

Outil millifluidique à gouttes pour déterminer les diagrammes de phase de protéines seules ou en mélange.

Joëlle Davy¹, Chloé Amine¹, Patrice Papineau¹, Anne-Laure Réguerre¹, Adeline Boire^{1*}, Denis Renard¹

Joëlle Davy est technicienne de recherche INRAE dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Ses activités sont la réalisation et le développement méthodologique d'analyses en lien avec les activités de purification de biopolymères et l'étude des interactions entre biopolymères par l'établissement de diagramme de phase.

Chloé Amine a effectué sa thèse de doctorat (2014-2017) dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Elle a participé au développement de l'outil millifluidique et l'a appliqué à la caractérisation des diagrammes de phases de mélanges de biopolymères.

Patrice Papineau est ingénieur d'étude INRAE dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Ses compétences concernent le développement de prototypes, d'interfaces informatiques, de capteurs, d'actionneurs, de prises et de prétraitements d'images.

Anne-Laure Réguerre est assistante-ingénieure INRAE dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Ses compétences concernent l'imagerie des échantillons à l'échelle microscopique et macroscopique, le traitement d'images pour caractériser les structures.

Adeline Boire est chargée de recherche INRAE dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Elle a porté l'ANS MicroPro, financée par le département CEPIA. Son domaine d'expertise concerne la physico-chimie des protéines et les phénomènes de séparation de phase.

Denis Renard est directeur de recherche INRAE dans l'unité de recherche BIA de Nantes. Il a dirigé la thèse de Chloé Amine. Son domaine d'expertise concerne la physico-chimie des biopolymères ainsi que la microfluidique et millifluidique à gouttes avec applications vers des matériaux bio-sourcés innovants.

¹ INRA, UR 1268 Biopolymères, interactions assemblages URBIA-INRAE, F-44316 Nantes
✉ Adeline.Boire@inrae.fr ; ☎ 02 40 67 50 83

Résumé. L'étude de la solubilité des protéines requiert des outils de criblage performants afin de cartographier leurs états d'assemblage en fonction des conditions physico-chimiques. Pour cela, nous avons développé un circuit millifluidique à gouttes tubulaire permettant de déterminer le diagramme de phases de protéines seules ou en mélange. Ce circuit couplé à un système d'acquisition d'image permet (i) de générer un mélange homogène de protéines/tampon et/ou protéines/biopolymères en un délai court (\sim s), (ii) de varier la composition des mélanges par simple ajustement des débits, et (iii) de déterminer la turbidité de la goutte par analyse du niveau de gris. La preuve de concept de ce circuit, i.e. efficacité de mélange, calibration turbidité vs niveau de gris, a été réalisée à partir de dispersions colloïdales de dioxyde de titane (TiO_2). Il a ensuite été validé à travers l'établissement d'un diagramme de phases connu d'un couple de biopolymères β -lactoglobuline / Gomme d'acacia. L'utilisation de la millifluidique a permis de réduire la quantité de matière requise d'un facteur supérieur à dix et le temps d'expérimentation d'un facteur cinq par rapport à une approche conventionnelle en tube.

Mots clés : millifluidique à gouttes, mélange, macro vision, détermination du point trouble.

Abstract. The investigation of protein solubility requires high-performance screening tools to map their assembly states depending on physical-chemical conditions. For this purpose, we developed a new simple tool based on tubular droplet millifluidics that allows (i) the generation of a homogeneous mixture of proteins/buffer and/or proteins/biopolymers in a short period of time (\sim s), (ii) the variation of the composition of the mixtures by adjusting the flow rates, and (iii) the determination of the turbidity of the drop by gray level analysis. The proof of concept of this device, i.e. mixing efficiency, turbidity vs. grey level calibration, was performed using colloidal titanium dioxide (TiO_2) dispersions. It was then validated through the establishment of a known phase diagram of biopolymers (β -lactoglobulin / acacia gum). The use of millifluidics reduced the amount of material required by a factor of ten and the experimentation time by a factor of five compared to a conventional tube approach.

Keywords: droplet-based millifluidics, mixing, image acquisition, cloud point determination.

Introduction

La solubilité et l'agrégation des protéines sont très dépendantes des paramètres physicochimiques (pH, température, sels...). Elles peuvent aussi être modulées en exploitant les synergies fonctionnelles entre protéines et autres biopolymères. L'établissement de diagramme de phases par l'analyse de la turbidité permet de cartographier ces états d'assemblage et ainsi de mieux les maîtriser. Cependant, ces études sont fortement consommatrices en temps et en matières premières. Ainsi, nous avons développé une technique de criblage moyen débit basée sur la miniaturisation du système qui fait l'objet de cet article.

La microfluidique est une technologie qui permet de concevoir sur une puce de quelques centimètres carrés de véritables « micro-laboratoires » capables d'effectuer des opérations diverses d'analyses, de criblages, ou encore de synthèses. Cette technique requiert un niveau d'expertise élevé et des équipements onéreux. Nous avons ainsi choisi de nous orienter vers une technique qui a émergé il y a une dizaine d'années en parallèle de l'essor de la microfluidique : la millifluidique (1–3). Elle est basée sur un assemblage de tubulures et de connectiques utilisées classiquement en chromatographie. La mise en place d'un dispositif millifluidique ne nécessite aucun équipement

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

spécifique coûteux de micro-fabrication. Ainsi, un circuit peut être assemblé à façon en quelques minutes puis facilement démonté ou adapté. Il s'agit d'une technologie bon marché, accessible à tous les laboratoires spécialisés ou non en microfluidique. Dans ce cahier des techniques, nous allons présenter le développement méthodologique de cet outil, que nous avons appelé MicroPro. Il a été réalisé dans le cadre d'une thèse INRA-Région (4) et d'un projet financé par le département CEPIA de l'INRAE.

Matériel et méthodes

Cahier des charges et principe

Avant d'aborder le choix technique et la conception de chacun des éléments de l'outil MicroPro, cette section expose le cahier des charges ainsi que le principe de l'outil.

Un outil de millifluidique à gouttes, aussi appelé millifluidique digitale, a été développé pour le criblage des interactions entre protéines et biopolymères, doit permettre :

- de générer un mélange rapide entre deux solutions miscibles ;
- de moduler et de contrôler précisément la composition du mélange produit ;
- de former des gouttes de phase aqueuse dans une phase continue d'huile ;
- d'acquérir des images en continu de trains de gouttes monodisperses ;
- d'analyser le niveau de gris moyen dans les gouttes afin de déterminer l'évolution de la turbidité ;
- de réaliser des observations sur des temps de quelques minutes à plusieurs heures ;
- de limiter la consommation de matières premières.

Pour répondre à ce cahier des charges, l'outil MicroPro développé est constitué de trois éléments principaux : une composante millifluidique à gouttes (**Figure 1-A**), un système optique en macro vision (**Figure 1-B**) associé à une interface numérique pour l'acquisition d'images en moyen débit (**Figure 1-C**). La millifluidique à gouttes liquide-liquide permet la génération de train de gouttes monodisperses de quelques microlitres dans une phase non miscible. Dans notre cas, il s'agit d'un montage coaxial de tubulures dans lequel circule une phase aqueuse dite dispersée, gouttes, et une phase huile dite continue. De nombreux paramètres régissent la formation des gouttes : la tension de surface entre les phases, le rapport de leur viscosité, les débits appliqués, la géométrie des canaux et le mouillage des fluides sur les parois. Chaque goutte peut être vue comme un microréacteur indépendant offrant la possibilité de moduler, rapidement et avec précision, de nombreux paramètres physico-chimiques. L'acquisition par imagerie sur fond noir des gouttes générées permet de mettre en évidence le point trouble par l'analyse du niveau de gris.

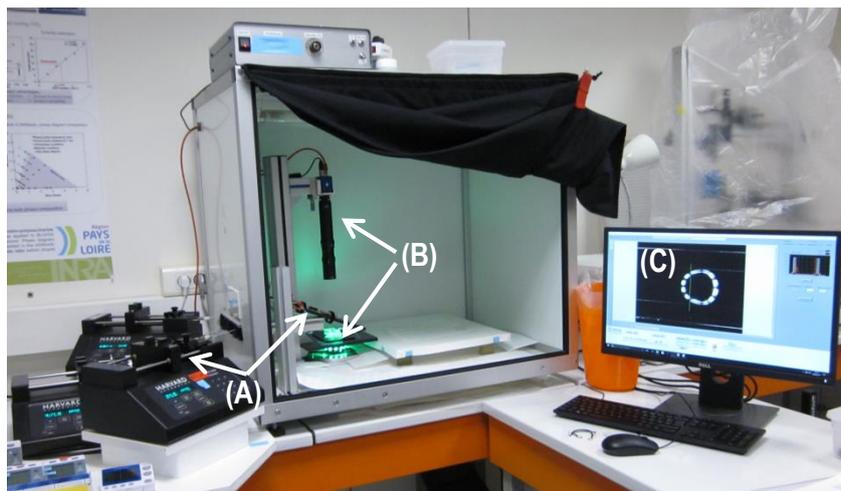


Figure 1. Vue générale du dispositif expérimental MicroPro.

(A) Montage d'un circuit millifluidique, assemblage de connectiques et de tubulures, alimenté par 3 pousse-seringues pour la génération et le contrôle précis de la composition de gouttes par variation des débits ; (B) Système optique en macro vision: caméra et objectif, source lumineuse à fond noir ; (C) Interface numérique.

Matériel

Réactifs et échantillons

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) à 5 ou 10 % de réticulant, [silicone bicomposant A et B, Eleco Produits, Silicone RTV 615 A+B Kit], est utilisé pour la fabrication d'éléments à façon par moulage. L'huile de tournesol [Sunflower seed, Sigma réf. 88921] constitue la phase continue dans la formation de train de gouttes par millifluidique. La phase dispersée est constituée soit d'eau, soit d'une suspension de dioxyde de titane [TiO₂, Sepic, France] à différentes concentrations pour l'optimisation de la mesure en niveau de gris et la calibration de la turbidité. Le glycérol à 99,5 % est également ajouté à la phase dispersée afin d'évaluer l'effet de la viscosité sur l'efficacité de mélange et sur la tenue en pression du système. La validation de la méthode pour un couple de biopolymères connu est réalisée avec une β -lactoglobuline bovine, BLG [DAVISCO Food International, USA, lot JE 001-8-415], et une gomme d'acacia, GA, du Sénégal [Nexira, France, lot 97J716].

Choix techniques

Chaque élément de l'outil MicroPro (**Figure 1**) est décrit dans les sections suivantes :

Le montage millifluidique à gouttes

Le circuit millifluidique formant notre dispositif est composé de connecteurs, de tubulures en polymères synthétiques flexibles ou semi-rigides ou de capillaires en verre [Upchurch Scientific®]. Utilisés en chromatographie basse pression, le coût de ces différents éléments est relativement faible en comparaison à des méthodes de microfabrication des dispositifs microfluidiques planaires. Le choix des connectiques et des tubulures de divers diamètres interne et externe est important dans le processus de formation des gouttes ainsi que dans le contrôle du volume et du débit. Nous avons testé différentes géométries, seules les options répondant le mieux à nos objectifs sont détaillées dans cet article (**Figure 2 ; Tableau 1**). Le coût total pour l'ensemble du circuit millifluidique représente environ 550 €, à savoir que le micromélangeur statique contribue environ pour moitié.

En amont de la formation de la goutte, le montage millifluidique est composé principalement de tubulures en FEP 1/16" (fluorinated ethylene-propylene), de connectiques coniques en PEEK® (polyetheretherketone) et de ferrules en ETFE (ethylene-tetrafluoroethylene) résistant mieux à la pression (**Figure 2, éléments (7), (2), (3) et tubulure**

(T1)). Pour assurer un mélange rapide des deux phases aqueuses, un micro-mélangeur statique est utilisé (**Figure 2, élément (1)**), il s'agit d'une connectique en forme de T avec une géométrie interne spécifique qui permet le mélange de deux flux arrivant sous pression au travers d'un capillaire de $0,25\ \mu\text{m}$ de diamètre pour un volume de détente de $0,95\ \mu\text{l}$ et dirigés vers une troisième sortie. La longueur des tubulures des flux entrant doit être identique. En sortie du micro-mélangeur, un ensemble d'unions et un capillaire en silice fondue de diamètre externe $0,66\ \text{mm}$ permet un montage coaxial avec une tubulure en Tygon® de diamètre interne $1,42\ \text{mm}$ (**Figure 2, tubulures (T2) et (T3)**). La matière de la tubulure est choisie en fonction des propriétés d'hydrophobicité des phases aqueuses. Les débits, différents et modulables, des deux phases dites dispersées (Q_d , aqueuse) et continues (Q_c , huile), sont imposés par le biais de pousse-seringues [Harvard Apparatus®, modèle PHD 2000] (**Figure 1-A**). Des seringues en verre luer-lock [Hamilton Gastight®] soit de $2,5\ \text{ml}$, soit de $25\ \text{ml}$ sont utilisées pour chacune des phases. Les pousse-seringues sont des systèmes à énergie mécanique de translation, le diamètre interne de la seringue est donc un facteur de précision du volume délivré pour un réglage de débit donné.

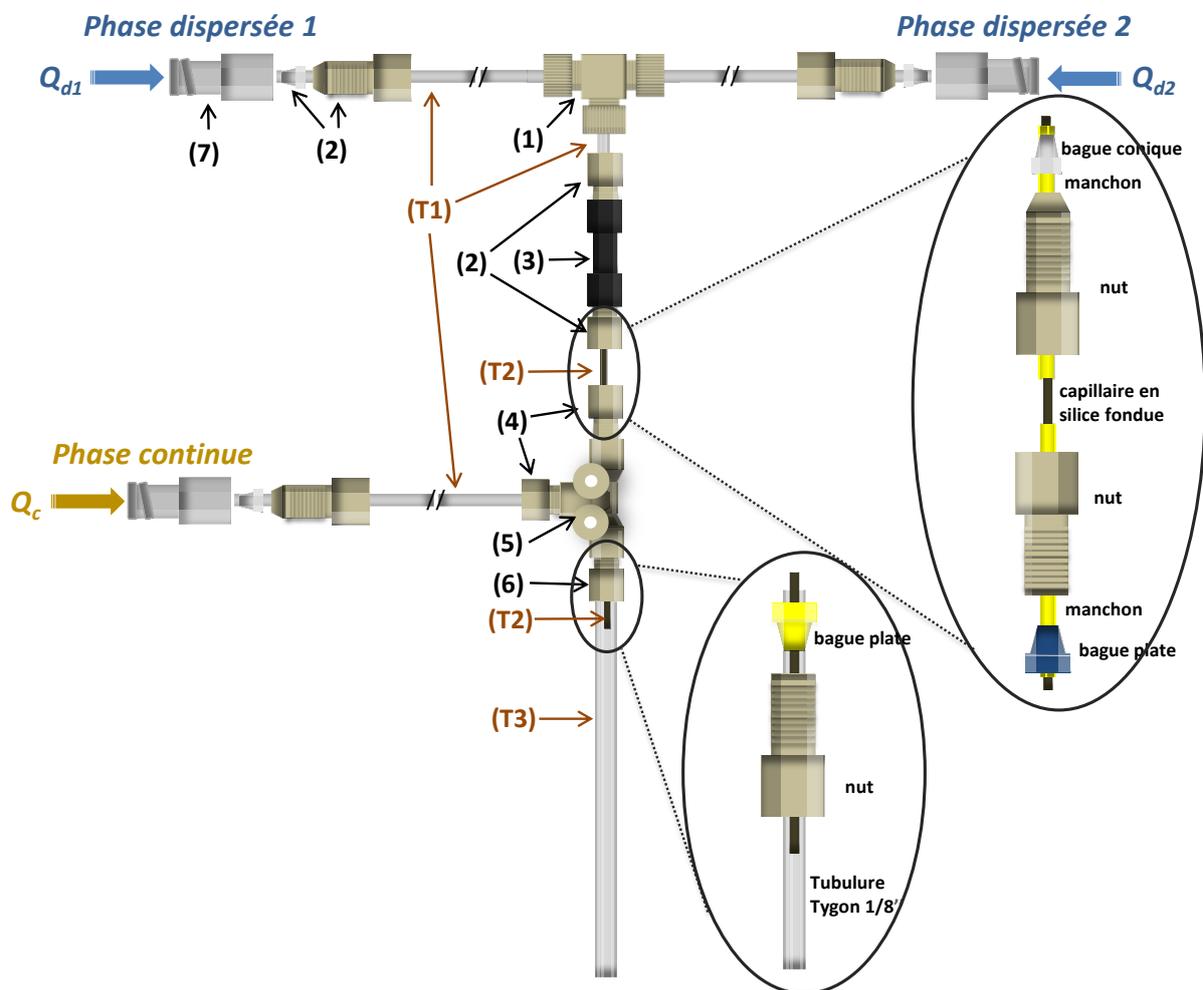


Figure 2. Schéma du montage des différentes connectiques pour la formation de train de gouttes par millifluidique en géométrie coaxiale. Les numéros associés aux connectiques et aux tubulures sont référencés dans le tableau 1. (dessin inspiré d'illustrations de Evandro Martins). Q_d et Q_c sont les débits, différents et modulables, des deux phases dites dispersées (aqueuse) et continue (huile).

Tableau 1. Liste des différents éléments composant le montage millifluidique

		DI / DE ou matière	Diamètre / Volume perforation
CONNECTIQUES			
(1)	union 10-32 Té, pour tubulure 1/16"	PEEK®	0,020" (0,50 mm) / 0,57 ml
(1)	micro mélangeur statique (sans fritté), pour tubulure 1/16"	PEEK® and Kel-F® (PCTFE)	0,010" (0,25 mm) / 0,95 ml
(2)	nut + ferrule 10-32 conique, pour tubulure 1/16"	PEEK® natural / ETFE natural	
(3)	union 10-32	PEEK® ZDV black	0,050" (1,25 mm) / 1,2 ml
(4)	nut + ferrule 1/4-28 Flat-Bottom (court), pour tubulure 1/16"	PEEK® natural / ETFE blue	
(5)	union 1/4-28 Té, pour tubulure 1/8"	PEEK®	0,050" (1,25 mm) / 17,5 ml
(6)	nut + ferrule 1/4-28 Flat-Bottom (court), pour tubulure 1/8"	PEEK® natural / ETFE yellow	
(7)	adaptateur femelle Luer 10-32 conique	ETFE natural	0,04" (1 mm)
TUBULURES			
T1	tubulure FEP 1/16" DE	0,50 mm (0,20") / 1,57 mm (1/16")	
T2	capillaire silice fondue (associer au manchon jaune)	530 / 660 mm	
associer au T2	manchon jaune FEP 1/16" (pour capillaire 630-670um DE)	685 mm (0,027") / 1,57 mm (1/16")	
T3	tubulure Tygon® R3607 1/8" DE	1,42 / 3,14 mm	
AUTRES			
	tuyau Tygon® 3603 (pour manchon de connexion)	2,38 mm / 3,97 mm	
	clamp pour tuyau 2,5 mm DE (fournisseur WPI)		

DI : diamètre interne

DE : diamètre externe

L'optique

Le système d'acquisition d'image est composé d'une caméra monochrome SVS ECO674MTLGEC GigE 2/3" CCD, 1920x1460, 19 fps, C, associée à un objectif télécentrique et d'une source lumineuse circulaire, sur fond noir. L'objectif modulaire est composé d'un tube télécentrique à focal fixe x0.67 [Vicotar® série T43], d'un zoom 7x à crantage manuel, et d'un objectif inférieur à grandissement fixe x1,5 [Alliance Vision, France]. La source lumineuse circulaire est composée de 12 LEDs vertes (520-535nm) adaptées à la sensibilité spectrale de la caméra [fabricant Cree, référence C503B-GCN-CY0C0791], elles sont orientées à 45°.

Plusieurs grandissements sont possibles : x0,75 ; x1 ; x1.5 ; x 2 ; x 3 ; x4 ; x5. Les champs de vue et la résolution sont détaillés (Tableau 2). La distance entre le corps de zoom et l'objet à observer est de 155 mm.

L'observation sur fond noir permet d'améliorer les contrastes en niveau de gris. L'acquisition d'images monochrome de 1920x1460 pixels se fait en 8 bits, le niveau de gris est codé entre 0 (noir) et 255 (blanc). La puissance de la source lumineuse peut être ajustée à l'aide d'un potentiomètre de graduation 0 à 10. A noter, un filtre en papier calque est disposé au niveau des LEDs pour une meilleure diffusion de la lumière, cela a pour effet d'atténuer les reflets observables sur l'image et d'obtenir une luminosité plus homogène sur toute la surface du champ d'observation.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

Tableau 2. Champ de vue et résolution disponibles

	Crantage manuel du corps de zoom 7x de l'objectif télécentrique						
	x 0,75	x 1	x 1,5	x 2	x 3	x 4	x 5
Taille pixel (µm)	15,26	11,53	7,13	6,18	3,91	2,93	2,31
Champ de vue (mm)	29,4 x 22,2	22,2 x 16,8	13,7 x 10,4	11,9 x 9	7,5 x 5,7	5,6 x 4,3	4,4 x 3,4

L'observation et le stockage des gouttes

L'observation des gouttes est réalisée en flux continu à l'intérieur de la tubulure Tygon®. La lumière incidente des LEDs va être en partie diffusée et réfractée par les différentes matières qu'elle traverse : la paroi du tuyau, l'huile, l'eau et l'air, ce qui induit la présence de reflets mais également une déformation visuelle de la goutte observée. Afin d'atténuer ce phénomène, le tuyau est plongé dans un bain d'éthylène glycol au niveau de la zone d'observation. L'éthylène glycol a un indice de réfraction similaire à celui des matières traversées ($1,3 < \text{indice de réfraction} < 1,5$) en comparaison de l'air (indice de réfraction: air = 1 ; éthylène glycol = 1,4). Pour ce faire, nous avons fabriqué une cellule ouverte dans laquelle le tuyau est maintenu (**Figure 3-A**). Pour des observations sur des temps longs, des cellules aux dimensions plus importantes sont fabriquées selon le même principe permettant le stockage de neuf tubulures pouvant contenir des trains de gouttes de différentes compositions.

Fabrication de cellules ouvertes

Le principe de la fabrication des différentes cellules repose sur le moulage à façon de PDMS et le collage sur des lames de verre. Le PDMS RTV615 est un silicone qui peut être réticulé thermiquement ce qui conduit à un matériau solide élastomère permettant toute forme de moulage. Il peut également être soudé de manière irréversible PDMS-PDMS ou PDMS-verre, par traitement des surfaces au plasma sous oxygène.

Différents éléments sont nécessaires pour ce moulage : des ergots pour le maintien du ou des tuyaux obtenus par impression 3D, des feuilles en PVC et des billes en verre (lesteur) pour la partie centrale de la cellule (**Figure 3-B**). Après une réticulation à 40°C et le retrait des objets de moulage, la composante supérieure en PDMS de la cellule peut être soudée sur une lame en verre soit de microscopie 76 x 26 mm soit une plaque 100 x 150 mm, permettant une observation en optique avec un rétroéclairage sur fond noir (**Figure 3-C**).

Les dimensions des cellules pouvant être fabriquées sont limitées par la taille de la chambre du nettoyeur plasma [Harrick, Plasma modèle PDC-002, dimension de la chambre : diamètre 152 mm, profondeur 165 mm].

Fabrication d'une jonction multivoies

La cellule de stockage ouverte 9 voies permet de stocker 9 tubulures contenant chacune des gouttes aux compositions différentes. Afin d'optimiser leur remplissage, une jonction comportant 1 voie entrante et 9 voies sortantes est fabriquée en PDMS et un segment de tuyau FEP 1/8" (**Figure 4-A**).

Une ossature en tubulures FEP (**Figure 4-B**) est réalisée comme objet de moulage : sur un élément central en 1/8" (DI / DE : 1,55 / 3,18 mm), des trous sont percés à distance régulière avec un foret en carbure de tungstène de 1,55 mm puis ébavurés. Des segments de tuyau en 1/16" (DI / DE : 0,50 / 1,57 mm) y sont alors introduits et à leur autre extrémité, il est inséré un manchon en 1/8" (DI / DE : 1,55 / 3,18 mm).

Après avoir obturé chaque extrémité de l'ossature, celle-ci est moulée dans un volume de PDMS. Une fois réticulé, le bloc est découpé et les éléments latéraux en 1/8" et 1/16" sont retirés. Seul le segment central en FEP 1/8" est maintenu en place.

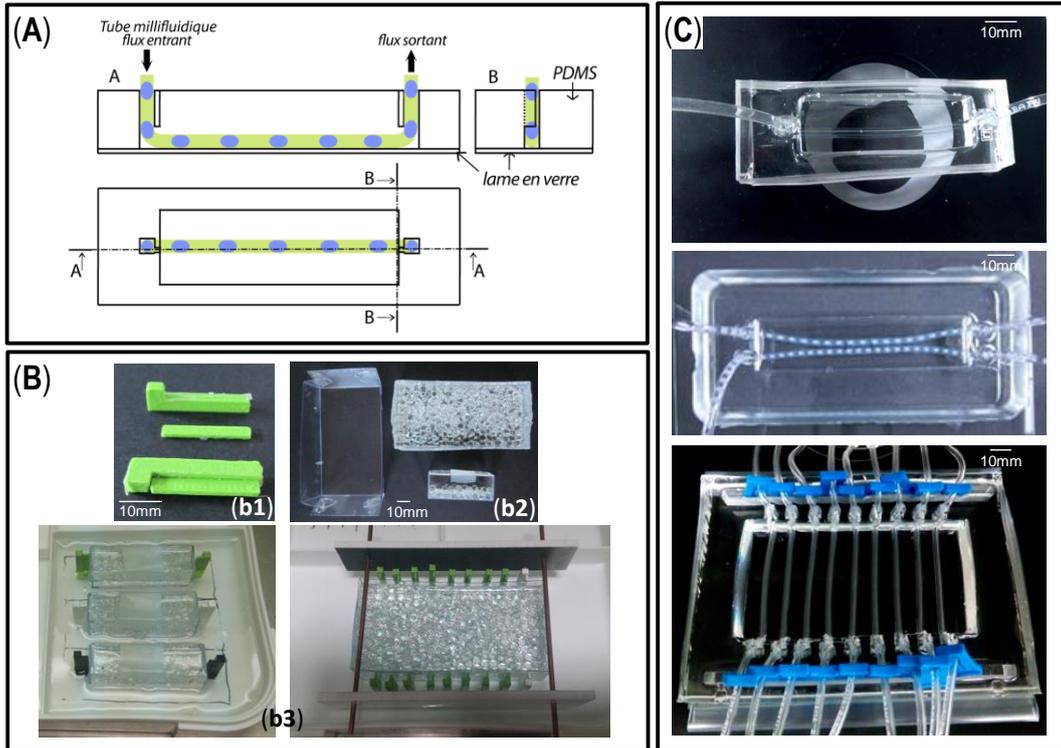


Figure 3. Fabrication de cellules ouvertes pour le positionnement du tuyau millifluidique dans un bain d'éthylène glycol afin d'obtenir une qualité d'image suffisante

(A) Schémas vus de dessus et en coupe d'une cellule pour le maintien d'une tubulure ; (B) Eléments de moulage: (b1) ergot pour le maintien du tuyau, fabriqué par impression 3D, (b2) moule centrale en PVC alourdi par des billes en verre et du PDMS réticulé, (b3) positionnement des différents éléments dans du PDMS pour la réticulation ; (C) cellules ouvertes finalisées de différentes dimensions pour le maintien dans un bain d'éthylène glycol de 1, 2 ou 9 tubulures Tygon®.

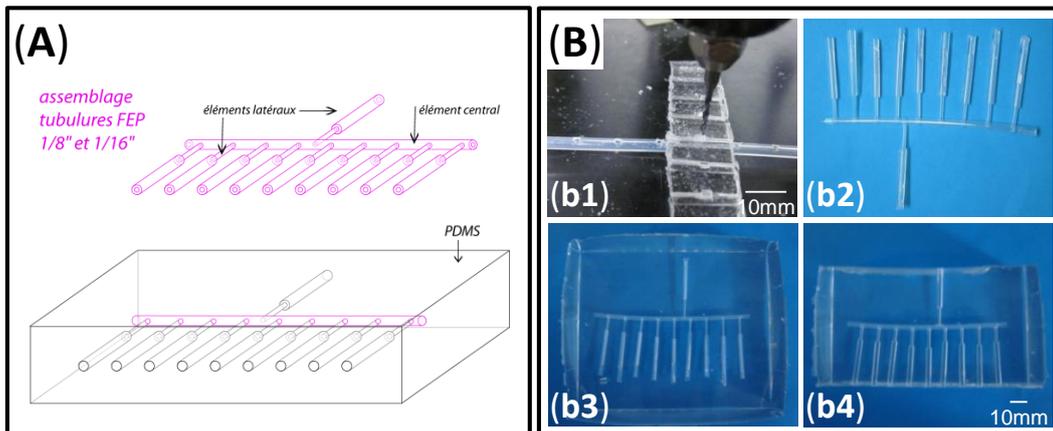


Figure 4. Fabrication d'une jonction multivoies en PDMS et un segment de tuyau FEP 1/8"

(A) Schéma de l'ossature en FEP et de la jonction multivoies; (B) Fabrication et moulage de l'ossature en FEP: (b1) perçage de l'élément central, (b2) ossature assemblée, (b3) ossature moulée dans du PDMS après l'étape de réticulation, (b4) jonction 10 voies finalisée.

L'acquisition d'images

Une interface sous LabView (<http://www.ni.com>) est créée pour l'acquisition d'images de gouttes mobiles produite par la technique de millifluidique à gouttes. Elle permet notamment de synchroniser la prise d'image automatique

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

par détection d'un profil en niveau de gris préalablement enregistré sur une goutte témoin (**Figure 5**). Le paramétrage de la tolérance et d'un temps inter-gouttes est possible.

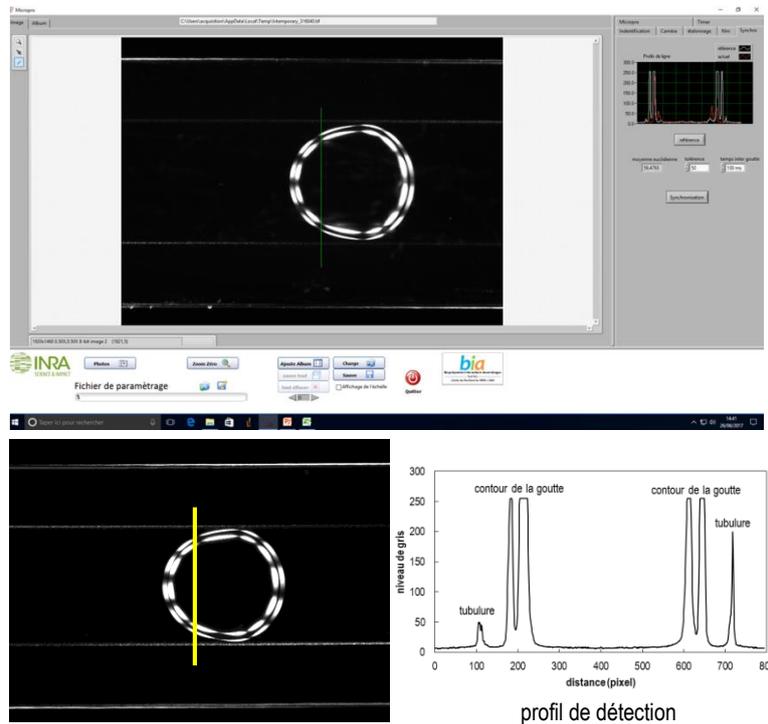


Figure 5. Déclenchement de l'acquisition d'images par synchronisation d'un profil de détection en analyse du niveau de gris

L'analyse d'images

Le traitement des images se porte sur la zone centrale de la goutte appelée région d'intérêt (ROI, region of interest). Les images peuvent être analysées manuellement par un logiciel libre d'imagerie type ImageJ. Cependant, pour un nombre d'images important, une procédure automatique a été développée sous Matlab R2016b. Celle-ci permet de définir un masque afin de sélectionner la zone interne de la goutte, ROI. Pour cela, pour chaque image un seuil en niveau de gris est obtenu par k-mean pour séparer les zones claires de l'image du fond. Ensuite, les parois du tube et de la goutte sont éliminées de la ROI avec des opérateurs de Morphologie Mathématique, tels que des ouvertures et des fermetures (5). Après application du masque à l'image d'origine, les valeurs éditées sont le NG moyen, minimum, maximum et médian ainsi que le nombre de pixel analysé de la ROI. Cette procédure est réalisée sur l'ensemble des images acquises grâce à une macro. Plusieurs fichiers résultats sont alors édités : un fichier mesures.txt regroupant les mesures précédemment citées associées au nom de l'image analysée, pour la série d'images; un fichier histo_peri.txt reprend l'histogramme en niveau de gris pour chaque ROI analysée ; un fichier date_boucleAI_nom.txt pour les paramètres de la boucle saisis.

Méthode de production de gouttes par millifluidique

La composante millifluidique à gouttes (**Figure 1-A**), développée pour le criblage des interactions entre biopolymères, est constituée de l'assemblage des éléments détaillés dans les paragraphes concernant « le montage millifluidique à gouttes » et « l'observation et le stockage des gouttes ». Chacun ayant été décrit individuellement dans le choix technique et/ou sa conception, cette section expose le principe de ce qui constitue le cœur de l'outil à savoir la millifluidique à gouttes en lien avec les objectifs fixés.

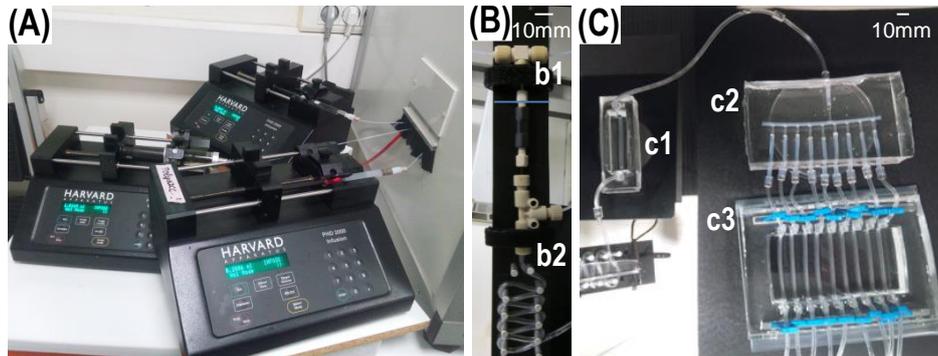


Figure 6. Composante millifluidique à gouttes du dispositif expérimental.

(A) Pousse-seringues alimentant le circuit millifluidique : 2 pour la phase dispersée (mélange de 2 phases aqueuses), le 3ème pour la phase continue (huile). (B) Géométrie utilisée pour le mélange et la formation de train de gouttes : (b1) micro-mélangeur statique pour un mélange rapide des 2 phases miscibles en amont de la formation des gouttes, (b2) formation des gouttes monodisperses et amélioration du mélange intra-goutte au travers d'un serpent. (C) Observation et stockage des trains de gouttes : (c1) zone d'acquisition d'images en continue, (c2) jonction 10 voies permettant de diriger le flux vers une cellule de stockage (c3) pour une observation sur des temps longs.

Cette composante peut être divisée en quatre parties (**Figure 6**).

- La première partie permet de générer un mélange rapide entre deux solutions miscibles. Celui-ci est assuré grâce à l'utilisation d'un micro-mélangeur statique [Upchurch Scientific®]. Il est alimenté au travers de tuyaux FEP 1/6" connectés à deux seringues de 2,5 ml contenant chacune une phase aqueuse et disposées sur des pousse-seringues indépendants. Le contrôle des débits (Q_{d1} , Q_{d2}) permet de moduler et de maîtriser précisément la composition du mélange.
- La seconde partie du circuit permet la formation de train de gouttes, dans une phase continue d'huile. La phase continue est également alimentée via un pousse-seringues muni de deux seringues de 25 ml, les sorties sont assemblées par une connexion en Y afin d'assurer un volume d'huile suffisant pour la durée de l'expérimentation. La formation des gouttes se fait dans une géométrie coaxiale, c'est-à-dire par centrage d'un tube interne et d'un tube externe permettant l'écoulement des deux fluides, dispersée et continue, de manière concentrique (**Figure 7-A**). Elle résulte d'un équilibre entre la tension superficielle à l'interface des deux fluides et l'effet de cisaillement causé par le fluide externe (entraînement visqueux). Une goutte croît puis se détache quand la tension de surface ne suffit plus à la maintenir accrochée à l'extrémité du capillaire interne. La taille des gouttes obtenues et la distance entre les gouttes sont contrôlées par les débits Q_d et Q_c des différentes phases, la géométrie du dispositif utilisé mais aussi leurs viscosités et leur tension interfaciale. Le train de gouttes parcourt ensuite une longueur de tuyaux d'environ 300 mm disposé en forme de serpent (**Figure 6-B2**). Le passage d'une goutte à travers un virage serré induit des mouvements de circulation interne qui, associés à la diffusion moléculaire permet d'affiner le mélange des deux phases aqueuses au sein de la goutte (**Figure 7-B**). Ce phénomène est communément appelé « effet boulanger » (6, 7).

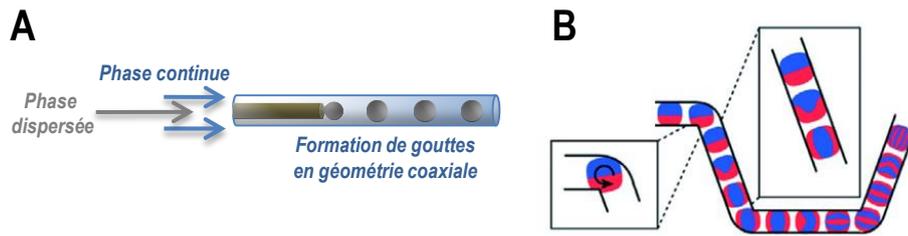


Figure 7. A _Visualisation de la formation de gouttes dans une géométrie coaxiale. B _Illustration de l'effet boulanger lors du passage d'une goutte dans un canal en serpentin (6).

- Par la suite, le train de gouttes généré arrive sur la zone d'observation optique (**Figure 6-c1**). Pour une qualité d'image, le tuyau est maintenu dans un liquide, de l'éthylène glycol choisit pour son indice d'optique, grâce à la conception d'une cellule ouverte (**Figure 3**). L'acquisition en continue et l'analyse des images permettent de déterminer l'évolution de la turbidité par une mesure de niveau de gris moyen dans la goutte ce qui caractérise la présence d'interactions liées aux conditions de mélange de deux solutions miscibles.
- une quatrième zone, optionnelle, peut être ajoutée pour le stockage des gouttes produites en vue d'une observation sur des temps longs supérieurs à 35 minutes (**Figure 6-c3**). Pour cela, la jonction 10 voies et la cellule 9 voies sont assemblées à la sortie du circuit millifluidique à l'aide de manchons soit en Tygon® soit en PDMS, sans connectique particulière du fait des faibles débits et pressions en aval de la formation de train de gouttes. Le flux est orienté manuellement vers les différentes voies à l'aide de clamps en polyéthylène [WPI, réf 14042-100]. L'évolution de la turbidité peut alors être observée pour des temps longs voir sur plusieurs jours, directement dans la cellule de stockage.

Résultats

Paramétrage de l'outil MicroPro

Après avoir choisi, conçu et assemblé les différents éléments de l'outil, leurs paramètres d'utilisation optimale doivent être définis en lien avec le cahier des charges. L'outil millifluidique conditionne en particulier la consommation de matières premières par la sélection d'un volume de goutte, d'une distance inter-gouttes et d'une vitesse. Ces paramètres sont également déterminants pour le réglage de la caméra afin d'acquérir de bonnes images numériques.

Volume des gouttes, choix des débits des phases dispersées, Q_d , et continues, Q_c

L'influence des débits sur la taille des gouttes et sur les temps d'observation est testée pour des dimensions de tubulures fixées. La taille des gouttes est contrôlée par le ratio des débits Q_d / Q_c entre la phase dispersée et la phase continue. Plus le ratio Q_d / Q_c est faible, plus les gouttes seront petites et espacées. Le temps requis par une goutte pour arriver sur la zone d'observation dépendra quant à lui de la valeur du débit total mais aussi de la longueur du canal.

La taille des gouttes est peu affectée par l'augmentation de la viscosité de la phase dispersée (8), nous avons donc évalué, expérimentalement, le volume des gouttes et la distance inter-gouttes en mesurant la fréquence de formation de gouttes d'eau à différents débits imposés de la phase dispersée, Q_d , et de la phase continue, Q_c .

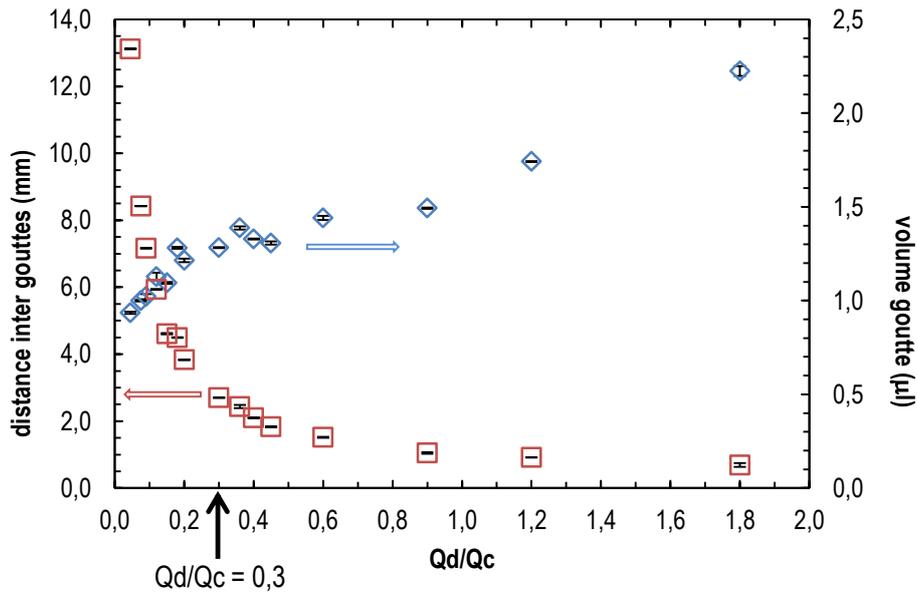


Figure 8. Evolution du volume des gouttes et de la distance inter-gouttes en fonction du ratio Q_d/Q_c spécifique au montage millifluidique utilisé soit un montage coaxial d'un capillaire en silice fondue de diamètre interne / externe 530 / 660 μm avec un tuyau en Tygon® de diamètre interne 1.42 mm.

Dans notre configuration, nous pouvons explorer des volumes de gouttes entre 1 et 2,5 μl pour des distances inter-gouttes entre 0,5 et 14 mm comme illustré (**Figure 8**). Ces données dépendent de la géométrie du montage millifluidique (**Figure 2**) notamment les dimensions des tubes contribuant à la génération des gouttes (**Tableau 1**) et elles sont ainsi spécifiques au circuit utilisé.

Nous avons sélectionné les conditions pour un ratio $Q_d / Q_c = 0,3$, soit un volume de goutte d'eau d'environ 1,3 μl et une distance inter-gouttes d'environ 2,7 mm. La taille de la goutte correspond alors à un diamètre légèrement supérieur au diamètre interne du tuyau Tygon®, soit 1,42 mm, autorisant une zone d'analyse en imagerie raisonnable limitant les effets de bords liés à la forme sphérique de la goutte. Cela nous permet également de limiter notre consommation en phase dispersée et d'avoir un temps minimum avant observation de l'ordre de deux minutes. Les valeurs de Q_d et Q_c retenues sont respectivement 3 ml/h et 10 ml/h. Nous pouvons alors estimer une vitesse de déplacement du flux au sein du tube Tygon® de diamètre intérieur 1,42 mm, à environ 2,3 mm/s en mesurant le temps mis par une goutte pour parcourir une distance définie.

Paramétrage d'acquisition des images

L'imagerie est une affaire de choix et de compromis au regard de ce que nous observons, l'échantillon, et de la donnée que nous souhaitons en retirer, l'analyse d'image. Notre objectif est d'acquérir des images en continu de trains de gouttes monodisperses, l'échantillon, et d'analyser le niveau de gris moyen dans les gouttes afin de déterminer une évolution de la turbidité, l'analyse d'image. Les principaux paramètres de réglage de la caméra sont la vitesse d'acquisition et le temps d'ouverture de l'obturateur. L'observation est réalisée sur un objet mobile, la vitesse d'acquisition est donc réglée au maximum soit 24,8 Hz. Par contre, le temps d'ouverture du diaphragme de la caméra par rapport à la vitesse de déplacement des gouttes doit être optimisé afin d'acquérir des images de bonne qualité numérique. La présence d'un double anneau blanc sur le contour de la goutte, dû à la diffusion de la lumière sur la surface d'une forme sphérique, nous permet d'évaluer la netteté de l'image. L'objectif est réglé sur le grandissement x5 pour l'observation d'une seule goutte soit une taille d'image de 4,4 x 3,4 mm et une taille de pixel de 2,31 μm de côté (**Tableau 2**).

Pour les conditions de géométrie du montage millifluidique et les débits sélectionnés précédemment, l'acquisition des images de gouttes d'eau en flux continu est réalisée à différents temps d'exposition compris entre 20 000 ms et 40 000 ms. L'analyse du profil en niveau de gris selon un axe précis nous permet d'estimer la qualité de la

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (102)

résolution des deux anneaux blancs formant le contour de la goutte (**Figure 9**). Pour des temps d'ouverture du diaphragme supérieurs à 25 000 ms, nous observons une altération significative de la décomposition des deux bandes (**Figure 9-(i)**) et une augmentation de l'épaisseur du trait (**Figure 9-(ii)**) représentative d'un flou cinétique. Nous utiliserons en ouverture de diaphragme cette limite maximum de 25 000 ms pour un débit total, $Q_c + Q_d$, de 13 ml/h appliqué au montage millifluidique coaxial en capillaire silice fondue 530 / 660 μm et tuyau Tygon® 2,38 / 3,97 mm (**Figure 2- tubulures (T2) et (T3)**) soit une vitesse de déplacement d'environ 2,3 mm/s. L'intensité des niveaux de gris pourra être modulée par le réglage de la puissance de la source lumineuse, potentiomètre de graduation 0 à 10.

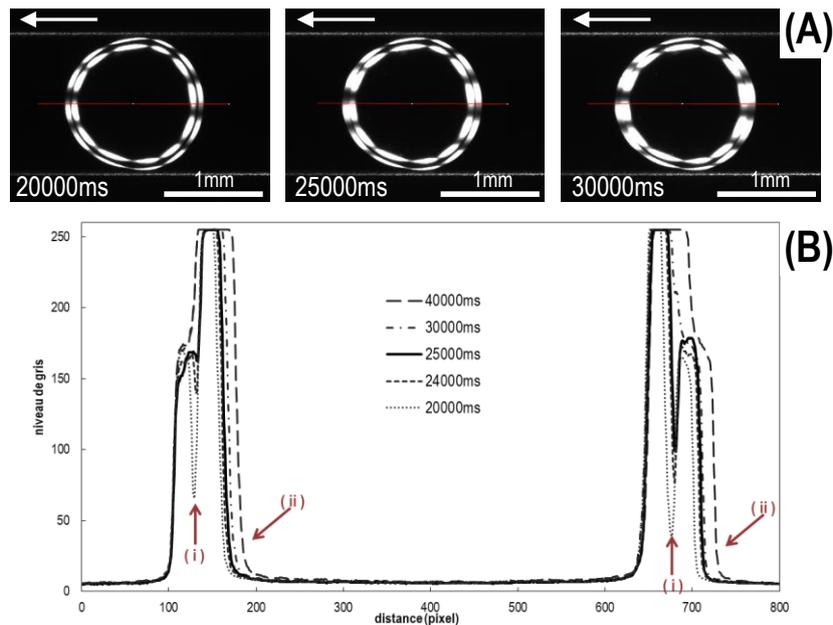


Figure 9. Optimisation du temps d'ouverture de la caméra pour l'acquisition d'images

(A) Acquisition d'image en flux continu au sein d'une tubulure Tygon® de diamètre interne 1,42mm à des débits $Q_d=3\text{ml/h}$; $Q_c=10\text{ml/h}$, pour différents temps d'ouverture de la caméra. (B) Analyse du profil en niveau de gris selon un axe précis sur l'image.

Détection du point trouble

La construction d'un diagramme de phase d'un mélange de biopolymères repose, usuellement, sur la détermination du point trouble. Il se définit comme la composition au-delà ou en deçà de laquelle le système subit une forte augmentation ou diminution de turbidité. Il met en évidence la zone où le système se sépare en deux phases par une différence d'indice de réfraction dans le milieu réactionnel. Habituellement mesuré en spectrophotométrie dans le visible, il peut également être mis en évidence par l'analyse en imagerie du niveau de gris mais ce dernier n'est pas une donnée absolue, une calibration du système de saisie est nécessaire. La mesure en absorbance dans le visible de suspensions colloïdales de dioxyde de titane à différentes concentrations permet d'établir la relation entre une valeur de turbidité et un niveau de gris mesuré. Le TiO_2 est également utilisé afin de valider l'homogénéité du mélange intra-goutte des deux phases aqueuses selon le circuit millifluidique utilisé.

Optimisation du mélange intra-goutte

Le mélange entre les deux solutions miscibles doit être rapide afin d'obtenir un milieu réactionnel le plus homogène en concentration des différents solutés et de limiter les effets cinétiques localisés d'interactions. Pour ce faire, nous utilisons un micro-mélangeur statique (**Figure 6-b1**) en amont de la formation de la goutte et en aval un tuyau Tygon® d'environ 300 mm disposé en forme de serpentin à 8 coudes (**Figure 6-b2**) afin d'améliorer l'efficacité du

mélange par advection chaotique. Cependant, l'adaptation du circuit à des solutions plus ou moins visqueuses nécessite, dans certains cas, de remplacer le micro-mélangeur par une jonction en T de diamètre de perforation 0,50 mm (**Tableau 1- élément (1)**). En effet, l'augmentation de la viscosité entraîne une nette élévation de la pression dans les tuyaux et le micro-mélangeur, au-dessus de la pression maximale supportée par ce dernier. Cela induit une contre-pression en amont qui génère des fuites au niveau des connectiques et des à-coups du mécanisme des pousse-seringues qui a pour conséquence une polydispersité de la taille des gouttes produites et une hétérogénéité de leur composition. L'efficacité du mélange est donc testée à l'aide de deux phases aqueuses à des viscosités potentiellement différentes soit une suspension turbide de TiO_2 à 100 mg/l avec de l'eau ou du glycérol à différentes concentrations. La viscosité dynamique mesurée expérimentalement à 20°C à l'aide d'un rhéomètre [ARES, TA Instrument, USA] équipé d'une géométrie cône-plan (40 mm, angle 0.04 radian) est de 1 mPa.s pour l'eau et respectivement de 25, 84,5 et 380 mPa.s pour des solutions de glycérol à 65 %, 80 % et 92 %.

Les différents montages du circuit millifluidique expérimentés sont l'utilisation soit du micro-mélangeur statique soit d'une jonction en T 0,5 mm en amont de la formation des gouttes associé ou non à un canal disposé en serpentin à 8 coudes en aval. En substitution du serpentin, un tuyau Tygon® est positionné le plus linéaire possible. La distance entre la formation de la goutte et la zone d'observation est dans ce cas d'environ 95 mm.

Les conditions expérimentales sont celles sélectionnées précédemment soit les débits de la phase dispersée Qd1 et Qd2 à 1,5 ml/h pour un mélange [1:1] des deux phases aqueuses et Qc à 10 ml/h pour la phase continue, huile. Le temps d'ouverture de la caméra est de 22 000 ms et le curseur de la puissance de la source lumineuse est en position 9.

La qualité du mélange est estimée en imagerie par l'analyse de l'histogramme des niveaux de gris sur la zone d'intérêt intra-goutte. Dans le cas d'un mélange non visqueux, le résultat obtenu avec le micro-mélangeur statique présente un histogramme relativement étroit avec une moyenne en niveau de gris au environ de 40 (**Figure 10-A**). Lorsque la viscosité est augmentée à 65 % de glycérol, les gouttes semblent se former et apparaître homogènes mais l'histogramme montre une valeur moyenne plus faible, environ 30, ce qui signifie que le mélange [1 :1] n'est pas respecté. Si la viscosité est encore augmentée, une forte polydispersité de la taille des gouttes formées et l'hétérogénéité à l'intérieur de la goutte sont observées. Pour diminuer la pression, le micro-mélangeur est remplacé par une jonction en T 0,5 mm, dans ce cas les gouttes apparaissent monodisperses quelle que soit la viscosité mais plus hétérogène que celles produites avec le micro-mélangeur. En effet les histogrammes en niveau de gris sont très larges et multimodaux (**Figure 10-B**). L'hétérogénéité intra-goutte est attribuée à l'important temps requis pour l'obtention d'un mélange complet par simple diffusion qui, dans un régime laminaire, est proportionnel à la distance pendant laquelle la diffusion se produit. Une jonction en T classique seul ne produit pas un mélange efficace, l'ajout d'un canal en serpentin à 8 coudes placé directement après la formation de la goutte contribue fortement à améliorer l'homogénéité par advection chaotique quelle que soit la viscosité des solutions aqueuses. Nous pouvons conclure que la géométrie du circuit millifluidique avec le micro-mélangeur statique est efficace pour assurer un mélange rapide de deux composants non visqueux. Il est également possible d'obtenir de bons résultats avec des solutions plus visqueuses en ayant recourt à une jonction en T plus classique associée à un canal en forme de serpentin même si cela augmente le temps de mélange.

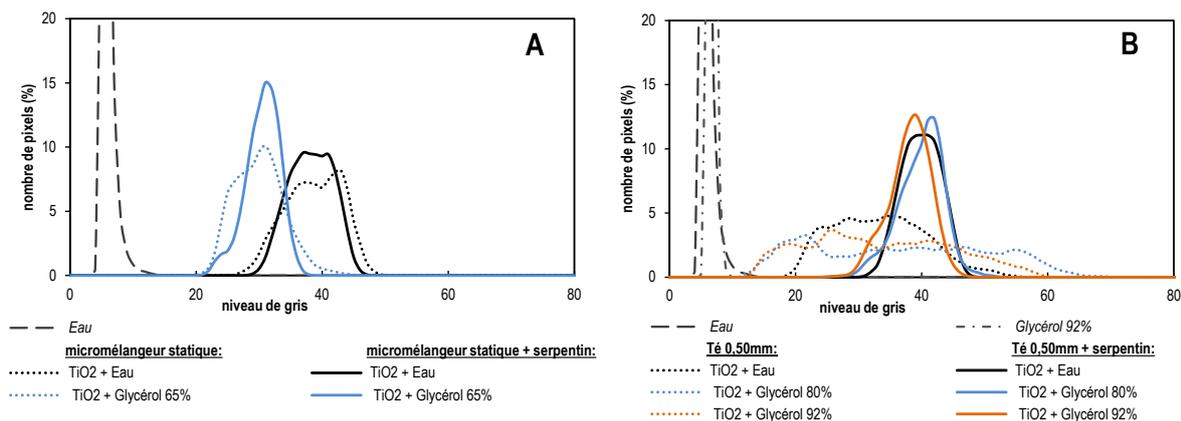


Figure 10. Optimisation du mélange intra-goutte par comparaison des histogrammes en niveaux de gris normalisés en % de pixels pour différents montage millifluidique avec en amont de la formation des gouttes un micro-mélangeur statique ou un Té 0.5 mm et en aval un canal disposé ou non en serpentin à 8 coudes.

Détermination du point trouble : calibration du niveau de gris et validation de la méthode en flux continu sur des gouttes de compositions différentes

L'analyse en niveau de gris des images se base sur des données relatives qui nécessitent une étape de calibration. Cette étape est réalisée avec une suspension colloïdale de dioxyde de titane (TiO₂) dans l'eau. Elle permet également de valider la méthode de la détermination du point trouble, le montage millifluidique et l'optique.

Afin de déterminer une gamme de concentration en TiO₂ pertinente, l'absorbance à 650 nm de trois suspensions mères à environ précisément 1 mg/ml diluées à différentes concentrations comprises entre 0 et 80 µg/ml sont mesurées (**Figure 11-A**). Nous constatons que pour des concentrations inférieures à environ 60 µg/ml en TiO₂, l'absorbance mesurée à 650 nm est linéaire et répond à la loi de Beer-Lambert. La valeur du niveau de gris augmente également linéairement en fonction de la concentration en TiO₂. Cela permet de mettre en évidence la proportionnalité entre le niveau de gris et la turbidité. La relation appliquée entre la turbidité et l'absorbance est $Turbidité = 2,303 \times Absorbance \times L$ où L est la distance du trajet optique en cm et est égal à 1.

La méthode de détermination du point trouble par la millifluidique à gouttes peut alors être testée sur un mélange de deux phases aqueuses, la première est de l'eau, et la seconde une suspension de TiO₂ à 50 µg/ml. Pour cela, une suspension colloïdale de TiO₂ à environ précisément 1 mg/ml est préparée et trois dilutions à 50 µg/ml sont réalisées. Il est procédé à la détermination en niveau de gris, par la méthode mise en place, du mélange [Eau ; TiO₂ 50 µg/ml] à différents rapports de débit respectivement Qd1_Qd2 : 0_50, 10_40, 20_30, 30_20, 40_10 et 50_0 µl/mn. Le débit de la phase continue est de 10 ml/h. Le temps d'ouverture de la caméra est de 25 000 ms et le curseur de l'intensité lumineuse est réglé sur la position 8. L'analyse en niveau de gris des images est effectuée sur au moins 6 gouttes par composition de mélange. Nous observons que la valeur du niveau de gris analysé pour chaque mélange produit augmente linéairement en fonction de la concentration en TiO₂ (**Figure 11-B**), ce qui nous assure du bon contrôle des débits dans la composition du mélange. Une mesure en absorbance à 650 nm de chaque dilution de TiO₂ à 50 µg/ml permet alors de faire le lien entre le niveau de gris et la turbidité.

L'objectif du montage MicroPro développé est de maîtriser le ratio de mélange de deux phases aqueuses en variant les débits contrôlés par les pousse-seringues afin d'obtenir un criblage rapide de plusieurs compositions de gouttes. Par cet essai, nous validons l'outil ainsi que les paramètres d'utilisation et la calibration du système optique par une suspension de TiO₂ à 50 µg/ml.

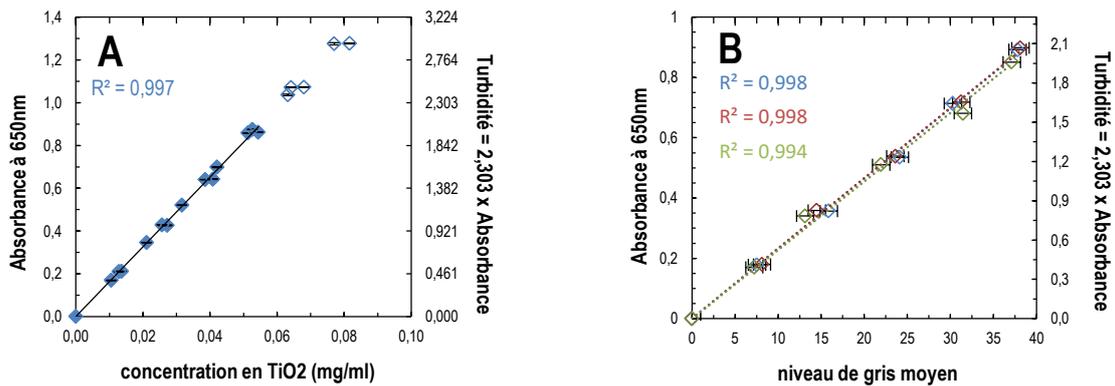


Figure 11. A _Mesure en absorbance à 650 nm de 3 suspensions mère de TiO₂ à environ 1 mg/ml diluées à différentes concentrations comprises entre 0 et 80 µg/ml, la courbe de tendance est déterminée pour des valeurs en absorbance inférieures à 1 (losanges pleins). B _détermination du niveau de gris par millifluidique à gouttes sur un mélange Eau et suspension de TiO₂ à 50 µg/ml à différents rapports de débit. La mesure en absorbance à 650 nm de la suspension de TiO₂ permet d'établir la relation entre un niveau de gris et une turbidité.

Validation sur un couple de biopolymères connus

Le système MicroPro a été validé à travers l'établissement du diagramme de phases connu d'un couple de biopolymères : β -lactoglobuline / Gomme Arabique (9). Dans un premier temps, le diagramme de phases a été déterminé en tube par spectrophotométrie dans l'eau à pH 4,2. Dans un second temps, les mélanges BLG / GA ont été générés avec le circuit millifluidique à gouttes dans les mêmes conditions physico-chimiques. L'initiation et la suppression de la séparation de phases a été mise en évidence dans les gouttes. Dans la gamme de concentration testée (1-5% en poids), les fortes similitudes observées entre les résultats obtenus en tubes et par millifluidique, ont permis de valider l'efficacité de l'approche millifluidique pour le criblage des conditions d'interactions et de séparation de phases entre biopolymères. Ce circuit a enfin été utilisé pour sonder l'assemblage de la napine de colza et de la pectine et a permis de mettre en évidence les conditions physico-chimiques de leur association (10).

Conclusion

Nous avons développé un dispositif millifluidique couplé à un système d'acquisition d'images afin de sonder les conditions de solubilité et d'agrégation de protéines seules ou en mélange. Le montage optique est composé d'une caméra, d'un objectif et de 12 diodes électroluminescentes (DEL) disposées de manière à réaliser les observations sur fond noir. Le circuit millifluidique permet lui de mélanger des dispersions de protéines avec d'autres dispersions de biopolymères et de générer des gouttes grâce à une géométrie de co-écoulement. Deux types de mélangeur ont été développés en fonction de la viscosité des phases dispersées. Un micro-mélangeur statique en T permet un mélange efficace de deux composants non visqueux. Dans le cas de dispersions visqueuses, une combinaison entre une jonction en T et un canal en serpentins a été développée. La taille des gouttes et la distance entre gouttes peuvent être contrôlées par le rapport de débit des phases dispersées et continues. Enfin, deux types de cellules d'observation ont été construits à façon à pouvoir ajuster le temps d'observation. Le dispositif millifluidique mis au point dans le cadre de cette étude est très facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas d'expertise particulière ni d'équipement coûteux. Il peut donc être adapté à l'infini en fonction de la quantité de matière première disponible et du temps d'observation requis pour chaque expérience spécifique, par simple ajustement de la longueur et du diamètre du tube ou par variation des débits. L'utilisation de ce montage a conduit à deux publications dans le journal international à comité de lecture *Food Hydrocolloids* (9, 10).

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

- Quevedo, E., J. Steinbacher, and D.T. McQuade. (2005) Interfacial Polymerization within a Simplified Microfluidic Device: Capturing Capsules. *Journal of American Chemical Society*. 127: 10498–10499.
- Lorber, N., F. Sarrazin, P. Guillot, P. Panizza, A. Colin, B. Pavageau, C. Hany, P. Maestro, S. Marre, T. Delclos, C. Aymonier, P. Subra, L. Prat, C. Gourdon, and E. Mignard. (2011) Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process: Applications in chemistry and high-pressure microflows. *Lab on Chip*. 11: 779–787.
- Engl, W., M. Tachibana, A. Colin, and P. Panizza. (2008) A droplet-based high-throughput tubular platform to extract rate constants of slow chemical reactions. *Chemical Engineering Science*. 63: 1692–1695.
- Amine, C. (2017) Millifluidique à gouttes : un outil pour le criblage des interactions entre biopolymères. Thèse de doctorat .
- Serra, J. (1982) *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Academic press.
- Song, H., J.D. Tice, and R.F. Ismagilov. (2003) A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time. *Angewandte. Chemie Int. Ed.* 42: 768–772.
- Song, H., M.R. Bringer, J.D. Tice, C.J. Gerdt, and R.F. Ismagilov. (2003) Experimental test of scaling of mixing by chaotic advection in droplets moving through microfluidic channels. *Applied Physical Letters*. 83: 4664.
- Zhang, D.F., and H.A. Stone. (1997) Drop formation in viscous flows at a vertical capillary tube. *Physics of Fluids*. 9: 2234–2242.
- Amine, C., A. Boire, J. Davy, M. Marquis, and D. Renard. (2017) Droplets-based millifluidic for the rapid determination of biopolymers phase diagrams. *Food Hydrocolloids*. 70.
- Amine, C., A. Boire, A. Kermarrec, and D. Renard. (2019) Associative properties of rapeseed napin and pectin: Competition between liquid-liquid and liquid-solid phase separation. *Food Hydrocolloids*. 92: 94–103.