industrie textile, l'industrie des colorants ^[32] et l'industrie de papier – pour la délignification des fibres de bois, particulièrement pendant le processus de blanchissement ^[33, 34].

Le substrat (comme les phénols) peut être oxydé soit directement par l'enzyme, soit par l'intermédiaire d'un médiateur (figure 11). Les médiateurs sont utilisés lorsque le substrat d'intérêt (comme c'est le cas des lignines) ne peut pas être oxydé directement par l'enzyme à cause de sa taille qui lui ne permet pas de pénétrer à l'intérieur du site actif ou parce qu'il a un potentiel redox particulièrement élevé ^[30].

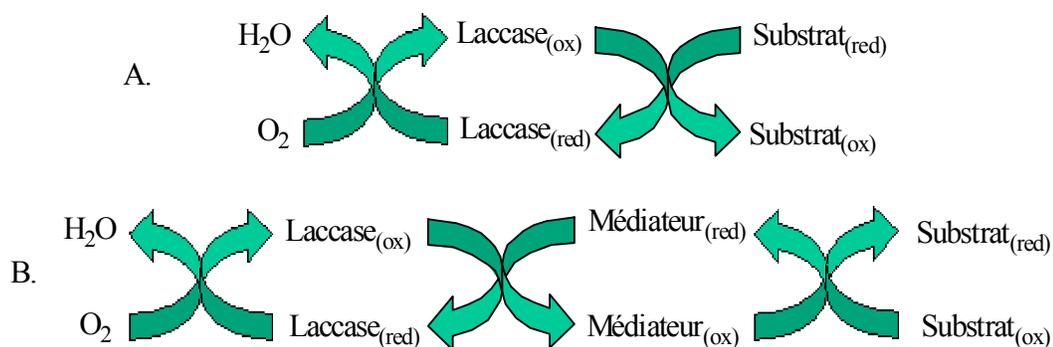


Figure 11. Représentation des oxydations enzymatiques catalysées par la laccase A. en absence ou B. en présence de médiateurs chimiques.

Le premier médiateur artificiel utilisé dans un système laccase-médiateur pour la délignification de la pâte à papier a été l'acide 2,2'-azino-bis (3éthylbénzothiazoline-6-sulphonique), connu sous le nom d'ABTS et qui a été introduit en 1990 ^[35]. Étant donné la grande variété des produits oxydables par la laccase, des biocapteurs à base de laccase ont été développés, pour l'analyse d'échantillons environnementaux complexes ^[36].

Puisque les enzymes agissent en modifiant la vitesse des réactions, il est nécessaire d'étudier la cinétique des réactions pour comprendre leur mode

d'action. Dans les biocapteurs, les enzymes sont des catalyseurs et la quantité d'enzyme immobilisée doit être évaluée afin d'établir l'efficacité de la méthode d'immobilisation et d'en évaluer l'impact sur l'enzyme. Pour arriver à ce but, de comparer le comportement de l'enzyme libre avec celui de l'enzyme encapsulée, l'activité enzymatique ainsi que la cinétique enzymatique des deux sont évaluées.

1.4.1 L'activité enzymatique de la laccase

L'activité enzymatique est une notion fondamentale pour la caractérisation des enzymes, compte tenant du fait que généralement, elles sont mélangées à d'autres protéines et ne se trouvent pas dans un état pur lors des réactions qu'elles catalysent. Pour cette raison, il faut trouver une méthode pour repérer leur présence et pour quantifier les effets qu'elles provoquent. La quantité de matière transformée dans l'unité de temps est fonction du nombre de molécules d'enzymes. Dans une unité de temps donnée et dans des conditions optimales de fonctionnement, on peut considérer que chaque molécule d'enzyme catalyse la transformation du même nombre de molécules de substrat ^[27]. C'est ce qu'on définit comme UNITÉS D'ACTIVITÉ. La valeur de l'activité enzymatique dépend de nombreux facteurs comme la nature et la concentration du substrat, le pH, la température, la force ionique et ces facteurs devraient, si possible, être optimales ^[37]. L'activité enzymatique représente donc la quantité d'enzymes réellement actives par rapport à un substrat donné et elle est mesurée par rapport à un substrat de référence, dans des conditions de pH et de température déterminées. Un autre paramètre de caractérisation d'une enzyme est l'activité spécifique. Elle est une mesure du degré de pureté d'une enzyme et représente l'activité enzymatique par milligramme de protéine totale.

Puisque la laccase agit sur une large variété de substrats, la mesure de son activité enzymatique peut se faire en utilisant divers substrats, ainsi que différentes méthodes de détection ^[38]. Toutefois, le substrat de référence utilisé pour la laccase est l'acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS),

dont la réaction d'oxydoréduction est présentée dans la figure 12 ^[39]. Le radical formé (ABTS^{•-}) présente un maximum d'absorption à 420 nm ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ^[40] et donc des mesures spectrophotométriques peuvent être utilisées pour calculer l'activité enzymatique de l'enzyme libre.

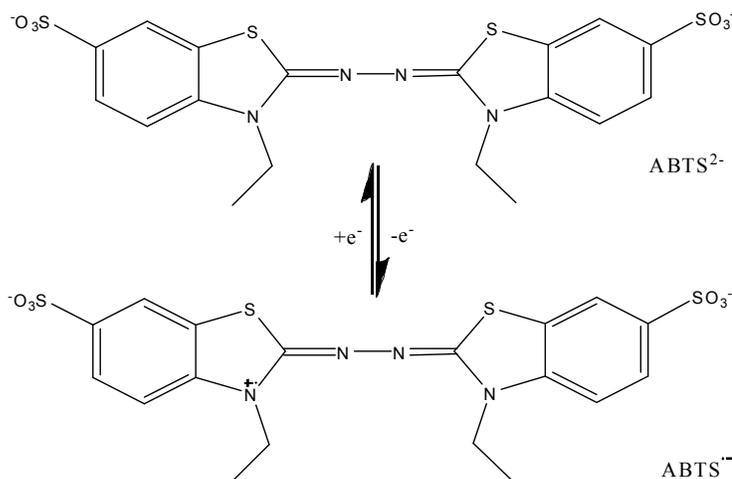


Figure 12. Structure des formes réduite (ABTS²⁻) et oxydée (ABTS^{•-}) de l'ABTS, tiré de la référence ^[39].

Les paramètres cinétiques de la laccase en solution ont été évalués en utilisant comme substrat l'ABTS. Par contre, l'ABTS n'est pas le premier choix pour les essais avec la laccase microencapsulée. En fait, les microcapsules synthétisées portent une charge positive sur leur paroi polymérique et sous sa forme réduite l'ABTS est chargé négativement (2⁻), ce qui l'empêche de pénétrer la microcapsule pour réagir avec la laccase. Donc il ne peut pas être utilisé pour mesurer l'activité enzymatique de la laccase encapsulée. Alors il a fallu trouver un autre substrat qui ne soit pas négatif à la valeur du pH de la solution tampon utilisée pour la réaction enzymatique. Pour cette raison nous avons décidé de choisir l'ortho-phenylènediamine (OPD) comme substrat modèle pour notre projet de recherche. Son $pK_a = 4,47$ lui confère un caractère cationique dans le domaine de pH utilisé pour la réaction enzymatique.

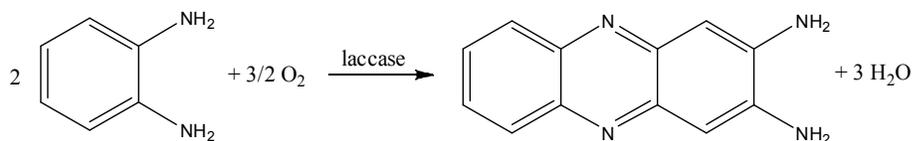


Figure 13. Réaction d'oxydation de l'ortho-phenylènediamine catalysée par la laccase et le produit de réaction, le 2,3-diaminophénazine.

Un autre avantage du choix de l'OPD comme substrat modèle pour notre étude vient du fait que celui-ci réagit avec la laccase d'après une stoechiométrie déjà établie^[38] et le produit de réaction, le 2,3-diaminophénazine (DAP) présente deux maximums d'absorbance, soit à 254 et 420 nm. La vitesse d'apparition du DAP peut donc être mesurée par spectrophotométrie.

1.4.2 Techniques pour évaluer les paramètres cinétiques de la laccase

La cinétique enzymatique décrit les mécanismes des réactions catalysés par les enzymes en étudiant leur vitesse (leur évolution en fonction du temps)^[37]. La formation d'un complexe entre l'enzyme et son substrat constitue le concept central de la catalyse enzymatique. On explique généralement l'accélération de la vitesse (la catalyse) de la réaction enzymatique par un abaissement général de la barrière énergétique que le système doit franchir. Dans la figure 14, la variation d'énergie libre entre l'état initial et l'état final est désignée par ΔG ^[27].

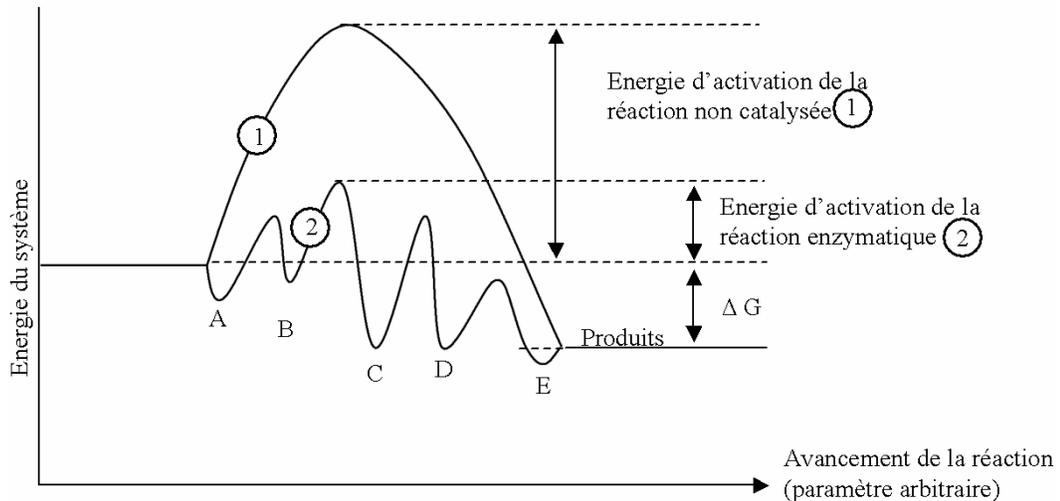


Figure 14. Schéma de l'avancement d'une réaction chimique du point de vue énergétique en comparant la réaction catalysée par les enzymes et la réaction non catalysée ^[27]. A, B, C, D, E sont des étapes transitoires de la réaction enzymatique.

Les enzymes décomposent une réaction donnée en une cascade d'étapes transitoires (A...E) qui ne sont séparées les unes des autres que par des barrières énergétiques faibles. La plus haute de ces barrières règle l'énergie d'activation globale de la réaction enzymatique (trajet 2 dans la figure 14), et est inférieure à l'énergie d'activation de la réaction non catalysée (trajet 1 dans la figure 14). La réaction s'écoule d'autant plus vite que l'énergie d'activation correspondante est plus basse. Les minima intermédiaires A, B et suivants correspondent à des états intermédiaires du système. Ils correspondent au niveau énergétique atteint par l'ensemble formé par l'enzyme et les réactifs en cours de transformation. Le système évolue par une cascade de petits événements conduisant à des intermédiaires réactionnels, qui peuvent être caractérisés éventuellement par spectrométrie ^[27]. Ces intermédiaires n'ont généralement qu'une vie brève mais ils peuvent être analysés et séparés par des méthodes d'analyse modernes.

1.4.2.1 Loi de Michaelis-Menten

En se basant sur les résultats obtenus par Victor Henri ^[37], Michaelis et Menten (1913) ont proposé une équation de vitesse représentant le mécanisme d'action des enzymes. Le principe fondamental du fonctionnement des enzymes est la formation du complexe enzyme-substrat, ES, en équilibre avec le substrat libre (figure 15). Ce mécanisme implique une première étape de fixation du substrat sur l'enzyme et une seconde étape de conversion du substrat en produit, qui se déroule au sein du complexe enzyme-substrat ^[37]. La seconde étape se termine par la libération du produit et l'enzyme revient alors à son état initial (régénération du catalyseur).

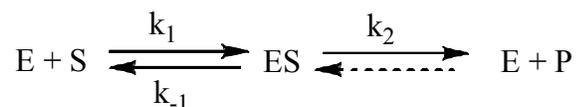


Figure 15. Équation d'une réaction enzymatique de type Michaelis-Menten, tirée de la référence ^[27].

La vitesse totale de la réaction dépend donc de ces deux étapes. De façon générale, la constante k_2 est beaucoup plus faible que k_{-1} , ce qui veut dire que la transformation en produit est l'étape limitante par rapport à l'association entre le substrat et l'enzyme. La vitesse totale du processus dépend de plusieurs facteurs comme la concentration de substrat, la concentration de l'enzyme ainsi que des conditions expérimentales (température, pH). L'équation de Michaelis-Menten prédit que pour une concentration faible de substrat, la vitesse est directement proportionnelle à cette concentration mais que, pour une concentration suffisamment élevée de substrat la vitesse de la réaction devient indépendante de la concentration de substrat et atteint une limite qu'elle ne peut pas dépasser (V_{max}). À ce moment l'enzyme est saturée en substrat, la concentration du substrat n'a plus d'influence sur la vitesse de réaction, car la vitesse est limitée par l'enzyme elle-même.

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

où v = vitesse initiale (mol/s)

V_{\max} = vitesse maximale (mol/s)

$[S]$ = concentration du substrat (M)

K_M = constante de Michaelis-Menten (M)

La courbe définie par l'équation 4 et présentée dans la figure 16, a la forme d'une hyperbole rectangulaire passant par l'origine. La vitesse initiale dépend de la concentration de substrat ainsi que de la constante d'affinité (K_M) entre le substrat et l'enzyme. Dans le cas particulier où $v = V_{\max}/2$, on obtient $K_M = [S]$. Ainsi, la valeur de K_M correspond à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de la réaction. Plus elle est petite, plus l'affinité entre le substrat et l'enzyme est grande, alors il faut moins de substrat pour obtenir la moitié de la vitesse maximale.

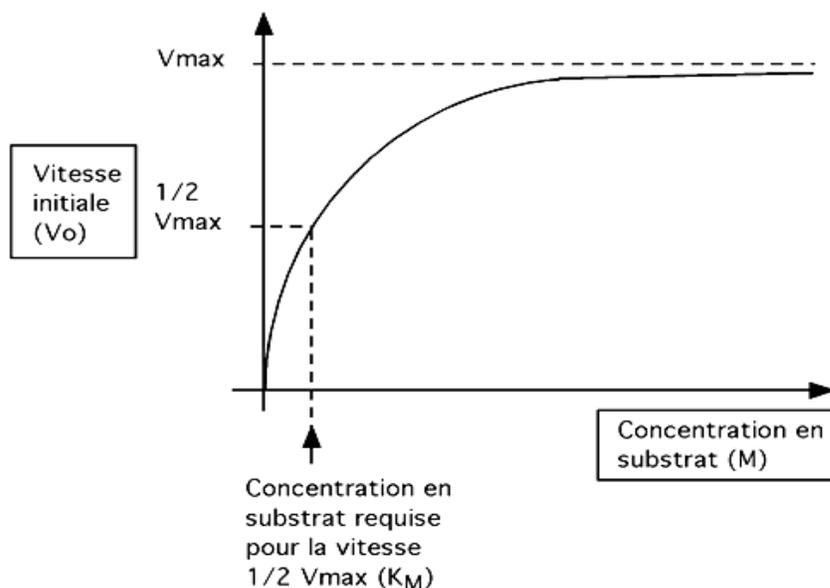


Figure 16. Dépendance de la vitesse initiale vis-à-vis de la concentration du substrat pour une réaction obéissant à l'équation de Michaelis-Menten.

Dans le cadre de notre projet, les paramètres cinétiques (K_M et V_{max}) ainsi que l'activité enzymatique ont été mesurés pour la laccase libre et pour la laccase encapsulée afin de caractériser l'effet de l'immobilisation sur l'enzyme et les résultats seront discutés dans le chapitre 3.

1.4.2.2 Évaluation de l'activité enzymatique en utilisant la cellule à oxygène

Puisque la laccase est une enzyme qui réduit l'oxygène, il est possible d'en mesurer l'activité enzymatique en utilisant l'électrode de Clark ^[40]. La cellule à oxygène est constituée d'une membrane en teflon (figure 17) perméable aux gaz et l'oxygène passe à travers cette membrane pour arriver à l'électrode de travail où il est réduit en eau (équation 5) grâce à l'application d'un potentiel suffisamment négatif (-0,6 V vs. Ag/AgCl).



La réaction d'oxydation complémentaire a lieu à l'électrode Ag/AgCl :



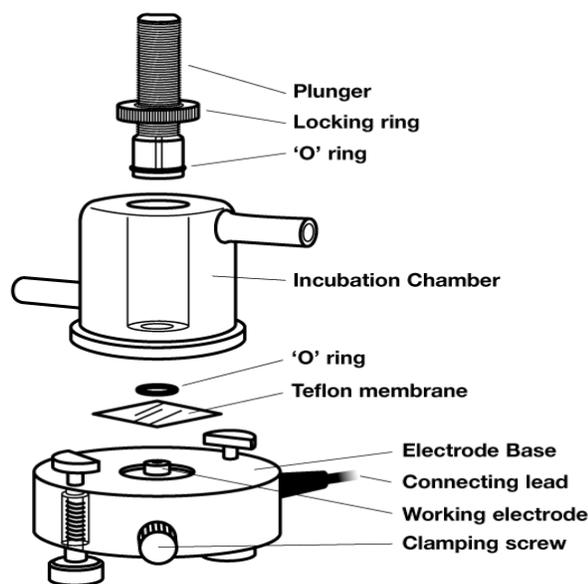


Figure 17. Schéma de la cellule à oxygène, tiré de la référence ^[41]. La membrane semi-perméable en Téflon sépare la cellule de l'électrode et permet le passage de l'oxygène qui est réduit à l'électrode de travail.

Le courant enregistré est proportionnel à la pression partielle d'oxygène dans la cellule, qui est une mesure directe de la concentration de celui-ci dans la solution (loi de Henry). Lorsque de l'oxygène est consommé dans l'oxydation enzymatique du substrat, sa concentration dans la cellule diminue, ce qui entraîne une diminution du courant électrique (équation 7). Alors le courant mesuré peut être relié à la vitesse de consommation du substrat, par l'intermédiaire de la consommation d'oxygène.

$$i_d = \frac{4F \times P_m \times A \times P(O_2)}{b} \quad (7)$$

où F = constante de Faraday ($96\,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

P_m = perméabilité du téflon à O_2 ($\text{mol} \cdot \text{atm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

A = aire de l'électrode (cm^2)

$P(O_2)$ = pression d'oxygène (atm)

b = épaisseur de la membrane de téflon (cm).

Cette méthode de mesure de l'activité enzymatique est particulièrement utile pour déterminer l'activité enzymatique et les paramètres cinétiques de la laccase encapsulée, parce que les capsules en solution créent une solution turbide, ce qui peut fausser les mesures effectuées par spectrophotométrie.

1.4.2.3 Évaluation de l'activité enzymatique en utilisant l'absorption moléculaire UV-Vis

Comme déjà mentionné, les produits des réactions enzymatiques de la laccase avec les différents substrats comme l'ABTS et l'OPD peuvent être suivis en utilisant la spectrophotométrie. En mesurant l'absorbance en fonction du temps on peut suivre la vitesse d'apparition du produit de réaction qui est directement reliée à la vitesse de consommation du substrat et on arrive à calculer l'activité enzymatique de la laccase par rapport au substrat choisi. L'activité standard est exprimée en unités, une unité étant la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 mol d'ABTS (ou OPD) par minute.

L'activité volumique d'une solution de laccase est calculée selon l'équation 8 :

$$\text{Activité volumique (U/mL)} = \frac{\partial A}{\partial t} \frac{V_c}{\epsilon l} \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{\text{mol}} \frac{1}{V_{enz}} \quad (8)$$

où $\frac{\partial A}{\partial t}$ = variation de l'absorbance de ABTS^{•-} (ou DAP) en fonction du temps

(Abs/min)

V_c = volume de la cellule à mesure (L)

ϵ = coefficient d'absorptivité molaire de l' ABTS^{•-} (ou DAP)(M⁻¹ cm⁻¹)

l = chemin optique (cm)

V_{enz} = volume de la solution d'enzyme dans la cellule (mL)

La spectrophotométrie a été utilisée comme méthode d'évaluation de l'activité enzymatique et des paramètres cinétiques de la laccase libre, car la laccase encapsulée (les microcapsules) forme une solution turbide dont le signal d'absorbance peut être faussé à cause de la dispersion de la lumière.

Ces deux méthodes nous permettent d'évaluer l'activité enzymatique et les paramètres cinétiques de la laccase en réaction avec les substrats choisis, mais elles présentent un inconvénient majeur : on ne peut pas quantifier le substrat et le produit de la réaction enzymatique individuellement, à cause de chevauchement des spectres pour la spectrophotométrie UV-Vis et à cause de la mesure indirecte de la consommation de l'oxygène par l'autre méthode. Donc, pour suivre du point de vue quantitatif la réaction enzymatique d'intérêt, nous avons besoin d'une méthode de séparation performante, couplée à l'absorption UV-Vis qui sert comme méthode de détection.

Après avoir caractérisé l'enzyme libre et immobilisée, on s'est concentré sur l'étude quantitative de la réaction enzymatique catalysée par la laccase. L'électrophorèse capillaire a été choisie comme méthode de séparation dans le cadre de ce projet, grâce à sa haute efficacité comme méthode d'analyse.

1.5 L'électrophorèse capillaire pour des applications quantitatives

L'électrophorèse capillaire est une technique de séparation de choix grâce à son haut pouvoir de résolution. Le principe de séparation en électrophorèse capillaire consiste dans le déplacement des molécules chargées dans un capillaire de faible diamètre sous l'influence d'un champ électrique assez important. Elle est apparue comme réponse au besoin de disposer des techniques d'analyse de haute résolution, de précision quantitative et qui produit des déchets en une faible quantité.

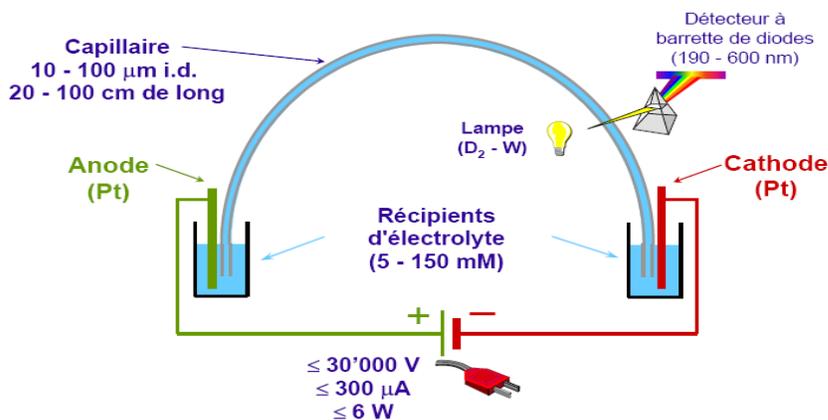


Figure 18. Schéma général d'un système d'électrophorèse capillaire tiré de la référence ^[42].

La migration des espèces est le résultat de deux mécanismes qui coexistent en électrophorèse capillaire, l'électromigration et l'électroosmose. L'électromigration représente tout simplement l'attraction que les molécules chargées en solution ont pour la cathode ou l'anode. Sous l'influence d'un champ électrique, les espèces se déplacent vers l'électrode de charge opposée avec une vitesse linéaire selon leur mobilité électrophorétique (μ_{ep}), qui est fonction de leur charge et masse ^[43].

Ce phénomène peut être décrit selon l'équation 9 :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\eta\pi r} \quad (9)$$

où

- μ_{ep} = mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)
- q = charge électrique de l'ion (C)
- η = viscosité du milieu (cP)
- r = rayon hydrodynamique de l'analyte (cm).

D'après l'équation 9, on déduit qu'une particule petite et portant une charge élevée a une mobilité très grande, orientée vers l'électrode de charge opposée, tandis qu'une particule large portant une faible charge aura une mobilité réduite.

Le deuxième phénomène, le flux électroosmotique ne dépend pas du tout de la nature ou de la charge des analytes en solution. Le capillaire est fait de silice fondue et la paroi intérieure du capillaire est couverte de groupes SiOH qui ont une valeur du $pK_a \sim 6$. Au contact d'une solution aqueuse, ces groupes seront en équilibre avec leur forme déprotonée, le SiO^- :



L'équilibre décrit entre les deux formes peut être déplacé en contrôlant le pH de la solution aqueuse. Plus le pH est bas, plus la concentration de protons en solution sera élevée donc plus l'équilibre sera favorisé vers la formation de SiOH. L'équilibre change de direction lorsque le pH augmente et de plus en plus de contre-ions (des cations dans la majorité des cas) provenant de la solution tampon se collent sur la paroi afin de respecter la loi de l'électroneutralité. Une double couche est alors formée : la première couche d'ions s'absorbe sur la paroi du capillaire et est très compacte et statique (couche de Stern) tandis que la deuxième couche est diffuse et plus éloignée de la paroi (couche de Gouy-Chapman). La formation de cette double couche entraîne la création d'une différence de potentiel, connue sous le nom de potentiel zéta (ξ). Lorsque le voltage est appliqué, les cations de la couche diffuse se mettent en mouvement vers la cathode et puisque ces cations sont solvatés, ils entraînent avec eux la masse de la solution de l'intérieur du capillaire, formant ainsi un flux de solution vers la cathode, phénomène connu sous le nom de flux électroosmotique. Le flux électroosmotique a un profil plat, contrairement à l'écoulement laminaire observé en chromatographie liquide. Cela se traduit en un pouvoir de séparation supérieur à celui de la chromatographie liquide, grâce au fait que l'intérieur du capillaire de séparation ne contient pas de phase stationnaire. Les avantages de l'utilisation des capillaires se traduisent dans l'absence de la résistance au transfert de masse et dans l'absence des chemins multiples, deux facteurs connus en chromatographie comme des sources d'élargissement des pics. C'est principalement pour cette raison que les séparations en électrophorèse capillaire sont beaucoup plus efficaces que les séparations par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

La mobilité électroosmotique peut être calculée à partir de l'équation 10 :

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \xi}{4\eta\pi} \quad (10)$$

où μ_{eof} = mobilité électroosmotique ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

ε = constante diélectrique du milieu

ξ = potentiel zéta (V)

η = viscosité du milieu (cP)

Puisque l'électromigration et l'électroosmose coexistent durant une séparation en électrophorèse capillaire, il est important de mentionner que la vitesse apparente des analytes (v_{app}) est la somme des deux phénomènes, comme le montre l'équation 11 :

$$v_{app} = (\mu_{ep} + \mu_{eof})E \quad (11)$$

où E = champ électrique (V cm^{-1}).

En conséquence, une particule portant une charge positive se déplacera vers la cathode avec une mobilité égale à la somme des deux mobilités, électroosmotique et électrophorétique, tandis que pour une particule chargée négativement, les deux mobilités auront un sens contraire. Si la molécule a une charge négative, la mobilité électrophorétique déplacera la molécule vers l'anode. Toutefois, la mobilité électroosmotique a généralement une valeur assez grande pour entraîner toutes les particules vers la cathode, et les molécules qui sortiront en premiers seront les cations de petite taille, suivis par les cations plus grand ou portant une charge plus faible, les molécules neutres et en dernier sortiront les anions de petite taille portant une charge élevée.

L'efficacité des séparations en électrophorèse capillaire est généralement plus grande que celle d'autres méthodes de séparation telles que la CLHP. Le nombre

de plateaux théoriques (N), ou l'efficacité, en électrophorèse capillaire peut être calculé comme en chromatographie :

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D_m} \cdot \frac{L_d}{L_t} \quad (12)$$

où μ_{ep} = mobilité électrophorétique de l'analyte d'intérêt ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

μ_{eo} = mobilité électro-osmotique ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

V = valeur du potentiel appliqué (V)

L_d = longueur du capillaire jusqu'au détecteur (cm)

L_t = longueur totale du capillaire (cm)

D_m = coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

La résolution (R) entre deux pics, qui est une mesure de la qualité de la séparation, est donnée par :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\Delta\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo}} \right) \quad (13)$$

où N = nombre de plateaux théoriques

$\Delta\mu_{ep} = \mu_{ep,j} - \mu_{ep,i}$ ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

$\bar{\mu}_{ep}$ = mobilité électrophorétique moyenne ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

μ_{eo} = mobilité électro-osmotique ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)

Il existe plusieurs modes d'électrophorèse capillaire qui servent à analyser une large variété d'analytes ^[43]. Le plus simple, le plus utilisé et le plus commun mode d'électrophorèse capillaire est l'électrophorèse capillaire en solution libre (CZE ou FSCE) où le mécanisme de séparation repose sur le rapport charge-sur-masse (q/M). Pour notre projet, nous avons choisi ce mode d'analyse et les détails sur les conditions de séparation seront donnés dans le chapitre suivant.

1.6 Objectifs généraux

L'objectif principal de ce projet de recherche est d'étudier l'efficacité de la microencapsulation, qui, grâce aux avantages présentés, a été choisie comme méthode d'immobilisation de l'enzyme d'intérêt, soit la laccase. Les microcapsules sont préparées par condensation interfaciale entre un polymère hydrosoluble et un agent réticulant soluble dans un solvant organique. Les détails de ce procédé sont donnés dans le chapitre 2. Le résultat de la réticulation interfaciale entre les deux phases est une sphère creuse qui contient l'enzyme en solution aqueuse. La membrane formée est semi-perméable et permet la diffusion des diverses molécules (par exemple le substrat) à l'intérieur des microcapsules, sans laisser échapper l'enzyme ^[44]. Après avoir synthétisé les microcapsules, nous avons évalué l'impact de la microencapsulation sur le comportement de l'enzyme, en comparant les divers paramètres cinétiques caractérisant l'enzyme libre et immobilisée, résultats qui sont présentés dans le chapitre 3. Ensuite, une méthode de séparation en EC a été développée (chapitre 4) afin de quantifier l'efficacité de la conversion du substrat choisi en son produit résultant de l'oxydation enzymatique subie. Cette méthode a été utilisée pour caractériser la laccase libre, laccase immobilisée et laccase immobilisée à l'intérieur d'un microréacteur, afin de mieux comprendre la comportement probable de l'enzyme dans des biocapteurs. Les résultats de ces essais ainsi que les résultats préliminaires du montage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire sont présentés dans le chapitre 5.

CHAPITRE 2
MATÉRIELS ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1. Provenance des produits

L'enzyme laccase II (E.C. 1.10.3.2) provenant de *Trametes Versicolor* a été produite et partiellement purifiée par chromatographie d'échange ionique sur DEAE-Bio-Gel comme décrit précédemment ^[35]. L'*o*-phenylènediamine (OPD), 2,3-diaminophenazine (DAP, 90%), polyéthylèneimine (PEI, $M_n = 1200$ g/mol, 50% dans l'eau), cyclohexane, Span®80 et dichlorure de décandioyle (97%, densité = 1,119 g/mL) ont été obtenus de Sigma – Aldrich Canada (Oakville, Canada). Le polysorbate 20 a été acheté chez VWR (Buffalo Grove, IL, USA) et le 2,2'-azino-bis(3éthylbénzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) a été acheté chez Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN, USA). L'acétate de sodium, l'acide acétique, le phosphate de sodium monobasique et l'acide phosphorique utilisés pour la préparation des solutions tampons ont été achetés chez A&C American Chemicals Ltd. (Montréal, Canada). L'eau distillée et deionisée a été obtenue avec un système de filtration/deionisation d'eau MilliQ de Millipore (Etobicoke, Canada). L'azote a été obtenu de Praxair (Montréal, Canada). Les capillaires en silice fondue (50 μm d.i. x 360 μm d.e.; 530 μm d.i. x 800 μm d.e.) ont été achetées chez Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, USA) et Chromatographic Specialties (Brockville, Canada). Les seringues de 1 mL et les filtres en nylon de 0,2 μm (largeur des pores) ont été achetés chez Chromatographic Specialties. Les filtres en microfibre de verre de 1,5 μm (largeur des pores) ont été obtenus de Whatman Inc. (Piscataway, NJ, USA).

2.2 Préparation des microcapsules par agitation mécanique

La procédure choisie pour encapsuler la laccase dans des microcapsules est basée sur celle utilisée par le groupe de Poncelet ^[45]. Les microcapsules sont faites en polymère réticulé par polymérisation interfaciale. Le polyéthylèneimine (PEI) est un polymère hydrosoluble et l'agent réticulant en solution organique (cyclohexane) est le dichlorure de décanedioyle. L'agent réticulant réagit avec les fonctions amines primaires et secondaires du PEI selon un mécanisme de réaction d'addition-élimination, détaillé dans la figure 20.

La phase aqueuse est formée de 8,1 mL eau pure dans laquelle on ajoute 0,8 mL de solution de laccase (~ 3850 U/mL vs ABTS) et 1 mL de polymère (PEI $M_w = 1300$, 50% (m/m)). La phase organique (I) est formée de 50 mL de cyclohexane (2% (v/v) Span[®]80). Une deuxième phase organique (II) est formée de 20 mL de cyclohexane contenant le dichlorure de décanedioyle (0,10 mol/L).

La première étape de préparation des microcapsules consiste dans la dispersion de la phase aqueuse dans la phase organique I. La dispersion a lieu dans un bêcher de 250 mL contenant la phase organique, dans laquelle on ajoute la phase aqueuse. Le tout est soumis à une agitation mécanique ayant une durée de 2 minutes, à une vitesse de 1640 t/min; pendant ce temps, des microgouttelettes sont formées suite à l'agitation mécanique du mélange des deux phases (organique et aqueuse) ce qui mène à la formation d'une émulsion blanche. Le rôle du surfactant Span[®]80 ajouté dans la phase organique I est de stabiliser l'émulsion formée. Après 2 minutes, on ajoute la phase organique II, contenant l'agent réticulant et le processus de polymérisation commence à l'interface de ces microgouttelettes. Le processus de formation de microcapsules a lieu sous agitation mécanique, à la même vitesse, pour une période de temps de 10 minutes. Le résultat consiste dans la formation de microcapsules insolubles dans lesquelles l'enzyme présente initialement dans la phase aqueuse a été emprisonnée.

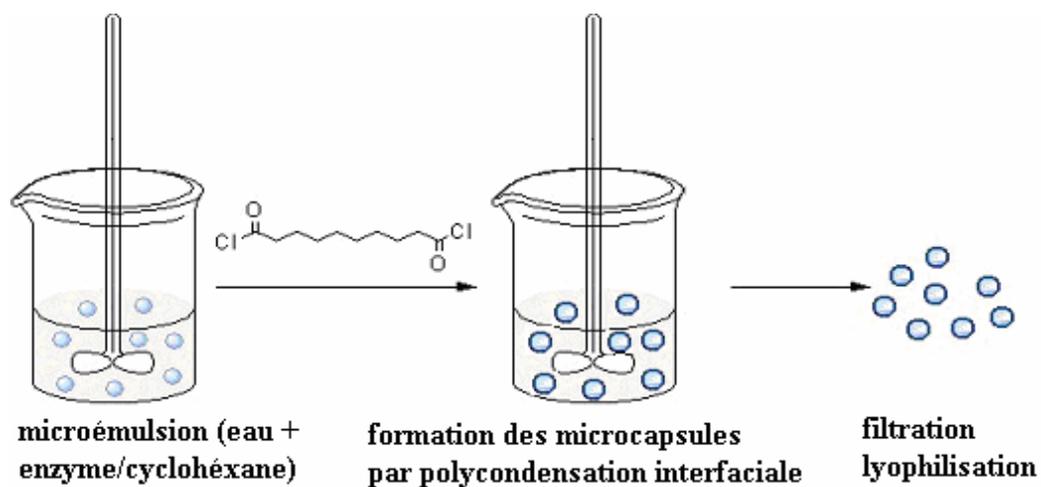


Figure 19. Schéma de la synthèse des microcapsules par agitation mécanique.

Après 10 minutes, la réaction de polymérisation est arrêtée en ajoutant un volume de 50 mL de cyclohexane. L'agitation est arrêtée et le mélange est laissé au repos pour 7 minutes. Pendant ce temps, les microcapsules se déposent au fond du bûcher. Le surnageant est enlevé et du cyclohexane (50 mL) est rajouté. Les microcapsules formées sont filtrées et rincées avec environ 500 mL d'eau MilliQ. Les capsules bien filtrées sont récupérées, pesées et conservées à 4⁰C.

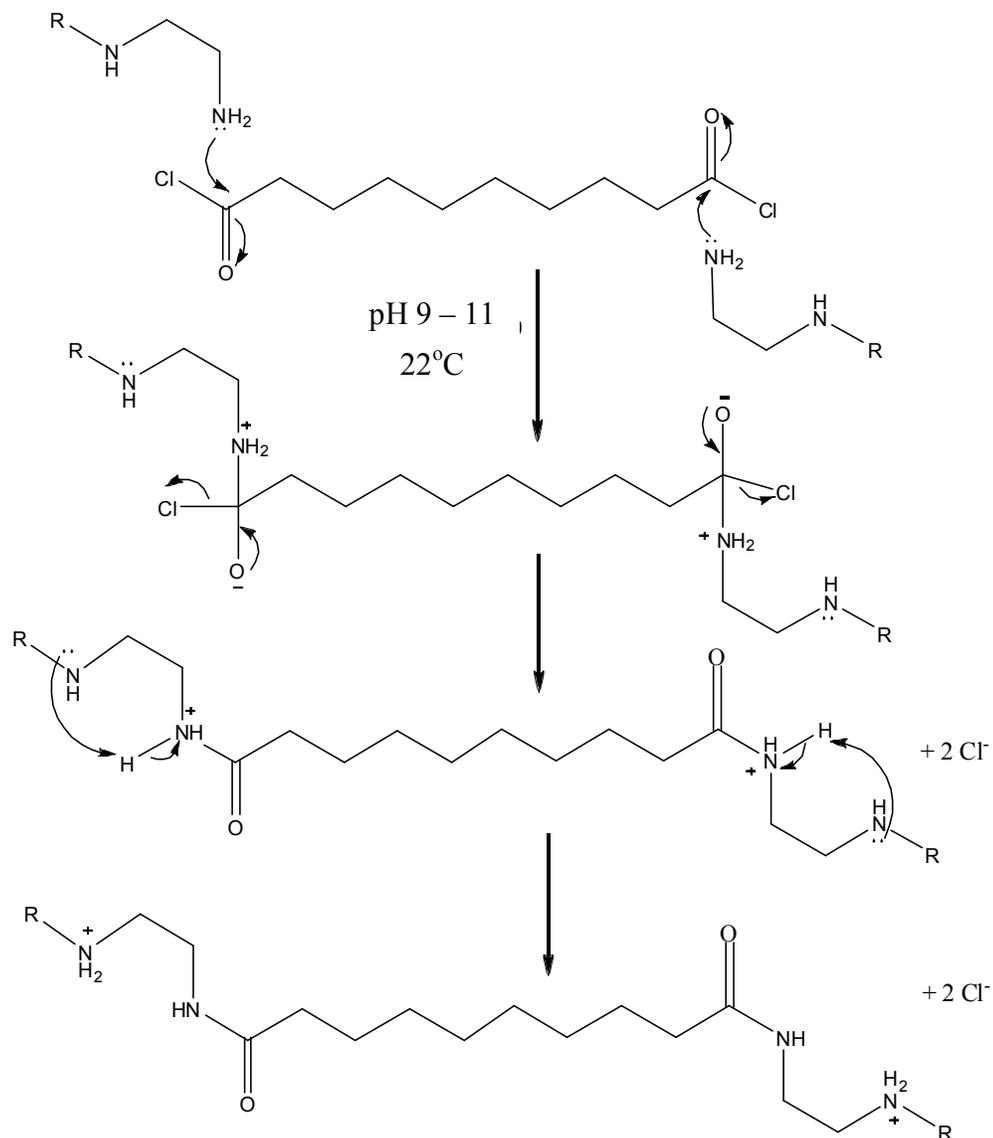


Figure 20. Mécanisme de réticulation des fonctions amines du PEI par le dichlorure de décanedioyle, qui est à la base de la formation de la membrane des microcapsules.

Des études effectuées dans notre groupe de recherche ont suivi la caractérisation des capsules (forme, distribution de taille des microcapsules, taille des pores) en fonction de l'effet des différents paramètres sur la préparation de celles-ci. La forme des microcapsules a été évaluée en prenant des photos de celles-ci vues avec un microscope optique Zeiss ou Leica. La distribution de taille des

microcapsules a été évaluée en utilisant la diffraction de lumière ^[46]. La taille des pores des microcapsules a été évaluée en utilisant des polymères (PEI) marqués avec du FITC ayant de différentes masses moléculaires ^[47]. Les molécules de PEI ont pénétré à l'intérieur des capsules par diffusion, si la dimension des molécules ne dépassait pas la dimension des pores de la membrane. Ultérieurement, la présence de PEI marqué à l'intérieur des microcapsules a été mise en évidence en utilisant un microscope confocal, ce qui a permis d'établir la largeur des pores des microcapsules.

2.3 Évaluation des paramètres cinétiques

Dans le cadre de ce projet, après la synthèse des microcapsules, on s'est intéressé à l'évaluation des paramètres cinétiques de la laccase immobilisée et à la comparaison de ceux-ci avec ceux obtenus pour la laccase libre, pour mieux comprendre l'effet de l'encapsulation sur l'enzyme. La spectrophotométrie a été utilisée pour évaluer la vitesse de la réaction de la laccase par rapport au substrat choisi, tandis que la cellule à oxygène a été préférée pour les mesures effectuées pour la laccase immobilisée, comme expliqué dans la section 1.4.2.2.

2.3.1 Spectrophotométrie

Les réactions qui sont à la base des mesures spectrophotométriques afin de déterminer l'activité enzymatique de la laccase sont présentées dans la section 1.4.1. Le substrat de référence pour la laccase est l'ABTS, mais des mesures de l'activité enzymatiques ont été effectuées en utilisant aussi l'OPD comme substrat. Les solutions de différentes concentrations de substrat (allant de 0,025 mM à 8 mM pour l'OPD et de 0,025 mM à 2 mM pour l'ABTS) ont été préparées dans l'eau pure. Le spectrophotomètre utilisé est le Cary-100 Bio UV-visible et les cuvettes en verre optique ont un trajet optique de 1 cm. La solution de référence est le tampon acétate 0,05 M de pH 4,5 et ce même tampon dans lequel on a ajouté l'enzyme sert de solution de mesure de départ. Au moment où le

substrat est ajouté, la mesure de l'absorbance à 420 nm est démarrée. Les absorbances sont mesurées pour 1,5 min. La pente de ce graphique de l'absorbance en fonction du temps correspond à la vitesse initiale (V_0) de la réaction pour une concentration donnée du substrat utilisé. Cette expérience est répétée pour chaque différente concentration de substrat afin d'obtenir les valeurs de V_0 pour celles-ci. Ensuite une courbe de Michaelis-Menten peut être tracée en représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat (i.e., figure 16) et cette courbe est utilisée pour l'évaluation des paramètres cinétiques K_M et V_{max} . La méthode spectrophotométrique ne s'applique que pour les mesures sur la laccase libre, parce que les capsules forment une solution turbide dont le signal d'absorbance peut être faussé à cause de la dispersion de la lumière. Pour les mesures sur la laccase encapsulée nous avons choisi une méthode électrochimique, soit la mesure de la consommation d'oxygène à l'aide d'une cellule à oxygène.

2.3.2 Cellule à oxygène

La cellule à oxygène utilisée est le modèle Digital Model 10 de Rank Brothers ^[41] (figure 17). L'électrode de travail en platine est couverte par la membrane de Téflon et est fixée à un potentiel de $-0,6$ V vs Ag/AgCl. L'oxygène qui traverse la membrane arrive à l'électrode et est réduit automatiquement. Pour chaque expérience l'électrode est calibrée à 100 % d'oxygène (pourcentage d'oxygène qui correspond à la concentration maximale en O_2 d'une solution saturée d'air à la température de l'expérience). En pratique, on laisse barboter de l'air pendant 10 minutes dans la solution qui est dans la cellule jusqu'à ce que le signal se stabilise et en ce moment on fixe le 100% d'oxygène. À la température de travail thermostatée à $27^{\circ}C$, 100% d'oxygène en solution aqueuse correspond à $7,968$ mg/L ^[48]. Les résultats enregistrés en pourcentage d'oxygène sont convertis en concentration d'oxygène d'après la valeur qui correspond au 100%. Par la suite, la consommation d' O_2/s est convertie en consommation par minute et en connaissant la concentration initiale d' O_2 (100%) et la stoechiométrie de la

réaction enzymatique (1 : 4 pour l'ABTS et 1 : 2 pour l'OPD) on arrive à calculer le nombre de micromoles de substrat oxydés par millilitre d'enzyme par minute, donc U/mL de laccase.

Pour les mesures, une solution de 1000 μL d'enzyme diluée 500 fois est ajoutée dans le tampon acétate 50 mM de pH 4,5 qui se retrouve dans la cellule. Le volume de tampon est calculé de telle façon pour que le volume final de solution dans la cellule ne dépasse pas 2,8 mL. On commence à barboter de l'air et après la stabilisation du signal, le barbotage est arrêté. En ce moment le substrat (ABTS ou OPD) est rajouté et la consommation d'oxygène est enregistrée en fonction du temps. La solution mère de substrat a une concentration de 50 mM et le volume rajouté dans la cellule est calculé de tel façon pour que la concentration finale de substrat dans la cellule soit celle souhaitée, compte tenant du volume final de la solution (2,8 mL). La pente correspondante à la consommation d'oxygène en fonction du temps ($\%O_2/s$) représente la vitesse initiale de la réaction enzymatique pour la concentration donnée du substrat. Comme pour les études par spectrophotométrie, la réaction est suivie à plusieurs concentrations du substrat afin de tracer une courbe Michaelis-Menten et évaluer les paramètres cinétiques de la réaction étudiée. Pour toutes les mesures par cellule à oxygène, pour le calcul de l'activité enzymatique, il faut connaître la concentration de l'oxygène dans la cellule et la stœchiométrie de la réaction enzymatique.

2.4 Développement de la méthode d'analyse par électrophorèse capillaire

La réaction enzymatique entre l'OPD et la laccase a été caractérisée de point de vue quantitatif en développant une méthode de séparation en électrophorèse capillaire suivie d'une détection par absorption UV-Vis. Compte tenant que l'objectif de notre étude est de développer un microréacteur enzymatique à l'échelle d'un biocapteur qui sera utilisé afin suivre la réaction enzymatique, le choix d'une technique d'analyse qui ne consomme que des nL de solution s'impose. Nous avons donc décidé de choisir l'électrophorèse capillaire, qui

présente cet avantage par rapport à la chromatographie liquide. L'inconvénient de la technique de détection choisie (absorption UV-Vis) est sa faible limite de détection par rapport aux autres techniques (e.g. spectrométrie de masse), mais compte tenant de la complexité réduite des échantillons à analyser et des résultats préliminaires des analyses qui ont indiqué une quantification possible en utilisant l'absorption UV-Vis, nous l'avons finalement choisie pour caractériser le système enzyme-substrat mentionné.

Les analyses de mobilité électrophorétique sont faites avec un système d'électrophorèse capillaire (CE) d'Agilent Technologies 110 Series CE System, équipé d'un détecteur à barrette de diodes. Un capillaire de silice fondue ayant une longueur totale de 48,5 cm (40 cm jusqu'au détecteur) et un diamètre interne de 50 μm est employé. La détection UV-Vis est effectuée à 200 nm et 254 nm, représentant les maximums respectives de l'OPD et son produit d'oxydation enzymatique, le DAP. Avant chaque injection, le capillaire est rincé avec du NaOH 0,1 M, de l'eau et du tampon, pendant 3 min, à 50 mbar (pour chaque solution) pour un remplacement minimal de 10 volumes de capillaire. L'injection de l'échantillon est faite par pression (injection hydrodynamique) à 50 mbar pour 2 s, représentant environ 3 nL. Une seconde injection à la même pression, cette fois-ci de tampon pour mettre l'échantillon 'en sandwich', a aussi une durée de 2 s. Cette technique empêche les pertes d'analyte lors de l'application du voltage de séparation. Le potentiel de séparation choisi est égal à 20 kV. La température du capillaire est ajustée à 25⁰C. Les paramètres initiaux de séparation ont été adaptés d'après ceux trouvés pour la séparation des isomères de phénylène-diamines ^[49], et les seuls paramètres variés ont été la solution tampon et le pH de séparation. Nous avons trouvé que le tampon optimal de la séparation est le phosphate de sodium, 50 mM, pH 2,5. Les solutions tampon ont été gardées au frigo (4⁰C) et avant l'utilisation, chaque solution tampon a été dûment gazéifiée et filtrée à travers des filtres en nylon Chromspec ayant des pores d'un diamètre de 0,2 μm . Le résumé de la méthode d'analyse sur le système CE d'Agilent Technologies se

trouve en annexe. Une fois les conditions de séparation établies, nous avons procédé à l'élaboration de la méthode de quantification des produits d'intérêt.

2.4.1 Quantification de la réaction enzymatique par EC

Des étalons d'OPD et DAP de concentrations connues (0,05; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 mM pour l'OPD et 0,045; 0,090; 0,450; 0,900; 1,80; 2,70 mM pour le DAP) ont été préparées et analysées en électrophorèse capillaire, dans le tampon phosphate avec un potentiel appliqué de 20 kV. Les hauteurs et les aires des pics obtenus ont été portées en graphique afin de tracer les courbes d'étalonnage proprement dites (figure 41 et 42). Étant donné le fait que le DAP est peu soluble dans l'eau et qu'il est soluble dans des alcools (méthanol, éthanol), la solution-mère de DAP 4,5 mM a été préparée avec un mélange éthanol-tampon phosphate (3:1), et diluée par la suite avec le tampon phosphate pour obtenir les concentrations voulues. Le rôle du tampon phosphate est d'assurer à l'échantillon à analyser en électrophorèse capillaire une conductivité semblable avec la conductivité de l'électrolyte de séparation, pour éviter les variations du courant lors de l'analyse. La solution d'OPD a été préparée avec de l'eau pure. La quantification de la réaction enzymatique est effectuée pour la réaction de la laccase libre et de la laccase encapsulée (microcapsules en suspension).

Pour la réaction de la laccase libre, 33,6 μL d'OPD 50 mM sont mélangés avec 146,4 μL tampon acétate 50 mM pH 4,5 et 100 μL solution de laccase libre (diluée 500 fois) tel que l'activité finale était de 0,94 U/mL. Le volume final de la solution étant de 280 μL , la concentration finale d'OPD est donc 6 mM. La réaction enzymatique a lieu à 25⁰C, le temps de réaction étant de 79 min. La progression de la réaction enzymatique a été suivie en injectant le mélange réactionnel après 1 min, 38 min et 79 min.

Pour la réaction des microcapsules en suspension, 290 mg de capsules humides ont été mélangées avec 3 mL de solution d'OPD 2 mM pour un interval de temps

de 2 minutes à la température de la pièce. Par la suite, la solution a été filtrée et analysée.

2.5 Le microréacteur enzymatique

Après avoir immobilisé l'enzyme et en évalué les paramètres cinétiques, nous avons procédé à l'élaboration du microréacteur enzymatique proprement-dit. Le microréacteur enzymatique à base d'enzyme microencapsulée a le rôle de servir comme modèle pour le comportement de l'enzyme dans des biocapteurs. La fabrication du microréacteur est basé sur la méthode décrite par Bonneil ^[25] et comprend le compactage des microcapsules se trouvant en suspension dans un capillaire à l'aide d'une seringue. Le microréacteur consiste dans un capillaire de silice fondue ayant une longueur de 10 cm, un diamètre interne (d.i.) de 530 μm et un diamètre externe (d.e.) de 800 μm qui contient, à l'une de ses extrémités, une fritté formée par l'insertion de quelques couches de filtre en verre Whatman (figure 21). La fritté est tenue en place par un autre capillaire ayant une longueur de 10 cm, un diamètre interne de 50 μm et un diamètre externe de 360 μm qui est introduit dans la capillaire plus large et fixé avec une goutte d'époxy.

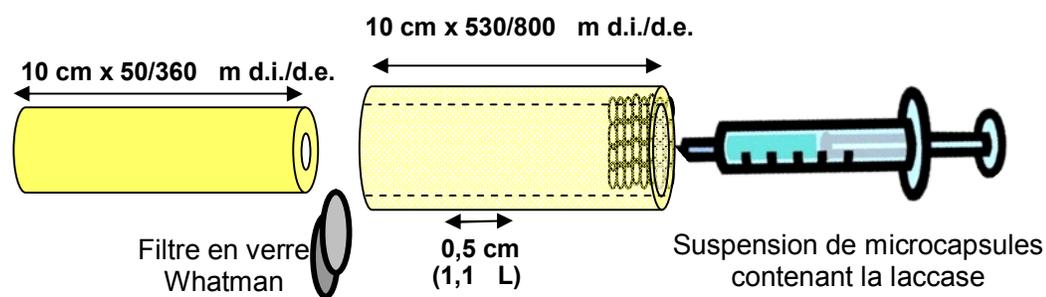


Figure 21. Schéma montrant la fabrication du microréacteur enzymatique.

Les microcapsules contenant la laccase sont d'abord mises en solution sous agitation au bain à ultrasons pendant 30 min (ceci ayant le rôle de détruire les

agrégats de microcapsules qui se forment après leur synthèse) puis la solution est passée à travers le microréacteur à l'aide d'une seringue de 1 mL attachée au capillaire à l'aide d'une petite quantité d'époxy. La solution passe à travers le capillaire et les microcapsules y sont retenues jusqu'à la formation d'une couche de microcapsules ayant une longueur de 0,5 cm, grâce au filtre en verre fixé à la sortie du capillaire. Afin de mesurer la quantité de microcapsules immobilisées à l'intérieur du capillaire, nous avons fait la différence entre la masse du capillaire avant et après le remplissage, en s'assurant que l'eau qui occupait les interstices formés entre les microcapsules soit éliminée. Ceci est réalisé en appliquant une pression d'air avec la seringue utilisée pour remplir le microréacteur.

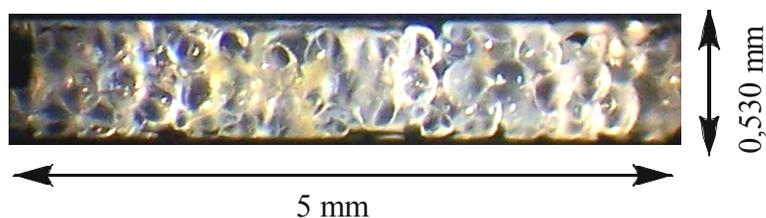


Figure 22. Photo montrant le microréacteur enzymatique vu au stéréomicroscope.

Malgré la simplicité de la procédure de fabrication du microréacteur, le problème qui se pose pendant cette étape est que les microcapsules se décantent à la base de la seringue et l'entrée du capillaire peut être bloquée à cause des agrégats qui restent encore dans la solution, résultant un capillaire rempli non uniformément ou une faible répétitivité du remplissage. Toutefois, le fait que la quantité de microcapsules nécessaire pour remplir 0,5 cm de capillaire soit très faible, constitue un avantage qui surmonte le problème énoncé.

La réaction enzymatique à travers le microréacteur est quantifiée en utilisant le même principe que pour les réactions de la laccase libre et des microcapsules en suspension (voir section précédente). Dans le microréacteur, environ 2,8 mg de capsules ont été immobilisées et un volume de 50 μ L de solution d'OPD 2 mM (préparée dans du tampon acétate 50 mM, pH 4,5) a été passé à travers, en appliquant une pression d'azote de 25 psi dans le vial contenant le substrat (figure

23). Le temps total de résidence de l'échantillon dans le microréacteur est environ 2 min, qui est en fait le temps nécessaire de l'échantillon pour traverser le microréacteur. Pour s'assurer que toute solution de produit et substrat sort du microréacteur, un volume de 100 μ L de tampon acétate pH 4,5 est passé à travers le microréacteur après chaque réaction et la solution résultante, ayant un volume final de 150 μ L est analysée en électrophorèse capillaire. Le volume de solution injectée en électrophorèse capillaire est toujours égal à 3 nL (conforme au protocole d'analyse) et les aires des pics d'OPD et DAP sont converties en concentrations, grâce aux courbes d'étalonnage.

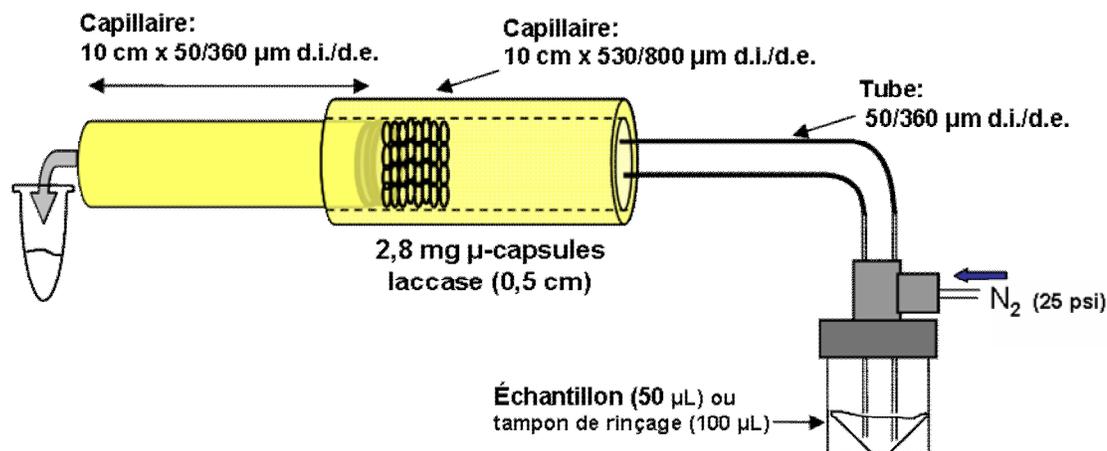


Figure 23. Schéma montrant le cheminement de la réaction enzymatique à travers le microréacteur ainsi que les étapes préalables à l'analyse de l'échantillon en électrophorèse capillaire. Les étapes d'opération sont : **1.** 50 μ L OPD (2 mM) dans le tampon acétate (50 mM, pH 4,5); 2 min **2.** Rinçage avec 100 μ L tampon **3.** Collecte des produits de réaction et solution de rinçage (150 μ L) **4.** Injection en EC

2.6 Développement du montage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire

Comme mentionné dans l'introduction, l'objectif de construire un microréacteur en ligne avec le système d'électrophorèse capillaire devrait faciliter les diverses analyses à faire pour mieux comprendre le comportement de la laccase

encapsulée, tout en automatisant la procédure d'analyse et en minimisant la consommation de réactifs. Le couplage du microréacteur en ligne avec le système d'électrophorèse capillaire exige une façon d'introduction du mélange réactionnel dans l'appareil à des très petits volumes, soit le plus proche de 3 nL. Selon notre recherche, la plus petite boucle d'injection disponible, à un prix raisonnable est celle de Valco, ayant un volume interne (boucle) d'injection de 60 nL. Après avoir confirmé sur le système d'électrophorèse capillaire d'Agilent qu'un volume d'injection de 60 nL ne causerait pas trop de dégradation de la résolution de séparation, un montage fut réalisé pour intégrer la vanne Valco (60 nL) dans le système de séparation électrophorétique (figure 24).

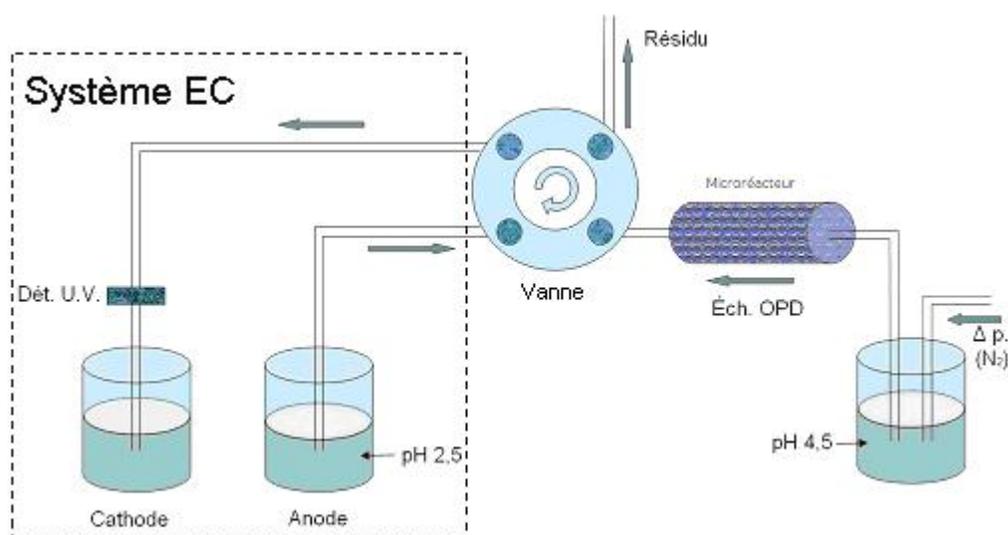


Figure 24. Schéma du montage en ligne proposé pour l'étude de l'efficacité du microréacteur enzymatique.

Initialement nous avons pensé à un montage où le microréacteur soit directement lié au capillaire de séparation du système d'électrophorèse capillaire, de façon que les produits de réaction qui sortent du capillaire soient immédiatement séparés en électrophorèse. Mais le problème qui s'est posé à ce niveau consiste dans la différence entre le pH optimal pour la réaction enzymatique et celui de la séparation. Le tampon optimal de la réaction enzymatique est l'acétate pH 4,5 tandis que le tampon de séparation est le phosphate pH 2,5. La réaction enzymatique n'est pas possible à pH 2,5 car la laccase est complètement inhibée

et la séparation par électrophorèse dans un tampon acétate à pH 4,5 n'est pas possible non plus, car à cette valeur de pH les résultats obtenus ont montré une très faible reproductibilité des séparations. Pour résoudre ce problème on a pensé à ce montage (figure 24 et 25) qui permettrait le changement des deux solutions tampon : tampon acétate pH 4,5 pour la réaction enzymatique et phosphate pH 2,5 pour la séparation en électrophorèse capillaire.

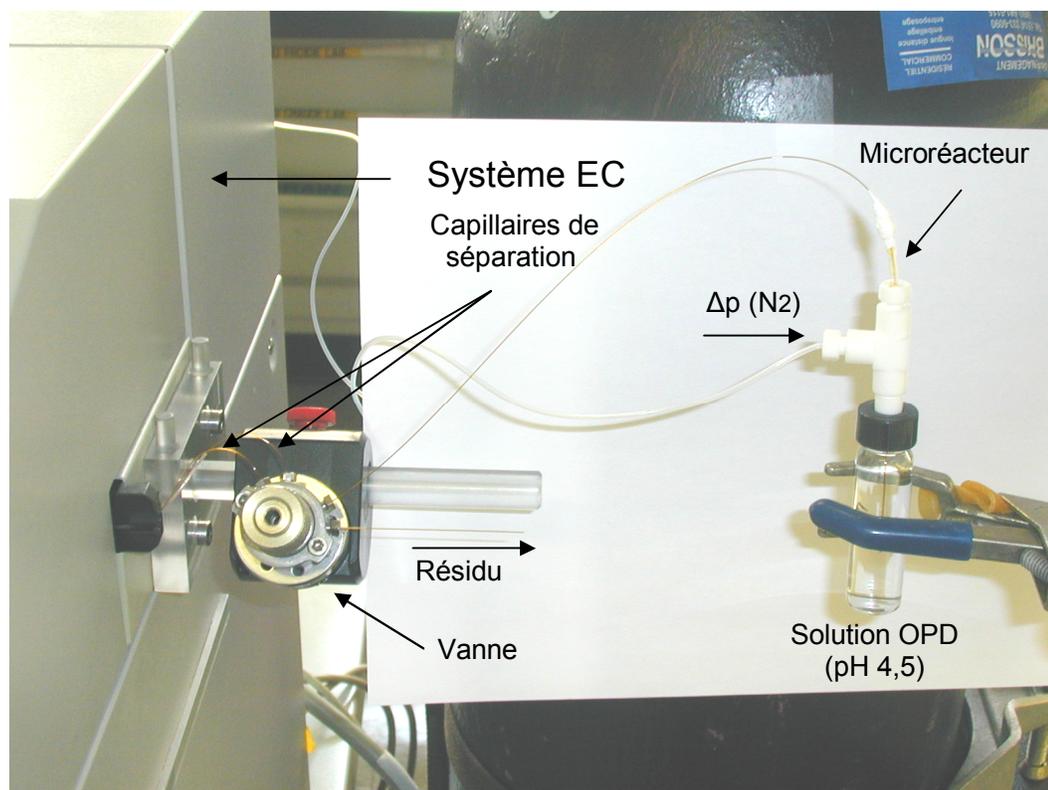


Figure 25. Photo montrant la réalisation du couplage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire, par l'intermédiaire de la vanne Valco.

Les ports de la vanne sont connectés de la façon suivante : un à la sortie du microréacteur, deux autres ports sont connectés au capillaire de séparation, celui-ci étant coupé, pour permettre l'interposition de la vanne (figure 25) et le quatrième dirige la solution vers la sortie (résidus). Pour permettre l'utilisation du capillaire de séparation à l'extérieur de l'appareil Agilent, nous avons utilisé le

cartouche du capillaire adapté pour le couplage EC – spectrométrie de masse, comme le montre la figure 26.

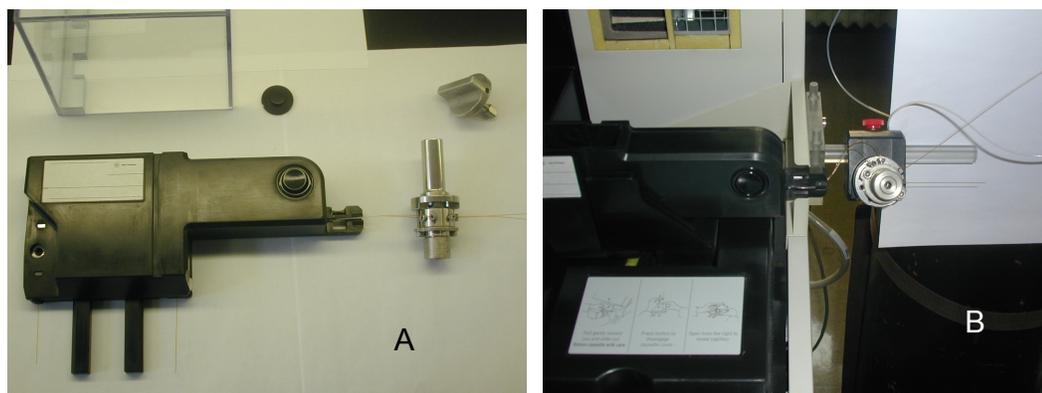


Figure 26. Photo montrant l'utilisation du cartouche du capillaire adapté pour le couplage EC – spectrométrie de masse à la réalisation du montage en ligne du microréacteur et le système de séparation.

La solution contenant le substrat OPD est poussée à travers le microréacteur enzymatique par l'application d'une pression (N_2) à l'entrée de celui-ci. La sortie du microréacteur est connectée à une porte d'entrée de la vanne permettant à la solution de traverser la vanne. La pression d'azote dans le vial contenant le substrat OPD sera calibrée de telle façon que le moment de l'injection en EC coïncide avec le moment où les produits de réaction se trouvent dans la boucle interne de la vanne. Au moment où la solution d'intérêt est à l'intérieur de la vanne, on la tourne et la solution arrive au niveau du capillaire de séparation. À ce moment, le capillaire étant rempli avec du tampon phosphate pH 2,5 on procède à l'application du potentiel nécessaire pour commencer la séparation proprement-dite.

CHAPITRE 3
RÉSULTATS DES ÉTUDES CINÉTIQUES

Le choix de la technique d'encapsulation d'enzymes et de la nature des constituants de la membrane dépend des différentes caractéristiques recherchées, tels que la dimension des particules, l'épaisseur de la paroi, la perméabilité, la stabilité et la compatibilité à l'environnement de l'utilisation finale envisagée.

Les microcapsules que nous avons synthétisées au laboratoire d'après le protocole décrit dans la section 2.1.2, possèdent une géométrie sphérique, un diamètre de 30 à 50 μm ^[46], une membrane résistante et semi-perméable avec des pores ayant une largeur comprise entre 2,6 et 5 nm ^[47].

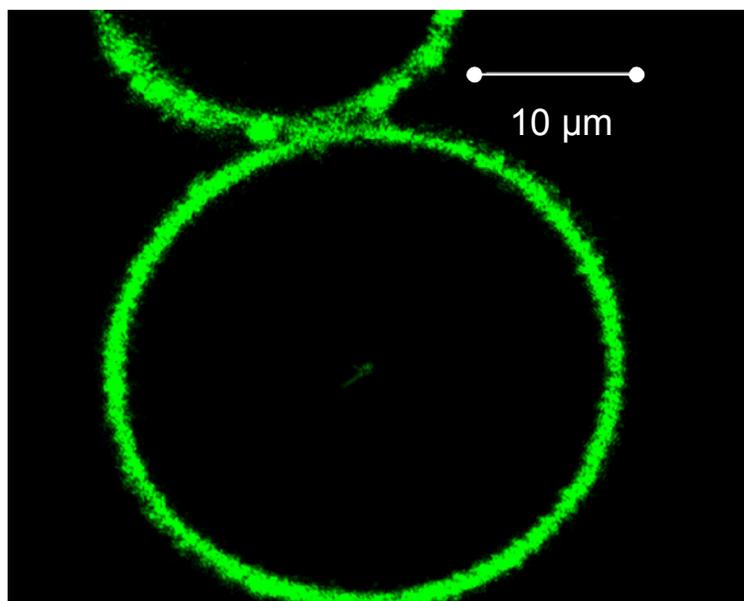


Figure 27. Exemple de microcapsules marquées avec FITC, ayant un diamètre de 50 μm , tel que vues avec un microscope confocal.

3.1 Effet de l'encapsulation sur l'activité de la laccase

Après avoir immobilisé une enzyme, les premières questions qui se posent sont : l'enzyme a-t-elle gardé son activité? En quelle mesure cette activité a été affectée par le processus d'immobilisation? Les réponses à ces questions nous donnent la mesure de l'efficacité de l'encapsulation. L'évaluation des différents paramètres,

comme le pH d'activité maximale, l'affinité entre l'enzyme et le substrat ainsi que la vitesse maximale de conversion du substrat par l'enzyme libre et par l'enzyme immobilisée nous aident à mesurer l'impact de la méthode d'immobilisation sur le comportement enzymatique de la laccase.

3.1.1 Effet du substrat sur l'activité enzymatique de la laccase libre

L'activité enzymatique de la laccase libre a été le premier paramètre mesuré pour vérifier le maintien de l'activité catalytique de l'enzyme. Les mesures de l'activité enzymatique de la laccase libre ont été effectuées selon les procédures décrites dans la section 2.3.

Tableau 1. Les valeurs de l'activité enzymatique (U/mL) de la laccase libre mesurées par spectrophotométrie et la cellule à oxygène par rapport aux deux substrats choisis.

	Spectrophotométrie ($\lambda = 420$ nm)	Cellule à oxygène	Écart
ABTS	3850 U/mL	3340 U/mL	13%
OPD	282 U/mL	162 U/mL	43%

Conditions de réaction : solutions mères de substrat ABTS et OPD 50 mM, (concentration finale du substrat ABTS 1 mM, OPD 6 mM), tampon acétate 50 mM, pH 4,5 et solution laccase libre diluée 500 fois (conditions de saturation).

Les différences des valeurs obtenues par les deux méthodes pourraient s'expliquer par le fait que, dans les calculs effectués pour obtenir l'activité enzymatique de la laccase, les points de départ sont différents pour chacune des méthodes. Par spectrophotométrie, on utilise comme point de départ pour le calcul de l'activité de la laccase, la vitesse d'apparition du produit d'oxydation enzymatique, tandis que, par la méthode électrochimique, on utilise la vitesse de consommation de l'oxygène lors de la réaction, pour obtenir finalement l'activité enzymatique recherchée. Ceci a mené à un écart modeste de 13% entre les deux méthodes pour l'ABTS. Par contre, le grand écart de 43% entre les activités calculées pour l'OPD ne peut pas simplement être expliqué par les différents

points de départ. En fait, comme élaboré par la suite dans le chapitre 5.3, le produit d'oxydation de l'OPD subit une oxydation secondaire qui absorbe à $\lambda = 420$ nm. Cela augmente faussement le signal du produit primaire. Ceci donne une valeur d'activité trop élevée d'activité d'OPD calculée par la méthode spectrophotométrique. On estime donc que l'activité de l'OPD par spectrophotométrie est surestimée d'environ 13% par rapport à la valeur calculée avec la cellule à oxygène.

3.2 Effet de l'encapsulation sur le pH de l'activité enzymatique maximale

Les valeurs de pH auxquels la laccase présente des maximums d'activité enzymatique ont été évalués. Il est important de rappeler que pour mesurer correctement l'activité enzymatique d'une enzyme, les conditions de réaction doivent être établies de telle façon pour que la vitesse initiale de la réaction enzymatique soit maximale. Pour la laccase libre avec le substrat OPD, la vitesse initiale de la réaction enzymatique a été mesurée pour des différentes valeurs de pH entre 3 et 7,5 en utilisant la méthode de la cellule à oxygène. Le maximum de la vitesse initiale de la réaction est atteint dans une solution tampon ayant un pH de 4,5 comme montré dans la figure 28. Le manque des barres d'erreurs sur le graphique s'explique par le fait que les mesures prises à l'aide de la cellule à oxygène sont relativement longues et la réalisation de chaque analyse en triplicata aurait été assez laborieuse. Cependant, les mesures prises ultérieurement en triplicata pour les calculs de l'activité enzymatique indiquent un écart type relatif de maximum 9% pour les vitesses initiales de réaction et ce, en utilisant différents substrats (OPD, ABTS et PPD). Nous pensons que le même comportement aurait été observé dans le cas des mesures utilisées pour déterminer le pH optimal de la réaction enzymatique. Huang et al. ont trouvé que le pH optimal pour la réaction enzymatique entre la laccase et le substrat OPD était 6,2 ^[38]. Vu que les mêmes conditions d'analyse ont été utilisées, il est possible que cette différence soit due aux différentes sources de provenance des laccases (différents champignons). La séquence d'acides aminés constituant la chaîne polypeptidique de l'enzyme peut

varier en fonction de la provenance de celle-ci ^[27]. Il a été mis en évidence qu'en remplaçant un seul acide aminé dans cette séquence détermine un saut de la valeur du pH optimal égal à 1,4 unités pour la même enzyme, puisque l'activité catalytique de chaque site est liée de manière intrinsèque à la présence de différents acides aminés dans son environnement ^[50].

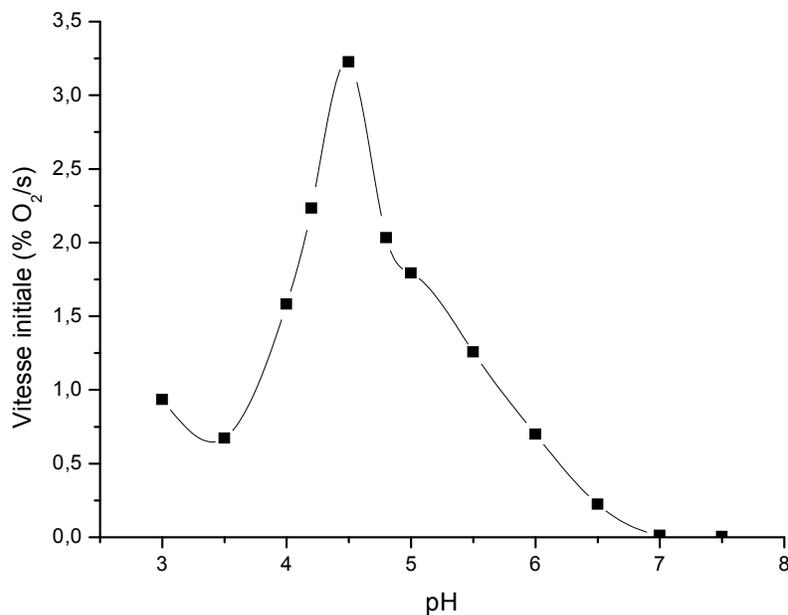


Figure 28. Effet du pH sur la vitesse initiale de l'oxydation enzymatique de l'OPD en présence de la laccase libre ($4,3 \times 10^{-5}$ mM Lcc, OPD 2mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E = -0,6$ V vs Ag/AgCl).

Après avoir établi la valeur du pH optimal pour la réaction enzymatique, plusieurs solutions tampon (acétate, phosphate et McIlvaine) ont été testées, afin d'en déterminer la meilleure pour le déroulement de la réaction enzymatique. Les résultats obtenus (tableau 2) indiquent une vitesse initiale de réaction plus grande en présence des tampons acétate et McIlvaine, par rapport au tampon phosphate, avec une différence négligeable entre les deux premiers. Ultérieurement, le tampon acétate a été utilisé pour nos études.

Tableau 2. Valeurs des vitesses initiales de la réaction enzymatique de la laccase libre en présence de différentes solutions tampon ayant un pH de 4,5.

Tampon pH 4,5	Vitesse initiale (% O ₂ /s)
Acétate	3,23
McIlvaine	3,18
Phosphate	2,65

Pour ce qui est de la laccase encapsulée avec l'OPD, les analyses ont confirmé que la valeur du pH optimal pour la réaction enzymatique correspond à celle obtenue pour la laccase libre, c'est-à-dire 4,5 (figure 29). Cette observation est en contraste avec une autre étude sur la laccase, avec un substrat similaire, le para-phenylènediamine (PPD) : le proton change les propriétés du PEI, causant un déplacement de la valeur du pH optimal pour l'activité enzymatique de l'enzyme encapsulée (pH 5,75) versus l'enzyme libre (pH 5,00) ^[51]. Dans la littérature il y a d'autres mentions conformément auxquelles la valeur du pH optimal de la réaction enzymatique peut subir un changement pour l'enzyme immobilisée par rapport à l'enzyme libre ^[23]. Cependant, dans le cas de l'oxydation enzymatique de l'OPD en présence de la laccase on ne l'observe pas. Le comportement de l'OPD est différent de celui du PPD, car les valeurs de pKa₂ des deux substrats sont différentes (4,6 pour l'OPD et 6 pour le PPD). Les tampons donnant la vitesse initiale maximale pour la réaction de la laccase encapsulée sont, comme pour la laccase libre, l'acétate et McIlvaine (tableau 3). Comme pour la réaction de la laccase libre, pour les études suivantes, le tampon acétate a été utilisé.

Tableau 3. Valeurs des vitesses initiales de la réaction enzymatique de la laccase encapsulée en présence de différentes solutions tampon ayant un pH de 4,5.

Tampon pH 4,5	Vitesse initiale (% O ₂ /s)
Acétate	0,30
McIlvaine	0,29
Phosphate	0,25

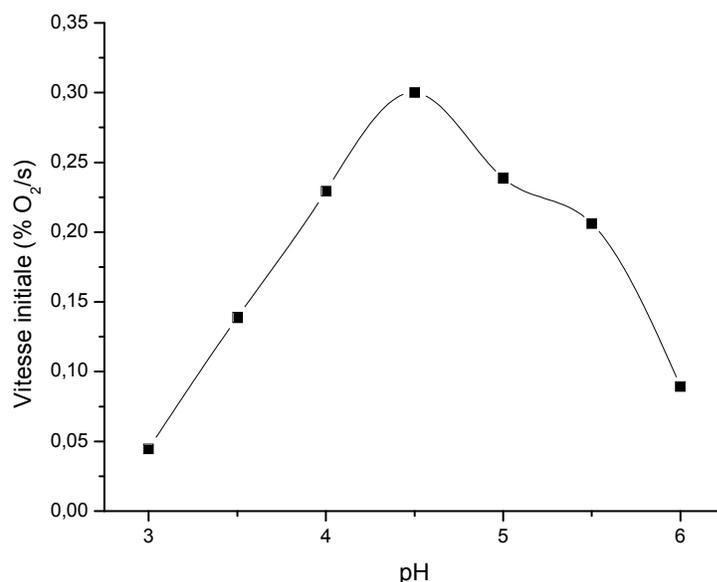


Figure 29. Effet du pH sur la vitesse initiale de l'oxydation enzymatique de l'OPD en présence de la laccase encapsulée (1,5 mg/mL capsules sèches dans 2,8 mL de solution, concentration finale OPD 5mM) mesurée par consommation d'oxygène ($\Delta E = -0,6$ V vs Ag/AgCl).

En ce qui concerne l'influence de la concentration du tampon (force ionique de la solution) sur la vitesse maximale, deux concentrations différentes ont été testées, soit 0,10 M et 0,05 M pour les deux tampons sous mentionnés, en utilisant l'OPD comme substrat. Les résultats obtenus pour les deux concentrations montrent des valeurs de la vitesse maximale de réaction équivalentes (données pas montrées). Il est connu que la force ionique de la solution a un effet très important sur la vitesse maximale d'une réaction enzymatique et pour mettre cet effet en évidence, des études plus approfondis, sur une plage plus large de valeurs de concentrations sont nécessaires.

3.3 Efficacité de l'encapsulation de la laccase

En ce qui concerne l'enzyme immobilisée, la première chose vérifiée a été le maintien de son activité enzymatique. Dans une étude publiée par notre groupe de recherche ^[52] il est démontré qu'une grande partie de la laccase immobilisée par

la technique décrite dans la section 2.2 se trouve dans la membrane des capsules. Dans le cas particulier du PEI, ceci peut affecter l'activité enzymatique de la laccase, à cause de la structure du PEI, qui est un polymère très cationique, créant ainsi un microenvironnement chargé autour de l'enzyme. La conséquence directe de ce fait est que l'ABTS n'a pas pu être utilisé comme substrat à cause du fait que, sous sa forme réduite, il est chargé négativement ($z = -2$) et il est attiré par la paroi chargée positivement de la microcapsule, empêchant ainsi son processus de diffusion à l'intérieur de la microcapsule et vers le site actif de l'enzyme. Les mesures d'activité ont été alors faites en utilisant la cellule à oxygène et le substrat choisi a été uniquement l'OPD, car il est cationique dans l'intervalle de pH utilisé. La diffusion du substrat à l'intérieur des microcapsules et du produit de réaction à l'extérieur est réalisée grâce au gradient de concentration et les dimensions des pores des microcapsules permettent le dépassement des répulsions électrostatiques qui peuvent apparaître entre les capsules et les molécules de substrat. Les mesures préliminaires effectuées ont montré une consommation rapide de l'oxygène dans la cellule après avoir ajouté le substrat dans la solution déjà présente, soit les microcapsules en suspension dans le tampon acétate. Le résultat (figure 30) montre que la laccase est encore active dans les capsules et la pente négative du graphique (la partie linéaire en rouge) nous donne la vitesse initiale de la réaction enzymatique et est utilisée pour le calcul de l'activité de l'enzyme immobilisée.

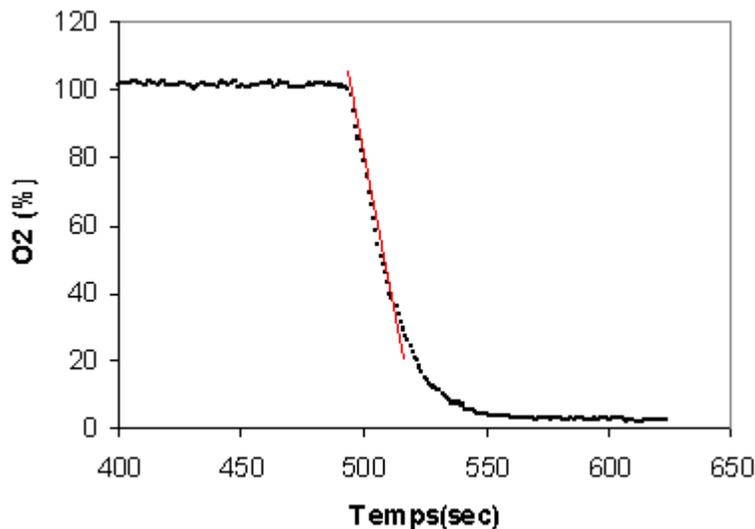


Figure 30. Mesure de l'activité enzymatique de la laccase encapsulée (174,5 mg capsules humides) et l'OPD (6 mM) dans un tampon acétate 50 mM pH 4,5. La consommation d'oxygène en fonction du temps est convertie en unités d'activité (U).

L'efficacité de la méthode d'immobilisation est évaluée en comparant l'activité de la laccase libre avant la synthèse des microcapsules à l'activité de la laccase encapsulée (après la synthèse). L'activité de la laccase libre utilisée pour la synthèse est égale à 162 U OPD/mL (concentration finale du substrat OPD 6 mM, voir Tableau 4). Un volume de 0,8 mL de cette solution (donc 130 U de laccase) a été utilisé pour la synthèse des microcapsules, selon la procédure décrite dans la section 2.2. Une masse de 20,78 g de capsules humides a été obtenue. L'activité enzymatique de ces capsules a été évaluée envers l'OPD, en utilisant la même technique, soit la cellule à oxygène. Une activité de 0,751 U OPD/g de capsules humides a été obtenue, ce qui donne une activité totale de 15,6 U, pour la masse totale de capsules synthétisées. La diminution de l'activité enzymatique de 130 U à 15,6 U représente une efficacité d'encapsulation de 12%, en termes de rétention de l'activité enzymatique envers l'OPD (ou une perte d'activité enzymatique de 88%). Cette diminution pourrait s'expliquer soit par la perte d'enzymes pendant le processus d'encapsulation, soit par sa désactivation une fois encapsulée, ou bien une combinaison des deux. Des études ont été donc faites pour identifier la cause de ces pertes.

Pour évaluer la perte d'enzymes pendant le processus d'immobilisation, nous avons procédé à une quantification de l'enzyme présente dans la solution restante, après que la microencapsulation soit effectuée. La méthode utilisée est celle basée sur l'acide bicinchoninique ^[53] (BCA) et dont le principe consiste dans la formation d'un complexe protéine-Cu²⁺ dans des conditions alcalines, suivie d'une réduction du Cu²⁺ en Cu¹⁺, étant connu que la cystéine, cystine, tryptophane, tyrosine et les liaisons peptidiques ^[54] réduisent le Cu²⁺ en Cu¹⁺. Dans un milieu alcalin, BCA forme avec le Cu¹⁺ un complexe bleu foncé, dont l'apparition est mesurée par spectrophotométrie, à 560 nm. La quantité de cuivre réduit est proportionnelle à la quantité de protéine présente en solution. En connaissant la quantité de départ de laccase utilisée dans le processus de microencapsulation et en mesurant la quantité de protéine qui reste en solution après que l'immobilisation soit finie, on trouve la quantité d'enzyme qui se trouve à l'intérieur des microcapsules. La quantité de laccase restante dans la solution finale représente 4% de la quantité de laccase initiale, ce qui nous indique une efficacité du processus d'immobilisation de 96% ^[55]. Ce résultat, corrélé avec celui qui nous indique une diminution de l'activité enzymatique par encapsulation de 88%, mène à la conclusion que cette perte d'activité de la laccase est due en une grande proportion à la désactivation de la laccase, plutôt qu'à sa perte pendant le processus d'immobilisation.

La désactivation de l'enzyme dans le processus de synthèse des microcapsules pourrait s'expliquer par le fait que le PEI est un agent réducteur, ce qui peut affecter directement l'activité catalytique de la laccase. La réaction de réticulation entre le PEI et la laccase est une autre explication qui pourrait être à la base de cette désactivation de l'enzyme. La réaction de réticulation entre le polymère et l'agent réticulant est basée sur la formation des liens peptidiques entre les fonctions amines du polymère et les fonctions chlorures d'acides de l'agent. Il est donc possible que l'agent réticulant forme des liaisons avec l'enzyme par ses groupements amines, tout en changeant sa structure tridimensionnelle ce qui pourrait la désactiver. En plus de changer sa structure tridimensionnelle, la

réticulation de l'enzyme pourrait limiter l'accès du substrat à son site actif, ce qui aurait comme effet une perte de son activité enzymatique. Cette hypothèse, du changement de la structure tridimensionnelle de l'enzyme à cause de la réticulation sera vérifiée dans notre groupe de recherche à l'aide de la microscopie à fluorescence.

Plusieurs études portant sur la synthèse et la caractérisation des microcapsules sont présentement en cours dans notre groupe de recherche. Une amélioration de l'efficacité de l'encapsulation est envisagée en essayant des synthèses à partir de différents polymères et agents réticulants et aussi en contrôlant les facteurs qui influencent directement le processus de microencapsulation.

3.4 Études cinétiques

On pensait que l'immobilisation des enzymes diminue leur activité et cette diminution est mise en évidence lors de l'étude des paramètres cinétiques de l'enzyme libre comparativement aux ceux de l'enzyme immobilisée. Afin de trouver les paramètres cherchés, les courbes de Michaelis-Menten ont été tracées pour chaque système laccase libre-OPD et laccase encapsulée-OPD (figures 31, 32 et 33) sur un domaine large de concentrations des solutions de substrat. Les courbes de Michaelis-Menten représentent la variation de la vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration du substrat et comme on peut observer en regardant l'allure des courbes, la laccase maintient son comportement michaelien après avoir été immobilisée. Pour la laccase libre, la courbe de Michaelis-Menten a été tracée à partir des résultats obtenus par les deux méthodes : spectrophotométrique et cellule à oxygène (tout en gardant les mêmes conditions d'analyse), tandis que pour la laccase immobilisée seulement la cellule à oxygène a été utilisée. Les résultats ont été automatiquement compilés sur le modèle d'une courbe hyperbolique, afin de déterminer K_M et V_{max} pour la réaction laccase – OPD (tableau 4).

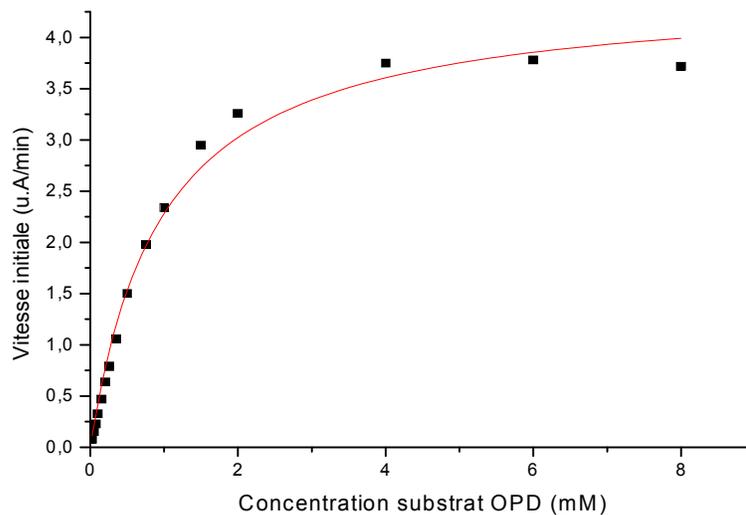


Figure 31. Courbe de Michaelis-Menten obtenue par mesures spectrophotométriques pour la laccase libre avec l'OPD comme substrat, dans un tampon acétate 0,050 M, pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 4,46 [\text{OPD}] / (0,96 + [\text{OPD}])$.

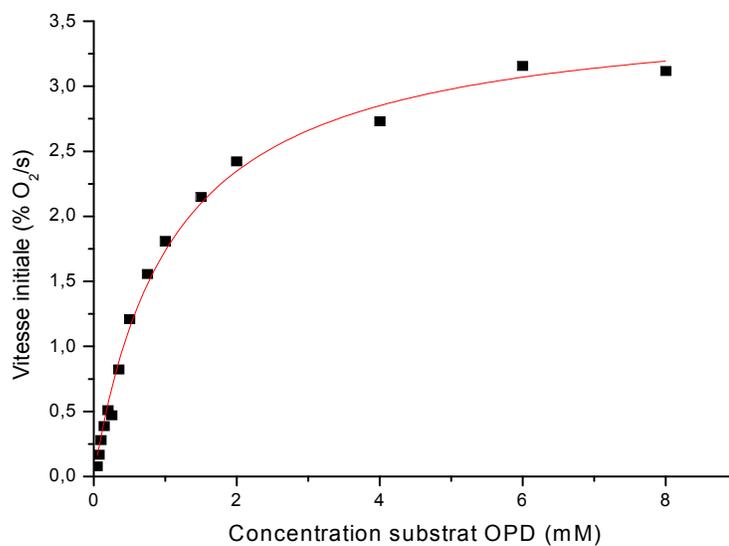


Figure 32. Courbe de Michaelis-Menten obtenue en utilisant la cellule à oxygène pour la laccase libre avec l'OPD comme substrat, dans un tampon acétate 0,050 M, pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 3,63 [\text{OPD}] / (1,09 + [\text{OPD}])$.

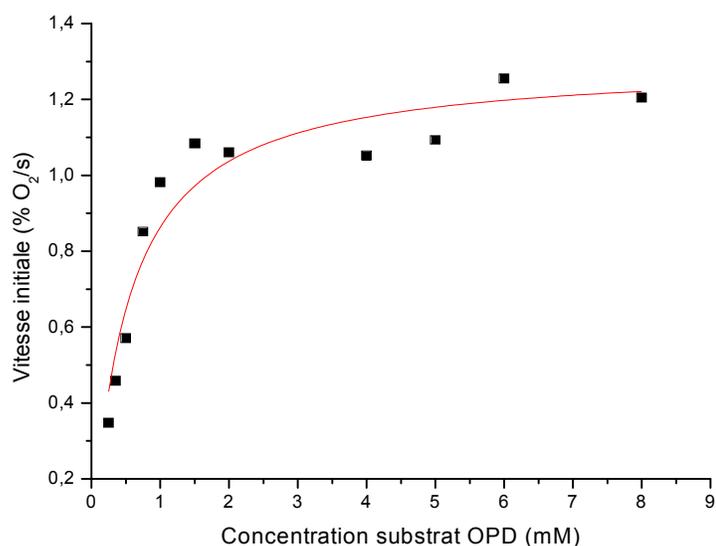


Figure 33. Courbe de Michaelis-Menten pour la laccase encapsulée avec l'OPD comme substrat dans un tampon McIlvaine 0,050 M, pH 4,5. L'équation de la régression hyperbolique est $v = 1,30 [\text{OPD}] / (0,50 + [\text{OPD}])$.

Tableau 4. Comparaison des paramètres cinétiques de la laccase libre et microencapsulée, pour le substrat OPD.

	Laccase libre	Laccase encapsulée
K_M (mM)	$1,09 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,09$
V_{\max} (% O ₂ /s)	$3,63 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,05$
Activité enz. (U OPD/mL)	0,94	0,038

Les résultats montrent que l'immobilisation de l'enzyme produit une diminution de deux paramètres cinétiques calculés, soit la vitesse maximale (V_{\max}) et la valeur de la constante de Michaelis-Menten (K_M). Les valeurs de la vitesse maximale obtenues sont de $3,63 \pm 0,10$ %O₂/s pour la laccase libre et de $1,30 \pm 0,05$ %O₂/s pour la laccase encapsulée. Cette variation peut être expliquée par une diminution rapide de la concentration de substrat dans la zone immédiate entourant l'enzyme (apparition d'un gradient de concentration), qui elle est confiée dans les pores des microcapsules ^[51]. À cause de la restriction de diffusion ^[56], l'activité apparente paraîtra plus petite qu'elle l'est en réalité au site

actif de l'enzyme, parce que la mesure de l'activité est une mesure macroscopique, prise dans l'ensemble de la solution, où ces effets de diffusion se font ressentir. En conséquence, cet effet sera plus prononcé lorsqu'on utilise un substrat pour lequel la laccase a une activité plus grande ou un substrat qui a une vitesse de diffusion plus lente, car le gradient de concentration créé sera plus important.

Pour vérifier la mesure dans laquelle l'encapsulation affecte le comportement de l'enzyme, on a comparé les quantités d'enzymes libres et immobilisées nécessaires pour atteindre la même vitesse maximale, pour la même concentration de substrat.

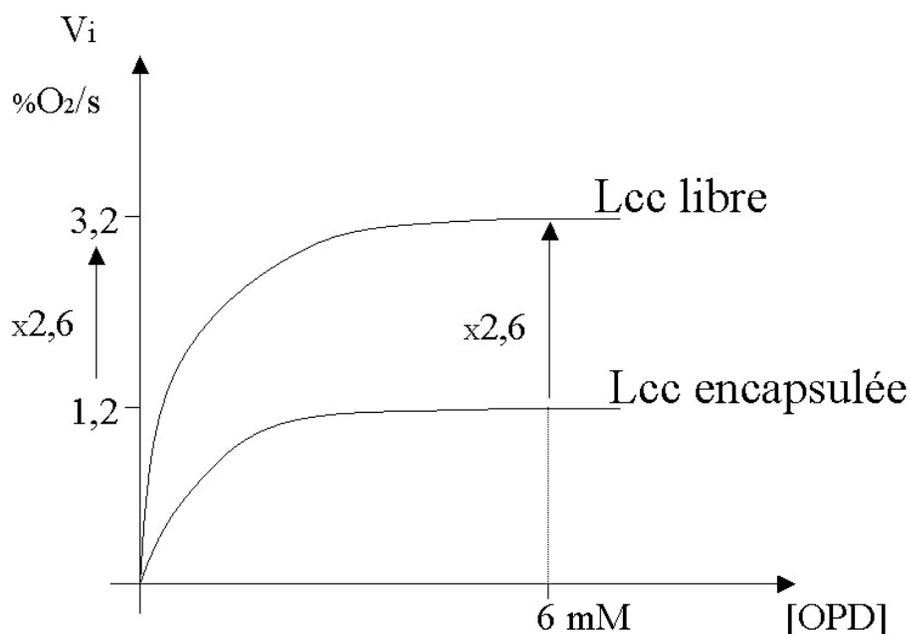


Figure 34. Pour la même concentration de substrat, les vitesses initiales des deux réactions enzymatiques diffèrent par un facteur de 2,6. En multipliant la quantité de microcapsules par un facteur de 2,6, tout en gardant la même concentration de substrat, on obtient la quantité théorique (de départ) de laccase encapsulée nécessaire pour obtenir la même vitesse initiale que pour la laccase libre.

Pour une concentration du substrat OPD de 6 mM, la valeur de la vitesse initiale pour la laccase libre est de 3,2 $\%O_2/s$ tandis que pour la laccase encapsulée on a

obtenu une valeur de 1,2 %O₂/s donc un facteur de 2,6 entre les deux valeurs. En multipliant la quantité de capsules utilisée par 2,6 on trouve que pour parvenir à la même vitesse initiale on a besoin de 2 L de laccase libre et d'une quantité de microcapsules qui ont été synthétisées à partir de 6,7 L solution de laccase pure (~ 3850 U/mL vs ABTS), ce qui nous confirme l'hypothèse de désactivation de l'enzyme lors du processus de synthèse. Comme déjà mentionné, cette désactivation peut être due à une perte d'enzyme pendant la synthèse ou bien la laccase est encapsulée mais elle perd sa capacité catalytique à cause de la réticulation des fonctions amines au cours de l'encapsulation.

La constante de Michaelis-Menten (K_M) est le deuxième facteur évalué afin d'effectuer la comparaison entre les deux systèmes (enzyme libre et immobilisée). Cette constante est une mesure de l'affinité entre l'enzyme et son substrat et est indépendante de la concentration d'enzymes actives. La constante de Michaelis-Menten nous indique la quantité de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale. Donc une valeur de K_M plus petite indique une meilleure affinité entre l'enzyme et substrat, parce que une plus petite quantité de substrat est nécessaire pour obtenir la moitié de la vitesse maximale. Les valeurs trouvées sont de $1,09 \pm 0,08$ mM pour la laccase libre et $0,50 \pm 0,09$ mM pour la laccase encapsulée, donc une diminution de 54%, ce qui nous indique une meilleure affinité enzyme-substrat dans le cas de l'enzyme immobilisée. Cette affinité pourrait être due au confinement de l'enzyme à l'intérieur de la capsule, car il y a plusieurs facteurs qui modifient l'environnement de l'enzyme et qui modifient en même temps son comportement. Quelques exemples d'effets provoqués par l'encapsulation seraient : la limitation de la diffusion du substrat à travers la membrane, l'accumulation ou la répulsion du substrat sur la paroi (en fonction de la charge qu'il possède) ainsi que la charge du microenvironnement créé par la capsule, tous ces facteurs ayant comme résultat une diminution artificielle de la valeur de K_M ^[51]. D'autres études ^[51, 57, 58] ont mis en évidence des enzymes immobilisées ayant le même comportement apparent : une meilleure affinité enzyme-substrat lorsque l'enzyme est immobilisée. En réalité, la laccase

encapsulée a probablement une affinité plus basse pour le substrat OPD que la laccase libre. Ce comportement apparent peut être dû à la présence du PEI dans le milieu de réaction, car la même tendance cinétique (diminution de K_M) a été observée lorsque le PEI a été tout simplement ajouté dans un mélange de réaction de la laccase libre avec le substrat OPD ^[47]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les fonctions amines du PEI peuvent former des liaisons avec l'enzyme, changeant le microenvironnement des sites actifs en même temps que son comportement cinétique. Nous ne pouvons pas conclure que l'affinité de la laccase est augmentée par le PEI, mais nous démontrons une baisse du K_M qui devra être expliquée par d'autres expériences.

Pour mieux comprendre l'effet de l'encapsulation sur l'activité catalytique de la laccase, d'autres études sont en cours dans le cadre de notre groupe de recherche, comme par exemple l'évaluation de l'effet de la porosité des microcapsules sur la vitesse de réaction, ce qui nous donnera une idée sur le lien entre la vitesse de diffusion du substrat à l'intérieur des microcapsules et la vitesse de la réaction enzymatique.

En résumé, l'encapsulation de la laccase n'affecte pas le pH de l'activité enzymatique maximale, celui-ci étant égal à 4,5 autant pour la laccase libre que pour la laccase immobilisée, envers le substrat choisi, soit l'OPD. En comparant l'activité enzymatique de la laccase libre avant la synthèse des microcapsules à celle de la laccase encapsulée, on a trouvé une efficacité de la méthode d'immobilisation de 12%. Cette diminution est due en grande proportion à la désactivation de la laccase durant la réaction de réticulation, car le PEI, étant un agent réducteur, peut affecter directement l'activité catalytique de la laccase. Les valeurs de la vitesse maximale évaluée ont mis en évidence une diminution de l'activité enzymatique de la laccase immobilisée par rapport à l'enzyme libre. Par contre, les valeurs de la constante de Michaelis-Menten nous indiquent une meilleure affinité enzyme-substrat dans le cas de l'enzyme immobilisée. Cependant, plusieurs facteurs (i.e. la limitation de la diffusion du substrat à

travers la membrane ou la charge du microenvironnement crée par la capsule) pourraient expliquer ce comportement apparent de l'enzyme immobilisée.

Une fois les paramètres cinétiques évalués, la prochaine étape de notre étude a été de quantifier la réaction enzymatique, en termes de quantité de substrat consommé et de produit d'oxydation formé, pour la laccase libre, immobilisée et immobilisée à l'intérieur d'un microréacteur, afin de mieux comprendre et modéliser le comportement de l'enzyme dans des biocapteurs.

*CHAPITRE 4***DÉVELOPPEMENT DE LA MÉTHODE EC POUR LA
QUANTIFICATION DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE**

Après avoir caractérisé le comportement cinétique de l'enzyme libre et immobilisée, la prochaine étape de notre projet a été de quantifier la réaction enzymatique, en termes de la conversion du substrat OPD en produit de réaction DAP pour l'enzyme libre, pour l'enzyme microencapsulée et pour les microcapsules immobilisées à leur tour dans un microréacteur. Pour arriver à cette fin, une méthode de séparation et quantification par électrophorèse capillaire a été développée.

4.1 Optimisation de la méthode EC : mode d'électrophorèse et détection

La première étape dans le développement de la méthode de séparation consiste dans le choix du mode d'électrophorèse, ainsi que du mode de détection. Pour notre projet, vu que les analytes à séparer (le substrat OPD et son produit d'oxydation enzymatique, le DAP) sont des petites molécules aromatiques chargées au pH de travail choisi, et en se basant sur les paramètres initiales de séparations trouvés pour la séparation des isomères de phénylène-diamines ^[59], nous avons opté pour l'électrophorèse capillaire en solution libre (CZE) suivie d'une détection UV-Vis. Après avoir choisi la détection UV-Vis, il faut trouver la longueur d'onde optimale pour la détection. Il faut mentionner que la longueur d'onde ne doit pas être nécessairement celle du maximum d'absorption, mais, plus important, il faut qu'elle accroisse de façon spécifique la détectabilité des analytes, tout en réduisant l'absorbance du milieu ^[43]. Pour nos analyses, en se basant sur les spectres d'absorption UV des deux analytes (figures 35 et 36), nous avons choisi deux longueurs d'onde : $\lambda = 254$ nm (pour le DAP) et $\lambda = 200$ nm (pour l'OPD).

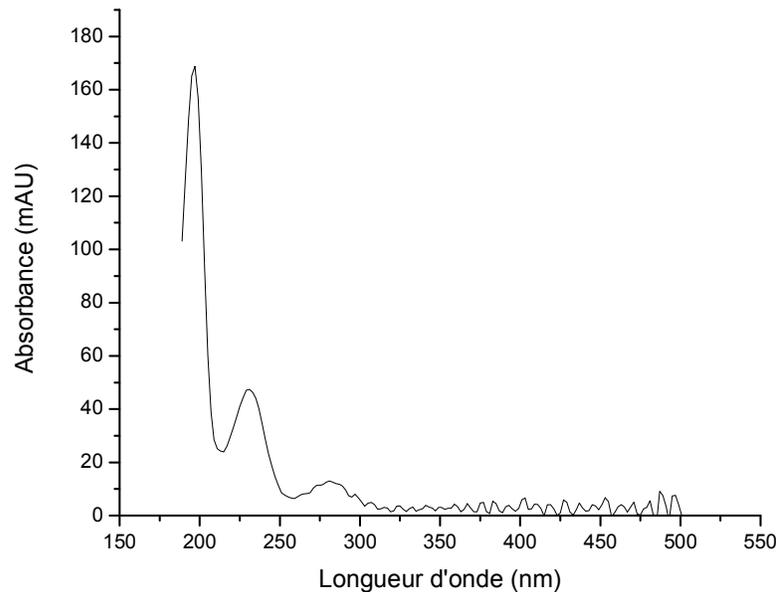


Figure 35. Spectre UV du pic de *o*-phenylènediamine (OPD 6 mM) pris par l'intermède du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent.

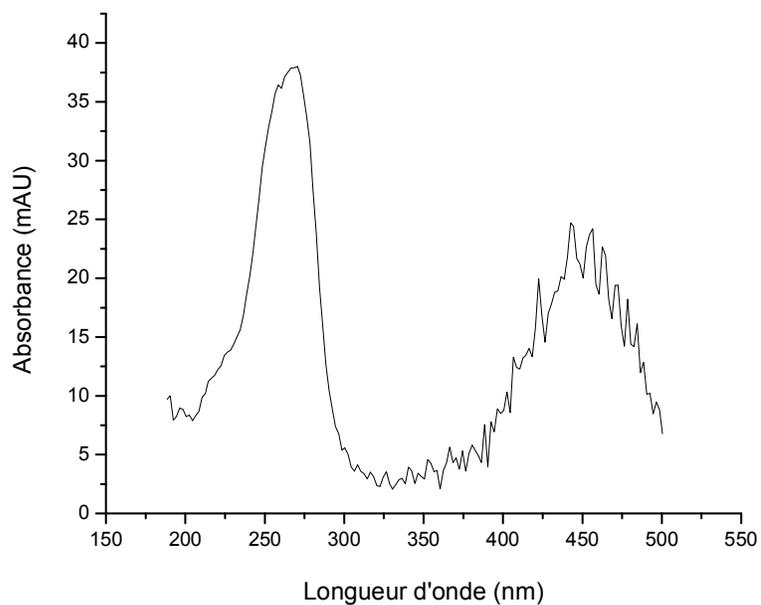


Figure 36. Spectre UV du pic de 2-hydroxy-3-aminophénazine (DAP 5 mM) pris par l'intermède du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent.

4.2 Choix du tampon

Le choix du tampon à utiliser lors d'une analyse en électrophorèse capillaire est d'une importance primordiale. Le tampon doit être choisi en tenant compte non pas seulement du pH et de la concentration qu'il doit avoir, mais aussi en pensant aux restrictions par rapport à la longueur d'onde minimum à partir de laquelle il peut être utilisé. Le pH du tampon est choisi en fonction des pK_a des solutés à séparer et de la valeur du flux électroosmotique que l'on veut atteindre, car la séparation des molécules dépend de leurs charges et de leur mobilité apparente, valeurs qui sont directement liées au pH du milieu.

Les premières séparations en EC ont été effectuées dans un tampon phosphate de sodium/acide acétique, 50 mM, pH 6,2 parce que celle-ci était la valeur optimale du pH trouvée dans la littérature ^[38] pour l'activité enzymatique. On pensait que le couplage de la réaction enzymatique et de la séparation des produits serait plus efficace si le pH pour ces deux étapes était le même. Les résultats (figure 37 et 38) ont montré que la séparation des produits était impossible, car le substrat OPD et le produit de réaction enzymatique DAP sont neutres à cette valeur du pH. Dans la figure 37, on voit deux électrophorégrammes des deux solutions d'OPD et DAP qui ont été analysées séparément et qui, par la suite, ont été mélangés et analysés de nouveau dans les mêmes conditions, le résultat étant affiché dans la figure 34. Les valeurs des constantes de dissociation trouvées dans la littérature pour l'OPD varient légèrement : 1,70-1,86 pour pK_{a1} et 4,55-4,65 pour pK_{a2} ^[49]. La seule valeur trouvée dans la littérature pour le pK_a du DAP a été de 5,1 ^[60], alors on a déterminé expérimentalement la première constante de dissociation apparente (dépendante de la force ionique du milieu) du DAP. On a mesuré le changement de la mobilité électrophoretique du DAP en fonction de l'acidité du tampon d'analyse qui variait de 1,6 à 3,1 et on a calculé la valeur du $pK_{a1,app}$ étant égale à 2,0 ce qui correspond à la valeur attendue, compte tenant des valeurs du pK_a de l'OPD.

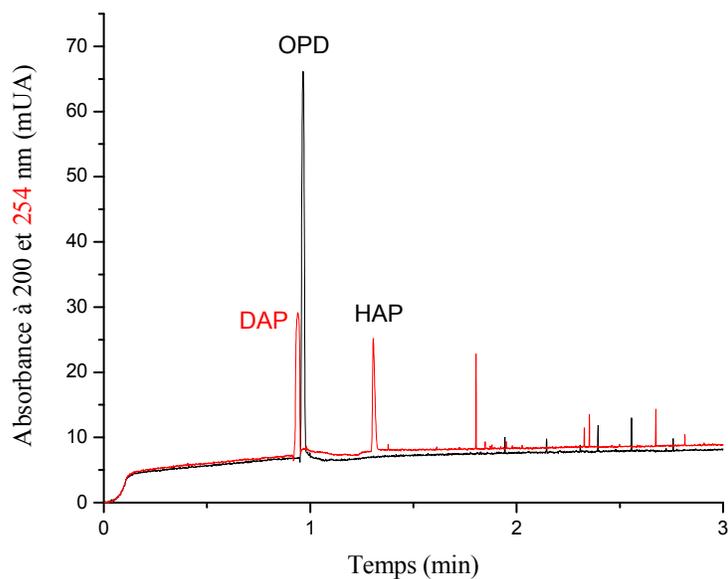


Figure 37. Électrophorégrammes montrant les temps de migration de deux solutions : OPD 2 mM et DAP 1mM dans un tampon phosphate de sodium/acide acétique 50 mM, pH 6,2.

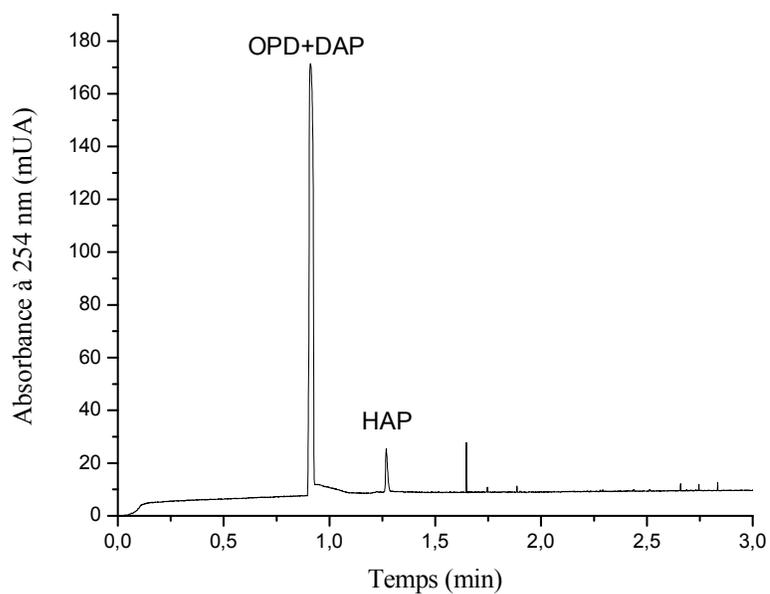


Figure 38. Électrophorégramme montrant les temps de migration d'une solution d'OPD et DAP dans un tampon phosphate de sodium/acide acétique 50 mM, pH 6,2.

Dans cette situation, on aurait pu utiliser l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire (MECK) pour séparer l'OPD du DAP, étant connu le fait que cette méthode s'applique avec succès pour la séparation des produits neutres, mais on venait de découvrir que le pH optimal pour la réaction enzymatique entre la laccase et l'OPD était en fait 4,5 et non pas 6,2, comme déjà mentionné dans la section 3.2. Alors on a décidé de diminuer le pH de séparation pour nos produits d'intérêt.

Dans ces conditions, plusieurs séparations ont été menées dans des tampons acétate ayant un pH 4,5 et 5,0. La reproductibilité des temps de migration et des hauteurs des pics était faible à cause de la variation du flux électroosmotique, étant connu que dans cet intervalle de pH la mobilité électroosmotique change très rapidement. Dans la figure 39, un échantillon de solution d'OPD de concentration 6 mM a été injecté en électrophorèse capillaire dans un tampon acétate de pH = 5,0. L'analyse a été effectuée en triplicate, et les résultats ont mené à des valeurs de 10% (écart-type relatif) pour le temps de migration et de 44% (écart-type relatif) pour l'aire des pics. Ce même comportement a été aussi observé dans le cas de l'analyse des solutions de DAP.

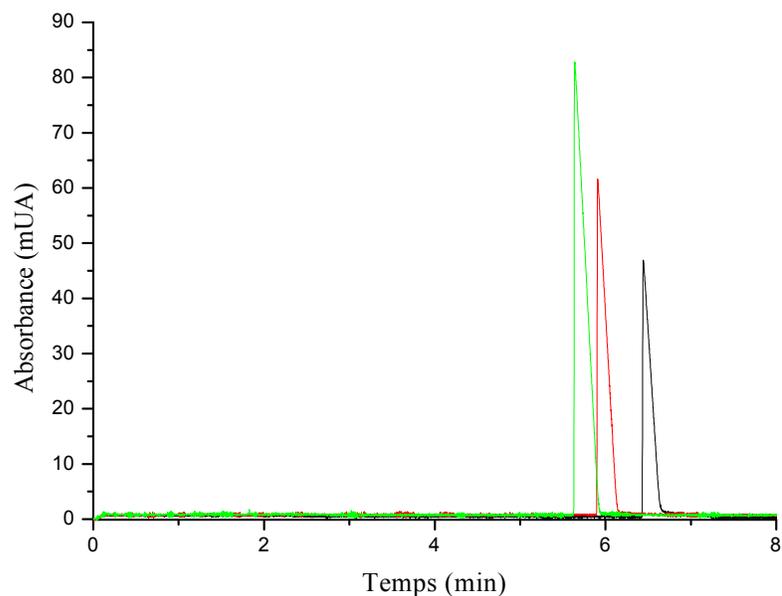


Figure 39. Électrophorégrammes montrant les temps de migration d'un échantillon d'OPD 6 mM dans un tampon acétate 50 mM, ayant un pH = 5,0. Le même échantillon a été injecté trois fois de suite, dans les mêmes conditions de séparation.

Un autre désavantage de l'utilisation des solutions tampon ayant des pH autour de 5 consiste dans le rapprochement des temps de migrations des deux analytes d'intérêt, soit l'OPD et DAP. Un échantillon d'une solution d'OPD 6 mM à laquelle on a rajouté de la laccase, a été analysé et les temps de migrations des deux composés sont presque identiques, le pic du DAP se chevauche avec celui de l'OPD ($R < 0,5$), ce qui rend les résultats pratiquement inutilisables à des fins de calculs quantitatifs.

Au pH 4,25 la résolution s'est amélioré à une valeur de 0,95 et aussi la reproductibilité du temps de migration (2,6% écart-type relatif pour le temps de migration du DAP), mais ces résultats étaient loin des conditions de séparation nécessaires pour une quantification simultanée de l'OPD et DAP.

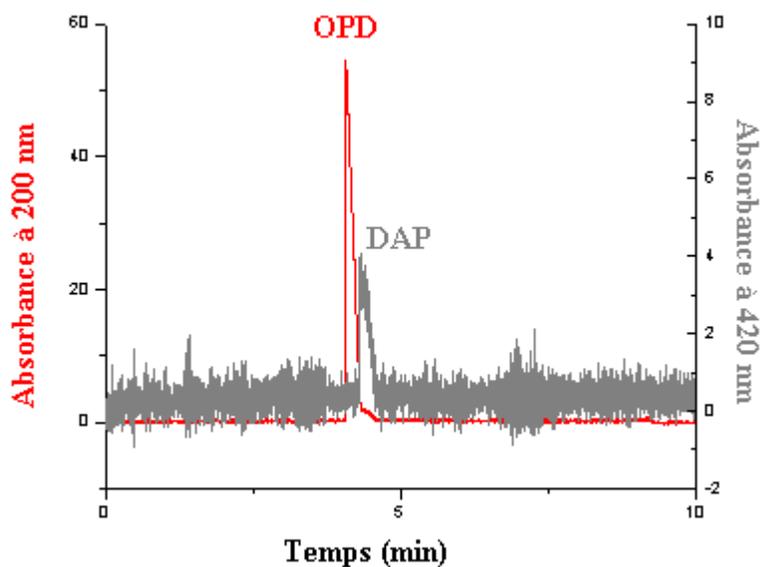


Figure 40. Électrophorogrammes montrant les temps de migration d'une solution d'OPD et DAP dans un tampon acétate pH = 4,25.

Malgré notre désir initial d'utiliser le même tampon pour la réaction enzymatique que pour la séparation, les résultats obtenus nous ont montré qu'une solution tampon avec un pH beaucoup moins élevé était nécessaire pour la séparation électrophoretique. Le choix d'une solution tampon plus acide offre un double avantage : on sort du domaine du pH (4-8) où le flux électroosmotique varie beaucoup en fonction du pH et à un pH acide, étant donné les valeurs de pKa présentées pour l'OPD et DAP, on sait que les deux analytes sont cationiques et ont des mobilités électrophoretiques différentes, ce qui n'est pas le cas pour un pH autour de 4,5. Nous avons opté pour un tampon phosphate de sodium ayant un pH de 2,5 valeur à laquelle les analytes à séparer sont chargés positivement et ils migrent seulement grâce à leur mobilité électrophorétique. Conformément à la théorie, le cation le plus petit sort en premier, suivi de celui plus grand. Les résultats obtenus (figure 43) nous fournissent une meilleure séparation des deux composés d'intérêt ($R = 9,3$) et une meilleure reproductibilité : 0,4% et 0,3% (écart-type relatif) respectivement pour le temps de migration de l'OPD et DAP, et 0,5% et 1,7% (écart-type relatif) pour les aires des pics de l'OPD et DAP, respectivement ($n = 2$, même journée).

Tableau 5. Valeurs de l'efficacité et de la résolution des séparations en électrophorèse capillaire en fonction de diverses valeurs du pH de la solution tampon utilisée.

Solution tampon et pH	Nombre de plateaux théoriques N (pour le pic d'OPD)	Résolution (R) entre les pics d'OPD et DAP
Phosphate de sodium/acide acétique pH 6,2	164 600	0,2
Acétate pH 5,0	58 300	0,4
Acétate pH 4,5	102 000	0,5
Acétate pH 4,25	34 400	0,95
Phosphate de sodium pH 2,5	260 700	9,3

En résumé, les paramètres initiaux de séparations ont été adaptés d'après ceux trouvés pour la séparation des isomères de phénylène-diamines ^[49], ayant varié seulement la solution tampon et le pH de séparation. Le tableau 5 montre les résultats obtenus pour les calculs de N et R pour les diverses valeurs du pH testés. Comme on peut voir, les meilleures valeurs sont celles obtenues en utilisant le tampon phosphate de sodium ayant un pH de 2,5. La prochaine étape de notre étude consiste dans la quantification proprement dite de la réaction enzymatique, en se basant sur la méthode d'EC développée.

CHAPITRE 5
QUANTIFICATION DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE

5.1 Quantification de la réaction enzymatique

À l'exception de deux cas précis, toutes les méthodes analytiques nécessitent un étalonnage, processus qui relie le signal analytique mesuré à la concentration de l'analyte. Les deux exceptions sont les méthodes gravimétriques et coulométriques. Dans ces deux cas, la relation entre les grandeurs mesurées et la concentration de l'analyte peuvent être calculées à partir de constantes physiques connues. Pour les autres méthodes analytiques, trois types d'étalonnage sont disponibles : la préparation et l'utilisation d'une courbe d'étalonnage externe, la méthode des ajouts dosés et la méthode de l'étalon interne.

Le choix de la méthode d'étalonnage pour notre projet n'a pas été facile. Puisqu'il s'agit d'une méthode d'analyse en-ligne, où les produits doivent être analysés directement après avoir passé à travers le microréacteur enzymatique, la méthode des ajouts dosés n'est pas applicable. On a essayé de trouver un étalon interne, que l'on voulait ajouter à l'échantillon avant que celui-ci passe à travers le microréacteur enzymatique, pour que l'analyse en ligne ne soit pas affectée, mais la tâche de trouver un composé qui soit positivement chargé à pH 2,5 (pour la séparation en électrophorèse capillaire) et qui ne soit pas dégradé en présence de l'enzyme, a été très difficile. Le rôle de l'étalon interne était d'éliminer les variations des temps de migration et des aires des pics des produits analysés, en le rapportant constamment aux résultats obtenus pour l'étalon interne. Finalement, nous avons décidé d'utiliser une courbe d'étalonnage externe pour la quantification de la réaction enzymatique étudiée. Des courbes d'étalonnage pour le substrat OPD et son produit d'oxydation enzymatique, le DAP, ont été établies (figure 41 et 42) à partir de composés disponibles commercialement.

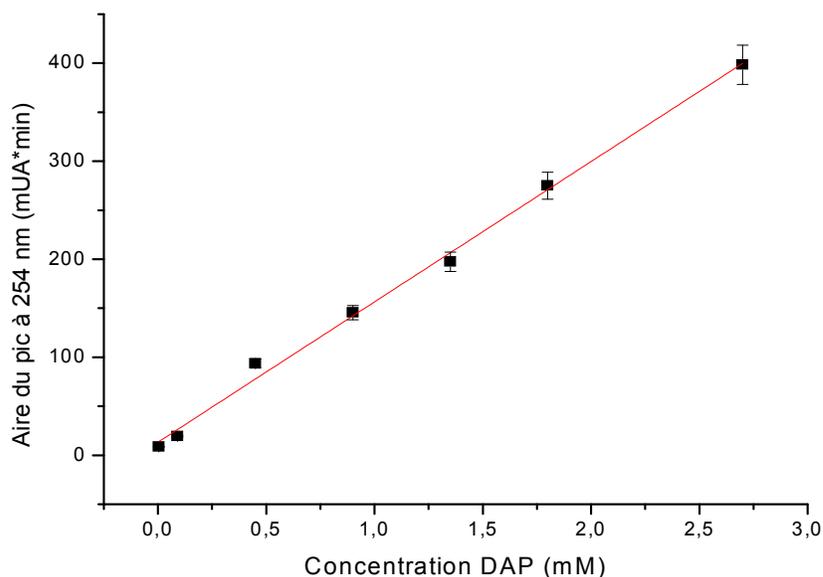


Figure 41. Courbe d'étalonnage du DAP obtenue en représentant les aires des pics ($n = 2$) en fonction des concentrations des solutions standard. L'équation de la régression linéaire est : Aire = $(143 \pm 3,90)$ [DAP] + $(13,3 \pm 5,39)$, avec un $R^2 = 0,996$.

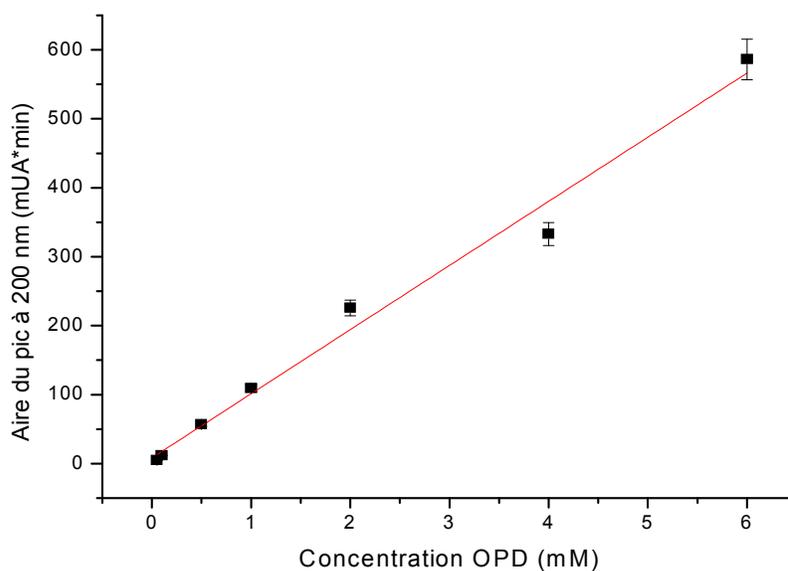


Figure 42. Courbe d'étalonnage de l'OPD obtenue en représentant les aires des pics ($n = 2$) en fonction des concentrations des solutions standard. L'équation de la régression linéaire est : Aire = $(93 \pm 5,0)$ [OPD] + $(8,3 \pm 14)$, avec un $R^2 = 0,98$.

5.2 Étude de la réaction enzymatique de la laccase libre

Après avoir mesuré les paramètres cinétiques caractérisant l'enzyme libre et encapsulée et après avoir établi les conditions d'analyse en électrophorèse capillaire, on a procédé à la prochaine étape de notre étude, soit la quantification de la réaction enzymatique proprement-dite. En première, on a vérifié si un suivi de la réaction enzymatique était possible à l'aide électrophorèse capillaire (figure 43).

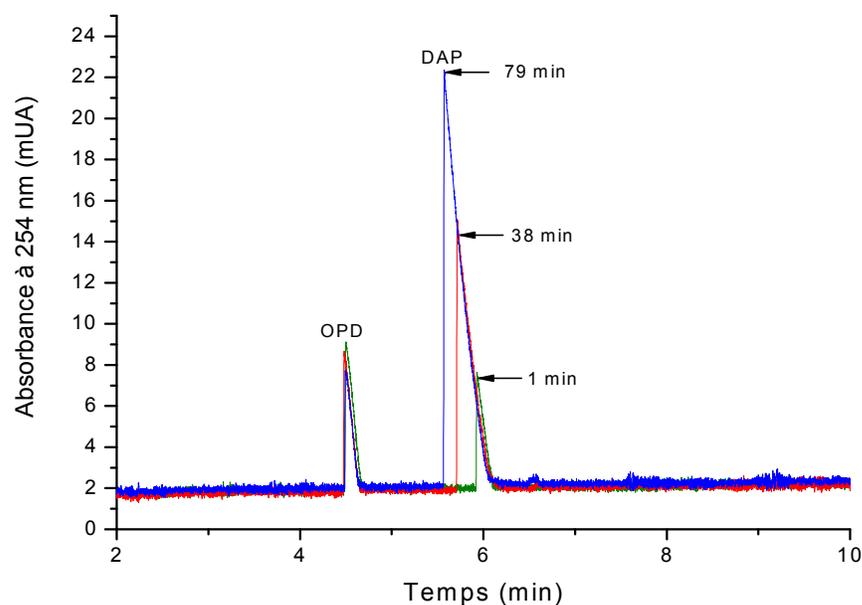


Figure 43. Suivi de la progression de la réaction enzymatique entre l'OPD et la laccase libre en électrophorèse capillaire. Conditions de réaction enzymatique : OPD 6 mM, tampon acétate 50 mM, pH 4,5, laccase libre (0,94 U/mL). Conditions de séparation : injection 3 nL, tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 2,5, voltage 20 kV.

Un mélange réactionnel de la laccase libre (sans agitation) avec le substrat OPD en concentration de saturation de l'enzyme, a été analysé en électrophorèse aux intervalles de temps indiqués sur la figure 43. Les aliquotes ont été injectées directement en électrophorèse capillaire et la détection a été effectuée à 200 et 254 nm. Les résultats à 254 nm (figure 43) montrent une différence nette entre la hauteur du pic de DAP provenant des trois aliquotes analysées aux trois moments

de la réaction, ce qui nous indique qu'une quantification du produit d'oxydation enzymatique est possible. À cette longueur d'onde (254 nm) le DAP a une absorptivité molaire approximativement 5 fois plus élevée que l'OPD, et pour cette raison la diminution des pics d'OPD lors de sa consommation n'est pas très évidente. Pourtant, cette diminution est mise en évidence dans la figure 44, où l'on peut suivre la consommation d'OPD pendant la réaction enzymatique selon les électrophorégrammes enregistrés à $\lambda = 200$ nm.

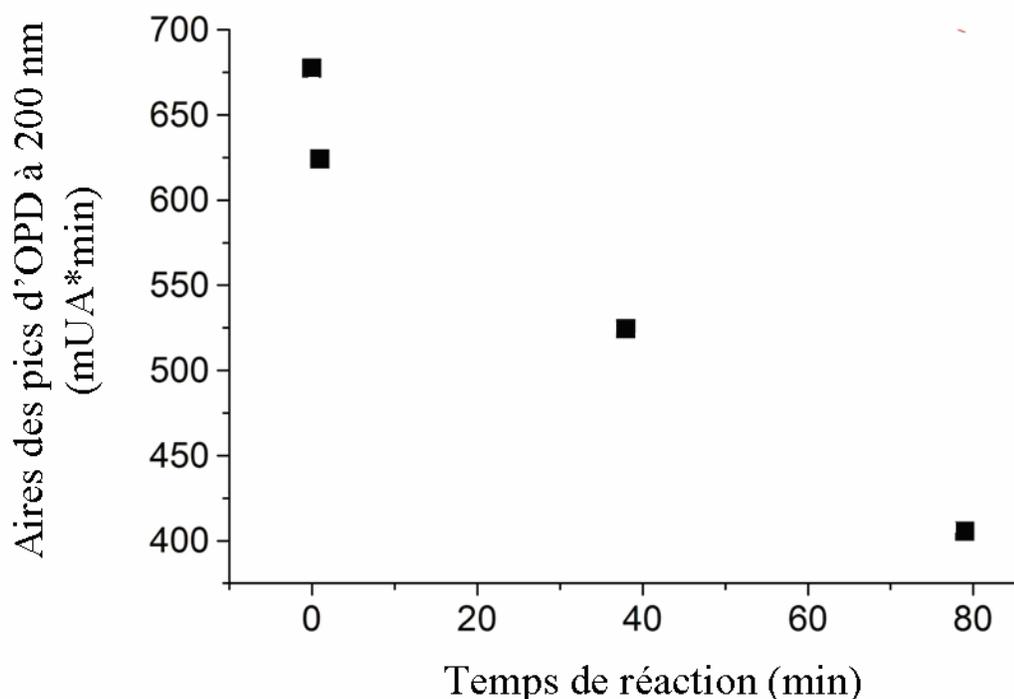


Figure 44. Progression de la réaction enzymatique mise en évidence par la consommation de l'OPD. Conditions de réaction enzymatique : OPD 6 mM, tampon acétate 50 mM, pH 4,5, laccase libre (0,94 U/mL). Conditions de séparation : injection 3 nL, tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 2,5, voltage 20 kV.

La quantification de la réaction enzymatique a été effectuée de deux façons à l'aide des courbes d'étalonnage : 1) en calculant la proportion d'OPD consommée, à partir de la quantification de l'OPD resté en solution après la réaction enzymatique (calcul A) et 2) en calculant la quantité de DAP formé et en la convertissant en OPD consommé, compte tenant du rapport stœchiométrique de 2:1 pour la formation du DAP ^[38] (calcul B). Après 79 minutes, l'efficacité de

la conversion de l'OPD dans la réaction enzymatique avec la laccase libre était de 41% d'après le calcul A et de 46% d'après le calcul B. La proportion d'OPD consommé dans la réaction enzymatique était confirmée par un calcul direct compte tenant des aires des pics d'OPD au moment du début et à la fin de la réaction. Ce rapport nous indique une consommation d'OPD de 41%, ce qui est tout à fait en accord avec le calcul par la méthode A. L'écart observé entre les résultats obtenus par la méthode de calcul A et B peut être dû au fait que la méthode B est une méthode indirecte, qui laisse place à une propagation d'erreurs plus importante.

5.3 Étude de la réaction enzymatique de la laccase encapsulée et à travers le microréacteur enzymatique

L'efficacité du microréacteur enzymatique a été testée en mesurant le rapport de conversion du substrat OPD en produit d'oxydation DAP (Tableau 6) et en le comparant avec les résultats obtenus pour la réaction enzymatique de la quantité correspondante de microcapsules en suspension (conditions de réaction décrites dans les sections 2.4.1 et 2.5).

Tableau 6. Pourcentage de l'efficacité de conversion du substrat (OPD 2mM) en produit de réaction DAP par la laccase encapsulée.

Laccase microencapsulée	Efficacité de conversion (2 min)	
	Calculée par la quantification de l'OPD non réagi (calcul A) ^a	Calculée par la quantification du DAP formé (calcul B) ^a
Microcapsules dans le microréacteur	48 ± 2%	26 ± 3%
Microcapsules en suspension	40 ± 4%	19 ± 3%

^a Les méthodes de calcul sont décrites dans la section 5.2

Les résultats obtenus indiquent une efficacité de la réaction enzymatique du microréacteur légèrement supérieure à celle faite avec des microcapsules en suspension. Cela pourrait être expliqué par le fait que la pression hydrodynamique appliquée à travers le microréacteur mène à une vitesse de réaction globale plus élevée. En fait, la vitesse du cycle catalytique de transformation du substrat en produit d'oxydation n'est pas affectée en soi, mais c'est la vitesse de propagation du substrat et du produit d'oxydation enzymatique à travers la paroi des microcapsules qui change et qui a comme résultat un meilleur taux de transformation de l'OPD en DAP. Effectivement, du point de vue statistique, entre les deux résultats il n'y a pas de différence significative (annexe).

Le calcul de la quantité d'OPD consommée dans la réaction enzymatique nous indique un écart entre les résultats obtenus par les deux méthodes de calcul. La quantification de l'OPD non-réagi nous mène, par différence, à la quantité d'OPD consommée dans la réaction (calcul A). Cette valeur est significativement supérieure (annexe) à la quantité d'OPD calculée à partir de la quantification du DAP formé durant la réaction enzymatique (calcul B). Cette différence de 48% versus 26% peut être attribuée à : (i) l'oxydation spontanée du DAP menant à la formation du 2-hydroxy-3-aminophenazine (HAP) ^[61], (ii) la formation d'oligomères et polymères de l'OPD et/ou DAP ^[62], (iii) l'adsorption non-spécifique du produit dans les microcapsules, (iv) l'adsorption non-spécifique du produit dans les parois du microréacteur, et/ou (v) la faible diffusion du produit vers l'extérieur des microcapsules. Ces hypothèses ont été vérifiées tour à tour.

L'électrophorégramme de la figure 45, qui représente les produits qui se trouvent dans le mélange sortant du microréacteur, montre clairement un produit secondaire de réaction, probablement le HAP. Sa présence est soutenue par son spectre d'absorbance (figure 46) pris pendant la séparation, par l'intermédiaire du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent et comparé avec la littérature ^[61]. Ceci démontre qu'au moins une partie de la différence mentionnée

antérieurement est due à la première hypothèse : la formation de l'HAP par l'oxydation spontanée du DAP interfère avec la quantification de ce dernier.

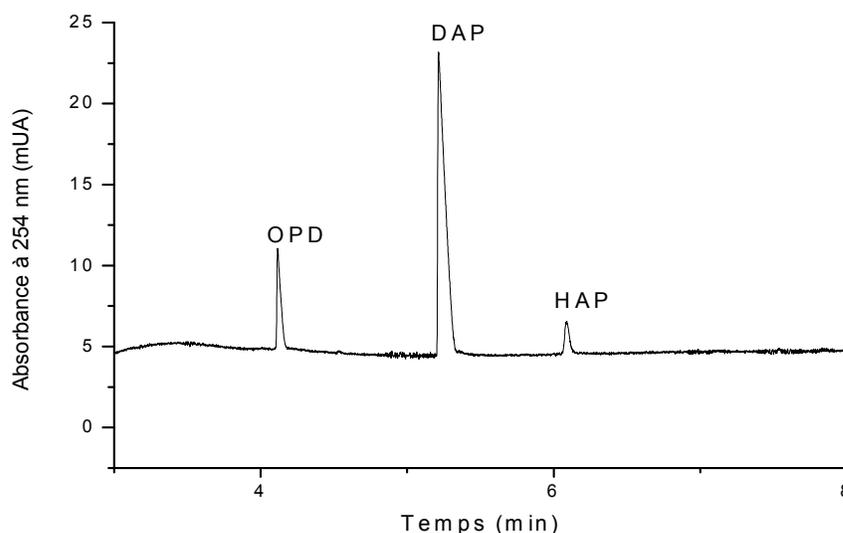


Figure 45. Électrophorégramme d'un échantillon d'OPD 2 mM passé à travers le microréacteur enzymatique, dans lequel on peut observer la présence du produit secondaire, l'HAP.

Cependant, la perte du DAP à cause de son oxydation est peu significative, comme l'on peut observer en comparant son spectre d'absorption (figure 32) avec celui de l'HAP, pour une injection d'une solution standard de DAP 5 mM (90% pur). En se basant sur la loi de Lambert-Beer (on connaît les concentration des solutions analysée et les valeurs de l'absorbance à 254 nm) on arrive à estimer les valeurs de l'absorptivité molaire de chaque produit. En présumant que le 10% d'impureté du standard du DAP (indiqué par le fournisseur) est attribuable à la présence de l'HAP (la figure 46 représente une concentration de 0,5 mM d'HAP), on déduit que l'HAP a une absorptivité molaire approximativement cinq fois plus élevée que le DAP à 254 nm. En appliquant ce rapport pour les pics de la figure 41, on obtient un rapport de concentrations de DAP : HAP de 45 : 1, ce qui ne peut pas expliquer la différence de l'efficacité de conversion calculée antérieurement (tableau 5).

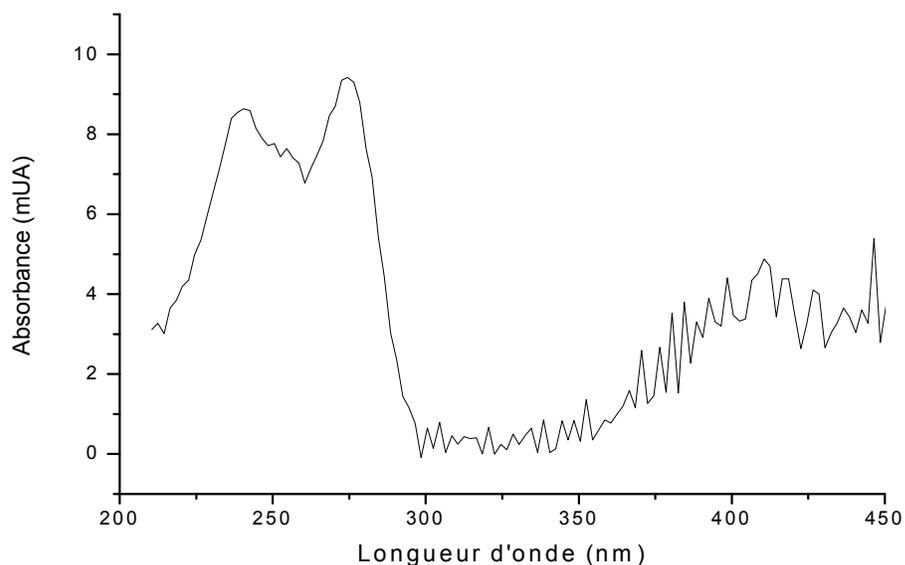


Figure 46. Spectre UV du pic de hydroxy-2-amino-3-phénazine (HAP) pris par l'intermédiaire du détecteur PDA du système d'électrophorèse capillaire Agilent.

Pour comparaison, le spectre d'absorbance d'une solution standard d'OPD de concentration 6 mM est montré dans la figure 31. Compte tenant des puretés relatives du substrat et du produit de réaction, l'absorptivité molaire du DAP est estimée étant cinq fois plus élevée que celle de l'OPD à 254 nm.

Pour ce qui est de la deuxième hypothèse, il est démontré que l'OPD et le DAP subissent des réactions de polymérisation lors des réactions enzymatiques ^[62]. Il est concevable que la laccase puisse transformer simultanément l'OPD en DAP et poly-DAP, ce qui peut expliquer l'efficacité de conversion apparemment plus grande, en se basant sur la quantification de l'OPD. En suivant le même jugement, si une portion du DAP subit une réaction de polymérisation durant la réaction enzymatique, le pic du DAP apparaîtra plus petit qu'il est en réalité. Nous n'avons pas cherché spécifiquement les poly-OPD et poly-DAP dans les échantillons séparés en EC. La masse molaire de ces polymères étant très grande, leur diffusion à travers la membrane des microcapsules est probablement empêchée, ce qui fait que leur détection dans le mélange de réaction serait très difficile.

Afin de vérifier les deux hypothèses (iii) et (iv), nous avons effectué une étude de récupération. La rétention du DAP dans le microréacteur a été quantifiée en passant 50 μL de solution standard de DAP (3mM) à travers le microréacteur, dans les mêmes conditions de pression que pour une réaction enzymatique, mais sans le rinçage de 100 μL . La solution sortante a été ensuite analysée en électrophorèse capillaire et les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus pour l'analyse de la solution-témoin de DAP 3 mM (figure 45). Deux échantillons différents ont été analysés et chaque analyse a été répétée (eg : par EC) deux fois. La quantification des pics avant et après le passage du standard de DAP à travers le microréacteur a mené à un recouvrement de $83 \pm 1\%$. La perte de 17% peut s'expliquer par une adsorption du DAP sur les parois du capillaire en silice fondue, à cause d'une attraction électrostatique. Il est connu que le capillaire en silice fondue a une surface chargée négativement au pH 4,5 et le DAP a une charge partielle estimée à +1, en se basant sur ses valeurs des pKa. Par contre, les microcapsules sont cationiques et alors seulement des faibles forces intermoléculaires pourraient être responsables pour une perte par adsorption du DAP pendant le passage de 2 minutes des solutions à travers le microréacteur.

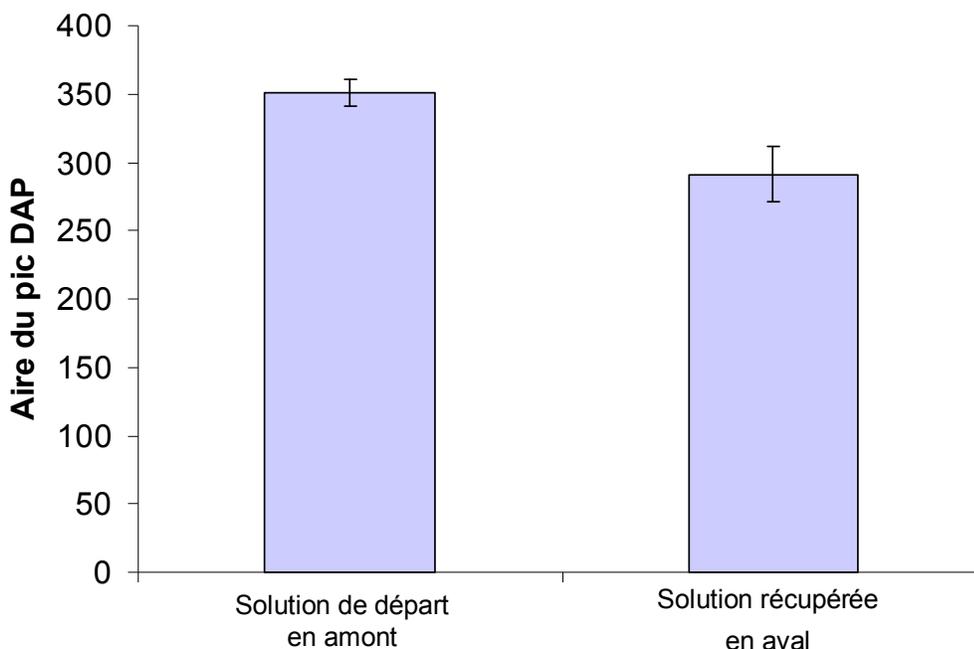


Figure 47. Recouvrement du DAP à travers le microréacteur enzymatique. En amont : échantillon de DAP 3mM analysé directement en électrophorèse capillaire et en aval: échantillon de DAP 3mM passé à travers le microréacteur enzymatique et par la suite analysé en électrophorèse capillaire.

Dans le but de faire la différence entre la perte du DAP par adsorption aux parois du microréacteur et la perte du DAP dans la membrane des microcapsules, nous avons effectué une deuxième étude d'efficacité de conversion, en utilisant une suspension de microcapsules. La concentration de l'OPD (2 mM) et le temps de réaction (2 min) ont été presque les mêmes, tandis que le microréacteur a été remplacé par une quantité proportionnelle de 290 mg de microcapsules mises en suspension dans 3 mL de tampon acétate de pH 4,5. Ceci donne une densité de microcapsules similaire à celle du microréacteur. Les résultats obtenus (tableau 5) montrent la même différence pour l'écart de quantification effectué par les deux méthodes (A et B). Ces résultats montrent que la dernière hypothèse, celle d'une faible diffusion du DAP vers l'extérieur des microcapsules pourrait être significative. La diffusion de l'OPD et du DAP est quelque peu empêchée, même à des densités de charges du PEI très faibles, ce qui a été signalé antérieurement

pour le PPD, l'isomère de l'OPD ^[51]. Cependant, on présume que le substrat OPD peut diffuser plus facilement à travers la membrane des microcapsules parce que l'OPD est moins cationique et plus petit que son produit d'oxydation, le DAP. En conséquence, le taux de produit sortant des microcapsules est probablement inférieur au celui du substrat entrant et cette différence est encore plus évidente dans le cas des produits de polymérisation, à cause de leur masse molaire plus importante. Cet effet a été observé préalablement ^[51] pour le produit cationique de l'oxydation du PPD par la laccase encapsulée. Cette hypothèse est encore dans l'étude dans notre groupe de recherche.

Après avoir quantifié la réaction enzymatique, on a procédé à l'évaluation de la stabilité du microréacteur enzymatique dans le temps. Sa stabilité a été évaluée en termes de quantification du DAP (efficacité de conversion de l'OPD) sur un intervalle de temps de 30 jours. Après 30 jours, l'efficacité du microréacteur a diminué par 50% comme l'indique la figure 48. Cependant, durant cette période, le microréacteur a été utilisé plusieurs fois.

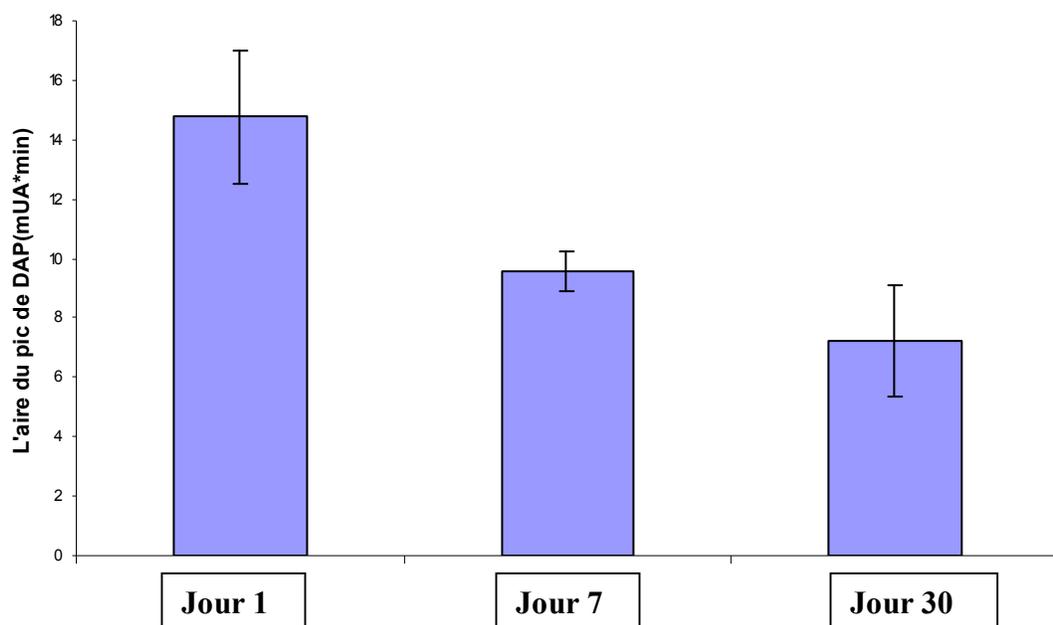


Figure 48. Stabilité d'un microréacteur enzymatique sur un intervalle de temps de 30 jours, mesurée en quantifiant le DAP. Conditions de réaction : 2,1 mg microcapsules, 50 L OPD 2 mM, tampon acétate 50 mM pH 4,5.

Chaque barre représente la moyenne des aires des pics de 3 échantillons d'OPD 2 mM (aliquotes de 50 μ L) passés séparément à travers le microréacteur. Chaque échantillon a été analysé en électrophorèse capillaire deux fois. La précision des aires des pics est de 5,2% écart-type relatif. Les barres d'erreur démontrent la reproductibilité du fonctionnement du microréacteur dans une seule journée.

5.4 Développement du montage en ligne du microréacteur enzymatique couplé au système d'électrophorèse capillaire

Avant de commencer les essais du montage en ligne, un essai préliminaire a été effectué en injectant 60 nL d'un mélange de réaction de substrat OPD avec la laccase libre en électrophorèse capillaire, pour s'assurer que la séparation d'un plus grand volume est possible. Le 50 nL correspond au volume de la boucle d'injection choisie pour le montage en-ligne. Le résultat (figure 49) montre que la séparation est possible, la résolution entre les pics d'OPD et DAP étant égale à 9. Comme attendu, pour un volume d'injection plus grand, l'efficacité de la séparation a diminué d'un facteur de 8,6 (pour le DAP), mais la quantification est quand même possible.

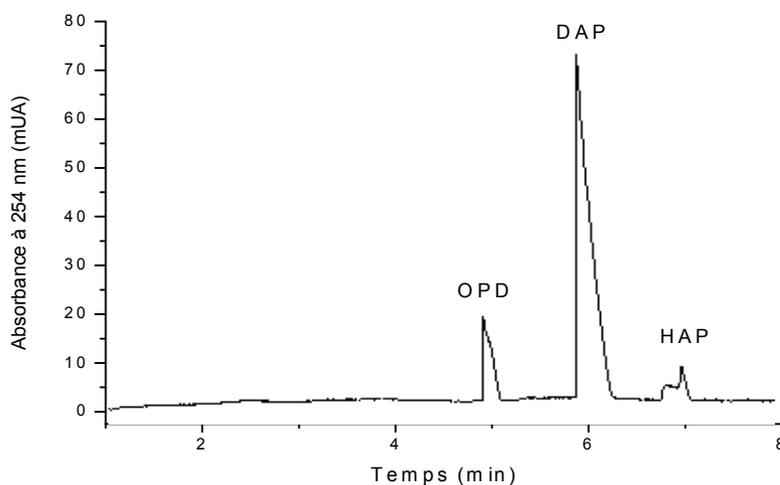


Figure 49. Électrophorégramme d'un échantillon après la réaction enzymatique en utilisant une injection de 60 nL.

Malgré nos efforts effectués avec le montage en ligne proposé (figure 24), la séparation des produits de réaction enzymatique n'a pas été possible, parce que le haut voltage appliqué dans le système d'électrophorèse capillaire a produit un chauffage très important à l'intérieur de la vanne, causant la production de bulles d'air, qui provoquaient à chaque fois une chute de courant, tout en arrêtant la séparation en cours. Nous avons essayé de surmonter ce problème en utilisant des capillaires de séparation ayant des diamètres internes divers (figure 50), en pensant que la variation du diamètre entraînera une variation différente de la résistance dans la vanne et ainsi on pourrait éviter la formation des bulles d'air et la chute du courant. Ces tests ont été effectués en utilisant comme électrolyte une solution tampon phosphate ayant un pH de 2,5 et une concentration de 25 mM.

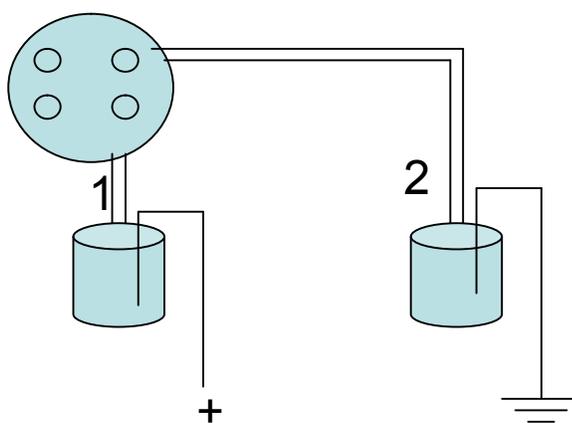


Figure 50. Schéma du micro-montage utilisé pour effectuer les essais avec les différents diamètres internes des capillaires. 1 et 2 : capillaires de différents diamètres comme détaillé dans le tableau 6.

Plusieurs voltages appliqués ont été aussi testés pour voir à quel point le courant a chuté afin de régler le problème. Les résultats pour les différents voltages et diamètres de capillaire se trouvent dans le tableau 7.

Tableau 7. Valeurs du potentiel appliqué et le temps de fonctionnement atteint lors de l'utilisation des capillaires ayant des différents diamètres internes. Solution tampon : phosphate de sodium 25 mM, pH 2,5.

Diamètre interne (μm)		Voltage appliqué (kV)	Courant obtenu (μA)	Durée d'obtention d'un courant stable (min)
Capillaire 1 ^a	Capillaire 2 ^a			
50	50	2	6,6	10
		5	15,2	10
		5	15,7	10
		7,5	23,3	10
		10	33,1	1
		10	33,4	1,35
		10	33	2
		10	32,7	1,25
30	30	2,5	2,9	10
		5	5,4	10
		7,5	8,9	10
		10	12,2	10
		12,5	15,4	10
		15	19,2	2,34
		15	19	3,31
20	30	5	4,3	3
		10	8,4	0,5
250	50	10	13,5	2
		-10	1,5	1
250	250	5	très instable	
		-5	très instable	

Temps d'application du potentiel : 10 min; longueur des deux capillaires: 35 cm.

^aVoir figure 48.

En pratique, pour que la séparation en EC soit possible, il faut que le courant soit stable pour toute la durée de chaque analyse, pour le potentiel de séparation choisi. Les essais effectués avec des capillaires ayant un diamètre interne de 50 μm ont mené à l'obtention d'un courant stable pour une période de 10 min, et ce, pour l'application d'un potentiel de séparation de maximum 7,5 kV. Avec les capillaires ayant un diamètre interne de 30 μm , on a obtenu un courant stable pour une période de 10 min pour l'application d'un potentiel de 12,5 kV. Pour des voltages appliqués au-delà de 10 kV (pour un d.i. de 50 μm) ou 15 kV (pour un d.i. de 30 μm) le courant a chuté, produisant l'arrêt de l'analyse. Pour notre projet, comme le potentiel nécessaire à la séparation des produits est de 20 kV, le

courant chute immédiatement après l'application de celui-ci, en arrêtant l'analyse et rendant la séparation pratiquement impossible.

Ce problème de chute de courant pourrait être surmonté en couplant la vanne au capillaire de séparation par l'intermédiaire d'un montage en T (figure 51), évitant ainsi l'application du voltage directement dans la vanne. La solution a été introduite dans la boucle de la vanne en appliquant une pression d'azote de 10 psi du côté où se trouvera le microréacteur, jusqu'à ce que la solution sorte à l'autre bout. Ensuite, on tourne la vanne en position d'injection et on applique une nouvelle pression pour que la solution qui est à l'intérieur de la boucle d'injection entre dans le capillaire de séparation. À ce moment, on applique le voltage nécessaire pour la séparation et on enregistre les paramètres d'intérêt de l'analyse.

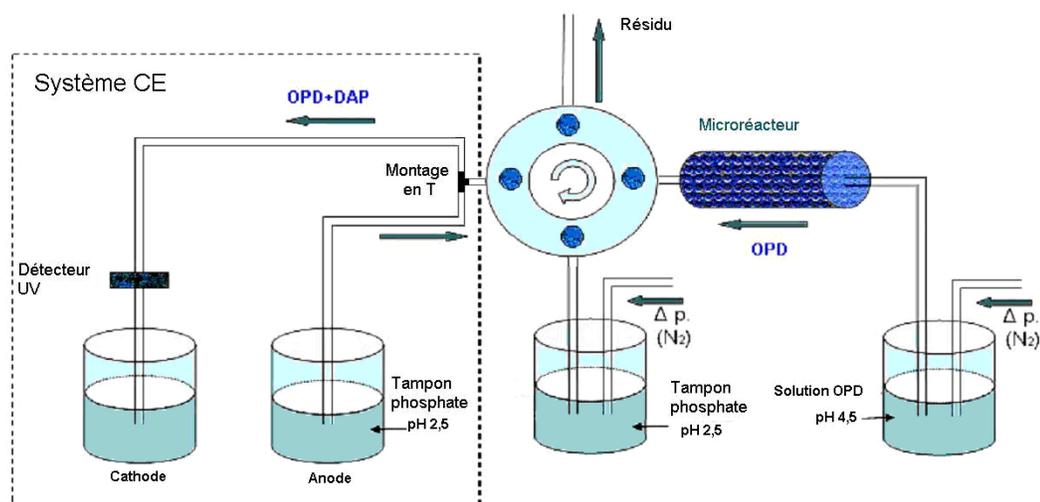


Figure 51. Schéma du deuxième montage en-ligne proposé pour l'étude de l'efficacité du microréacteur enzymatique.

Pour vérifier si le nouveau montage utilisant la connexion en T fonctionne, nous avons testé l'influence du montage en T lorsqu'un voltage est appliqué à travers le capillaire de séparation. Dans un premier temps, le montage en T a été testé sans être connecté à la vanne, comme le montre la figure 52. La solution tampon

est introduite dans le capillaire de séparation à travers le T, à l'aide d'une seringue. Au moment où le capillaire est rempli, le voltage est appliqué pendant l'intervalle de temps désiré.

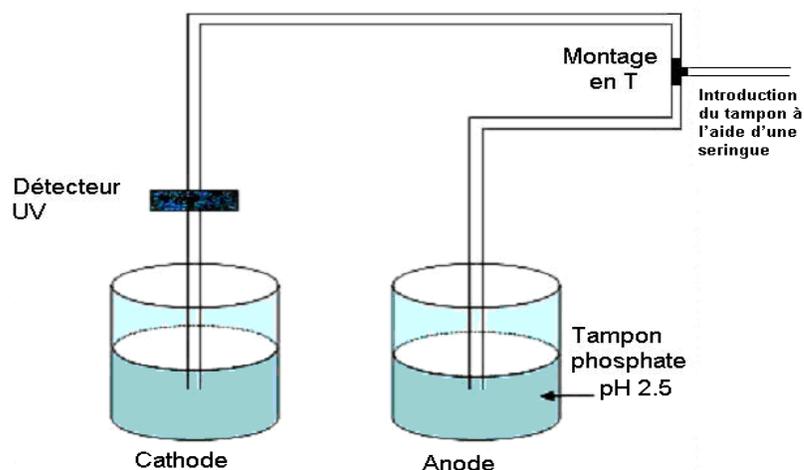


Figure 52. Schéma du micro-montage utilisé pour tester le fonctionnement de l'assemblage en T.

Les résultats préliminaires se sont avérés encourageants, car le courant a été stable pour tous les voltages testés, pendant l'intervalle de temps fixé, comme montré au tableau 8.

Tableau 8. Valeurs du voltage appliqué et le temps de fonctionnement atteint lors de l'utilisation du montage en T.

Diamètre interne (µm)		Voltage appliqué (kV)	Courant obtenu (µA)	Durée d'obtention d'un courant stable (min)
Capillaire 1	Capillaire 2			
50	50	5	18,2	10
		10	38	10
		20	67	10
		20	64,1	20
		20	64,8	20
		20	62,1	20
		20	62,6	20

La prochaine étape dans le développement du montage en ligne a été de vérifier le fonctionnement du montage en ligne proposé dans le système d'EC (figure 53).

Les essais ont été effectués avec une solution tampon phosphate ayant un pH de 2,5 et une concentration de 25 mM. Pour les tests effectués, en appliquant un voltage de 20 kV, on a réussi à obtenir un courant constant de $63,4 \pm 1,2 \mu\text{A}$.

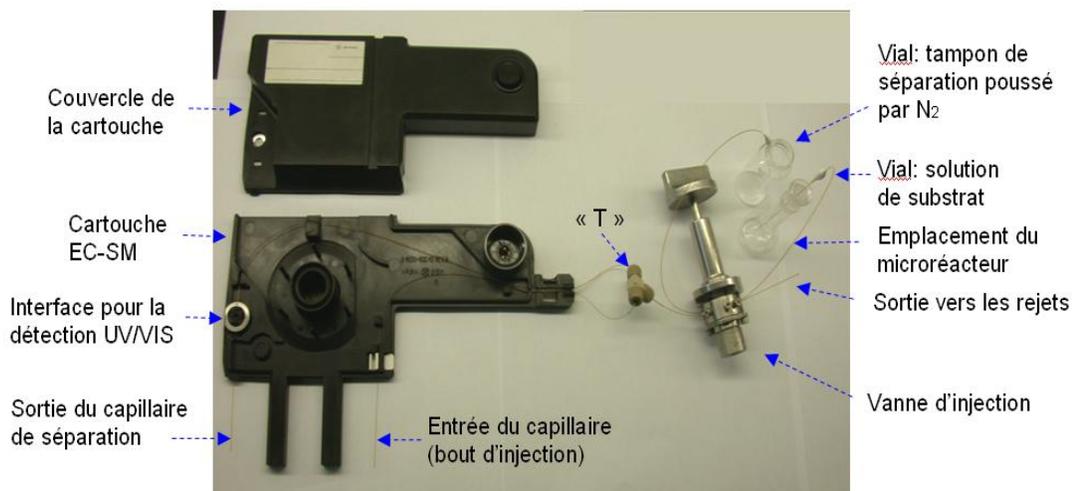


Figure 53. Photo montrant l'utilisation d'une cartouche de capillaire adaptée pour le couplage EC – spectrométrie de masse à la réalisation du montage en ligne par l'intermédiaire du T.

Les résultats des études présentés dans ce chapitre nous ont permis d'évaluer l'efficacité de conversion de la réaction enzymatique pour la laccase libre, laccase immobilisée et laccase immobilisée à l'intérieur d'un microréacteur, afin de comprendre le comportement probable de l'enzyme dans des biocapteurs. La quantification de la réaction enzymatique a été faite à partir de la quantité de substrat consommé (calcul A) et à partir de la quantité de produit de réaction formé (calcul B). Pour ce qui est de la laccase libre, les deux méthodes de calcul ont mené à des résultats équivalents. Pour la laccase immobilisée, les résultats indiquent une discrétance deux fois plus importante si la première méthode de calcul (calcul A) est utilisée par rapport à la méthode B. L'oxydation spontanée du DAP menant à la formation du HAP, la formation d'oligomères et polymères de l'OPD et/ou DAP, l'adsorption non-spécifique du DAP dans les microcapsules et dans les parois du microréacteur et la faible diffusion du produit d'oxydation vers l'extérieur des microcapsules, sont quelques facteurs qui mènent à cette

différence. Une meilleure efficacité de réaction enzymatique du microréacteur par rapport aux microcapsules en suspension a été remarquée. Ceci est dû à la pression hydrodynamique appliquée à travers le microréacteur, ce qui entraîne une vitesse de diffusion plus grande du substrat et du produit de réaction à travers les microcapsules et ainsi on obtient une vitesse de réaction globale plus élevée. Par la suite, nous avons essayé le couplage en ligne du microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire. Le montage proposé initialement n'a pas fonctionné et un deuxième montage a été développé. Les résultats préliminaires se sont avérés encourageants, mais à ce point, il ne restait plus de temps pour optimiser le développement du système proposé, le thème restant ouvert pour la recherche future. L'étape suivante sera de mettre en place un procédé qui nous permettra de s'assurer que toute la solution se trouvant dans la boucle d'injection de la vanne passe dans le capillaire de séparation avant l'application du voltage. Afin d'y arriver, deux autres paramètres restent à optimiser : la pression et le temps nécessaire à l'application de cette pression dans la boucle de la vanne. Le fonctionnement du montage en ligne proposé permettra l'étude et la caractérisation d'autres systèmes enzyme-substrat, tout en profitant des avantages que les systèmes en ligne présentent.

CHAPITRE 6
CONCLUSIONS

Ce projet de recherche a eu comme principal but l'étude de l'efficacité de la microencapsulation, technique d'immobilisation d'enzymes utilisée pour la réalisation des nouveaux biocapteurs et bioréacteurs. Pour y arriver, nous avons d'abord évalué les effets que la méthode d'immobilisation choisie comporte sur l'enzyme. Par la suite, la réaction enzymatique est étudiée du point de vue qualitatif et quantitatif, en utilisant une méthode d'analyse basée sur la technique de l'électrophorèse capillaire. Ensuite, afin de modéliser le comportement des enzymes dans des biocapteurs, on a procédé à la caractérisation de la réaction enzymatique à travers un microréacteur contenant l'enzyme microencapsulée. Finalement, nous avons essayé la réalisation d'un montage en ligne entre le microréacteur enzymatique et le système d'électrophorèse capillaire, pour faciliter l'étude du comportement des enzymes envers différents substrats.

Pour commencer, les microcapsules ont été synthétisées par polymérisation interfaciale entre le PEI, un polymère hydrosoluble et l'agent réticulant en phase organique, le dichlorure de d'écandioyle. En utilisant les conditions expérimentales décrites dans la section 2.2, nous avons obtenu des microcapsules qui possèdent une géométrie sphérique, un diamètre de 30 à 50 μm , une membrane résistante et semi-perméable avec des pores ayant une largeur comprise entre 2,6 et 5 nm.

Avant de procéder à l'évaluation de divers paramètres cinétiques caractérisant l'enzyme libre et immobilisée, nous avons étudié en premier l'effet de l'encapsulation sur le pH de l'activité enzymatique maximale. Les analyses ont confirmé que le maximum de la vitesse initiale de la réaction est atteint dans une solution tampon acétate ayant un pH de 4,5, autant pour la laccase libre, que pour la laccase encapsulée, envers le substrat choisi, soit l'OPD. Concernant l'effet de l'encapsulation sur le comportement de l'enzyme, nous avons constaté que l'enzyme a gardé son activité catalytique, ceci étant mise en évidence par le suivi de l'oxydation du substrat OPD en présence de la laccase, à l'aide de la cellule à oxygène. L'efficacité de la méthode d'immobilisation a été évaluée en comparant

l'activité de la laccase libre avant la synthèse des microcapsules à l'activité de la laccase encapsulée. Ceci nous a montré une efficacité d'encapsulation de 12%, ce qui pourrait s'expliquer soit par la perte d'enzyme pendant le processus d'encapsulation, soit par sa désactivation une fois immobilisée. La perte d'enzyme pendant le processus d'immobilisation a été évaluée par la méthode basée sur l'acide bicinchoninique et le résultat nous a montré une perte de protéine de seulement 4% de la quantité de laccase initiale, ce qui nous indique une efficacité du processus d'immobilisation de 96%. Ce résultat montre que la perte de l'activité enzymatique de la laccase est due en grande proportion à la désactivation de la laccase durant la réaction de réticulation. Le PEI est un agent réducteur, ce qui peut affecter directement l'activité catalytique de la laccase. Il est aussi possible que pendant le processus de réticulation l'agent réticulant forme des liaisons avec l'enzyme, tout en changeant sa structure tridimensionnelle, ce qui pourrait la désactiver. La réticulation de l'enzyme pourrait limiter l'accès du substrat à son site actif, ce qui aurait comme effet une perte globale de son activité enzymatique.

On attendait une diminution de l'activité enzymatique suivant l'immobilisation de la laccase et cette diminution a été mise en évidence lors de l'étude des paramètres cinétiques de l'enzyme libre comparativement à ceux de l'enzyme immobilisée. Les valeurs de la vitesse maximale obtenues sont de $3,63 \pm 0,10$ %O₂/s pour la laccase libre et de $1,30 \pm 0,05$ %O₂/s pour la laccase encapsulée. Cette variation peut être expliquée d'un côté par l'apparition d'un gradient de concentration du substrat dans la zone immédiate entourant l'enzyme, et d'un autre côté par la restriction de diffusion du substrat au site actif de l'enzyme. Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (qui est une mesure de l'affinité de l'enzyme envers son substrat) nous indiquent une meilleure affinité enzyme-substrat dans le cas de l'enzyme immobilisée ($1,09 \pm 0,08$ mM pour la laccase libre vs. $0,50 \pm 0,09$ mM pour la laccase encapsulée). Plusieurs facteurs dus à l'encapsulation de l'enzyme mènent à une diminution artificielle de la valeur de K_M : la limitation de la diffusion du substrat à travers la membrane,

l'accumulation ou la répulsion du substrat sur la paroi ainsi que la charge du microenvironnement créée par la capsule. Ce comportement peut être aussi dû à la présence du PEI dans le milieu de réaction, car la même tendance cinétique a été observée lorsque le PEI a été tout simplement ajouté dans un mélange de réaction de la laccase libre avec le substrat OPD.

Au niveau de la quantification de la réaction enzymatique par électrophorèse capillaire, la première étape a été de développer la méthode d'analyse. Les analyses ont été effectuées en solution libre, en appliquant un voltage de 20 kV, avec une polarité normale. La détection UV-Vis a été choisie et les composés d'intérêt ont été suivis à deux longueurs d'onde différentes, soit 200 et 254 nm. Les analyses ont été menées en utilisant des capillaires de silice fondue, dans un tampon phosphate, 50 mM ayant un pH de 2,5. La deuxième étape a été l'évaluation proprement-dite de la quantité de substrat consommé et de produit d'oxydation formé (efficacité de conversion) pour la laccase libre, laccase immobilisée et laccase immobilisée à l'intérieur d'un microréacteur, afin de mieux comprendre le comportement probable de l'enzyme dans des biocapteurs. Deux méthodes de calcul pour la quantification de la réaction enzymatique ont été utilisées : à partir de la quantité de substrat consommé (calcul A) et à partir de la quantité de produit de réaction formé (calcul B). Pour ce qui est de la laccase libre, les deux méthodes de calcul ont mené à des résultats équivalents. Pour la laccase immobilisée, l'évaluation de l'efficacité de conversion de l'enzyme nous indique une différence de deux fois plus grande si la méthode de calcul A est utilisée par rapport à la méthode B. Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette différence, un d'entre eux ayant une influence plus importante que les autres : l'oxydation spontanée du DAP menant à la formation du HAP, la formation d'oligomères et polymères de l'OPD et/ou DAP, l'adsorption non-spécifique du DAP dans les microcapsules et dans les parois du microréacteur et la faible diffusion du produit d'oxydation vers l'extérieur des microcapsules. On remarque une meilleure efficacité de réaction enzymatique du microréacteur par rapport aux microcapsules en suspension. Ceci est dû au fait que la pression hydrodynamique

appliquée à travers le microréacteur mène à une vitesse de diffusion plus grande du substrat et du produit de réaction à travers la paroi des microcapsules et ainsi on obtient une vitesse de réaction globale plus élevée.

Après avoir testé la stabilité du microréacteur et en avoir démontré sa réutilisabilité, on est passé à la dernière étape du projet, qui fut la conception du montage en ligne du microréacteur et le système d'électrophorèse capillaire. Vu que le pH optimal de la réaction enzymatique est de 4,5 et le pH du tampon de séparation en électrophorèse capillaire est de 2,5 on a pensé à un premier montage en ligne qui introduisait la solution sortante du microréacteur directement dans le système d'EC par l'intermédiaire d'une vanne d'injection Valco, ayant un volume interne de 60 nL. Le montage proposé n'a pas fonctionné à cause du fait que le haut voltage appliqué dans le système de séparation produisait un chauffage très important à l'intérieur de la vanne, causant la production de bulles d'air, qui provoquait à chaque fois une chute de courant, arrêtant ainsi la séparation en cours. Un deuxième montage basé sur l'utilisation d'un connecteur en T qui évitait l'application du voltage directement dans la vanne a été testé. Cette fois les résultats se sont avérés encourageants, car l'application du voltage désiré a été possible, sans que le courant soit interrompu. Les études se sont arrêtées à ce point, à cause du manque de temps, mais le projet reste ouvert pour l'optimisation de paramètres d'injection et pour l'utilisation effective du montage en ligne.

En conclusion, l'objectif principal de ce projet, soit l'étude de l'efficacité de l'encapsulation comme méthode d'immobilisation d'enzyme fut atteint. Dans notre démarche, plusieurs étapes furent franchies et nous avons démontré qu'effectivement, l'encapsulation est une méthode efficace d'immobilisation d'enzymes qui nous permet la conception de nouveaux bioréacteurs et biocapteurs. L'utilisation du microréacteur conçu à base d'enzyme microencapsulés en est la preuve. La prochaine étape du projet (à court terme) sera l'optimisation du montage en ligne proposé, ce qui permettra l'accomplissement des études cinétiques plus avancées sur la laccase et sur d'autres paramètres de l'encapsulation, tout en profitant des avantages que les

montages en ligne présentent. À long terme, le projet ouvre des perspectives pour des nouvelles études (par exemple sur la digestion des protéines), en exploitant les avantages de la nouvelle technique d'encapsulation enzymatique. La conception des microréacteurs enzymatiques à base d'autres enzymes microencapsulées permettra d'investiguer le comportement de celles-ci envers des divers substrats d'intérêt. Jusqu'à présent, la grande majorité des microréacteurs enzymatiques ont été utilisés à des fins de recherche, et il existe peu des brevets décrivant des microréacteurs ayant une applicabilité spécifique [8]. Chaque projet de recherche vise finalement une applicabilité pratique et les microréacteurs enzymatiques ont le potentiel d'être exploitées à grande échelle dans des divers domaines, compte tenant du grand potentiel de cette ressource vivante représentée par les enzymes

RÉFÉRENCES

- [1] D.C. Harris, *Quantitative chemical analysis*. 6 ed. **2003**, New York: W. H. Freeman and Company. p. 744.
- [2] B. Eggins, *Biosensors: An Introduction*. **1996**, Toronto: Wiley-Teubner. p. 212.
- [3] T. Ikeda et K. Kano, *An electrochemical approach to the studies of biological redox reactions and their applications to biosensors, bioreactors, and biofuel cells*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2001**. 92(1): p. 9-18.
- [4] M. Chaplin, *What are biosensors ?*, <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>, consulté le 12 octobre 2009
- [5] E.A. Moschou, B.V. Sharma, S.K. Deo, et S. Daunert, *Fluorescence Glucose Detection: Advances Toward the Ideal In Vivo Biosensor*. *Journal of Fluorescence*, **2004**. 14(5): p. 535-547.
- [6] A. Rasooly et K.E. Herold, *Biosensors and biodetection : methods and protocols*. **2009**, New York, NY: Humana Press. p. 464.
- [7] A. Manz, *Bioanalytical Chemistry*. **2004**, Londres: Imperial College Press p. 129.
- [8] P.L. Urban, D.M. Goodall, et N.C. Bruce, *Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies*. *Biotechnology Advances*, **2006**. 24(1): p. 42-57.
- [9] A.P.F. Turner, I. Karube, et G.S. Wilson, *Biosensors : fundamentals and applications*. **1987**, New York: Oxford University Press. p. 770.
- [10] S.K. Jung et G.S. Wilson, *Polymeric Mercaptosilane-Modified Platinum Electrodes for Elimination of Interferants in Glucose Biosensors*. *Anal. Chem.*, **1996**. 68(4): p. 591-596.
- [11] W. Hartmeier, *Immobilized biocatalysts : an introduction*. **1988**, New York: Springer-Verlag. p. 212.
- [12] N. Mano, F. Mao, et A. Heller, *Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose-O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**. 125(21): p. 6588-6594.
- [13] C.L. Leland C. Clark Jr, *ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY*. *Annals of the New*

York Academy of Sciences, **1962**. 102(Automated and Semi-Automated Systems in Clinical Chemistry): p. 29-45.

- [14] T.M.S. Chang, *Semipermeable Microcapsules*. Science, **1964**. 146: p. 524-525.
- [15] T.M.S. Chang, *Pharmaceutical and therapeutic applications of artificial cells including microencapsulation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **1998**. 45(1): p. 3-8.
- [16] L. Cao, *Carrier-Bound Immobilized Enzymes - Principles, Applications and Design*, ed. J.W. Sons. **2005**, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. p. 600.
- [17] C. Wischke et S.P. Schwendeman, *Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles*. International Journal of Pharmaceutics, **2008**. 364(2): p. 298-327.
- [18] C.J. Thompson, D. Hansford, S. Higgins, C. Rostron, G.A. Hutcheon, et D.L. Munday, *Evaluation of ibuprofen-loaded microspheres prepared from novel copolyesters*. International Journal of Pharmaceutics, **2007**. 329(1-2): p. 53-61.
- [19] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro, et J.L. Pedraz, *Cell microencapsulation technology: Towards clinical application*. Journal of Controlled Release, **2008**. 132(2): p. 76-83.
- [20] G.H. Seong, J. Heo, et R.M. Crooks, *Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System*. Anal. Chem., **2003**. 75(13): p. 3161-3167.
- [21] A.L. Kukla et Y.M. Shirshov, *Computer simulation of transport processes in biosensor microreactors*. Sensors and Actuators B: Chemical, **1998**. 48(1-3): p. 461-466.
- [22] Q. Zhang, J.-J. Xu, et H.-Y. Chen, *Glucose microfluidic biosensors based on immobilizing glucose oxidase in poly(dimethylsiloxane) electrophoretic microchips*. Journal of Chromatography A, **2006**. 1135(1): p. 122-126.
- [23] A.M. Girelli et E. Mattei, *Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review*. Journal of Chromatography B, **2005**. 819(1): p. 3-16.
- [24] K. Shimada, T. Oe, et T. Nambara, *Immobilized enzyme reactors for detection systems in high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **1989**. 492: p. 345-359.

- [25] E. Bonneil et K.C. Waldron, *On-line system for peptide mapping by capillary electrophoresis at sub-micromolar concentrations*. *Talanta*, **2000**. 53(3): p. 687-699.
- [26] V.A. Davankov, *Analytical chiral separation methods*. *Pure and Applied Chemistry*, **1997**. 69: p. 1469-1474.
- [27] J. Pelmont, *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. **1995**, Grenoble: Presses universitaires de Grenoble. p. 1039.
- [28] M.H.F. Thuesen, Ole; Reinhammar, Bengt; Ulstrup, Jens, *Cyclic Voltammetry and Electrocatalysis of the Blue Copper Oxidase Polyporus versicolor Laccase*. *Acta Chemica Scandinavica*, **1998**. 52: p. 555-562.
- [29] D. Rochefort, *Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le bioblanchiment de la pâte à papier*, Thèse de doctorat, Université de Montréal, Département de chimie, Montréal. **2001**.
- [30] S. Riva, *Laccases: blue enzymes for green chemistry*. *Trends in Biotechnology*, **2006**. 24(5): p. 219-226.
- [31] R.C. Minussi, G.M. Pastore, et N. Durán, *Potential applications of laccase in the food industry*. *Trends in Food Science & Technology*, **2002**. 13(6-7): p. 205-216.
- [32] H. Claus, G. Faber, et H. König, *Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2002**. 59(6): p. 672-678.
- [33] C.N. Leonowicz A, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J, *Fungal laccase: properties and activity on lignin*. *Journal of Basic Microbiology*, **2001**. 41: p. 185-227.
- [34] P. Bajpai, *Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry*. *Biotechnol. Prog.*, **1999**. 15(2): p. 147-157.
- [35] R. Bourbonnais, M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier, et M. Yaguchi, *Lignin oxidation by laccase isozymes from Trametes versicolor and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1995**. 61(5): p. 1876-1880.
- [36] J.J. Roy, T.E. Abraham, K.S. Abhijith, P.V.S. Kumar, et M.S. Thakur, *Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase*. *Biosensors and Bioelectronics*, **2005**. 21(1): p. 206-211.

- [37] M.J. Athel Cornish-Bowden, Valdur Saks, *Cinétique enzymatique*. **2005**, Grenoble: EDP sciences. p. 462.
- [38] H. Huang, R. Cai, Y. Du, et Y.e. Zeng, *The Automatic Kinetic Spectrophotometric Assay for Laccase Activity Using o-Phenylenediamine* Laboratory Robotics and Automation, **1996**. 8: p. 231-235.
- [39] G.T.R. Palmore et H.-H. Kim, *Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **1999**. 464(1): p. 110-117.
- [40] C. Johannes et A. Majcherczyk, *Laccase activity tests and laccase inhibitors*. Journal of Biotechnology, **2000**. 78(2): p. 193-199.
- [41] R.B. Ltd, *Oxygen Measurement Controllers*, <http://www.rankbrothers.co.uk/prod2.htm>, consulté le 3 octobre 2009
- [42] S.R. Jean-Luc Veuthey, *Electrophorèse capillaire Historique et perspectives*, http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/afsep/fichier/225_18_1_2005.pdf, consulté le 20 mai 2009
- [43] J.P. Landers, *Handbook of capillary electrophoresis*. **1997**: Boca Raton : CRC Press. p. 894.
- [44] A. Kondo, *Microcapsule processing and technology*. **1979**, New York: Marcel Dekker. p. 181.
- [45] D. Poncelet, T. Alexakis, B.P. De Smet, et R.J. Neufeld, *Microencapsulation within crosslinked polyethyleneimine membranes*. Journal of Microencapsulation, **1994**. 11(1): p. 31 - 40.
- [46] K. Gendron, *Immobilisation d'enzymes par microcapsules polymérisées pour le développement de biocapteurs*, Université de Montréal, Département de chimie, Montréal. **2007**.
- [47] Y. Zhang et D. Rochefort, *Activity conformation and thermal stability of laccase and glucose oxydase in poly(ethyleneimine) microcapsules for immobilization in paper*. Process Biochemistry, **2010**.
- [48] A.P.H. Association, *Solubility of Oxygen in Water (Fresh and Saline) Exposed to Water-saturated Air at Sea Level (760 mm Hg (101.3 kPa)*, <http://www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/do/do-01.htm>, consulté le 3 février 2011
- [49] C.E. Lin et Y.T. Chen, *Migration behavior and separation of benzenediamines, aminophenols and benzenediols by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **2000**. 871: p. 357-366.

- [50] C. Madzak, M.C. Mimmi, E. Caminade, A. Brault, S. Baumberger, P. Briozzo, C. Mougin, et C. Jolival, *Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis*. Protein Engineering Design and Selection, **2006**. 19(2): p. 77-84.
- [51] D. Rochefort, L. Kouisni, et K. Gendron, *Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **2008**. 617(1): p. 53-63.
- [52] L. Kouisni et D. Rochefort, *Confocal microscopy study of polymer microcapsules for enzyme immobilisation in paper substrates*. Journal of Applied Polymer Science, **2009**. 111(1): p. 1-10.
- [53] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goetze, B.J. Olson, et D.C. Klenk, *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical Biochemistry, **1985**. 150(1): p. 76-85.
- [54] K.J. Wiechelman, R.D. Braun, et J.D. Fitzpatrick, *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation*. Analytical Biochemistry, **1988**. 175(1): p. 231-237.
- [55] Y. Zhang et D. Rochefort, *Comparison of emulsion and vibration nozzle methods for microencapsulation of laccase and glucose oxidase by interfacial reticulation of poly(ethyleneimine)*. Journal of Microencapsulation, **2010**. 27: p. 703-713.
- [56] N. Munshi, K. Chakarvorty, T.K. De, et A.N. Maitra, *Activity and stability studies of ultrafine nanoencapsulated catalase and penicillinase*. Colloid & Polymer Science, **1995**. 273(5): p. 464-472.
- [57] J. Rogalski, M. Wojtas-Wasilewska, R. Apalovi, ccaron, et A. Leonowicz, *Affinity chromatography as a rapid and convenient method for purification of fungal laccases*. Biotechnology and Bioengineering, **1991**. 37(8): p. 770-777.
- [58] D. Quan, Y. Kim, et W. Shin, *Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface*. Journal of Electroanalytical Chemistry, **2004**. 561: p. 181-189.
- [59] M.W.F. Nielen, *Separation of phenylenediamine isomers by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, **1992**. 625(2): p. 387-391.
- [60] K.L.F. Patty, A. Sonia, et T. Claudia, *Photoinduced DNA Cleavage and Cellular Damage in Human Dermal Fibroblasts by 2,3-*

Diaminophenazine. Photochemistry and Photobiology, **2005**. 81(1): p. 89-95.

- [61] J.C. Van Damme, B. De Ryckel, et M. Galoux, *Analyse par chromatographie liquide du diamino-2,3 phénazine et de l'hydroxy-2 amino-3 phénazine dans les carbendazimes techniques et formulés*. Journal of Chromatography A, **1990**. 518: p. 375-384.
- [62] X.-G. Li, M.-R. Huang, W. Duan, et Y.-L. Yang, *Novel Multifunctional Polymers from Aromatic Diamines by Oxidative Polymerizations*. Chemical Reviews, **2002**. 102(9): p. 2925-3030.

ANNEXES

Conditions de séparation utilisées pour effectuer les analyses en électrophorèse capillaire.

Mode	Électrophorèse capillaire en solution libre
Détection	UV-Vis, à 200 et 254 nm
Tampon	Phosphate, 50 mM, pH 2,5
Polarité et voltage	Normale, 20 kV
Température	25°C
Capillaire	Silice fondue, $L_t = 48,5$ cm, $L_d = 40$ cm, d.i = 50 μ m, d.e. = 360mm
Injection	Mode hydrodynamique, 50 mbar pour 2 secondes.
Temps de rinçage du capillaire	Nouveau capillaire : 1h NaOH 1M; 20 min. tampon de séparation; 20 min H ₂ O
	Début journée : 20 min NaOH 0,1M; 20 min. tampon de séparation; 10 min H ₂ O
	Après chaque analyse : 5 min. NaOH 0,1 M; 5 min. tampon de séparation; 5 min. H ₂ O
	Fin journée : 3 min. NaOH 0,1 M; 3 min. tampon; 3 min H ₂ O; 3 min. air

Efficacité de conversion du substrat OPD et résultats statistiques.

Laccase microencapsulée	Efficacité de conversion (2 min)		Résultats tests statistiques *
	Calculée par la quantification de l'OPD non réagi (calcul A) ^a	Calculée par la quantification du DAP formé (calcul B) ^a	
Microcapsules dans le microréacteur	48 ± 2%	26 ± 3%	F _{calc} = 2,25 S _p = 2,55 t _{calc} = 10,6
Microcapsules en suspension	40 ± 4%	19 ± 3%	F _{calc} = 1,77 S _p = 3,54 t _{calc} = 7,26
Résultats tests statistiques *	F _{calc} = 4,00 S _p = 3,16 t _{calc} = 3,10	F _{calc} = 1,00 S _p = 3,00 t _{calc} = 2,86	

* F_{table} = 19,0 pour 95 % niveau de confiance et 2 degrés de liberté

T_{table} = 4,303 pour 95 % niveau de confiance et 2 degrés de liberté

Si F_{calc} < F_{table} il n'y a pas de différence significative entre les valeurs comparées.

Si T_{calc} > T_{table} la différence entre les valeurs comparées est significative.