HAL
open science

Développement d'un outil microfluidique polyvalent pour l'étude de la cristallisation : application à la nucléation de principes actifs pharmaceutiques

Manuel Ildefonso

To cite this version:

Manuel Ildefonso. Développement d'un outil microfluidique polyvalent pour l'étude de la cristallisation : application à la nucléation de principes actifs pharmaceutiques. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Aix-Marseille université, 2012. Français. NNT : . tel-00721436

HAL Id: tel-00721436

https://theses.hal.science/tel-00721436v1

Submitted on 27 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Aix-Marseille Université

Numéro d'ordre :

THÈSE

pour obtenir le grade de :

Docteur en Science des matériaux, Physique, Chimie et Nanoscience d'Aix-Marseille Université

Développement d'un outil microfluidique polyvalent pour l'étude de la cristallisation : application à la nucléation de principes actifs pharmaceutiques

Présentée par :

Manuel ILDEFONSO

À soutenir publiquement le vendredi 29 Juin devant le jury suivant :

Rapporteurs : Mme. Fabienne ESPITALIER – RAPSODEE Albi UMR 5302
M. François PUEL – LAGEP Lyon UMR 5007

Examinateurs : M. Pierre BONGRAND – LAI Marseille Inserm U1067
M. Philippe LETELLIER – TECHNOLOGIE SERVIER Orléans
M. Alastair MAGNALDO – CEA-Marcoule Bagnols-sur-Cèze
Mme. Anne SPASOJEVIC – SPMS Châtenay-Malabry UMR 8580

Directeurs de thèse : Mme. Nadine CANDONI – CINaM Marseille UMR 7325
M. Stéphane VEESLER – CINaM Marseille UMR 7325

Préparée au Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille CINaM-CNRS (UMR 7325) Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 9

Remerciements

“[…] il peut y avoir de la honte à être heureux tout seul.”
Albert Camus, La peste

Avant de remercier toutes les personnes que j'ai connues durant ces trois années, je souhaiterais remercier la communauté scientifique en général sans distinction de domaine ou spécialité pour l'accueil qu'elle réserve aux nouveaux venus comme moi. Et en ces temps de division entre les hommes, trouver un ensemble de personnes aussi diverses qui arrivent à se parler dans le seul but d'enrichir l'autre est un trésor bien plus grand que toutes les découvertes scientifiques.

Avant tout je tiens à remercier ceux qui m'ont encouragé à m'engager dans ce projet, M. François Puel qui m'a recommandé pour cette thèse ainsi que MM. Philippe Letellier et Mickael Lynch qui m'ont grandement aidé lors de mon choix.

Toute cette aventure a été rendue possible par M. Jacques Derien qui a cru en ce projet et m'a accordé une bourse de thèse pour le faire avancer. Je remercie également M. Claude Henry, directeur du CINaM, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail. Je tiens également à remercier M. Roger Morin, directeur du département Source et Sonde Ponctuel, qui lui aussi m'a accueilli chaleureusement au sein du département et m'a fait partager une certaine conception de la recherche.

J'exprime toute ma reconnaissance aux deux rapporteurs de cette thèse, Mme Fabienne Espitalier et M. François Puel qui ont pris sur leur temps précieux pour examiner ce travail. Je suis également très reconnaissant envers Mme Anne Spasojevic, M. Pierre Bongrand M. Philippe Letellier et M. Alastair Magnaldo, qui me font l'honneur de participer au jury de soutenance.

Je tiens à apporter mes plus chaleureux remerciements à mes deux incroyables directeurs de thèse Mme Nadine Candoni et M. Stéphane Veesler qui m'ont accompagné durant ces trois ans et qui ont pris soin de moi en bons "*parents attentifs*". Je sais que je ne n'aurais probablement pas pu faire grand-chose sans eux et je les remercie pour absolument tout.

Je tiens à saluer tous les stagiaires qui ont travaillé avec moi, M. Palakorn Puniam, M. Jean-Christophe Renaud, Melle Isabelle Cassagneau, Melle Michelle Bootsma, Melle Julie Quercia, Melle Amélie Rethore, M. Benjamin Ben Haim et M. Minh Phat La. Sans eux, ce projet n'aurait jamais pu avancer à un tel rythme ; ce travail est en partie le leur.

J'ai également ici une pensée pour les autres membres du groupe "Solution" avec qui j'ai pu travailler durant ces quelques années et qui ont contribué à me faire progresser sur le plan scientifique et/ou personnel. Merci donc à Mme Zoubida Hammadi, à M. Jean-Pierre Astier, à M. Romain Grossier, à M. Thibaud Detoisien et à Melle Sophie Pierron.

Je remercie toutes les personnes du CINaM qui m'ont apporté leur aide afin de réaliser mes expériences : Mme Nathalie Ferte pour le travail sur les protéines, M. Vasile Heresanu pour les expériences rayons X, MM. Thirou Bactivelane et Michel Audifren pour la conception des systèmes de contrôle de température et de prise de vue, MM. Frédéric Bedu, Igor Ozerov et Romain Jeannette de la plateforme de nanofabrication PLANETE pour les étapes de microfabrication, MM. Brice Detailleur, Jérémy Murgia et toutes les personnes de l'atelier du CINaM qui ont fabriqué les systèmes d'observation indispensable à ce travail, ainsi que M. Marcel Fernandez qui a conçu les adaptateurs pour les pousse seringues.

Je pense également à M. Jean Baptiste Bergot, qui nous a quittés trop tôt.

Je tiens à remercier Mme. Sweetco pour son aide précieuse en anglais lors de la rédaction des différents articles.

Je remercie pour leur incroyable entrain M. Alain Ibanez, M. Julien Zaccaro et M. Julien Leroudier de l'Institut Néel qui m'ont permis de participer à leurs travaux sur la cristallisation du KDP.

Merci à M. Olivier Théodoly et à M. Jules Dupire du laboratoire INSERM "Adhésion et Inflammation" qui m'ont permis d'utiliser leur Plasma Cleaner afin de réaliser certains tests de microfluidique.

Un grand merci à Tom Leyssens qui m'a inciter à travailler sur la cristallisation de la caféine et m'a ainsi permis de réussir la cristallisation d'une molécule organique dans des gouttes microfluidiques.

"*Domo arigato gosaimasu*" à MM. Hiroshi Hiratsuka et Tetsuo Okutsu de l'université de Gunma ainsi que MM. Kyo Sato et Satoru Ueno de l'université d'Hiroshima pour m'avoir permis de découvrir un pays magnifique, le Japon, et pour m'avoir fait prendre conscience de l'universalité de la Science.

Je ne peux pas ne pas remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces trois ans et dont j'ai tellement appris. À ceux qui m'ont posé de grandes questions scientifiques sur le bord d'un terrain de pétanque : "*Tu tires ou tu pointes* ?". À ceux qui m'ont permis d'appréhender le caractère stochastique des phénomènes physiques, qu'il s'agisse de la nucléation ou d'un tir de pétanque. À ceux qui m'ont appris, durant leur footing d'entrainement pour le semi-marathon, qu'une thèse c'est avant tout une course de fond. À tous ceux qui m'ont appris en courant derrière un ballon de foot que sans une équipe on ne peut rien faire de valable. À tous ceux qui m'ont appris que les chercheurs d'où qu'ils viennent ont beaucoup à partager, y compris une bière après un match de volley. À tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à ce manuscrit. À tous ceux avec qui j'ai partagé de bons moments.

Un grand merci à vous tous.

Je tiens enfin à remercier toute ma famille qui m'a soutenu de toutes les façons possibles depuis le début de mes études. Merci à mes amis qui sont toujours là quand on a besoin d'eux. Et surtout Merci a Diane qui partage ma vie depuis bientôt 6 ans et qui m'a aimé durant toutes ces années.

Sommaire

“Observer attentivement c’est se rappeler distinctement ”
Edgar Allan Poe, Histoires extraordinaires

Sommaire

REMERCIEMENTS **2**

SOMMAIRE **5**

INTRODUCTION **12**

CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE **16**

1 NOTION DE CRISTALLISATION EN SOLUTION **17**

1.1 GENERALITES 17
1.2 POLYMORPHISME ET PHASES CRISTALLINES 20
1.3 NUCLEATION 22
1.3.1 Nucléation primaire homogène 22
1.3.2 Nucléation primaire hétérogène 26

2 MICROFLUIDIQUE **29**

2.1 SYSTEMES MICROFLUIDIQUES DE CRISTALLISATION. 30
2.1.1 Systèmes microfluidiques pour la cristallisation des protéines 30
2.1.2 Systèmes microfluidiques pour l'étude de la cristallisation 35
2.2 FABRICATION DE SYSTEMES MICROFLUIDIQUES 40
2.2.1 Systèmes microfluidiques en verre 40
2.2.2 Systèmes microfluidiques en PDMS 41
2.2.3 Systèmes microfluidiques en THV 43
2.2.4 Systèmes microfluidiques à base de capillaires 44

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES **46**

1 PRINCIPES ACTIFS ET PREPARATION DES SOLUTIONS **47**

1.1 LE LYSOZYME 47
1.2 LA CAFEINE 49
1.3 L'ISONICOTINAMIDE 51

2 MATERIEL **52**

2.1 L'ALIMENTATION DU SYSTEME MICROFLUIDIQUE EN SOLUTION 52
2.2 LE CONTROLE DE TEMPERATURE 53
2.3 L'OBSERVATION DES GOUTTES ET DES CRISTAUX 54

3 METHODES **56**

3.1 COURBES DE SOLUBILITE 56
3.2 ENCADREMENT DE SOLUBILITE PAR LA TEMPERATURE 57
3.3 FREQUENCE DE NUCLEATION 58

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS **60**

1 ÉTUDE DE LA NUCLEATION EN PHASE AQUEUSE **61**

1.1 LE SYSTEME MICROFLUIDIQUE 62
1.2 MESURE DE LA LIMITE DE ZONE METASTABLE (LZM) (ARTICLE 1) 65
1.3 MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENTES PHASES CRISTALLINES (ARTICLE 1) 68
1.4 FREQUENCE DE NUCLEATION PRIMAIRE (ARTICLE 2) 70
1.4.1 Choix de la température de croissance 70
1.4.2 Choix des concentrations 70
1.4.3 Choix des temps de nucléation 71
1.4.4 Évolution de la fréquence de nucléation 72
1.5 ARTICLE 1 76
1.6 ARTICLE 2 81

2 VERS L'ETUDE DE LA NUCLEATION EN PHASE ORGANIQUE (ARTICLE 3) 86

2.1 SYSTEME POLYVALENT DE STOCKAGE DES GOUTTES 86

2.1.1 Méthode de stockage de gouttes dans des capillaires en Téflon 87

2.1.2 Limite de Zone Métastable 88

2.1.3 Fréquence de nucléation 89

2.2 VERS UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE UNIVERSEL, COMPATIBLE TOUT SOLVANT ET TOUTE MOLECULE 93

2.2.1 "Plug factory" à base de capillaire 93

a) "Plug factory" basée sur l'insertion d'une aiguille dans un capillaire 93

b) "Plug factory" basée sur les techniques HPLC 94

c) Choix de l'huile injectée dans la "plug factory" 95

d) Outil d'injection dans la "plug factory" 95

2.2.2 Validation de la nouvelle "plug factory" 96

a) Validation de la formation des gouttes de divers solvants 96

b) Validation du stockage des gouttes de divers solvants 96

c) Validation des expériences de cristallisation dans divers solvants 97

2.2.3 Faisabilité de la mesure de la LZM de la caféine 98

2.3 ARTICLE 3 100

CONCLUSION GENERALE 106

ANNEXES 110

1 CURRICULUM VITAE 111

2 CRISTALLISATION DU KDP 114

3 NANOTECHNOLOGIES DEDIEES AU CONTROLE DE LA NUCLEATION 123

BIBLIOGRAPHIE 146

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique des principaux types de faciès 19

Figure 2: Différents types d'empilement dense de sphères..... 20

Figure 3: Diagrammes de phase de systèmes monotropiques (a) et énantiotropiques (b) 21

Figure 4 : Schéma présentant les deux théories de la nucléation d'après Erdemir et al. 22

Figure 5 : Énergie d'activation de germination en fonction du rayon du germe 23

Figure 6a : Fréquence de nucléation en fonction de β à température constante..... 24

Figure 7 : Diagramme de phase montrant la courbe de solubilité (donnée thermodynamique en bleu) et la limite de zone métastable (donnée cinétique en rouge) 25

Figure 8 : Représentation d'un germe de nucléation hétérogène sur un substrat, d'après Boistelle..... 26

Figure 9 : angle de contact entre un germe et son substrat pour différentes affinités germe/substrat d'après Boistelle. 26

Figure 10 : Nucléation d'un germe bidimensionnel sur un substrat 27

Figure 11 : Limite de zone métastable des différents mécanismes de nucléation..... 27

Figure 12 : Évolution du paramètre f, d'après Liu 28

Figure 13 : Évolution du nombre de références indexées dans la base de données de SciVerse concernant la microfluidique (échelle logarithmique). Recherche effectuée sur les mots-clefs : microfluidic et microfluidic + crystallization avec l'outil Scopus le 28 mars 2012. 29

Figure 14 : (A) Photomicrographie montrant les 6 réservoirs vides disposés de part et d'autre de la valve d'intercommunication (orange) (B) Remplissage des réservoirs, les réservoirs de précipitant (en bleu) sont déjà remplis. 31

Figure 15 : Schéma de formation de gouttes en microfluidique, formation par flow focusing (a) et formation par cross flowing (b) 32

Figure 16 : La goutte claire circule dans le canal jusqu'à rencontrer un puits vide dans lequel elle pénètre 32

Figure 17 : a) De larges gouttes de précipitant séparées par des gouttes de séparation sont introduites et mélangées avec un tampon et une solution de protéine, puis entrainées par un flux d'huile afin de former des gouttes microfluidiques. b) Les débits relatifs des différents composants (précipitant, tampon, solution de protéine et huile) peuvent varier. On maintient le débit de solution de protéine constant. Le débit de tampon est inversement proportionnel au débit de précipitant qui est lui-même proportionnel au débit d'huile. c) et d)Le débit d'huile étant proportionnel au débit de précipitant on peut établir une relation entre la taille des gouttes et leur concentration, plus les gouttes sont petites plus elles sont concentrées en précipitant. D'après Ismagilov 33

Figure 18 : Schéma de principe du microévaporateur, d'après Leng 35

Figure 19 : Puce microfluidique pour la mesure directe de la courbe de solubilité d'après Laval, les cristaux apparaissent sous forme de points lumineux grâce à leur biréfringence..... 36

Figure 20 : Visualisation des deux températures de dissolution des cristaux au cours du réchauffement par palier d'une puce microfluidique d'après Laval P. 37

Figure 21 : Schéma de principe de la mesure de la fréquence de nucléation..... 37

Figure 22 : Schéma de la puce microfluidique avec la zone chaude T1 et la zone froide T2.. 38

Figure 23 : Schéma du montage microfluidique d'après Dombrovski 38

Figure 24 : Les différentes étapes de la gravure en solution de microcanaux sur du verre. 40

Figure 25 : Schéma reprenant les étapes de fabrication d'une puce microfluidique en PDMS d'aprés. 42

Figure 26 : Schéma d'un système de génération de gouttes dans un capillaire en PVC 44

Figure 27 : (a) Représentation de la protéine de lysozyme ; (b) cristal de lysozyme 48

Figure 28 : Caféine (a) Formule développée ; (b) Représentation 3D ; (c) Image MEB de cristaux (x60)..... 49

Figure 29 : Dans une zone de travail allant de 25°C à 45°C la sursaturation maximale qu'il est possible d'atteindre par changement de température est égale à la hauteur de la flèche noire divisée par la hauteur de la flèche rouge. 50

Figure 30 : Isonicotinamide (a) Formule développée (b) Photomicrographie de cristaux..... 51

Figure 31 : Solubilité de l'isonicotinamide comparée entre cette étude et celle de ter Horst et al. : 51

Figure 32 : Photographie du système de régulation de la température des seringues monté sur les pousse seringues Nemesys..... 53

Figure 33 : Photomicrographie d'une goutte microfluidique contenant un cristal : a) sans adaptation d'indice optique ; b) avec adaptation d'indice optique..... 54

Figure 34 : Différents montages d'observation de systèmes de stockage contrôlés en température a) binoculaire avec élément Peltier plat b) microscope inversé avec récipient double enveloppe en PMMA c) binoculaire avec élément Peltier UNIDIM (ANACRISMAT)..... 55

Figure 35 : Prototype UNIDIM contenant des gouttes d'éthanol colorées en bleu dans un capillaire : 55

Figure 36 : Représentation schématique de la méthode de détermination de la solubilité par ajouts successifs d'après Detoisien et al.. 56

Figure 37 : Schéma du montage permettant la détermination des courbes de solubilité d'après Detoisien..... 57

Figure 38 : Schéma de principe de la méthode de double pulsation thermique, 1 Préparation de la solution, 2 Nucléation (durant Δt) et 3 croissance des cristaux..... 58

Figure 39 : Puce microfluidique de J.B. Salmon : (a) Schéma de principe, avec en vert l'arrivée d'huile, en bleu l'arrivée de la (ou des) solution(s) et en rouge la sortie des gouttes ; (b) Photographie avec des gouttes 62

Figure 40 : Photographie et schéma de principe de l'utilisation de la puce microfluidique dans ce travail, une seule "plug factory" (à gauche) alimente en gouttes plusieurs puces de stockage (4 dans cet exemple)..... 63

Figure 41 : Photomicrographie de gouttes contenant 0, 1 ou plus de 1 cristal..... 65

Figure 42 : Évolution du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température et position de ces mêmes points sur un diagramme de phase (solubilité en orange et LZM en pointillé vert) 66

Figure 43 : Courbe de solubilité d'aprés (en noir), estimation de la LZM (en rouge) et limite de zone de mononucléation (en bleu) du lysozyme dans 0.7M de NaCl à pH=4.5 pour une durée de 20h 66

Figure 44 : Photomicrographie de gouttes de solution lysozyme à 20mg/ml 0,7M NaCl pH=4,5 68

Figure 45 : Gouttes de solution de lysozyme (20mg/ml ; 0,7M NaCl ; pH=4,5) observées (a) après 20h à 6°C (b) 6 minutes après avoir augmenté la température à 30°C (c) après 12 minutes à 30°C 69

Figure 46 : Solubilité d'après et LZM obtenue précédemment pour le lysozyme dans 0,7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h. Les croix et les cercles indiquent respectivement les températures de nucléation T_n et de croissance T_c aux concentrations de 20 à 55mg/mL 70

Figure 47 : Évolution du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps de nucléation Δt 71

Figure 48 : Nombre moyen de cristaux nucléés par goutte en fonction du temps de nucléation. 72

Figure 49 : (a) Évolution de J en fonction de la sursaturation, d'après nos résultats expérimentaux (●) et d'après Galkin et al. (□), les barres d'erreur sont inférieures à la taille des points ; (b) Évolution de ln(J) en fonction de $1/(\ln\beta)^2$ et équation de la droite ajustant nos points expérimentaux. 73

Figure 50 : (a) Photomicrographie d'une goutte de 250nL contenant un cristal dans un capillaire en Téflon (b) Photomicrographie d'un capillaire en Téflon observé en polarisation croisée 87

Figure 51 : Évolution du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température et détermination de la T_{LZM} : (a) dans le cas de gouttes stockées dans des puces en PDMS ; (b) dans le cas de gouttes stockées dans des capillaires en Téflon 88

Figure 52 : Courbe de solubilité (en noir) et estimation de la LZM du lysozyme dans 0.7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h pour des gouttes stockées dans des puces en PDMS (en bleu) ou pour des gouttes stockées dans des capillaires en Téflon (en rouge)89

Figure 53 : Solubilité d'après et LZM dans les capillaires en Téflon pour le lysozyme dans 0,7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h. Les croix et les cercles indiquent respectivement les températures de nucléation T_n et de croissance T_c aux concentrations des expériences 90

Figure 54 : (a) nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps de nucléation (b) Fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation à 20°C 90

Figure 55 : Évolution de ln(J) en fonction de $1/(\ln\beta)^2$ et équation de la droite ajustant nos points expérimentaux 91

Figure 56 : (a) Photographie du capillaire percé par l'aiguille (b) La jonction aiguille/capillaire est noyée dans la colle Araldite pour assurer l'étanchéité. 94

Figure 57 : Schéma de fabrication des gouttes dans des jonctions (a) en croix (b) en T. En jaune arrivée de l'huile FC-70, en bleu arrivée de la solution et en pointillé la sortie des gouttes. 94

Figure 58 : Formation de goutte dans une jonction T 95

Figure 59 : Formule développé du FC-70 95

Figure 60 : Photographie de gouttes contenant des cristaux dans le nouveau système microfluidique basé sur la technique des capillaires : (a) Cristal de lysozyme 30mg/ml à 20°C dans un tampon aqueux de 0,7M NaCl pH = 4,5 ; (b) Cristal de caféine dans l'éthanol 7mg/ml à 20°C ; (c) Cristal d'isonicotinamide dans l'éthanol 143mg/ml à 10°C ; (d) Cristal d'isonicotinamide dans le nitrobenzène 7mg/ml à 10°C 97

Figure 61 : Cristaux de caféine dans une goutte de 250nl 7mg/ml à 20°C 98

Figure 62 : Solubilité et LZM de la caféine dans l'éthanol en fonction de la température 99

Introduction

"J'appelle entier ce qui a un commencement, un milieu et une fin. Le commencement est ce qui ne suppose rien avant soi, mais qui veut quelque chose après."

Aristote

Les cristaux ont toujours été considérés comme des solides particuliers en raison de leur forme géométrique et pour certains de leur transparence. Cette transparence a même valu aux cristaux de gypse d'être utilisés par les Romains pour fermer les embrasures des fenêtres avant l'invention des techniques de fabrication du verre plat[1]. Si l'utilisation des cristaux est très ancienne, leur fabrication ne l'est pas moins. Par exemple, depuis l'Antiquité les hommes cristallisent le sel dans les marais salants.

L'opération permettant d'obtenir des cristaux est appelée cristallisation. Elle correspond au passage d'un état désordonné de la matière à un état ordonné et solide. Il existe cependant différents types de cristallisation. L'eau qui gèle forme des cristaux de glace lors du passage de l'état liquide à l'état solide, on parle de cristallisation en bain fondu. Pour la cristallisation du sel dans les marais salants, on parle de cristallisation en solution. Ce second type de cristallisation permet le passage d'un soluté de l'état dissout à l'état de solide cristallin. Dans ce travail, nous étudierons spécifiquement la cristallisation en solution.

La cristallisation en solution met en jeu plusieurs phénomènes qui gouvernent différentes propriétés des cristaux obtenus. Ainsi, la croissance des cristaux détermine leur faciès (formes extérieures des cristaux), leur morphologie (faces) et leur taille, alors que la nucléation (l'apparition de nouveaux cristaux) détermine la phase cristalline. Ces différents paramètres (faciès, morphologie, taille et phase cristalline) vont faire varier les propriétés des cristaux et donc les propriétés du produit fabriqué à partir de ces cristaux.

La cristallisation en solution est utilisée dans de très nombreux procédés et dans des domaines variés : cristallisation du sel ou du sucre dans l'agroalimentaire, cristallisation du savon dans l'industrie lessivielle, cristallisation de cristaux de grandes tailles et de grande qualité pour l'optique, cristallisation de nombreux principes actifs dans l'industrie pharmaceutique… Mais tous ces domaines n'ont pas les mêmes exigences quant à l'étape de cristallisation en solution. Dans certains domaines, elle n'est pas une étape critique (cristallisation du sel par exemple), dans d'autres domaines, cette étape peut avoir des conséquences majeures (cristallisation de principes actifs).

Dans l'industrie pharmaceutique, une étape de cristallisation mal contrôlée (en termes de reproductibilité) peut mettre en danger la vie des patients. En effet, le changement de faciès, de taille ou de phase cristalline des cristaux obtenus peut modifier radicalement leurs propriétés de dissolution. Cela a pour conséquence de modifier la biodisponibilité du principe actif, le rendant toxique ou inefficace. Si la taille moyenne des cristaux peut être modifiée après la cristallisation (par broyage, granulation…), la phase cristalline elle, est totalement dépendante du procédé de cristallisation et plus particulièrement de l'étape de nucléation. Cela a déjà conduit à des incidents par le passé, comme dans le cas du Ritonavir[2]. Ces incidents ont poussé les autorités à exiger des laboratoires pharmaceutiques une étude approfondie du processus de cristallisation afin de réduire au maximum ce risque. Cela va également dans le sens de l'intérêt des laboratoires puisque ces derniers peuvent breveter chaque phase cristalline découverte et donc protéger davantage leurs produits contre la fabrication de contrefaçons.

Une bonne maîtrise de la nucléation est donc essentielle dans le domaine pharmaceutique afin d'assurer la sécurité des patients, d'assurer la robustesse du procédé de cristallisation et de protéger les recherches par l'obtention de brevets.

Dans ce contexte, le but de cette thèse est de proposer un outil, le plus adapté possible aux contraintes de l'industrie pharmaceutique, afin de répondre aux interrogations survenant lors de l'étude de la cristallisation d'une nouvelle molécule.

Le premier problème rencontré lors de l'étude de la cristallisation d'un nouveau produit est la faible quantité de produits disponibles, ce qui est normal dans une phase de développement où la production industrielle n'a pas encore commencé. En parallèle, la cristallisation est influencée par plusieurs paramètres qui sont : la température, la concentration, la nature du milieu (solvant) et l'hydrodynamique. Pour bien connaître le comportement d'un principe actif pharmaceutique au cours de la cristallisation et choisir des conditions de cristallisation robuste, il est nécessaire de déterminer l'influence de chacun de ces paramètres ainsi que de leurs influences croisées. Cela conduit donc à un grand nombre d'expériences pour tester les différentes combinaisons possibles. Il est également très intéressant de produire un grand nombre de phases différentes afin de connaître les différents polymorphes existants. Un autre aspect est la production de monocristaux pour une analyse plus poussée de la structure cristalline par diffraction des rayons X. Enfin l'outil choisi pour cribler les conditions de cristallisation doit être suffisamment simple d'utilisation et rentable pour être adopté par l'ensemble des laboratoires pharmaceutiques.

Ces différents aspects du problème définissent deux contraintes qui semblent contradictoires, faire un grand nombre d'expériences avec le minimum de produit. La seule solution permettant de répondre à ces deux contraintes consiste à limiter au maximum les quantités mises en jeu dans chaque expérience. Il s'agira donc de manipuler des quantités très faibles de solutions du µL au nL plutôt que du L au mL, comme cela se fait actuellement. Les technologies permettant la manipulation de fluides à de telles échelles sont regroupées sous le terme générique de microfluidique. Il s'agit alors de mettre au point un système microfluidique permettant l'étude de la nucléation de principes actifs pharmaceutiques. Au cours de ce travail, nous avons développé, de concert, un système microfluidique et une méthodologie d'étude de la nucléation.

Afin d'atteindre le but fixé dans cette thèse, un état de l'art sera présenté dans une première partie pour mieux comprendre les problèmes liés à la fois à l'étude de la nucléation, mais aussi à l'utilisation des outils microfluidiques dans ce domaine. Tout d'abord, nous présenterons le phénomène de nucléation en développant les notions de nucléation homogène et hétérogène. Une attention toute particulière sera portée sur les implications de cette étape en matière de polymorphisme. Puis nous verrons les différentes solutions apportées par la microfluidique afin de simplifier l'étude de la nucléation de différentes sortes de molécules.

Dans une seconde partie, nous discuterons des différents principes actifs pharmaceutiques retenus pour cette étude ainsi que des différents appareils utilisés pour les caractériser. Dans cette partie matériel nous ne parlerons pas de l'outil microfluidique utilisé puisque celui-ci a beaucoup évolué tout au long de ce travail en fonction des résultats obtenus.

La partie résultat se découpera en deux grands chapitres, chacun conclu par un ou deux articles. Chaque chapitre montre une étape du développement de l'outil microfluidique ainsi que les méthodes utilisées pour réaliser des études de nucléation. Dans un premier chapitre, nous verrons une méthode utilisant une puce microfluidique en PDMS (un polymère silicone) pour mesurer la limite de zone métastable (limite de nucléation) d'un principe actif pharmaceutique soluble dans l'eau. Cette puce permet également l'apparition de nouvelles phases cristallines que nous caractériserons. Puis une méthodologie différente sera employée pour obtenir une mesure précise de la fréquence de nucléation du principe actif dans l'eau. Dans le second chapitre, nous étendons l'étude à des solvants organiques avec lesquels le PDMS n'est pas compatible. Le but étant d'aboutir à un outil microfluidique polyvalent et simple d'utilisation, nous validerons chaques étapes de transformation de cet outil.

Pour conclure nous reviendrons sur les avancées techniques et méthodologiques qui ont était réalisées au cours de ce travail, mais aussi sur les obstacles qu'il reste à franchir pour obtenir un outil d'étude de la nucléation qui réponde mieux encore aux contraintes de l'industrie pharmaceutique.

Chapitre 1 : Bibliographie

“Si vous ne pouvez expliquer un concept à un enfant de six ans, c'est que vous ne le comprenez pas complètement.”

Albert Einstein

Cette partie bibliographique a pour but de décrire les deux aspects du problème traité dans ce travail. Tout d'abord en présentant un état de l'art sur la cristallisation en solution en portant une attention particulière sur le phénomène de nucléation. Puis dans un second temps, avec une présentation des différentes méthodes microfluidiques qu'il est possible d'utiliser pour étudier la cristallisation. Dans cette partie, l'accent sera mis sur les matériaux de fabrication des systèmes microfluidiques. Mais commençons par définir la cristallisation.

1 Notion de cristallisation en solution

La cristallisation en solution est un changement d'état au cours duquel un corps va passer de l'état dissout à l'état de solide cristallin. Malgré la simplicité de mise en œuvre de la cristallisation en solution, utilisée depuis de nombreux siècles dans les marais salants, ce phénomène repose sur des principes physiques qui peuvent être complexes. Il convient donc de prendre un peu de temps pour définir les bases de la cristallisation en solution.

L'objet de cette partie est de définir les différents aspects de la cristallisation en solution qui seront abordés dans ce manuscrit. Tout d'abord, quelques généralités sur les notions de solubilités, de sursaturation et de faciès cristallins seront exposées succinctement. Puis le concept de phases cristallines sera défini en cherchant à mettre en lumière les possibilités de caractérisation dans un but de criblage de phase. Enfin, une revue bibliographique de la nucléation sera réalisée afin de voir comment les différentes notions vues précédemment interagissent au cours de cette étape.

1.1 Généralités

Cette première partie s'attachera à définir quelques notions fondamentales de la cristallisation en solution telle que la solubilité, la sursaturation, la croissance cristalline et le faciès.

Une solution se définit comme la dispersion d'un composé, le soluté, dans un second composé, le solvant. On dit alors que le soluté est dissout par le solvant. On peut avoir une idée rapide du pouvoir de dissolution d'un solvant sur un soluté donné par la règle du « like dissolve like », c'est à dire qui se ressemble (chimiquement) se dissout[3].

Cependant, il existe une quantité maximale de soluté qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant, elle correspond à l'équilibre cristal/solution. Cette quantité maximale est appelée solubilité C* et sera exprimée en mg/ml dans ce manuscrit. Lorsque la quantité maximale de soluté a été dissoute dans le solvant, la solution est dite saturée. La solution satisfait alors à l'Équation 1.

$$C = C^*$$

Équation 1

C : Concentration en soluté de la solution, ici la solution est saturée (mg/mL)
C* : Solubilité (mg/mL)

Différents paramètres peuvent faire varier la solubilité d'une molécule dans un solvant. Il s'agit le plus souvent de la nature du solvant et de la température. Cependant pour des molécules plus complexes, comme les protéines, la solubilité peut dépendre également du pH, de la force ionique de la solution, de la nature des autres ions en solutions, etc.[4]

La notion de solubilité, également appelée concentration à saturation, qui vient d'être vue permet de déterminer l'état d'équilibre thermodynamique d'un système cristal/solution. Cependant, il existe des états hors équilibre et l'un d'entre eux est la sursaturation.

Une solution est sursaturée lorsque la concentration en soluté C est supérieure à la solubilité C*. On définira la sursaturation β comme une grandeur sans dimension rendant compte de cet excès de soluté.

$$\beta = \frac{C}{C^*}$$

Équation 2

β : Sursaturation (adimensionnel)
C : Concentration en soluté de la solution sursaturée (mg/ml)
C* : Solubilité (mg/ml)

Un moyen d'obtenir une solution sursaturée est de dissoudre le soluté dans des conditions permettant d'accroitre C*, par exemple en augmentant la température. Puis en diminuant la température, la solubilité est réduite jusqu'à ce que cette dernière soit inférieure à la concentration de la solution.

Une solution sursaturée possède donc un excès de soluté en solution par rapport à l'équilibre thermodynamique cristal/solution. Cet écart à l'équilibre thermodynamique constitue la force motrice de la cristallisation. La cristallisation n'est que la manifestation de ce retour à l'équilibre.

Le retour à l'équilibre thermodynamique d'une solution sursaturée passe nécessairement par la cristallisation des molécules de soluté présentes en excès dans la solution. La sursaturation conduit ces molécules à intégrer un cristal de soluté. Elles peuvent soit conduire à la formation de nouveaux cristaux (cet aspect sera développé dans la partie 1.3) soit intégrer un cristal déjà existant. On parle dans ce cas de croissance cristalline puisque le cristal va croître en intégrant de nouvelles molécules via sa surface.

Selon la structure chimique de cette surface, il va être plus ou moins facile d'intégrer un nouvel élément dans le cristal. Cela va donc se traduire au niveau macroscopique par une différence dans la vitesse de croissance de chaque face du cristal. Les différentes faces du cristal ne se développant pas à la même vitesse, le cristal prendra un faciès (forme extérieure du cristal) qui dépendra de la vitesse de croissance relative des faces. Le faciès peut être en aiguille très fine, en baguette plus épaisse, en plaquette ou même en cube. La Figure 1 montre l'appellation de différents faciès caractéristiques des cristaux.

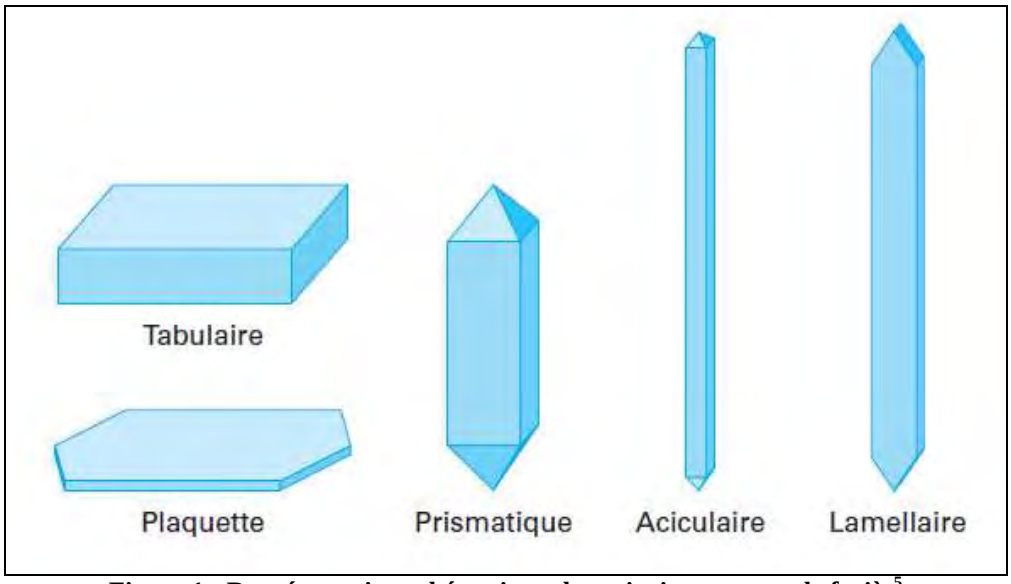


Figure 1 : Représentation schématique des principaux types de faciès[5]

Le faciès joue un rôle important dans le comportement macroscopique de la poudre cristalline. Par exemple, une poudre formée de multitudes d'aiguilles forme plus facilement des agrégats qu'une poudre formée de cubes.

Après ces quelques rappels de cristallisation en solution, nous pouvons détailler les phénomènes de polymorphisme et de nucléation qui nous intéressent plus particulièrement dans ce travail.

1.2 Polymorphisme et phases cristallines

D'après sa définition, un cristal est caractérisé par une répartition régulière et périodique des atomes qui le composent. Cette périodicité est liée à la façon dont les éléments (atomes ou molécules) qui intègrent le cristal lors de sa croissance vont s'empiler pour former la structure dense du cristal. On peut simplifier le problème en considérant un empilement dense de sphères comme le montre la Figure 2.

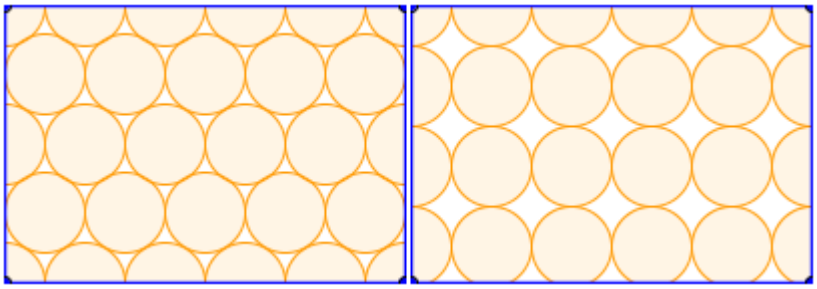


Figure 2: Différents types d'empilement dense de sphères

Les deux types d'empilement sont en effet des empilements denses, réguliers et périodiques de sphères identiques. Ils répondent donc à la définition que l'on donne du cristal, mais présentent cependant deux structures bien différentes. Dans le cas d'un cristal, un phénomène similaire peut se produire lors de l'empilement des molécules ou des atomes qui le constitue. Chaque type d'empilement caractérisera alors une phase solide appelée polymorphe cristallin. On dira alors que ce solide présente plusieurs polymorphes. Mais le polymorphisme n'est pas la seule possibilité pour un solide d'exister sous différentes phases cristallines.

Un cristal peut être formé de plusieurs types de molécules dans des proportions définies. On parle alors selon les cas : d'hydrates si l'une des espèces chimiques est l'eau, de solvates si l'une des espèces chimiques est un solvant organique ou de cocristaux si toutes les espèces sont des solides à température ambiante[6]. Chacun de ces mélanges en quantité définie constitue alors une nouvelle phase cristalline, qui peut à son tour présenter ou non du polymorphisme. Pour un produit chimique donné, il peut exister un grand nombre de phases cristallines différentes.

Chaque phase cristalline possède un arrangement des molécules qui lui est propre, il s'agit donc de solides différents qui possèdent des propriétés physiques différentes. Un exemple bien connu est celui du graphite et du diamant, deux solides composés exclusivement de carbone, mais qui présentent des propriétés physiques différentes : résistance mécanique, conductivité… De la même façon, différentes phases cristallines d'un même produit auront des densités, des solubilités, des faciès ou encore des propriétés optiques différentes suivant la phase cristalline.

On comprend donc que deux polymorphes d'une même espèce chimique possèdent chacun une courbe de solubilité. Si sur un domaine de température donné les courbes de solubilité de chaque phase ne se croisent pas, on parle d'un système monotropique sur ce domaine de température. Dans le cas contraire, on parle d'un système énantiotropique. La Figure 3 montre deux exemples de systèmes comportant deux phases, celui de gauche est monotropique et celui de droite est énantiotropique.

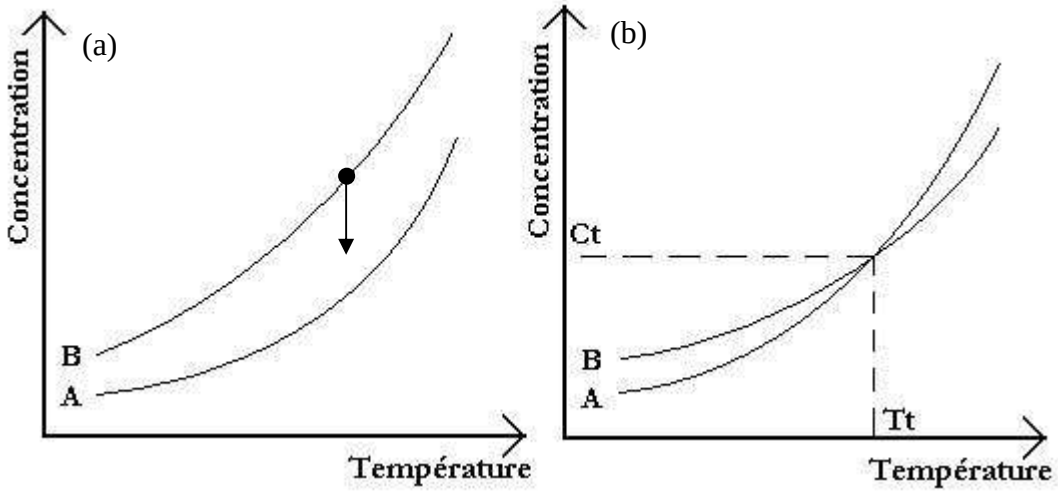


Figure 3: Diagrammes de phase de systèmes monotropiques (a) et énantiotropiques (b)[8]

Dans un système monotropique avec une phase B dont la solubilité est supérieure à celle d'une phase A, imaginons une solution à l'équilibre avec la phase B et ne contenant pas de cristaux de la phase A. Cette solution étant sursaturée par rapport à la phase A, elle peut conduire au bout d'un temps donné à la nucléation de cristaux de la phase A. Dans ce cas, les cristaux de phase A sont en suspension dans une solution sursaturée et se mettent à croître, diminuant ainsi la concentration de la solution. Les cristaux de la phase B toujours présents en solution sont alors en suspension dans une solution sous-saturée et commencent à se dissoudre. Par conséquent, la phase A se développera aux dépens de la phase B[7]. La phase B est donc une phase métastable qui se convertira spontanément en phase A après un certain temps. On en déduira également que le polymorphe le plus stable est le polymorphe dont la solubilité est la plus faible[8].

D'un point de vue thermodynamique on obtient forcément le polymorphe le plus stable en solution. Mais les choses deviennent différentes si l'on prend également en compte la cinétique d'évolution de tels systèmes. Pour une solution à l'équilibre avec un polymorphe métastable, il sera intéressant de savoir quelles sont les chances de voir apparaître (nucléer) la phase stable. En effet si la sursaturation par rapport à la phase stable est trop faible la nucléation de cette phase n'aura pas lieu dans un temps observable et la phase métastable sera alors stabilisée par l'absence de la phase stable[9].

On voit déjà ici que c'est lors de l'étape de nucléation que se décide la phase cristalline du solide obtenu. Dans le but de proposer un criblage des différentes phases cristallines d'un principe actif pharmaceutique, il est donc nécessaire de bien connaître les mécanismes mis en jeu lors de l'étape de nucléation.

1.3 Nucléation

Cette étape permet l'apparition de nouveaux cristaux dans la solution en conduisant à la formation de germes cristallins qui permettront la croissance cristalline. Cette nucléation peut avoir lieu n'importe où dans la solution et à n'importe quel moment. La nucléation est un phénomène stochastique, pour la caractériser il est préférable de réaliser un nombre important d'expériences afin d'obtenir des données statistiques. En d'autres termes il vaut mieux 100 expériences dans un volume de 100nL qu'une seule expérience dans un volume de 10µL.

On distinguera deux types de nucléation, la nucléation primaire qui correspond à l'apparition d'une phase cristalline non préexistante en solution, par opposition à la nucléation secondaire où les nouveaux germes proviennent de cristaux de la même phase, déjà présents en solution. La nucléation secondaire a le plus souvent lieu par attrition de cristaux fragiles ou cristallisants en aiguille. Ce phénomène est très important dans les cristallisoirs agités utilisés dans l'industrie. La nucléation secondaire peut également provenir de cristaux que l'on a rajoutés à la solution. On parle alors d'ensemencement. Dans notre étude, nous négligerons la nucléation secondaire, car les expériences sont toutes réalisées en milieu statique et sans ensemencement. Nous parlerons donc essentiellement dans ce manuscrit de nucléation primaire qui est elle-même divisible en deux catégories : la nucléation primaire homogène et la nucléation primaire hétérogène.

1.3.1 Nucléation primaire homogène

La nucléation primaire est dite homogène lorsque les germes cristallins se forment sans contact avec un élément extérieur à la solution (parois du cristallisoir, poussières, interface, etc.). Deux théories coexistent actuellement pour expliquer cette formation de germes au sein de la solution (Figure 4) :

➤ La théorie classique de la nucléation[10] que nous avons retenue pour ce travail.

Cette théorie est basée sur celle de la nucléation d'une goutte d'eau (approximation capillaire) et considère que la nucléation est limitée par l'apparition du germe critique.

➤ La théorie de la nucléation en deux étapes[11,12] que nous ne développerons pas ici.

Cette théorie sépare la densification du germe de son organisation en cristal. La solution se densifie localement en agrégeant des molécules puis s'organise pour former un cristal. Selon le cas ce sera l'une ou l'autre de ces deux étapes qui sera l'étape limitante.

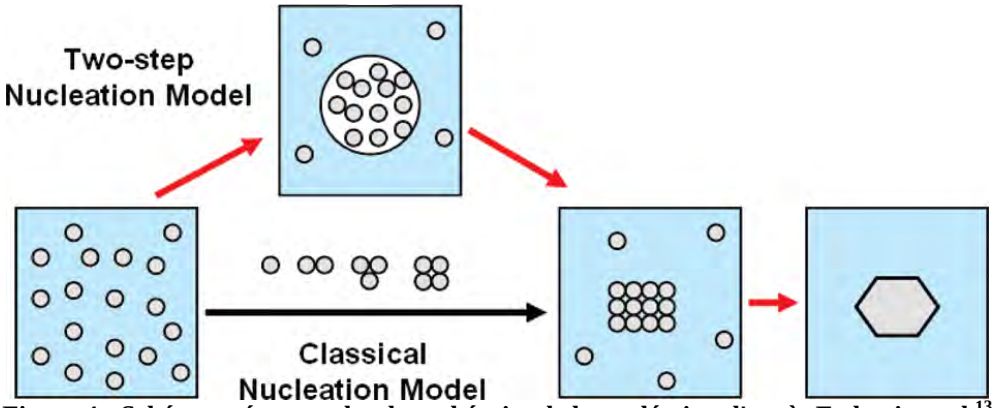


Figure 4 : Schéma présentant les deux théories de la nucléation d'après Erdemir et al.[13]

Dans la théorie classique de la nucléation, la solution sursaturée est un liquide homogène à l'échelle macroscopique, mais pouvant présenter des fluctuations à l'échelle moléculaire par rapport à l'état moyen de la solution[10]. Ces fluctuations aléatoires vont se traduire par l'apparition d'agrégats instables contenant plusieurs molécules de soluté[14]. Ces agrégats se font et se défont par capture ou perte aléatoire d'une molécule. D'un point de vue thermodynamique, le grossissement de l'agrégat se fait avec une augmentation de son volume et de sa surface de contact avec la solution. L'accroissement du volume se fait avec un gain en énergie, tandis que l'augmentation de surface nécessite une dépense énergétique. En supposant que les agrégats soient sphériques et que l'énergie interfaciale agrégat/solution soit identique en tout point de la surface, on peut écrire l'énergie nécessaire pour obtenir un agrégat de rayon r à température et pression constante sous la forme suivante[3].

$$\Delta G = -\left(\frac{4\pi r^3}{3} \times \frac{1}{\Omega} kT \ln \beta\right) + (4\pi r^2 \times \gamma)$$

Équation 3

ΔG	: Énergie d'activation nécessaire pour former un agrégat de rayon r
r	: Rayon de l'agrégat (en m)
Ω	: Volume d'une molécule de soluté (en m^3)
k	: Constante de Boltzman $1{,}3806503.10^{-23}$ $J.K^{-1}$
T	: Température (en K)
β	: Sursaturation (sans unité)
γ	: Énergie interfaciale moyenne agrégat/solution (en $J.m^{-2}$)

On voit bien ici le terme de volume négatif et le terme de surface positif. Afin de se rendre compte de l'évolution de ΔG en fonction de r, on trace cette fonction sur la Figure 5.

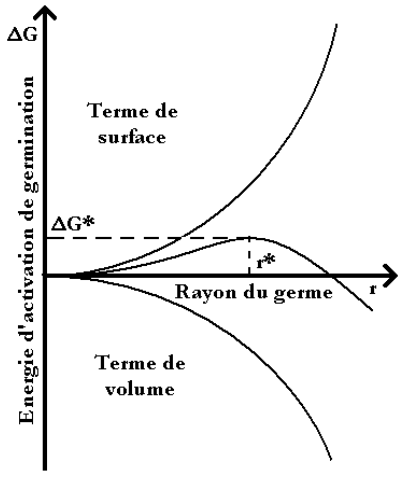


Figure 5 : Énergie d'activation de germination en fonction du rayon du germe[3]

On constate alors que cette fonction passe par un maximum ΔG* pour un rayon de l'agrégat appelé rayon critique r*. Pour cette taille l'agrégat est instable, si on lui enlève une molécule il tend à se dissoudre, et si on lui ajoute une molécule il tend à croître et à devenir un germe cristallin. Il faut donc franchir un seuil minimum d'énergie ΔG* pour faire apparaitre un germe. Le rayon critique r* et l'énergie libre d'activation critique ΔG* peuvent être calculés en utilisant l'Équation 4.

$$\frac{\delta \Delta G}{\delta r}(r^*) = 0$$

Équation 4

La résolution de l'Équation 4 permet d'obtenir le rayon du germe critique selon la "relation de Gibbs Thomson Freundlich ", Équation 5, ainsi que la valeur de ΔG* Équation 6.

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT\ln\beta}$$

Équation 5

$$\Delta G^* = -\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT\ln\beta)^2}$$

Équation 6

Au vu de la forme de la courbe de la Figure 5 il est facile d'assimiler ΔG* à une énergie d'activation de nucléation primaire homogène, en faisant certaines hypothèses liées à la théorie classique de la nucléation. On pourra alors utiliser une loi de cinétique du type loi d'Arrhenius. On peut ainsi définir une fréquence de nucléation J correspondant au nombre de germes ayant nucléé par unité de temps et par unité de volume (Équation 7)[10].

$$J = K_0 \exp\left(\frac{\Delta G^*}{kT}\right) = K_0 \exp\left(-\frac{16\pi}{3}\frac{\Omega^2\gamma^3}{(kT)^3\ln^2\beta}\right)$$

Équation 7

J : Fréquence de nucléation (en $m^{-3}.s^{-1}$)
K_0 : Facteur cinétique caractéristique d'un couple cristal solution (en $m^{-3}s^{-1}$)
ΔG* : Énergie libre d'activation critique (en J)
k : Constante de Boltzman $1.3806503.10^{-23}$ $J.K^{-1}$
T : Température (en K)
Ω : Volume d'une molécule de soluté (en m^3)
β : Sursaturation (sans unité)
γ : Énergie interfaciale moyenne agrégat/solution ($J.m^{-2}$)

J dépend de paramètres fixes liés au soluté (Ω) ou à l'interaction du soluté avec la solution (γ) et d'autres paramètres variables, la sursaturation et la température. Plus la sursaturation est grande plus la fréquence de nucléation est élevée, et il en va de même pour la température. La Figure 6 montre cette augmentation exponentielle de la fréquence de nucléation avec la sursaturation (Figure 6a), ainsi qu'avec la température (Figure 6b), tous les autres paramètres étant constants.

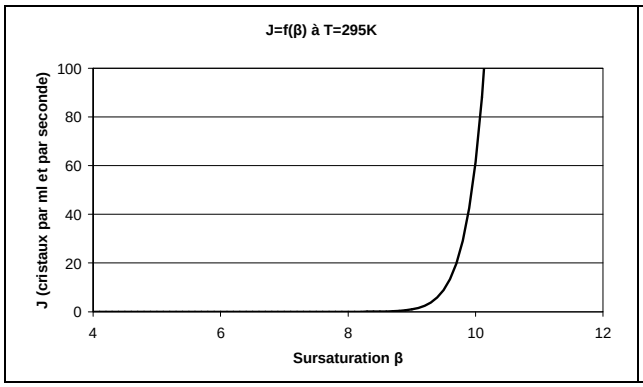


Figure 6a : Fréquence de nucléation en fonction de β à température constante (T=295K ; Ω=2,5.10^{-22}cm^3 ; γ=2.10^{-3} mJ.cm^{-2} ; K_0=10^{20}cm^{-3}s^{-1})

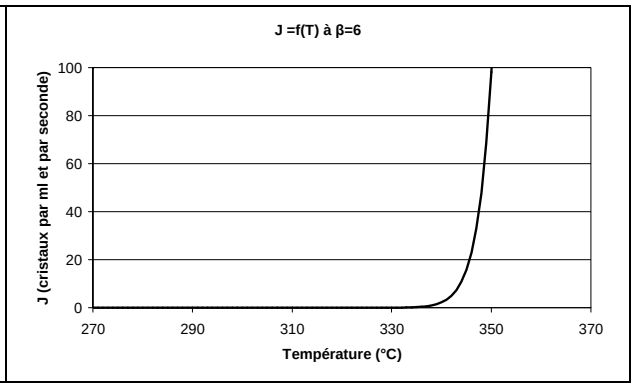


Figure 6b : Fréquence de nucléation en fonction de la température à β constant (β=6 ; Ω=2,5.10^{-22}cm^3 ; γ=2.10^{-3} mJ.cm^{-2} ; K_0=10^{20}cm^{-3}s^{-1})

On constate sur les Figure 6a et 6b que même si l'équilibre thermodynamique d'une solution est rompu (β>1) le retour à l'équilibre peut être très lent à cause d'une fréquence de nucléation très faible. Il y a blocage cinétique de la nucléation. On peut donc définir au sein de la zone sursaturée deux zones, une où la nucléation primaire est possible cinétiquement et une autre où elle rencontre un blocage cinétique. La limite entre ces deux zones, appelée limite de zone métastable (LZM) est une limite liée à la cinétique de la nucléation. Cette limite dépend du temps choisi pour considérer la nucléation comme rapide. En dessous de cette limite, la nucléation est négligeable et seule la croissance cristalline est considérable, comme le montre la Figure 7.

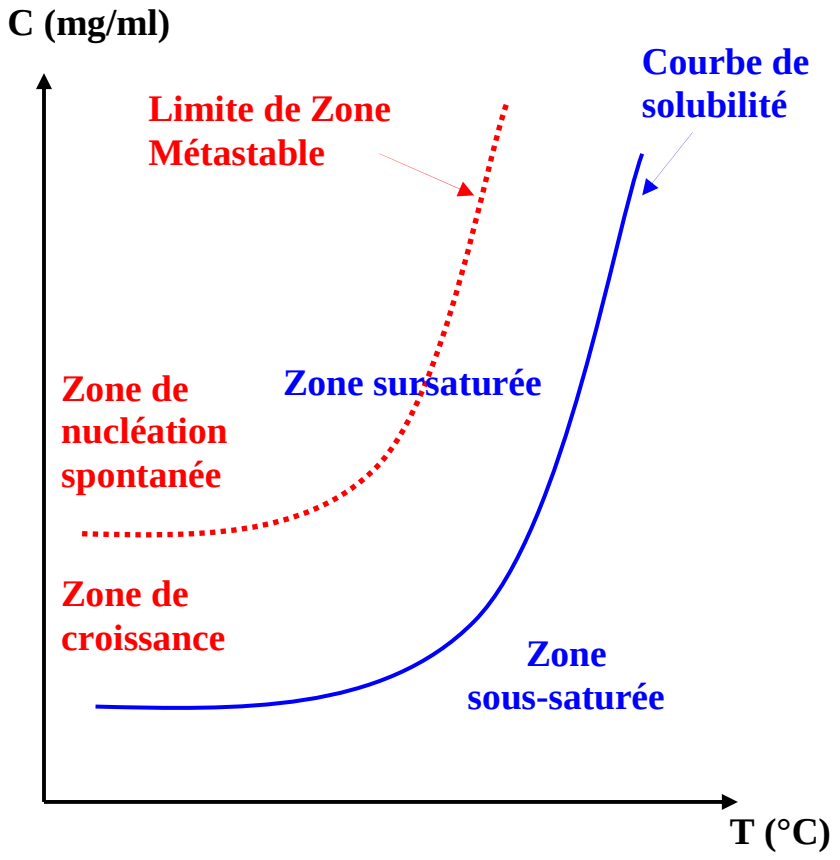


Figure 7 : Diagramme de phase montrant la courbe de solubilité (donnée thermodynamique en bleu) et la limite de zone métastable (donnée cinétique en rouge)

La limite de zone métastable joue un rôle important lors de la cristallisation industrielle, car pour contrôler la cristallisation l'industriel cherche à se placer dans la zone de croissance puis à ensemencer la solution (ajout de cristaux de la phase recherchée). Cette méthode permet de s'affranchir de la nucléation primaire en solution pouvant conduire à des phases cristallines non voulues et également à une nucléation mal contrôlée posant des problèmes de reproductibilité.

La position de cette limite de zone métastable va dépendre de l'énergie d'activation de nucléation vue précédemment. L'utilisation d'un "catalyseur" de nucléation (particules, parois,…) permet d'abaisser cette barrière énergétique.

1.3.2 Nucléation primaire hétérogène

La nucléation primaire hétérogène implique l'intervention d'un substrat pour générer un nouveau germe. Ce substrat peut être une paroi du cristallisoir, une poussière, ou même un cristal (d'une autre phase). Le rayon du germe critique sera identique à celui de la nucléation homogène, cependant le germe sera réduit à une calotte sphérique d'autant plus petite que le cristal a d'affinité avec le substrat comme le montre la Figure 8. Le nombre de molécules de soluté nécessaires pour atteindre ce rayon critique sera alors moindre que dans le cas de la nucléation homogène et la barrière énergétique abaissée.

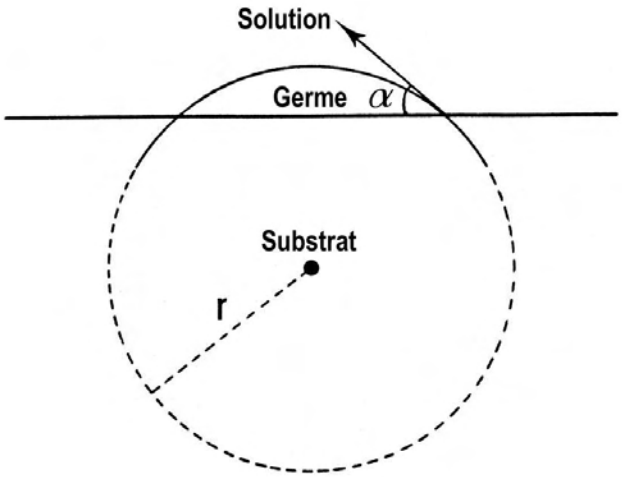


Figure 8 : Représentation d'un germe de nucléation hétérogène sur un substrat, d'après Boistelle[3]

L'énergie critique de nucléation hétérogène ΔG^*_{het} dépend alors de l'angle de contact α que fait la calotte sphérique avec le support. On peut l'écrire sous la forme[3] :

$$\Delta G^*_{het} = \Delta G^* \left(\frac{1}{2} - \frac{3}{4}\cos\alpha + \frac{1}{4}\cos^3\alpha \right)$$

Équation 8

On voit ici l'importance que revêt l'affinité entre le support et le germe. De cette affinité dépendra la valeur de l'angle α comme décrit sur la Figure 9.

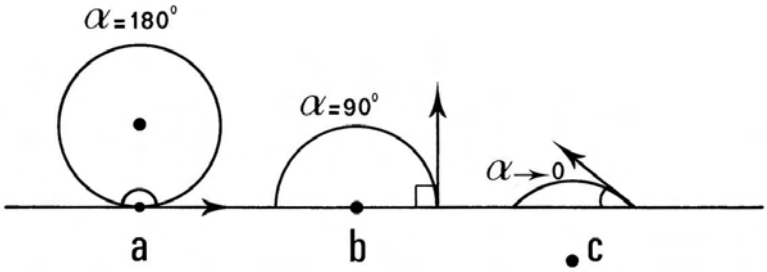


Figure 9 : angle de contact entre un germe et son substrat pour différentes affinités germe/substrat d'après Boistelle[3].

S'il n'existe aucune affinité entre le substrat et le nucléus, l'angle α entre le germe et le substrat sera de 180° et $\Delta G^*_{het} = \Delta G^*$, comme dans le cas de la nucléation homogène. Le germe étant juste posé à la surface du substrat.

Pour une interaction germe/substrat plus importante l'angle α peut prendre la valeur 90°. Le germe critique hétérogène contient alors moitié moins de molécules que le germe critique homogène, ΔG^*_{het} vaut $\Delta G^*/2$.

Si cette affinité germe substrat est très grande, alors α est très petit et ΔG^*_{het} devient très faible. C'est par exemple le cas lors de l'entartrage d'une canalisation industrielle. Si on considère une affinité parfaite du germe pour le substrat (α étant alors nul) la plus petite calotte du germe a au minimum la hauteur d'une molécule. Le germe peut alors être assimilé à un disque dont la hauteur vaut un diamètre moléculaire d_m comme le montre la Figure 10. On parle dans ce cas de germination bidimensionnelle.

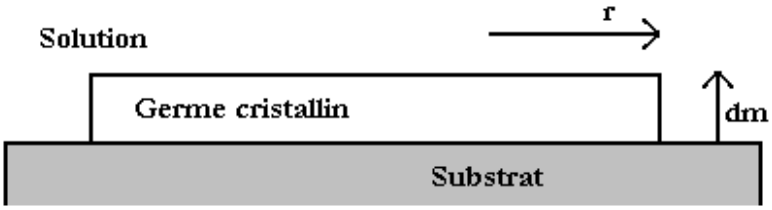


Figure 10 : Nucléation d'un germe bidimensionnel sur un substrat[15]

Dans tous les cas de figure, le support catalyse la nucléation, en abaissant la barrière énergétique mise en jeu. Cet effet explique la prédominance, observée expérimentalement, de la nucléation hétérogène sur la nucléation homogène pour des solutions insuffisamment purifiées[16]. Si l'on souhaite diminuer l'influence de la nucléation hétérogène sur une expérience, on peut filtrer la solution pour s'affranchir des particules en suspension et chercher à réduire les interactions entre le soluté et les parois du cristallisoir.

En comparaison par rapport à la nucléation homogène, il est clair que la zone métastable de la nucléation hétérogène sera réduite sur le diagramme de phase, comme le montre la Figure 11.

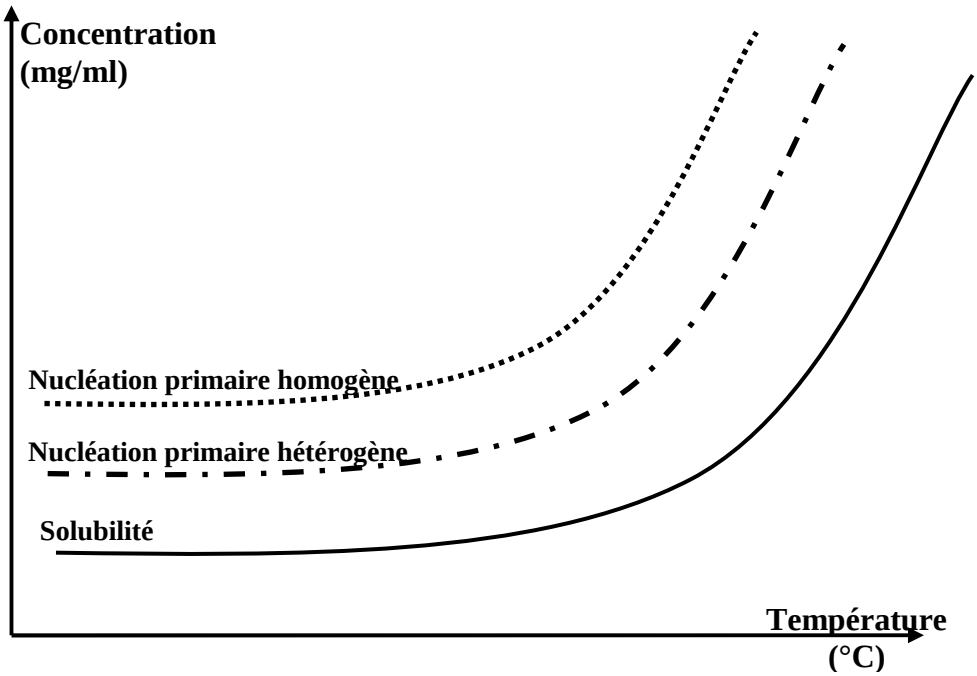


Figure 11 : Limite de zone métastable des différents mécanismes de nucléation[17]

Dans une vision plus globale de l'ensemble des phénomènes de nucléation, Liu propose d'harmoniser les différents phénomènes de nucléation[18]. Qu'il s'agisse de la nucléation bidimensionnelle lors de la croissance des cristaux, de nucléation hétérogène ou homogène, tous ces phénomènes sont gouvernés par une fréquence de nucléation J dépendante d'un facteur f suivant l'Équation 9.

$$J = K_0 \exp\left(- f \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3 \ln^2 \beta} \right)$$

Équation 9

Ce facteur f est un paramètre décrivant l'influence de tout substrat étranger sur la nucléation. Ce paramètre tient compte non seulement de l'interaction germe/substrat, mais aussi de la taille des particules et de leur structure, comme le résume la Figure 12.

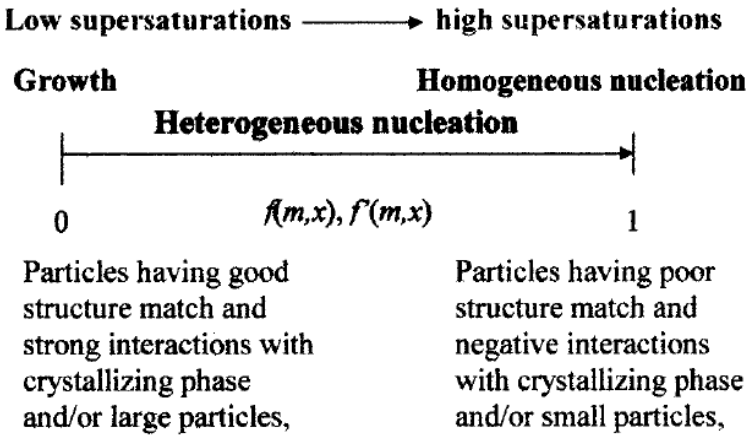


Figure 12 : Évolution du paramètre *f*, d'après Liu[18]

Il y aurait donc une continuité entre les mécanismes de croissance et de nucléation homogène passant par tous les intermédiaires possibles de la nucléation hétérogène. Ceci explique la prédominance constatée expérimentalement de la nucléation hétérogène qui peut se produire sur une très vaste gamme de sursaturation.

La nucléation fait intervenir de nombreux paramètres ce qui implique de réaliser un grand nombre d'expériences. De plus, le caractère aléatoire de la nucléation nécessite de multiplier les expériences afin d'avoir des données statistiques. C'est pourquoi nous avons cherché à réaliser le plus grand nombre d'expériences possibles en réduisant les volumes mis en jeu dans chaque expérience. Pour cela, notre idée est de développer un outil polyvalent et simple d'utilisation à partir de techniques de microfluidiques permettant de réaliser ces expériences sur des volumes de l'ordre du nanolitre, ou de la centaine de nanolitres. De plus, comme l'ont montré Grossier et al.[19], les volumes supérieurs au nanolitre peuvent être considérés comme des réservoirs infinis du point de vu de la nucléation. Cela signifie que tout au long du processus de nucléation la concentration (et donc la sursaturation) reste constante.

2 Microfluidique

La microfluidique fait référence aux techniques permettant la manipulation de fluides à l'échelle microscopique. Il s'agit la plupart du temps de canaux microscopiques (1 à 1000 µm) permettant la circulation de fluide dans des systèmes appelés puces microfluidiques. Les volumes mis en jeu sont alors compris entre le femtolitre (10^{-15} L soit 1 μm^3) et le microlitre (10^{-6} L soit 1 mm^3)[20].

La réduction des volumes mis en jeu et la forte intégration de systèmes de contrôle des écoulements dans les systèmes microfluidiques donnent accès à un nombre important d'expériences en parallèle. Cette parallélisation des expériences permet soit de réaliser une approche statistique d'un phénomène aléatoire soit de cribler un grand nombre d'expériences différentes.

De plus, en utilisant de faibles volumes de produits chimiques cette technologie permet de réduire les coûts, mais aussi la pollution engendrée par l'utilisation de ces produits (par exemple pour des produits radioactifs). Ces intérêts multiples expliquent le développement rapide que connaît le secteur des systèmes microfluidiques comme l'atteste la Figure 13.

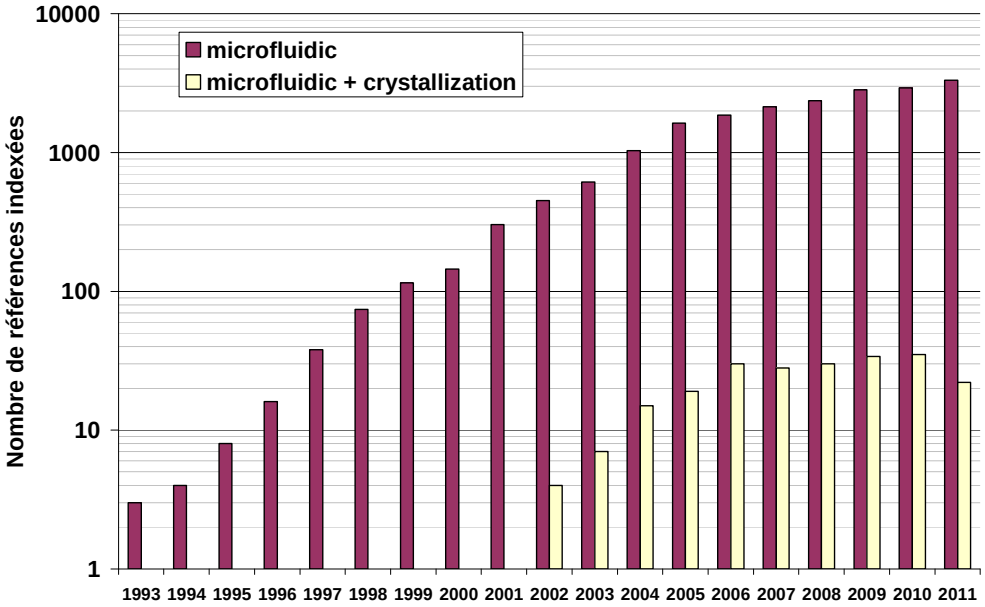


Figure 13 : Évolution du nombre de références indexées dans la base de données de SciVerse concernant la microfluidique (échelle logarithmique). Recherche effectuée sur les mots-clefs : microfluidic et microfluidic + crystallization avec l'outil Scopus le 28 mars 2012.

Dans cette partie, nous chercherons à montrer ce que la microfluidique peut apporter à l'étude de la cristallisation. Nous commencerons tout d'abord par un tour d'horizon de différents systèmes microfluidiques utilisés pour l'étude de la cristallisation. Puis nous nous pencherons sur les méthodes et les matériaux utilisés lors de la conception de ces systèmes microfluidiques, afin de voir lesquels sont les plus susceptibles d'être adaptés à l'étude de la nucléation de principes actifs pharmaceutiques.

2.1 Systèmes microfluidiques de cristallisation.

Les systèmes microfluidiques dédiés à la cristallisation sont basés sur la génération de nanocristallisoirs (qui peuvent être des puits ou des gouttes) isolés les uns des autres dans lesquels la cristallisation peut avoir lieu, et dont le volume est inférieur au microlitre.

L'utilisation de petits volumes pour l'étude de la cinétique de cristallisation n'est pas récente. On trouve en effet une expérience de cristallisation de nitrate de potassium dans des gouttes de 30nL à 30µL en 1959[21]. Cependant, les développements récents de la microfluidique notamment dans le domaine de la biologie ont complètement modifié les possibilités offertes par les systèmes microfluidiques.

Nous nous attacherons ici à décrire deux axes de développement des systèmes microfluidiques répondant à des objectifs différents :

- soit la production de cristaux adaptés à la résolution structurale par diffraction des rayons X ce qui nécessite de cribler de nombreuses conditions de cristallisation afin d'obtenir des monocristaux adaptés. Les solutés concernés par ces études sont surtout des protéines.
- soit des études plus fondamentales sur la caractérisation et la quantification statistique des différents paramètres de cristallisation (courbes de solubilité, polymorphisme, fréquence de nucléation…). L'introduction de systèmes permettant la caractérisation in situ de phase lors du criblage sera également évoquée.

2.1.1 Systèmes microfluidiques pour la cristallisation des protéines

Depuis la fin des travaux visant au décodage du génome humain les biologistes se retrouvent avec un nombre très conséquent de gènes dont ils ne connaissent pas la fonction. Ces différents gènes permettent le plus souvent la production d'une protéine remplissant un rôle spécifique. Pour cela, chaque protéine possède une structure tridimensionnelle qui est propre à la fonction dont elle a la charge. Désormais, la tâche des biologistes est donc de synthétiser ces protéines et de déterminer leur fonction en s'appuyant sur leur structure. Par analogie avec la génomique on désigne ce thème de recherche sous le nom de protéomique.

Pour pouvoir déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine qui est une molécule très complexe, les méthodes de simulation informatique sont pour l'heure insuffisantes. La technique permettant la détermination la plus précise de cette structure reste l'analyse des clichés de diffraction des rayons X réalisés sur des monocristaux. Cependant, cette méthode d'analyse ne peut être réalisée que sur des cristaux de protéine ayant une taille et une qualité suffisante pour obtenir des clichés de bonne qualité. C'est pourquoi de nombreuses études ont été lancées afin d'obtenir de la manière la plus rapide qui soit des cristaux de qualité à partir de n'importe quelle protéine.

Les protéines sont des molécules complexes comportant des charges positives et négatives. De ce fait, leur solubilité est particulièrement sensible au pH, à la force ionique et à la nature des ions de la solution. Pour cristalliser ces protéines il existe donc une large gamme de conditions de cristallisation possibles, chaque condition résultant du mélange de la solution de protéine avec un précipitant différent. La méthode retenue pour obtenir des cristaux à partir

de n'importe quelle protéine est celle du criblage d'un maximum de précipitants différents (pH, force ionique, nature des ions). Afin d'automatiser cette tâche longue et fastidieuse de tests multiples, des robots de criblage sont de plus en plus utilisés. Mais malgré l'utilisation de robots travaillant sur des volumes de l'ordre de la centaine de nanolitres, la quantité de protéine nécessaire à la réalisation de l'ensemble du criblage reste trop élevée au regard de la difficulté de produire de telles protéines.

Dans ce contexte, les systèmes microfluidiques apportent l'avantage de réduire le volume de protéine jusqu'au nL. Afin de venir en aide aux biologistes, des physico-chimistes ont cherché à remplacer les robots de manipulation d'échantillons par des systèmes microfluidiques. Ces robots étant très complexes et ayant un prix très élevé les systèmes microfluidiques développés n'avaient presque aucune limite en termes de coût ou de complexité. Il s'agissait de puces microfluidiques en PDMS (un polymère silicone) intégrant un très grand nombre de fonctions (valve intégrée, pompe intégrée, mélangeur) et nécessitant un appareillage extérieur complexe (arrivée multiple de gaz sous pression entre autres). La production de ces puces repose sur une technique d'empilement de couches successives permettant la circulation de la solution de protéine et des précipitants dans des canaux micrométriques distincts. Cette circulation de fluide est contrôlée par des circuits d'air comprimé permettant d'actionner des vannes et pompes intégrées dans la puce.

L'un des exemples de puce microfluidique de ce type est la puce développée par R. Quake et al.[22]. Cette puce permet de remplir six réservoirs (24nL en moyenne) répartis en paire de part et d'autre d'une vanne centrale (Figure 14). Durant la première phase la vanne centrale est fermée et les réservoirs d'un côté de la vanne sont remplis avec la solution de protéine tandis que ceux de l'autre côté sont remplis avec le précipitant. Durant une seconde phase la vanne centrale est ouverte pour permettre au précipitant de diffuser dans la solution de protéine. Sur une puce de quelques centimètres carrés 48 précipitants différents peuvent être testés simultanément et à trois concentrations différentes. Ce système est aujourd'hui commercialisé pour le criblage de condition de cristallisation à un prix de plusieurs centaines de milliers d'euros, un prix en accord avec la complexité de la technologie utilisée.

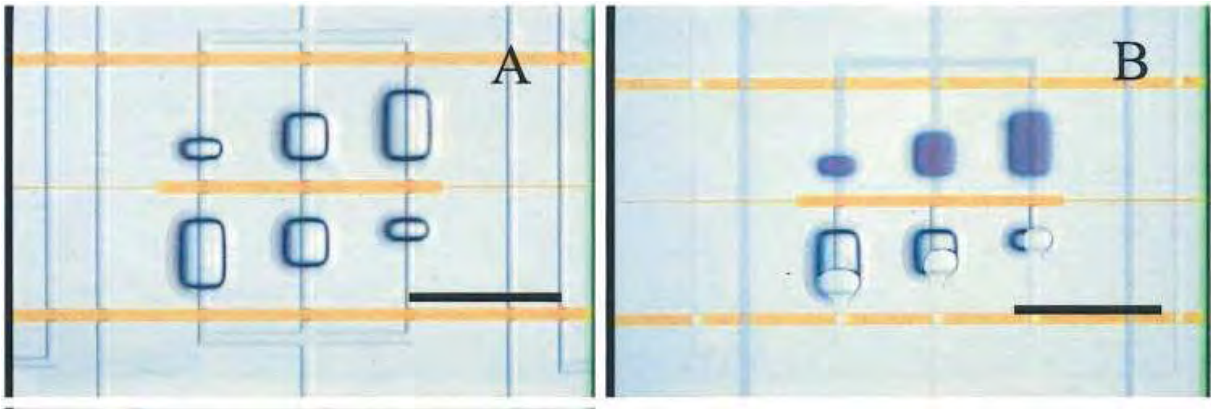


Figure 14 : (A) Photomicrographie montrant les 6 réservoirs vides disposés de part et d'autre de la valve d'intercommunication (orange) (B) Remplissage des réservoirs, les réservoirs de précipitant (en bleu) sont déjà remplis.

Cependant si la microfluidique permet de réaliser des puces très complexes on peut se demander si cette complexité est bien nécessaire. En effet, des systèmes moins complexes basés sur la formation de gouttes ont également été développés. Chaque goutte étant un mini cristallisoir au sein duquel la nucléation peut avoir lieu. L'apport de la microfluidique pour la fabrication de goutte est particulièrement appréciable. En effet, il suffit de faire se croiser un

flux de solution aqueuse avec un flux d'huile ayant une affinité avec les parois supérieure à celle de la solution (huile silicone avec des parois en silicone) pour former des gouttes.

Deux géométries de canaux microfluidiques peuvent être utilisées, une géométrie en croix pour la technique de flow focusing et une géométrie en T pour la technique de cross flowing comme le montre la Figure 15. Ces géométries permettent non seulement de produire des gouttes en continu, mais également de contrôler précisément leur taille.

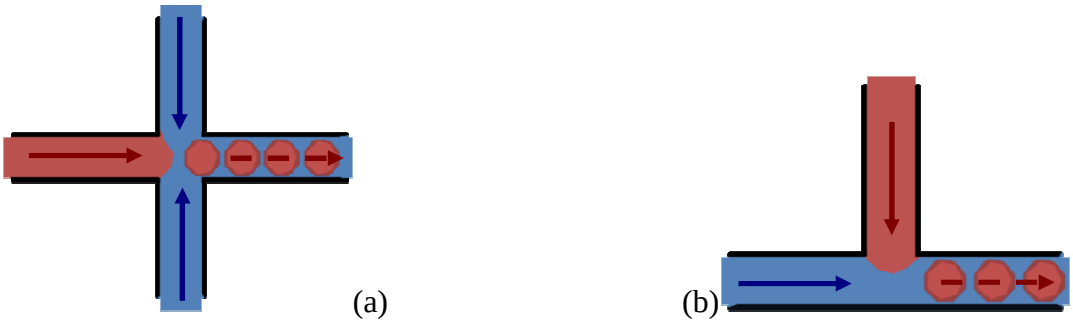


Figure 15 : Schéma de formation de gouttes en microfluidique, formation par flow focusing (a) et formation par cross flowing (b)

Cependant les gouttes étant produites les unes derrière les autres il devient presque impossible de distinguer une goutte d'une autre. Ce qui empêche bien souvent l'utilisation de précipitants différents pour une même série de gouttes et réduit donc les possibilités de criblage de conditions de cristallisation. Une solution à ce problème a été apportée par l'équipe de S. Fraden qui propose de rajouter des tensioactifs aux gouttes formées puis de les stocker dans des puits disposés le long d'un canal. Chaque goutte circule alors le long du canal sans pénétrer dans les puits contenant déjà une goutte (répulsion favorisée par les tensioactifs) mais pouvant remplir un puits vide comme le montre la Figure 16[23].

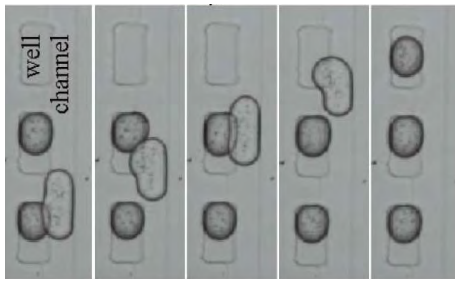


Figure 16 : La goutte claire circule dans le canal jusqu'à rencontrer un puits vide dans lequel elle pénètre

Sous cette couche microfluidique un second montage microfluidique permet de faire circuler une solution de précipitant dont la concentration varie selon un gradient déterminé. Par osmose la concentration dans les gouttes stockées va s'équilibrer avec le gradient de précipitant sous-jacent produisant un gradient de concentration dans les gouttes. L'utilisation de deux éléments Peltier disposés sous la puce permet de créer un gradient de température orthogonal au gradient de concentration[24]. Ce système finalement assez complexe permet cependant un bon criblage des paramètres concentration et température pour un précipitant donné.

Une autre solution plus simple a été présentée par l'équipe de R.F. Ismagilov. Il s'agit d'introduire séparément dans la puce microfluidique les trois composants nécessaires à la cristallisation des protéines : tampons, précipitant et solution de protéine[25]. Cela permet de créer à façon des gouttes contenant différentes concentrations de précipitant et différentes

concentrations de protéine en utilisant les débits relatifs des trois constituants. La Figure 17 a montre un schéma où les trois constituants (précipitant en haut à gauche, tampon en haut au centre et protéine en haut à droite) peuvent se mélanger en diverses proportions, dépendant des débits relatifs d'injection des composants, puis former des gouttes par l'injection en bas à gauche d'une huile adaptée. De plus le flux de précipitant utilisé sur ce schéma n'est pas formé d'un seul précipitant mais de plusieurs larges gouttes de précipitant séparées par des gouttes de séparation (spacer plug). Cela permet de tester rapidement différents précipitants au cours d'une même expérience et en faisant varier les débits d'injection de tester différentes concentrations pour chaque précipitant. Cependant, il n'est toujours pas possible d'identifier les gouttes afin de connaitre la concentration dans chacune d'elle.

La subtilité introduite par l'équipe de R.F. Ismagilov est de coupler la variation du flux de précipitant à la variation du flux d'huile permettant la formation de gouttes comme le montre les flèches noires de la Figure 17 b. En faisant varier le flux d'huile, la taille des gouttes formées varie ce qui permet d'identifier la concentration en précipitant comme cela est montré sur la Figure 17 c et d. Grâce à ce système microfluidique il est possible de générer rapidement un grand nombre de gouttes de concentrations différentes, mettant en jeux des précipitants différents. De plus, ce système est relativement simple à mettre en œuvre. Le stockage des gouttes après leur formation se fait dans un capillaire en Téflon transparent de faible diamètre interne.

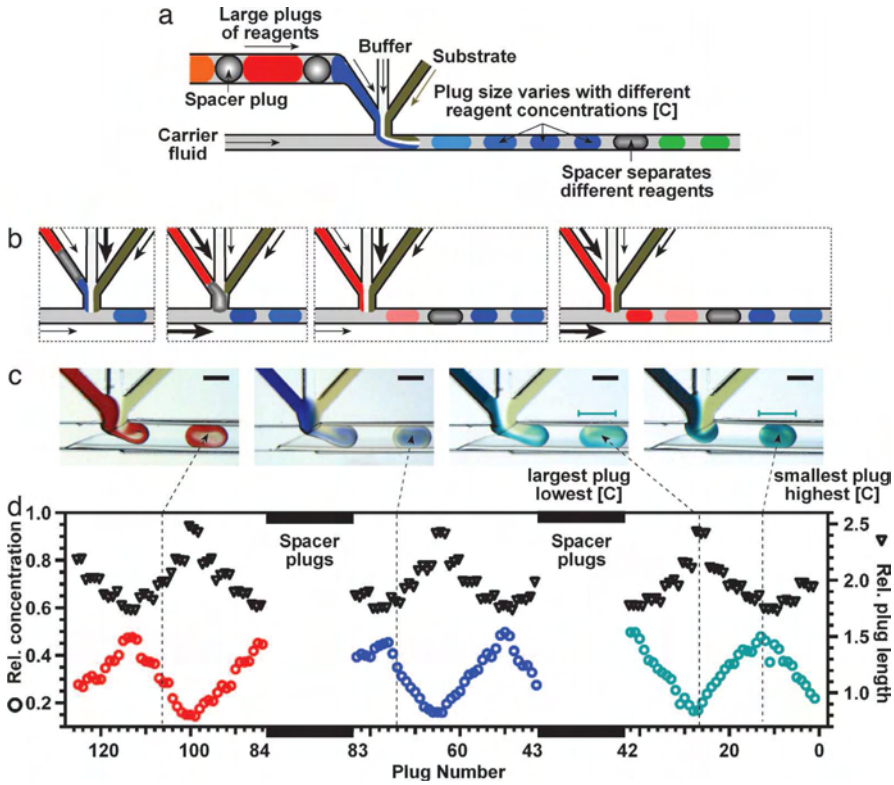


Figure 17 : a) De larges gouttes de précipitant séparées par des gouttes de séparation sont introduites et mélangées avec un tampon et une solution de protéine, puis entrainées par un flux d'huile afin de former des gouttes microfluidiques. b) Les débits relatifs des différents composants (précipitant, tampon, solution de protéine et huile) peuvent varier. On maintient le débit de solution de protéine constant. Le débit de tampon est inversement proportionnel au débit de précipitant qui est lui-même proportionnel au débit d'huile. c) et d)Le débit d'huile étant proportionnel au débit de précipitant on peut établir une relation entre la taille des gouttes (triangles noirs sur l'axe de droite) et leur concentration (cercles de couleur sur l'axe de gauche), plus les gouttes sont petites plus elles sont concentrées en précipitant. D'après Ismagilov[25]

Cette méthode de stockage de grande quantité de gouttes dans des capillaires en Téflon peut être problématique pour récupérer le ou les cristaux de protéines ainsi formés et réaliser les clichés de diffraction des rayons X. Par exemple, si la goutte contenant le cristal se trouve en plein milieu du tube : comment faire pour récupérer le cristal ? La méthode la plus simple serait de réaliser la diffraction des rayons X sur le cristal encore à l'intérieur de sa goutte dans le tube. En effet, les premiers essais réalisés avec cette technique directe de diffraction des rayons X montrent qu'il est possible d'obtenir des clichés de diffraction d'une qualité suffisante pour retrouver la structure d'une protéine[26].

Cette première approche de la microfluidique utilisée pour la cristallisation des protéines permet de voir deux philosophies de développement différentes. La première cherche à mettre au point des systèmes très complexes intégrants de nombreux microsystèmes afin de réaliser à l'échelle micrométrique les essais réalisés à plus grande échelle. La seconde philosophie cherche à exploiter au maximum les avantages de la microfluidique pour réaliser un système simple, mais permettant d'obtenir des cristaux de protéine et les clichés de diffraction afin d'en résoudre la structure.

2.1.2 Systèmes microfluidiques pour l'étude de la cristallisation

L'étude fondamentale de la cristallisation ne se contente pas d'obtenir des cristaux, mais elle cherche aussi à comprendre le rôle que jouent différents paramètres sur l'apparition de ces cristaux. Certains paramètres comme la solubilité sont facilement accessible à la mesure, mais d'autre comme la limite de stabilité d'une solution sursaturée ou la fréquence de nucléation le sont moins. La microfluidique, en permettant de multiplier les expériences à moindre coût (faible consommation de produit), est une piste intéressante pour améliorer les techniques de mesure existantes pour les différents paramètres de la cristallisation.

L'essentiel des systèmes microfluidiques utilisés pour les études fondamentales de la cristallisation repose sur le même principe que les systèmes en gouttes décrits précédemment pour la cristallisation des protéines. Cependant, d'autres idées innovantes comme celle du microévaporateur développé par J. Leng[27] (2006) permettent des expériences originales. Le microévaporateur est composé d'un canal transparent en cul-de-sac relié à un réservoir et recouvert d'une membrane. Le canal est rempli de solution puis de l'air sec est envoyé de l'autre côté de la membrane. Le solvant contenu dans le canal s'évapore, ce qui crée une dépression qui aspire la solution depuis le réservoir. Le soluté se retrouve alors concentré à l'extrémité du canal ce qui permet d'obtenir une sursaturation importante et de déclencher la nucléation. La Figure 18 résume ce principe qui permet d'obtenir des temps de nucléation et des vitesses de croissance au sein d'un même système microfluidique.

Figure 18 : Schéma de principe du microévaporateur, d'après Leng[27]

Cependant, la génération de gouttes dans des systèmes microfluidiques présente des avantages indéniables pour l'étude fondamentale de la cristallisation. Tout d'abord, la génération de gouttes ne nécessite pas l'ajout de tensioactif pouvant perturber la cristallisation. De plus, les gouttes sont toutes de la même taille, car générées par la même géométrie de canaux (flow focusing ou cross flowing). La géométrie des canaux très simple, sans superposition de canaux microfluidiques rend la fabrication du système microfluidique aisée. Enfin, on peut atteindre des vitesses de génération de l'ordre de plusieurs gouttes par seconde, c'est donc une technique à haut débit. Pour toutes ces raisons, la génération de gouttes est actuellement la technique microfluidique la plus utilisée pour l'étude de la cristallisation.

Les gouttes constituent autant de microcristallisoirs qui vont permettre de mesurer les paramètres de cristallisation. Le premier paramètre de cristallisation à mesurer, et cela, quelle que soit l'échelle, reste toujours la solubilité en fonction de la température. Une méthode de mesure directe et très visuelle permet de déterminer la courbe de solubilité grâce à une puce microfluidique assez peu complexe mise au point par Laval et al.[28] (2007). Cette puce est simplement constituée d'un générateur de gouttes et de canaux parallèles. Chaque canal est rempli à son tour avec des gouttes dont la concentration est diminuée d'un canal à l'autre. On obtient alors un gradient discret de concentration. Puis on abaisse la température de manière

importante afin que toutes les gouttes cristallisent. Les canaux sont ensuite placés entre deux éléments Peltier de température différente afin de générer un gradient de température orthogonal au gradient de concentration. La lecture de la solubilité se fait en traçant la courbe passant entre la dernière goutte contenant un cristal et la première goutte n'en contenant plus comme le montre la Figure 19[28].

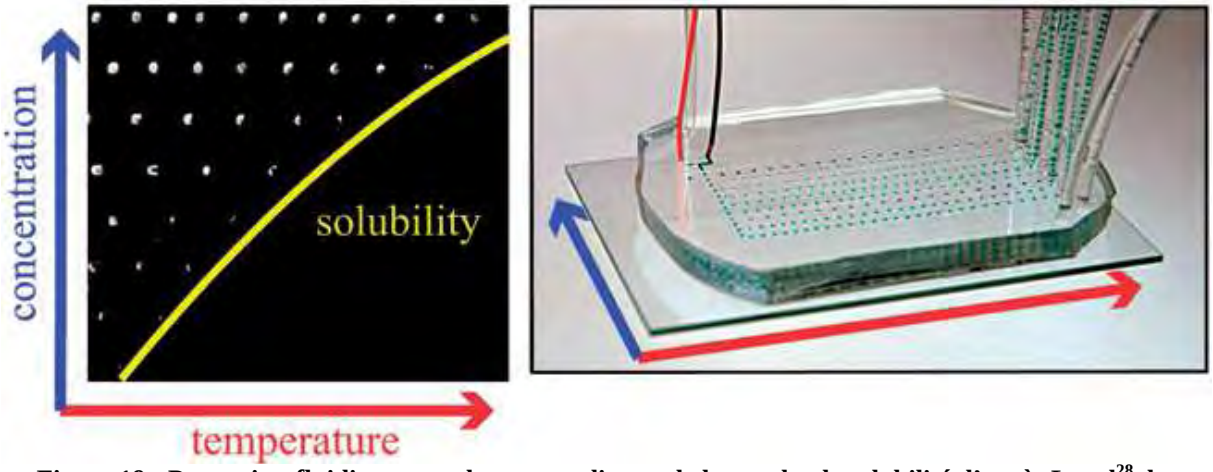


Figure 19 : Puce microfluidique pour la mesure directe de la courbe de solubilité d'après Laval[28], les cristaux apparaissent sous forme de points lumineux grâce à leur biréfringence.

Cette technique ne permettant pas de distinguer la solubilité de différents polymorphes, une autre méthode et une autre puce sont nécessaires. Par exemple, on peut remplir un capillaire unique avec un grand nombre de gouttes de même concentration. Si ce nombre est suffisamment grand, certaines gouttes cristalliseront sous une forme polymorphique et d'autres sous une autre forme. De plus, les risques de nucléation concomitante des deux polymorphes dans une même goutte seront d'autant plus faibles que le volume de la goutte sera réduit. L'observation par microscopie optique des gouttes permet de différencier des polymorphes dont le faciès est différent. De plus sur une puce dont on fait varier la température il est possible de visualiser la température de dissolution des cristaux, et ce, pour chaque goutte et donc pour chaque polymorphe.

Cette méthode a été utilisée par Laval et al. pour déterminer les courbes de solubilité de deux polymorphes du nitrate de potassium[29]. Pour cela une puce microfluidique très simple a été utilisée. Elle est constituée d'un générateur de gouttes avec une géométrie de type flow focusing, les gouttes circulent ensuite dans un long canal microfluidique en serpentin. Une fois le serpentin rempli de gouttes, on coupe les pompes permettant la génération des gouttes. On dispose alors d'une centaine de gouttes toutes identiques, de concentration C_1 que l'on fait nucléer par refroidissement. Puis la puce est réchauffée par palier de 1 degré Celsius avec prise de vue des gouttes. On observe alors deux températures caractéristiques. Au-dessus de la première température T_3, la majorité des cristaux contenus dans les gouttes se sont dissout. Mais il faut attendre de dépasser la seconde température T_2 (plusieurs degrés au dessus) pour que les derniers cristaux puissent enfin être dissout. La Figure 20 montre comment ces deux températures peuvent être mises en lumière. La température T_3 correspond à la température d'équilibre d'un polymorphe tandis que la température T_2 correspond à la température d'équilibre d'un second polymorphe et tous les deux pour la même concentration C_1. Il suffit de répéter l'expérience ci-dessus à plusieurs concentrations pour obtenir les courbes de solubilité complète des deux polymorphes.

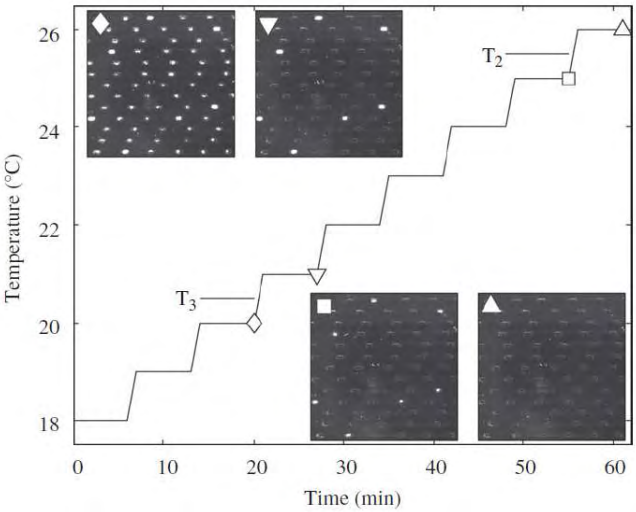


Figure 20 : Visualisation des deux températures de dissolution des cristaux au cours du réchauffement par palier d'une puce microfluidique d'après Laval P.[29]

Les technologies microfluidiques apportent des simplifications dans la détermination de la courbe de solubilité, gain de temps entre autres, en tirant parti de la réduction de volume et donc du grand nombre d'expériences en parallèle. Cependant, d'autres mesures comme la mesure du temps de nucléation utilisent quant à elles une propriété directement liée à la microfluidique, la mononucléation. En effet, grâce au faible volume des gouttes la nucléation n'a lieu qu'une seule fois par goutte dans la plupart des cas. Le cristal ainsi formé consommant rapidement la sursaturation de la goutte la sursaturation devient trop faible pour permettre un second événement de nucléation[30]. On peut donc assimiler le nombre de gouttes contenant un cristal au nombre d'événements de nucléation.

Plusieurs systèmes microfluidiques permettant de mesurer des fréquences de nucléation sont basés sur la mesure du nombre de gouttes ayant cristallisé. Il s'agit ici de produire des gouttes à une température supérieure à la solubilité puis de faire circuler ces gouttes dans un canal dont la température est inférieure à la solubilité (voir Figure 21). La vitesse des gouttes étant constante il y a équivalence entre le temps de séjour dans la zone froide et la position de la goutte dans le canal. En observant différents points du canal et en obtenant pour chaque point le nombre de gouttes ayant cristallisé on peut calculer la fréquence de nucléation[30]. Cette méthode dite de la cristallisation en vol a été développée par différents laboratoires avec des objectifs différents.

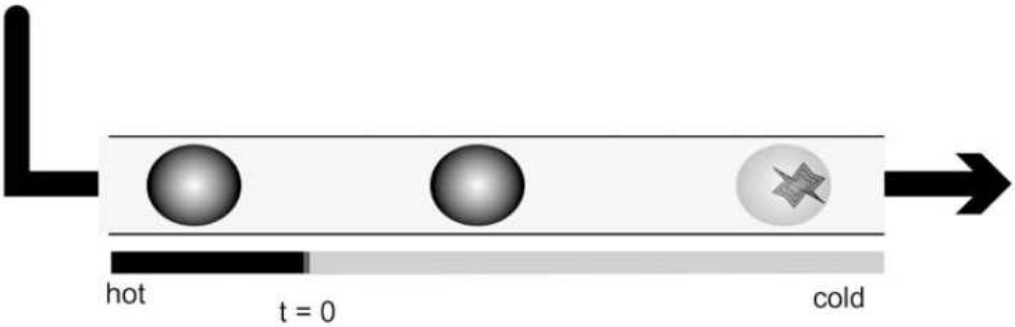


Figure 21 : Schéma de principe de la mesure de la fréquence de nucléation[30]

En 2006-2007 Laval P. et al ont proposé une puce microfluidique pour l'étude de la cristallisation du nitrate de potassium dans l'eau[31]. La puce comporte les deux parties maintenues à deux températures différentes mentionnées ci-dessus sur un même support (Figure 22). La puce est observée sous un microscope optique afin de déterminer la vitesse des gouttes et donc le temps de séjour en différents points du canal. Ensuite une seconde observation est faite sous polariseur croisé pour détecter les cristaux de nitrate de potassium par leur propriété de biréfringence. La fraction des gouttes ne contenant pas de cristaux décroit au cours du temps, au fur et à mesure que des cristaux apparaissent.

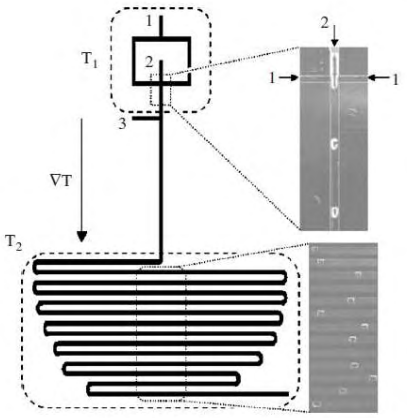


Figure 22 : Schéma de la puce microfluidique avec la zone chaude T1 et la zone froide T2[31]

Un autre système microfluidique encore plus simple, mais toujours basé sur le même principe a été conçu par Dombrovski et al. pour étudier la cristallisation du α-lactose monohydraté[32]. Ce qui est particulièrement original dans ce système est qu'il ne s'agit pas d'une puce microfluidique classique, mais de matériel initialement utilisé pour la chromatographie liquide. Le système de génération de gouttes est une simple jonction en T de 150µm de diamètre et le canal dans lequel circulent les gouttes est un tube en Téflon du même diamètre. Le tube est directement plongé dans un bain thermostaté pour en contrôler la température. L'observation se fait grâce à la transparence du tube qui permet l'observation directe des gouttes par microscopie optique. Ce système permet d'étudier très simplement la cristallisation en microfluidique sans nécessiter l'usage d'une puce microfluidique.

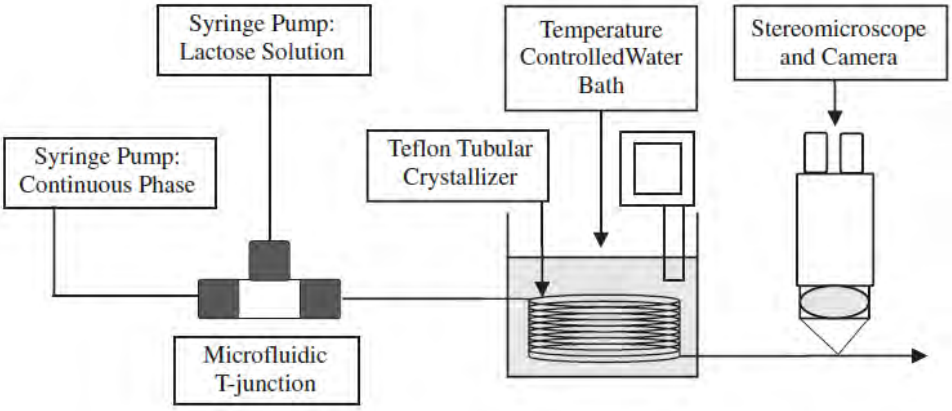


Figure 23 : Schéma du montage microfluidique d'après Dombrovski[32]

Enfin, un autre système se rapproche de nos objectifs puisqu'il s'agit d'un système microfluidique dédié à la cristallisation de molécules organiques dans des solvants organique[33] développé par Teychené et al. Cependant, les polymères comme le PDMS n'étant pas compatibles avec les solvants organiques, les auteurs ont été contraints de fabriquer leur puce microfluidique en verre. Or le verre présente le défaut d'être hydrophile ce qui impose que la phase continue pour la formation de gouttes soit de l'eau, alors que certains solvants organiques utilisés pour la cristallisation de principe actif pharmaceutique sont miscibles dans l'eau. Ainsi en cas de miscibilité partielle, le solvant va diffuser dans l'eau, diminuant la taille de la goutte. Si la miscibilité est totale, la formation de goutte deviendra impossible. Cette puce microfluidique permet donc la détermination de la fréquence de nucléation dans les solvants organiques non miscibles avec l'eau, de plus l'utilisation du verre comme matériau rend sa fabrication onéreuse et complexe.

2.2 Fabrication de systèmes microfluidiques

La fabrication des systèmes microfluidiques dépend principalement de deux facteurs qui sont la taille des canaux microfluidiques et la nature du matériau dans lequel ces canaux sont réalisés. Pour l'étude de la cristallisation, nous avons vu qu'il était intéressant de manipuler des volumes de l'ordre du nanolitre au microlitre, soit des canaux microfluidiques de 100 µm à 1000 µm de diamètre. La fabrication de canaux de plus petite taille est bien sûr possible, mais nécessite des "subtilités de fabrication" supplémentaires dont nous ne parlerons pas ici.

Le choix du matériau va dépendre de la nature des solutions qui circuleront dans les canaux, en effet, certains polymères ne supportant pas certains solvants. Nous nous intéresserons à quatre matériaux différents, le verre, le PDMS (Polydimethylsiloxane), le Téflon (THV ou PFA) et le PEEK (Polyether ether ketone). Ces quatre matériaux permettent la réalisation de systèmes microfluidiques par des méthodes de fabrication bien différentes.

2.2.1 Systèmes microfluidiques en verre

Le verre est le matériau par excellence du chimiste, car il est peu réactif chimiquement et parfaitement imperméable au liquide et au gaz. Cependant, c'est un matériau très dur et cassant, et de ce fait difficile à travailler. De plus, il présente des propriétés hydrophiles, ce qui peut être gênant pour créer des gouttes d'eau dans de l'huile. En effet, les gouttes d'eau auront tendance à coller aux parois hydrophiles des canaux microfluidiques. Il existe toutefois des méthodes afin de traiter la surface du verre pour le rendre hydrophobe.

Comme cela vient d'être mentionné, le verre est un matériau très dur et peu réactif chimiquement. On se rend alors rapidement compte que la fabrication de microcanaux dans un tel matériau n'est pas chose aisée. La technique de microfabrication utilisée est celle de la gravure en solution ou wet etching. La Figure 24 présente les différentes étapes de la gravure en solution.

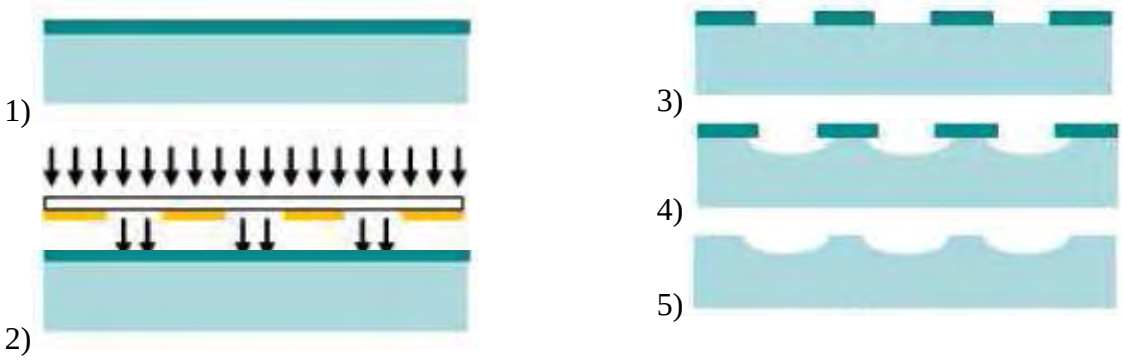


Figure 24 : Les différentes étapes de la gravure en solution de microcanaux sur du verre.

La première étape consiste à enduire la surface du verre d'une résine photosensible (1). La résine est ensuite exposée à un rayonnement UV (2) à travers un masque sur lequel est tracé le design des canaux de la puce. La résine exposée aux UV est ensuite enlevée par un solvant approprié (3). La surface de la puce est alors plongée dans une solution d'acide fluorhydrique qui n'attaquera pas la résine, mais uniquement le verre. La durée de ce bain

déterminera la profondeur des canaux obtenus (4). Après retrait de la résine, on obtient des canaux gravés chimiquement dans le verre (5).

Plusieurs points sont à préciser concernant cette technique de gravure : tout d'abord, elle nécessite un grand nombre d'étapes ; de plus, elle utilise de l'acide fluorhydrique particulièrement toxique et enfin elle ne permet de réaliser que des canaux de forme arrondie. Cependant, ces canaux sont très résistants tant d'un point de vue mécanique que chimique et ils sont d'une grande transparence ce qui facilite l'observation.

Une fois les canaux gravés dans le verre il faut encore finir de les fermer. Pour cela deux solutions sont envisageables : les recouvrir avec une plaque de verre lisse ou avec une seconde plaque gravée, ce qui donnera respectivement une forme hémicirculaire ◡ ou circulaire ● . Dans le second cas, il est nécessaire de bien positionner les deux demi-canaux gravés en vis-à-vis pour former le canal circulaire. On peut utiliser pour cela une croix gravée à côté des canaux microfluidiques afin d'aligner les deux plaques. Dans tous les cas, il est nécessaire que l'une des deux plaques soit percée des différents puits d'accès permettant d'amener les solutions dans la puce microfluidique.

Il faut ensuite faire adhérer ensemble les deux plaques de verre. Pour cela on peut soit les coller avec un adhésif, soit faire chauffer le verre à 600°C afin de faire fondre l'interface entre les deux plaques de verre. L'utilisation d'adhésif permet un collage à basse température, mais la présence d'adhésif peut gêner certaines applications, car ce dernier ne résiste pas aux solvants organiques. Le collage thermique permet de s'affranchir totalement de matériaux externes, mais la température élevée peut déformer certains des canaux microfluidiques. C'est toutefois la technique qu'il faut utiliser pour ne pas avoir d'incompatibilité avec les solvants organiques.

La fabrication de puces en verre est complexe, faisant intervenir des réactifs particulièrement dangereux. C'est pourquoi le coût de fabrication d'une puce microfluidique en verre est particulièrement élevé. Malgré la grande résistance mécanique et chimique du verre, la réutilisation d'une même puce nécessite un lavage méticuleux entre chaque utilisation. Cependant, un amas de cristaux peut rester bloqué dans le canal empêchant la circulation de tout liquide, y compris d'un solvant de lavage, rendant ainsi la puce définitivement inutilisable. C'est en partie pour ces raisons que d'autres matériaux sont utilisés pour les systèmes microfluidiques dédiés à la cristallisation.

2.2.2 Systèmes microfluidiques en PDMS

L'un des matériaux les plus utilisés est le PDMS ou polydiméthylsiloxane (Sylgrad 184 Silicone Elastomere Kit, Dow Corning). Il s'agit d'un élastomère silicone assez souple. Sa nature silicone le rend compatible avec la quasi-totalité des produits biologiques. De plus, il est très transparent même à des épaisseurs importantes. Il est donc devenu le matériau de prédilection des puces microfluidiques dédiées à la biologie et donc à la cristallisation des protéines.

La fabrication d'une puce en PDMS se fait par lithographie douce et se passe en deux grandes étapes : la réalisation du moule et la production de la puce. En effet avec un même moule il est possible de réaliser plusieurs puces microfluidiques identiques. Ainsi, contrairement au verre, il n'est pas nécessaire de refaire toutes les étapes de fabrication pour chaque puce.

La première étape est la fabrication du moule. Pour cela, on réalise dans un premier temps un masque sur lequel figure le design de la puce, dont le but est d'arrêter les rayonnements UV en dehors du tracé voulu pour les canaux. Il peut alors s'agir d'un simple transparent imprimé avec une photocopieuse. Puis on enduit un wafer en silicium avec une résine photosensible (souvent une résine époxy SU-8) par enduction centrifuge ou spin coating. Cela permet de déposer une couche de résine d'épaisseur contrôlée de manière uniforme sur toute la surface du wafer. On expose ensuite le wafer enduit à un rayonnement UV à travers le masque. La résine exposée aux UV réticule tandis que celle qui n'y est pas exposée reste fluide. Enfin, on enlève la résine non réticulée avec un solvant adapté et on obtient un wafer avec à sa surface des canaux en relief en SU-8. Ce wafer constituera notre moule pour la fabrication de la puce microfluidique en PDMS.

Le PDMS est un polymère obtenu par réticulation à chaud d'un prépolymère que l'on mélange avec un durcisseur. Pour réaliser la puce microfluidique on coule le mélange prépolymère/durcisseur sur le moule puis on le chauffe à 80°C pendant une heure pour le faire réticuler. On démoule ensuite le PDMS et on obtient un bloc de PDMS avec les canaux microfluidiques en creux. On perce les entrées à l'aide d'une simple aiguille de seringue, afin de pouvoir introduire les différentes solutions dans la puce. La partie contenant les canaux est alors prête et il ne reste plus qu'à les fermer. Pour cela on enduit un second wafer en silicium de PDMS par enduction centrifuge et on le chauffe également à 80°C pendant une heure. Le wafer recouvert de PDMS et le bloc de PDMS avec les canaux microfluidiques sont introduits dans un nettoyeur plasma afin d'oxyder les deux surfaces à mettre en contact. Il suffit ensuite de poser le bloc de PDMS sur la surface du wafer pour que les deux surfaces de PDMS se collent fermant ainsi les canaux microfluidiques. Les différentes étapes de fabrication d'une puce en PDMS sont résumées sur la Figure 25[34].

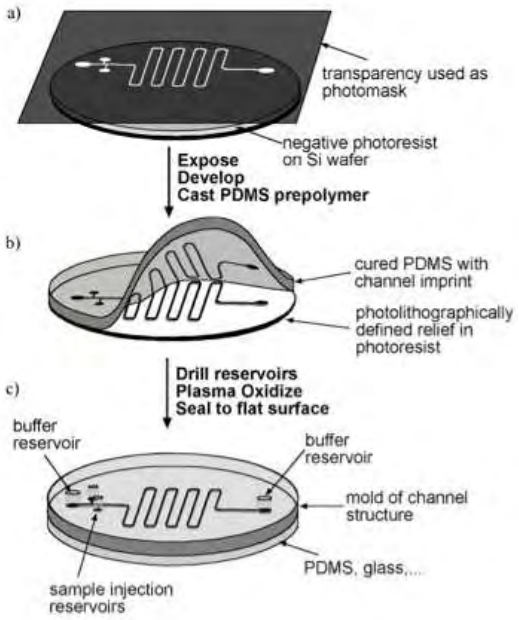


Figure 25 : Schéma reprenant les étapes de fabrication d'une puce microfluidique en PDMS d'aprés[34].

Les puces microfluidiques en PDMS sont plus simples à produire que les puces en verre. D'une part, elles ne nécessitent pas de produit d'une grande toxicité. De plus, une fois le moule réalisé toutes les opérations peuvent être réalisées dans n'importe quel laboratoire disposant d'une étuve et d'un nettoyeur plasma (moins de 7000 € d'investissement). Il est alors facile de fabriquer plusieurs puces microfluidiques durant la même journée. Ainsi, le fait que les puces puissent facilement être changées permet de limiter les risques liés à une cristallisation pouvant boucher les canaux. Par ailleurs, la nature élastique du PDMS permet de connecter très facilement des capillaires pour amener les solutions dans la puce microfluidique et cela sans risque de fuites, le PDMS servant de joint avec le capillaire. Cependant, le PDMS est incompatible chimiquement avec de nombreux solvants organiques (acétone, acétate d'éthyle…) ce qui limite son utilisation essentiellement aux solutions aqueuses.

2.2.3 Systèmes microfluidiques en THV

Pour les applications incompatibles avec l'utilisation de puce en PDMS, il existe d'autres matériaux ayant une meilleure résistance aux solvants organiques. L'équipe de J.L. Viovy de l'institut Curie a même développé une méthode de fabrication de puce en Dyneon THV, un polymère fluoré[35]. Ce polymère thermoplastique possède une bonne résistance chimique (comme les autres polymères fluorés) et un point de fusion relativement bas ce qui le rend plus simple à travailler. Il est également transparent et élastique (comme le PDMS) ce qui simplifie l'observation et la connexion entre la puce et les capillaires permettant de l'alimenter en solution.

La méthode décrite par Viovy et al.[35] pour fabriquer cette puce est dite méthode de l'emboutissage à chaud ou "hot embossing". Tout comme la méthode de lithographie douce il s'agit dans un premier temps de fabriquer une matrice avec des canaux microfluidique en relief, cette matrice peut être réalisée en PDMS suivant une technique de lithographie douce. Ensuite, une plaque de THV 500 de 5mm d'épaisseur est pressée sur le moule tout en étant chauffée à 180°C à l'aide d'une presse hydraulique chauffante. On obtient ainsi une plaque de THV 500 avec les canaux microfluidiques en creux. On perce les entrées afin de pouvoir introduire les différentes solutions dans la puce. La partie contenant les canaux est alors prête et il ne reste plus qu'à les fermer. Pour cela on enduit une seconde plaque de THV 500 avec une solution de THV 220 dans l'acétone par enduction centrifuge. On place la plaque de THV comprenant les canaux microfluidiques sur la plaque enduite et on les presse l'une contre l'autre tout en les chauffant à 120°C pour fermer les canaux.

Cette technique présente un avantage majeur par rapport à celle présentée précédemment, elle est facilement industrialisable grâce à l'emploi conjoint d'un polymère thermoplastique et d'une méthode largement utilisée dans l'industrie plastique d'emboutissage à chaud qui permet la fabrication en grande série. Le second avantage est l'utilisation d'un polymère fluoré relativement peu couteux (50$/kg) qui assure une bonne compatibilité avec de nombreux solvants organiques. Cependant, ce polymère est incompatible (en particulier au niveau de la jonction entre les deux plaques de THV) avec l'acétone, un solvant très souvent utilisé en cristallisation. De plus, cette méthode est très récente[35] (2011) et l'on manque de recul sur cette technique qui n'en reste pas moins très prometteuse.

2.2.4 Systèmes microfluidiques à base de capillaires

Les capillaires utilisés pour connecter les puces en PDMS ou en THV aux pousse seringues sont fabriqués dans des polymères bien plus résistants aux solvants que le PDMS ou le THV. Ceci a poussé certains chercheurs à focaliser leur intérêt sur les capillaires plutôt que sur les puces en elles-mêmes. En effet, on trouve des capillaires avec des diamètres internes de 25µm à plusieurs millimètres, ce qui est dans la gamme de taille des canaux microfluidiques.

Une méthode simple, utilisée pour réaliser un système microfluidique afin de générer des gouttes consiste à glisser une aiguille de seringue à travers la paroi du capillaire et à injecter la solution organique au cœur du flux d'huile, comme le montre la Figure 26. Ainsi, cette méthode a permis par exemple de réaliser des microcapsules par polymérisation interfaciale[36]. Ce système est simple et rapide à fabriquer même avec très peu de moyens. Il nécessite cependant une certaine dextérité pour placer l'aiguille ce qui peut nuire à la reproductibilité des expériences. De plus, un tel système ne permet pas de fabriquer des gouttes de dimension inférieure à la centaine de nanolitres à cause du diamètre de l'aiguille.

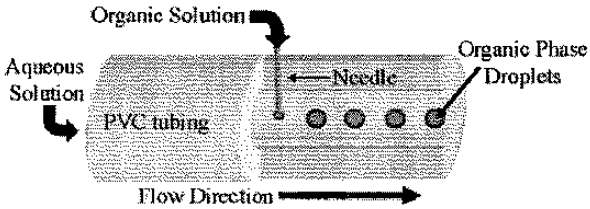


Figure 26 : Schéma d'un système de génération de gouttes dans un capillaire en PVC[36]

L'exemple ci-dessus montre qu'un système microfluidique peut être fabriqué en utilisant des éléments produits commercialement sans étape de microfabrication. Un autre exemple de fabrication de systèmes microfluidiques avec des capillaires repose sur l'emploi de jonction en T ou en croix et de systèmes de connexion faciles entre ces éléments. Il suffit de connecter ces éléments ensemble pour fabriquer un système microfluidique correspondant au design voulu. De plus, les éléments peuvent être aisément démontés pour être lavés et réutilisés un grand nombre de fois. Ces éléments issus pour la plupart des technologies HPLC sont conçus pour résister à une large gamme de solvants organiques et sont donc fabriqués dans des polymères adaptés (PEEK ou Téflon) et même parfois en verre. La multiplicité des polymères disponibles permet de fabriquer des systèmes microfluidiques dont les parois sont hydrophiles ou hydrophobes selon les besoins (goutte d'eau dans l'huile ou l'inverse). Ils sont également disponibles commercialement à des prix relativement bas. Enfin, la plupart des capillaires sont transparents à la lumière visible ce qui permet d'y observer les gouttes[37].

Cependant, la principale limite de ces systèmes est la taille minimale qui est disponible pour les canaux, on atteint ainsi des diamètres de 150µm minimum pour les jonctions en T et 25µm pour les capillaires. La production de gouttes étant gouvernée essentiellement par la géométrie de la jonction en T permettant de former cette goutte, on en déduit qu'il sera difficile de générer des gouttes de moins de 150µm de diamètre soit un volume d'environ 2nl. Enfin, la plus grande taille de canaux obtenue par cette méthode a conduit certains chercheurs à lui donner le nom de millifluidique plutôt que de microfluidique.

Chacune des techniques microfluidiques présentées ci-dessus comporte des avantages et des inconvénients. Cependant, deux techniques sortent du lot :

- la lithographie douce pour la fabrication de puce en PDMS qui a permis le développement de la recherche en microfluidique dans un grand nombre de laboratoires.
- l'utilisation de systèmes microfluidiques à base de capillaires qui permet à des non-spécialistes de microfluidique de développer rapidement des outils microfluidiques simples.

En conclusion, on voit que l'intérêt croissant porté à la microfluidique par des chercheurs issus de domaines très différents a conduit à un développement rapide des applications, mais aussi des méthodes de fabrication de systèmes microfluidiques. Ceci a permis de diminuer les coûts de production et donc d'étendre le champ des applications potentielles. Ces technologies sont cependant encore très récentes et sont donc appelées à évoluer considérablement durant les prochaines années. Enfin, il reste aux technologies microfluidiques à trouver leur place à côté des autres techniques de laboratoire.

Chapitre 2 :
Matériels et méthodes

"Ne vous reposez pas entièrement sur la théorie lorsque votre vie est en jeu."
Frank Herbert

Cette partie a pour but de décrire et d'expliquer le choix des différents matériels et méthodes utilisés afin de réaliser ce travail de thèse. Cela concerne les molécules utilisées, le matériel asservi aux systèmes microfluidiques et les méthodes de caractérisation de la cristallisation mises en œuvre. Comme cela a déjà été dit en introduction, les systèmes microfluidiques en eux-mêmes, ainsi que les méthodes mises au point au cours de ce travail, ne seront pas décrits dans cette partie, mais plutôt dans la partie dédiée à la présentation des résultats. En effet, le système et la méthode microfluidique utilisés ont évolué tout au long de ce manuscrit et leurs mises au point constituent un résultat à part entière de ce travail.

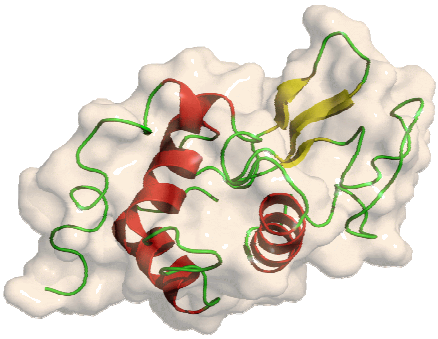
1 Principes actifs et préparation des solutions

Dans le but de développer un outil permettant la cristallisation de molécules pharmaceutiques, nous avons testé trois molécules utilisées dans l'industrie pharmaceutique : le lysozyme, la caféine et l'isonicotinamide. Pour chaque molécule, nous décrirons brièvement leurs applications médicales ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. Puis nous discuterons le choix des solvants utilisés pour la cristallisation de ces molécules. Enfin, nous terminerons cette partie par les différentes méthodes de préparation nécessaires pour obtenir les solutions mères des différents principes actifs.

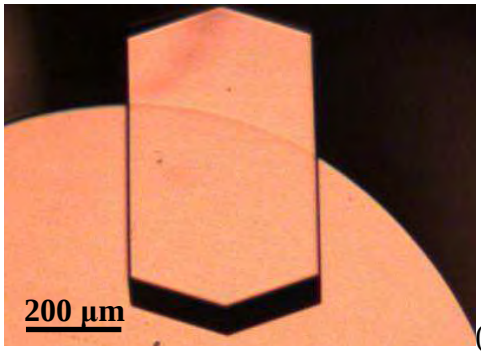
1.1 Le Lysozyme

Le lysozyme est une protéine constituée de 129 acides aminés (voir Figure 27). C'est donc une molécule de grande taille avec un poids moléculaire de 14307g/mol (ou 14,3 kDalton). Comme la plupart des protéines, cette molécule possède un caractère zwitterionique avec un point isoélectrique de 11,35. Pour un pH de 4,5, chaque molécule porte alors une dizaine de charges positives. Son coefficient d'absorption massique à la longueur d'onde 280nm est de 2,64 $mL.mg^{-1}.cm^{-1}$.

Cette enzyme est présente dans un grand nombre de sécrétions (larme, salive…) et également dans le blanc d'œuf. Elle fut découverte par Alexander Flemming qui mit en évidence ses propriétés antibactériennes[38]. En effet, le lysozyme catalyse l'hydrolyse des peptidoglycanes présents à la surface des cellules bactériennes entraînant la rupture (lyse) de leur membrane. Les propriétés antibactériennes du lysozyme sont actuellement utilisées pour des traitements locaux antiseptiques. On peut citer la Lysopaine® médicament utilisé dans le traitement d'appoint antibactérien des muqueuses buccales et de l'oropharynx.



(a)



(b)

Figure 27 : (a) Représentation de la protéine de lysozyme ; (b) cristal de lysozyme

Le Lysozyme utilisé au cours de ce travail est extrait du blanc d'œuf de poule et fourni par la société Sigma. Il s'agit de cristaux de lysozyme recristallisé trois fois dans un tampon d'acétate de sodium. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche hygroscopique. Le lysozyme est utilisé sans purification complémentaire lors de la préparation de la solution mère de lysozyme pour les études de cristallisation.

Le lysozyme est une protéine soluble dans l'eau. Cependant comme un bon nombre de protéines sa solubilité varie en fonction du pH et de la force ionique de la solution. C'est pourquoi la solution mère est tamponnée et possède une force ionique précise. Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux obtenus par d'autres équipes de recherche, nous avons choisi les valeurs de pH et de force ionique qui sont le plus souvent employées dans ces études, soit pH=4,5 dans 0,7 M de NaCl[39,40]. Pour cela nous avons préparé séparément les solutions de lysozyme et de sel dans un tampon d'acétate de sodium à pH=4,5.

Le tampon est obtenu par ajout de soude dans une solution contenant 0,5% d'acide acétique dans de l'eau pure (ELGA UHQ reverse osmosis system). Le pH du tampon est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Schott Instrument, Prolab 1000) avant la filtration à travers un filtre Millipore de 0,22µm. La solution de sel est obtenue en ajoutant la quantité requise de NaCl dans le tampon afin d'obtenir une concentration de 1,4 M. La solution de lysozyme est préparée en dissolvant la quantité requise de lysozyme dans le tampon. L'absence de sel permet la dissolution du lysozyme, en effet dans ces conditions cette solution est sous-saturée. La concentration en lysozyme de la solution est vérifiée par mesure de la densité optique de la solution (Biochrom, Libra S22) en utilisant le coefficient d'extinction du lysozyme à 280nm. La poudre de lysozyme étant hygroscopique il est parfois nécessaire d'ajuster la quantité de lysozyme introduite après avoir mesuré la concentration en lysozyme.

Lors du mélange à volume égal entre la solution de NaCl et celle de lysozyme, on obtient bien une solution de lysozyme à pH 4,5 dans 0,7 M de NaCl. Ce mélange peut se faire directement dans la puce microfluidique comme nous le verrons ultérieurement. Cela permet de générer la sursaturation in situ. Il faut noter que cette approche diffère de celle utilisée sur des molécules organiques de plus petite taille comme la caféine.

1.2 La caféine

La caféine est un alcaloïde présent notamment dans le café et de formule brute $C_8H_{10}N_4O_2$ (voir Figure 28). Il s'agit d'une petite molécule dont la masse moléculaire n'est que de 194.19g/mol. Elle est soluble dans de nombreux solvants organiques, mais également faiblement soluble dans l'eau.

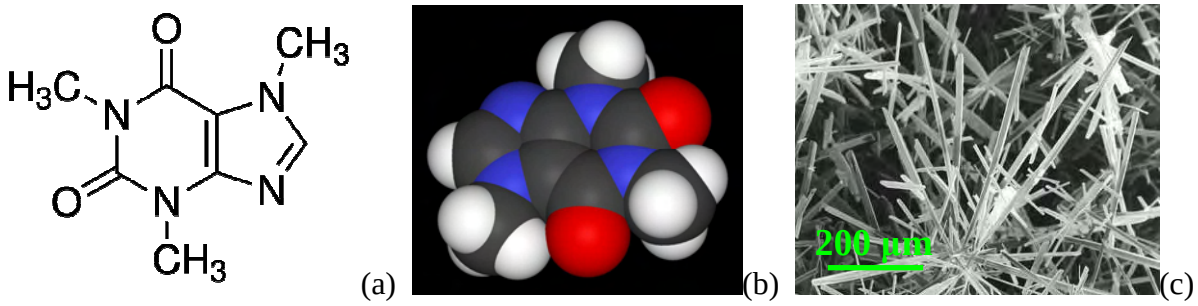


Figure 28 : Caféine (a) Formule développée ; (b) Représentation 3D ; (c) Image MEB de cristaux (x60).

Depuis la préhistoire, les hommes consomment des plantes contenant de la caféine pour réduire la sensation de fatigue et améliorer la vigilance. Cependant, ce n'est qu'en 1819 que le chimiste allemand Friedlieb Ferdinand Runge[41] réussit à isoler la caféine pour la première fois. La caféine est obtenue industriellement comme sous-produit de la décaféination. La caféine présente un intérêt médical en plus des effets que nous lui connaissons. Cette molécule est utilisée en néonatalogie comme traitement de référence en tant que stimulant respiratoire chez des prématurés ayant des difficultés à respirer sans assistance.

Dans cette étude, nous avons choisi la caféine commercialisée par la société Sigma et nous l'avons utilisée sans purification complémentaire. Il s'agit d'une poudre blanche non hygroscopique. La caféine est nocive en cas d'ingestion et peut causer des irritations par inhalation. Afin de déterminer les solvants présentant un intérêt pour l'étude de la nucléation de la caféine, des courbes de solubilité ont été mesurées dans différents solvants : acétate d'éthyle, éthanol, dichlorométhane et acétone. Le choix des solvants retenu a été effectué en fonction de la sursaturation maximale que les différents solvants permettaient de générer dans la gamme de température de nos premiers essais, soit entre 45°C et 25°C.

En effet la sursaturation maximale que l'on peut atteindre par changement de température est définie comme le rapport entre la solubilité maximale que l'on peut atteindre sur la gamme de température (souvent à la température la plus élevée) et la solubilité minimale sur cette même gamme de température. Dans une zone de travail allant de 25°C à 45°C la sursaturation maximale qu'il est possible d'atteindre par changement de température est égale sur la Figure 29 à la hauteur de la flèche noire divisée par la hauteur de la flèche rouge Le Tableau 1 présente les résultats obtenus pour la caféine sur une gamme de température de 25°C à 45°C.

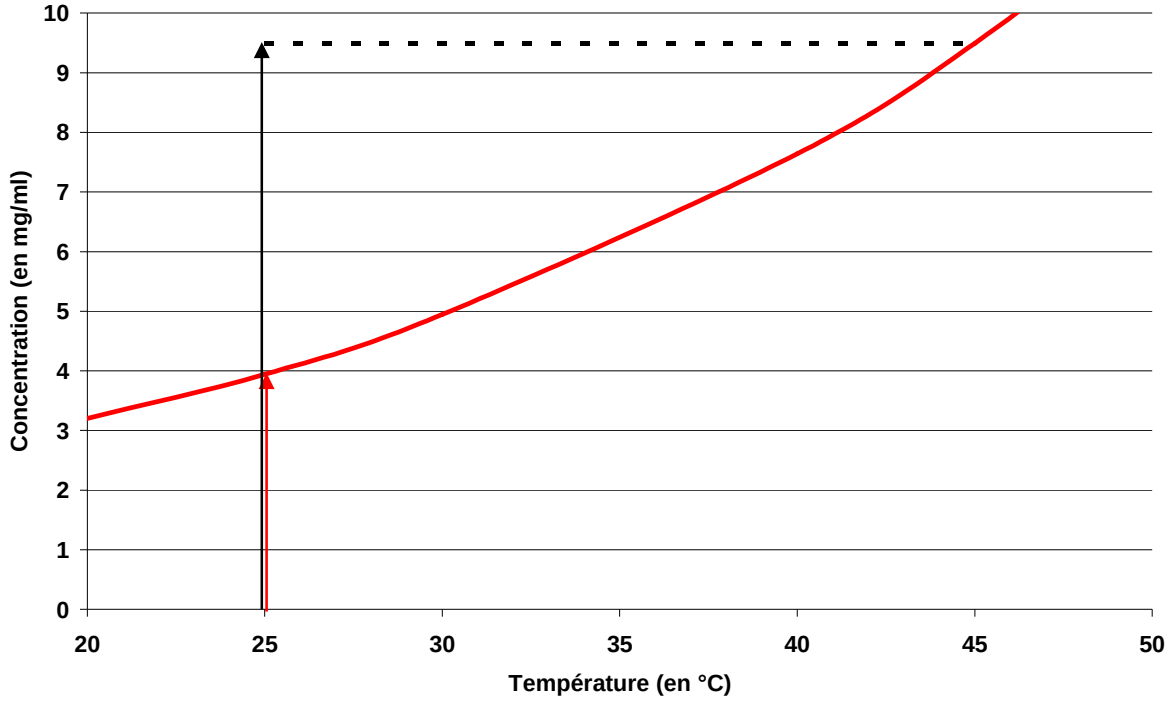


Figure 29 : Schéma de principe du calcul de la sursaturation maximale accessible dans une gamme de température allant de 25°C à 45°C.

	Acétate d'éthyle	Éthanol	Dichlorométhane	Acétone
Solubilité 25°C	70 mg/ml	4 mg/ml	120 mg/ml	11 mg/ml
Solubilité 45°C	110 mg/ml	9 mg/ml	140 mg/ml	16 mg/ml
Sursaturation 45°C → 25°C	1.57	2.25	1.25	1.45

Tableau 1 : Solubilité de la caféine à 25°C et 45°C dans différents solvants et sursaturation entre 45°C et 25°C.

À partir des données du Tableau 1, nous avons retenu comme solvant l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Ce sont tous les deux des solvants classiques d'une étape de cristallisation dans le domaine pharmaceutique. Les solutions de caféine sont préparées en dissolvant à chaud la quantité souhaitée de caféine dans le solvant. La sursaturation est alors générée par le refroidissement de la solution de caféine.

1.3 L'isonicotinamide

L'isonicotinamide est une molécule organique dont la structure chimique est très proche de celle du nicotinamide (vitamine B_3), la position de la fonction amide étant en méta de l'azote pour la nicotinamide. L'isonicotinamide est une petite molécule plane de masse moléculaire 122.12 $g.mol^{-1}$. Cette molécule ne présente pas un intérêt pharmaceutique direct comme le lysozyme ou la caféine. En effet, elle est utilisée dans l'industrie pharmaceutique afin d'obtenir des cocristaux[42]. De tels cocristaux permettent de modifier les propriétés des cristaux de principes actifs (dissolution plus rapide par exemple). Cette étude se déroule dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de J.H. ter Horst (Delft University of Technologie, Pays-Bas) sur la mesure de la fréquence de nucléation de molécules organiques.

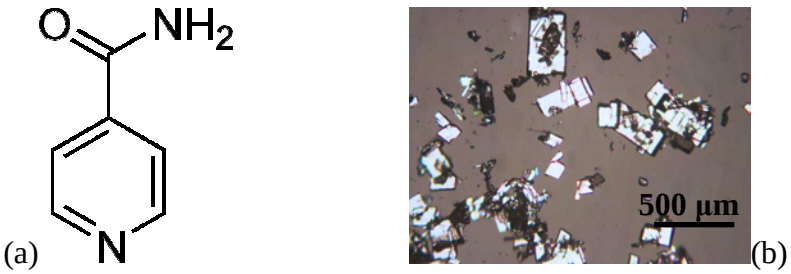


Figure 30 : Isonicotinamide (a) Formule développée (b) Photomicrographie de cristaux

L'isonicotinamide utilisée dans ce travail a été fournie par la société Sigma et elle est étudiée sans purification supplémentaire. Il s'agit d'une poudre blanche cristalline non hygroscopique. Ce produit est toxique avec un risque d'irritation pour les yeux, la peau et les voies respiratoires. Le choix des solvants repose essentiellement sur la possibilité de comparer nos résultats avec ceux de J.H. ter Horst et al.[43] (voir Figure 31). Trois solvants ont été retenus : l'éthanol, l'acétone et le nitrobenzène. Ce dernier solvant, moins souvent utilisé que les deux autres, nous permettra de tester la compatibilité de notre système microfluidique avec des solvants non classiques.

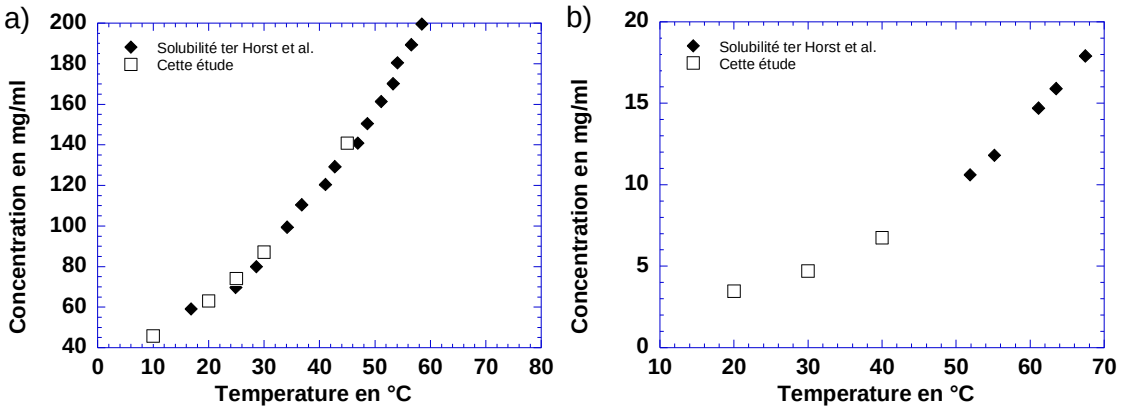


Figure 31 : Solubilité de l'isonicotinamide comparée entre cette étude et celle de ter Horst et al.[44] : a) dans l'éthanol ; b) dans le nitrobenzène

Les solutions d'isonicotinamide sont préparées en dissolvant à chaud la quantité souhaitée d'isonicotinamide dans le solvant. La sursaturation est alors générée par le refroidissement de la solution d'isonicotinamide. Une fois les différentes solutions préparées, il faut encore les introduire dans le système microfluidique et parfois en les maintenant à la température requise. Cela nécessite un appareillage adapté autour du système microfluidique.

2 Matériel

Cette partie a pour but de décrire les différents appareillages qu'il est nécessaire d'adjoindre au système microfluidique afin d'en assurer le fonctionnement. Leur rôle est de répondre à deux problématiques essentielles : comment alimenter le système microfluidique en solution ? Comment l'analyser en fin d'expérience ?

2.1 L'alimentation du système microfluidique en solution

Le système microfluidique se compose de canaux permettant le passage de liquides. Cependant, les liquides ne peuvent circuler dans ces canaux qu'à la condition d'être injectés dans le système microfluidique avec une pression suffisante. Il faut également noter que le faible diamètre des canaux microfluidiques entraîne une perte de charge d'autant plus importante que la longueur des canaux est grande. Pour injecter un liquide dans un système microfluidique, il faut utiliser une pompe et plusieurs options sont possibles.

Il peut s'agir d'injecter le liquide en utilisant une source de pression (air comprimé) à appliquer sur le liquide. Cette solution appliquée à la microfluidique est notamment développée par la société française Fluigent. Grâce à un contrôle précis de la pression d'injection du liquide dans le système microfluidique, il est ainsi possible de stopper quasi instantanément la circulation du liquide. De plus, l'absence d'élément mécanique en contact avec le liquide permet d'éviter la génération d'un flot pulsatile de liquide. Cependant, le contrôle sur la seule pression d'injection ne donne pas directement accès au débit d'injection du liquide.

Pour pallier ce problème, des pompes dédiées à la microfluidique ont été développées. Il s'agit de pompes permettant d'injecter des liquides à des débits faibles et contrôlés (compatible avec la microfluidique) tout en minimisant les "à-coups". Cependant, le contact entre le liquide à injecter et les pièces mécaniques étant direct, il faut donc que ces pièces ne soient pas altérées par le liquide. De plus, l'apparition de cristaux à l'intérieur de la pompe risque de détériorer les pièces en mouvement. L'utilisation de telles pompes est donc plutôt à réserver pour des applications de production avec une cristallisation bien maîtrisée et non pas pour des applications de recherche.

Une autre solution est d'utiliser une pompe de type pousse seringue. Il s'agit d'une pompe comportant un bâti fixe sur lequel est fixé le corps de la seringue et d'un chariot mobile sur lequel est fixé le piston de la seringue. Une telle pompe présente plusieurs avantages : la seringue peut aisément être remplacée, il est facile de contrôler le débit d'injection par la vitesse du piston et il est possible d'adapter la nature de la seringue au type de solvant utilisé (polypropylène, Téflon ou verre). Cependant, la quantité maximale qu'il est possible d'injecter en continu sera dépendante de la contenance de la seringue.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé différents pousse seringues associés à différentes seringues. Dans un premier temps, nous avons utilisé trois pousse seringues pilotés manuellement (Bioseb BS-8000). Il s'agit de pousse seringues très simples puisqu'il suffit de régler le diamètre de la seringue utilisée, puis de programmer un débit. Ce type de pousse

seringue est donné comme étant capable de fonctionner jusqu'à une température de 45°C. Plus récemment, nous les avons remplacés par un ensemble de trois pousse seringues de précision avec une interface de contrôle par ordinateur. Il s'agit de pousse seringues Nemesys (NEM-B101-02) capables de fonctionner jusqu'à une température de 50°C.

Les seringues utilisées en routine dans ces pousse seringues sont des seringues TERUMO de 2,5ml stériles dans un emballage individuel (référence SS*02LE1). Il s'agit de seringues en polypropylène avec un piston dont le joint est un élastomère. Cet élastomère est incompatible avec l'utilisation de certains solvants organiques (acétone, acétate d'éthyle), particulièrement à une température supérieure à la température ambiante. C'est pourquoi l'utilisation de seringues en verre a été préférée avec certains solvants. Ce sont des seringues Hamilton de 1ml avec un corps en verre et un joint en Téflon assurant une compatibilité totale avec tous les solvants, même à chaud.

2.2 Le contrôle de température

Plusieurs étapes de ce travail nécessitent un contrôle de la température ce qui nous a conduits à utiliser différents systèmes de régulation :

- pour la dissolution à chaud de la caféine ou de l'isonicotinamide (dans de petits flacons hermétiques), une étuve ne possédant pas de groupe froid et ne pouvant donc réguler la température qu'au dessus de la température ambiante est utilisée jusqu'à des températures de 60°C.

- pour induire la nucléation à des températures inférieures à l'ambiante, nous avons placé les systèmes de stockage (puces microfluidiques ou capillaires) dans des étuves pourvues de groupe froid, dans un frigo ventilé ou dans un congélateur ; les températures fixées sont respectivement de l'ambiante à 10°, 6°C et -25°C. Enfin nous avons développé récemment un système de porte-capillaire thermostaté par des éléments Peltier, l'UNIDIM.

- pour l'injection des solutions à chaud, nous avons employé deux méthodes : Pour les températures inférieures à 45°C, le système microfluidique, les seringues et les pousse seringues Bioseb BS-8000 sont placés dans une grande étuve. Pour les températures plus élevées jusqu'à 70°C, une enceinte thermostatée est adaptée sur les pousse seringues Nemesys (Figure 32). Ce dispositif développé au laboratoire en collaboration avec la société ANACRISMAT permet de maintenir les seringues et le système microfluidique à une température élevée sans chauffer inutilement la partie mécanique du pousse seringue.

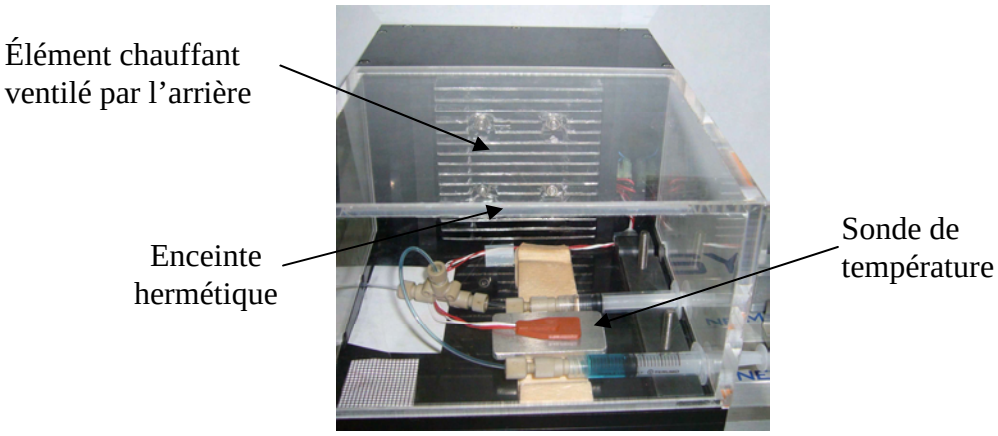


Figure 32 : Photographie du système de régulation de la température des seringues monté sur les pousse seringues Nemesys

2.3 L’observation des gouttes et des cristaux

Dans cette étude, nous cherchons à observer d’une part des séries de gouttes, d’autre part le ou les cristaux à l’intérieur de ces gouttes. La taille réduite des gouttes (inférieur à 0,5mm de diamètre) et à plus forte raison des cristaux ne permet pas l’observation à l’œil nu. Les observations se font alors à l’aide de microscopes optiques possédant deux polariseurs croisés (à 90°), ce qui selon la loi de Malus conduit à une extinction totale de la lumière. Tandis que les cristaux biréfringents (cristaux à symétrie non cubique) feront changer la direction de polarisation et apparaîtront alors comme des éléments lumineux sur un fond sombre. Ainsi, un fort contraste est obtenu lors de l’observation de cristaux même si ces derniers sont de taille réduite. Tous les microscopes utilisés dans ce travail sont équipés de caméras CCD couleur reliées à un ordinateur.

Les microscopes employés sont de deux types suivant la nature du système de stockage. Comme les puces microfluidiques en PDMS sont fixées sur un support en silicium opaque l’observation se fait en réflexion grâce à un microscope binoculaire (WILD Makroscop M420) avec un éclairage polarisé annulaire. Pour les systèmes de stockage de gouttes utilisant des capillaires en Téflon semi-transparents, l’observation est réalisée en transmission avec un microscope inversé (Nikon diaphot). Une nette amélioration est apportée en immergeant les capillaires dans l’eau, car l’indice optique de l’eau est très proche de celui du Téflon ce qui limite la réfraction des rayons lumineux et améliore la qualité de l’image. Cette technique dite d’adaptation de l’indice optique évite de noircir les bords du capillaire comme le montre la Figure 33. De plus, l’eau peut servir de fluide caloporteur pour contrôler la température des gouttes.

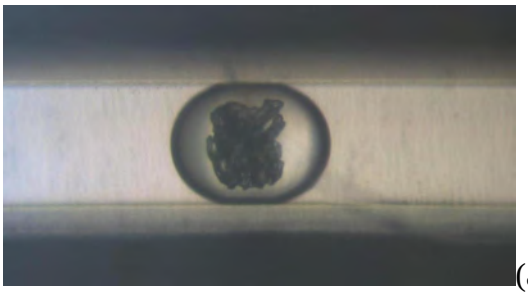
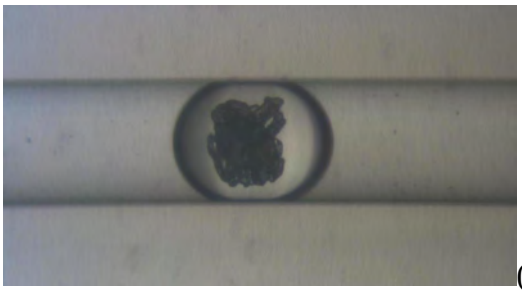

(a)

(b)

Figure 33 : Photomicrographie d'une goutte microfluidique contenant un cristal : a) sans adaptation d'indice optique ; b) avec adaptation d'indice optique

Lors de la prise de vue, nous disposons d'un contrôle de température qui va dépendre du type de stockage. Pour les puces microfluidiques en PDMS fixées sur un support en silicium le contrôle de température se fait grâce à un élément Peltier plat en contact direct avec le support en silicium (Figure 34 a). Pour les capillaires en Téflon il est assuré par un récipient en PMMA dont la paroi est formée d'une double enveloppe dans laquelle de l'eau circule à une température contrôlée par un bain thermostaté (Figure 34 b). Enfin, un prototype permettant l'observation des capillaires en Téflon tout en contrôlant la température avec des éléments Peltier est développé en collaboration avec une PME locale ANACRISMAT. Ce prototype baptisé UNIDIM permet l'observation en transmission ou en réflexion des capillaires en Téflon (Figure 34 c). L'utilisation d'éléments Peltier pour le contrôle de la température en remplacement de la circulation d'eau est alors privilégiée. En effet, ils permettent de faire subir aux gouttes des variations de température beaucoup plus rapides tout en les observant au microscope, ce qui peut s'avérer particulièrement intéressant pour caractériser les cristaux (polymorphisme,…).

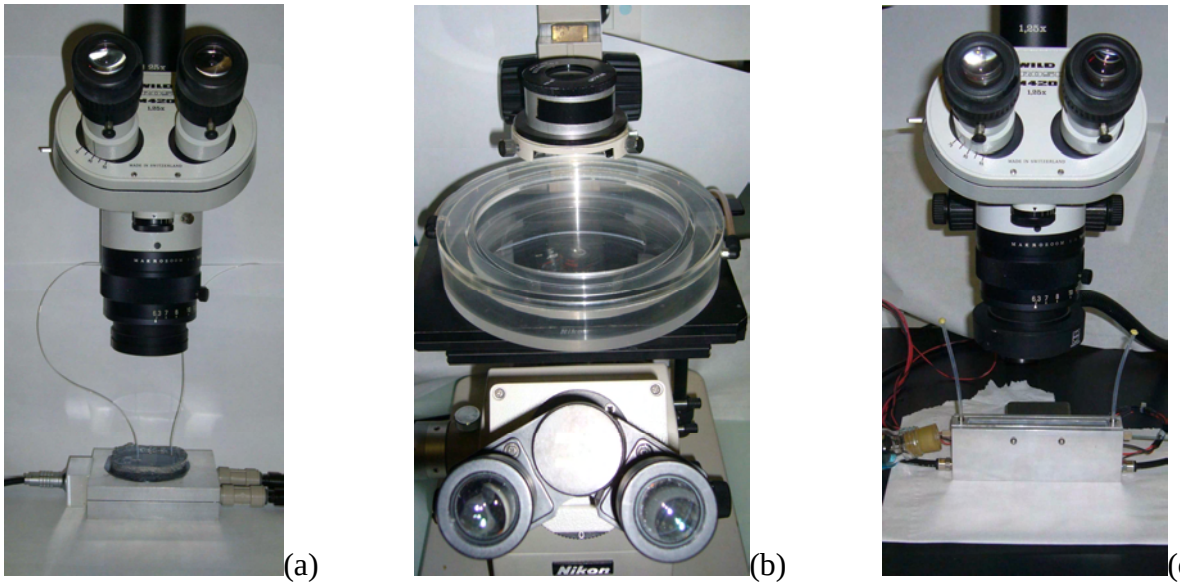


Figure 34 : Différents montages d'observation de systèmes de stockage contrôlés en température
a) binoculaire avec élément Peltier plat b) microscope inversé avec récipient double enveloppe en PMMA
c) binoculaire avec élément Peltier UNIDIM (ANACRISMAT)

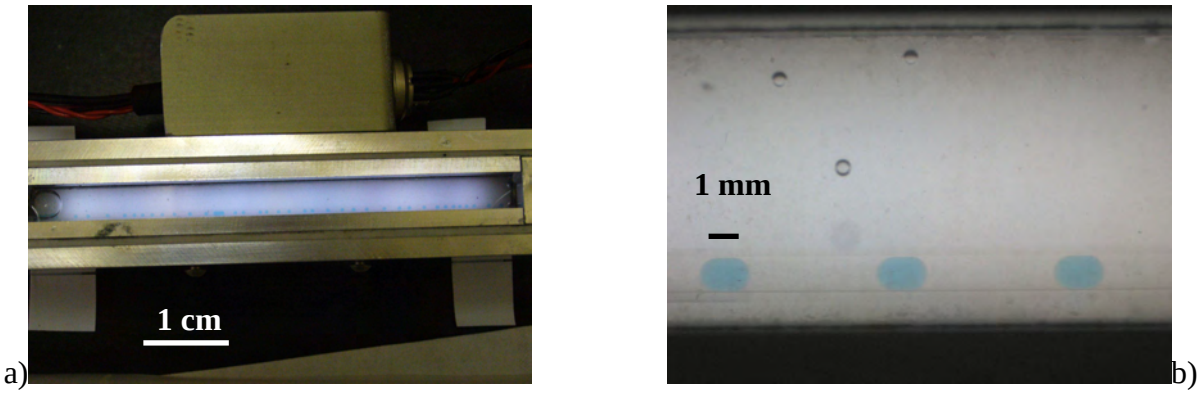


Figure 35 : Prototype UNIDIM contenant des gouttes d'éthanol colorées en bleu dans un capillaire :
a) vue de dessus b) vue au microscope

3 Méthodes

Le matériel décrit précédemment pour l'observation par microscopie optique et le contrôle de la température nous permet de mettre en place des méthodes adaptées pour mesurer des courbes de solubilité, encadrer une solubilité en température ou encore déterminer des fréquences de nucléation. Parmi ces méthodes, celles qui ne sont pas liées à la technique microfluidique seront détaillées dans cette partie, alors que celles développées spécifiquement pour la microfluidique au cours de ce travail représentent des résultats qui seront présentés dans le Chapitre 3 : Résultats et discussions.

3.1 Courbes de solubilité

La mesure de l'évolution de la solubilité en fonction de la température est une donnée thermodynamique essentielle pour l'étude de la cristallisation d'une molécule. Chaque couple soluté/solvant ayant une courbe de solubilité unique il est souvent nécessaire de déterminer expérimentalement cette dernière. Pour déterminer cette courbe de solubilité, la méthode utilisée est celle des ajouts successifs. Il s'agit d'ajouter à un volume de solvant connu et thermostaté des quantités pesées de soluté. Si après l'ajout la solution est sous-saturée, nous n'observerons pas de cristaux en suspension dans la solution et nous procéderons à un nouvel ajout. Si après cet ajout la solution est saturée, les cristaux de soluté ne seront pas dissouts et pourront être observés en suspension. La masse maximale de soluté pouvant être dissoute dans ce volume de solvant à cette température est donc comprise entre la masse de soluté introduite avant et après le dernier ajout. Il suffit alors de diviser cette masse par le volume de solvant pour connaitre la solubilité. On augmente ensuite la température et l'on procède de la même manière pour une seconde température. La Figure 36 montre le parcours suivi par la solution dans un diagramme de phase.

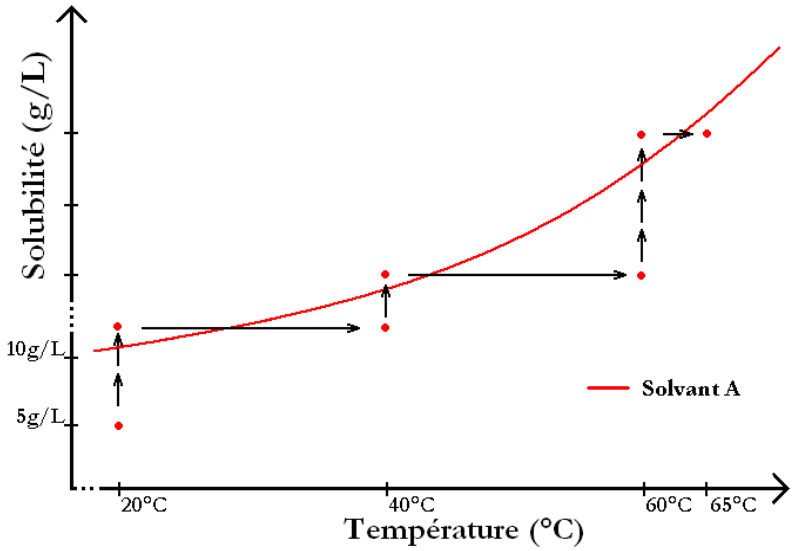


Figure 36 : Représentation schématique de la méthode de détermination de la solubilité par ajouts successifs d'après Detoisien et al.[45].

Afin de mettre en œuvre cette méthode, nous utilisons un montage comprenant deux béchers de 20 ml à double enveloppe thermostatés par une circulation d'eau. Le premier bécher contient 10 mL de la solution à étudier et le second contient 10 mL de solvant seul.

Une sonde de température plonge dans le second bécher afin de mesurer précisément la température du solvant. Sous chaque bécher un agitateur magnétique permet l'agitation de la solution grâce à un barreau aimanté. La Figure 37 schématise ces différents éléments afin de donner une vue d'ensemble du montage expérimental.

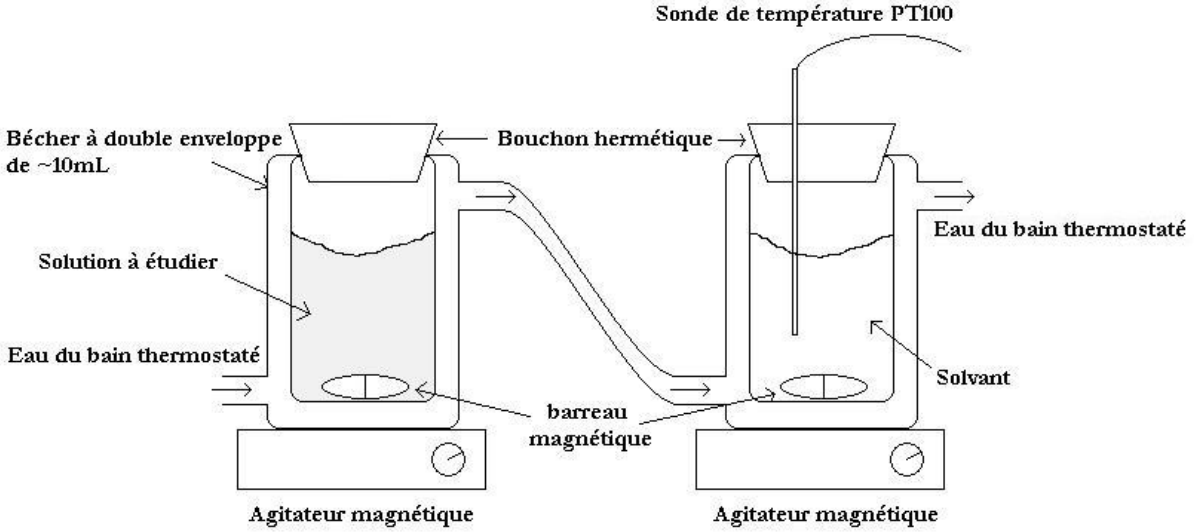


Figure 37 : Schéma du montage permettant la détermination des courbes de solubilité d'après Detoisien[15]

Cette méthode permet d'obtenir un encadrement de la valeur de solubilité qui est comprise entre la concentration avant et après le dernier ajout. Sa précision dépend essentiellement de l'écart entre l'avant-dernier et le dernier ajout. Cela permet d'obtenir rapidement une valeur approximative de la solubilité en ajoutant des masses importantes, puis d'affiner cette valeur lors d'une seconde expérience mettant en jeu des ajouts de masse plus faible. En utilisant cette méthode, nous avons pu obtenir les courbes de solubilité de la caféine et de l'isonicotinamide dans les différents solvants utilisés au cours de ce travail. La courbe de solubilité du lysozyme provient quant à elle de la littérature, le lysozyme ayant été abondamment étudié dans les conditions de ce travail (0,7M NaCl pH = 4,5).

La méthode des ajouts successifs nécessite de pouvoir intervenir directement sur la solution pour ajouter les masses de soluté. De tels ajouts sont impossibles dans un système microfluidique où une fois la goutte produite il n'est plus possible de lui ajouter du soluté. Pour déterminer la solubilité in situ dans une goutte microfluidique il est donc nécessaire d'utiliser une autre méthode.

3.2 Encadrement de solubilité par la température

Dans le cas de gouttes dans un système microfluidique, il est possible d'utiliser une méthode par encadrement de la température pour déterminer la solubilité d'un cristal dans la solution qui l'entoure[46]. Cette méthode aussi appelée "bracketing technique" consiste à observer la croissance ou la dissolution de cristaux en fonction de la température[47], ce qui est aisé grâce au microscope optique et au contrôle de la température dont nous disposons. Si le cristal se dissout, cela signifie que la solution est sous-saturée, s'il croît alors la solution est sursaturée. Comme la courbe de solubilité marque la limite entre zones sous-saturée et sursaturée, on peut en donner un encadrement en température. Cette technique permet de déterminer la solubilité d'un couple cristal/solution avec une précision pouvant aller de 1°C à 0,1°C[48].

Chaque phase ou polymorphe ayant sa propre solubilité, la méthode d'observation des cristaux en suspension à différentes températures décrite ci-dessus permet de distinguer et ainsi de mettre en évidence des phases ou des polymorphes différents sans avoir recours à la diffraction des rayons X.

3.3 Fréquence de nucléation

La fréquence de nucléation J correspond au nombre de germes ayant nucléé par unité de temps et par unité de volume. Les germes qui nucléent aléatoirement dans la solution ont un rayon très faible ce qui ne permet pas de les observer par microscopie optique. Il y a donc un temps de croissance entre le moment où un cristal nuclée et le moment où il peut enfin être observé. De plus, la croissance des cristaux consomme une part importante de la sursaturation qui n'est plus disponible pour la nucléation d'autres cristaux. Pour pallier ces difficultés, il serait préférable de séparer le phénomène de nucléation du phénomène de croissance qui s'ensuit. Une des méthodes utilisées pour cela est la méthode dite de double pulsation thermique[49]. Il s'agit de faire varier la sursaturation de la solution à travers des changements de température, qui font passer la solution d'un côté puis de l'autre de la limite de zone métastable. La nucléation se produit lorsque la concentration de la solution est au dessus de la limite de zone métastable, la croissance se passant dans la zone de croissance située sous la limite de zone métastable.

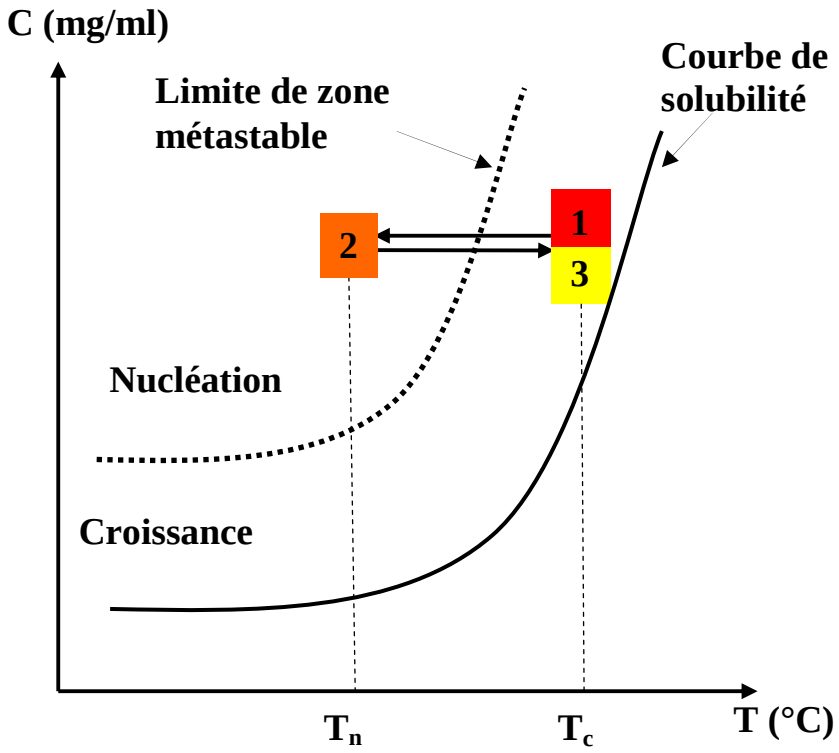


Figure 38 : Schéma de principe de la méthode de double pulsation thermique, 1 Préparation de la solution, 2 Nucléation (durant Δt) et 3 croissance des cristaux

Il s'agit de commencer l'expérience à la température T_c (1) dans la zone de croissance, où la nucléation n'est pas favorisée cinétiquement. On abaisse ensuite la température jusqu'à T_n (cas d'une solubilité directe) pour franchir la limite de zone métastable et pénétrer dans la zone de nucléation (2). On reste dans cette zone (c'est-à-dire à cette température) durant un

temps Δt qui sera le temps de nucléation. On augmente ensuite la température jusqu'à T_c afin de franchir à nouveau la limite de zone métastable (3) et revenir dans la zone de croissance. À ce stade la nucléation redevient impossible cinétiquement, mais les germes ayant nucléé durant le temps Δt dans la zone de nucléation auront tout le temps de croître jusqu'à atteindre des dimensions détectables par microscopie optique[50]. Le nombre de cristaux apparus N est alors compté.

Cette méthode permet d'avoir une mesure fiable de la fréquence de nucléation qui ne dépend pas des outils d'observation utilisés (tous les cristaux atteignant une taille observable). Elle sous-estime cependant le nombre de cristaux nucléés à T_n en raison de la dissolution de certains germes lorsque l'on augmente la température jusqu'à T_c [51].

La fréquence de nucléation J est obtenue par l'Équation 10 en supposant que l'on se trouve dans le régime stationnaire de nucléation.

$$J = \frac{N}{V.\Delta t}$$

Équation 10

J : Fréquence de nucléation (en $mL^{-3}.s^{-1}$)
N : Nombre de cristaux présents dans l'échantillon
V : Volume de l'échantillon (en mL^{-3})
Δt : Temps de nucléation (en s)

Cette méthode de double pulsation thermique impose des contraintes surmontables grâce à nos dispositifs :

- les différents changements de température entre T_c et T_n doivent être effectués le plus rapidement possible pour pouvoir déterminer avec précision le temps de nucléation Δt. L'adéquation aux systèmes microfluidiques est ici indéniable puisque le rapport entre la surface et le volume des gouttes est grand et permet des échanges thermiques rapides.
- il faut pouvoir compter avec précision le nombre de cristaux N dans les gouttes. Ceci est possible si les cristaux sont faciles à distinguer les uns des autres et si N est suffisamment faible dans chaque goutte. Le faciès des cristaux va également jouer un rôle important, car il est plus difficile de distinguer des aiguilles très fines que des cristaux massifs. L'utilisation de microscopes à lumière polarisée et de différentes techniques pour améliorer le contraste prend donc ici tout son sens.
- la limite de zone métastable doit être déterminée au préalable dans les conditions de l'expérience. En effet, cette limite étant une donnée cinétique, sa mesure doit se faire dans des conditions expérimentales proches de l'expérience (de la génération des gouttes jusqu'à leur observation). Pour cela, nous avons développé une méthode de mesure spécifique aux techniques microfluidiques qui sera détaillée dans le Chapitre 3 : Résultats et discussions.

D'autres méthodes ne distinguant pas la phase de nucléation de la phase de croissance peuvent également être utilisées pour déterminer la fréquence de nucléation. Par exemple, la méthode des temps d'induction utilise le temps qui sépare l'établissement de la sursaturation de l'apparition du premier cristal pour déterminer la limite de zone métastable de cette solution[43].

Chapitre 3 : Résultats et discussions

« Ce qui compte ne peut toujours être compté, et ce qui peut être compté ne compte pas toujours. »

Albert Einstein

Ce chapitre présentera les avancées obtenues au cours de ce travail tant dans la mise au point des systèmes microfluidiques que des méthodes d'étude de la nucléation. Le but est d'étudier la nucléation d'un principe actif pharmaceutique en employant un outil microfluidique simple d'utilisation pour des laboratoires non spécialistes en microfluidique. Nous avons focalisé nos recherches sur la technique microfluidique en gouttes qui est la plus prometteuse pour l'étude de la nucléation. Dans une première partie, intitulée 'Étude de la nucléation en phase aqueuse', nous avons adapté un système microfluidique existant afin d'explorer les propriétés de nucléation d'une molécule modèle soluble dans l'eau. Puis, cherchant à rendre notre système microfluidique polyvalent, nous avons étendu (dans la seconde partie) notre analyse à des molécules cristallisant en solvant organique.

1 Étude de la nucléation en phase aqueuse

Comme nous avons pu le voir en conclusion du 'Chapitre 1 : Bibliographie' la fabrication de puces en PDMS s'est imposée dans de nombreux laboratoires comme la technique de fabrication de référence pour les systèmes microfluidiques. Cette technique de fabrication par lithographie douce est disponible au laboratoire grâce à un transfert de technologie entre le Laboratory Of the Future à Bordeaux et le CINaM. De plus, le CINaM dispose d'une plateforme de microfabrication (PLANETE) permettant de réaliser à façon des moules pour la lithographie douce du PDMS. Pour ces différentes raisons, nous avons choisi de travailler dans un premier temps sur des puces en PDMS adaptées à l'étude de la cristallisation dans l'eau. Le laboratoire ayant une expérience importante sur la cristallisation de protéines en solutions aqueuses nous avons choisi d'étudier la cristallisation d'une protéine utilisée comme principe actif pharmaceutique, le lysozyme.

Dans cette partie 1, nous proposons une méthode associée à l'outil microfluidique suffisamment simple pour être employée en routine par des industries pharmaceutiques. Pour cela, nous décrirons les modifications apportées au système microfluidique existant[31] pour l'étude des différents paramètres de nucléation du lysozyme dont la cristallisation est décrite dans la littérature. Puis nous présenterons les résultats obtenus sur la mesure de la limite de zone métastable, la caractérisation des polymorphes et enfin la détermination de la fréquence de nucléation du lysozyme. Ces travaux ont donné lieu à deux publications qui sont présentées à la fin de cette partie.

1.1 Le système microfluidique

Le système microfluidique que nous avons retenu pour déterminer la LZM du lysozyme est un système développé au Laboratory Of the future à Bordeaux par l'équipe de J.B. Salmon. Il s'agit d'une puce microfluidique en PDMS initialement utilisé pour la mesure de la cinétique de nucléation du nitrate de potassium dans l'eau[52]. Cette puce est basée sur la génération de gouttes par flow focusing, comme décrit dans le Chapitre 1 : Bibliographie. Le moule ainsi que le masque UV permettant de réaliser la puce par lithographie douce nous ont été donnés par l'équipe de J.B. Salmon, ce qui nous a permis de fabriquer un certain nombre de puces en PDMS. La puce comporte deux parties juxtaposées : la première permet de générer les gouttes et la seconde partie est un canal de 45 cm de long permettant de stocker les gouttes (voir Figure 39).

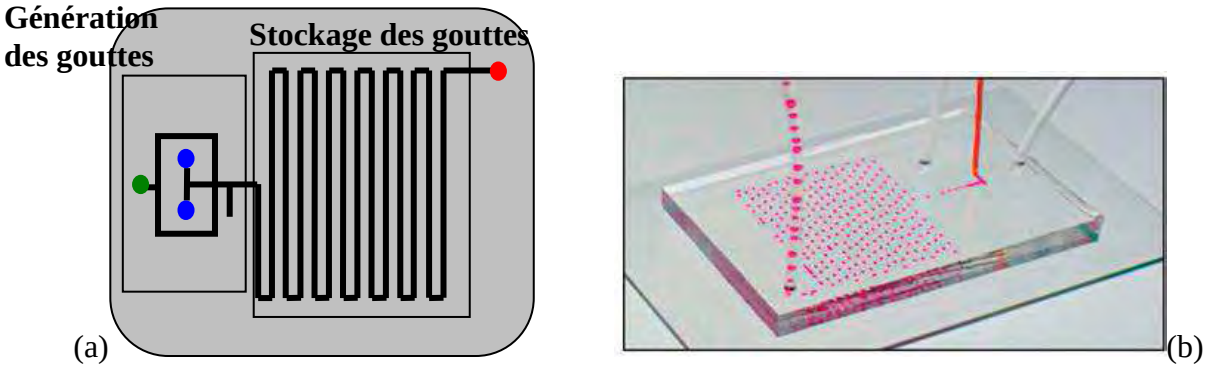


Figure 39 : Puce microfluidique de J.B. Salmon : (a) Schéma de principe, avec en vert l'arrivée d'huile, en bleu l'arrivée de la (ou des) solution(s) et en rouge la sortie des gouttes ; (b) Photographie avec des gouttes

La zone de génération permet d'introduire simultanément deux solutions qui se mélangeront juste avant de former des gouttes. Dans le cas de l'étude de la cristallisation d'une protéine comme le lysozyme cela permet d'introduire la solution de protéine d'un côté et la solution de précipitant (solution de NaCl) de l'autre. Ainsi, la sursaturation n'est générée que quelques instants avant la formation des gouttes et non pas dans la seringue servant à injecter la solution, évitant la formation de cristaux dans la seringue.

Il est à noter que le temps d'induction entre la génération de la sursaturation et l'apparition du premier cristal est d'autant plus grand que le volume est faible. On voit alors le problème qui se pose si la sursaturation est générée dans la seringue (2,5mL) et non dans la goutte (250nL), le temps d'induction dans la seringue est 10000 fois plus court. Pour des temps d'induction de l'ordre de quelques heures dans les gouttes, la seringue cristalliserait en quelques secondes, empêchant alors toute expérience. De même, un temps de cristallisation d'une heure dans la seringue conduirait à un temps de cristallisation de plus d'un an dans les gouttes. Il est donc primordial de générer la sursaturation in situ, soit en ajoutant une solution de précipitant dans le système microfluidique (cristallisation du lysozyme) soit en modifiant la température une fois les gouttes formées (cristallisation de molécules organiques voir partie 2).

Les gouttes de solutions aqueuses sont générées dans de l'huile silicone (Sigma oil AP 100). Ainsi la puce microfluidique permet de générer très simplement un grand nombre de gouttes indépendantes qui sont autant de nanocristallisoirs. De plus, en arrêtant l'arrivée d'huile et de solution ces gouttes peuvent être conservées dans le canal. Les canaux ayant une

largeur de 500µm, les gouttes crées par flow focusing ont un volume de 250nL avec une dispersion de seulement quelques pour cent[52,29]. Ainsi, chaque expérience peut compter des centaines de gouttes identiques afin d'obtenir des données statistiques fiables. La durée des expériences est tout de même limitée à 24h par l'utilisation du PDMS car au-delà de 24h le volume des gouttes d'eau diminue de façon non négligeable à cause de l'évaporation et de la diffusion dans le PDMS.

Cette puce permet d'observer la cristallisation à une seule température à la fois. Cela peut rapidement devenir un problème pour une utilisation intensive comme dans l'industrie pharmaceutique. Dans ce travail, nous avons cherché à réaliser des expériences de cristallisation simultanément à différentes températures. Pour cela, nous avons créé deux types de puce différents (Figure 40) : d'une part la "plug factory" dans laquelle les gouttes sont produites, d'autre part la puce de stockage qui reprend le canal de 45cm pour stocker les gouttes. La "plug factory" est reliée à la puce de stockage par un capillaire en Téflon (SCI BB311-24). Ainsi on peut remplir plusieurs puces de stockage avec une seule" plug factory" en déconnectant le capillaire, une fois la puce de stockage remplie, pour le reconnecter à une puce de stockage vide. La création de ces deux types de puce a été réalisée en modifiant la position respective des entrées et sorties de liquide de la puce, ce que permettent aisément le PDMS et la technique de lithographie douce utilisée pour la fabrication des puces.

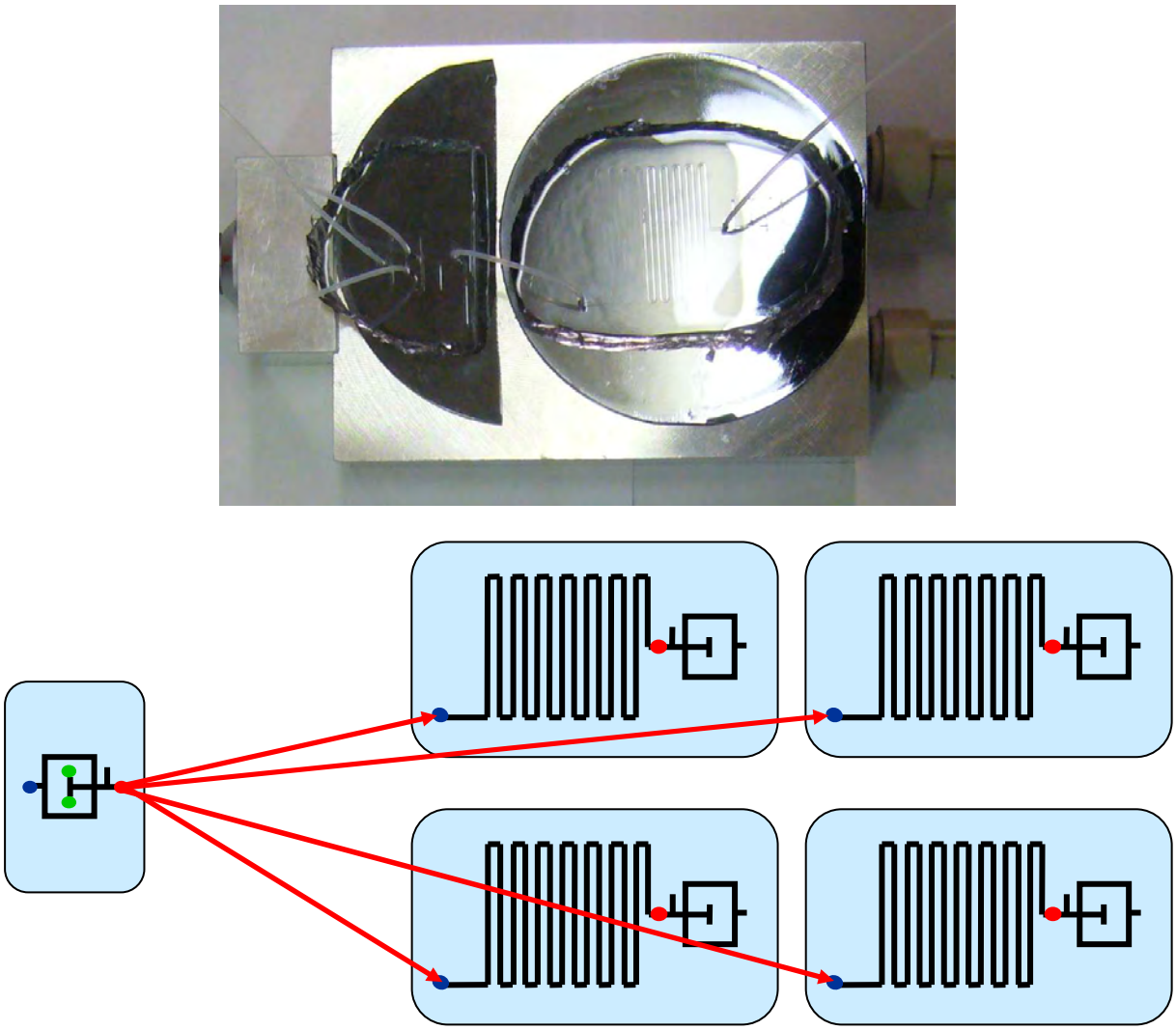


Figure 40 : Photographie et schéma de principe de l'utilisation de la puce microfluidique dans ce travail, une seule "plug factory" (à gauche) alimente en gouttes plusieurs puces de stockage (4 dans cet exemple).

Ce système présente l'avantage de créer des gouttes qui sont toutes issues de la même "plug factory", et donc toutes identiques en volume et en concentration, et de pouvoir les stocker dans différentes puces de stockage. Chaque puce de stockage est ensuite entreposée dans des étuves à différentes températures. Plusieurs températures de cristallisation peuvent donc être testées simultanément. Pour tester plusieurs concentrations en lysozyme, il est nécessaire de changer la concentration au niveau de l'alimentation en solution de lysozyme de la "plug factory". Ainsi, on obtient des points à différentes températures et différentes concentrations.

1.2 Mesure de la Limite de Zone Métastable (LZM) (Article 1)

Dans l'industrie, le contrôle de la cristallisation est souvent effectué en ensemençant la solution à cristalliser avec des cristaux de la phase que l'on cherche à obtenir. Pour que cet ensemencement soit efficace, il faut que deux conditions soient remplies, la solution doit être sursaturée, mais elle ne doit pas nucléer spontanément. La limite de sursaturation est donnée par la courbe de solubilité et la limite de nucléation spontanée est la limite de zone métastable (ou LZM). La connaissance de cette limite est donc nécessaire pour réaliser une cristallisation bien contrôlée. De plus, la LZM sera également utile pour réaliser une mesure de la fréquence de nucléation par la méthode de la double pulsation thermique décrite page 58.

Dans la mesure de la LZM, nous avons profité de la possibilité offerte par notre système microfluidique de réaliser plusieurs expériences à différentes températures pour une même concentration. En effet, nous avons rempli 4 puces de stockage avec des gouttes de même volume et à la même concentration puis nous les avons stockées à des températures différentes. Le temps de stockage dépend de la durée pendant lequel la solution doit rester métastable (ne pas nucléer). Dans ce travail cette durée est de 20h dû à la vitesse de croissance très lente des cristaux de lysozyme.

À l'issue de cette phase, chaque puce est observée, tout en la maintenant à sa température de stockage. Le nombre de gouttes ainsi que le nombre de cristaux sont obtenus par comptage manuel à travers un microscope optique. Le nombre de cristaux est compris entre 0 et 4 cristaux par goutte comme l'illustrent les photomicrographies de la Figure 41.

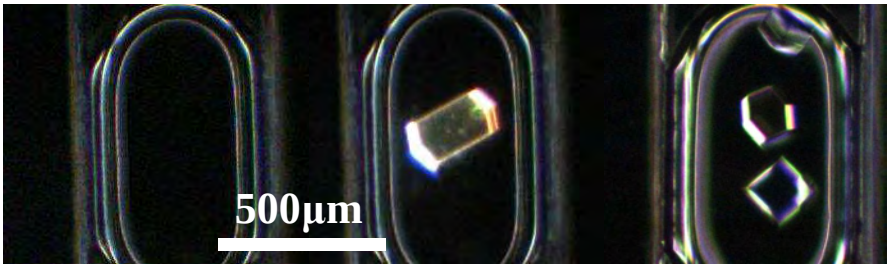


Figure 41 : Photomicrographie de gouttes contenant 0, 1 ou plus de 1 cristal

On s'intéresse au nombre moyen de cristaux par goutte que l'on obtient pour chaque puce, en divisant le nombre de cristaux par le nombre de gouttes. Comme ces observations sont réalisées pour différentes températures (± 1°C), on trace le nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température de stockage (voir Figure 42 a). On relie les différents points à l'aide d'une fonction polynomiale d'ordre 2 utilisant la méthode des moindres carrés et on extrapole la courbe obtenue afin de trouver son point d'intersection avec l'axe des abscisses. Ce point correspond à la température minimale pour laquelle on s'attend à n'avoir aucun cristal au bout des 20h de stockage. Ainsi, sur la Figure 42 a) on estime cette température à 31°C pour une concentration en lysozyme de 20mg/ml. On la note T_{LZM} car elle correspond à un point de la limite de zone métastable pour la concentration considérée (Figure 42 b).

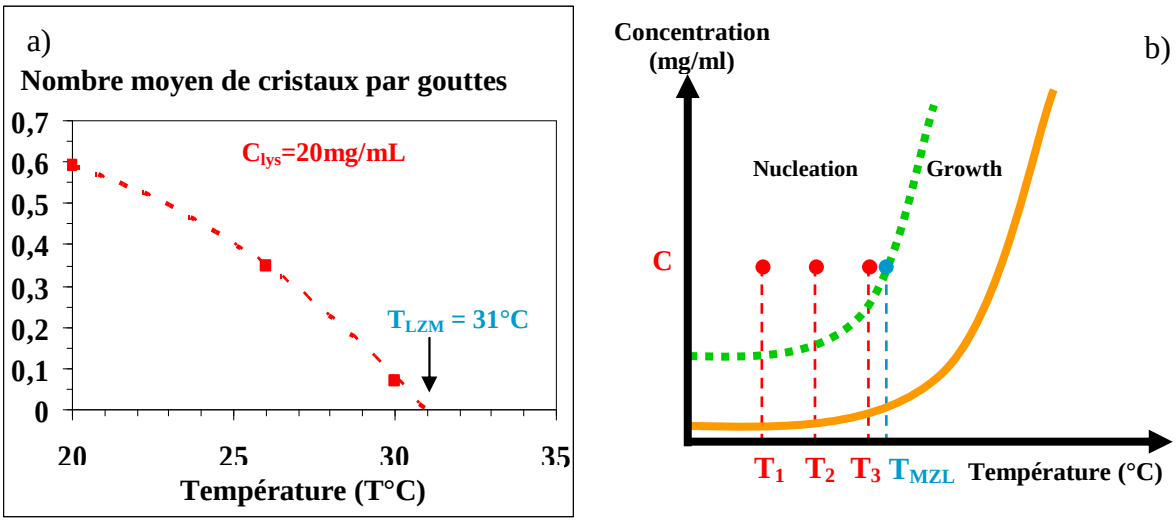


Figure 42 : Évolution du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température et position de ces mêmes points sur un diagramme de phase (solubilité en orange et LZM en pointillé vert)

Pour obtenir une courbe représentative de la limite de zone métastable, il est nécessaire de répéter ces expériences pour différentes concentrations. Afin de réduire le nombre de puces de stockage nécessaires pour obtenir les différents points de la courbe, nous avons adapté la gamme de température étudiée suivant la concentration en lysozyme (Tableau 2). En fait, les gammes de température ciblent des températures de plus en plus hautes avec la concentration en lysozyme, car la valeur de T_{LZM} augmente avec la concentration. Les résultats expérimentaux de la LZM sont présentés sur la Figure 43.

Concentration	Températures			
15 mg/ml	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C
20 mg/ml	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
30 mg/ml	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
50 mg/ml	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C

Tableau 2 : Conditions expérimentales concentration/température ayant servi à la détermination de la LZM du lysozyme

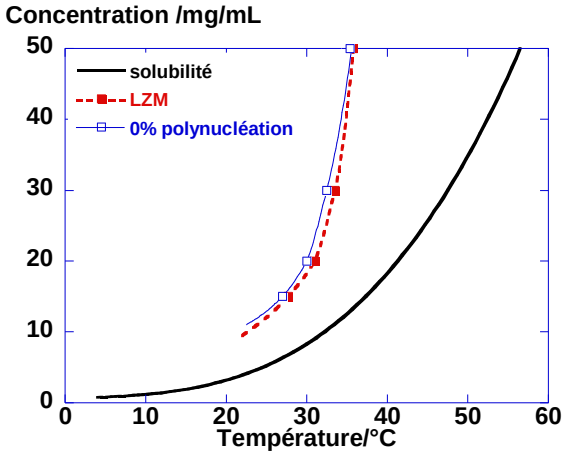


Figure 43 : Courbe de solubilité d'aprés[39] (en noir), estimation de la LZM (en rouge) et limite de zone de mononucléation (en bleu) du lysozyme dans 0.7M de NaCl à pH=4.5 pour une durée de 20h

Nous avons également déterminé une zone où la nucléation donne au maximum un cristal par goutte. Pour cela nous avons extrapolé l'évolution du pourcentage de gouttes contenant plus de 1 cristal en fonction de la température afin de trouver, comme pour la LZM, la température pour laquelle la probabilité d'observer une goutte contenant plus de 1 cristal devient nulle. Cela nous a permis de déterminer une zone, très proche de la limite de zone métastable, où les gouttes contiennent au maximum 1 cristal. La taille de ce cristal (une fois l'équilibre liquide-solide atteint) sera alors calibrée par la quantité de soluté à cristalliser contenu dans la goutte. Il faut cependant nuancer ce résultat puisque dans cette zone seuls quelques pourcents (≈ 10%) des gouttes contiennent effectivement un cristal.

La méthode que nous avons développée permet d'obtenir la limite de zone métastable rapidement en ne réalisant que 4 expériences, une par concentration avec une plug-factory, mettant chacune en jeu 4 puces de stockage microfluidiques. Chaque puce stocke en moyenne 130 gouttes (± 20 gouttes) de 250nl, soit une consommation totale de solution de protéine de 500µL minimum. En plus de réduire la quantité de produits consommés la réduction de volume à un second intérêt qui est d'élargir la zone métastable et donc de permettre un accès à des sursaturations plus importantes avant le début de la nucléation.

La méthode microfluidique que nous avons développée dans ce travail permet une détermination de la LZM d'un principe actif pharmaceutique simple, rapide et consommant peu de produit. Elle répond donc parfaitement au cahier des charges que nous nous étions fixés au début de ce travail.

1.3 Mise en évidence de différentes phases cristallines (Article 1)

La limite de zone métastable est propre à chaque couple cristal/solution, ce qui veut dire que cette limite sera différente suivant la phase cristallisée. Le polymorphisme peut donc rendre plus complexe la mesure de la zone métastable, mais sa mise en évidence constitue une information importante dans l'étude d'un processus de cristallisation. La connaissance des différents polymorphes (et de leurs LZM associées) permet de mieux contrôler la cristallisation et de l'orienter vers telle ou telle forme cristalline intéressant l'application. En effet dans ces conditions, l'on peut connaitre à l'avance les phases pouvant nucléer à partir d'une solution donnée.

La méthode utilisée pour déterminer la LZM du lysozyme nous conduit à réaliser un grand nombre d'événements de nucléation dans des conditions de sursaturation et de température variées. Les expériences présentées dans le Tableau 2 sont uniquement celles qui ont permis de déterminer la LZM du lysozyme. Nous avons également mené des expériences annexes à des températures plus faibles résultant du stockage au réfrigérateur durant 20h à 6°C des capillaires en Téflon servant à transférer les gouttes de la "plug factory" aux puces de stockage. À l'origine, ces expériences avaient uniquement pour but de déterminer si des cristaux ayant nucléé dans les gouttes contenues dans ces capillaires pouvaient être observés. Nous avons alors obtenu la photomicrographie de la Figure 44. Il s'agit de deux gouttes de 250nL dans un capillaire en Téflon de diamètre interne 580µm. Les deux gouttes ont été initialement produites l'une juste après l'autre grâce à une puce "plug factory" et contiennent toutes deux une solution de lysozyme à 20mg/ml dans un tampon pH=4,5 et 0,7M de NaCl.

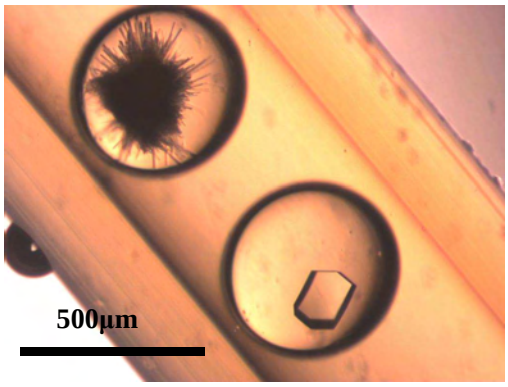


Figure 44 : Photomicrographie de gouttes de solution lysozyme à 20mg/ml 0,7M NaCl pH=4,5

Ces deux gouttes sont donc parfaitement identiques lors de leur production et, étant espacées de moins d'un millimètre, leur "histoire" thermique est également identique. Cependant, les cristaux qu'elles contiennent présentent des faciès très différents, l'un en forme d'hexagone massif et le second en forme d'oursin. On peut alors légitimement se poser la question si ce nouveau faciès est lié ou non à un changement de structure du cristal. Ces deux cristaux sont-ils de la même phase ? Nous avons utilisé une technique d'encadrement de la solubilité par la température pour déterminer la solubilité de chaque faciès. La température de solubilité du faciès en oursin est de 24°C et celle du faciès massif de 30°C. De plus après 12 minutes à 30°C le faciès en oursin est totalement dissout tandis que le faciès massif ne

s’est que très peu dissout après plusieurs heures à cette température. Ceci est illustré Figure 45, et cette différence de solubilité démontre que nous sommes en présence de deux phases distinctes du lysozyme[53], chaque faciès correspondant à une phase cristalline différente. La température d’équilibre de la phase oursin étant plus faible que celle de la phase massive on en déduit que : la phase stable est la phase massive et que la phase oursin est métastable.

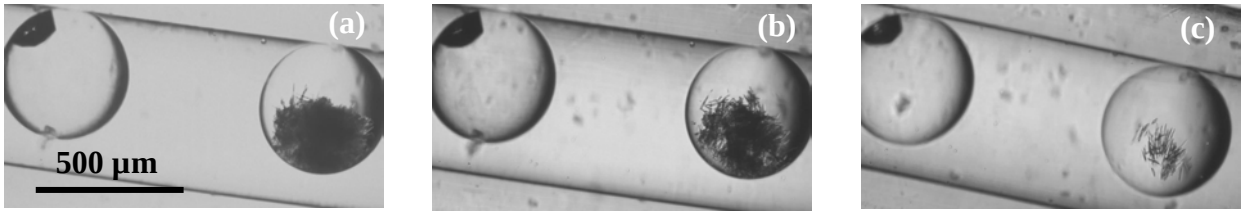


Figure 45 : Gouttes de solution de lysozyme (20mg/ml ; 0,7M NaCl ; pH=4,5) observées (a) après 20h à 6°C (b) 6 minutes après avoir augmenté la température à 30°C (c) après 12 minutes à 30°C

Plusieurs facteurs favorisent l’apparition et la stabilisation des formes métastables dans les systèmes microfluidiques. Tout d'abord, le faible volume de solution (ici 250nL) permet de retarder la nucléation et donc d’atteindre des sursaturations plus élevées qu’avec une méthode non microfluidique. Le faible volume permet également des changements de température plus rapide qu’avec des volumes plus importants, ce qui contribue également à atteindre des sursaturations plus hautes avant le début de la nucléation. Enfin, même si la microfluidique ne permet pas d’obtenir uniquement des gouttes ne contenant qu’un seul cristal, le faible nombre de cristaux dans chaque goutte limite l’apparition concomitante des phases métastable et stable dans la même goutte, ce qui conduirait à la disparition de la phase métastable au profit de la phase stable. En effet si la phase métastable est la seule phase cristalline dans la goutte elle pourra survivre indéfiniment, ce qui permettra son observation[54].

Enfin, la microfluidique permet d’étendre le champ de recherche des polymorphes (extension des sursaturations accessibles, stabilisation des phases métastables) tout en limitant la quantité de produit consommée pour cette recherche. Cette application pourrait être particulièrement intéressante pour la recherche pharmaceutique où une recherche exhaustive des polymorphes doit être menée sur de nombreuses molécules disponibles en faible quantité. Cette expérience nous montre aussi que les capillaires peuvent être utilisés pour stocker des gouttes microfluidiques.

1.4 Fréquence de nucléation primaire (Article 2)

Dans les parties précédentes, nous avons développé une méthode pour déterminer la LZM du lysozyme. La connaissance de cette LZM rend désormais possible l'utilisation de la méthode de double pulsation thermique vue au Chapitre 2 paragraphe 3.3 pour déterminer la fréquence de nucléation du lysozyme. Nous devons préciser que pour éviter les risques d'évaporation des gouttes dans la puce en PDMS nous avons choisi un temps maximum d'expérience de 20h, ce qui correspond à la LZM mesurée. Dans la méthode utilisée, quatre paramètres doivent être définis : la température de nucléation T_n, la température de croissance Tc, les gammes de temps de nucléation Δt et de concentration. Afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux donnés par la littérature[40,50,55], une valeur de 20°C est alors fixée pour T_n avec des valeurs de concentration en lysozyme de quelques dizaines de mg/mL. Il reste à choisir les trois autres paramètres indispensables à cette méthode grâce à des expériences préliminaires. Puis dans un second temps, nous réalisons les mesures de la fréquence de nucléation stationnaire du lysozyme ciblée sur ces paramètres.

1.4.1 Choix de la température de croissance

Dans la méthode de double pulsation thermique, les températures T_n et T_c doivent se trouver de part et d'autre de la LZM sur toute la gamme de concentration étudiée. Le but est de privilégier la nucléation à T_n puis la croissance à T_c. Afin de bénéficier d'une gamme de concentration la plus large possible (de 20 à 55mg/mL tous les 5mg/mL) nous avons choisi de travailler avec une température de croissance T_c de 40°C (Figure 46).

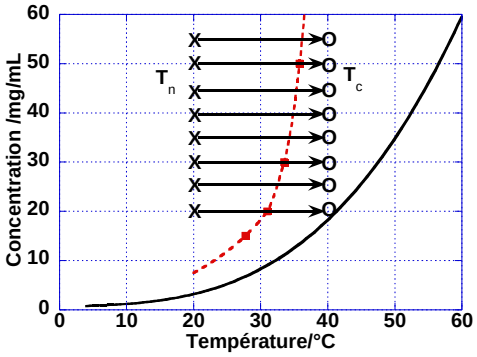


Figure 46 : Solubilité d'après [39] et LZM obtenue précédemment pour le lysozyme dans 0,7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h. Les croix et les cercles indiquent respectivement les températures de nucléation T_n et de croissance T_c aux concentrations de 20 à 55mg/mL

1.4.2 Choix des concentrations

La concentration en lysozyme doit être suffisante pour obtenir un nombre de cristaux significatifs dans les gouttes. Des essais préliminaires de nucléation à T_n=20°C pendant Δt=20h ont été menés sur des gouttes de 20 à 30 mg/mL de concentration en lysozyme (tampons 0,7M NaCl pH=4,5). Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.

Pourcentage de gouttes contenant	20 mg/ml	25 mg/ml	30mg/ml
0 cristal	90%	80%	67%
1 cristal	10%	18%	30%
Plus de 1cristal	0%	2%	3%

Tableau 3 : Pourcentage de gouttes contenant des cristaux après 20h à 20°C

Le très faible nombre de cristaux obtenus, malgré un temps de nucléation le plus long possible, nous a conduits à choisir des concentrations supérieures à 40 mg/mL pour nos expériences. Les concentrations retenues sont donc 40 mg/mL, 45 mg/mL, 50 mg/mL et 55 mg/mL.

1.4.3 Choix des temps de nucléation

Le dernier paramètre à déterminer est la gamme de temps de nucléation qui sera utilisée pour nos expériences. Pour déterminer l'influence du temps de nucléation Δt nous avons pris une concentration en lysozyme de 50mg/mL et nous avons varié Δt sur une large gamme de temps (de 30 minutes à 8 heures). L'évolution du nombre de cristaux par gouttes est représentée sur la Figure 47. Nous observons qu'après une phase initiale de croissance linéaire du nombre moyen de cristaux par goutte avec le temps de nucléation un palier est atteint vers 2 heures.

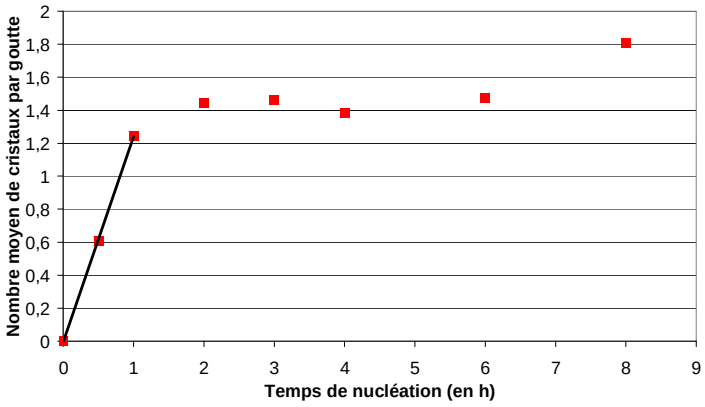


Figure 47 : Évolution du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps de nucléation Δt

Nous remarquons que le palier apparaît après avoir franchi la valeur de 1 cristal par goutte en moyenne. On peut donc considérer qu'il ne reste plus de gouttes ne contenant pas de cristaux. Dans toutes les gouttes, le ou les cristaux croissent alors rapidement du fait de la forte sursaturation. Ainsi, dans les conditions de l'expérience un cristal de 100µm d'arête diminue la sursaturation de 6% dans la goutte qui le contient. La croissance a alors un effet de déplétion de la concentration. La sursaturation ne peut plus être considérée comme constante et donc la fréquence de nucléation diminue. Afin de nous affranchir de ce phénomène, nous avons réduit le temps maximal de nucléation à une heure et demie pour travailler sur la partie linéaire de la courbe et calculer la fréquence de nucléation stationnaire[56]. La mesure d'une fréquence de nucléation stationnaire nécessite que la concentration et la température restent constantes.

Nous choisirons le temps minimal de nucléation de façon à négliger les incertitudes liées aux changements de températures des puces de stockage. Il faut en effet au moins une minute pour modifier la température de nos puces une fois celles-ci placées dans une étuve. Les temps de nucléation seront donc compris entre 15 minutes et 90 minutes. Ainsi, les conditions de concentration et de température constantes sont réunies pour la mesure de la fréquence de nucléation stationnaire dans les expériences de microfluidique.

1.4.4 Évolution de la fréquence de nucléation

Une fois la valeur de la température de croissance T_c et les gammes de concentration et de temps de nucléation définies, nous utilisons la méthode de double pulsation thermique pour étudier la fréquence de nucléation du lysozyme. Chacune de nos expériences implique de remplir 4 puces de stockage avec une puce “plug factory” à une concentration donnée. Dès qu’une puce de stockage est remplie, elle est placée dans une étuve à 40°C (correspondant à T_c) afin d’éviter la nucléation. Une fois toutes les puces de stockage remplies, elles sont transférées simultanément dans une seconde étuve à 20°C (température de nucléation). À intervalle régulier (15 à 30 minutes), une puce est transférée de l’étuve à 20°C vers l’étuve à 40°C. Une fois toutes les puces transférées elles restent dans l’étuve à 40°C durant 20h (phase de croissance des cristaux). À l’issue de ces 20h chaque puce est observée afin de compter le nombre de gouttes ainsi que le nombre de cristaux présents dans l’ensemble des gouttes. Chaque puce ne contenant pas exactement le même nombre de gouttes, on normalise le nombre de cristaux obtenus en le divisant par le nombre de gouttes pour obtenir un nombre moyen de cristaux nucléés par goutte. On peut donc étudier l’évolution de ce nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de Δt. Puis on répète l’opération pour différentes concentrations et on obtient les points de la Figure 48.

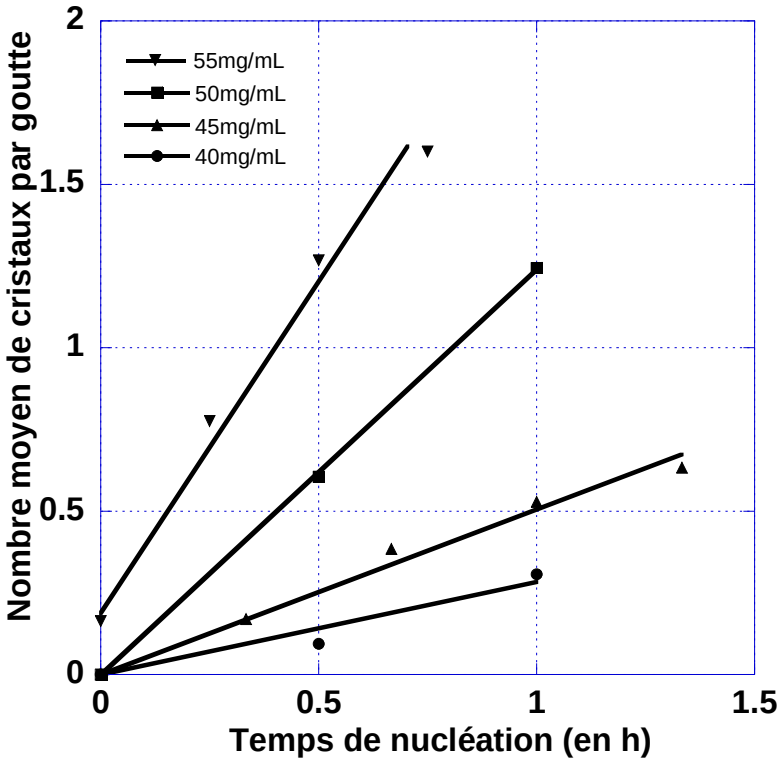


Figure 48 : Nombre moyen de cristaux nucléés par goutte en fonction du temps de nucléation.

On voit clairement ici une dépendance linéaire entre le nombre de cristaux nucléés par goutte et le temps de nucléation (Δt). De plus, les droites passent toutes par l'origine sauf celle à 55mg/mL, Pour laquelle deux facteurs semblent intervenir : à 40°C la solution est très proche de la limite de la LZM ce qui peut provoquer la nucléation de quelques cristaux dans la zone de croissance ; de plus, les transferts de la puce de stockage (entre les différentes étuves) s'effectuent à température ambiante ce qui peut provoquer la nucléation. Cependant, on note que cette nucléation "involontaire" est suffisamment reproductible puisque les expériences à 55mg/mL conduisent à une droite comme pour les autres concentrations.

La dépendance linéaire entre le nombre de cristaux nucléés par goutte et le temps de nucléation (Δt) indique que pour une même concentration l'influence de la nucléation hétérogène sur les résultats est reproductible. On pourra utiliser ici le facteur f, pour quantifier cette influence, puisque ce facteur permet de prendre en compte l'abaissement de la barrière énergétique de la nucléation par la présence de substrat étranger[18].

La pente de ces droites donne le nombre de cristaux apparus par goutte et par heure. On calcule la fréquence de nucléation à 20°C en convertissant en nombre de cristaux apparus par mL par seconde par la relation :

$$J = \frac{N}{V.\Delta t}$$

J : Fréquence de nucléation stationnaire (en $mL^{-1}s^{-1}$)
N : Nombre moyen de cristaux par gouttes (± 0.01)
V : Volume moyen d'une goutte ($2{,}5.\ 10^{-4} \pm 10^{-5}$mL)
Δt : Temps de nucléation (± 60 s)

On connait également la solubilité C_s du lysozyme à 20°C dans les conditions de l'expérience (C_s = 3.17 mg/ml dans le tampon 0.7M NaCl pH=4.5[39]). On calcule donc la sursaturation β correspondant à chaque concentration et on trace l'évolution de J en fonction de la sursaturation β (Figure 49 (a)).

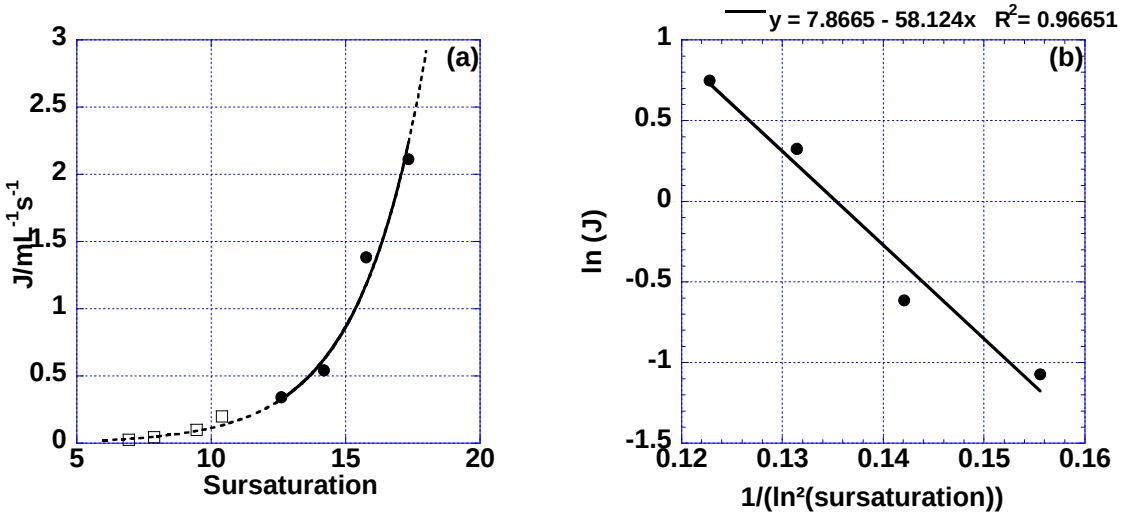


Figure 49 : (a) Évolution de J en fonction de la sursaturation, d'après nos résultats expérimentaux (●) et d'après Galkin et al.[40] (□), les barres d'erreur sont inférieures à la taille des points ; (b) Évolution de ln(J) en fonction de 1/(lnβ)² et équation de la droite ajustant nos points expérimentaux.

Comme on l'a vu précédemment dans le Chapitre 1 : Bibliographie partie 1.3, J peux être calculée à partir de l'Équation 7.

$$J = K_0 \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3 \ln^2 \beta} \right)$$

Équation 7

J : Fréquence de nucléation stationnaire (en $m^{-3}s^{-1}$)
K_0 : Facteur cinétique caractéristique d'un couple cristal solution (en $m^{-3}s^{-1}$)
k : Constante de Boltzman $1.3806503.10^{-23}$ $J.K^{-1}$
T : Température (en K)
Ω : Volume d'une molécule de soluté (en m^3)
β : Sursaturation (sans unité)
γ : Énergie interfaciale moyenne agrégat/solution ($J.m^{-2}$)

La Figure 49 (b) montre bien que ln(J) évolue linéairement en fonction de $1/(\ln\beta)^2$ et l'équation de la droite nous renseigne sur la valeur du coefficient B de l'Équation 11.

$$\ln(J) = \ln(K_0) - \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3} \left(\frac{1}{\ln^2 \beta} \right) = A - B \left(\frac{1}{\ln^2 \beta} \right)$$

Équation 11

On utilise alors la valeur de B pour calculer l'énergie interfaciale moyenne γ entre le cristal et la solution, suivant l'Équation 12 :

$$B = \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3} \text{ et par conséquent } \gamma = \sqrt[3]{\frac{B \times 3 \times (kT)^3}{16\pi \times \Omega^2}}$$

Équation 12

B : 58.124
k : Constante de Boltzman $1.3806503.10^{-23}$ $J.K^{-1}$
T : Température 293.15 K
Ω : Volume d'une molécule de lysozyme 3.10^{-26} m^3
γ : Énergie interfaciale moyenne agrégat/solution ($J.m^{-2}$)

Donc : $\gamma = 0.63$ $mJ.m^{-2}$

Cette valeur de γ est en accord avec les valeurs obtenues lors d'autres expériences de nucléation du lysozyme menées dans les mêmes conditions expérimentales qui aboutissent à 0.51-0.64 $mJ.m^{-2}$ pour le groupe de Vekilov[40] et 0.91 $mJ.m^{-2}$ pour le groupe de Fraden[55].

Cependant, il faut noter qu'il s'agit d'un γ apparent calculé en utilisant l'équation utilisée de la nucléation primaire homogène. La nucléation étant très probablement hétérogène il reste une indétermination sur cette valeur. Pour être exact, il faudrait introduire dans la formule le facteur f de Liu[18] afin de tenir compte de l'hétérogénéité de la nucléation.

$$\gamma_{Calculé} = \gamma_{Homogéne} \times \sqrt[3]{f}$$

Équation 13

Cette méthode microfluidique permet donc de déterminer directement et de manière précise et rapide la fréquence de nucléation J. Le grand nombre de gouttes utilisées pour chaque expérience de cette étude a permis d'obtenir des données statistiquement fiables. De plus, l'utilisation de goutte de 250nL permet de réduire considérablement la quantité de produits nécessaire pour mener à bien une telle étude, l'ensemble des expériences de mesure de la fréquence de nucléation n'ayant consommé que 30mg de lysozyme au total. En utilisant un système semblable, mais avec des canaux de 100µm de large, on obtient alors des gouttes de 2 nL pour une consommation de lysozyme de 0,3mg seulement. De plus, le faible volume des gouttes réduisant le nombre de cristaux dans chaque goutte nous avons pu travailler à des sursaturations élevées. Nous avons ainsi pu mesurer des fréquences de nucléation de 0.3 à 3 nuclei.mL^{-1}.s^{-1} alors que les expériences menées par Galkin et al. sur des volumes de 700 nL donnent des fréquences de nucléation accessibles à la mesure entre ≈ 0.007 et ≈0.7 nuclei.mL^{-1}.s^{-1} [50]. La microfluidique permet ainsi de tester les modèles théoriques sur des plages de sursaturation bien plus grande que d'autres techniques.

En conclusion, la méthode microfluidique développée dans cette première partie a été validée par l'étude de la cristallisation du lysozyme. Ainsi, elle nous a permis de mesurer la limite de zone métastable ainsi que la fréquence de nucléation. Ces études ont chacune donné lieu à une publication.

1.5 Article 1

Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool

M. Ildefonso, E. Revalor, P. Punniam, J.B. Salmon, N. Candoni et S. Veesler
Journal Of Crystal Growth, 2012, 9-12

Résumé :

Nous présentons deux résultats principaux dans cet article : 1) un système microfluidique simple d'utilisation et pouvant facilement être transféré dans un laboratoire non-spécialiste en microfluidique ; 2) une méthode précise pour mesurer la limite de zone métastable. Nous définissons une zone du diagramme de phase où la nucléation à de grandes chances d'être mononucléaire, c'est à dire qu'il y a au maximum un cristal par goutte. Par ailleurs, nous avons réussi à faire nucléer et à stabiliser un cristal d'une phase métastable. Cette approche microfluidique est très prometteuse tant du point de vue du contrôle que de l'étude des processus de cristallisation.

Author's personal copy

Journal of Crystal Growth 342 (2012) 9–12

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Crystal Growth

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcrysgro

Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool

M. Ildefonso [a], Eve Revalor [a], P. Punniam [a], J.B. Salmon [b], N. Candoni [a], Stéphane Veesler [a,*]

[a] Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille, CNRS, Aix-Marseille Université, CINaM-UPR 3118, Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex, France
[b] Laboratoire du futur, unité mixte Rhodia/CNRS/Bordeaux-1, 33608 Pessac Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 July 2010
Accepted 12 November 2010
Available online 19 November 2010

Keywords:
A1. Nucleation
A2. Growth from solutions
B1. Proteins

ABSTRACT

We present an easy-to-use microfluidic set-up, easily transferable to the laboratory and determine an accurate method for metastable zone width measurement. We clearly define a zone in the phase diagram where nucleation is mononuclear. We nucleate a single crystal of metastable phase, which turns out to be stable. This approach holds promise for the control and the study of crystallization processes.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Miniaturization of tools to crystallize organic molecules and proteins is a hot topic. Novel methods such as crystallization robots for high-throughput screening [1] and emulsion-based methods have been developed. Examples of the latter include spherical crystallization by the quasi-emulsion method [2,3], methods using the miscibility gap in the phase diagram [4] or microfluidic methods [5]. Working with small volume systems has already proved valuable and holds great promise for the control and the study of crystallization processes, for instance, producing crystals of controlled size [6]. In practice, this makes it possible to increase the number of experiments and decrease the amount of material used [7–9].

In this paper, we focus on nucleation, with an easy-to-use and easily transferable to the laboratory (this technology can be implemented in standard laboratory environments) microfluidic set-up developed by Laval et al. [10,11]. Hundreds of droplets can be formed and stored in a microfluidic chip. These droplets are independent micro-reactors in which the confinement makes it possible to dissociate crystal nucleation from growth, allowing nucleation to be studied and controlled. The high number of droplets in the microfluidic chip yields a large sample of independent crystallization events, a prerequisite for statistical analysis of a stochastic process such as nucleation. Currently, the supersaturation range over which experiments can be performed is rather limited due to the metastable zone. In addition, the nucleation rate J can only be measured in the vicinity of the metastable zone limit [12]. Thus, determination of the metastable zone width is a key step in nucleation studies. Here, we develop a method to measure metastable zone width. By using it to examine a protein, the lysozyme, we isolate and observe a metastable polymorph.

2. Materials and methods

2.1. Protein solutions

Hen-egg white lysozyme (14600 Da, $pI=11.2$) was purchased from Sigma (batch 057K7013 L 2879) and was used without further purification. The purity of lysozyme was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH=4.5 with NaOH (1 M) and filtered through 0.22 μm Millipore filters. The pH was checked with a pHmeter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were controlled by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) taking an extinction coefficient of 2.64 mL cm^{-1} mg^{-1} at 280 nm. In all the crystallization experiments hereunder, the NaCl concentration was fixed at 0.7 M at pH=4.5.

2.2. Droplet generation and storage

The basic microdevice design and construction was previously described [10]. In our adaptation, shown in Fig. 1, microfluidic chips are divided into 2 parts: the plug factory zone for the generation of droplets and the droplet storage zone.

Plug factory: protein and salt solutions are injected (points 1 and 2 in Fig. 1a) at a rate of 300 μL/h with syringe pumps (Bioseb BS800) and thus mixed by diffusion. Droplets are generated at the intersection between the silicone oil (Sigma oil AP 100, viscosity 940 cSt) and

* Corresponding author. Tel.: +336 6292 2866; fax: +334 9141 8916.
E-mail address: veesler@cinam.univ-mrs.fr (S. Veesler).

0022-0248/$ - see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.11.098

Author's personal copy

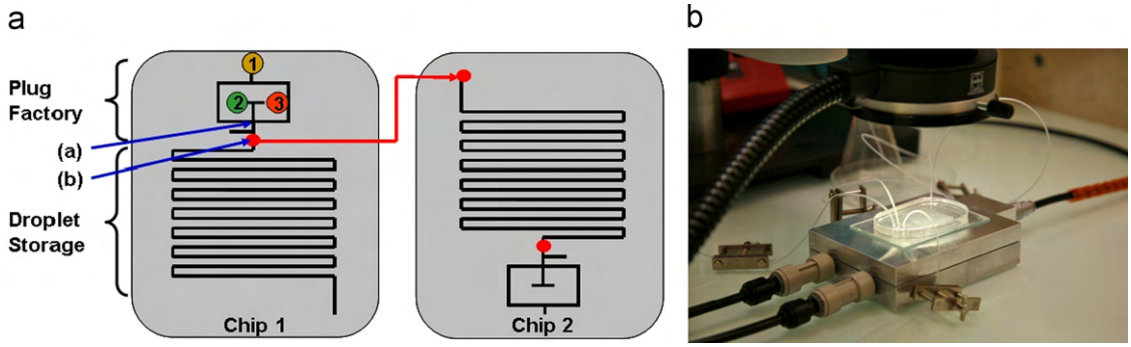


Fig. 1. (a) Design of the microdevice: oil, protein and NaCl solutions are injected in inlets (1), (2) and (3), respectively, (channel width 500 μm) and (b) microfluidic experimental set-up with thermostatted sample-holder.

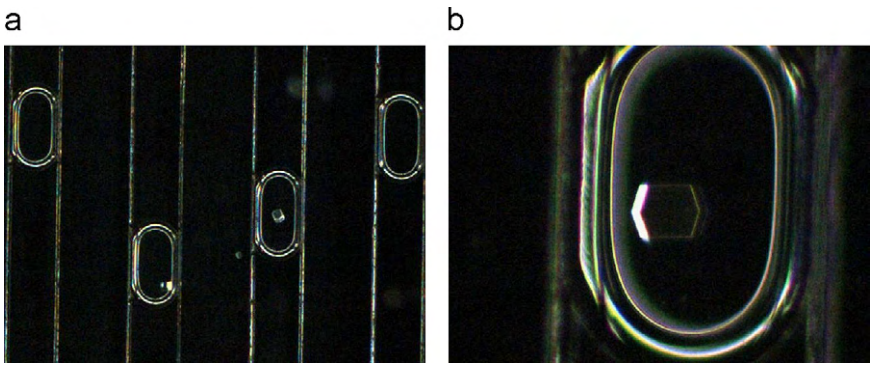


Fig. 2. (a) and (b) Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL—0.7 M NaCl—pH = 4.5) observed after stored 20 h (channel width 500 μm).

Table 1
Experimental conditions for metastable zone width determination.

Protein concentration (mg/mL)	Temperature (°C)			
15	15	20	25	30
20	20	25	30	35
30	25	30	35	40
50	30	35	40	45

aqueous streams (point (a) in Fig. 1a), the total flow rate for the oil being 1.4 mL/h. Each droplet has a volume of 250 nL with a volume polydispersity of a few percent [11,13].

Up to 200 droplets are stored, either in the same chip or in another; in this latter case chip 2 is connected to the outlet of the chip 1 plug factory zone (point (b) in Fig. 1a) using micro-tubing (SCI, BB311-24) of 584 μm inner diameter. This procedure allows us to fill several chips with the same chemical composition.

2.3. Determining metastable zone

In order to determine the metastable zone width for lysozyme solutions at pH = 4.5, we fill 4 microfluidic devices with the same solution and store them at different temperatures for 20 h. Then we observe and count crystals that have nucleated in each drop with a stereomicroscope (Wild Makroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK 31BF03). During observation the device is thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France) (Fig. 1b). Typical images at different magnifications are shown in Fig. 2. Different concentrations were tested; experimental conditions are summarized in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Metastable Zone (MZ) width

The metastable zone limit is characterized by the maximum temperature above which the supersaturated solution can stay for the required time, here 20 h, without losing its metastability [14]. This temperature (at which there is no crystal), T_{MZ}, is extrapolated (interpolation) from a plot of the average number of crystals versus temperature (Fig. 3a). Experimental results are summarized in Table 2, i.e. average number of crystals versus temperature for different protein concentrations. Note that we nucleated solely tetragonal lysozyme after 20 h for temperature ranging from 15 to 40 °C.

According to our experimental results the pair protein concentration—T_{MZ} is a point on the curve that limits the metastable zone. In Fig. 3b, a plot of these pairs for different protein concentrations is presented together with the solubility curve [15]. The metastable zone that we are interested in is situated between the solubility curve and the MZ limit. Note that here we obtained the MZ limit after only 4 experiments because we were able to fill several storage chips using only one generation chip (see part 2.2.). Moreover, the high number of reproducible droplets in the microfluidic chip permits an accurate statistical analysis. To summarize, we show here that this microfluidic method is an accurate and easy-to-use way to determine MZ width.

3.2. Mononuclear vs polynuclear nucleation

In the literature, mononuclear nucleation is often claimed for small volume systems, namely droplet methods [16] or microfluidic methods. However, this was recently questioned both

Author's personal copy

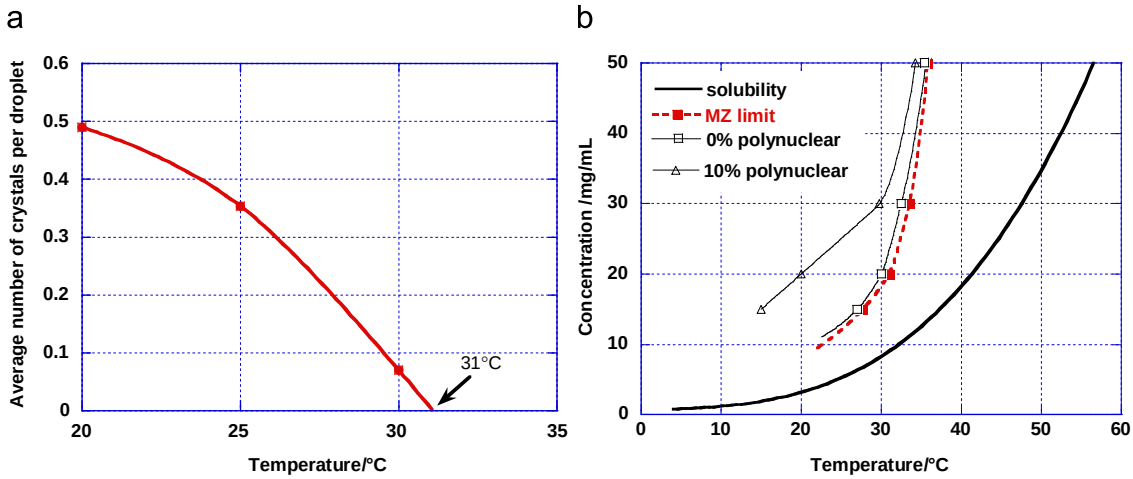


Fig. 3. (a) Average number of crystals per droplet versus temperature after 20 h, lysozyme at 20 mg/ml, NaCl 0.7 M and pH=4.5 and (b) tetragonal lysozyme (0.7 M NaCl—pH=4.5) solubility versus temperature according to [15], MZ limit and limit between mono and polynuclear mechanism (see text for explanation), lines improve legibility.

Table 2
Results for metastable zone width determination.

Protein concentration (mg/mL)	[a]	Temperature (°C)							
		15	20	25	30	35	40	T_{MZ} [b]	T_{polyN} [c]
15	0	57.05	64.52	90.97	99.20				
	1	31.29	27.74	4.17	0.8				
	>1	11.66	7.74	4.86	0			27.7	25 < T < 27.7
	<n>	0.601	0.471	0.201	0.008				
	N	163	155	144	125				
20	0		64.52	76.55	94.37	100			
	1		24.52	17.24	4.23	0			
	>1		10.96	6.21	1.41	0		31.0	30.0
	<n>		0.490	0.354	0.070	0			
	N		155	145	142	103			
30	0			69.62	59.84	100	96.49		
	1			27.85	31.50	0	3.51		
	>1			2.53	8.66	0	0	33.5	32.5
	<n>			0.342	0.496	0	0.035		
	N			158	127	122	114		
50	0				18.44	79.57	100		
	1				35.46	16.13	0		
	>1				46.10	4.30	0	35.8	35.6
	<n>				1.794	0.258	0		
	N				141	93	101		

[a] 0, 1 and >1 correspond to 0, 1 and more than 1 crystal per droplet in percentage, <n> is the average number of crystals per droplet and *N* the total number of droplets.
[b] T_{MZ} extrapolated temperature of metastable zone limit
[c] T_{polyN} extrapolated temperature for polynuclear nucleation

theoretically [17] and experimentally [18]. Here, we are able to determine a clear zone in the phase diagram where it was observed a single nucleation event, that is to say is mononuclear. From the data presented in Table 2, we can extrapolate a T_{polyN} from the evolution of number of crystals with temperature, at a fixed protein concentration. For this purpose, an extrapolation similar to the one used for T_{MZ} is applied to the percentage of droplets where more than one crystal is observed. At T_{polyN} and above, the probability of observing more than one crystal in a droplet is 0. Data are presented in the last column of Table 2 and plotted in Fig. 3b, leading to a polynuclear limit. The mononuclear zone is situated between the MZ limit and the polynuclear limit. Below this limit, the probability of obtaining more than 1 crystal increases. This mononuclear zone is very narrow (Fig. 3b); to widen it we plotted the 10% limit (Fig. 3b), i.e. where 10% of droplets contain more than 1 crystal. This strategy yields a greater experimental zone maximizing the number of droplets with 1 crystal.

3.3. Polymorphism

By controlling the nucleation mechanism, monodisperse particles can be produced [6]. This is useful in order to isolate a metastable phase. Indeed, it was recently shown that in small volume systems the probability of observing a metastable phase is increased [13,19]. Because of the mononuclear nucleation, the nucleated crystal of the metastable phase being alone cannot dissolve. Thus, small volumes are able to "freeze" the metastable phase [19]. Moreover, the higher supersaturations reached in small volume systems increase the probability of nucleating a metastable phase [20].

Author's personal copy

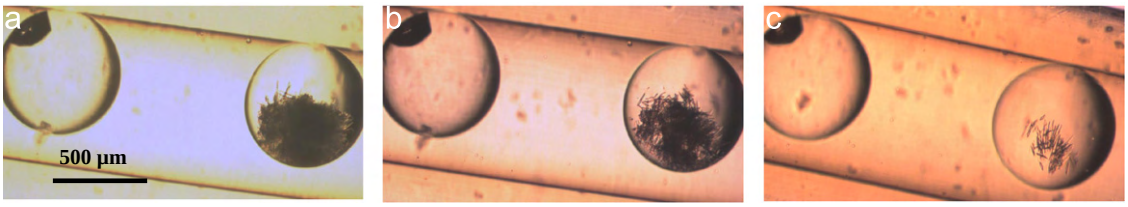


Fig. 4. Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL (0.7 M NaCl—pH = 4.5) observed (a) at 20 °C after stored 20 h at 6 °C, after increasing temperature to 30 °C, (b) after 6 min and (c) after 12 min.

We tested this assertion with lysozyme crystallization for which different polymorphs are known [21,22]. In part 3.1. we showed that with temperatures from 15 to 40 °C we nucleated solely tetragonal lysozyme after 20 h. To nucleate a new phase, we therefore performed experiments at 20 mg/mL and 6 °C for 20 h and we observed (at $T = 20$ °C) a different crystal habit (the sea-urchin habit) in 6 droplets out of 237 (Fig. 4). In a morphodrom of lysozyme crystals, at pH 4.6 and in NaCl solution, Tanaka et al.[23] previously observed the sea-urchin habit but did not assigned it to a new phase. Thus, varying temperature, we verified whether if the 2 crystal habits corresponded to 2 different phases [24] (Fig.4). We increased the temperature to 30 °C and observed the dissolution of the sea urchin-like habit (on the right in Fig. 4b–c) whereas the tetragonal lysozyme (on the left in Fig. 4b–c) was stable and probably continued growing. In addition, we estimate the concentration in the droplet. We assume that droplets are spherical with a diameter of 500 µm and that their initial concentration of lysozyme is of 20 mg/ml. Hence, if a cubic shape lysozyme crystal of 50 µm of edge emerges in a droplet, it decreases its concentration of 5%, that is to say the final concentration is around 19 mg/mL.

In fact, the equilibrium temperature of tetragonal lysozyme, in this experimental condition, is about 40 °C (Fig. 3b). Moreover, using the bracketing method [25] we estimate at ± 1 °C the equilibrium temperature to be 24 °C for the sea urchin phase in suspension in a 19 mg/mL lysozyme solution. Using this microfluidic method, therefore, we successfully isolate a metastable phase.

4. Conclusion

In this paper, we have shown how an easy-to-use microfluidic set-up, easily transferable to the laboratory (this technology can be implemented in standard laboratory environments), in conjunction with an appropriate method, enables the metastable zone width of a protein to be measured. The technique also enables a zone in the phase diagram where nucleation is mononuclear (one crystal per droplet) to be defined. We also demonstrate the nucleation of a single crystal of a metastable phase, which turns out to be stable; because the metastable phase is "frozen" in the droplet due to the high supersaturations reached in small volume droplets generated by the microfluidic system.

Acknowledgements

We thank T. Bactivelane (CINaM) and M. Audiffren (Anacrismat) for their help in the development of the thermostatted sample-holder. ER and SV thank the Sanofi-Aventis group for the financial support and M. Sweetko for the English revision.

References

[1] R.C. Stevens, High-throughput protein crystallization, Curr. Opinion Struct. Biol. 10 (2000) 558–563.
[2] Y. Kawashima, M. Okumura, H. Takenaka, Spherical crystallization: direct spherical agglomeration of salicilyc acid crystals during crystallization, Science 216 (1982) 1127–1128.
[3] F. Espitalier, B. Biscans, C. Laguerie, Particle design Part B: batch quasi-emulsion process and mechanism of grain formation of ketoprofen, Chem. Eng. J. 68 (1997) 103–114.
[4] S. Veesler, E. Revalor, O. Bottini, C. Hoff, Crystallization in the Presence of a Liquid–Liquid Phase Separation, Org. Process Res. Dev. 10 (2006) 841–845.
[5] J. Leng, J.B. Salmon, Microfluidic crystallization, Lab Chip 9 (2009) 24–34.
[6] R.D. Dombrowski, J.D. Litster, N.J. Wagner, Y. He, Crystallization of alpha-lactose monohydrate in a drop-based microfluidic crystallizer, Chem. Eng. Sci. 62 (2007) 4802–4810.
[7] L. Li, D. Mustafi, Q. Fu, V. Tereshko, D.L. Chen, J.D. Tice, R.F. Ismagilov, Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins, Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006) 19243–19248.
[8] J.-U. Shim, G. Cristobal, D.R. Link, T. Thorsen, S. Fraden, Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein, Crystal Growth & Design 7 (2007) 2192–2194.
[9] T.M. Squires, S.R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, Rev. Mod. Phys. 77 (2005) 977.
[10] P. Laval, J.-B. Salmon, M. Joanicot, A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics, J. Cryst. Growth 303 (2007) 622–628.
[11] P. Laval, A. Crombez, J.-B. Salmon, Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements, Langmuir 25 (2009) 1836–1841.
[12] E. Revalor, Z. Hammadi, J.P. Astier, R. Grossier, E. Garcia, C. Hoff, K. Furuta, T. Okutsu, R. Morin, S. Veesler, Usual and Unusual Crystallization from Solution, J. Cryst. Growth 312 (2010) 939–946.
[13] P. Laval, C. Giroux, J. Leng, J.-B. Salmon, Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism, J. Cryst. Growth 310 (2008) 3121–3124.
[14] D. Kashchiev, D. Verdoes, G.M. Van Rosmalen, Induction time and metastability limit in new phase formation, J. Cryst. Growth 110 (1991) 373–380.
[15] E. Cacioppo, M.L. Pusey, The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4, J. Cryst. Growth 114 (1991) 286–292.
[16] D. Kashchiev, D. Clausse, C. Jolivet-Dalmazzone, Crystallization and Critical Supercooling of Disperse Liquids, J. Colloid Interface Sci. 165 (1994) 148–153.
[17] R. Grossier, S. Veesler, Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems, Cryst. Growth Des. 9 (2009) 1917–1922.
[18] R. Grossier, A. Magnaldo, S. Veesler, Ultra-fast crystallization due to Confinement, J. Crystal Growth 312 (2010) 487–489.
[19] A.Y. Lee, I.S. Lee, A.S. Myerson, Factors Affecting the Polymorphic Outcome of Glycine Crystals Constrained on Patterned Substrates, Chem. Eng. Technol. 29 (2006) 281–285.
[20] D. Mangin, F. Puel, S. Veesler, Polymorphism in Processes of Crystallization in Solution: A Practical Review, Org. Process Res. Dev. 13 (2009) 1241–1253.
[21] M. Ataka, M. Asai, Systematic studies on the crystallization of lysozyme, J. Cryst. Growth 90 (1988) 86–93.
[22] L. Legrand, M. Ries-Kautt, M.-C. Robert, Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility, Acta Crystallogr. Sect. D 58 (2002) 1564–1567.
[23] S. Tanaka, M. Yamamoto, K. Ito, R. Hayakawa, Relation between the phase transition and the crystallization in protein solutions, Phys. Rev.E 56 (1997) 67–69.
[24] J.P. Astier, S. Veesler, Using temperature to crystallize proteins: a mini-review, Cryst. Growth Des. 8 (2008) 4215–4219.
[25] W. Beckmann, R. Boistelle, K. Sato, Solubility of the A, B and C polymorphs of stearic acid in decane, methanol,butanone, J. Chem. Eng. Data 29 (1984) 211–214.

1.6 Article 2

Using microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics

M. Ildefonso, N. Candoni et S. Veesler
Crystal Growth and Design, 2011, 11 (5), 1527-1530

Résumé :

Dans cet article, nous mesurons la cinétique de nucléation du lysozyme en utilisant un système microfluidique simple à utiliser et à fabriquer décrit dans l'article précédent. Nous confirmons ainsi que la microfluidique est un moyen direct, précis et rapide pour mesurer une fréquence de nucléation en utilisant seulement quelques milligrammes de produit. De plus, notre système microfluidique permet, grâce à la réduction des volumes de solution à cristalliser, d'étendre la gamme de sursaturation accessible expérimentalement. Enfin, ce système peut être appliqué à l'étude de la cristallisation de tout type de molécules solubles dans l'eau.

CRYSTAL GROWTH & DESIGN

ARTICLE

pubs.acs.org/crystal

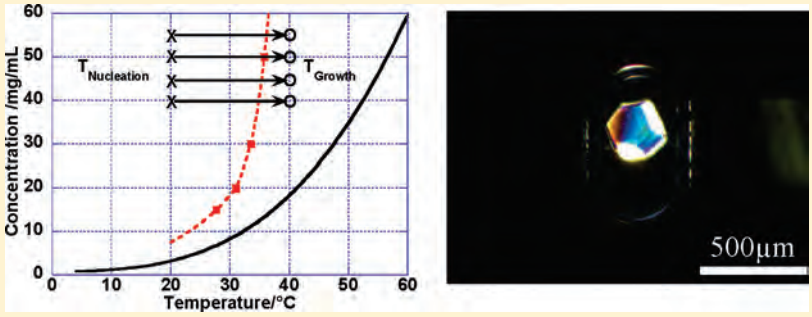
Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics

Published as part of a virtual special issue of selected papers presented at the 9th International Workshop on the Crystal Growth of Organic Materials (CGOM9).

M. Ildefonso, N. Candoni, and S. Veesler*

Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille CINAM—CNRS, Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France, In association with Marseille Universities

ABSTRACT:



Here we measure lysozyme nucleation kinetics using an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup previously described. We confirm that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure nucleation frequency using only a few milligrams of molecules. Moreover, our microfluidics setup, by diminishing crystallizer volumes, increases the experimental supersaturation range accessible and can be applied to all water-soluble molecules.

1. INTRODUCTION

In this paper, we focus on nucleation, which plays a fundamental role in crystallization processes, notably determining the physical properties of crystals, including crystal size distribution and phases. The control of nucleation kinetics is a real challenge in many scientific fields, for instance in biology and pharmacology. Although a great deal is known about crystal growth, considerably less is known about crystal nucleation because of the difficulty of obtaining reliable kinetic data. Reliable data are difficult to obtain because nucleation is a stochastic phenomenon and, therefore, an accurate determination of nucleation kinetics requires a large sample of independent nucleation events. With a view to generating kinetic data, microfluidics offers an interesting potential for the control and the study of nucleation, by enabling the number of experiments to be increased and the quantity of molecules to be decreased.[1−4] Here, we employ an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup developed by Salmon,[5,6] which we had previously adapted for nucleation research.[7] The hundreds of droplets generated in the microfluidics chip yields a large sample of independent nucleation events. We then investigated the nucleation kinetics of hen-egg white lysozyme (HEWL) using the double pulse technique.[8−10]

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Protein Solutions. HEWL (molecular weight = 14.6 kDa and isoelectric point = 11.2) was purchased from Sigma (batch 057K7013 L 2879) and used without further purification. The purity of lysozyme was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH = 4.5 with NaOH (1 M) and filtered through 0.22 μm Millipore filters. The pH was checked with a pH meter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were checked by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) using an extinction coefficient of 2.64 mL cm^{-1} mg^{-1} at 280 nm. In all the crystallization experiments hereunder, the NaCl concentration was fixed at 0.7 M at pH = 4.5.

2.2. Droplet Generation and Storage. The basic microdevice design is fabricated in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) by using soft-lithographic techniques (Figure 1a); the construction and procedure were previously described.[5,7] Protein and salt solutions were injected into the 500 μm-channel of the chip at a rate of 300 μL/h with syringe pumps (Bioseb BS800) and thus mixed by diffusion. Droplets were generated at the intersection between the silicone oil (Sigma oil AP 100, viscosity 940cSt) and aqueous streams using the flow focusing method[11,12] (Figure 1b). Up to

Received: October 27, 2010
Revised: March 4, 2011

 © XXXX American Chemical Society

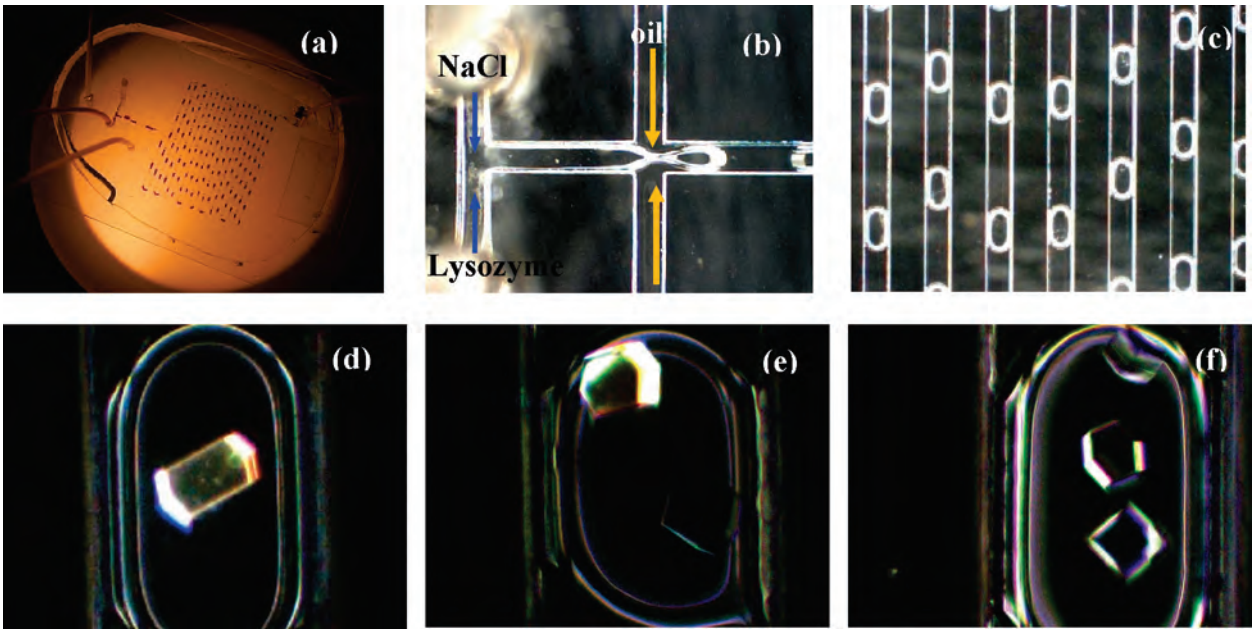


Figure 1. (a) Image of the device, (b) zoom of the inlets of the plug factory showing droplet formation, (c) image of the stored droplets, and (d−f) examples of lysozyme droplets observed after 20 h, at $T_{nucleation}$ = 20 °C and T_{growth} = 40 °C (channel width 500 μm).

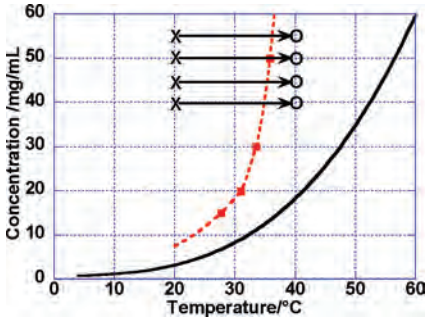


Figure 2. Tetragonal lysozyme (0.7 M NaCl, pH = 4.5) solubility versus temperature according to Cacioppo et al.[17] and metastable zone curves according to Ildefonso et al.;[7] lines improve legibility. Points (×) and (○) indicate nucleation and growth conditions, respectively. Arrows represent the experimental path in the phase diagram.

200 droplets were stored in one chip (Figure 1c); each droplet had a volume of 250 nL with a volume polydispersity of a few percent.[6,13] Using the plug factory zone (Figure 1b) for the generation of droplets,[7] several chips could be filled with the same chemical composition. Then the crystals that had nucleated in each drop were observed and counted under a stereomicroscope (Wild Makroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK 31BF03). During observation, the device was thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France). Typical images are shown in Figure 1d−f.

2.3. Determination of Nucleation Rate. We used the double pulse technique,[8−10] allowing direct determination of the steady-state rate of primary nucleation. At the beginning of an experiment, the solution was loaded into the chip at a temperature chosen to prevent nucleation of crystals, T_{growth}. In order to obtain nucleation, we lowered the temperature to a selected $T_{nucleation}$. After a period of Δt (nucleation time), temperature was raised from $T_{nucleation}$ to T_{growth} (Figure 2). At T_{growth}, supersaturation was at a level where the nucleation rate was practically zero, but the crystals already formed could grow to detectable dimensions. The use of this method allows decoupling of nucleation and the ensuing growth. After the growth stage, the crystals nucleated at $T_{nucleation}$ during Δt are counted. After plotting the average number of crystals nucleated as a function of the Δt, the steady state nucleation rate is determined as represented by the slope of the straight line plotted. We fitted the experimental crystal distribution with a Poisson law, as previously reported by Galkin and Vekilov.[9] For all experimental conditions, here four chips were filled with the same solution, using the procedure described in section 2.1, allowing four nucleation times to be tested simultaneously. Chips were stored at $T_{nucleation}$ in an incubator; because temperature could be reached within 1 min, we used the shortest Δt of 15 min to avoid uncertainties due to T changes.[9] Moreover, evaporation of water through the PDMS layer is negligible in our experiments because it was previously shown that aqueous droplets stored at 60 °C in the same device decrease by 10% in about 4 h.[14] It must be noted that for long storage time at 40 °C if a second nucleation wave occurred, we would observe crystals of different sizes in the same droplet, and this is not the case here; see Figure 1e and f, for instance.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Experimental Parameters. With the double pulse technique, there are four parameters to adjust: $T_{nucleation}$, T_{growth}, concentration, and nucleation time. We chose a nucleation temperature of 20 °C, in order to compare our data with the data from the literature.[9,15] Since the T_{growth} needs to be in the metastable zone, we chose 40 °C (Figure 2), having previously measured the metastable zone width for lysozyme under the same conditions with the same microfluidics setup.[7] Preliminary measurements showed that the average number of crystals per droplet after 20 h at 20 °C is very low at 20 and 30 mg/mL. Therefore, we conducted experiments between 40 and 55 mg/mL. To test metastability, we also performed experiments at 40 °C, i.e. Δt = 0, for all experimental conditions. The constraint in choice of the nucleation time is the number of crystals

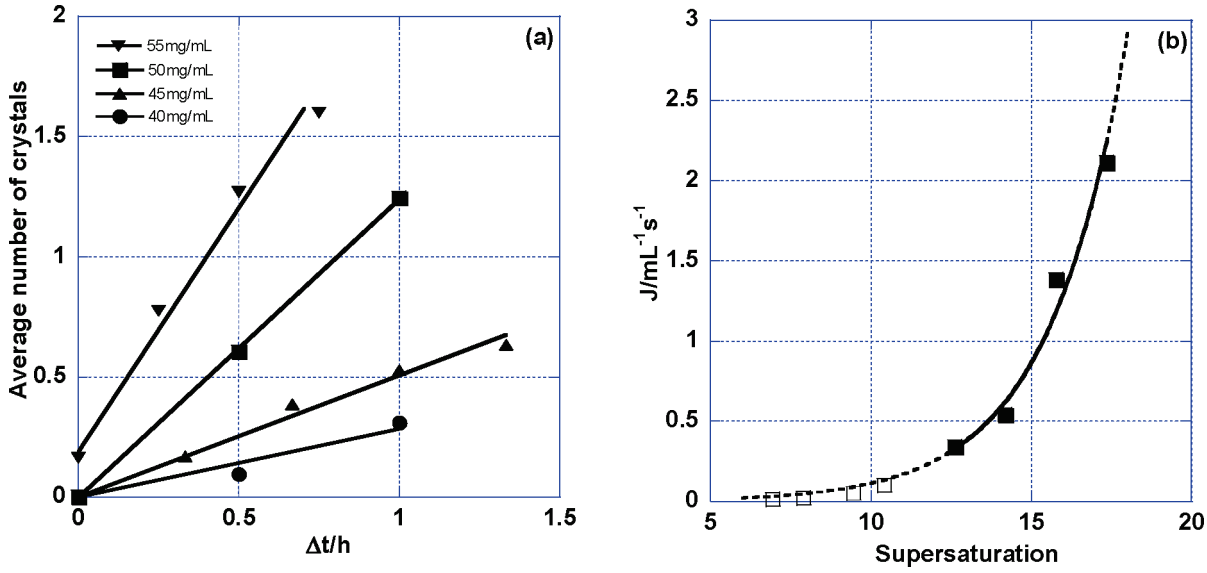


Figure 3. (a) Average number of lysozyme crystals nucleated in one droplet versus nucleation time (NaCl = 0.7 M and pH = 4.5), (b) primary nucleation rate vs supersaturation, at 20 °C, (■) from the slope of the straight lines of Figure 3a and (□) data, at 12.6 °C, C_s = 1.6 mg/mL, from Galkin and Vekilov.[18]

Table 1. Average Number of Lysozyme Crystals Nucleated in One Droplet[a]

	avg no. lysozyme crystals at the following nucleation times							
protein conc (mg/mL)	0 min	15 min	20 min	30 min	40 min	45 min	1 h	1 h 20 min
40	0			0.094 (3.1)			0.308 (1.7)	
45	0		0.170 (2.3)		0.385 (1.5)		0.528 (1.9)	0.633 (1.3)
50	0			0.606 (1.4)		1.245 (1.8)		
55	0.164 (4.0)	0.776 (2.0)		1.269 (1.7)		1.600 (1.3)		

[a] The deviation in % is given in parentheses.

nucleated per droplet. Due to the droplet volume, here 250 nL, the lysozyme concentration could not be considered constant if the nucleation time was too long, explaining the saturation effect observed. In practice, the average number of crystals per droplet no longer varied linearly with nucleation time. We therefore chose to use 15 min < Δt < 2 h (Figure 3a).

3.2. Primary Nucleation Rates. Table 1 summarizes the results of the nucleation experiments. Figure 3a shows that the time dependence of the average number of crystals nucleated in one droplet is linear, confirming steady state nucleation. Another important result is that, for all experimental conditions except the highest supersaturation, straight lines pass through the axis origins, indicating that the data are not affected by heterogeneous nucleation.[9] The presence of crystals at $\Delta t = 0$ for a lysozyme concentration of 55 mg/mL indicates that this solution is near its limit of metastability (Figure 1) and nucleation probably occurs during transfer to the incubator, after filling. Thus, in Figure 3b we plot the nucleation rate or nucleation frequency, J. Here, we only need to recall that [16]

$$J = K_0 \exp - \left(\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3 \ln^2 \beta} \right) \quad (1)$$

where K_0 is a pre-exponential factor, Ω is the volume of a molecule inside the crystal (3.10^{-20} cm^3 for tetragonal lysozyme[9]), γ is the crystal−solution interfacial free energy (J·m^{-2}), k is the Boltzmann constant (1.3805×10^{-23} J·K^{-1}), T is temperature (K), and β is the supersaturation, $\beta = C/C_s$, where C is the solution concentration and C_s is the solubility (C_s = 3.17 mg/mL in 0.7 M NaCl at pH = 4.5 and T = 20 °C[17]). From the data presented in Figure 3b we found γ = 0.62 mJ/m^2, a value in good agreement with previous determinations from lysozyme nucleation experiments under the same conditions: 0.51−0.64 mJ/m^2 for the Vekilov group[9,18] and 0.91 mJ/m^2 for the Fraden group.[15] Moreover, our kinetic data are also in good agreement with the data of Galkin and Vekilov[9] obtained for the same NaCl concentration at 12.6 °C (Figure 3b).

3.3. Discussion. The experimental results presented above demonstrate that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure J. Our results also confirm that at this scale, 250 nL, nucleation kinetics is not affected by volume; that is, to say there are no confined volume effects.[19,20] As our aim was to obtain reliable statistical data with the minimum quantity of materials, each experimental condition requires only one droplet storage device, i.e up to 200 droplets, which consumes less than 30 mg of lysozyme for the entire experiments presented here. However, we can expect to measure J in smaller chip channels; for instance, a decrease in channel diameter from 500 to 100 μm decreases droplet volume from 250 nL to 2 nL. In so doing, we would consume no more than 0.3 mg of lysozyme.

Finally, one of the limitations involved in measuring J is the supersaturation range over which the experiment can be performed. When β is too low, heterogeneous nucleation can replace homogeneous nucleation. When β is too high, J is difficult

to measure because it is too rapid. In practice, we are able to measure the nucleation frequency only in the vicinity of the metastable zone limit. In this paper, we show that when experimental volume is diminished, the range of experimentally measurable J is increased. For instance, Galkin and Vekilov[9] announced a dynamic range of nucleation rates accessible to their technique from ~0.7 to ~0.007 nuclei/mL·s. Here, with a four times lower volume, we access a range from ~3 to ~0.3 nuclei/mL·s, thus increasing the supersaturation range experimentally accessible (Figure 3b).

4. CONCLUSIONS

Here we measure lysozyme nucleation kinetics using an easy-to-use and simply constructed microfluidics setup. We confirm that microfluidics is a direct, accurate, and fast method to measure nucleation frequency using only a few milligrams of molecules. Moreover, our microfluidics setup, by diminishing crystallizer volumes, increases the experimental supersaturation range accessible. It would be interesting to test the effect on nucleation of even smaller volumes, as small volume systems offer promising properties.[19,20]

The advantage of this methodology and setup is its application to all water-soluble molecules, whether mineral, organic, or biological. We are now working on a setup using organic solvents with many potential applications, for instance for pharmaceutical molecules.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: 336 6292 2866. Fax: 334 9141 8916. E-mail: veesler@cinam.univ-mrs.fr.

■ ACKNOWLEDGMENT

We thank M. Audiffren (ANACRISMAT) and T. Bactivelane for their technical help. We thank N. Ferte for protein characterization and fruitful discussions. We thank M. Sweetko for English revision.

■ REFERENCES

(1) Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tereshko, V.; Chen, D. L.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (51), 19243–19248.

(2) Shim, J.-U.; Cristobal, G.; Link, D. R.; Thorsen, T.; Fraden, S. Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (11), 2192–2194.

(3) Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77* (3), 977.

(4) Leng, J.; Salmon, J. B. Microfluidic crystallization. *Lab Chip* **2009**, *9*, 24–34.

(5) Laval, P.; Salmon, J.-B.; Joanicot, M. A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics. *J. Cryst. Growth* **2007**, *303*, 622–628.

(6) Laval, P.; Crombez, A.; Salmon, J.-B. Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements. *Langmuir* **2009**, *25* (3), 1836–1841.

(7) Ildefonso, M.; Revalor, E.; Punniam, P.; Salmon, J. B.; Candoni, N.; Veesler, S. Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool. *J. Cryst. Growth* **2011**, article in press.

(8) Tsekova, D.; Dimitrova, S.; Nanev, C. N. Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196* (2−4), 226–233.

(9) Galkin, O.; Vekilov, P. G. Direct determination of the nucleation rates of protein crystals. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (3), 10965–10971.

(10) Revalor, E.; Hammadi, Z.; Astier, J. P.; Grossier, R.; Garcia, E.; Hoff, C.; Furuta, K.; Okutsu, T.; Morin, R.; Veesler, S. Usual and Unusual Crystallization from Solution. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 939–946.

(11) Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A. Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82* (3), 364–366.

(12) Joanicot, M.; Ajdari, A. Droplet Control for Microfluidics. *Science* **2005**, *309* (5736), 887–888.

(13) Laval, P.; Giroux, C.; Leng, J.; Salmon, J.-B. Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310* (12), 3121–3124.

(14) Laval, P.; Lisai, N.; Salmon, J. B.; Joanicot, M. A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams. *Lab Chip* **2007**, *7*, 829–834.

(15) Selimovic, S.; Jia, Y.; Fraden, S. Measuring the Nucleation Rate of Lysozyme using Microfluidics. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (4), 1806–1810.

(16) Boistelle, R.; Astier, J. P. Crystallization mechanisms in solution. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 14–30.

(17) Cacioppo, E.; Pusey, M. L. The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4. *J. Cryst. Growth* **1991**, *114*, 286–292.

(18) Galkin, O.; Vekilov, P. G. Are nucleation kinetics of protein crystals similar to those of liquid droplets?. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (1), 156–163.

(19) Grossier, R.; Magnaldo, A.; Veesler, S. Ultra-fast Crystallization due to Confinement. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 487–489.

(20) Grossier, R.; Veesler, S. Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (4), 1917–1922.

2 Vers l'étude de la nucléation en phase organique (Article 3)

Nous venons de voir un système microfluidique en PDMS associé à une méthode permettant de mesurer la LZM et la fréquence de nucléation de principes actifs pharmaceutiques solubles dans l'eau et qui présentent un faciès adapté au dénombrement des cristaux. Pour les principes actifs pharmaceutiques qui ne remplissent pas ces conditions, notre idée a été de développer un outil microfluidique plus polyvalent. Le but est de pouvoir utiliser des solvants organiques et des produits dont les cristaux ne sont pas dénombrables, en travaillant avec d'autres matériaux que le PDMS.

Afin de tirer parti des études que nous avons réalisées à l'aide de la puce microfluidique en PDMS, nous l'avons transformée progressivement pour la rendre compatible avec l'usage de solvants organiques. Dans un premier temps, nous avons cherché à modifier uniquement les puces de stockage et nous validons ce nouveau système en comparant la cristallisation du lysozyme à celle obtenue auparavant sur le système de stockage en PDMS. Dans un second temps, nous avons également transformé la "plug factory" et nous avons étudié la cristallisation de molécules d'intérêts pharmaceutiques.

2.1 Système polyvalent de stockage des gouttes

Le système microfluidique présenté dans la partie 1 utilise plusieurs puces de stockage en PDMS (4 dans nos expériences). À l'issue de chaque expérience, ces puces qui ont contenu des cristaux doivent être minutieusement lavées avant de pouvoir être utilisées à nouveau. Comme ces puces sont constituées d'un simple canal de 45cm de long qui ne nécessite pas forcément une fabrication par soft lithographie, on peut les fabriquer dans d'autres matériaux que le PDMS qui seraient suffisamment peu coûteux pour être à usage unique. Ainsi, nous détaillerons ici un système microfluidique de stockage en Téflon (SCI BB311-24) dont nous comparerons les résultats à ceux du stockage en puces PDMS.

2.1.1 Méthode de stockage de gouttes dans des capillaires en Téflon

Dans le paragraphe 1.3, nous avons montré que les capillaires en Téflon permettaient le stockage et l'observation des gouttes. Ils sont donc une alternative possible aux puces de stockage en PDMS. Ces capillaires sont compatibles avec les solvants organiques et ont un coût faible (environ 1€ le mètre et environ 1000 gouttes par mètre), ce qui permet d'envisager de ne pas les réutiliser. De plus, le diamètre des capillaires en Téflon (584 µm) étant légèrement supérieur à celui des canaux en PDMS (500µm), la forme des gouttes est modifiée, donnant des gouttes parfaitement sphériques, comme nous le montre la Figure 50 (a). Ainsi, un plus grand nombre de gouttes peut être stocké sur une même longueur. Cependant la nature semi-cristalline du Téflon le rendant biréfringent, voir Figure 50 (b), le contraste en lumière polarisée, avec des cristaux qui sont eux aussi biréfringents, est réduit.

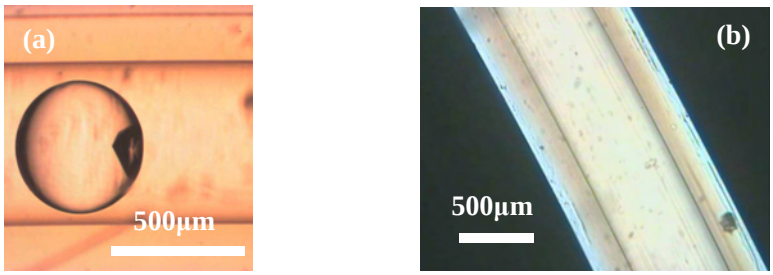


Figure 50 : (a) Photomicrographie d'une goutte de 250nL contenant un cristal dans un capillaire en Téflon (b) Photomicrographie d'un capillaire en Téflon observé en polarisation croisée

Le changement de matériau pour le système microfluidique de stockage des gouttes nécessite de modifier également l'huile utilisée. En effet, il est impératif que l'huile mouille correctement les parois afin de former des gouttes d'eau dans l'huile et non des gouttes d'huile dans l'eau. Comme la "plug factory" est en PDMS et le capillaire de stockage en Téflon, l'huile doit donc être mouillante à la fois pour le PDMS et le Téflon. On a alors sélectionné une huile silicone (affinité avec le PDMS) comportant des groupements latéraux fluorés (affinité avec le Téflon), vendue par Hampton Research sous le nom FMS Oil ou Poly(3, 3, 3-trifluoropropylmethylsiloxan). Cette huile permet de stabiliser les gouttes à l'intérieur du capillaire, les rendant immobiles durant au moins une semaine, ce qui prévient les risques de coalescence des gouttes. Enfin, cette huile possède un indice de réfraction de 1,38 très proche de celui du Téflon, ce qui facilite l'observation des gouttes.

Une longueur de capillaire en Téflon de 30cm est utilisée pour stocker environ 200 gouttes produites avec une "plug factory" en PDMS dans les mêmes conditions que pour le stockage dans des puces en PDMS. Pour cela, il suffit de raccorder le capillaire à la sortie de la "plug factory", de le laisser se remplir de gouttes puis de le déconnecter et de le remplacer par un capillaire vide. Une fois le capillaire rempli, il faut le fermer le plus hermétiquement possible pour éviter l'évaporation des gouttes. On chauffe alors l'extrémité du capillaire à la flamme jusqu'à ce qu'elle devienne translucide, puis on la pince avec une pince plate. Les gouttes contenues dans les capillaires ainsi fermés pourront être conservées plusieurs semaines sans évaporation détectable.

2.1.2 Limite de Zone Métastable

Afin de valider ce nouveau système, nous cherchons à déterminer si le fait de stocker les gouttes dans des capillaires en Téflon plutôt que dans des puces en PDMS modifie ou non la limite de zone métastable. Pour cela la LZM du lysozyme est déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe 1.2. On stocke donc des capillaires à différentes températures puis on observe après 20h le nombre de cristaux présents dans les gouttes de chaque capillaire.

On constate une différence lors du tracé de l'évolution du nombre de cristaux en fonction de la température par rapport à l'étude dans le PDMS. Avec un stockage des gouttes dans les capillaires en Téflon le nombre de cristaux par goutte décroit exponentiellement en fonction de la température, Figure 51 (a). Dans ce cas, au lieu de déterminer le point d'intersection entre la courbe et l'axe des abscisses comme pour le PDMS, la température T_{LZM} est donnée par la valeur à laquelle la courbe exponentielle atteint le seuil de 0,01 cristal par goutte, ce qui correspond à notre erreur de mesure. De plus, cette décroissance exponentielle est plus en accord avec la théorie classique de la nucléation, que la courbe polynomiale obtenue dans le PDMS.

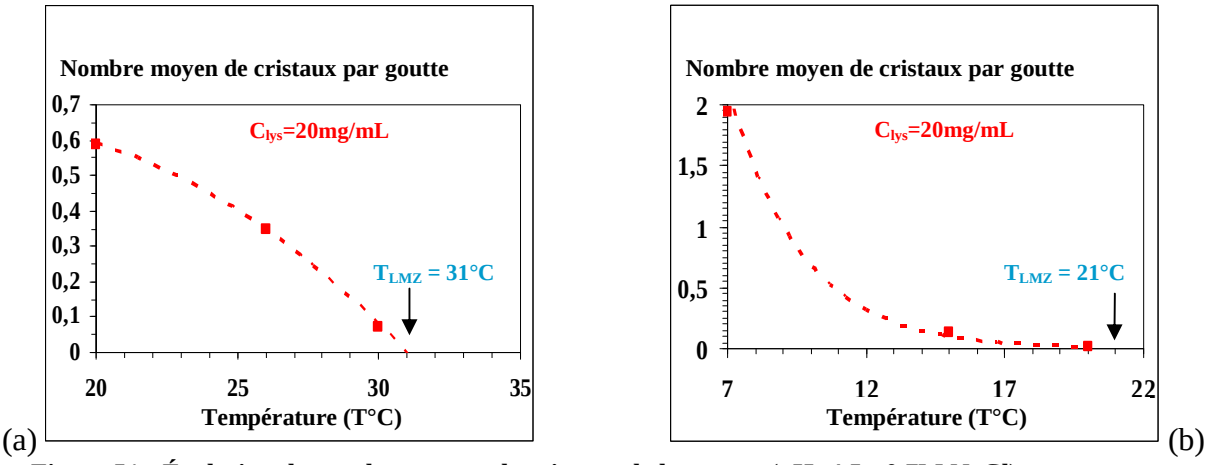


Figure 51 : Évolution du nombre moyen de cristaux de lysozyme (pH=4,5 ; 0,7M NaCl) par goutte en fonction de la température et détermination de la T_{LZM} : (a) dans le cas de gouttes stockées dans des puces en PDMS ; (b) dans le cas de gouttes stockées dans des capillaires en Téflon

On procède de même pour obtenir la T_{LZM} du lysozyme à des concentrations comprises entre 15 et 50 mg/ml. On compare alors les courbes de LZM obtenues dans les puces en PDMS et dans les capillaires en Téflon (respectivement en bleu et en rouge sur la Figure 52). Ces courbes présentent des différences significatives, en particulier pour les concentrations les plus faibles. Plus la concentration en lysozyme est élevée plus les courbes de LZM sont proches. On peut analyser cette différence comme étant due à la diminution de la nucléation hétérogène pour les gouttes stockées dans les capillaires en Téflon. En effet, deux facteurs sont modifiés par le changement de matériau : la forme des gouttes varie d'une forme allongée à des gouttes sphériques, ce qui réduit la surface de l'interface goutte/huile ; et la nature chimique des capillaires et de l'huile, tous les deux fluorés, modifie l'énergie de l'interface goutte/huile. Ces deux facteurs peuvent réduire la nucléation hétérogène à l'interface goutte/huile. Par ailleurs, la réduction de l'évaporation induite par l'utilisation des capillaires en Téflon contribue également à réduire la nucléation. Pour les concentrations en

lysozyme plus élevées, la nucléation homogène devient prépondérante sur la nucléation hétérogène expliquant la convergence des LZM pour ces concentrations.

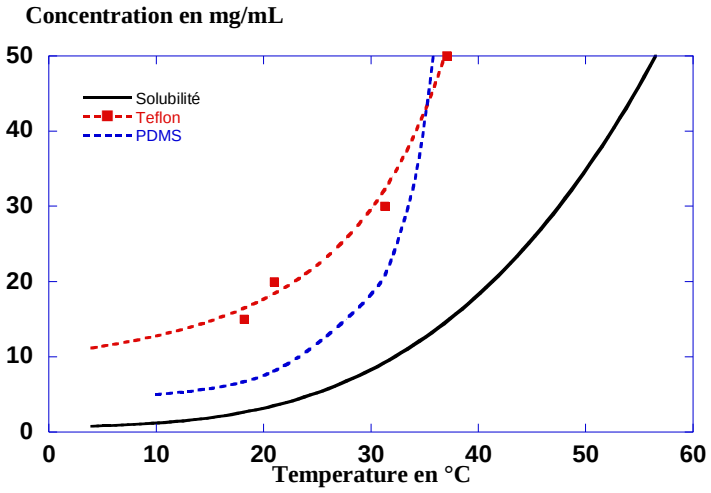


Figure 52 : Courbe de solubilité (en noir) et estimation de la LZM du lysozyme dans 0.7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h pour des gouttes stockées dans des puces en PDMS (en bleu) ou pour des gouttes stockées dans des capillaires en Téflon (en rouge)

Les différences observées sur les concentrations les plus basses lors de la détermination de la LZM du lysozyme indiquent des mécanismes de nucléation différents dans le PDMS et dans le Téflon. Si on se réfère à l'analyse de Liu[18] à l'aide du facteur f (page 28) qui traduirait l'effet de l'huile et du canal sur la nucléation, on peut écrire $f_{\text{Téflon}} > f_{\text{PDMS}}$. On se rapprocherait donc de conditions de nucléation homogène dans le montage en Téflon. Par contre aux concentrations plus élevées ($C \geq 30$mg/ml) les LZM sont sensiblement les mêmes.

2.1.3 Fréquence de nucléation

Nous prolongeons notre étude de l'influence du stockage dans les capillaires en Téflon sur la nucléation par la mesure de la fréquence de nucléation du lysozyme, en utilisant la méthode de la double pulsation thermique. Pour pouvoir comparer les résultats avec le stockage dans les puces en PDMS, nous utiliserons les conditions données dans le paragraphe 1.4, soit : T_n = 20°C ; T_c = 40°C ; concentrations comprises entre 40 et 50 mg/ml et temps de nucléation compris entre 15 minutes et 90minutes. La température de croissance T_c se situe bien dans la zone métastable déterminée dans le Téflon comme le montre la Figure 53.

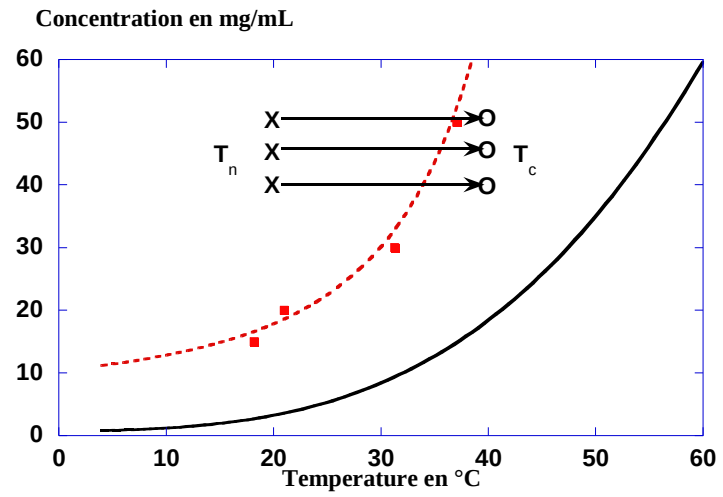


Figure 53 : Solubilité d'après [39] et LZM dans les capillaires en Téflon pour le lysozyme dans 0,7M de NaCl à pH=4,5 pour une durée de 20h. Les croix et les cercles indiquent respectivement les températures de nucléation T_n et de croissance T_c aux concentrations des expériences

De la même manière que pour les expériences dans le PDMS, on étudie l'évolution du nombre de cristaux par goutte stockée dans les capillaires en Téflon en fonction du temps de nucléation Δt à différentes concentrations. Les résultats sont reportés sur la Figure 54 (a). Nous retrouvons ici une dépendance linéaire entre le nombre de cristaux nucléés par goutte et Δt, de surcroit toutes les droites passent par l'origine. On peut alors calculer J à partir de la pente des droites et tracer l'évolution de J en fonction de la sursaturation (voir Figure 54 (b)). On constate une différence déjà visible sur les courbes de LZM, la fréquence de nucléation est plus basse dans les capillaires en Téflon pour les sursaturations les plus faibles, mais se rapproche de la fréquence de nucléation dans les puces en PDMS pour les sursaturations plus élevées. Nous allons voir que le paramètre *f* introduit par Liu[18] (voir p29) et qui traduit l'hétérogénéité de la nucléation permettrait de quantifier la différence entre la nucléation dans les puces en PDMS et la nucléation dans les capillaires en Téflon.

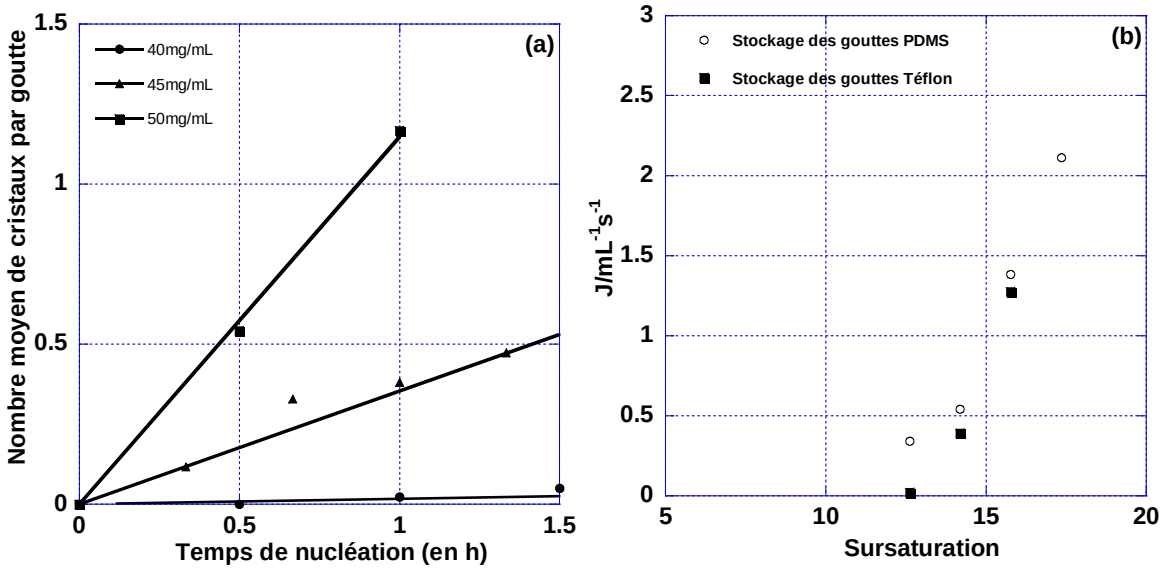


Figure 54 : (a) nombre moyen de cristaux de lysozyme (pH=4,5 ; 0,7M NaCl) par goutte en fonction du temps de nucléation (b) Fréquence de nucléation du lysozyme en fonction de la sursaturation à 20°C

Pour les sursaturations élevées, le type de stockage influe peu sur les fréquences de nucléation. Ce comportement provient probablement de la réduction de la nucléation hétérogène dans le cas du Téflon, comme nous l'avions expliqué pour la courbe de LZM. Nous pouvons alors approfondir l'étude du facteur f. En effet, cela va nous permettre de comparer quantitativement l'hétérogénéité de la nucléation entre les deux méthodes de stockage. Pour cela nous calculons le rapport $f_{\text{Téflon}}/f_{\text{PDMS}}$ en utilisant une méthode proche du calcul de γ utilisé précédemment page 74 en y ajoutant le facteur f.

$$J = K_0 \exp\left(- f \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3 \ln^2 \beta} \right)$$

Équation 9

J	: Fréquence de nucléation (en $m^{-3}s^{-1}$)
K_0	: Facteur cinétique caractéristique d'un couple cristal solution (en $m^{-3}s^{-1}$)
k	: Constante de Boltzman $1.3806503.10^{-23}$ $J.K^{-1}$
T	: Température (en K)
Ω	: Volume d'une molécule de soluté (en m^3)
β	: Sursaturation (sans unité)
γ	: Énergie interfaciale moyenne agrégat/solution ($J.m^{-2}$)
f	: Paramètre décrivant l'influence d'un substrat sur la nucléation ($0 < f \leq 1$)

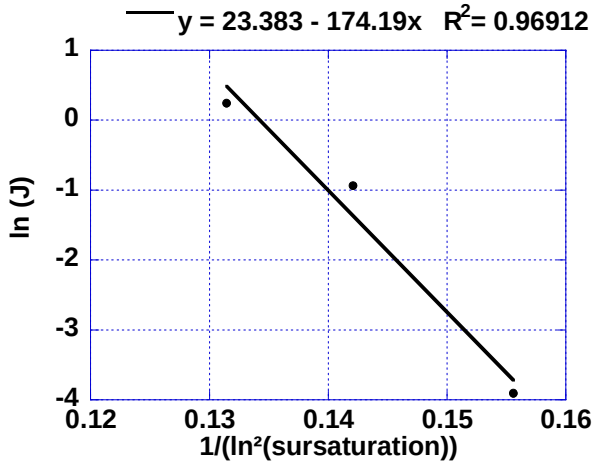


Figure 55 : Évolution de ln(J) en fonction de 1/(lnβ)² et équation de la droite ajustant nos points expérimentaux

La Figure 55 montre que ln(J) évolue linéairement en fonction de 1/(lnβ)² et l'équation de la droite nous renseigne sur la valeur du coefficient B de l'Équation 14.

$$\ln(J) = \ln(K_0) - f \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3} \left(\frac{1}{\ln^2 \beta} \right) = A - B \left(\frac{1}{\ln^2 \beta} \right) \text{ et par conséquent } B = f \frac{16\pi}{3} \frac{\Omega^2 \gamma^3}{(kT)^3}$$

Équation 14

Les conditions de nucléation dans les deux méthodes de stockage étant identiques, lot de lysozyme identique, nucléation à la même température et dans la même solution tampon (0,7M NaCl pH=4,5), les paramètres T, Ω et γ sont eux aussi identiques. Seul le facteur f sera différent et on peut écrire :

$$\frac{f_{Téflon}}{f_{PDMS}} = \frac{f_{Téflon}\frac{16\pi}{3}\frac{\Omega^2\gamma^3}{(kT)^3}}{f_{PDMS}\frac{16\pi}{3}\frac{\Omega^2\gamma^3}{(kT)^3}} = \frac{B_{Téflon}}{B_{PDMS}} = \frac{174{,}19}{58{,}124} = 3{,}00$$

Équation 15

Le rapport $f_{\text{Téflon}}/f_{\text{PDMS}}$ est donc de 3 ce qui signifie que :

$$\Delta G^*_{Téflon} = \Delta G^*_{Homogéne}\, f_{Téflon} = 3\times\Delta G^*_{Homogéne}\, f_{PDMS} = 3\times\Delta G^*_{PDMS}$$

Équation 16

La barrière énergétique à franchir pour faire nucléer un cristal de lysozyme dans une goutte est trois fois plus élevée dans un capillaire en Téflon que dans une puce en PDMS. C'est le propre de la nucléation primaire hétérogène que de catalyser la nucléation en abaissant la barrière énergétique à franchir. Cependant, au vu du faible nombre de données expérimentales (4 sursaturations pour le PDMS et 3 pour le Téflon), il est difficile de conclure précisément sur la valeur de ce rapport.

Un moyen complémentaire de vérifier cette valeur serait de calculer $\gamma_{\text{Téflon}}$ en utilisant le rapport obtenu si dessus. En effet d'après l'Équation 13 page 75.

$$\gamma_{Téflon} = \gamma_{Homogéne}\times\sqrt[3]{f_{Téflon}} \text{ et } \gamma_{PDMS} = \gamma_{Homogéne}\times\sqrt[3]{f_{PDMS}}$$

On en déduit

$$\gamma_{Téflon} = \gamma_{PDMS}\times\sqrt[3]{\frac{f_{Téflon}}{f_{PDMS}}} = 0{,}63\times\sqrt[3]{3} = 0{,}91$$

Le groupe de Fraden donne également une valeur de γ de 0,91 mJ.m^{-2} ce qui tend à prouver que le rapport calculé pour $f_{\text{Téflon}}/f_{\text{PDMS}}$ est tout à fait cohérent.

2.2 Vers un système microfluidique universel, compatible tout solvant et toute molécule

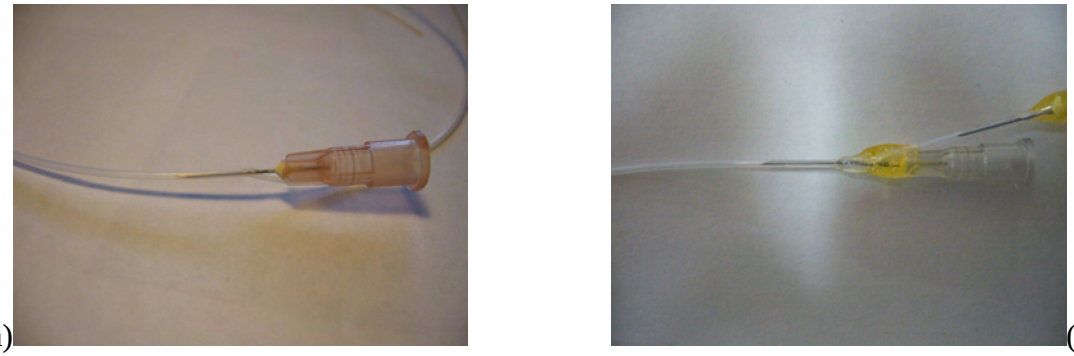
Nous venons de voir que les capillaires en Téflon compatibles aux solvants organiques permettent de stocker des gouttes et de déterminer la LZM et la fréquence de nucléation. Pour rendre le système microfluidique complètement compatible aux solvants organiques, il reste alors à modifier la “plug factory” en PDMS. La revue bibliographique met en évidence l’intérêt des systèmes microfluidiques à base de capillaires qui sont à la fois simples à mettre en œuvre, compatibles avec les solvants organiques courants et adaptés au stockage de gouttes. Cette partie a pour but de définir le système le plus pertinent pour notre application, puis de montrer que la cristallisation de différents principes actifs dans différents solvants est possible grâce à ce système microfluidique et enfin d’en montrer la faisabilité en déterminant la LZM d’un principe actif pharmaceutique.

2.2.1 “Plug factory” à base de capillaire

D’après la bibliographie, il existe différentes manières de générer des gouttes avec un système microfluidique en capillaire. Afin de déterminer la méthode la plus adaptée à nos contraintes expérimentales, nous les avons toutes testées, car leur coût est en général faible (moins de 200 euros). Nous avons également amélioré l’huile et le système d’injection afin de rendre notre système microfluidique totalement compatible avec l’utilisation de solvants organiques.

a) “Plug factory” basée sur l’insertion d’une aiguille dans un capillaire

La technique la plus simple pour générer des gouttes à l’intérieur de capillaire en Téflon consiste à y insérer une aiguille en acier inoxydable, compatible avec l’utilisation de solvants organiques. Pour cela, nous perçons précautionneusement la paroi d’un capillaire en Téflon de 584µm de diamètre interne à l’aide d’une aiguille de 400µm de diamètre externe et nous obtenons le montage de la Figure 56 (a). Une fois cette étape réalisée, il reste encore à établir l’étanchéité du capillaire autour de l’aiguille. On opte pour l’utilisation d’une colle bi-composant Araldite, qui noiera une large portion du capillaire comme le montre la Figure 56 (b). Ce choix est en grande partie imposé par la difficulté de coller le capillaire en Téflon par d’autres méthodes. Nous avons ensuite testé ce système en injectant de l’huile FMS (huile silicone comportant des groupements fluorés) via le capillaire et de l’éthanol via l’aiguille. Nous avons ainsi réussi à générer des gouttes d’éthanol dans l’huile FMS. Cependant, les gouttes produites par ce système se sont avérées très irrégulières, probablement à cause du biseau à l’extrémité de l’aiguille. De plus, la fabrication non reproductible de la jonction risque de nuire à la reproductibilité des gouttes, tout changement de géométrie ayant un impact sur la génération des gouttes[57]. Cette technique simple permet donc de générer des gouttes dans un capillaire, mais sans aucun contrôle sur la reproductibilité des gouttes.

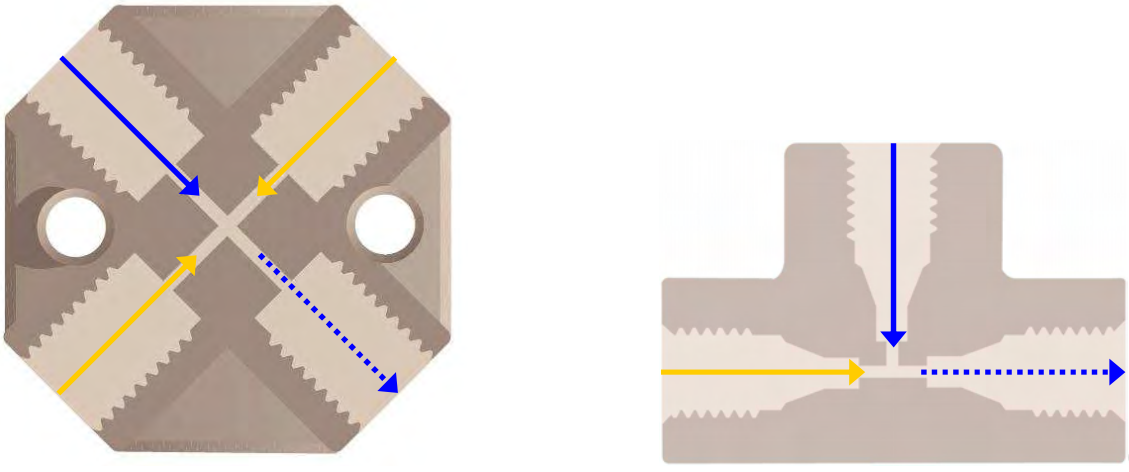


(a) (b)

Figure 56 : (a) Photographie de l'aiguille une fois celle-ci introduite dans le capillaire (b) La jonction aiguille/capillaire est noyée dans la colle Araldite pour assurer l'étanchéité.

b) "Plug factory" basée sur les techniques HPLC

Les systèmes HPLC sont conçus pour faire circuler des solvants sous de fortes pressions dans des capillaires en PEEK (polyétheréthercétone) ou parfois en Téflon qui sont tous deux des polymères particulièrement résistants aux solvants organiques. Les tailles de capillaires sont calibrées et les connexions uniformisées pour permettre toutes sortes de connexions différentes. Nous nous intéresserons aux deux types de connexions permettant de générer des gouttes : les connexions en croix et les connexions en T (P-727 et P-729 IDEX Health and Science). Ces deux types de connexion sont fabriqués en PEEK. Dans un premier temps, nous sommes partis de l'idée de la "plug factory" en PDMS qui utilise une jonction en croix (génération de gouttes par flow focusing). Comme le montre la Figure 57 (a), la jonction en croix contient quatre branchements de section circulaire et de diamètre 500µm comparée à la section rectangulaire de 500µm pour la "plug factory" en PDMS. Nous les connectons à des capillaires en PFA (perfluoroalkoxy) (1907L IDEX Health and Science), un fluoropolymère comme le Téflon, également de 500µm de diamètre interne. De la même façon que pour la "plug factory" en PDMS, l'huile est injectée par deux branchements se faisant face. La solution est injectée par l'un des branchements restants et les gouttes sortent par le dernier branchement. Malheureusement, les gouttes ainsi formées ne sont pas homogènes en taille même si nous avons constaté une nette amélioration par rapport au système avec l'aiguille. Cette inhomogénéité est probablement due à la géométrie circulaire des canaux qui ne permet pas à l'huile de pincer de façon régulière la solution injectée.



(a) (b)

Figure 57 : Schéma de fabrication des gouttes dans des jonctions (a) en croix (b) en T. En jaune arrivée de l'huile FC-70, en bleu arrivée de la solution et en pointillé la sortie des gouttes.

Afin d'améliorer l'homogénéité des gouttes, nous avons testé la connexion en T présentée sur la Figure 57 (b). Les branchements sont également de section ronde et de diamètre interne 500µm mais ils forment un T. L'arrivée de l'huile s'effectue en face de la sortie des gouttes et la solution est injectée latéralement, comme le montre la Figure 58. Ce système microfluidique permet d'obtenir des gouttes régulières avec une dispersion de seulement 4% environs.

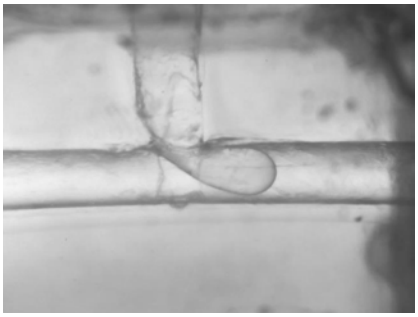


Figure 58 : Formation de goutte dans une jonction T

c) Choix de l'huile injectée dans la "plug factory"

Au cours de nos essais, nous avons précisé le cahier des charges de la "plug factory" en insistant sur la reproductibilité des gouttes produites quel que soit le solvant organique utilisé. L'huile FMS étant partiellement miscible dans des solvants organiques tels que l'acétone, nous avons cherché une huile qui ne soit pas miscible avec un maximum de solvants organiques et qui soit suffisamment mouillante vis-à-vis du Téflon pour stabiliser les gouttes dans les capillaires de stockage. Parmi les huiles fluorées, une huile présentant ces caractéristiques de mouillabilité et d'immiscibilité requises est l'huile FC-70 (3M) dont la formule est donnée sur la Figure 59. De plus, cette huile présente une viscosité (14mPa.s) supérieure à celle des autres huiles fluorées (≈1mPa.s) et plus proche de la viscosité des huiles silicone utilisées jusqu'alors (100mPa.s), c'est pourquoi nous l'avons choisi pour nos expériences. La viscosité de l'huile contribue à stabiliser les gouttes lors de stockages longs avec des manipulations fréquentes.

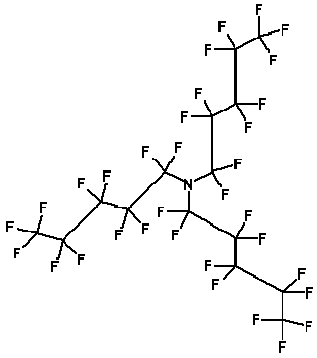


Figure 59 : Formule développé du FC-70

d) Outil d'injection dans la "plug factory"

La compatibilité de notre "plug factory" à tout solvant organique dépend également du système d'injection. En effet, l'injection est réalisée grâce à des pousse seringues qui ne sont pas en contact direct avec les solutions, mais les seringues le sont. Nous avons donc remplacé les seringues jetables en polypropylène avec joint en silicone par des seringues en verre avec joint en Téflon plus compatibles avec l'utilisation de solvants organiques.

2.2.2 Validation de la nouvelle “plug factory”

Avec notre nouveau système microfluidique entièrement compatible aux solvants organiques, nous avons réalisé des expériences de cristallisation. Pour cela nous avons fait trois types d’essais : tout d'abord, nous avons formé des gouttes de différents solvants, puis nous avons observé l’évolution de ces gouttes au cours du temps, et enfin nous avons cristallisé différentes molécules dans ces gouttes.

a) Validation de la formation des gouttes de divers solvants

Pour la formation des gouttes, nous avons testé six solvants différents : l’eau, l’éthanol, l’acétone, l’acétate d’éthyle, le nitrobenzène et l’acétonitrile. L’eau, l’éthanol, l’acétone et l’acétate d’éthyle sont quatre solvants organiques couramment utilisés en cristallisation alors que le nitrobenzène et l’acétonitrile sont des solvants moins conventionnels. Dans nos expériences, le ratio entre le débit d’huile et celui de solvant est de deux. Nous obtenons alors des gouttes régulières pour tous les solvants avec une dispersion en volume de 4% environs. Les gouttes sont mesurées par analyse d’images. Dans le cas de l’eau et avec une jonction T en PEEK, la dispersion sur la taille des gouttes est de quelque pour cent comme l’ont montré Dombrovsky et al. dans leurs travaux[32].

b) Validation du stockage des gouttes de divers solvants

Une fois les gouttes formées elles circulent dans un capillaire en PFA et il suffit de le déconnecter de la jonction T pour isoler les gouttes. Le capillaire en PFA est alors fermé en chauffant ses extrémités puis en les écrasant avec une pince plate, comme pour les capillaires en Téflon. On obtient ainsi des trains de gouttes de solvant dans les capillaires en PFA qui sont ensuite stockées durant plusieurs semaines à température ambiante. L’évaporation est suivie par analyse d’image. Après une semaine, l’évaporation des gouttes est négligeable. Après un mois l’évaporation reste faible pour tous les solvants utilisés. En fait, l’évaporation ne devient nettement visible et donc significative qu’après 3 mois environ. Il s’agit ici d’une amélioration considérable par rapport aux puces de stockage en PDMS pour lesquelles l’évaporation cessait d’être négligeable au-delà de 24h. Cependant pour des stockages à des températures plus élevées (50°C), l’évaporation cesse d’être négligeable après quelques jours.

c) Validation des expériences de cristallisation dans divers solvants

Afin de valider les expériences de cristallisation avec ce nouvel outil microfluidique, nous avons testé différentes molécules dans différentes solutions. Tout d'abord, nous avons cristallisé du lysozyme à 30mg/ml dans un tampon 0,7M NaCl pH = 4,5 à 20°C et nous avons obtenu des cristaux comme celui présent sur la photographie Figure 60 (a). Fort de cette réussite, nous avons testé la caféine dans l'éthanol à 7mg/ml à 20°C (soit β = 2,2) et nous avons obtenu des cristaux semblables à celui de la photographie Figure 60 (b). Nos derniers essais concernent l'isonicotinamide dans deux solvants différents, l'éthanol et le nitrobenzène, respectivement à 143mg/ml à 10°C (soit β = 3,1) et 7mg/ml (solubilité à 45°C) à 10°C et nous avons obtenu les cristaux des photographies Figure 60 (c) et (d).

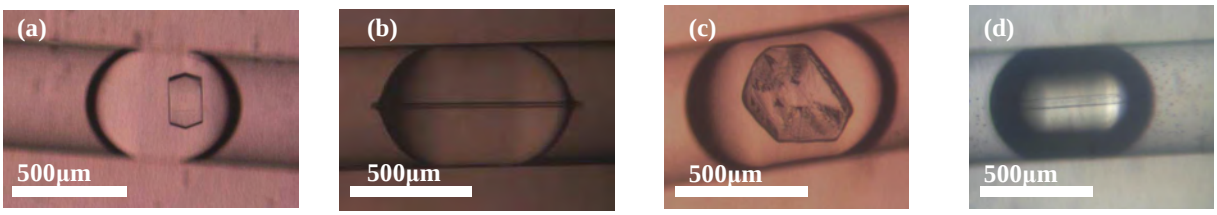


Figure 60 : Photographie de gouttes contenant des cristaux dans le nouveau système microfluidique basé sur la technique des capillaires : (a) Cristal de lysozyme 30mg/ml à 20°C dans un tampon aqueux de 0,7M NaCl pH = 4,5 (β=9,5) ; (b) Cristal de caféine dans l'éthanol 7mg/ml à 20°C (β=2) ; (c) Cristal d'isonicotinamide dans l'éthanol 143mg/ml à 10°C (β=2,25) ; (d) Cristal d'isonicotinamide dans le nitrobenzène 7mg/ml à 10°C (β=2)

Dans cette partie validation, on ne s'est pas intéressé à la mesure de J pour le lysozyme. En effet, seul le système de génération de goutte et la nature de l'huile fluorée ayant changé, cela ne nous a pas paru pertinent de refaire cette mesure.

Pour conclure, notre système microfluidique en PEEK et PFA est polyvalent, peu cher et compatible avec tous les solvants organiques, tout en restant un bon outil de cristallisation.

2.2.3 Faisabilité de la mesure de la LZM de la caféine

La dernière étape pour valider ce nouveau système microfluidique consiste à démontrer que ce montage est utilisable dans des études de nucléation de principes actifs en milieu organique. Pour cela on a étudié la faisabilité de la mesure de la LZM d'un principe actif pharmaceutique. La cristallisation de principes actifs pharmaceutiques diffère grandement de la cristallisation des protéines (comme le lysozyme) à cause de leurs fréquences de nucléation beaucoup plus élevées. De plus, de nombreux principes actifs pharmaceutiques présentent des faciès en aiguilles, avec la possibilité de générer des cristaux maclés ou agrégés ce qui rend difficile le dénombrement des cristaux[58]. Une méthode adaptée doit alors être mise au point pour l'étude de la cristallisation de principe actif pharmaceutique en tenant compte de ces limitations. Nous avons choisi d'étudier la cristallisation de la caféine dans l'éthanol, car il s'agit d'un principe actif pharmaceutique présentant un faciès en aiguille comme le montre la Figure 61.

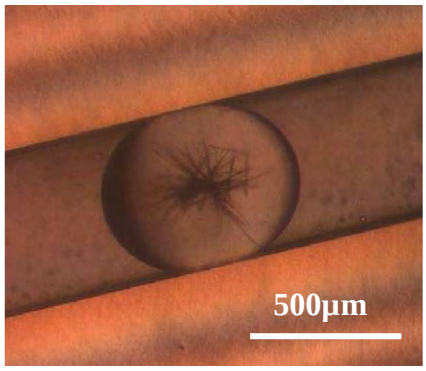


Figure 61 : Cristaux de caféine dans une goutte de 250nl 7mg/ml à 20°C

La méthode de détermination de la LZM présentée au paragraphe 1.2 s'appuie sur la détermination du nombre moyen de cristaux par goutte en fonction de la température pour une concentration donnée. La caféine ne permet pas d'utiliser une telle méthode à cause du trop grand nombre de cristaux pouvant nucléer dans chaque goutte. Nous avons donc opté pour une méthode qualitative qui consiste à noter le nombre de gouttes ayant nucléé sur le nombre total de gouttes en fonction de la température, et ce pour quatre concentrations comprises entre 4 et 8 mg/ml. (voir Tableau 4 ci-dessous).

Température	4 mg/ml	6 mg/ml	7mg/ml	8mg/ml
5°C	100%	100%	100%	100%
10°C	2,7%	98,3%	100%	100%
15°C	0%	100%	100%	100%
20°C	0%	0%	8%	97,1%
25°C	0%	0%	0%	12,6%
30°C	0%	0%	0%	0%
36°C	0%	0%	0%	0%

Tableau 4 : Pourcentage de gouttes cristallisées en fonction de la température pour quatre concentrations en caféine différentes

La température T_{LZM} est comprise entre la température pour laquelle il reste des gouttes ayant cristallisé et la température pour laquelle aucune goutte n'a cristallisé, cela nous donne une gamme de température dans laquelle se situe T_{LZM} représentée sur la Figure 62 sous la forme de barre d'erreur en X. Nous avons choisi de définir T_{LZM} comme étant la moyenne de ces deux températures ; par exemple 12,5°C pour la T_{LZM} avec une concentration de 4mg/ml.

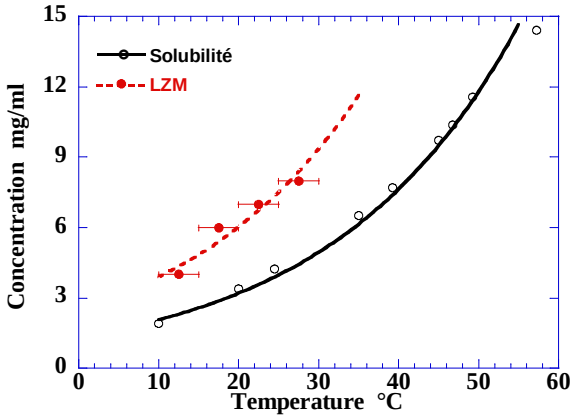


Figure 62 : Mesure de la solubilité et de la LZM de la caféine dans l'éthanol en fonction de la température.

L'exploitation conjointe d'un nouveau système microfluidique en capillaire compatible aux solvants organiques et d'une méthode de détermination de la LZM adaptée permet d'effectuer l'étude de la cristallisation d'un principe actif pharmaceutique dont le faciès empêche le dénombrement précis des cristaux. De plus, notre système microfluidique est peu onéreux et peut être appliqué à tout type de cristallisation. Ses composants sont également disponibles commercialement en différentes tailles de canaux allant de 1mm (gouttes de 2000 à 700nL) à 150µm (gouttes de 7 à 2nL). En effet, la possibilité d'ajuster le volume selon les besoins permet de réduire les quantités de produit consommées au cours de l'étude. Ainsi, ce système permet de faire des études de cristallisation sur toute molécule qui demanderait une réduction des coûts (API, protéine) et/ou des risques (explosifs, matériaux radioactifs). Enfin, les capillaires en PFA utilisés permettent également la réalisation de clichés de diffraction des rayons X des cristaux contenus dans les gouttes, comme l'ont montré Yadav et al.[26]. En conclusion, la polyvalence de ce système est démontrée et son utilisation pour l'étude de la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques validée.

2.3 Article 3

A Cheap, Easy Microfluidic Crystallization Device Ensuring Universal Solvent Compatibility

M. Ildefonso, N. Candoni et S. Veesler
Organic Process Research and Development, 2012, 16, 556-560

Résumé :

Les systèmes microfluidiques sont de plus en plus utilisés pour le criblage de conditions de cristallisation. Ces systèmes permettent la génération de gouttes ayant un volume de l'ordre du nanolitre qui sont autant de cristallisoirs indépendants. Cela permet de réaliser un grand nombre d'expériences dans des conditions identiques en utilisant seulement une petite quantité de produits. Cependant, les systèmes classiques de nucléation sont faits de PDMS qui n'est compatible qu'avec des solutions aqueuses. De plus, ces systèmes impliquent le plus souvent une organisation complexe accessible aux seuls spécialistes de la microfluidique. Dans cet article nous chercherons à dépasser ces problèmes en présentant un système microfluidique peu cher et utilisable dans toutes les conditions d'étude de la cristallisation. Ce système thermostaté rend possible l'étude de la nucléation aussi bien dans les solutions aqueuses que dans les solvants organiques, permettant ainsi l'étude de la cristallisation de molécules organiques comme les principes actifs pharmaceutiques, les explosifs ou les nanoparticules.

Organic Process Research & Development

Article

pubs.acs.org/OPRD

A Cheap, Easy Microfluidic Crystallization Device Ensuring Universal Solvent Compatibility

Manuel Ildefonso, Nadine Candoni, and Stéphane Veesler*

Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille CINAM-CNRS, Aix-Marseille Université, Campus de Luminy, F-13288 Marseille, France

ABSTRACT: Microfluidic devices are increasingly used for the screening of crystallization conditions. Their advantage is the generation of droplets, every droplet being an independent crystallizer with volumes in the nanoliter range. This enables a large number of experiments to be carried out under identical conditions necessitating only small quantities of materials. However, classic microfluidic crystallization devices are made of poly(dimethylsiloxane), only compatible with an aqueous medium. In addition, they generally involve very complicated setups, often inaccessible to nonmicrofluidics specialists. In this paper, we overcome these drawbacks, presenting a cheap and universally applicable microfluidic crystallization tool. This thermostatted device makes it possible to study nucleation in both aqueous and organic solvents, rendering microfluidic devices applicable to organic molecules such as APIs, explosives, and metal oxide nanoparticles.

1. INTRODUCTION

The crystallization of novel materials requires experimental strategies for the rapid screening of crystallization conditions. When only small quantities of materials are available for preliminary studies, new crystallization tools are vital. In the past decade, an interest in microfluidic crystallization has increased.[1−4] Microfluidic devices allow a large number of experiments under identical conditions, every droplet being an independent crystallizer with volumes in the nanoliter range. Most studies use poly(dimethylsiloxane) (PDMS) devices and focus on complicated setups, multilayer PDMS chips with multi-inputs that are generally inaccessible to nonmicrofluidics specialists.[5−8] PDMS is used because this building material is cheap and convenient, but it has disadvantages, the main one being its poor solvent compatibility. However, some groups have recently started to develop simple microfluidic devices[10−12] in which plugs are generated via a T-junction coupled to PVC or Teflon tubing. Our aim here was to address the problem of solvent-compatibility, building on these recent attempts at simplification, with a view to developing a laboratory-scale tool. Therefore, the key points of this work are an easy-to-use, universally solvent-compatible and cheap microfluidic setup which avoids the use of surfactant and is easily transferable to the laboratory for crystallisation studies. To prove the viability of our setup, we apply simple methods previously developed for measuring metastable zone width[13] and nucleation kinetics[14] for aqueous media. The results presented here concern nucleation of a biological molecule and active pharmaceutical ingredients (APIs) in different crystallization media, including organic solvents.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Solutions. *2.1.1. Protein Solutions.* Hen-egg white lysozyme (14600 Da, pI = 11.2) was purchased from Sigma (batch 057K7013 L 2879) and used without further purification. Lysozyme purity was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH = 4.5 with NaOH (1 M), and filtered through 0.22 μm Millipore filters. The pH was checked with a pH meter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were checked by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) using an extinction coefficient of 2.64 mL cm^{-1} mg^{-1} at 280 nm. In all the crystallization experiments hereafter, the NaCl concentration was fixed to 0.7 M at pH = 4.5.

2.1.2. Organic Solutions. Caffeine was purchased from Sigma (batch A0283756) and used without further purification. A suitable amount of caffeine was dissolved in ethanol 99% (batch V0D770190D) to obtain the stock solutions required. Isonicotinamide was purchased from Sigma (batch BCBD6627) and used without further purification. A suitable amount of isonicotinamide was dissolved in ethanol 99% and nitrobenzene (batch STBB8950 V).

2.2. Devices. The basic design and construction of our microfluidic devices were as described by Laval et al.[9] In our previous adaptation[13] of this classic microfluidic device, chips are divided into two parts: the plug-factory zone for the mixing and generation of droplets and the droplet-storage zone for the storage and observation of droplets. The channel size of the plug-factory determines droplet size. Using this setup, we generate droplets of the same volume at a given concentration, and we fill storage chips that we store at different temperatures. Here, we present the chronology of our experimental approach. we constructed two devices based on our previous adaptation, which used the same droplet method but chips built from different materials, namely varying combinations of PDMS, Teflon, and polyether ether ketone (PEEK). During generation and storage, the devices and the feeding syringes were thermostatted (see details hereafter). Precision syringe pumps (Bioseb BS-8000)

Received: October 18, 2011
Published: February 28, 2012

 © 2012 American Chemical Society

were used to control the flow rates (100−600 μL/h) of drops and continuous phase, and the temperature of the pumps was controlled by an incubator. Drops were observed under a stereomicroscope (Wild Makroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK 31BF03).

2.2.1. Pure PDMS Device. Both plug-factory and storage chips are made of PDMS. During the experiment, the device is thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France). Teflon tubing (SCI, BB311-24), of 584 μm inner diameter, connects plug-factory and storage chips. Each droplet has a volume of 250 nL with a volume polydispersity of a few percent.[15,16] This device can be used to store droplets for 24 h, although longer storage will lead to extensive evaporation due to the porosity of PDMS.[17]

2.2.2. Mixed PDMS/Teflon Device. While in the previous setup, Teflon tubing connects plug-factory and storage chips, this device uses Teflon tubes as storage chips. There are two major advantages: no detectable evaporation after 1 week at room temperature (evaporation being estimated from the evolution of the size of the droplet) and universal applicability to organic solvents. However, the plug factory is still in PDMS thermostatted by Peltier elements. In order to reach a good wettability of the oil for both PDMS and Teflon wall, we use FMS Oil (Poly-3,3,3-trifluoropropylmethylsiloxane, Hampton Research). Hence, we avoid the risk of forming oil droplets in the aqueous phase. After filling, the tube entrance is heated and pinched to seal the tube. An incubator controls temperature. Note that, during observation, the storage tube is immersed in a temperature-controlled water vessel, allowing direct observation through the transparent Teflon wall.

2.2.3. Mixed PEEK/Teflon Device. In this device the plug-factory is a T-junction made of PEEK (IDEX P-727 PEEK Tee) as proposed by Dombrowski,[12] the output tube being a Teflon storage tube. The T-junction (Figure 1) has an inner diameter

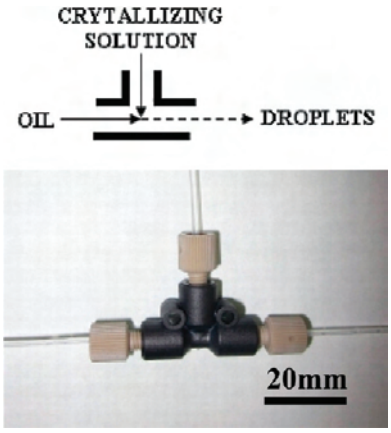


Figure 1. Scheme and photo of plug-factory T-junction made of PEEK.

of either 508 μm (250 nL droplets) or 152 μm (2 nL droplets) and is connected to Teflon tubing of a diameter of 508 or 150 μm, respectively. The advantage of both Teflon and PEEK polymers is their compatibility with all solvents, the sole exception being concentrated acid (sulfuric or nitric acid). In order to ensure maximum versatility, we used fluorinated oil FC-70 (Hampton Research), which has no or very low miscibility with solvents and good wettability with Teflon. In addition, the device being thermostatted, we can store droplets for several weeks without significant evaporation.

2.3. Methods. *2.3.1. Crystallization Strategy.* The way supersaturation is achieved in chips or tubes defines the crystallization process. An easy way to achieve supersaturation consists of using temperature, making it possible to control supersaturation at constant composition with a reversible effect.[18] This is the method used here. When the temperature dependence of solubility is too low, another method consists of using a solvent mixture where the solubility of the solute is high in the first solvent and (very) low in the second. Thus, the supersaturated stage is rapidly reached. This method can be carried out easily with our setup by adding a second T-junction at the entrance to the crystallizing solution (Figure 1).

2.3.2. Determining Metastable Zone. The metastable zone represents a kinetic limit in the supersaturated region of the phase diagram below which no nucleation occurs for a given time in a given volume. Note that crystallization of an organic compound such as an active pharmaceutical ingredient (API) is different from crystallization of protein, because organic molecules have a higher nucleation rate than proteins. Hence, the nucleation time chosen in this work is 4 h for caffeine compared to 20 h for lysozyme. The experimental procedure to determine the metastable zone was as previously described.[13] To summarize, four chips or tubes are filled with the same solution and stored at different temperatures. Then, nucleated crystals are counted, and the temperature at which there is no crystal, T_{MZ}, is extrapolated (interpolation) from a plot of the average number of crystals per droplet versus temperature.

2.3.3. Nucleation Rate: Double Pulse Technique.[19−21] The method and the data treatment were as presented in a previous paper.[14] To summarize, crystals are nucleated at a nucleation temperature, outside the metastable zone (below T_{MZ}) and for a given nucleation time. Then, the temperature is raised until it reaches the metastable zone (growth temperature), where the crystals already formed grow to detectable dimensions and are counted. The use of this method allows nucleation to be separated from the ensuing growth. Thus, the steady-state nucleation rate is given by the slope of the average number of crystals nucleated as a function of the nucleation time. For all experimental conditions, four devices were filled with the same solution, allowing four nucleation times to be tested simultaneously. Here nucleation and growth temperatures are 20 and 40 °C, respectively, the choice of these temperatures being clearly explained by Ildefonso et al.[14]

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this contribution, we present the results of nucleation experiments on a biological molecule and two APIs in different crystallization media including organic solvents. Teflon tubing is used as storage chip with two different plug-factories, as described above (part 2.2).

3.1. Nucleation of Protein in the Mixed PDMS/Teflon Device. In order to prove the viability of our Teflon storage devices, we compare nucleation of our model system, lysozyme, in the classic PDMS storage chip and the Teflon storage chip, with the plug-factory in PDMS in both cases. Results are summarized in Table 1. Figure 2a shows the time dependence of the average number of crystals nucleated per droplet using the double pulse technique; the slope of the straight line gives us the primary nucleation rate using the Teflon chip. In Figure 2b, we plot the nucleation rate versus supersaturation obtained in the Teflon storage chip and in the classic PDMS chip.[14] We used the same protein batch, the same concentration range, and the same temperature conditions. The plug-factory is identical

Table 1. Average number of lysozyme crystals nucleated per droplet[a] for a given protein concentration at a given nucleation time

protein concentrations (mg/mL)	Nucleation times								
	0 min	20 min	30 min	40 min	1 h	1.33 h	1.5 h	2 h	3 h
40	0		0 (−)		0.023 (2.5)		0.051 (2.5)	0.012 (5.4)	0.058 (1.5)
45	0	0.117 (1.6)		0.329 (0.8)	0.381 (0.7)	0.472 (1.0)		0.665 (0.7)	
50	0		0.541 (0.6)		1.166 (0.4)				

[a]The deviation in % is given in parentheses.

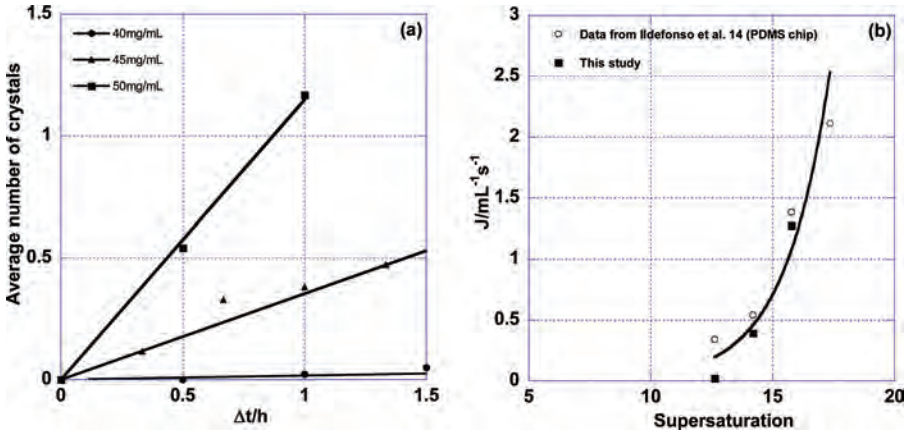


Figure 2. (a) Average number of lysozyme crystals nucleated per droplet versus nucleation time (NaCl = 0.7 M and pH = 4.5). (b) Primary nucleation rate vs supersaturation, at 20 °C (the line is a guide for the eye).

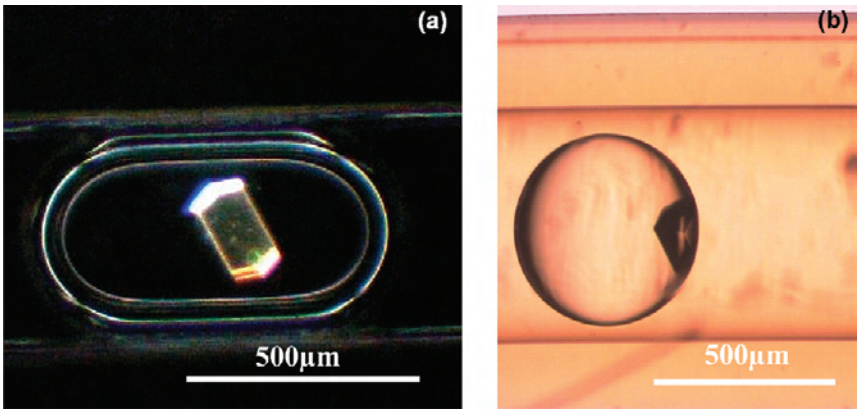


Figure 3. Images of lysozyme crystals in a 250 nL droplet (20 mg/mL, NaCl = 0.7 M, pH = 4.5 at 20 °C) in (a) PDMS chip and (b) in Teflon chip.

in both devices, with a droplet volume of 250 nL. However, the tubing has a diameter of 584 μm while PDMS chips have a diameter of 500 μm; thus, the shape of the droplets differs, as shown in Figure 3. We also changed both the oil, from silicone (Sigma oil AP 100) to FMS Oil, and channel material, inducing a modification of the surface tension of droplets. Moreover, the droplet evaporation rate in Teflon tubing is lower than in PDMS. Despite these differences, we measure nucleation rates in good agreement with those obtained in pure PDMS chips. To sum up, this Teflon storage device is versatile, cheap, and permits nucleation experiments in droplets over a longer period than PDMS chips.

3.2. Nucleation in the Mixed PEEK/Teflon Device. One of the limitations of the mixed PDMS/Teflon device tested in part 3.1. is the poor solvent compatibility of the PDMS plug-factory. Here we used a T-junction made of PEEK as plug-factory.

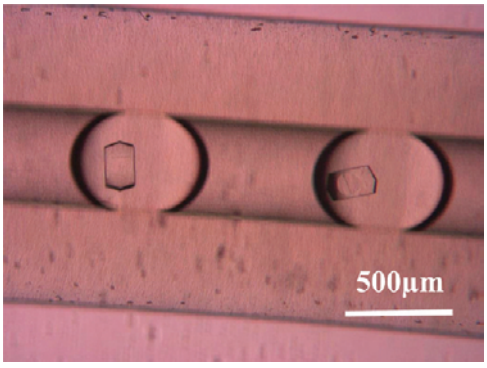


Figure 4. Images of lysozyme crystals in droplets (35 mg/mL; NaCl = 0.7 M; pH = 4.5; T = 20 °C) in a mixed PEEK/Teflon device.

3.2.1. Generating Aqueous-Phase Droplets. We checked the validity of the ensuing device for generation of aqueous-phase

droplets. Dombrovsky et al. showed for lactose that a PEEK T-junction is able to generate aqueous droplets with a volume polydispersity of a few percent.[12] Here, we generated droplets of lysozyme and stored them in Teflon tubing. We obtained regular droplets in which lysozyme crystals appear after a few hours (Figure 4).

3.2.2. Generating Organic Solvent Droplets. To ascertain the universal solvent compatibility of this device, we tested it with different organic solvents common in industrial crystallization studies, namely ethanol, acetone, ethyl acetate, as well as less conventional solvents such as nitrobenzene or acetonitrile. In every solvent, the PEEK/Teflon device generates droplets which can be stored for more than 1 week without significant evaporation (Figure 5a). It is noteworthy that no droplet coalescence is observed. We also tested the ability of crystals to nucleate in this new device using three different solutions, solutions of caffeine and isonicotinamide in ethanol (Figure 5b,c) and a solution of isonicotinamide in nitrobenzene (Figure 5d). In all cases, crystals with totally different habits were obtained. To sum up, the PEEK/Teflon device is versatile, cheap, and universally compatible with organic solvents, as well as being suitable for crystallization experiments.

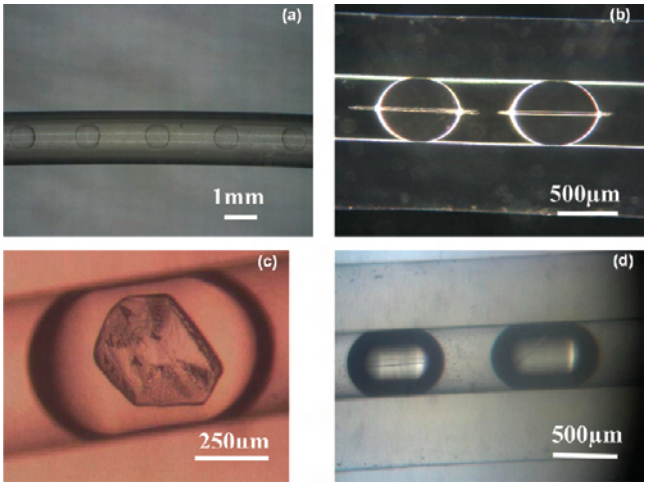


Figure 5. (a) Acetone droplets in fluorinated oil after 3 months storage. (b) Caffeine crystals in ethanol droplets (10 mg/mL; T from 30 to 10 at 0.5 °C/min). (c) Isonicotinamide crystal in an ethanol droplet (143 mg/mL; T = 10 °C). (d) Isonicotinamide crystals in nitrobenzene droplets (7 mg/mL; T = 10 °C).

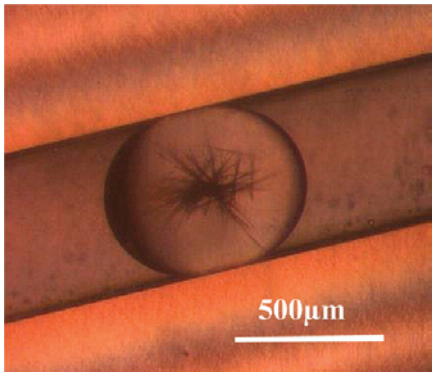


Figure 6. Caffeine crystals in an ethanol droplet (7 mg/mL − T = 20 °C).

3.2.3. Application to the Nucleation of Caffeine. The control of nucleation is a real challenge. For instance, in the pharmaceutical industry nucleation will control the phase and the crystal size distribution, which are key parameters of APIs. Here, we carried out a preliminary caffeine nucleation study using the PEEK/Teflon device and obtained reliable data on nucleation of caffeine in ethanol. The high anisotropy of the API crystal structure frequently involves the production of needle-shaped or acicular crystals.[22] This is confirmed with caffeine, which crystallizes with an acicular habit (Figure 5b). Moreover, for higher supersaturation, activated secondary nucleation appears, leading to a random nucleation of needles[23] (crystalline agglomerates) (Figure 6). This is a limitation for nucleation studies using the double-pulse method because it is impossible to count crystals. Therefore, we adapted our method to measure the metastable zone width; the knowledge of the metastable zone width presents an interest in the control of industrial crystallization. Instead of counting crystals and extrapolating the temperature T_{MZ} at which there is no crystal, we counted the number of droplets that nucleated after 4 h. T_{MZ} is extrapolated from a plot of the percentage of nucleated droplets versus temperature. In practice, T_{MZ} is bracketed according to the following formula:

$$T_{0\%} - 5 < T_{MZ} < T_{0\%} \quad (1)$$

with $T_{0\%}$ the lowest nucleation temperature in °C yielding no crystals.

We tested four concentrations from 4 to 8 mg/mL with temperature varying from 5 to 30 °C (Figure 7a). For each condition 30−110 droplets were generated. Using this method, we obtained the metastable zone limit of caffeine in ethanol, shown on the phase diagram (Figure 7b). To sum up, this PEEK/Teflon device is a cheap and universally applicable crystallization tool.

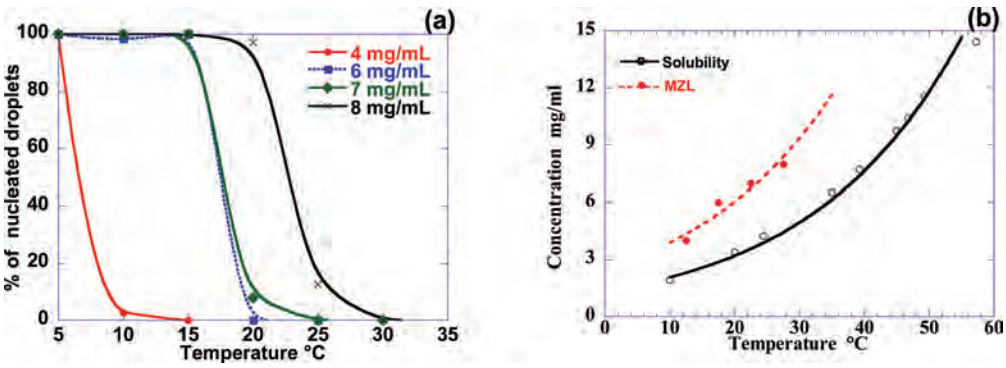


Figure 7. (a) Percentage of nucleated droplets of caffeine vs temperature and (b) caffeine solubility in ethanol versus temperature (our data) and MZ limit, lines improve legibility.

4. CONCLUSION

In this paper we present a cheap and universally applicable crystallization tool, in the form of a PEEK/Teflon microfluidic device. This thermostatted device allows droplets to be formed in different aqueous and organic solvents and stored for several weeks without significant evaporation. Thus, our device makes it possible to study nucleation in both aqueous and organic solvents, rendering microfluidic devices applicable to organic molecules such as APIs, explosive metal oxide nanoparticles. However, for systems leading to a random nucleation of acicular crystalline agglomerates, the double-pulse method cannot be directly applied to measure nucleation rate. Future studies will examine whether using the induction time method[24,25] could provide a solution. Lastly, it should be noted, as pointed out by Yadav et al.[11a], that Teflon tubing is suitable for in situ screening X-ray diffraction studies, thus opening interesting perspectives in the field of crystallization screening for which solid-phase characterization is vital.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Telephone: 336 6292 2866. Fax: 334 9141 8916. E-mail: veesler@cinam.univ-mrs.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Bactivelane (CINaM) and M. Audiffren (Anacrismat) for their help in the development of the setup. We thank M. Sweetko for English revision.

■ ADDITIONAL NOTE

[a]In their paper Yadav et al. centered a water plug in a Teflon capillary in the beam of a Rigaku MSC R-AXIS IV X-ray diffractometer; after 10 min collection the data were suitable for indexing crystal.

■ REFERENCES

(1) Leng, J.; Salmon, J. B. Microfluidic Crystallization. *Lab Chip* **2009**, *9*, 24−34.

(2) Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid Physics at the Nanoliter Scale. *Rev. Model. Phys.* **2005**, *77* (3), 977.

(3) Selimovic, S.; Jia, Y.; Fraden, S. Measuring the Nucleation Rate of Lysozyme Using Microfluidics. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (4), 1806−1810.

(4) Sauter, C.; Dhouib, K.; Lorber, B. From Macrofluidics to Microfluidics for the Crystallization of Biological Macromolecules. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (11), 2247−2250.

(5) Hansen, C. L.; Skordalakes, E.; Berger, J. M.; Quake, S. R. A Robust and Scalable Microfluidic Metering Method That Allows Protein Crystal Growth by Free Interface Diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99* (26), 16531−16536.

(6) Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tereshko, V.; Chen, D. L.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. Nanoliter Microfluidic Hybrid Method for Simultaneous Screening and Optimization Validated with Crystallization of Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (51), 19243−19248.

(7) Song, H.; Chen, D. L.; Ismagilov, R. F. Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45* (44), 7336−7356.

(8) Shim, J.-U.; Cristobal, G.; Link, D. R.; Thorsen, T.; Fraden, S. Using Microfluidics to Decouple Nucleation and Growth of Protein. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7* (11), 2192−2194.

(9) Laval, P.; Salmon, J.-B.; Joanicot, M. A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics. *J. Cryst. Growth* **2007**, *303*, 622−628.

(10) Quevedo, E.; Steinbacher, J.; Mcquade, D. T. Interfacial Polymerization within a Simplified Microfluidic Device: Capturing Capsules. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (30), 10498−10499.

(11) Yadav, M. K.; Gerdts, C. J.; Sanishvili, R.; Smith, W. W.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. In situ data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38* (6), 900−905.

(12) Dombrowski, R. D.; Litster, J. D.; Wagner, N. J.; He, Y. Crystallization of alpha-lactose monohydrate in a drop-based microfluidic crystallizer. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62* (17), 4802−4810.

(13) Ildefonso, M.; Revalor, E.; Punniam, P.; Salmon, J. B.; Candoni, N.; Veesler, S. Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool. *J. Cryst. Growth* **2012**, *342* (1), 9−12.

(14) Ildefonso, M.; Candoni, N.; Veesler, S. Using microfluidics for fast, accurate measurement of lysozyme nucleation kinetics. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (5), 1527−1530.

(15) Laval, P.; Crombez, A.; Salmon, J.-B. Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements. *Langmuir* **2009**, *25* (3), 1836−1841.

(16) Laval, P.; Giroux, C.; Leng, J.; Salmon, J.-B. Microfluidic Screening of Potassium Nitrate Polymorphism. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310* (12), 3121−3124.

(17) Laval, P.; Lisai, N.; Salmon, J. B.; Joanicot, M. A Microfluidic Device Based on Droplet Storage for Screening Solubility Diagrams. *Lab Chip* **2007**, *7*, 829−834.

(18) Astier, J. P.; Veesler, S. Using Temperature to Crystallize Proteins: A Mini-Review. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8* (12), 4215−4219.

(19) Tsekova, D.; Dimitrova, S.; Nanev, C. N. Heterogeneous Nucleation (And Adhesion) of Lysozyme Crystals. *J. Cryst. Growth* **1999**, *196* (2−4), 226−233.

(20) Galkin, O.; Vekilov, P. G. Direct Determination of the Nucleation Rates of Protein Crystals. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (3), 10965−10971.

(21) Revalor, E.; Hammadi, Z.; Astier, J. P.; Grossier, R.; Garcia, E.; Hoff, C.; Furuta, K.; Okutsu, T.; Morin, R.; Veesler, S Usual and Unusual Crystallization from Solution. *J. Cryst. Growth* **2010**, *312*, 939−946.

(22) Taulelle, P.; Astier, J. P.; Hoff, C.; Pèpe, G.; Veesler, S. Pharmaceutical Compound Crystallization: Growth Mechanism of Needle-Like Crystals. *Chem. Eng. Technol.* **2006**, *29* (2), 239−246.

(23) Puel, F.; Verdurand, E.; Taulelle, P.; Bebon, C.; Colson, D.; Klein, J.-P.; Veesler, S. Crystallization Mechanisms of Acicular Crystals. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310* (1), 110−115.

(24) Kashchiev, D.; Verdoes, D.; Van Rosmalen, G. M. Induction Time and Metastability Limit in New Phase Formation. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 373−380.

(25) Jiang, S.; Ter Horst, J. H. Crystal Nucleation Rates from Probability Distributions of Induction Times. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *11* (1), 256−261.

Conclusion générale

"Ce que l’on conçoit bien s’énonce clairement
Et les mots pour le dire arrivent aisément."
Nicolas Boileau (d’après Horace)

Le but de cette thèse est le développement d'un outil microfluidique d'étude de la cristallisation adaptée aux contraintes de l'industrie pharmaceutique, c'est-à-dire permettant de réaliser un grand nombre d'expériences de cristallisation tout en utilisant le moins de produit possible et en restant simple à mettre en place expérimentalement. Dans l'industrie pharmaceutique, l'étude de la cristallisation se focalise en particulier sur l'étape de nucléation, étape qui va contrôler la phase et la taille des cristaux dans le processus de fabrication. Pour caractériser la nucléation, nous avons cherché à déterminer la limite de zone métastable (LZM), à mettre en évidence la présence éventuelle de différentes phases cristallines ou encore à mesurer la fréquence de nucléation.

Pour réaliser ces mesures, nous avons sélectionné différents principes actifs pouvant nous servir de modèle pour l'étude de la nucléation. Chacune des molécules retenues présente des caractéristiques la rendant représentative d'une catégorie de principe actif : le lysozyme pour la cristallisation des protéines dans l'eau, l'isonicotinamide pour la cristallisation de cristaux massifs dans un solvant organique et enfin la caféine pour la cristallisation d'aiguilles dans un solvant organique.

Nous avons alors mis au point deux systèmes microfluidiques et des méthodes associées pour l'étude de la nucléation de principes actifs pharmaceutiques. Le premier système microfluidique permet l'étude de la nucléation dans l'eau ou dans une solution aqueuse et le second permet de travailler dans n'importe quel solvant y compris organique. Les deux systèmes se composent d'une "plug factory" permettant de générer des gouttes de 250nL de solution dans l'huile et d'un système de stockage des gouttes permettant leur observation. Chaque goutte étant un cristallisoir indépendant cette technique permet de réaliser très simplement un très grand nombre d'expériences. Nous avons également mis au point des méthodes d'étude de la nucléation utilisant ces gouttes microfluidiques et permettant entre autres : de déterminer une limite de zone métastable (LZM), de mettre en évidence la présence de plusieurs phases cristallines ou encore de mesurer la fréquence de nucléation.

Pour mettre au point ces méthodes, nous avons dans un premier temps utilisé le système microfluidique compatible avec les solutions aqueuses. Ce système, basé sur la technologie PDMS, est une adaptation aux contraintes de l'industrie pharmaceutique d'un système microfluidique d'étude de la cristallisation déjà existant. Grâce à ce système et aux méthodes utilisées, nous avons pu tracer la LZM du lysozyme, mettre en évidence deux phases aux faciès différents et calculer l'énergie interfaciale cristal/solution à travers la mesure de la fréquence de nucléation. Nous avons validé les résultats obtenus en les comparant à ceux de la littérature et ainsi montré l'utilité de ce système pour l'étude de la cristallisation.

Cependant, ce système microfluidique présente trois limitations qui nécessitent d'être résolues avant que cette méthode puisse être adoptée par l'industrie pharmaceutique. Tout d'abord, l'utilisation d'une puce en PDMS impose l'eau comme solvant de cristallisation ; or la plupart des produits pharmaceutiques ne sont pas cristallisés dans l'eau, mais dans des solvants organiques. Ensuite le nombre de cristaux dans chaque goutte doit être déterminé avec précision dans les méthodes utilisées. Un trop grand nombre de cristaux par goutte (plus de 5 environ) ou des cristaux avec un faciès difficile à observer (aiguille très fine) nous empêcheraient d'utiliser ces méthodes. Enfin, le dernier problème vient de l'observation des gouttes et du comptage des cristaux qui se fait manuellement. L'automatisation du système sera nécessaire pour envisager son usage dans un laboratoire pharmaceutique.

Nous avons alors cherché à développer un nouveau système microfluidique permettant de dépasser les limitations de ce premier système. Mais afin de capitaliser sur les résultats obtenus, nous avons cherché à améliorer progressivement le système existant. Tout d'abord en changeant le système de stockage de nos gouttes, ce qui nous a permis d'observer et de qualifier le mécanisme de nucléation dans les deux systèmes. Puis, dans un second temps, nous avons modifié la "plug factory", l'huile utilisée et le système d'injection des solutions afin de rendre notre système entièrement compatible avec l'utilisation de solvants organiques. Après la validation de ce nouveau système microfluidique, nous l'avons utilisé pour développer une méthode applicable à de nombreux principes actifs pharmaceutiques pour déterminer la limite de zone métastable d'une molécule. En outre, cette méthode basée sur la fraction de gouttes ayant cristallisé plutôt que sur le nombre de cristaux permet de mesurer la LZM de molécules générant des cristaux trop nombreux ou trop difficiles à observer pour la méthode de mesure développée précédemment.

Au cours de ce travail nous avons également du développer des outils annexes aux systèmes microfluidiques afin de pourvoir réaliser différentes tâches utiles à la réalisation de nos expériences. Nous avons ainsi fait fabriquer une cuve à double enveloppe en plexiglas afin d'observer les échantillons en immersion tout en contrôlant leur température. Nous avons collaboré avec une PME locale pour mettre au point une enceinte thermostatée permettant de réguler la température de nos solutions pendant leur injection. Enfin, toujours avec cette PME, nous avons créé un porte-échantillon (UNIDIM) parfaitement adapté au contrôle en temps réel de la température dans les capillaires de stockage des gouttes et à leur observation dans les différentes conditions requises par nos méthodes expérimentales. Sur ces différents projets, nous avons reçu le soutien financier du réseau Cristech, du CINaM via une ATP interne, de la région PACA et de C'Nano PACA (GDR 3196).

Le système microfluidique que nous avons mis au point répond au cahier des charges que nous nous étions fixés au début de ce travail et constitue d'ores et déjà un outil performant pour l'étude de la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques. De plus, ce système permet de générer des gouttes de n'importe quel solvant (y compris l'eau) et de les stocker sans qu'il soit nécessaire de modifier l'huile utilisée ou l'état de surface des canaux. Cette propriété particulière de notre système microfluidique permet d'envisager son utilisation pour l'étude de la cristallisation de n'importe quelle molécule (principes actifs, explosifs, radioactifs…) et ce dans n'importe quel solvant (aqueux ou organique).

Ce système microfluidique est limité par les propriétés du Téflon PFA. Le système présente donc une très bonne compatibilité chimique avec les acides forts, les bases fortes et les solvants organiques. Il n'est cependant pas compatible avec le fluor. De plus, le Téflon PFA peut être utilisé sur une large gamme de température allant de -100 jusqu'à +250°C. Dans le cas d'une utilisation en cristallisation, c'est essentiellement le solvant qui limitera la gamme de température accessible (température d'ébullition ou de fusion).

Une autre limitation inhérente à l'utilisation de goutte de quelques centaines de nanolitres est la nécessité d'accéder à des sursaturations plus grandes pour garder un temps de nucléation qui ne soit pas excessivement long. De plus, cette sursaturation doit être générée dans le système microfluidique ce qui rend ce problème encore plus complexe. L'utilisation d'un antisolvant afin d'augmenter la sursaturation apparait comme la solution la plus efficace pour résoudre ce problème, mais ne s'adapte pas forcément à l'étude de la cristallisation de toutes les molécules.

De plus, il reste encore des points technologiques à améliorer pour le rendre utilisable en routine dans les laboratoires pharmaceutiques. C'est pourquoi nous sommes actuellement en train de réaliser le couplage du porte échantillon UNIDIM à un système d'acquisition vidéo permettant une plus grande automatisation des méthodes que nous avons mise au point dans ce travail. L'utilisation d'une double prise de vue automatisée avec une image en polarisation croisée (mettant en évidence les cristaux) associée à une prise de vue classique (permettant de compter les gouttes) permettra l'analyse automatisée des clichés par ordinateur. Cette automatisation des méthodes nous semble un point essentiel pour permettre l'adoption de notre système microfluidique dans des laboratoires de cristallisation non spécialistes en microfluidique.

Comme cela a été montré par Ismagilov et al.[25] les systèmes microfluidiques se prêtent particulièrement bien à une automatisation du criblage de conditions de cristallisation. En effet, la possibilité de mélanger différentes solutions au cœur du système microfluidique associée à la modulation des débits d'injection des solutions permet d'envisager de réaliser simplement des gradients de concentration (en mélangeant une solution et son solvant) ou de varier la quantité d'antisolvant dans une solution pour observer la précipitation. On peut également envisager d'étudier l'effet de différents antisolvants en utilisant un système microfluidique proche de celui proposé par le groupe d'Ismagilov[25]. Pour cela le système microfluidique que nous proposons est particulièrement polyvalent. En effet il est très simple de lui ajouter un branchement supplémentaire pour introduire une nouvelle solution.

Enfin pour rendre notre système complètement polyvalent et pour permettre l'étude de la fréquence de nucléation de molécules cristallisant en aiguille comme la caféine nous envisageons de développer une méthode microfluidique de mesure de la fréquence de nucléation en utilisant la technique des temps d'induction. Cela nous permettrait de disposer de toutes les méthodes nécessaires pour l'étude de la nucléation de n'importe quelle molécule cristallisant avec n'importe quel faciès.

Il reste encore beaucoup à faire avant que des systèmes microfluidiques tels que le notre soient adoptés par l'industrie, mais j'ose croire que ce travail est un pas en avant essentiel pour aller dans cette direction.

Annexes

“On tourne d’abord tout ce qui doit être tourné dans une direction et ensuite les plans dans la direction opposée.”

Fritz Lang

1 Curriculum Vitae

Cursus

Thèse	Science des matériaux, physique, chimie et nanoscience Réalisée au CINaM, Marseille	Débutée en 2009
Master 2 Pro	Formulation et chimie industrielle Université Claude Bernard Lyon 1	2009
Master 1	Chimie Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand 2	2008
Licence 3	Physique-chimie Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand 2	2007
Licence 2	Physique-chimie Université Blaise Pascal Clermont-Ferrand 2	2006
Classe prépa	Cycle Préparatoire Polytechnique Institut National Polytechnique de Grenoble	2005
Baccalauréat	Scientifique Lycée Polyvalent de Chamalières	2004

Publications

Nucleation Control and Rapid Growth of KDP crystals in Stationary Conditions.
J. Leroudier, J. Zaccaro, M. Ildefonso, S. Veesler, J. Baruchel & A. Ibanez, Crystal Growth & Design, 2011, 11 (6), pp 2592–2598

Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool.
M. Ildefonso, E. Revalor, P.Punniam, J.B.Salmon, N.Candoni & S. Veesler, Journal of Crystal Growth, 2012, 342, 9-12

Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics
M. Ildefonso, N. Candoni, & S. Veesler, Crystal Growth and design, 2011, 11 (5), pp 1527-1530

Nanotechnologies dedicated to nucleation control
N. Candoni, Z. Hammadi, R. Grossier, M. Ildefonso, Eve Revalor, N. Ferte, T. Okutsu, R. Morin & S. Veesler, International Journal of Nanotechnology, 2012, 9, 439-459

A cheap, easy microfluidics crystallization device ensuring universal solvent compatibility
M. Ildefonso, N. Candoni, & S. Veesler, Organic Process Research and Developpement, **2012**, 16 (4), pp 556-560

Enseignements

TP d'optique géométrique	L1
TP physique expérimentale	L1-L2-L3
TP d'électrocinétique	L1
TD de chimie physique	L2

Encadrements

Palakorn Punniam	IUT	3 mois
Jean-Christophe Renaud	IUT	3 mois
Isabelle Cassagneau	École d'Ingénieur	1 mois
Michelle Bootsma	IUT	2 mois
Julie Quercia	IUT	2 mois
Amélie Rethore	BTS	2 mois
Benjamin Ben Haim	Master 2	6 mois
Minh Phat La	IUT	3 mois

Conférences – Séminaires

Microfluidic, a new scale to study nucleation
Faculty of medicine, Gunma University, **2010**, Gunma (Japan) Séminaires
Graduate School of Biosphere Sciences, Hiroshima University, **2010**, Hiroshima (Japan) Séminaires

Tutorial - How to perform a crystallization experiment using a microfluidic chip?
International School of Crystallization, **2010**, Granada (Spain) Oral + Poster

Nucleation and Polymorphism explored via an Easy-to-use Microfluidic Tool
9th International Workshop CGOM9, **2010**, Singapore (Republic of Singapore) Oral + Poster

A universally solvent-compatible microfluidics device for crystallization study
10th International Workshop CGOM10, **2012**, Limerick (Ireland) Oral

Microfluidic, a new scale to study nucleation
18th International Symposium on Industrial Crystallization, **2011**, Zurich (Swiss) Oral

Tutorial - How to perform a crystallization experiment using a microfluidic chip?
International School on Biological Crystallization, **2011**, Granada (Spain) Oral + Poster
Summer school EMBO in collaboration with AFMB, **2011**, Marseille (France) Oral

La microfluidique au service de la nucléation
Cristech 2010, **2010**, Autrans (France) Oral

Microfluidic tools for screening of crystallisation conditions
Winter school of microfluidic, **2010**, Les Houches (France) Poster

Étude de la cristallisation d'une protéine modèle à l'aide d'une puce microfluidique
Cristal 6 : Cristallisation et précipitation industrielle, **2010**, Marseille (France) Poster

Cristallisation de biomolécule : approche microfluidique
Journée Scientifique Biologie, Chimie, Physique, **2010**, Marseille (France) Poster

Développement d'un outil microfluidique pour l'étude de la cristallisation
Journée Scientifique des Doctorants CINaM, **2010**, Marseille (France) Oral

Étude de la cristallisation d'une protéine à l'aide d'une puce microfluidique
Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale, **2010**, Marseille (France) Poster

Les protéines et leur structure
Fête de la science, **2010**, Marseille (France) Oral + Poster

Cristallisation de protéines : approche microfluidique
Journée Scientifique de l'École Doctorale, **2011**, Marseille (France) Poster

Microfluidique pour la nucléation
Journée Scientifique des Doctorants CINaM, **2011**, Marseille (France) Oral

Formulation et déformulation d'un sirop de menthe
Fête de la science, **2011**, Marseille (France) Oral

Étude de la cristallisation grâce à l'outil microfluidique
Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale, **2012**, Marseille (France) Oral

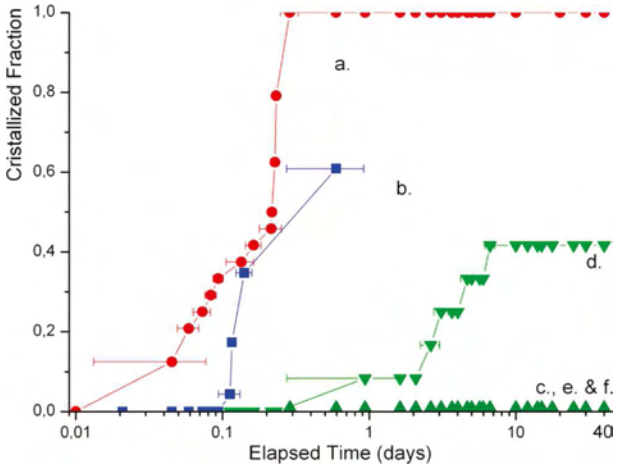
2 Cristallisation du KDP

Au cours de ce travail, j'ai eu la chance de collaborer avec l'équipe d'Alain Ibanez de l'institut Néel sur le contrôle de la nucléation de cristaux de KDP (dihydrogéno phosphate de potassium). Le but de ce travail est de faire croitre en solution des cristaux de KDP de grande taille. De tels cristaux permettent de produire des lames de grande taille (40 x 40 cm^2) utilisées comme convertisseur de fréquence sur des lasers de grande puissance comme ceux du "Laser Mégajoule". Pour produire un monocristal de cette taille possédant les qualités optiques requises, il est important que sa croissance se fasse en l'absence d'impureté et particulièrement d'autres cristaux de KDP qui pourraient générer des défauts dans le cristal.

La méthode utilisée pour produire ces cristaux repose actuellement sur un abaissement progressif de la température et nécessite plusieurs mois. C'est pourquoi l'institut Néel propose une nouvelle méthode plus rapide basée sur l'enrichissement en continu de la solution de croissance du cristal. Pour cela on pompe de la solution dans la cuve de croissance puis on l'enrichit en KDP en la faisant passer dans une cuve légèrement plus chaude contenant des cristaux de KDP. La solution passe ensuite par un système de filtration avant d'êtres ramenée à la température de la cuve de croissance et de réintégrer cette dernière.

Le principal point faible de cette méthode est le risque important de nucléation pouvant survenir dans la solution enrichie en KDP une fois celle-ci refroidie. Il est donc primordial que le système de filtration empêche l'entrée ou la nucléation d'un cristal dans la cuve de croissance. Le but de ce travail est de déterminer le traitement le plus efficace que doit subir la solution dans le système de filtration pour éviter l'apparition d'un second cristal dans la cuve de croissance.

Le travail que nous avons mené au CINaM vise à comparer les effets sur la nucléation de différents traitements pouvant être appliqués à la solution dans le système de filtration. Chaque expérience a consisté à remplir 24 vials avec 1ml de solution ayant subi l'un des traitements possibles puis de suivre l'apparition de cristaux dans les différents vials au cours du temps. Les résultats sont résumés dans la figure ci-dessous.



Fraction de vials cristallisé en fonction du temps pour différents traitements de la solution : a) Filtration seule (20nm) ; b) Filtration et surchauffe de 20°C durant 20 minutes ; c) Filtration, surchauffe de 20°C et ultrasons à 25 kHz durant 10 minutes ; d) Filtration, surchauffe de 20°C et ultrasons à 45 kHz durant 10 minutes ; e) Filtration, surchauffe de 20°C et ultrasons à 25 kHz durant 20 minutes ; f) Filtration, surchauffe de 20°C et ultrasons à 45 kHz durant 20 minutes

Notre travail a permis de montrer que la surchauffe de 20°C permet de retarder l'apparition de cristaux dans les vials et que cet effet est augmenté par l'utilisation conjointe des ultrasons. Il est même possible de différencier les deux fréquences d'ultrasons utilisées, car pour un même temps d'application de 10 minutes les ultrasons à 45kHz permettent de retarder la nucléation de quelques jours tandis que les ultrasons à 25kHz permettent de retarder cette dernière de plus de 40 jours. Cette étude permet donc de valider l'utilisation des ultrasons dans le système de filtration pour optimiser la croissance de cristaux de KDP, mais aussi de choisir la fréquence d'ultrasons (25kHz) à utiliser afin de maximiser l'effet d'inhibition de la nucléation.

CRYSTAL GROWTH & DESIGN

ARTICLE

pubs.acs.org/crystal

Nucleation Control and Rapid Growth of KDP Crystals in Stationary Conditions

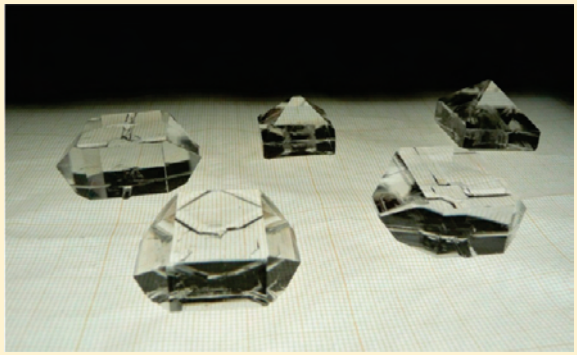
Julien Leroudier,[†] Julien Zaccaro,[*,†] Manuel Ildefonso,[‡] Stéphane Veesler,[‡] José Baruchel,[§] and Alain Ibanez[†]

[†]Institut Néel, CNRS & Université Joseph Fourier, UPR 2940, 25 av. des Martyrs, BP 166, 387042 Grenoble cedex 09, France

[‡]Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM), CNRS, Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 09, France

[§]European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 38043 Grenoble cedex 09, France

ABSTRACT: Thanks to an improved control of the nucleation, an original crystal growth method operating in stationary thermodynamic conditions has been developed. It allows rapid growth of crystals at constant temperature and supersaturation. As a case study, large KH_2PO_4 (KDP) crystals of high purity have been reproducibly obtained at constant temperatures and growth rates of 1 cm/day. Recorded X-ray diffraction topographs of as-grown crystals showed high crystal quality. This method opens the way for the rapid growth of high quality crystals for homogeneous intermediate compositions of solid solutions, doped crystals, and compounds exhibiting a weak solubility.



1. INTRODUCTION

Crystal growth of KH_2PO_4 (KDP) is a topic that has been extensively covered over the years.[1,2] Indeed, for decades KDP crystals have been grown either for their nonlinear optical properties or, because of the relative ease in achieving successful growth, for fundamental studies on crystal growth mechanisms. At the beginning of the 1990s, special interest arose for large aperture optical elements based on KDP crystals (Pockel's cells, frequency converters) for laser fusion facilities such as the "Gekko-XII", the "National Ignition Facility" (NIF) or the "Laser Mégajoule" (LMJ) in Japan, the United States, and France, respectively. The size of such optics (40×40 cm^2) requires giant KDP crystals to be grown in solution. This promoted many studies on methods to grow giant crystals. The Japanese, for instance, developed a three vessel technique[3] which allowed them to grow, in half a year, a giant KDP crystal (40×40 cm^2 in cross section) at merely 3 mm/day. At the same period, rapid growth of KDP (10 mm/day and over) was pioneered in the former USSR[4−7] and later developed at the Lawrence Livermore National Laboratory for the specific needs of the NIF.[8−10] This rapid growth technique is based on the temperature lowering method (TLM) to create the supersaturation in 1000 L[11] or even 2000 L[12] tanks of solutions and their continuous filtration[13] to avoid spurious nucleation.

While TLM is very robust and fully mature for the rapid growth of giant KDP crystals, it nonetheless suffers from intrinsic limitations. The main drawback of TLM is to have a solvent which provides a convenient solubility-temperature gradient of the solute: not too steep to avoid unstable growth associated with temperature fluctuations, especially when rapid growth is involved, and not too moderate to avoid a disproportionate volume of growth solutions to obtain large crystals. Finding such "good" solvents can be extremely time-consuming, even impossible, for some solutes. For instance, the chemical stability of some compounds can drastically limit the acceptable solvents; others, such as covalent compounds, will present extremely low solubility in almost any liquid. For all these compounds, the TLM is totally inappropriate for typical growth, let alone rapid growth. Moreover, even if a convenient solvent is known, once a sufficient forced convection is achieved on the growing crystal, the only adjustable parameter left to control the growth is the temperature lowering rate. This major parameter has to be adjusted throughout the growth run to maintain a constant growth rate and avoid spurious nucleation. This can prove very difficult especially when one considers growing a new compound for which the solubility curve and metastable zone width are not as well established as those of KDP. Furthermore, with this method, it is extremely difficult to assert the true supersaturation at which the crystal is being grown. This determination requires determining the actual desaturation of the solution from its initial concentration caused by the growth of the crystals. This is difficult to achieve in practice during growth with reasonable accuracy since it requires determining the crystallization yield from the size and shape of the growing crystals or from their weight, taking into account the change in solution density accompanying the desaturation being sought. As a result, for TLM, the supersaturation which is the

Received: March 18, 2011
Revised: April 18, 2011
Published: May 02, 2011

ACS Publications © 2011 American Chemical Society

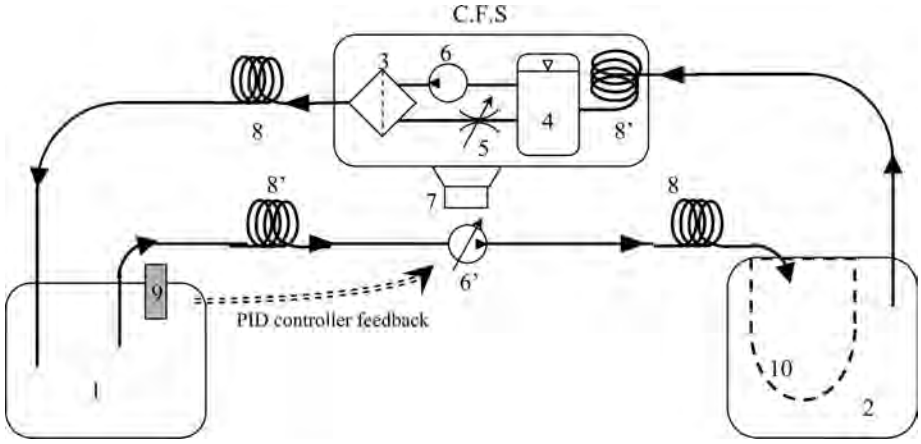


Figure 1. Hydraulic schematic of the "rapid transport method" growth system: 1 - growth zone; 2 - saturation zone; 3 - tangential filtration cartridge (20 nm threshold); 4 - accumulator; 5 - metering valve; 6 - peristaltic pump; 6′ - variable peristaltic pump; 7 - ultrasound and heating element; 8, 8′ - heat exchangers; 9 - capacitive level sensor; 10 - filter bag (1 μm threshold) holding the micro crystalline nutrient. This RTM system has been patented.[17]

driving force of the growth is generally left undetermined and variable. Indeed, even if the growth rate is maintained constant by adapting the temperature lowering rate, it does not provide stable growth conditions since a change in supersaturation is used to compensate for the varying growth temperature. As a consequence, the continual variation of the thermodynamic conditions results in modifications of the growth mechanisms involved. Thus, corresponding crystals are prone to inhomogeneities, be it in the incorporation of impurities,[14] of doping, or of substitutional elements. This latter point can be particularly critical for the growth of an intermediate composition of a solid solution. In that case, the sole fact of lowering the temperature can impact the partition coefficient, so the composition grown at the beginning of the run is significantly different from the one crystallizing later. This compositional drift can cause enough strains to create defects or cracks in crystals even smaller than 1 cm^3, rendering them useless. That is why, very early, transport methods that are capable of growing crystals in stationary thermodynamic conditions were considered to be "the most pertinent ones".[12] Nevertheless, for the rapid growth of KDP, TLM was preferred because it was simpler, and the extra joints, piping, connections, pumps, or reactor that transport involves could be as many sites of catastrophic spurious nucleations.[11]

But, as exposed above, if one is considering rapidly growing crystals less favorable than KDP in terms of solubility or compounds doped or of intermediate compositions of solid solutions, then adapting the rapid growth principals to a transport technique becomes necessary. But to operate a transport method in rapid growth regime, the solution has to be conditioned in order to remain metastable, without spurious nucleation, even at high relative supersaturations.[11] For the TLM, this treatment is realized before and throughout the growth in a continuous filtration system (CFS). An important part of this treatment is the ultrafiltration of the solution. But, this is not sufficient to inhibit the nucleation. Indeed, if one considers the activity coefficients of KDP solute in water[15] at 20 °C with a relative supersaturation of about 25%, according to the classical theory of nucleation the critical radius is about 2 nm, for KDP clusters of perfect crystallinity. Ultrafiltration elements with such a low threshold exist but the filtrate flow they can achieve is too limited to be used in a crystal growth system. That is why in the CFS presented in ref 11, the solution is overheated to dissolve critical clusters smaller than the filtration threshold and to obtain thus "disaggregated" growth solutions. This overheating has been proven to be very efficient for the crystal growth of KDP[10] by TLM. Indeed, in that case the whole solution is overheated and filtered before the growth run starts, and then the solution is only in contact with the growing crystal. So, the overheating and filtration in the CFS are sufficient to maintain the solution in this "disaggregated" state.

In this study, we introduce a new method of rapid growth by solution circulation between two tanks, one containing the nutrient (saturation zone), the other the growing crystal (growth zone) and in between these two zones a CFS to remove any solute clusters. We have named this new route the rapid transport method (RTM). Unlike the TLM, for the RTM the solution is in contact with the nutrient which is gradually dissolved in order to maintain the saturation concentration. Hence, the solution entering the CFS contains solute clusters that have to be removed as they go past the CFS, before reaching the growth zone. That is why a new CFS was designed with a dramatically increased efficiency to prevent any spurious nucleation. This rapid transport method, with improved CFS, allowing rapid crystal growths in stationary thermodynamic conditions is presented here. To demonstrate the feasibility and efficiency of this new route and to be able to draw comparisons between rapids growth by RTM and TLM, we used KDP as the reference crystal.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Nucleation Control. To study the efficiency of the different treatments considered for the CFS, induction time measurements were performed. Very high supersaturations (83%) were used to keep the inductions times relatively small but also to reduce the time between the moment the crystal becomes observable and the actual nucleation. Thus, solutions saturated at 65 °C were prepared by dissolving high purity KDP salt (<ppm metal impurities) in high purity water (ρ = 18.2 MΩ cm) and circulated in a CFS (see Figure 1). Different treatments were then applied: (1) filtration only (20 nm threshold), (2) filtration (20 nm) and overheating (T_{eq}+ 20 °C), and (3) filtration (20 nm) and overheating (T_{eq}+ 20 °C) supplemented with ultrasound. For the treatments including ultrasound, different frequencies (25 and 45 kHz), power (20 and 140 W) and durations (10 and 20 min.) were tested. A list of the different treatments is presented in Table 1. In each case, the

Table 1. Different Treatments Applied to KDP Aqueous Solutions Saturated at 65°C before Bringing Them to 20 °C Achieving a Supersaturation of σ = 83%

				ultrasound	
exp	duration (min)	filtration (nm)	overheating (°C)	frequency (kHz)	power (W)
a		20			
b	20	20	+20		
c	10	20	+20	25	20
d	10	20	+20	45	20
e	20	20	+20	25	140
f	20	20	+20	45	140

solution exiting the CFS (after the 20 nm filtration cartridge) at T = 85 °C was distributed in 24 × 2 mL vials (HPLC grade) and stored in a thermostatted multiwell set up[16] within a few seconds at 20 °C creating suddenly a supersaturation of σ = 83%. The temperature was kept constant and sequential image acquisitions were performed automatically (at least every 30 min) to determine if any crystallization has occurred. The obtained images enable the estimation of the induction time in each vial as the mean elapsed time between the first image with an observable crystal and the previous crystal-free observation.

2.2. Growth Setup Description. *2.2.1. Temperatures and Supersaturation Management.* In the system we present here, the supersaturation is created by transporting solution from a zone where a high solute concentration is maintained (the saturation zone containing nutrient in excess) to the growth zone where the solubility and associated temperature are lower (Figure 1). Indeed, each one of these concentrations is set only by fixing the temperature in the corresponding zone. Hence, this enables the growth temperature and the relative supersaturation σ to be adjusted independently. The latter is determined by the temperature difference between the two zones according to

$$\sigma = \frac{S(T_{\mathrm{sat}}) - S(T_{\mathrm{grow}})}{S(T_{\mathrm{grow}})} \quad (1)$$

where $S(T)$ is the solubility at temperature T, T_{sat}, and T_{grow} being the temperatures of the saturation and growth zones, respectively.

For the targeted supersaturation to be achieved and, more importantly, to be stationary, the temperatures in growth, saturation zones, and filtration system must be perfectly controlled. Because these temperatures can be significantly different from one another, any change in the solution flow could modify the temperature in the part downstream. For instance, if the filtration element experiences clogging, the flow would be reduced over time so fewer calories would be brought to the growth zone by the incoming solution, leading to a modification in both growth temperature and supersaturation. That is why the solution goes through heat exchangers before it enters any part of the system (growth and saturation zones and the filtration system - 8, Figure 1). Of course, constant temperature in the growth zone will lead to a stationary supersaturation only if nutrient in excess remains in the saturation zone at all time. Moreover, the supersaturation can be considered stationary at the condition that the desaturation caused by the growing crystals remains negligible. That is, over any given period of time the growth yield should be much smaller than the total amount of solute in excess transported to the growth zone. It means that there is a lower limit to the solution flow between the saturation and growth zones for the supersaturation to be considered stationary throughout the growth run. Below that limit, not enough excess solute is brought to the growth zone, and the growing crystals (especially toward the end of the run, when they consume the most solute from the solution) will significantly desaturate the solution. So, if one is able to achieve constant temperatures in each zone and provide a sufficient flow of solution between them, the growth process will be carried out under perfectly stationary conditions.

An additional advantage of this system is found at the initial stage of the growth. For TLM, the solution is prepared at a high initial concentration that should correspond to a given saturation temperature. But the actual saturation temperature can be slightly different. Not knowing what the saturation temperature is precisely can be quite a problem at the initial stage of the growth when the seed is to be dissolved slightly and regrown in a controlled manner. Brutal temperature readjustments applied to avoid losing the seed by dissolution or to slow down a too rapid seed grow can be necessary but are detrimental in both cases to the grown crystal quality and are one of the main cause of failing growth runs. On the contrary, with the RTM system, one could almost ignore accurately the solubility curve of the compound to be grown and yet, in a few trials, manage to make perfect seed growth in a totally fail proof and perfectly reproducible way. Indeed, the saturation temperature is precisely determined; a controlled dissolution of the seed is achieved when the growth zone temperature is set slightly above the saturation one. Then, once a sufficient dissolution of the seed has been obtained the temperature of the growth zone is lowered to create the desired supersaturation to grow the seed. In only a few trials, the temperature profile of the growth zone can be determined and repeatedly applied to realize the exact same optimal initial stages of growth making this system much more stable and robust than TLM in this highly critical part of the growth run.

Finally, the solution in the growth zone is sent back to the saturation zone to compensate for the fraction of solute lost to the growth. The pump responsible for this transfer (6′, Figure 1) is a peristaltic pump (Watson Marlow model 520Du) driven by the solution level measured by a contactless capacitive sensor inserted in the growth reactor lid. The feedback from this sensor adjusts the return pump flow to ensure a perfectly constant level of solution in the growth zone. A heat exchanger at the exit of the growth zone (8′, Figure 1) allows making the solution undersaturated during this transport to avoid spurious nucleation in the return tube.

2.2.2. Rapid Growth Aspect. To operate the transport system in a rapid growth regime the nucleation has to be avoided even at high supersaturations. That is why a CFS derived from that presented in ref 11 was incorporated in the RTM design. A first filtration stage is provided by a filter bag (filtration threshold of 1 μm) used to hold the nutrient powder in the saturation zone. The solution going to the growth zone through the CFS is collected outside of this filter bag, while that returning from the growth zone goes directly into the bag. This first filtration element not only stops large insoluble particles from reaching the CFS, and hence the growth zone, but it also avoids any loss of nutrient grains being dragged into the CFS. If a significant amount of nutrient grains would be collected by the CFS, they would dissolve there at higher temperature than that of the saturation zone. Thus, the actual solution concentration would no longer be controlled by the saturation zone temperature but would gradually increase over time, eventually reaching the saturation at the CFS temperature.

The CFS has a standard tangential filtration system:[18] a tangential filtration element (0.02 μm threshold, 3, Figure 1) fed with solution coming from an accumulator (PTFE container 4, Figure 1). The solution is circulated by a peristaltic pump (6, Figure 1) set at a constant flow, which insures a high cross-flow of solution over the filtration membrane. This pump combined with a metering valve (5, Figure 1) on the retentate port of the filtration element allows adjustment of the transmembrane pressure, and hence, the filtrate flow which is the solution flow from the saturation to the growth zone. The ability to adjust this flow enables eventually compensating for the fouling of the membrane and maintain an optimal solution flow, high enough to avoid the desaturation of the growth solution by the growing crystals as introduced above. By itself, this nanofiltration is not enough to avoid

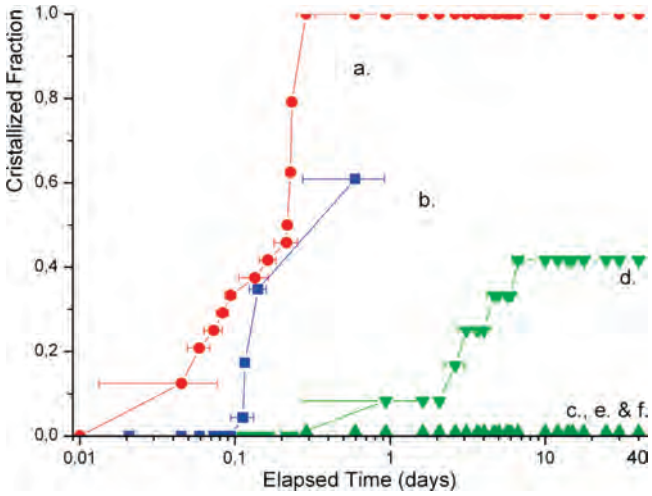


Figure 2. Fraction of crystallized vials as a function of the elapsed time since the onset of a supersaturation of σ = 83%, for different prior treatments: (a) filtration only (pore size 20 nm); (b) filtration and 20 min of +20 °C overheating, (c) filtration and 10 min of 20 W−25 kHz ultrasound and +20 °C overheating; (d) filtration and 10 min of 20 W−45 kHz ultrasounds and +20 °C overheating; (e) filtration and 20 min of 20 W−25 kHz ultrasound and +20 °C overheating; (f) filtration and 20 min of 20 W−45 kHz ultrasound and +20 °C overheating.

spurious nucleation. That is why, ultrasound was applied in order to efficiently disaggregate the solute clusters and accelerate their dissolution.[19]

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Nucleation Inhibition and Induction Time Measurements. In order to determine the most efficient way to inhibit the nucleation, KDP solutions were subjected to various treatments (Table 1) and filtered (20 nm pore size) as they exited the CFS. Figure 2 presents the fractions of vials ($N(t)/N_o$) where at least one nucleation event has occurred as a function of the elapsed time since the onset of the supersaturation. For clarity, the elapsed time is presented in logarithmic scale to better distinguish the nucleation events occurring at very different time scales.

Even if the limited number of vials (N_0 = 24) increases the uncertainty attached to the estimators of the induction times, Figure 2 clearly shows the effect of the treatments on the stabilization of the solution from 1 to 3 order of magnitude.

First, the comparison of experiments a and b confirms the impact on nucleation of the treatment used for the rapid growth of KDP by TLM (overheating and filtration). Indeed, for the overheated solution no nucleation events have been observed within the first 3 h, while at the same time 33% of the vials containing untreated solution (exp a) had already crystallized. The increase of the induction time is somewhat limited here to less than 1 order of magnitude because of the very high supersaturation involved (σ = 83%).

If one then considers the impact of ultrasound on the induction time, Figure 2 clearly shows that if a limited amount of ultrasound, applied for a limited period of time (exp d, 20 W of 45 kHz ultrasounds for 10 min), inhibits the nucleation in a far more efficient way than overheating. For this particular experiment, it did not take hours but days to observe nucleation events in at least 50% of the vials. Furthermore, our results show, for the first time, that not only the duration of the treatment and the ultrasonic power have an influence but also that their frequency is an important parameter to perfectly inhibit the nucleation in solutions. Indeed, comparing experiments d (45 kHz) and e (25 kHz) one can see that the latter is far more efficient to delay nucleation. The maximum delay can still be obtained at 45 kHz by increasing the ultrasonic power and the duration treatment (exp f). As a result, for experiments c, e, and f where the solution was exposed to 25 kHz ultrasound or 45 kHz for a longer period (20 min), no nucleation was observed even after 40 days at a relative supersaturation of σ = 83%. From this study, the treatment we have selected for the RTM growth of KDP crystals was 100 W of 25 kHz ultrasounds. The high efficiency of this treatment allowed using short treatments (a few minutes) and so gave more flexibility on the acceptable solution flow through the CFS.

3.2. Rapid Growth of KDP in Stationary Conditions. Using the RTM setup described above, KDP crystals of several cm^3 have been grown in stationary conditions at different growth temperatures and supersaturations. In order to obtain the true growth rate for each set point, high purity materials were used.[20] Thus, all materials of the RTM system in contact with the salt or the solution are high purity (semiconductor grade) fused silica or polymer. High purity KDP salt (less than 1 ppm in metal impurities) has been used as nutrient in the saturation zone and dissolved in high purity water (ρ = 18.2 MΩ cm) to prepare the growth solution. For each growth, a point seed (less than 5 mm size) was mounted at the center of a rotating platform and introduced in the slightly undersaturated KDP solution. After a limited dissolution, the temperature of the growth zone has been lowered to create a supersaturation, the seed was reconstructed and the growth started. Within less than 1 h, the system was perfectly thermostatted (solution and seed) and the stationary growth conditions were thus achieved. A typical rotation schedule used for the growing crystals was 3600 rev/min^2 acceleration; 10 s of constant rotation at 60 rpm; 3600 rev/min^2 deceleration while the rotation direction was reversed after each cycle. Using a CCD camera with a macro lens, snapshots of the growing crystals were recorded at constant intervals throughout the growth run in order to determine the growth rate with an accuracy of ±0.2 mm/day. To demonstrate that the system was effectively running in stationary conditions, long growth runs were conducted. Because of the size of the system (1.2 L in the growth zone), crystals with a base larger than about 2 in. cannot be extracted. So the supersaturation was reduced in order to extend the growth run over a week. As can be seen in Figure 3, even for significant period of time the growth rate remains perfectly stationary. Figure 3 also shows examples of growth rates achieved at higher supersaturations and different growth temperatures. For all cases, the growth rates remains perfectly stationary through the growth run even for growth rates over 10 mm/day.

With RTM, high growth rates can be achieved even at low temperatures with a growth rates along *c* over 25 mm/day at 18 °C for a supersaturation of 28%. Of course, similar growth rates can be attained with lower supersaturations for higher growth temperatures. Yet, we favored low temperatures for the growth as it tends to lead to single crystals of higher quality, with a higher laser damage threshold.[21] Because of the size of our setup and the transient period before stationary conditions are indeed achieved, trying to reach higher growth rates like those obtained for a transient period (a few hours)[19] is hardly possible. Nonetheless, for KDP the growth rates achieved with RTM are similar to those achieved by rapid TLM;[22] the small rate

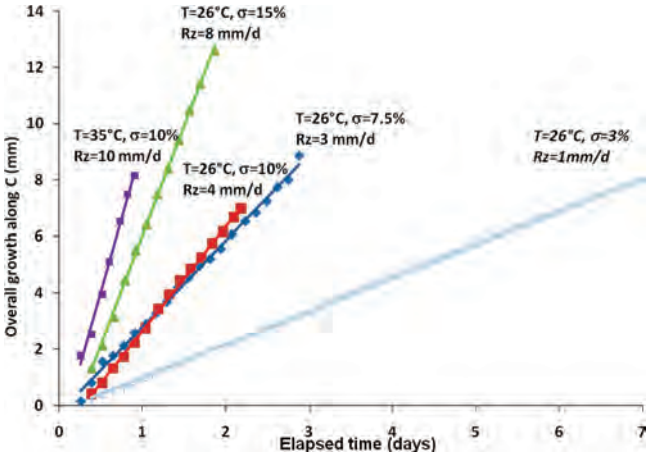


Figure 3. Growth along the crystallographic *c* axis of KDP crystals under different stationary conditions. The longest run (σ = 3%) was obtained for a reduced standard growth rate (1 mm/day), while the crystal rotation was not yet optimal. Hence, though it demonstrates the stationary growth over significant period of time, but this growth rate value is not to be compared with others due to a different hydrodynamic regime.

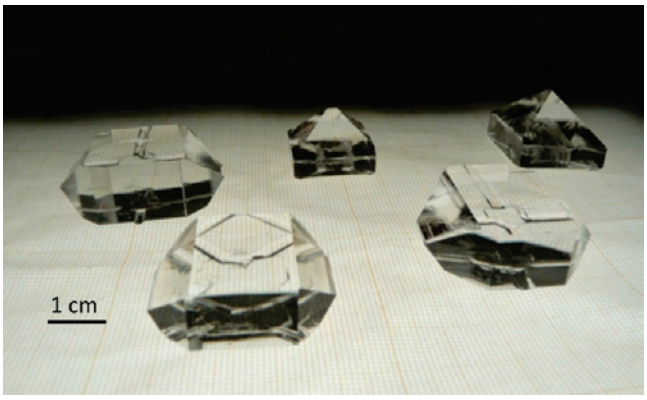


Figure 4. Examples of high purity KDP crystals grown at 10 mm/day (on millimeter paper). Three crystals are grown with horizontal *c*-axis (parallel to the image); two (in the back, on the right) are grown with vertical *c*-axis.

discrepancies can be explained by differences in hydrodynamic regimes. Moreover, the smaller volume of our system is less favorable in terms of achievable growth rates.

Still, in a few days, high purity KDP crystals of good optical quality can be repeatedly grown successfully at about 10 mm/day (Figure 4). The aspect ratio of the obtained crystals, with growths rates along *a* and *b* being almost equal to that along *c*, is typical of high purity KDP crystals. The resulting habitus for the crystals grown with *c* horizontal axis (Figure 4) is almost as long along *c* (growth along + and −*c*) as it is broad along *a* (growth along + and −*a*) but only half as high along *b* (growth along +*b* only) leading to a thick plate habitus. The crystals grown with the crystallographic axis *c* vertically present the standard habitus of high purity KDP.

3.3. Crystal Quality Characterizations. In order to determine the quality of the KDP crystals grown by the RTM method, X-ray diffraction topography images were recorded at the BM5 beamline of the European Synchrotron Radiation Facility. The lower energy part of the "white" photon energy spectrum was filtered away by copper and aluminum to reduce the heat load on the sample. All measurements were carried out in transmission (Laue) geometry, limiting the beam vertically by narrow slits (80 μm). This method, known as "section topography",[23] allows the study of "virtual" slices of the as-grown crystals. It is especially suitable for the nondestructive study of thick (over 1 mm) samples. As only a "nearly two-dimensional" part of the sample is illuminated, the contrasts associated with defects are more easily distinguished than in projection transmission topography[23] where all defects in the thickness would superimpose. Moreover, for section topography, the surface contributions are confined to the border of the images. The diffracted images were recorded on X-ray films of 2−3 μm resolution and later digitalized at 9600 dpi.

Figure 5 shows section topographs carried out in the *ab* plane of a KDP crystal grown at 26 °C with a relative supersaturation of 15% for a growth rate along *c* of 8 mm/day. Between each section the crystal was moved by 2 mm along the *c*-axis, the first image being recorded about 4 mm under the crystal apex. The diffracted beam falls onto the vertical film detector under an angle that corresponds to twice the Bragg angle. The recorded images are therefore projections where the horizontal dimension is conserved, but where the vertical one is narrowed, resulting in an uneven aspect ratio.

In these images we observe that KDP crystals grown by RTM exhibit a rather low defect density. The distorted regions (dark ones on the images) are confined to the immediate neighborhood of the lateral edges, or cover a very small fraction of the image corresponding to the bulk, over sections of about 1 cm^2. Moreover, no strains or misorientations are observed at the pyramidal growth sectors boundaries, and neither are growth bands or vicinal sectors. While the lines (or small dark contrasts) running parallel to the X-ray entry and exit faces (horizontal in the image) could be inclusions such as those observed in ref 12, the fact that most of them are parallel, short, and of the same dimension (especially in the upper part of image 5c) would rather point toward dislocations lines crossing the section plans at almost a right angle.

Figure 6a shows a traverse topograph of a 5 mm thick slab (μt = 7.8) cut perpendicularly to *c* (a vertical) in the prism of a KDP crystal grown under the same conditions as the one of Figure 5. The topograph was recorded in transmission in a Lang setup using the Mo $K_{\alpha 1}$ wavelength. Because of the strong absorption conditions, the strains associated with defects appear as losses of intensity (Borrmann effect, see for instance ref 22). In projection topographs, the contrasts of surface defects of the slab are superimposed on those of the bulk. To ascertain that the surface quality was not the major contribution to the contrasts observed in this traverse topograph, several sections were recorded. Like for Figure 5 the surface and volume contributions are then spatially separated on the film. In Figure 6b one can see that the diffracted intensity is perfectly homogeneous along the width of the image meaning that the surfaces do not significantly contribute to the contrasts observed in traverse mode (Figure 6a). The main features of the traverse mode image are the two vertical lines corresponding to the seed reconstruction. From these somewhat disturbed growth interfaces, dislocation bundles emerge, mostly on the left side, and run parallel to the *b*-axis. This indicates that in the case of that crystal, the initial stages of the growth (seed dissolution, reconstruction, and growth) were not completely optimized. On the other hand, the contrasts running parallel to the *b*-axis, in the lower quarter of the image, are not due to a growth instability but to small damages induced during the slab cutting (direction of the cutting wire along the

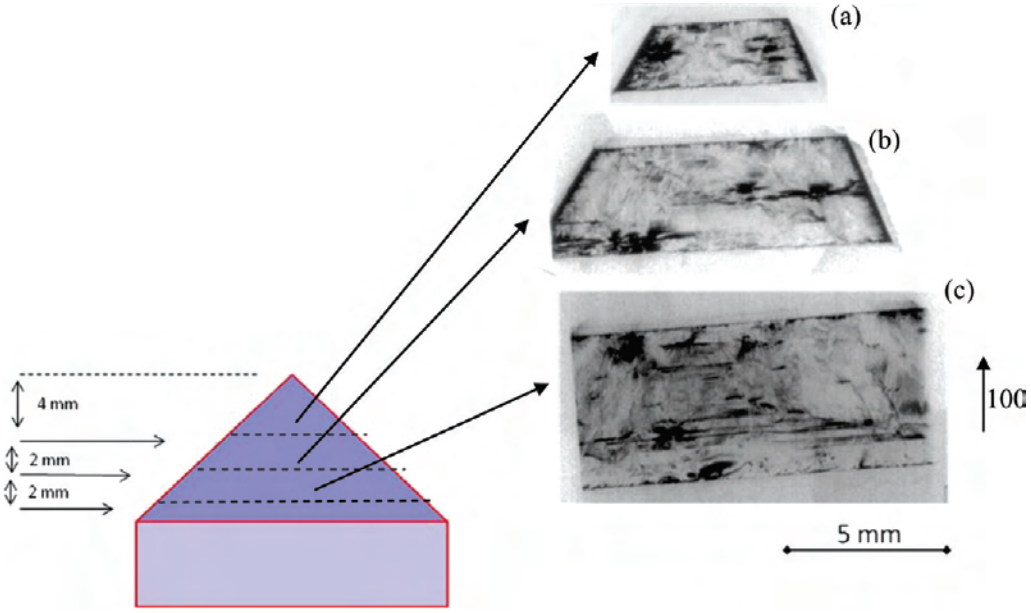


Figure 5. Section topographs of a KDP crystal grown by RTM. Topographs are taken in the dome (a) 4 mm, (b) 6 mm, and (c) 8 mm below the crystal apex in the *ab* plane while the diffraction vector is $g = [100]$.

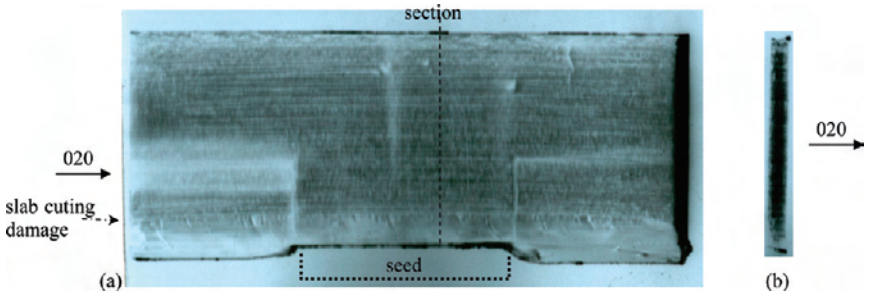


Figure 6. Topographs of a 5 mm thick slab ($\mu t = 7.8$) cut perpendicularly to the *c*-axis (vertical *a*-axis) in the prism of a KDP crystal grown by RTM. (a) Traverse topograph; (b) section topograph showing that no significant surface contribution (border of the image) participates in the contrast observed in the traverse image.

b-axis). Aside from that, no more than five defects are visible on that image, all located in the upper central region of the image. In spite of the very large volume probed here ($25 \times 10 \times 5$ mm^3), only a very small number of defects are visible with no strains or misorientation between prismatic growth sectors and no growth bands, thus confirming the good crystal quality as evidenced by the previous section topograph results, Figure 5.

4. CONCLUSION

An improved method to inhibit the nucleation in solution has been optimized by coupling ultrasound, overheating, and ultrafiltration of the solution. This allowed development of an original method of rapid solution growth in stationary conditions. By using a transport method (RTM), associated with efficient in-line inhibition of nucleation, particularly due to the ultrasound application, we have demonstrated that in the case of KDP, rapid growth rates can be achieved. Thus, we have obtained in a few days, under stable and reproducible conditions, large crystals of high quality exhibiting low defect densities, without any solvent inclusions, growth sector misorientations, or growth bands that could be easily observed by X-ray diffraction topography. This RTM growth technique, well-defined using KDP as the reference crystal, will be applied to other compounds such as intermediate compositions of solid solutions such as deuterated KDP crystals ($K(D_{1-x}H_x)_2PO_4$). In this case, it will be crucial to carry out the growth under stationary conditions (temperature and supersaturation) to obtain homogeneous crystals with constant D/H concentration ratios. On the other hand, this RTM method will be very useful for the growth of compounds exhibiting very weak solubility or limited temperature-solubility gradient.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: julien.zaccaro@grenoble.cnrs.fr. Phone (33)4 76 88 7804. Fax (33)4 76 88 10 38.

■ ACKNOWLEDGMENT

This work was performed with the support of the CEA Le Rippault under contract No. 722798100016897.

REFERENCES

(1) Rashkovich, L. N. In *KDP Family Single Crystals*; Hilger Ed.: Bristol, 1991.

(2) Zaitseva, N. P.; Carman, L. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2001**, *43*, 1.

(3) Sasaki, T.; Yokotani, A. *J. Cryst. Growth* **1990**, *99*, 820–826.

(4) Bespalov, V. I.; Bredikhin, V. I.; Ershov, V. P.; Katsman, V. I.; Lavrov, L. A. *J. Cryst. Growth* **1987**, *82* (4), 776–778.

(5) Zaitseva, N. P.; Smolskii, I. L.; Rashkovich, L. N. *Kristallografiya* **1991**, *36* (1), 198–202.

(6) Velikhov, Y. N. *Kristallografiya* **1992**, *37* (2), 540–543.

(7) Zaitseva, N. P.; Rashkovich, L. N.; Bogatyreva, S. V. *J. Cryst. Growth* **1995**, *148*, 276–282.

(8) de Yoreo, J. J.; Rek, Z. U.; Zaitseva, N. P.; Woods, B. W. *J. Cryst. Growth* **1996**, 291–297.

(9) Zaitseva, N. P.; Carman, L.; Smolsky, I.; Torres, R.; Yan, M. *J. Cryst. Growth* **1999**, *204*, 512–524.

(10) Zaitseva, N. P.; Carman, L.; Smolsky, I. *J. Cryst. Growth* **2002**, *241*, 363–373.

(11) Zaitseva, N. P.; de Yoreo, J. J.; Dehaven, M. R.; Vital, R. L.; Montgomery, K. E.; Richardson, M.; Atherton, L. J. *J. Cryst. Growth* **1997**, *180*, 255–262.

(12) Zhuang X. *J. Cryst. Growth* **2010**, doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.11.019.

(13) Zaitseva, N. P.; Atherton, J.; Rozsa, R.; Carman, L.; Smolsky, I.; Runkel, M.; Ryon, R.; James, L. *J. Cryst. Growth* **1999**, *197*, 911–920.

(14) Belouet, C.; Monnier, M.; Verplanke, J. C. *J. Cryst. Growth* **1975**, *29*, 109–120.

(15) Bohenek, M.; Myerson, A. S.; Sun, W. M. *J. Cryst. Growth* **1997**, *179* (1−2), 213–225.

(16) Detoisien, T.; Forite, M.; Taulelle, P.; Teston, J.; Colson, D.; Klein, J. P.; Veesler, S. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, *13* (6), 1338–1342.

(17) Patent Number FR2909687/EP2108061/WO2008081103.

(18) See, for instance, *Protein Concentration and Diafiltration by Tangential Flow Filtration*, Technical brief; Millipore Corporation: Billerica, MA, 2003; http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/ab3ba3a9d06cc6f185256bd10-068b0de/$FILE/TB032.pdf

(19) Nakatsuka, M.; Fujioka, K.; Kanabe, T.; Fujita, H. *J. Cryst. Growth* **1997**, *171*, 531–537.

(20) Kubota, N. *Cryst. Res. Technol.* **2001**, *36*, 749–769.

(21) Negers, R. A.; Zaitseva, N. P.; DeMange, P.; Demos, S. G. *Opt. Lett.* **2006**, *31* (21), 3110–3112.

(22) de Yoreo, J. J.; Land, T. A.; Rashkovich, L. N.; Onischenko, T. A.; Lee, J. D.; Monovskii, O. V.; Zaitseva, N. P. *J. Cryst. Growth* **1997**, *182*, 442–460.

(23) See, for instance, Authier, A. in *Dynamical Theory of X-ray Diffraction*; Oxford University Press: New York, 2001.

3 Nanotechnologies dédiées au contrôle de la nucléation

Cet article présente un ensemble de nanotechnologies ayant pour but de localiser la nucléation. La nucléation étant un phénomène stochastique il n'est pas possible de savoir à l'avance où et quand elle va se produire. Si l'on parvenait à localiser précisément la nucléation dans le temps et l'espace il serait possible d'observer les tout premiers instants d'un cristal en utilisant des outils adaptés (caméras rapide, diffraction laser,…). Différentes techniques sont développées au CINaM afin de localiser la nucléation à la fois dans le temps (déclenchement de la nucléation) et dans l'espace (confinement de la nucléation).

Pour contrôler le moment où la nucléation se produit il faut que la nucléation soit possible (solution sursaturée), mais également que la nucléation ne se produise pas spontanément (zone métastable). Dans cette zone métastable, la nucléation peut alors être provoquée par un champ externe. Dans cet article, deux types de champs externes seront développés, l'irradiation photochimique et les champs électriques localisés, même s'il en existe d'autre, comme les ultrasons ou les champs magnétiques par exemple.

L'irradiation photochimique consiste à exposer des solutions sursaturées de protéine (le BPTI) à la lumière d'une lampe au Xénon durant différents temps. Les solutions irradiées montrent l'apparition d'un plus grand nombre de cristaux que les solutions non irradiées ; de plus, le nombre de cristaux est d'autant plus grand que le temps d'irradiation est important. L'irradiation a donc un effet promoteur sur la nucléation et pourrait permettre de déclencher localement la nucléation.

La seconde technique utilisée au laboratoire pour promouvoir la nucléation est l'utilisation d'un champ électrique localisé qui est appliqué via deux pointes en tungstène dont les extrémités sont nanométriques. La nucléation se localise, suivant la protéine utilisée, à l'anode (pour le lysozyme) ou à la cathode (pour le BPTI). Toujours afin de localiser la nucléation les solutions peuvent être gélifiées en utilisant de l'agarose afin d'éviter que le nucléus formé se sédimente au fond de la solution, il s'agit ici de localiser la nucléation non plus seulement dans le temps, mais aussi dans l'espace.

Deux techniques sont développées au CINaM afin de localiser la nucléation dans l'espace, l'utilisation de gel (qui immobilise les nucléi) et la réduction du volume de cristallisation (inférieur au µL). Deux solutions techniques sont utilisées afin de réduire le volume de cristallisation, l'approche microfluidique (volume du µL au nL) et l'utilisation d'un générateur de microgouttes (volumes du nL au fL).

Le générateur est constitué d'un microinjecteur utilisé pour déposer des microgouttes de solution de NaCl sur une surface hydrophobe en PMMA placé dans un puits contenant de l'huile. L'eau contenue dans les gouttes diffuse lentement dans l'huile ce qui fait augmenter la concentration dans les gouttes. Pour des gouttes de 40pL la sursaturation peut atteindre $\beta > 1,9$ avant que la nucléation se produise (contre $\beta > 1,03$ pour des vials de 1ml). La faible taille des gouttes permet l'accès à des sursaturations qui ne pourraient être atteintes par d'autres méthodes.

L’approche microfluidique en PDMS de mon travail de thèse vient en complément de cette étude sur les très petits volumes en montrant une méthode simple permettant de générer un grand nombre de gouttes de faible taille. De plus grâce au nombre de gouttes disponibles il est possible de mener une étude plus poussée des phénomènes de nucléation en mesurant la limite de zone métastable ou la fréquence de nucléation.

Cet article permet de remettre mon travail dans le contexte des recherches menées au laboratoire et également de montrer la cohérence entre les diverses approches utilisées pour étudier la nucléation.

Nanotechnologies dedicated to nucleation control

Nadine Candoni*, Zoubida Hammadi, Romain Grossier, Manuel Ildefonso, Eve Revalor and Nathalie Ferté

Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille,
CNRS, Aix-Marseille Université,
CINAM-UPR3118, Campus de Luminy, Case 913,
13288 Marseille Cedex, France
Fax: +33 491 829 176
E-mail: candoni@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: hammadi@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: grossier@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: ildefonso@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: revalor@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: ferte@cinam.univ-mrs.fr
*Corresponding author

Tetsuo Okutsu

Department of Chemistry and Chemical Biology,
Gunma University,
KIRYU 375-8515, Japan
Fax: +33 491 829 176
E-mail: okutsu@gunma-u.ac.jp

Roger Morin and Stéphane Veesler

Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille,
CNRS, Aix-Marseille Université,
CINAM-UPR3118, Campus de Luminy, Case 913,
13288 Marseille Cedex, France
Fax: +33 491 829 176
E-mail: morin@cinam.univ-mrs.fr
E-mail: veesler@cinam.univ-mrs.fr

Abstract: This paper highlights the work of our group on the control and the observation of nucleation with techniques using nanotechnologies. This control is performed either by triggering nucleation in time with an external field or by localising it spatially in a microdroplet. Localisation in time using light irradiation induces nucleation by forming radicals; the use of electric field acts locally on the density of the solution. Localisation in space with a microfluidic device produces hundreds of nanovolume crystallisers where concentration and temperature are easily monitored. Thus, accurate statistical studies lead to the nucleation parameters (metastable zone, nucleation rate and polymorphism). Lastly, confinement with a microdroplet generator permits to reach very high

Copyright © 2012 Inderscience Enterprises Ltd.

supersaturations in fL to pL volumes allowing nucleation of a single crystal per microdroplet. All these methods clearly enhance nucleation in the metastable zone. Finally, they use small quantities of products offering potentialities for the screening of crystallisation conditions and phases (polymorphism).

Keywords: nucleation; confinement; external field; crystallisation from solution; polymorphism; metastable zone; microfluidic.

Reference to this paper should be made as follows: Candoni, N., Hammadi, Z., Grossier, R., Ildefonso, M., Revalor, E., Ferté, N., Okutsu, T., Morin, R. and Veesler, S. (2012) 'Nanotechnologies dedicated to nucleation control', *Int. J. Nanotechnol.*, Vol. 9, Nos. 3–7, pp.439–459.

Biographical notes: Nadine Candoni graduated from the Engineering School of Physics and Chemistry of Bordeaux, France, in 1992. She received both her MS (1994) and PhD (1998) in Condensed Matter, Chemistry and Organisation from the University of Paris VI. Her research for both degrees was carried out at the National Scientific Research Council of France (CNRS). She studied forced dynamic wetting of surfactant solutions and emulsions. In 2000, she was offered the position of Assistant Professor in the Biomedical Engineering School and in the *Groupe de Physique des Etats Condensés* at the Aix-Marseille University, France. She was recruited to develop research in nanotechnologies at the interface with biology. She first worked on surface functionalisation for the detection of DNA hybridisation using an Atomic Force Microscopy. She is currently in the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM, CNRS) and she is interested in physico-chemical properties of individual objects: (1) individual molecules through conductance measurements; (2) individual crystals through the generation of microdroplets by developing microfluidic techniques, for applications in materials sciences and biology.

Zoubida Hammadi received her PhD in Material Sciences (1993) from the Groupe de Physique des Etats Condensés at Marseille (France). It was a contribution to the study of copper thin films obtained by MOCVD. Since 1994, she occupies the position of Assistant Professor in the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM-CNRS) in association with Aix-Marseille University. During these years, she worked in various themes of research concerning field ion emission and she developed a new field ion microscope using a coaxial structure as emission source. Currently, she is interested in developing new approaches on crystallisation under electric fields and confinement, to address nucleation problems.

Romain Grossier received his PhD (2006) from the Ecole des mines of Albi-Carmaux (France) for his work on ultrasound-assisted crystallisation. During his postdoctoral fellowship in the Interdisciplinary Center of Nanoscience in Marseille (CINaM-CNRS), he studied the nucleation in confined spaces (in nanolitre to femtolitre droplets). He demonstrated the direct impact of confinement on the nucleation process. He controlled nucleation with one single nucleation event by droplet, to understand factors influencing the process and its underlying physics. He is now adapting this research to cementitious materials within the scope of the MIT Concrete Sustainability Hub, as a Postdoctoral Associate in the Van Vliet group.

Manuel Ildefonso received his MS in Formulation and Chemical Engineering from the University of Lyon, France, in June 2009. His research for this degree was carried out on co-crystal formulation of pharmaceutical products. Since September 2009, he was offered the position of PhD under the supervision of

Dr. S. Veesler and Dr. N. Candoni at the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM-CNRS). His work focuses on the development of droplet-based microfluidic devices for application in crystallisation for both pharmaceutical and biological compounds.

Eve Revalor graduated from the Engineering School of Chemical Engineering of Marseilles (ENSSPICAM) in 2005. She received her PhD in 2009 for her work on the crystallisation of active pharmaceutical compounds under external fields at the University of Marseilles in the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM-CNRS) under the supervision of Dr. Stéphane Veesler. This work was in collaboration with Sanofi-Aventis. She is now working at MIT on continuous crystallisation, as a Postdoctoral Associate in the MIT-Novartis Center for Continuous Manufacturing.

Natalie Ferté was recruited as Engineer in Biochemistry at the National Scientific Research Council of France (CNRS) in 1977 and she received her PhD in 1984. In 2002, she joined the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM, CNRS), France. She works on collaborations between physicists and biologists on various experiments concerning biological objects. Her expertise covers biochemical characterisation, purification, crystallisation, light diffusion, fluorescent labelling, lipid bilayers.

Tetsuo Okutsu graduated in Chemistry from the Tokyo Institute of Technology in 1986 (Chief Professor Kinichi Obi). He received his PhD (1991) on Photochemistry of the triplet state studied by the Electron Spin Resonance. Then, he worked at Fuji Photo Film Co. Ltd. on the crystal growth of tabular silver bromide crystals for high sensitive photo emulsion and he successfully synthesised monodispersed high aspect ratio tabular AgBr grains. In 1994, he obtained a position in the Department of Chemistry at the National University of Gunma and he developed his expertise on the influence of light irradiation: morphology change of the aromatic microcrystals (2000); enhancement of protein crystallisation (2003) with Dr. S. Veesler at CINAM (Marseille, France). Recently, he is interested in metal crystal growth induced by strong photons-molecules coupling field.

Roger Morin graduated in Electrical Engineering (1977), in Material Science (1977) and in Solid State Physics (1978) from the Ecole Supérieure d'Electricité and the University of Paris. He received his PhD in Physics from the University of Marseille, France, in 1986. Presently, he is the Research Director at the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM, CNRS). Currently, he works on: (1) properties from atomic size sources and structures like insulating nanoparticles and ultra-thin films; (2) extending the point source/probe concept to control reactions in solutions, soft reactions like crystal nucleation or strong reactions like ionic water dissociation.

Stéphane Veesler graduated from the Engineering School of Chemistry of Lyon (ESCPE), France, in 1987. He received his PhD (1991) in Material Sciences from the University of Marseille, France. His PhD research concerned a contribution to the knowledge of crystallisation in the Bayer process, with Dr. Boistelle. In 2006, he was offered the position of Research Director at the Interdisciplinary Center on Nanoscience in Marseille (CINaM, CNRS), for his expertise covering the different aspects of crystal growth from solution. Currently, his interest focuses on nucleation, developing usual and unusual approach. In conjunction with basic research, industrial and biological problems, he works on calcium sulphates, aluminium trihydroxides, some organic weed-killers, pharmaceutical compounds and biological materials.

1 Introduction

Crystallisation is widely applied in chemistry, physics and biology. In fact, we can mention drug design in pharmaceutical industries, determination of molecular structure in biology and development of single crystals in optics. In all of these applications, crystals must answer well-defined properties like crystalline phase, crystal habit, purity, mechanical strength, size, etc. In addition, according to the conditions of crystallisation, a very large number of solid substances may appear such as polymorph, solvates, microcrystalline solids and amorphs.

In crystallisation from solution, nucleation plays a fundamental role in the physical properties of crystals, such as crystal size distribution and phases. This task is extremely challenging because growth of crystals is optimal in the metastable zone, at low supersaturation, where nucleation is kinetically inactive. Thus, the purpose for crystal growers is to separate nucleation and growth phases. As nucleation is a stochastic phenomenon, the probability of observing the first nuclei is very low, for spatial and temporal reasons. Therefore, our aim is to provoke nucleation by localising it in time and space. In this review, we present our unusual approach of nucleation control and study with nanotechnologies.

To induce nucleation in the metastable zone, we use external fields, namely photochemical-light-induced nucleation [1–4] and localised voltage-induced nucleation [5–7]. Thus, both external fields allow us to control the time localisation of the nucleation event. Moreover, localisation in space is reached by confining the nucleation volume using

- gel media and localised voltage
- nanolitres with microfluidic method [8–10]
- picolitres to femtolitres with microdroplet generator [11–13].

2 Parameters of crystallisation

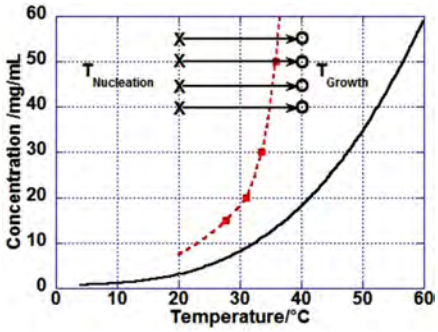
In crystallisation from solution, the first step consists of dissolving a chemical species in an interesting or imposed solvent. When the concentration in the solution is superior to the solubility of the species in the solvent at the considered temperature, the solution is supersaturated and a solid phase can crystallise. To understand crystallisation, several parameters, not only the solubility curve but also the metastable zone, the nucleation kinetics and polymorphism have to be determined. Figure 1 is a schematic representation of these parameters vs. temperature.

2.1 Metastable zone (MZ)

The metastable zone is limited by the maximum temperature above which the supersaturated solution can stay for the required time, without losing its metastability [14]. Figure 1 shows that this limit defines two zones where nucleation and growth are kinetically or thermodynamically promoted, respectively. It must be noted that the nucleation corresponds to the appearance of crystals and growth to their subsequent expansion. In practice, for a given concentration, the temperature TMZ limiting these

two zones is determined by storing solutions at given temperatures for a given time (20 h in our work). During this time if T < TMZ, crystals nucleate and if T > TMZ, no crystal appears. For low amount of crystals, i.e., experiments performed in small volumes, the number of crystals can be counted for each temperature and TMZ (the lower temperature at which there is no crystal) is extrapolated (interpolation) from a plot of the number of crystals in the solution vs. temperature.

Figure 1 Curves of solubility vs. temperature (····) and metastable zone (---), lines improve legibility. Points (O) and (×) indicate nucleation and growth conditions, respectively. Arrows represent the experimental path in the phase diagram (see online version for colours)



2.2 *Nucleation kinetics*

The nucleation kinetics, or more commonly, the nucleation rate J is the number of crystals that form in the supersaturated solution per unit of volume and per unit of time. To determine J, the Double Pulse Technique (DPT) permits to decouple nucleation and growth [15,16]. The nucleation rate, at a given concentration C, is given by the variation of the amount of crystals nucleated, with nucleation time. Therefore, DPT imposes a sequence of temperature (Figure 1): first, it is stored at a temperature chosen to prevent nucleation of crystals, T_{Growth} in the MZ; then, the temperature is lowered to a selected temperature in the nucleation zone $T_{\text{Nucleation}}$. After a period of Δt (nucleation time), temperature is raised from $T_{\text{Nucleation}}$ to T_{Growth}. At T_{Growth}, supersaturation is at a level where nucleation rate is practically zero, but the crystals already formed can grow to detectable dimensions. After the growth stage, the crystals nucleated at $T_{\text{Nucleation}}$ during Δt are counted. Hence plotting the average number of crystals nucleated as a function of the Δt, the steady-state nucleation rate is determined for a given concentration as represented by the slope of the straight line plotted.

Here, we only need to recall that [17]:

$$J = K_0 \exp - \left(\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3 \ln^2 \beta} \right) \tag{1}$$

where K_0 is a pre-exponential factor, Ω is the volume of a molecule inside the crystal (3×10^{-20} cm^3 for tetragonal lysozyme [16]), γ is the crystal-solution interfacial free energy (J.m^{-2}), k is the Boltzmann constant (1.3805×10^{-23} J.K^{-1}), T temperature (K) and

β is the supersaturation, $\beta = C/Cs$ where C is the solution concentration and Cs is the solubility.

Finally, one of the limitations involved in measuring J is the supersaturation range over which the experiment can be performed. When β is too low, heterogeneous nucleation can replace homogeneous nucleation. When β is too high, J is difficult to measure because it is too rapid. In practice, the nucleation frequency can be measured only in the vicinity of the metastable zone limit.

2.3 Polymorphism

Polymorphs are different solid phases for which the chemical composition is the same. However, for the general case of different phases with different compositions, solvates for example, phenomena described hereafter are identical.

In a solution of given concentration, different phases or polymorphs can nucleate according to the temperature. However, there is only one of them that is stable, corresponding to the minimal free energy of the system. In fact, as Ostwald [18] set into rule in 1897, a chemical system does not tend directly towards the most stable state, but rather tends towards the metastable state at closest. In conditions of volume where mononuclear nucleation occurs, the nucleated crystal of the phase being alone, it cannot easily follow a solution-mediated phase transition to a more stable phase. Moreover, the probability of nucleating a metastable phase is increased by high supersaturations [19].

3 Material section

In this paper, we present crystallisation experiments performed with proteins as model system.

3.1 Model proteins

- Hen-egg white lysozyme (14600 Da, pI = 11.2) is purchased from Sigma and is used without further purification.
- BPTI (6511 Da, pI = 10.5) is supplied as a lyophilised powder by Bayer and used as received.

The purity of proteins is checked by molecular sieving. Proper amounts of BPTI or lysozyme and NaCl are dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain stock solutions needed for crystallisation experiments. The different solutions are buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH = 4.5 with NaOH (1 M) and filtered through 0.22 µm Millipore filters. The pH is checked with a pH metre (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a micro pH electrode. Lysozyme and BPTI concentrations are controlled by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) using an extinction coefficient of 2.64 $mL.cm^{-1}.mg^{-1}$ and 0.786 $mL.cm^{-1}.mg^{-1}$ at 280 nm for lysozyme and BPTI, respectively.

3.2 Salt solutions

For experiments with 0.7 M NaCl solutions, NaCl is dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system). The solubility of NaCl is 5.42 M at 20°C in water [20]. The refractive index is 1.340 for a 0.7 M NaCl solution and if the concentration varies owing to evaporation, a relation between concentration and refractive index (tables 71 D-252 [21]) permits to determine the solution concentration.

4 Nucleation in the MZ, temporal localisation

4.1 Bibliographical studies

To avoid uncontrolled nucleation and to overcome stochasticity of primary nucleation, launching nucleation in the MZ to have a temporal control is a solution. In this purpose, we can induce crystallisation using external fields as it was highlighted by Voss [22] and Oxtoby [23]. Therefore, different external fields have been experimented on nucleation: magnetic [24–35], ultrasonic [36–39], non-photochemical light [40–44], photochemical light [1–4] and electric [5–7,45–49]. External fields were expected to induce effects on the structure of the supersaturated solutions through molecular orientation and density fluctuation. Bibliographic study shows that magnetic field has an effect on crystal orientation and quality but not on nucleation. Ultrasounds reduce induction time and increase the number of crystals. Non-photochemical light-induced nucleation is promising because it can also promote the nucleation of different polymorphs according to the polarisation of the femtosecond laser [43].

Related to photochemistry, Okutsu et al. [1] have observed the effect of laser on nucleation of benzophenone. Indeed, benzophenone is light-sensitive, and when the ethanol/water mixed solution is irradiated, there is less benzopinacol so the benzophenone can crystallise before benzopinacol precipitation. In experiments on lysozyme solutions irradiated by a xenon lamp, Okutsu et al. [2] and Veesler et al. [3] discovered that irradiation enhances nucleation for irradiation time smaller than 60 s; beyond this value, denaturation starts. Moreover, transient absorption experiments have demonstrated that the irradiation of lysozyme [3] and thaumatin [4] produces photochemical intermediate (radicals), which enhance nucleation.

Finally, concerning electric field, its effects on crystallisation from solution have first been theoretically considered by Kashchiev et al. [14]. Note that we are not treating electrocrystallisation, which means supersaturation generated by electrochemical reaction, in this review. In practice, most of the papers on this subject appeared in the early 2000s. For instance, Taleb has studied the nucleation rate of protein solution drops placed between two flat electrodes outside the crystalliser [45]. He has observed that crystallisation occurs near the cathode and has observed an improvement in the crystal quality [46]. Using the same set-up, Nanev and Penkova [47] have concluded that the electric field has a bigger impact on nucleation rate and induction time when temperature is lower, increasing the number of crystals nucleated. Mirkin et al. [48] and Moreno and Sazaki [49] have confirmed this behaviour using a set-up for internal application of an electric field on lysozyme solutions. Moreover, Moreno has observed an amorphous phase forming around the cathode.

4.2 Photochemical light irradiation

4.2.1 Method

The principle of our photochemical light irradiation experiments consists in seeding non-irradiated solution of BPTI with a given volume of irradiated solution of BPTI. In this purpose, 1.5 mL of a 4 mg.mL^{-1} BPTI solution containing 3.2 M NaCl is placed in a $0.2\ \text{cm} \times 1\ \text{cm} \times 4\ \text{cm}$ optical cell hermetically closed to prevent evaporation. Then, it is irradiated for different times by light from a Xenon lamp (USHIO, UXL 150D, 150W). 3 µL of this irradiated solution, namely the liquid seed, is mixed with 3 µL of three concentrated BPTI solutions, 36, 28 and 20 mg.mL^{-1}. Hence, the final solutions are 20, 16 and 12 mg.mL^{-1} BPTI and 1.6 M NaCl, leading to a final supersaturation of 2, 1.6 and 1.2. They are placed in a microbatch plate kept at 20°C to avoid nucleation during the growth process. A non-irradiated BPTI solution is also placed in the microbatch plate as control solution. In addition, undesired heterogeneous nucleation owing to evaporation from the vapour–solution interface of the droplets is avoided, thanks to an inert paraffin oil (HR3-42) covering the droplets. Consequently, the solution is pipetted through the oil and droplets are observed with a microscope.

4.2.2 Enhancement of nucleation

First, the control solution displays no crystal in any of the droplets, confirming that the solution is metastable and that we can completely eliminate undesired heterogeneous nucleation at solution–oil interface or solution-wall-of-the-vessel interface. To study the role of irradiation, liquid seed is irradiated for 0, 1, 3 and 5 min. After liquid seeding, we observe the droplets mixed with irradiated solution at BPTI concentrations of 12, 16 and 20 mg.mL^{-1}: BPTI crystals appear in the droplets at 16 and 20 mg.mL^{-1}. Moreover for these solutions, there are more crystals as irradiation time increases. These results show that light induces nucleation of BPTI.

To conclude this topic, Okutsu et al. [50] shows unambiguously that covalent-bonded lysozyme dimers are produced by photochemical reaction, which play the role of stable clusters in early stage of the nucleation, confirming that photochemical-light-induced nucleation acts at the molecular scale to enhance the nucleation process.

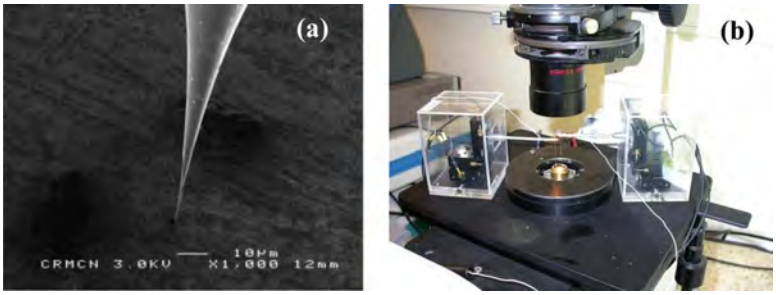
4.3 Localised voltage (electric field)

4.3.1 Method

The experiments with electric field consist of provoking nucleation with a localised voltage created with sharp electrodes. These are made from tungsten (W) wires (125 µm diameter) and the tip is fabricated by electrolytic etching as described in Muller and Tsong [51] and Hammadi et al. [52] (Figure 2(a)). Hence, the anode is placed in a glass capillary so that a sharp metallic tip emerges from the end of the capillary. Because of the nanometre size of electrode's tip, an intense electric field, large field gradients and high current densities are encountered near the tip. Two home-made nano-manipulators consisting of three miniature translation stages (piezoelectric elements, MS30 Mechonics) allow displacement of the electrodes in *X*, *Y* and *Z* (Figure 2(b)). The crystallisation and visualisation are performed in a thermostatted Peltier cell equipped with a Nikon

microscope and digital imaging capabilities, which has previously been described in detail [53].

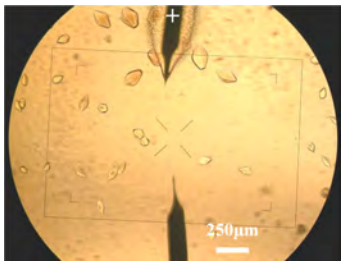
Figure 2 (a) SEM image of a W-tip and (b) temperature-controlled crystallisation cell with nano-manipulators (see online version for colours)



4.3.2 Nucleation in aqueous solution

Nucleation under electric field is investigated in-situ from solutions of BPTI and lysozyme in the metastable zone. For BPTI, crystals and a gel-like phase (dense and rich in protein) appear at the cathode (Figure 3), this phase corresponding to the amorphous phase observed by Moreno and Sazaki [49]. When the experiments are conducted with lysozyme, crystals are located near the anode and the dense phase nucleates on the cathode. Interestingly, when the electrode polarity is reversed, the dense phase dissolves and crystals grow, confirming the fact that the dense phase is metastable and due to a liquid–liquid phase separation. Moreover, there is a crystal-size gradient: crystals are larger in the vicinity of the anode because the growth kinetic is larger in the vicinity of the anode than at mid-distance of anode and cathode [10].

Figure 3 Crystals of BPTI (20 mg/mL – NaCl 1.6 M) nucleated and grown in the vicinity of the electrode after 24 h (experiment in free solution). After [6] with permission of Elsevier (see online version for colours)



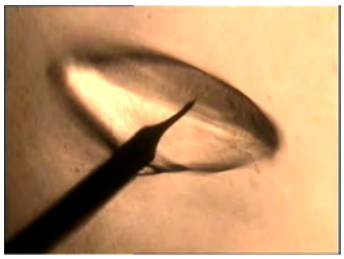
In these experiments, the presence of crystals, everywhere in between the two electrodes, is explained by the convection in aqueous solutions. Indeed, the convection counteracts the effect of the electric field, which tends to create a concentration gradient.

4.3.3 Nucleation without convection

Our idea is to perform experiments in agarose gel. Hence, the use of gel as crystallisation medium clearly enables better control of the location of nucleation and nucleus appears

in the vicinity of the tip apex (Figure 4). Indeed, creating localised fields and fluxes and preventing convection lead to a spatial and temporal control of the nucleation event. Moreover, as electric field launches nucleation in metastable solution, this approach has potential applications for the screening of crystallisation conditions and phases.

Figure 4 BPTI (20 mg/mL – NaCl 1.6 M) nucleation in the vicinity of the tip in 0.5% agarose gel (0.8 V–0.74 µA), length of experiment 12 h. As reference, the W-electrode wire diameter is 125 µm. After [7] with permission of ACS (see online version for colours)



4.4 Discussion on effect of external fields

Nucleation is a stochastic phenomenon and the probability of observing the critical nuclei formation is very low. By using an external field, our aim is to trigger nucleation, control it, locate it and observe it. In fact, the photochemical light irradiation obviously induces nucleation by forming radicals. As for the electric field, it tends to localise the nucleation near one electrode depending on the polarity of the molecule studied in acting locally on the density of the solution.

Fundamental studies are carried out in our laboratory to unravel the secrets of external field. Application of external field to different molecules, small organic molecules and minerals, for instance, is envisaged to generalise our results. We recall here that the nucleation and growth mechanisms are identical for all kinds of molecules.

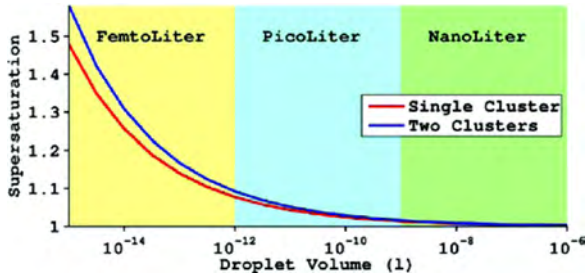
5 Localisation of crystallisation in space

5.1 Bibliographical studies

To localise crystallisation in space for nucleation kinetics study, the idea is to reduce the volume of crystallisation (smaller than µL). In practice, it also reduces the zone of observation, thus increasing the resolution of the detection. In small volumes, the solubility curve being a thermodynamic parameter is not modified. In contrast, kinetics effect must be reconsidered for volumes smaller than nanolitres. In fact, theoretical studies of the effect of confinement by volume reduction are summarised in Figure 5. The curve represents the critical supersaturation where no nucleation can occur, for volumes from µL to fL. The idea behind these theoretical studies is: when volume is decreased, the total number of molecules of the system is decreased. Then, this number is affected by the cluster formation, meaning the reservoir of molecules becomes finite in contradiction with the classical nucleation theory, which hypothesise infinite reservoir (concentration remaining constant during the nucleation event). Thus, this

diagram is derived from the slightly modified classical nucleation developed for finite-sized system [11] where one considers the number of molecules in the volume instead of the concentration. Hence, we experimentally observed that the kinetics effect of confinement enlarges the supersaturation window [12]. Thus, confinement provides a new way to study critical clusters and nucleation.

Figure 5 Critical supersaturation (after [11]) below which no nucleation can occur in function of droplet size, the red curve for a single nucleation event and the blue curve for a second event (for lysozyme in NaCl solution). With permission of ACS (see online version for colours)



In the literature, techniques employed to realise confinement at the nanometre scale are controlled-pore glasses [54,55] or other nanoporous materials [54]. Actually, authors study thermal behaviour of materials under confinement in relation with the Gibbs-Thomson equation [55], or polymorph selectivity in ultra-small pores [56,57] or in small droplets [58]. Another way to reach confinement is to use microemulsions, which permit to measure critical nucleus size via thermal behaviour [59]. We investigate the effect of confinement using techniques of droplet generation because it allows direct observation of the generated microdroplets under optical microscope. In this work, we present results obtained with two promising approaches: a microfluidic method and a microdroplet generator, for nL and pL to fL volumes, respectively. It must be noted that no surfactant is required for these techniques that would trouble crystallisation conditions.

5.2 Microfluidic system

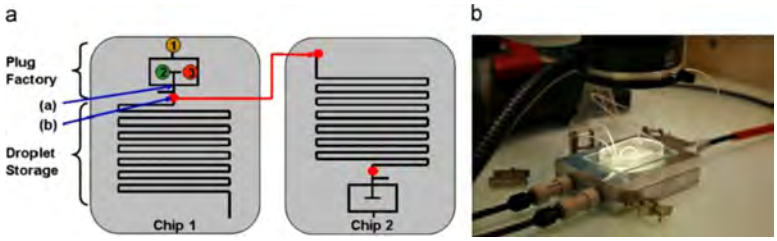
The purpose of our microfluidic system is to generate hundreds of micro-droplets (1–250 nL) with a simple and easy-to-use setup. The advantages of this method are double. First, a large sample of independent nucleation events is obtained in the same experimental conditions resolving the problem of stochasticity of nucleation phenomenon. Second, only one crystal per droplet is often produced, which, associated with a very good control on different parameters such as concentration, volume and temperature, permits to stabilise a metastable polymorph, as stated in Section 2.3. It is noteworthy that in the volume range accessible to our microfluidic set-up, there is no effect of finite system on nucleation, that is to say the reservoir is infinite.

5.2.1 Method

The basic microdevice design and construction, by using soft-lithographic techniques with PDMS, has previously been described [60,61]. We have developed a method

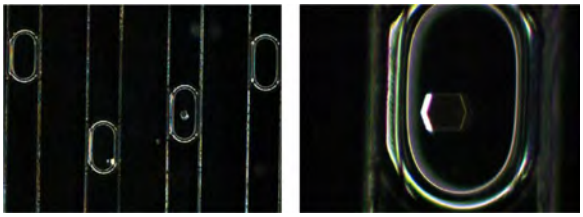
using two kinds of microfluidic chips [8,9]: a plug-factory dedicated to mix solutions and generate droplets and a storage chip used to store and observe droplets (Figure 6(a)). A stereomicroscope (WildMakroskop) equipped with a CCD camera (imaging source, DFK31BF03) permits to observe and count crystals that nucleate in each drop. During observation, the device is thermostatted by Peltier elements (Anacrismat, France) (Figure 6(b)).

Figure 6 (a) Design of the microdevice: oil, protein and NaCl solutions are injected in inlets (1), (2) and (3), respectively (channel width 500 µm) and (b) Microfluidic experimental set-up with thermostatted sample-holder. After [8] with permission of Elsevier (see online version for colours)



The channel size of microdevice is of 500 µm leading to droplet volumes of 250 nL. It must be noted that smaller channels (150 µm), which can be easily produced by soft-lithographic techniques, reduce considerably the volume of droplets (10 nL). Storage chips are filled with microdroplets identical in volume and concentration and they are stored at different temperatures. Typical images of droplets at different magnifications are shown in Figure 7.

Figure 7 Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL–0.7 M NaCl–pH = 4.5) and crystals, observed after a storage of 20 h (channel width 500 µm). After [8] with permission of Elsevier (see online version for colours)



Adjusting both parameters of concentration and temperature, we are able to study metastable zone width, nucleation rate and polymorphism.

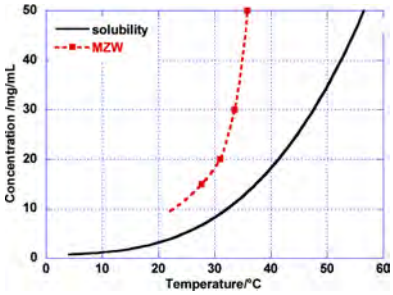
5.2.2 Nucleation parameters

Metastable zone

The microfluidic devices are filled with a lysozyme solution at given concentrations to determine the limit of metastable zone using the method described previously (see Section 2.1). In Figure 8, a plot of the pairs protein concentration-TMZ for four protein concentrations is presented together with the solubility curve. The metastable zone that we are interested in is situated between the solubility curve and the MZ limit.

Thanks to the high number of reproducible droplets, the microfluidic method clearly permits an accurate statistical analysis of the limit of the metastable zone.

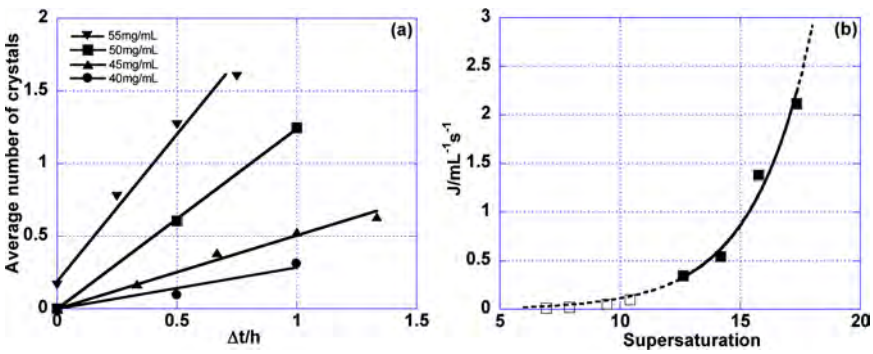
Figure 8 Limit of the metastable zone determined experimentally with lysozyme solutions (0.7 M NaCl – pH = 4.5) [8] and solubility according to [62], vs. temperature (see online version for colours)



Nucleation rate

The determination of nucleation rate with the DPT (see Section 2.2) needs to define four parameters: concentrations, times of nucleation, temperature of nucleation $T_{\text{Nucleation}}$ and temperature of growth T_{Growth}. The choice of these parameters is based on the solubility curve and the MZW of lysozyme, determined earlier: concentrations are varied from 40 mg/mL to 55 mg/mL to obtain enough crystals in droplets; times of nucleation smaller than 2 h guarantee that lysozyme concentration is constant in droplets of 250 nL, beyond that time the growth of nuclei depletes the droplet concentration; $T_{\text{Nucleation}}$ of 20°C permits to compare our data with the data from the literature [16,61,63,64] and T_{Growth} of 40°C is in the MZW (Figure 8). After a sequence of DPT, experimental crystal distribution is fitted with a Poisson law as previously reported by Galkin and Vekilov [16]. The average number of crystals nucleated per droplet varies linearly with time, confirming steady-state nucleation (Figure 9(a)). Moreover, straight lines pass through the axis origins (except for the highest supersaturation [65]), indicating that the data are not affected by important heterogeneous nucleation [16].

Figure 9 (a) Average number of crystals nucleated N in one droplet vs. nucleation time Δt (NaCl = 0.7 M and pH = 4.5) and (b) Homogeneous nucleation rate J vs. supersaturation, at 20°C, from the slope of the straight lines of Figure 9(a) (■); (□) data obtained at 12.6° for $\beta < 12$, from Galkin and Vekilov [66]. After [9] with permission of ACS (see online version for colours)



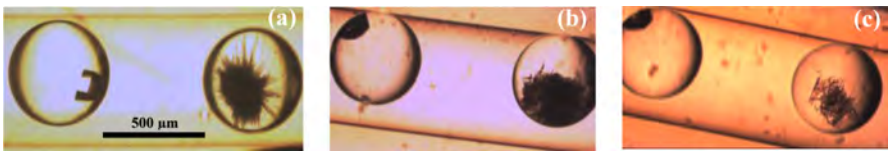
Values of J vary exponentially with $(-1/\ln^2\beta)$ in coherence with equation (1) (Figure 9(b)). It leads to a value of interfacial energy $\gamma = 0.62$ mJ/m^2 in good agreement with values obtained by the Vekilov group (0.51–0.64 mJ/m^2) [16,66] and by the Fraden group (0.91 mJ/m^2) [64]. Moreover, our kinetic data are also in good agreement with the data of Galkin and Vekilov [66] obtained for the same NaCl concentration at 12.6°C (Figure 9(b)).

Finally, compared with $J \sim 0.7$–0.007 nuclei/mL.s obtained by Galkin and Vekilov [66] for β in a range of 7–11, here we access a range of $J \sim 3$–0.3 nuclei/mL.s corresponding to a β range of 12–17. Obviously, reducing volume of nucleation permits to considerably increase the supersaturation range experimentally accessible and thus the range of experimentally measurable J.

Polymorphism

Different polymorphs are known for lysozyme [67,68]. Note that we nucleate solely tetragonal lysozyme after 20 h for temperature ranging from 15°C to 40°C. Therefore, we perform experiments at 20 mg/mL and 6°C for 20 h and we observed (at 20°C) a different crystal habit (the sea-urchin habit) in 6 droplets out of 237 (Figure 10(a)). In a morphodrom of lysozyme crystals, at pH = 4.6 and in NaCl solution, Tanaka et al. [69] have previously observed the sea-urchin habit but they do not assign it to a new phase. As increasing temperature to 30°C dissolves only the sea urchin-like habit (on the right in Figure 10(b) and (c)), and not the tetragonal crystal confirming that crystals with sea-urchin habit turn out to be a different phase [70]. Moreover, using the bracketing method [71], we estimate at ±1°C the equilibrium temperature to be 24°C for the sea urchin phase in suspension in a 19 mg/mL lysozyme solution [72].

Figure 10 Droplets of lysozyme solutions (20 mg/mL (0.7 MnaCl–pH 4.5) observed at 20°C): (a) After a storage of 20 h at 6°C. (b) After increasing temperature to 30°C during 6 min. (c) After increasing temperature to 30°C during 12 min. After [8] with permission of Elsevier (see online version for colours)



In conclusion, using this microfluidic method, we successfully isolate a metastable phase. In fact, the nucleation being mononuclear by controlling the nucleation kinetic via small-volume, if the nucleated crystal is of the metastable phase it cannot dissolve. Moreover, in small volume systems, the probability of observing a metastable phase is increased [20] owing to the higher supersaturations reached [66]. Thus, small volumes are able to 'freeze' the metastable phase [73].

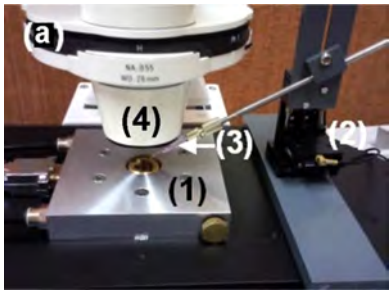
5.3 The microdroplet generator

Here, the aim is to explore smaller volumes than in microfluidic systems and hence to really reach confinement. Indeed, our microdroplet generator permits to form micro-droplets of aqueous solution from nL to fL [11–13] on a surface as single or arrays, and to observe crystallisation in these microdroplets.

5.3.1 Method

The whole set-up of microdroplet generation is shown in Figure 11. A microinjector (Femtojet, Eppendorf) is used to generate up to thousands of microdroplets with volumes ranging from nanolitre to femtolitres, without surfactant. A home-made micro-manipulator consisting of three miniature translation stages (piezo electric, MS30 mechonics) allows displacement of the injector (capillary holder) in *X*, *Y* and *Z*. By controlling the speed displacement of the micropipette in contact with the surface and injection pressure, we control the droplet size [13]. Droplets are deposited on a PMMA hydrophobic surface to avoid their spreading and coalescence. The surface is placed in a thermostatted well filled with inert DMS oil (Hampton Research HR3-419, refractive index = 1.390) and is observed with an optical microscope (Zeiss Axio Observer D1). Once droplets of an aqueous solution are generated on the surface, the principle is to let water slowly diffuse from the crystallisation droplets through the layer of liquid oil. Hence, the increase in the concentration of the solute to be crystallised establishes supersaturation.

Figure 11 Image of the whole experimental set-up; (1): thermostatted crystallisation-well, (2): XYZ miniature translation stages, (3): glass capillary and (4) condenser. After [12] with permission of Elsevier (see online version for colours)



5.3.2 Nucleation parameters

Supersaturation

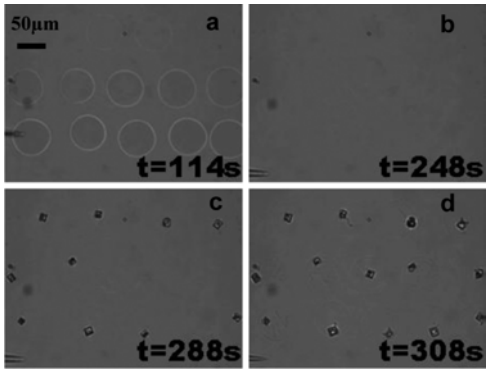
The complete process of the crystallisation of 0.7 M NaCl solution is presented in Figure 12: after the generation of droplets of 40 pL of volume (Figure 12(a)), they slowly evaporate increasing the concentration, which is given by the refractive index. Hence, when the supersaturation is established (Figure 12(b)), this one is estimated to $\beta > 1.9$ in the droplets [74]. This supersaturation is comparable with values obtained in small droplets by Tang and Munkelwitz [75]. It must be noted that non-confined NaCl solutions spontaneously nucleate at $\beta > 1.03$. Thus, the confinement stabilises highly supersaturated NaCl solutions.

Nucleation kinetics

Figure 12(c) and (d) shows that nucleation occurs from 150 s to 300 s after droplet generation and we observe one crystal per droplet in agreement with the prediction [10]. Moreover, crystals are reaching a size of 15 µm in less than 2 s. Consequently, the time for the formed nucleus to grow to a detectable size is negligible with regard to the time of appearance of a nucleus. Thus, this technique permits to access to the induction time,

defined as the time when a detectable crystal is observed. In addition, the time distribution of the induction time (comprises between 250 s and 308 s) gives a direct access to the stochasticity of the phenomenon. Here, an interpretation based on the two-step nucleation mechanism [76] can be proposed. In this mechanism, a density fluctuation is followed by a structural fluctuation, this latter being almost instantaneous.

Figure 12 Time sequence showing nucleation and ultra-fast growth of NaCl. Arrays of droplets of NaCl solutions are generated through the layer of liquid oil. Droplet size corresponds to a volume of 40 pL (assuming a spherical shape for the droplet)



5.4 Discussion on confinement

In this part on the localisation of nucleation in space, a first reduction of crystallisation volume to 250 nL is carried out through a microfluidic technique. This method offers two advantages: producing a high number of reproducible droplets and storing them at desired temperatures. Thus, nucleation parameters such as MZW, nucleation rate and polymorphism are successfully determined and ensuing statistical analysis leads to accurate results. Moreover, each experimental condition requires only one droplet storage device, i.e., up to 200 droplets, which consume less than 30 mg of lysozyme for the entire experiments presented here. Thus, reliable statistical data are obtained with minimum quantity of materials. In addition, microfluidics enables the nucleation of a single crystal of a metastable phase, which turns out to be stable.

It must be pointed out that we can expect to proceed in smaller chip channels. For instance, a decrease in channel diameter from 500 µm to 100 µm decreases droplet volume from 250 nL to 2 nL. In so doing, we would consume no more than 0.3 mg of lysozyme. Besides, PDMS is the most used material for microfluidic chips because it is easy to mould, transparent, cheap and it is really simple to connect them. However, PDMS swells with organic solvents and is a slightly porous material. Consequently, PDMS is appropriate for studies with aqueous solutions for storage time lower than 24 h. For organic solvents, chips in glass can be used but they are not adapted to aqueous solvents owing to the wettability of water on glass channels wall. Furthermore, they are very expensive and it is tricky to connect them. Another way is to use fluoropolymer chips [77], which are compatible with all of the solvents used for crystallisation. In addition, it must be noted that the fluoropolymer storage chips prevent solvent evaporation from droplets for many months. We plan to develop a new microfluidic set-up with fluoropolymer chips to explore nucleation in organic solvents and extend to

pharmaceutical molecules. Finally, our results also confirm that at this scale, 250 nL, nucleation kinetics depends on volume: the smaller the volume, the longer the induction time. Moreover, these droplets can be considered as finite systems, that is to say there are no confined volume effects. Thus, data obtained with microfluidic can be extrapolated to larger volume for industrial application.

Confinement down to fL volumes is reached using the microdroplet generator. It permits to generate arrayed aqueous phase microdroplet in oil and to explore the effect of confinement on the kinetics of crystallisation. In fact, the confinement clearly allows the system to be highly supersaturated and in a metastable state; this formation of a dense liquid phase is the first step of the nucleation process. Then, nucleation proceeds spontaneously leading to a single nucleation event per droplet formed from the confined dense liquid phase. Finally, thanks to the versatility of our set-up and the ability to control microdroplet size [12] and composition, we can easily screen different conditions of confinement and nucleate at will the stable or metastable phases. Finally, we are developing the concept of a second scan onto the surface with a second solution. Thus, we will be able to control the chemical composition of the droplet for nanoparticle precipitation, for instance.

6 Conclusion

In this paper, we illustrate that crystallisation is a multiscale phenomenon and we present different techniques for their ability to overcome stochasticity of nucleation. Therefore, the nucleation is triggered or rendered spontaneous, permitting a spatial or a temporal control of nucleation. Localisation in time is carried out either by light irradiation, which induces nucleation by forming radicals, or by electric field and localised voltage, which acts locally on the density of the solution. Concerning localisation in space, a first set-up is a microfluidic device. It produces hundreds of nanovolume crystallisers (droplets of 250 nL) for which concentration and temperature are easily monitored. Thus, it offers accurate statistical results on nucleation parameters such as metastable zone, nucleation rate and polymorphism. The second set-up is a microdroplet generator, which confines crystallisation volume down to fL reaching very high supersaturations. Thus, it opens up a whole range of possibilities on the study and control of single crystals.

All of these various methods clearly enhance nucleation in the metastable zone and can be used for screening crystallisation conditions and phases (polymorphism), with small quantities of products. Thus, their applications address many fields including biology, biomedical applications, drug discovery, chemical synthesis and particles synthesis.

Acknowledgements

We thank Sanofi-Aventis for funding projects and providing the industrial chemical compounds for the studies, and ANR-06-Blanc-0355 ‘MICROCRISTAL’ for financial support. We thank Bayer A.G. (Wuppertal, Germany) for providing us with BPTI, T. Bactivelane (CINaM), B. Detailleur (CINaM) and M. Audiffren (Anacrismat) for technical assistance.

References and Notes

1 Okutsu, T., Nakamura, K., Haneda, H. and Hiratsuka, H. (2004) 'Laser-induced crystal growth and morphology control of benzopinacol produced from benzophenone in ethanol/water mixed solution', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 4, pp.113–115.

2 Okutsu, T., Furuta, K., Terao, T., Hiratsuka, H., Yamano, A., Ferté, N. and Veesler, S. (2005) 'Light-induced nucleation of hen-egg white lysozyme', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 5, pp.1393–1398.

3 Veesler, S., Furuta, K., Horiuchi, H., Hiratsuka, H., Ferté, N. and Okutsu, T. (2006) 'Crystals from light: photochemically-induced nucleation of hen egg-white lysozyme', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 6, pp.1631–1635.

4 Okutsu, T., Sugiyama, K., Furuta, K., Watanebe, I., Mori, H., Obi, K., Horota, K., Horiuchi, H., Sazaki, G., Veesler, S. and Hiratsuka, H. (2007) 'Photochemically induced nucleation in supersaturated and undersaturated thaumatin solutions', *J. Photochem. Photobiol., A*, Vol. 190. pp.88–93.

5 Hammadi, Z., Astier, J.P., Morin, R. and Veesler, S. (2007) 'Protein crystallization induced by a localized voltage', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 8, pp.1476–1482.

6 Hammadi, Z. and Veesler, S. (2009) 'New approaches on crystallization under electric fields', *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, Vol. 101, pp.38–44.

7 Hammadi, Z., Astier, J.P., Morin, R. and Veesler, S. (2009) 'Spatial and temporal control of nucleation by localized DC electric field', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 9, pp.3346–3347.

8 Ildefonso, M., Revalor, E., Punniam, P., Salmon, J.B., Candoni N. and Veesler, S. (2011) 'Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool', *J. Cryst. Growth*, doi:10.1016/j.jcrysgro.2010.11.098

9 Ildefonso, M., Candoni, N. and Veesler, S. (2011) 'Using microfluidics for fast, accurate measurement of nucleation kinetics', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 11, No. 5, pp.1527–1530.

10 Revalor, E., Hammadi, Z., Astier, J.P., Grossier, R., Garcia, E., Hoff, C., Furuta, K., Okutsu, T., Morin, R. and Veesler, S. (2010) 'Usual and unusual crystallization from solution', *J. Cryst. Growth*, Vol. 312, pp.939–946.

11 Grossier, R. and Veesler, S. (2009) 'Reaching one single and stable critical cluster through finite sized systems', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 9, pp.1917–1922.

12 Grossier, R., Magnaldo, A. and Veesler, S. (2010) 'Ultra-fast crystallization due to Confinement', *J. Cryst. Growth*, Vol. 312, pp.487–489.

13 Grossier, R., Hammadi, Z., Morin, R., Magnaldo, A. and Veesler, S. (2011) 'Generating nanoliter to femtoliter microdroplets with ease', *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 98, No. 9, pp.091916-3.

14 Kashchiev, D., Verdoes, D. and Van Rosmalen, G.M. (1991) 'Induction time and metastability limit in new phase formation', *J. Cryst. Growth*, Vol. 110, pp.373–380.

15 Tsekova, D., Dimitrova, S. and Nanev, C.N. (1999) 'Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals', *J. Cryst. Growth*, Vol. 196, Nos. 2–4, pp.226–233.

16 Galkin, O. and Vekilov, P.G. (1999) 'Direct determination of the nucleation rates of protein crystals', *J. Phys. Chem. B*, Vol. 103, No. 3, pp.10965–10971.

17 Boistelle, R. and Astier, J.P. (1988) 'Crystallization mechanisms in solution', *J. Cryst. Growth*, Vol. 90, pp.14–30.

18 Ostwald, W. (1897) 'Studien uber die Bildung und Umwandlung fester Korper', *Z. Phys. Chem.*, Vol. 22, pp.289.

19 Mangin, D., Puel, F. and Veesler, S. (2009) 'Polymorphism in processes of crystallization in solution: a practical review', *Org. Process Res. Dev.*, Vol. 13, pp.1241–1253.

20 Langer, H. and Offermann, H. (1982) 'On the solubility of sodium chloride in water', *J. Cryst. Growth*, Vol. 60, pp.389–392.

21 Weast R.C. (1975–1976) *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Cleveland.

22 Voss, D. (1996) 'The 110% solution', *Science*, Vol. 274, pp.1325.

23 Oxtoby, D.W. (2002) 'Crystals in a flash', *Nature*, Vol. 420, pp.277–278.

24 Astier, J.P., Veesler, S. and Boistelle, R. (1998) 'Protein crystal orientation in a magnetic field', *Acta Cryst.*, Vol. D54, pp.703–706.

25 Sazaki, G., Yoshida, E., Komatsu, H., Nakada, T., Miyashita, S. and Watanabe, K. (1997) 'Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals', *J. Cryst. Growth*, Vol. 173, pp.231–234.

26 Worcester, D.L. (1978) 'Structural origins of diamagnetic anisotropy in proteins', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 75, pp.5475–5477.

27 Lonsdale, K. (1939) 'Diamagnetic anisotropy of organic molecules', *Proc. R. Soc. London*, Vol. A171, pp.541–568.

28 Neugebauer, D.C., Blaurock, A.E. and Worcester, D.L. (1977) 'Magnetic orientation of purple membranes demonstrated by optical measurements and neutron scattering', *FEBS Lett.*, Vol. 78, pp.31–35.

29 Torbet, J., Freyssinet, J.M. and Hudry-Clergeon, G. (1981) 'Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields', *Nature*, Vol. 289, pp.91–93.

30 Yamagishi, A. (1990) 'Biological systems in high magnetic field', *J. Magn. Magn. Mater.*, Vols. 90–91, pp.43–46.

3l Ataka, M., Katoh, E. and Wakayama, N.I. (1997) 'Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme', *J. Cryst. Growth*, Vol. 173, pp.592–596.

32 Astier, J.P., Veesler, S. and Boistelle, R. (1998) 'Protein crystal orientation in a magnetic field', *Acta Cryst.*, Vol. D54, pp.703–706.

33 Sazaki, G., Yoshida, E., Komatsu, H., Nakada, T., Miyashita, S. and Watanabe, K. (1997) 'Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals', *J. Cryst. Growth*, Vol. 173, pp.231–234.

34 Wakayama, N.I., Ataka, M. and Abe, H. (1997) 'Effect of a magnetic field gradient on the crystallization of hen lysozyme', *J. Cryst. Growth*, Vol. 178, pp.653–656.

35 Katsuki, A., Tokunaga, R., Watanabe, S.I. and Tanimoto, Y. (1996) 'The effect of high magnetic on the crystal growth of benzophenone', *Chem. Lett.*, Vol. 8, pp.607–608.

36 Hem, S.L. (1967) 'The effect of ultrasonic vibrations on crystallization processes', *Ultrasonics*, Vol. 5, pp.202–207.

37 Ueno, S., Ristic, R.I., Higaki, K. and Sato, K. (2003) 'In situ studies of ultrasound-stimulated fast crystallization using synchrotron radiation', *J. Phys. Chem. B*, Vol. 107, pp.4927–4930.

38 Louisnard, O., Gomez, F.J. and Grossier, R. (2007) 'Segregation of a liquid mixture by a radially oscillating bubble', *J. Fluid Mech.*, Vol. 577, pp.385–415.

39 Grossier, R., Louisnard, O. and Vargas, Y. (2007) 'Mixture segregation by an inertial cavitation bubble', *Ultrason. Sonochem.*, Vol. 14, pp.431–437.

40 Tam, A., Moe, G. and Happer, W. (1975) 'Particle formation by resonant laser light in alkali-metal vapor', *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 35, pp.1630–1633.

41 Tyndall, J. (1896) 'On the blue color of the sky, the polarization of skylight, and on the polarization of light by cloudy matter generally', *Philos. Mag.*, Vol. 37, pp.384–394.

42 Garetz, B.A., Aber, J.E., Goddard, N.L., Young, R.G. and Myerson, A.S. (1996) 'Nonphotochemical, polarization-dependent, laser-induced nucleation in supersaturated aqueous urea solutions', *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 77, pp.3475–3476.

43 Garetz, B.A., Matic, J. and Myerson, A.S. (2002) 'Polarization switching of crystal structure in the nonphotochemical light-induced nucleation of supersaturated aqueous glycine solutions', *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 89, pp.175501.

44 Zaccaro, J., Matic, J., Myerson, A.S. and Garetz B.A. (2001) 'Nonphotochemical, laser-induced nucleation of supersaturated aqueous glycine produces unexpected-polymorph', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 1, pp.5–8.

45 Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J.P., Capelle, B. and Aubry, A. (1999) 'Crystallization of proteins under an external electric field', *J. Cryst. Growth*, Vol. 200, pp.575–582.

46 Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeat, J.P. and Aubry, A. (2001) 'Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field', *J. Cryst. Growth*, Vol. 232, pp.250–255.

47 Nanev, C.N. and Penkova, A. (2001) 'Nucleation of lysozyme crystals under external electric, ultrasonic fields', *J. Cryst. Growth*, Vol. 232, pp.285–293.

48 Mirkin, N., Frontana-Uribe, B.A., Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A. and Moreno, A. (2003) 'The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method', *Acta Crystallogr., Sect. D*, Vol. 59, pp.533–1538.

49 Moreno, A. and Sazaki, G. (2004) 'The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme', *J. Cryst. Growth*, Vol. 264, pp.438–444.

50 Okutsu, T., Sugiyama, K., Furuta, K., Watanebe, I., Mori, H., Obi, K., Horota, K., Horiuchi, H., Sazaki, G., Veesler, S. and Hiratsuka, H. (2007) 'Photochemically induced nucleation in supersaturated and undersaturated thaumatin solutions', *J. Photochem. Photobiol., A*, Vol. 190, pp.88–93.

51 Muller, E.W. and Tsong, T.T. (1969) *Field Ion Microscopy: Principles and Applications*, American Elsevier Publishing Company, New York.

52 Hammadi, Z., Gauch, M. and Morin, R. (1999) 'Microelectron gun integrating a point-source cathode', *J. Vac. Sci. Technol., B: Microelectron. Nanometer Struct.*, Vol. 17, pp.1390–1394.

53 Veesler, S., Lafferrere, L., Garcia, E. and Hoff, C. (2003) 'Phase transitions in supersaturated drug solution', *Org. Process Res. Dev.*, Vol. 7, pp.983–989.

54 Haller, W. (1965) 'Chromatography on glass of controlled pore size', *Nature*, Vol. 206, pp.693–696.

55 Jackson, C.L. and Mckenna, G.B. (1990) 'The melting behavior of organic materials confined in porous solids', *J. Chem. Phys.*, Vol. 93, pp.9002–9011.

56 Ha, J-M., Wolf, J.H., Hillmyer, M.A. and Ward, M.D. (2004) 'Polymorph selectivity under nanoscopic confinement', *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 126, pp.3382–3383.

57 Beiner, M., Rengarajan, S. and Pankaj, E.D. and Steinhart, M. (2007) 'Manipulating the crystalline state of pharmaceuticals by nanoconfinement', *Nano Lett.*, Vol. 7, pp.1381–1385.

58 Lee, A.Y., Lee, I.S., Dette, S.S., Boerner, J. and Myerson, A.S. (2005) 'Crystallization on confined engineered surfaces: a method to control crystal size and generate different polymorphs', *J. Am. Chem. Soc*., Vol. 127, pp.14982–14983.

59 Liu, J., Nicholson, C.E. and Cooper, S.J. (2007) 'Direct measurement of critical nucleus size in confined volumes', *Langmuir*, Vol. 23, pp.7286–7292.

60 Laval, P., Salmon, J-B. and Joanicot, M. (2007) 'A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics', *J. Cryst. Growth*, Vol. 303, pp.622–628.

61 Laval, P., Lisai, N., Salmon, J.B. and Joanicot, M. (2007) 'A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams', *Lab Chip*, Vol. 7, pp.829–834.

62 Cacioppo, E. and Pusey, M.L. (1991) 'The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4.0 to 5.4', *J. Cryst. Growth*, Vol. 114, pp.286–292.

63 Laval, P., Giroux, C., Leng, J. and Salmon, J-B. (2008) 'Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism', *J. Cryst. Growth*, Vol. 310, pp.3121–3124.

64 Selimovic, S., Jia, Y. and Fraden, S. (2009) 'Measuring the nucleation rate of lysozyme using microfluidics', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 9, No. 4, pp.1806–1810.

65 The presence of crystals at $\Delta t = 0$ for a lysozyme concentration of 55 mg/mL indicates that this solution is near its limit of metastability and nucleation probably occurs during transfer to the incubator, after filling.

66 Galkin, O. and Vekilov, P.G. (2000) 'Are nucleation kinetics of protein crystals similar to those of liquid droplets?', *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 122, No. 1, pp.156–163.

67 Ataka, M. and Asai, M. (1988) 'Systematic studies on the crystallization of lysozyme', *J. Cryst. Growth*, Vol. 90, pp.86–93.

68 Legrand, L., Ries-Kautt, M. and Robert, M-C. (2002) 'Two polymorphs of lysozyme nitrate: temperature dependence of their solubility', *Acta Crystallogr. Sect. D*, Vol. 58, pp.1564–1567.

69 Tanaka, S., Yamamoto, M., Ito, K. and Hayakawa, R. (1997) 'Relation between the phase transition and the crystallization in protein solutions', *Phys. Rev. E*, Vol. 56, pp.67–69.

70 Astier, J.P. and Veesler, S. (2008) 'Using temperature to crystallize proteins: a mini-review', *Cryst. Growth Des.*, Vol. 8, pp.4215–4219.

71 Beckmann, W., Boistelle, R. and Sato, K. (1984) 'Solubility of the A, B and C polymorphs of stearic acid in decane, methanol, butanone', *J. Chem. Eng. Data*, Vol. 29, pp.211–214.

72 We assume that droplets are spherical with a diameter of 500 µm and that their initial concentration of lysozyme is of 20 mg/ml. Hence, if a cubic shape lysozyme crystal of 50 µm of edge emerges in a droplet, it decreases its concentration of 5%, that is to say the final concentration is around 19 mg/mL. In fact, the equilibrium temperature of tetragonal lysozyme, in this experimental condition, is about 40°C.

73 Lee, A.Y., Lee, I.S. and Myerson, A.S. (2006) ' Factors affecting the polymorphic outcome of glycine crystals constrained on patterned substrates', *Chem. Eng. Technol.*, Vol. 29, pp.281–285.

74 Grossier, R., Hammadi, Z., Morin, R. and Veesler, S. (2011) 'Nucleation made non-stochastic and its consequences', *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 107, No. 2, pp.025504.

75 Tang, I.N. and Munkelwitz, H.R. (1984) 'An investigation of solute nucleation in levitated solution droplets', *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. 98, pp.430–438.

76 Kashchiev, D. (2000) *Nucleation: Basic Theory with Applications*, Butterworth-Heinemann, Oxford.

77 Lorber, N., Sarrazin, F., Guillot, P., Panizza, P., Colin, A., Pavageau, B. *et al.* (2011) 'Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process: Applications in chemistry and high-pressure microflows', *Lab Chip*, Vol. 11, pp.779.

Bibliographie

"Les livres sont des amis froids et sûrs."
Victor Hugo

[1] Pline l'ancien, *Histoire naturelle*, Tome 36
[2] Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W, Morris J, *Ritonavir : an extraordinary Example of Conformational Polymorphism*, Pharmaceutical Research, **2001**,Vol. 18, No. 6, 859-866
[3] Boistelle R., *Concept de la cristallisation en solution.* Actualités Néphrologiques, Flammarion Médecine-Science Paris, **1985** : p. 159-202
[4] Riès-Kautt M. et Ducruix, A.., *From solution to crystals with a physico-chemical aspect*, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, Oxford University Press, **1999**, p. 269-310
[5] Bauer, M., *Cristallisation et polymorphisme : Description du phénomène*, Technique de l'ingénieur, **2004**, AF 3 640
[6] Srinivasulu Aitipamula, Rahul Banerjee, Arvind K. Bansal, Kumar Biradha, Miranda L. Cheney, Angshuman Roy Choudhury, Gautam R. Desiraju, Amol G. Dikundwar, Ritesh Dubey, Nagakiran Duggirala, Preetam P. Ghogale, Soumyajit Ghosh, Pramod Kumar Goswami, N. Rajesh Goud, Ram K. R. Jetti, Piotr Karpinski, Poonam Kaushik, Dinesh Kumar, Vineet Kumar, Brian Moulton, Arijit Mukherjee, Gargi Mukherjee, Allan S. Myerson, Vibha Puri, Arunachalam Ramanan, T. Rajamannar, C. Malla Reddy, Nair Rodriguez-Hornedo, Robin D. Rogers, T. N. Guru Row, Palash Sanphui, Ning Shan, Ganesh Shete, Amit Singh, Changquan C. Sun, Jennifer A. Swift, Ram Thaimattam, Tejender S. Thakur, Rajesh Kumar Thaper, Sajesh P. Thomas, Srinu Tothadi, Venu R. Vangala, Peddy Vishweshwar, David R. Weyna, Michael J. Zaworotko, *Polymorphs, salts, and cocrystals : what's in a name ?*, Crystal Growth and Design, **2012**, 12, 2147-2152
[7] Stéphane Veesler, Natalie Fertè, Marie-Sophie Costes, Mirjam Czjzek, et Jean-Pierre Astier., *Temperature and pH Effect on the Polymorphism of Aprotinin (BPTI) in Sodium Bromide Solutions*, Cryst. Growth Des., **2004**, Vol.4, No.6, 1137-1141
[8] Stéphane VEESLER, Denis MANGIN, François PUEL, *Polymorphisme et transition de phases solides en solution*, Techniques de l'Ingénieur, **2008**, J 2 160
[9] Roland BOISTELLE, Jean-Paul KLEIN, Jacques DUGUA, *Cristallisation : aspects théoriques*, Techniques de l'Ingénieur, **1989**, J 1 500
[10] Zettlemoyer, A.C. et Walton A.G., *Nucleation in Liquids and Solutions*, Nucleation **1969** : p.225-307
[11] Dimo Kashchiev, Peter G. Vekilov, et Anatoly B. Kolomeisky, *Kinetics of two-step nucleation of crystals*, The Journal of Chemical Physics, **2005**, 122(24) : p.244706
[12] Dragutin Knezic, Julien Zaccaro, et Allan S. Myerson, *Nucleation induction time in levitated droplets*, Journal of Physical Chemistry B, **2004**, 108, 10672-10677
[13] Deniz Erdemir, Alfred Y. Lee et Allan S. Myerson, *Nucleation of crystals from solution : classical and two step models*, Accounts of chemical research, **2009,** 42, 5, 621-629
[14] Chernov A.A., *Nucleation and Epitaxy*, Modern crystallography III, **1984** : p.48-98
[15] Detoisien, T., *Cristallisation d'un sel pharmaceutique : développement de méthodologies d'étude*, Thèse de l'université Paul Cézanne Aix Marseille III, **2010**
[16] D. Kashchiev et G. M. van Rosmalen, *Review : nucleation in solution revisited*, Cryst. Res. Technol., **2003,** 555-574
[17] Stéphane VEESLER, Denis MANGIN et François PUEL, *Cristallisation : aspects théoriques*, Techniques de l'Ingénieur, **2005**, J 2 710
[18] Liu X.Y., *Generic Progressive Heterogeneous Processes in nucleation*, Langmuir, **2000,** 7337-7345
[19] Romain Grossier et Stéphane Veesler, *Reaching one single and stable critical cluster through finite-sized systems*, Crystal Growth and Design, **2009**, 4, 1917-1922
[20] Laval P., *Outils microfluidiques pour l'étude des processus de cristallisation : solubilité, polymorphisme et cinétique de nucléation*, Thèse de l'université Bordeaux I, **2007**
[21] White M. L. et Frost Arthur A., *The rate of nucleation of supersaturated potassium nitrate solutions*, Journal of colloid science, **1959**, 14, 247-251
[22] Carl L. Hansen, Emmanuel Skordalakes, James M. Berger, and Stephen R. Quake, *A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion*, PNAS, **2002**, 26, 16531-16536
[23] Jung-uk Shim, Galder Cristobal, Darren R. Link, Todd Thorsen, et Seth Fraden, *Using microfluidics to decouple nucleation and growth of protein crystals*, Cryst. Growth Des., **2007**, 11, 2192-2194
[24] Selimović S, Gobeaux F et Fraden S, *Mapping and manipulating temperature-concentration phase diagrams using microfluidics*, Lab on a Chip, **2010**, DOI 10.1039/b925661j
[25] Liang Li, Debarshi Mustafi, Qiang Fu, Valentina Tereshko, Delai L. Chen, Joshua D. Tice et Rustem F. Ismagilov, *Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins*, PNAS, **2006**, 103, 19243-19248
[26] Yadav MK, Gerdts CJ, Sanishvili R, Smith WW, Roach LS, Ismagilov RF, Kuhn P et Stevens RC, *In situ data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization*, Journal of Applied Crystallography, **2005**, 38, 900-905

[27] Jacques Leng, Barbara Lonetti et Patrick Tabeling, *Microevaporators for Kinetic Exploration of Phase Diagrams*, Physical Review Letters, **2006**, 96, 084503
[28] Laval P, Lisai N, Salmon JB et Joanicot M, *A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams*, Lab on a chip, **2007**, 7, 829-834
[29] P. Laval, C. Giroux, J. Leng et J.-B. Salmon, *Microfluidic screening of potassium nitrate polymorphism*, Journal of Crystal Growth, **2008,** 310, 3121-3124
[30] J.-B. Salmon et J. Leng, *Microfluidics for kinetic inspection of phase diagrams*, Comptes Rendus Chimie, **2009**, 12, 258-269
[31] P. Laval, J.-B. Salmon et M. Joanicot, *A microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics*, Journal of Crystal Growth, **2007**, 303, 622-628
[32] Dombrowski, Richard D., Litster, James D., Wagner, Norman J. et He, Yinghe, *Crystallization of alpha-lactose monohydrate in a drop-based microfluidic crystallizer*, Chemical engineering Science, **2007**, 62, 4802-4810
[33] Sébastien Teychené et Béatrice Biscans, *Microfluidic Device for the Crystallization of Organic Molecules in Organic Solvents*, Crystal Growth and Design, **2011**, 11, 4810-4818
[34] David C. Duffy, J. Cooper McDonald, Olivier J. A. Schueller et George M. Whitesides, *Rapid Prototyping of microfluidic systems in Poly(dimethylsiloxane)*, Analytical chemistry, **1998**, 70, 4974-4984
[35] Stefano Begolo, Guillaume Colas, Jean-Louis Viovy et Laurent Malaquin, *New family of fluorinated polymer chips for droplet and organic solvent microfluidics*, Lab on a chip, **2011**, 11, 508-512
[36] Elizabeth Quevedo, Jeremy Steinbacher et D. Tyler McQuade, *Interfacial Polymerization within a simplified Microfluidic Device : Capturing Capsules*, Journal of American Chemical Society, **2005**, 127, 10498-10499
[37] Lorber N, Sarrazin F, Guillot P, Panizza P, Colin A, Pavageau B, Hany C, Maestro P, Marre S, Delclos T, Aymonier C, Subra P, Prat L, Gourdon C et Mignard E, *Some recent advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process : applications in chemistry and high-pressure microflows*, Lab on a Chip, **2011**, 11, 779-787
[38] Fleming A., *On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions*, Proc. R. Soc. Lond. B, **1922**, 93, 306-317
[39] Elizabeth Cacioppo et Marc L. Pusey, *The solubility of the tetragonal form of hen egg-white lysozyme from pH 4,5 to 5,4*, Journal of crystal growth, **1991**, 114, 286-292
[40] Oleg Galkin et Peter G. Vekilov., *Are nucleation kinetics of protein crystals similar to those of liquid droplets ?* , Journal of American Chemical Society, **2000**, 122, 156-163
[41] Runge F. F., *Neueste phytochemishe entdeckungen zur Begründung einer wissenschaftlichen phytochemie*, Berlin G. Reiner, **1820**, 144-159
[42] Nikoletta B. Báthori, Andreas Lemmerer, Gerhard A. Venter, Susan A. Bourne et Mino R. Caira, *Pharmaceutical Co-crystals with isonicotinamide-Vitamin B3, Clofibric Acid, and Diclofenac-and Two Isonicotinamide Hydrates*, Crystal Growth and Design, **2011**, 11, 75-87
[43] Somnath S. Kadam, Herman J. M. Kramer et Joop H. ter Horst., *Combination of a single primary nucleation event and secondary nucleation in crystallization processes*, Crystal Growth and Design, **2011**, 11, 1271-1277
[44] Ter Horst J. et al., Communication personnelle
[45] Thibaud Detoisien, Maxime Forite, Pascal Taulelle, Joël Teston, Didier Colson, Jean Paul Klein et Stéphane Veesler., *A Rapid Method for Screening Crystallization Conditions and Phase of an Active Pharmaceutical Ingredient*, Organic Process Research and Development, **2009**, 13, 1338-1342
[46] Stéphane Veesler, Laurent Lafferrère, Eric Garcia et Christian Hoff, *Phase Transitions in Supersaturated Drug Solution*, Organic Process Research and Development, **2003**, 7, 983-989
[47] Beckmann W., *Seeding the Desired Polymorph : Background, Possibilities, Limitations, and Case Studies*, Organic Process Research and Development, **2000**, 4, 372-383
[48] Wolfgang Beckmann, Roland Boistelle et Kiyotaka Sato, *Solubility of the A,B, and C Polymorphs of Stearic Acid in Decane, Methanol, and butanone*, Journal of Chemical Engineering Data, **1984**, 29, 211-214
[49] Tsekova Daniela; Dimitrova Sybila et Nanev, Christo N., *Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals*, Journal of crystal growth, **1999**, 196, 226-233
[50] Oleg Galkin et Peter G. Vekilov, *Direct determination of the nucleation rates of protein crystals*, Journal of Physical Chemistry, **1999**, 103, 10965-10971
[51] Narendra M. Dixit, Amit M. Kulkarni et Charles F. Zukoski., *Comparison of experimental estimates and model predictions of protein crystal nucleation rates*, Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, **2001**, 190, 47-60
[52] Philippe Laval, Aurore Crombez et Jean-Baptiste Salmon, *Microfluidic droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements*, Langmuir, **2009**, 25, 1836-1841
[53] Mitsuo Ataka et Michihiko Asai, *Systematic studies on the crystallization of lysozyme*, Journal of Crystal Growth, **1988**, 90, 86-93

[54] LEE Alfred Y.; IN SUNG LEE et MYERSON Allan S.;., *Factors affecting the polymorphic outcome of glycine crystals constrained on patterned substrates*, Chem. Eng. Technol., **2006**, 29, 281-285
[55] Šeila Selimović, Yanwei Jia et Seth Fraden, *Measuring the nucleation rate of lysozyme using microfluidics*, Crystal Growth and Design, **2009**, 4, 1806-1810
[56] Christo N. Nanev, Feyzim V. Hodzhaoglu et Ivaylo L. Dimitrov, *Kinetics of insulin crystal nucleation, energy barrier, and nucleus size*, Crystal Growth and Design, **2011**, 11, 196-202
[57] Volkert van Steijn, Chris R. Kleijn et Michiel T. Kreutzer., *Predictive model for the size of bubbles and droplets created in microfluidic T-junctions*, Lab on a chip, **2010**, 10, 2513-2518
[58] François Puel, Elodie Verdurand, Pascal Taulelle, Christine Bebon, Didier Colson, Jean-Paul Klein et Stéphane Veesler., *Crystallization mechanisms of acicular crystals*, Journal of crystal growth, **2008**, 310, 110-115