



**HAL**  
open science

# Développements instrumentaux pour le contrôle de la cristallisation par la dialyse : approche microfluidique et analyse aux rayons X

Niels Junius

► **To cite this version:**

Niels Junius. Développements instrumentaux pour le contrôle de la cristallisation par la dialyse : approche microfluidique et analyse aux rayons X. Biophysique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAY032 . tel-01498968

**HAL Id: tel-01498968**

**<https://theses.hal.science/tel-01498968>**

Submitted on 30 Mar 2017

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE la Communauté UNIVERSITÉ  
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Niels Junius**

Thèse dirigée par **Monika Budayova-Spano**

préparée au sein de l'**Institut de Biologie Structurale**  
et de l'**école doctorale de Physique**

# **Développements instrumentaux pour le contrôle de la cristallisation par la dialyse : approche microfluidique et analyse aux rayons X**

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2016**,  
devant le jury composé de :

**Mr. Wim Burmeister**

Professeur à l'Université Grenoble-Alpes, Grenoble, Président

**Mr. Claude Sauter**

Directeur de Recherche CNRS à l'IBMC, Strasbourg, Rapporteur

**Mme. Françoise Bonneté**

Chargée de Recherche CNRS à l'IBMM, Avignon, Rapporteur

**Mr. Stéphane Veesler**

Directeur de Recherche CNRS au CiNaM, Marseille, Examineur

**Mr. Jean-Baptiste Salmon**

Chargé de Recherche CNRS au LOF, Bordeaux, Examineur

**Mr. Jean-Luc Ferrer**

Responsable de groupe à l'IBS, Grenoble, Invité

**Mme. Monika Budayova-Spano**

Maître de conférences à l'Université Grenoble-Alpes, Grenoble, Directeur de  
thèse







# Remerciements

Je trouve qu'il est souvent difficile d'avoir les mots juste pour remercier les personnes qui nous ont soutenu. Ici, je vais essayer de proposer mes mots pour vous remercier.

Je voudrais en tout premier lieu remercier Monika qui a encadré et dirigé cette thèse en m'apportant une solide formation scientifique dans un domaine qui, il y a trois ans, était nouveau pour moi. Je te remercie pour ton soutien permanent, tes encouragements et tes conseils qui m'ont permis d'avancer dans ce projet de thèse fascinant mais aussi en dehors. Merci pour la relation de confiance que nous avons pu établir ensemble, qui se poursuit au delà du travail, pour nos échanges, et pour tes nombreuses qualités humaines indéniables. J'ai été très heureux de partager ces 3 ans avec toi.

Je tiens à remercier les rapporteurs de cette thèse, Claude Sauter et Françoise Bonneté, qui ont pris de leur précieux temps pour évaluer ce travail. Je remercie également les membres du jury : Wim Burmeister, Stéphane Veesler, Jean-Baptiste Salmon et Jean-Luc Ferrer de m'avoir honoré par leur présence.

Je voudrais remercier mes collègues du groupe Synchrotron. Yoann, merci de m'avoir apporté ton aide au quotidien (sur tout !), ta sympathie mais aussi de supers sorties, des souvenirs et des rires. Ça a été un plaisir de travailler avec toi. Merci Michel pour les nouveaux mots appris chaque jour et pour ta gentillesse ; la mariée ira mal. Philippe, merci de m'avoir supporté dans la dernière partie de ma thèse, toujours avec le sourire et les sorties qui vont bien. Merci Christophe pour ton aide technique, ta bonne humeur, tes blagues... Merci Pascale pour nos discussions sur le Canada. Merci Franck pour la protéine qui m'a permis d'avancer dans les développements et pour ta sympathie. Merci David pour nos échanges sur divers sujets et pour ton enthousiasme. Merci Xavier pour ton aide avec les spectromètres et pour nos échanges. Merci Antoine pour m'avoir permis d'utiliser vos spectromètres et pour nos discussions. Enfin merci à Jean-Luc pour nos échanges et pour tes conseils sur XDS.

Je souhaite remercier mes autres collègues avec qui j'ai partagé du temps, dès fois court, dès fois plus long, en conférence ou à l'IBS/ESRF : Sarah pour nos nombreux échanges et partages d'expérience, Mohammed pour nos discussions avec "le boss" mais aussi Yann-Vaï, Fanny, Raleb, Oriane, Bénédicte, Charles-Adrien, Roman, Adrien, Damien, Sylvain A., Adrien, Roman, Laura Z., Charline, Eric, Sylvain E., Laura V... Je remercie également le groupe de CRG français avec qui j'ai passé beaucoup de temps et qui sont tous très sympathiques plein de bonne humeur : Olivier G., Viviane, Stéphan, Nathalie, Nils, Tao, Odile, Jean-Sébastien, Olivier U., Jean-Louis, Olivier P., Isabelle, William, Eric... Merci aux

membres du groupe Métallo, Patricia pour ton dynamisme et ta gentillesse mais aussi Juan, Yvain, Lydie, Claudine, Anne, Eve pour votre présence et pour les discussions que j'ai pu avoir avec chacun de vous.

Je tiens également à remercier Jean-Baptiste pour la collaboration que nous avons eue et pour tes conseils. Esko pour nos échanges concernant le banc de cristallisation et ta sympathie. David pour les enseignements en LabVIEW que j'ai pris plaisir à partager avec toi et pour tes précieux conseils sur la partie thermorégulation.

Je remercie grandement le CEA et le programme doctoral Irtelis qui m'a permis d'obtenir cette bourse de thèse. Egaleme nt merci à Jacques Neyton, Eva Pebay Peyroula, Winfried Weissenhorn de l'IBS qui m'a accueilli durant ces années de thèse. Merci à Isabelle et Chantal pour votre grande aide pour les commandes et les missions.

Merci aux amis en dehors du travail qui ont contribué à leur façon pendant cette thèse : Adrien, Armin, Quentin, Pierre-Alexandre, Julie, Thomas, Benjamin, Laurène, Julien... Merci aussi à Marcel, Martine et Stéphanie. Merci à ma famille, mes parents, Thérèse et David, mes frères et sœurs, Gwen, Syb, Yvan, merci pour vos encouragements et votre soutien. Merci Christine pour ton soutien. Pour terminer merci Mathilde pour ton implication et ce temps partagé quotidiennement avec toi dont je ne pourrais me passer, qu'est-ce que je ferais sans toi ?

# Résumé

La cristallisation des protéines est une étape cruciale dans l'élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines. C'est un processus très délicat qui dépend de nombreuses variables environnementales dont le contrôle précis est difficile, voire impossible, dans les installations typiquement utilisées. Des approches basées sur la parallélisation massive des expériences et la réduction du volume d'échantillon par expérience, pour trouver les conditions initiales de cristallisation, montrent leur relative efficacité dans la recherche de ces conditions initiales mais aussi leurs limites quant à l'optimisation des cristaux obtenus.

La méthode présentée dans cette thèse diffère de ce paradigme. La démarche proposée est une approche séquentielle plutôt que la parallélisation d'expériences et est basée sur la connaissance des diagrammes de phase. Cette thèse repose sur une suite de développements d'instruments mis en œuvre pour maîtriser et rationaliser la cristallisation par la méthode de la dialyse, permettant ainsi l'exploration des diagrammes de phases sans consommer l'échantillon de protéine.

Il en résulte un dispositif microfluidique permettant la cristallisation de protéines par la méthode de la dialyse, l'utilisation d'un flux continu d'agent de cristallisation et par conséquent l'échange continu de conditions de cristallisation ainsi que le contrôle de la température au cours de l'expérience. Il est compatible avec le rayonnement X pour la collecte de données de diffraction *in situ* sur les cristaux ayant poussés dans la puce microfluidique. Ce système microfluidique est basé sur la miniaturisation du banc de cristallisation qui a été amélioré d'un point de vue : de l'électronique pour l'automatisation, du transport de fluides pour le fonctionnement en flux continu, du développement logiciel pour le contrôle des paramètres de cristallisation, de la mécanique pour améliorer la cellule de dialyse et la thermorégulation, et enfin par l'intégration d'un système UV permettant de réaliser des mesures d'absorbance *in situ* qui offre pour l'avenir la possibilité de mesurer la solubilité de protéine au cours d'une expérience de cristallisation par la dialyse.

Finalement les développements instrumentaux et méthodologiques ont été validés par la cristallisation de plusieurs protéines modèles dont les cristaux ont diffracté aux rayons X avec succès. En outre le transport d'espèces en solution par la dialyse a été étudié par une approche combinée expérimentale et théorique.

Mots clés : Microfluidique, Cristallisation, Protéine, Dialyse, Température, Diagramme de phases, Diffraction *in situ* aux rayons X.



# Abstract

Protein crystallization is a key step in elucidating three-dimensional structure of proteins. This very sensitive process depends on many variables that are difficult to control precisely or simultaneously in the existing facilities. Instrumentation developments have concentrated on massive parallel experiments and sample volume reduction used by experiment. With this approach it is relatively easy to find initial crystallization conditions but their optimization to yield well diffracting crystals often proves to be more difficult.

The method presented herein differs from the current paradigm, since we propose serial instead of parallel experiments based on the knowledge of phase diagrams. This project is based on a series of developments of instruments used to control and rationalize crystallisation using dialysis method, thus allowing phase diagrams exploration without consuming large quantity of protein sample.

This results in a microfluidic device that allows crystallization of proteins by dialysis method, use of a continuous flow of crystallization agent and therefore continuous exchange of crystallization conditions as well as temperature control during experiment. It provides X-rays compatibility for *in situ* diffraction data collection of crystals grown in the microfluidic chip. This microfluidic system is based on the miniaturization of the crystallization bench which has been improved on electronics for automation, fluid transport to operate at a continuous flow, software development for the control of crystallization parameters, mechanics to improve both dialysis cell and thermoregulation, and finally by the integration of a UV system to perform *in situ* absorbance measurements that provide the future possibility to measure the solubility of proteins in a dialysis crystallization experiment.

Finally both instrumental and methodological developments have been validated by the crystallization of several model proteins whose crystals diffracted successfully X-rays. Furthermore understanding of the transport of species in solution by dialysis was investigated by combined experimental and theoretical approaches.

Keywords : Microfluidic, Crystallization, Protein, Dialysis, Temperature, Phase diagram, *in situ* X-ray diffraction.



# Préface

## Présentation générale

La biologie structurale consiste en l'étude de la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques. La connaissance de ces structures permet d'apporter des réponses essentielles dans la compréhension de nombreux processus biologiques. Par exemple, Venkatraman Ramakrishnan, Thomas A. Steitz et Ada E. Yonath, lauréats du prix Nobel de chimie 2009, ont travaillé sur la structure et la fonction des ribosomes impliqués dans la production des protéines et ont ainsi permis, grâce aux structures déterminées aux rayons X, l'étude d'une machinerie essentielle de la vie. Cette étude a permis, entre autres, à la mise en évidence de sites de reconnaissances d'antibiotiques. En effet, certains antibiotiques bloquent le fonctionnement des ribosomes des bactéries pour les empêcher de survivre. On comprend à travers cet exemple que les études structurales sont d'un grand intérêt.

De nos jours la connaissance de la structure est principalement réalisée grâce à la cristallographie aux rayons X, bien qu'il existe d'autres méthodes. On peut aussi citer la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), la microscopie électronique ou encore la cristallographie aux neutrons. Sur le site de la PDB (Protein Data Bank), qui répertorie toutes les structures publiées, on peut voir le nombre total de structures actuellement publiées ainsi que le nombre de structure obtenues uniquement par la méthode de diffraction aux rayons X. Sur plus de 122 k structures, environ 89 % des structures ont été obtenues par cristallographie aux rayons X, 9 % par RMN, 1 % par microscopie électronique et moins de 1 % concerne d'autres techniques (cristallographie aux neutrons, ou l'utilisation hybride de techniques, combinant rayons X et neutrons par exemple).

Pour les études par cristallographie aux rayons X il est nécessaire de disposer de cristaux composés des macromolécules biologiques d'intérêt. Pour les obtenir, il faut procéder à la cristallisation qui va consister en l'évolution d'un état désordonné de la matière, en solution, à un état ordonné, cristallin. Cette cristallisation est régie par des lois physico-chimiques qui permettent la formation de cette phase cristalline. La cristallisation comprend la formation des cristaux et leur croissance. L'optimisation de la croissance cristalline nécessite la maîtrise d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques. De nombreux instruments et méthodes ont été développés pour maîtriser les conditions de cristallisation nécessaires à la formation de monocristaux permettant la collecte de données de diffraction de qualité sur des cristaux bien ordonnés.



L'approche présentée dans cette thèse diffère de la cristallisation à haut-débit qui consiste à paralléliser le maximum d'expériences dans lesquelles l'échantillon de protéine est consommé par chaque expérience, l'objectif ultime étant d'obtenir des cristaux dans une ou plusieurs conditions. L'approche présentée ici est séquentielle et vise à parcourir différentes conditions de cristallisations, présélectionnées, avec le même échantillon de protéine. Cette approche est réalisée à macro-échelle et à micro-échelle. La micro-échelle, ici, est la microfluidique qui consiste, de manière simplifiée, à la manipulation de fluides dans des systèmes de dimensions submillimétriques. La microfluidique permet, en plus, d'envisager de paralléliser un certain nombre d'expériences dans lesquelles l'échantillon n'est pas consommé et différentes conditions de cristallisation sont explorées de façon séquentielle. Le potentiel de l'approche séquentielle est très important pour l'optimisation de la croissance des cristaux. Qu'il s'agisse de la cristallographie aux rayons X ou aux neutrons, l'obtention de gros cristaux de haute qualité est un atout majeur qui permet, *in fine*, l'obtention de la structure tridimensionnelle.

Le travail réalisé au cours de cette thèse présente plusieurs aspects, tout d'abord c'est un travail pluri-disciplinaire à l'interface de la physique, de la chimie, de la biologie et de l'ingénierie. La thèse s'articule autour du développement et de la poursuite de développements d'instruments mis en œuvre pour contrôler et rationaliser la cristallisation. Un système microfluidique, basé sur la miniaturisation de la technologie du banc de cristallisation, a été mis en place pour la cristallisation des protéines. Ce système devait répondre à un certain nombre de contraintes comme le fait d'intégrer une membrane de dialyse, pouvoir être utilisé en flux continu, être compatible avec le rayonnement X et pouvoir opérer à différentes températures. Afin de valider les développements instrumentaux et méthodologiques, nous avons employé des protéines modèles, le lysozyme de blanc d'œuf de poule, l'IspE de l'agrobacterium et l'insuline de pancréas de porc. De plus, afin de maîtriser la cristallisation, nous avons étudié le transport d'espèce diffusant en solution lors de la cristallisation par la dialyse par une approche expérimentale et une compréhension théorique.

Ce manuscrit comporte 4 chapitres principaux et une conclusion générale :

Le premier chapitre présente les principes généraux qui régissent la cristallisation des protéines en solution et qui permettent l'introduction des diagrammes de phase ainsi que des différentes méthodes de cristallisation et plus particulièrement la dialyse. Ce chapitre présente aussi les notions d'écoulement en microcanaux qui appuient les résultats expérimentaux. Quelques systèmes microfluidiques développés à partir de différentes techniques de cristallisation sont également présentés pour enfin terminer par un aperçu des membranes de dialyse.

Le deuxième chapitre est sous-divisé en 2 parties, l'une concerne les développements instrumentaux et méthodologiques en lien avec le banc de cristallisation, la description de l'électronique mise en place pour automatiser et contrôler les différentes parties du banc, la programmation développée pour intégrer un logiciel clair, facilement utilisable pour tout

---

utilisateur et qui intègre toutes les options nécessaires au contrôle du banc, l'intégration d'un système de mesure de la concentration de protéine *in situ* par l'intermédiaire d'un spectromètre UV. L'autre partie concerne la microfluidique, plus précisément la microfabrication en salle blanche, le choix des matériaux qui composent la puce, la conception des différents prototypes, et une approche de la thermorégulation du système microfluidique basé sur l'utilisation de modules Peltier.

Le troisième chapitre est aussi sous-divisé en 2 parties. Dans la première partie on retrouve une étude systématique de la diffusion d'agents de cristallisation dans le cas de la dialyse dans différentes conditions ainsi que des essais de cristallisation de protéines dans le banc accompagné de preuves de principes sur la maîtrise de la cristallisation suivi d'un test prouvant la faisabilité d'une mesure par spectroscopie UV. Ce test est réalisé suite à l'intégration du système UV dans le banc de cristallisation. La seconde partie présente l'utilisation des puces microfluidiques, depuis les expériences de validation pour tester les limites et le fonctionnement du système, aux essais de cristallisation. Une étude du bruit de fond produit par les matériaux composants le système microfluidique, et les statistiques calculées suite à l'analyse aux rayons X *in situ* de cristaux obtenus en puce sont également présentées.

Le quatrième chapitre concerne la présentation d'un modèle préliminaire du transport de masse dans le cas de la dialyse et des calculs de perméabilités membranaires déduits de l'étude systématique présentée dans le chapitre 3, les phénomènes physiques mis en jeu lors de l'interaction du rayonnement X avec la matière lors de l'étude des matériaux dans le rayonnement synchrotron, et les différents phénomènes physiques entraînant des dérives de mesure qui peuvent intervenir lors d'une mesure de haute concentration de protéine par spectroscopie UV.

La conclusion générale vise à récapituler les développements réalisés au cours de cette thèse et à présenter les perspectives à venir.

En conclusion de cette présentation générale, j'ajouterai que j'ai été particulièrement motivé concernant : les développements instrumentaux, aussi bien du banc de cristallisation que de la puce microfluidique et surtout, par les simulations entreprises pour comprendre et modéliser le phénomène de la dialyse dans ces systèmes, même si ce dernier travail initié n'a pas conduit aux résultats espérés. Finalement, les développements instrumentaux pour la cristallisation sont les fondations de la recherche qui vont permettre l'élucidation de la structure tridimensionnelle de molécules d'intérêt.



# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Préface</b>	<b>vii</b>
<b>Table des figures</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xxiii</b>
<b>Abbréviations</b>	<b>xxiii</b>
<b>1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Objectifs pour la cristallisation . . . . .	1
1.1.1 Systèmes de protéines . . . . .	1
1.1.1.1 Lysozyme . . . . .	1
1.1.1.2 IspE . . . . .	2
1.1.1.3 Insuline . . . . .	3
1.1.2 Principes de la cristallisation des protéines . . . . .	4
1.1.2.1 Généralités . . . . .	4
1.1.2.2 Dialyse . . . . .	8
1.2 Microfluidique et cristallisation . . . . .	11
1.2.1 Notions utiles en mécanique des fluides . . . . .	11
1.2.1.1 Ecoulements en microcanaux . . . . .	11
1.2.1.2 Nombre de Reynolds . . . . .	13
1.2.1.3 Mouillage . . . . .	14
1.2.2 Systèmes développés pour la cristallisation des protéines . . . . .	15
1.2.2.1 Batch . . . . .	15
1.2.2.2 Libre diffusion à l'interface . . . . .	15
1.2.2.3 Contre-diffusion . . . . .	16
1.2.2.4 Diffusion de vapeur . . . . .	16
1.2.2.5 Dialyse . . . . .	16
1.2.2.6 Nucléation à l'échelle microfluidique . . . . .	17

1.3	Aperçu des membranes de dialyse . . . . .	18
1.3.1	Description . . . . .	18
1.3.2	Apparté sur la filtration . . . . .	19
<b>2</b>	<b>Développements instrumentaux et méthodologiques</b>	<b>21</b>
2.1	Banc de Cristallisation . . . . .	21
2.1.1	Présentation . . . . .	21
2.1.2	Electronique et programmation . . . . .	22
2.1.2.1	Logiciel . . . . .	23
2.1.2.2	Appareillage et électronique . . . . .	26
2.1.2.3	Publication sur l'instrument . . . . .	28
2.1.3	Nouveau design et intégration d'un spectromètre UV . . . . .	37
2.1.3.1	Description du système . . . . .	38
2.1.3.2	Mesures préliminaires . . . . .	39
2.1.3.3	Aperçu des pièces mécaniques . . . . .	44
2.2	Microfluidique . . . . .	46
2.2.1	Contexte - Présentation du système . . . . .	46
2.2.2	Matériaux utilisés . . . . .	47
2.2.2.1	PDMS . . . . .	47
2.2.2.2	SU-8 . . . . .	47
2.2.2.3	NOA . . . . .	48
2.2.2.4	PMMA . . . . .	48
2.2.2.5	Kapton . . . . .	49
2.2.2.6	COC . . . . .	49
2.2.3	Microfabrication . . . . .	49
2.2.3.1	Masques pour photolithographie . . . . .	49
2.2.3.2	Conception de moules SU-8 . . . . .	50
2.2.3.3	Analyse des lithographies . . . . .	51
2.2.3.4	Préparation du PDMS et du tampon . . . . .	51
2.2.4	Conception des différents prototypes . . . . .	52
2.2.4.1	Présentation des prototypes . . . . .	52
2.2.4.2	Base du processus de conception . . . . .	57
2.2.4.3	Stratégies de conception . . . . .	57
2.2.4.4	Informations complémentaires . . . . .	59
2.2.4.5	Conclusion . . . . .	60
2.2.5	Thermorégulation . . . . .	61
2.2.5.1	Présentation du système . . . . .	61
2.2.5.2	Matériels et méthodes misent en œuvre . . . . .	62
2.2.5.3	Système plaque . . . . .	66
2.2.5.4	Système de lames . . . . .	69

2.2.5.5	Montage de plusieurs modules en parallèle pour un système à une alimentation . . . . .	70
2.2.5.6	Conclusion . . . . .	79
<b>3</b>	<b>Expériences</b>	<b>81</b>
3.1	Banc de cristallisation . . . . .	81
3.1.1	Etude systématique de la diffusion . . . . .	81
3.1.1.1	Objectif et méthode . . . . .	81
3.1.1.2	Cas des PEG et sels séparés . . . . .	85
3.1.1.3	Cas d'un mélange PEG/sel . . . . .	92
3.1.1.4	Conclusion . . . . .	95
3.1.2	Cristallisation . . . . .	96
3.1.2.1	Lysozyme . . . . .	101
3.1.2.2	IspE . . . . .	101
3.1.3	Courbes de solubilité . . . . .	103
3.1.3.1	Méthode manuelle . . . . .	103
3.1.3.2	Méthode utilisant le banc de cristallisation . . . . .	104
3.1.3.3	Conclusion . . . . .	107
3.2	Microfluidique . . . . .	109
3.2.1	Utilisation . . . . .	109
3.2.2	Expériences de validation . . . . .	111
3.2.2.1	Ecoulement dans les canaux . . . . .	111
3.2.2.2	Temps de vidange des canaux . . . . .	113
3.2.2.3	Essais en pression . . . . .	116
3.2.2.4	Autres expériences et applications . . . . .	117
3.2.2.5	Conclusion . . . . .	117
3.2.3	Cristallisation . . . . .	118
3.2.3.1	Lysozyme . . . . .	118
3.2.3.2	IspE . . . . .	119
3.2.3.3	Insuline . . . . .	122
3.2.3.4	Autre . . . . .	123
3.2.4	Analyse RX <i>in situ</i> . . . . .	123
3.2.4.1	Caractérisation des matériaux . . . . .	123
3.2.4.2	Lysozyme . . . . .	126
3.2.4.3	IspE . . . . .	130
3.2.4.4	Insuline . . . . .	132
<b>4</b>	<b>Compréhension des phénomènes physiques : modélisation des données expérimentales</b>	<b>137</b>
4.1	Dialyse et diffusion . . . . .	137
4.1.1	Présentation du modèle - approche par simulations numériques . . . . .	137

---

4.1.2	Calculs de perméabilités membranaires . . . . .	142
4.2	Etude des matériaux aux rayons X . . . . .	143
4.2.1	Interactions avec la matière . . . . .	144
4.2.2	Comparaison des matériaux . . . . .	146
4.2.3	Informations complémentaires . . . . .	148
4.3	Spectroscopie UV d'absorption . . . . .	149
4.3.1	Déviations à la loi de Beer-Lambert . . . . .	149
4.3.1.1	Limitations de la loi de Beer-Lambert . . . . .	149
4.3.1.2	Déviations chimiques . . . . .	149
4.3.1.3	Déviations instrumentales . . . . .	150
4.3.2	Etude de la partie non-linéaire . . . . .	150
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>155</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>161</b>

# Table des figures

1.1	a) Cristaux de lysozyme obtenus par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Structure du lysozyme quadratique à 0,94 Å d'après [4].	2
1.2	a) Cristaux d'IspE obtenus par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Voie de synthèse du méthylérythritol phosphate. . . . .	3
1.3	a) Cristal d'insuline obtenu par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Structure de l'insuline de porc trigonal à 1,5 Å d'après [6].	4
1.4	Représentation schématique d'un diagramme de phase et de ses différentes zones. . . . .	6
1.5	Energie libre d'activation de germination en fonction du rayon r du germe selon la théorie classique de la nucléation. . . . .	6
1.6	Représentation schématique d'un diagramme de phase en fonction de la température dans le cas de la solubilité directe. . . . .	8
1.7	Représentation schématique d'un diagramme de phase en fonction de la concentration de précipitant avec les trajectoires cinétiques illustrées par des flèches dans le cas de la dialyse (rouge), de la diffusion de vapeur (vert), du batch (violet) et de la libre diffusion à l'interface du côté de la protéine (bleu) et du côté de l'agent de cristallisation (gris). . . . .	10
1.8	Goutte en équilibre sur une surface. . . . .	14
2.1	Photographie du banc de cristallisation. . . . .	22
2.2	Différentes vues du logiciel. (a) Accueil principal lors de l'ouverture du logiciel. (b) Vue paramétrage pour la création de scénario. . . . .	24
2.3	Différentes vues du logiciel. (a) Vue essai pour l'exécution des scénarios. (b) Vue maintenance pour contrôler tous les paramètres de l'expérience. . . . .	25
2.4	Système de cartes WAGO pour gérer différentes parties du banc. . . . .	27
2.5	Ancienne chambre de dialyse à gauche avec surfaces planes. Nouvelle chambre à droite avec surface sphérique pour la sur-chambre et conique pour la chambre.	37
2.6	Représentation schématique en 3D du banc de cristallisation et du système UV final. La source UV est représentée à gauche, le fil rouge représente l'emplacement des fibres optiques et la boîte grise et blanche à droite représente le spectromètre UV. . . . .	39



2.7	Schéma du système final avec l'interrupteur, le spectromètre et les différentes fibres optiques bifurquées ou non. . . . .	40
2.8	Absorbance mesurée avec un spectromètre QE65PRO en fonction de la longueur d'onde à différentes concentrations de lysozyme. Les concentrations de lysozyme sont indiquées en légende à droite des spectres en $\text{mg mL}^{-1}$ . . .	41
2.9	Absorbance mesurée avec un spectromètre HR2000 en fonction de la longueur d'onde à différentes concentrations de lysozyme. Les concentrations de lysozyme sont indiquées en légende à droite des spectres en $\text{mg mL}^{-1}$ . .	42
2.10	Evolution du facteur F, évalué par le rapport de deux temps d'intégration, en fonction de la longueur d'onde pour différentes concentrations de lysozyme. Spectromètre utilisé : QE65PRO. . . . .	42
2.11	Absorbance mesurée avec le spectromètre USB2000 à 280 nm en fonction de la concentration en Lysozyme pour deux longueurs de cuve différentes. . .	43
2.12	Ancien bloc support à gauche. Nouveau bloc support à droite. Echelle 1cm.	45
2.13	Différentes vues des pièces composant le nouveau bloc de dialyse. (a) Vue globale sans les échangeurs thermiques. (b) Vue en coupe d'un échangeur et du dispositif complet avec la lumière au dessus. (c) Vue en coupe du dispositif et de la cellule de dialyse à flux continu. (d) Vue en coupe du support et de la nouvelle cellule de dialyse à flux continu. . . . .	45
2.14	Épaisseurs atteignables par enduction centrifuge ("spin coating" en anglais) pour différents types de résines. Données Microchem/Kayaku Microchem. .	48
2.15	Photographie d'une puce microfluidique avec un film de Kapton jaune orangé disposé sur une partie de sa surface. . . . .	49
2.16	Schéma du motif d'alignement où l'on peut voir les deux épaisseurs, l'une rouge et l'autre grise, échelle en noir 4 mm. . . . .	50
2.17	Schéma indiquant comment disposer le masque sous la plaque de verre du microscope. Depuis le site web de l'EPFL (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne). . . . .	51
2.18	Exemple de deux profils réalisés avec Dektak sur deux moules SU-8 différents, un mal développé où on retrouve un peu de résine résiduelle (a) et l'autre bien développé (b). . . . .	52
2.19	Représentation des deux masques réalisés sous Clewin3 et utilisés pour le premier prototype. En rouge, le masque utilisé pour la première exposition, en gris le masque utilisé pour la seconde exposition. L'échelle indiquée est en $\mu\text{m}$ . Les masques sont inversés avant impression. . . . .	53
2.20	Schéma des étapes de remplissage du réservoir de protéine. En rouge la protéine, en vert l'huile utilisée pour encapsuler la protéine. Les croix rouges représentent une entrée fermée et les flèches représentent le sens de circulation du liquide. . . . .	54

2.21	Image prise au microscope optique. Visualisation de bulles d'air dans le réservoir central après l'ajout d'un colorant. . . . .	55
2.22	Photo de 3 prototypes, A, B et C réalisés selon la même procédure mais avec 3 designs différents. Echelle 0,5 cm. . . . .	56
2.23	Schéma des étapes de remplissage de deux façons différentes. En rouge la protéine, en bleu l'agent de cristallisation. Les flèches représentent le sens de circulation du liquide. Le triangle gris représente un cône de pipette. . . . .	56
2.24	Schéma du processus de microfabrication développé par Morel <i>et al.</i> . . . . .	57
2.25	Représentation schématique de la puce réalisée à la fin du processus de microfabrication par la 1ère méthode. . . . .	58
2.26	Seconde méthode de fabrication, du bas vers le haut. . . . .	59
2.27	Caractéristiques tension/température de différentes sondes de température, données publiques obtenues sur le site du "National Institute of Standards and Technology (NIST)". . . . .	63
2.28	Diagramme général des communications. . . . .	63
2.29	Le prototype du système de portepuce complet, accompagné d'un bloc à circulation d'eau en cuivre, réalisé avec Solidworks. . . . .	64
2.30	Schéma du placement des sondes et des modules Peltier pour les mesures sur les lames de cuivre. P1 et P2 correspondent aux modules Peltier. S1 à S4 correspondent aux sondes de température. . . . .	65
2.31	a) Vue réalisée avec Solidworks du système avec la plaque d'aluminium, les modules Peltier, une puce et un bloc échangeur thermique sans le portepuce b) Conductivité thermique du cuivre RRR50 et de deux type d'aluminium, données publiques obtenues sur le site du "National Institute of Standards and Technology (NIST)". . . . .	66
2.32	Chauffage du Peltier 2 avec le modèle de Peltier A (cf. Tableau 2.2) (axe de gauche) et tension appliquée aux bornes du Peltier 2 (axe de droite). . . . .	67
2.33	Variation de la température sur les 4 sondes selon la tension appliquée (axe de gauche) et tension appliquée aux bornes des modules Peltier (axe de droite) avec deux modèles de Peltier B (cf. Tableau 2.2). . . . .	68
2.34	Evolution de la température sur les sondes de température pendant 12 h. . . . .	68
2.35	Augmentation de la différence de tension appliquée au module P1 et P2 (axe de droite) entraînant un écart de température sur les 4 sondes de températures (axe de gauche) situées de part et d'autre de la puce. . . . .	69
2.36	Deux modèles de lamelles de cuivre avec une pièce de 1 € pour l'échelle. Le modèle de gauche est adapté au contrôle de la température d'une puce sans le portepuce. Le modèle de droite est plus grand pour s'adapter au portepuce. . . . .	70
2.37	Evolution de la température sur deux sondes situées sur 2 lamelles différentes lorsque la tension est modifiée sur un module Peltier à la fois. . . . .	71

2.38	Evolution de la température sur les modules P1 et P2 et sur les 2 puits les plus proches de ces derniers (axe de gauche) en fonction de la tension appliquée à P1 et P2 (axe de droite). . . . .	71
2.39	Schéma électrique du pont diviseur de courant et de tension avec R1 et R2 des résistances variables, U la tension d'alimentation, i le courant et P1 et P2 les modules Peltier 1 et 2. . . . .	72
2.40	Evolution de la température sur la face chaude, froide et différence de température $\Delta T = T_h - T_c$ additionnée à 273,15 K (pour la visualisation) en fonction de la tension d'alimentation du module Peltier modèle B (cf. Tableau 2.2). . . . .	74
2.41	Comparaison des valeurs de température mesurées à l'équilibre sur P1 et P2 et les valeurs théoriques, obtenues à partir des calculs de tension/courant (équations (2.3)) et ajustement de la courbe de calibration tension-température (Figure 2.40) pour différentes valeurs de tension d'alimentation du système global. $R1 = 10,8 \Omega \pm 0,2 \Omega$ et $R2 = 21,4 \Omega \pm 0,2 \Omega$ . . . . .	75
2.42	Géométrie pour la simulation numérique sous divisée en plusieurs domaines. . . . .	76
2.43	Résultat de la simulation numérique pour une valeur de $T_h$ de 301,3 K. . . . .	77
2.44	Gradient de température le long de la plaque de PMMA obtenu par simulation numérique pour $T_h = 301,3$ K. . . . .	78
2.45	Evolution des températures sur P1 (S1) et P2 (S3) ainsi que sur le premier puits le plus proche de P1 (S2) et P2 (S4) accompagnées par les températures théoriques d'équilibre obtenues à partir du calcul des tensions et des simulations numériques. . . . .	78
2.46	Evolution de la température sur S2 et S4 situées sur les premiers puits les plus proches de P1 et P2 respectivement accompagnées par les températures théoriques obtenues par simulation numérique pour la valeur spécifique de température mesurée sur chaque module P1 et P2 (cf. 2.45 pour les valeurs réelles de température de P1 et P2). . . . .	79
3.1	Schéma des étapes pour obtenir une mesure à un temps donné. . . . .	82
3.2	Variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en PEG pour le PEG 1000, courbe bleue, et le PEG 4000, courbe orange. . . . .	83
3.3	Variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en sel pour le NaCl, courbe bleue, le NaOAc, courbe orange, et le $(NH_4)_2SO_4$ , courbe jaune. . . . .	83
3.4	Spectres RMN représentant l'intensité normalisée sur le pic de l'acide acétique pour différentes concentrations de PEG 6000 et une variation du pic du PEG 6000 avec la concentration. . . . .	85

3.5	Evolution de la concentration rapportée à la concentration finale en fonction du temps pour le NaCl à $2 \text{ molL}^{-1}$ , points rouges, et pour le PEG 8000 à 25 % (w/v), points noirs. Les ajustements associés ont été tracés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur 3 mesures différentes du même point expérimental. . . . .	86
3.6	Evolution du $\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en % (w/v) et du poids moléculaire de PEG à 293 K. . . . .	87
3.7	Evolution du $\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en $\text{molL}^{-1}$ et du type de sel à 293 K. . . . .	88
3.8	a) $\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en PEG 1000 à 277 K et 293 K. b) $\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en PEG 8000 à 277 K et 293 K. . . . .	88
3.9	$\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en PEG 1000 pour des volumes de chambre de dialyse de 50 et 200 $\mu\text{L}$ . . . . .	89
3.10	$\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en PEG 1000 et PEG 4000 pour deux seuils de rétention différents de la membrane de dialyse. . . . .	90
3.11	$\tau_{1/2}$ en fonction de la concentration en PEG 1000 dans plusieurs cas décrit par la légende. . . . .	91
3.12	Concentration en PEG 6000 dans un bouton de dialyse dans 3 conditions différentes. Membrane utilisée 12-14 kDa. La légende représente la condition initiale du réservoir. . . . .	93
3.13	Concentration en PEG 6000 dans un bouton de dialyse dans 3 conditions différentes. Membrane utilisée 6-8 kDa. La légende représente la condition initiale du réservoir. . . . .	94
3.14	a) Expérience de nucléation, croissance, dissolution puis re-nucléation et croissance utilisant la concentration de précipitant comme paramètre de l'expérience. Température constante de 291 K. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience. . . . .	98
3.15	a) Expérience de nucléation, croissance, dissolution puis re-nucléation et croissance utilisant la température comme paramètre de l'expérience. Concentration de NaCl constante de 0,9 M. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience. . . . .	99
3.16	a) Expérience présentant le contrôle de la nucléation et croissance d'un cristal en utilisant la température. Concentration de NaCl constante de 0,75 M. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience. . . . .	100

3.17	Cristaux d'IspE obtenus par dialyse contrôlée en température en présence a) d'ADP et b) d'ATP. . . . .	102
3.18	En vert et jaune : points de solubilités obtenus dans nos expériences à pH 4 pour la forme tétragonale du lysozyme. En bleu et orange : points de solubilités obtenus à pH 4 pour la forme tétragonale du lysozyme d'après la littérature [159]. . . . .	104
3.19	Spectre d'absorbance en fonction de la longueur d'onde pour le MayaPro réalisé dans le banc de cristallisation avec un temps d'intégration de 100 ms sans aucune moyennation. . . . .	105
3.20	Représentation schématique de la trajectoire cinétique d'une expérience visant à déterminer une courbe de solubilité par diminution de la température. En rouge, l'échantillonnage est plus élevé qu'en vert. Le point A représente le point de départ d'une expérience. Les lignes bleues délimitent les zones linéaire, non-linéaire et saturée des spectres. . . . .	106
3.21	Représentation schématique de la trajectoire cinétique d'une expérience visant à déterminer une courbe de solubilité par augmentation de la température. En rouge, l'échantillonnage est plus élevé qu'en vert. Le point A représente le point de départ d'une expérience. Les lignes bleues délimitent les zones linéaire, non-linéaire et saturée des spectres. . . . .	106
3.22	Evolution de l'intensité en fonction de la longueur d'onde avec le temps lors de la croissance de cristaux en solution : $t_1 = 0$ h, $t_2 = 24$ h, $t_3 = 44$ h. . . . .	108
3.23	Support permettant de disposer 3 puces dans le rayonnement synchrotron. a) Comparaison de la dimension du support à gauche avec une plaque Crystal-QuickX à droite. b) Support démonté prêt à recevoir les puces. La partie de droite se place au dessus de la partie de gauche. L'ensemble est maintenu par deux vis et écrous. . . . .	111
3.24	Images de fluorescence de la partie inférieure (canaux), on y voit un canal d'entrée en haut à droite et le canal du réservoir de forme circulaire. Des microsphères s'écoulent dans la puce à deux pressions différentes. . . . .	112
3.25	En orange, différentes zones d'intérêt, utilisées dans l'analyse de l'intensité des pixels. . . . .	113
3.26	Courbes d'intensité moyenne de bleu à différents temps de passage, durant les 3 premières minutes de l'eau s'est écoulée dans la puce. Courbe jaune : intensité moyenne de référence correspondant au milieu du canal. Courbe orange : intensité moyenne correspondant au bord du réservoir. Courbe bleue : intensité moyenne correspondant au centre du réservoir. . . . .	114
3.27	Courbes d'intensité moyenne de bleu à différents temps de passage. Courbe jaune : intensité moyenne de référence correspondant au milieu du canal. Courbe orange : intensité moyenne correspondant au bord du réservoir. Courbe bleue : intensité moyenne correspondant au centre du réservoir. . . . .	115

3.28	Visualisation de fuites à partir d'images de fluorescence de la partie inférieure de la puce. . . . .	116
3.29	Observation de l'assèchement du puits supérieur par passage de PEG à haut poids moléculaire dans les canaux. Images à lire de gauche à droite puis de haut en bas. Phénomène de coalescence sur les images 7 et 10. Disparition de la goutte formée sur les images 8 et 11. Temps total de 2 h 45 min. . . . .	118
3.30	Premiers essais de cristallisation en puce microfluidique. . . . .	119
3.31	Expérience de dissolution et recristallisation avec le lysozyme. a) Nucléation et croissance à 293 K, NaCl 0,75 M. b) Dissolution à 300 K, NaCl 0,75 M. c) Nucléation rapide à 293 K, NaCl 0,75 M. d) Dissolution à 293 K, NaCl 0 M. . . . .	120
3.32	Croissance d'un cristal d'IspE en puce microfluidique : a) 6 jours, b) 19 jours, c) 50 jours depuis le début de l'expérience. d) Un autre cristal d'IspE obtenu dans les mêmes conditions de cristallisation et d'expérience. . . . .	121
3.33	Cristaux d'IspE permettant de collecter <i>in situ</i> des données de diffraction aux rayons X sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes. . . . .	121
3.34	Cristaux d'insuline permettant de collecter <i>in situ</i> des données de diffraction aux rayons X sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes. . . . .	122
3.35	Cristaux d'HCA II obtenus en puce microfluidique. . . . .	123
3.36	Bruit de fond généré par les composants de la puce et la puce elle-même. Intensité correspondant à la valeur relevée par le détecteur soustraite des mesures sans échantillon en atmosphère d'hélium. . . . .	125
3.37	a) Cliché de diffraction de la puce microfluidique sans cristal. b) Cliché de diffraction de la puce microfluidique contenant un cristal de lysozyme. . . . .	125
3.38	Comparaison entre le bruit de fond généré par notre puce microfluidique et deux autres plaques traditionnelles de cristallisation. Intensité correspondant à la valeur relevée par le détecteur soustraite des mesures sans échantillon en atmosphère d'hélium. . . . .	126
4.1	Géométrie du modèle du bouton de dialyse. Les lignes grises délimitent la solution et une condition d'absence de flux a été appliquée. Les lignes bleues représentent les délimitations de la membrane, où la diffusion des molécules diffère beaucoup par rapport aux zones du réservoir et de la chambre. . . . .	138
4.2	Evolution de $f$ en fonction du rapport entre la rayon des pores et le rayon de la molécule pour les 4 modèles présentés ci-dessus. En jaune le modèle de l'équation (4.2), en noir le modèle de l'équation (4.3), en turquoise le modèle de l'équation (4.4) et en bleu le modèle de l'équation (4.5) pour $n = 3$ , valeur la plus adaptée par ajustement. . . . .	140
4.3	Evolution de la concentration rapportée à la concentration finale dans la chambre de dialyse en fonction du temps pour le PEG 1000 à 10 % (w/v) réalisé expérimentalement, "exp", et par simulation, "simu" (valeur moyenne dans la chambre). . . . .	141

4.4	Coefficient de perméabilité en fonction de la concentration en NaCl pour différentes conditions de température et seuil de rétention de la membrane (indiquées en légende). Les courbes en trait plein représentent un ajustement linéaire pour évaluer la tendance globale. . . . .	143
4.5	Coefficient de perméabilité en fonction de la concentration en PEG 1000 pour différentes conditions de température, seuil de rétention de la membrane et volume de la chambre de dialyse (indiquées en légende). Les courbes en trait plein représentent un ajustement linéaire pour évaluer la tendance globale. . . . .	144
4.6	Section efficace du carbone en fonction de l'énergie des photons. $\tau$ , effet photoélectrique ; $\sigma_{coh}$ , diffusion Rayleigh ; $\sigma_{incoh}$ , diffusion Compton ; $\kappa_n$ , production de paire (noyau) ; $\kappa_e$ , production de paire (électron) ; $\sigma_{ph}$ , absorption photonucléaire. D'après [177, 179]. . . . .	145
4.7	Evolution de la transmission en fonction de l'épaisseur de divers matériaux. . . . .	147
4.8	Evolution de la transmission en fonction de l'énergie pour une gamme d'énergie proche de 12 keV. . . . .	147
4.9	Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de lysozyme avec une représentation de la zone linéaire en rouge et de la partie non-linéaire qui pourrait être ajustée en vert. . . . .	151
4.10	De gauche à droite et de haut en bas : ajustement linéaire, ajustement quadratique, ajustement cubique inversé. . . . .	152
4.11	Interpolation linéaire et interpolation cubique. . . . .	153
4.12	Images à lire de gauche à droite et de haut en bas. Dissolution de cristaux de lysozyme suivi par une recristallisation rapide pour former un grand nombre de petits cristaux en puce microfluidique. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . . . . .	160
4.13	Cristaux de lysozyme formés dans la puce ayant été colorés à l'aide d'un colorant rouge. Echelle 100 $\mu\text{m}$ . . . . .	160

# Liste des tableaux

2.1	Tableau comparatif de différents capteurs. Données Ocean Optics, Idil Fibres Optiques. . . . .	40
2.2	Données de deux modules Peltier utilisés . . . . .	62
3.1	Données XDS de cristaux de lysozyme ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	128
3.2	Données XDS de cristaux de lysozyme ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	129
3.3	Données XDS de cristaux d'IspE ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	131
3.4	Données XDS obtenues par groupement des données à partir de 6 cristaux d'IspE ayant poussés dans la même condition de cristallisation. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	132
3.5	Données XDS obtenues sur un cristal d'insuline congelé, cristal obtenu par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	133
3.6	Données XDS de cristaux d'insuline ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	135
3.7	Données XDS obtenues par groupement des données de 6 cristaux d'insuline ayant poussé dans la même condition. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution. . . . .	136
4.1	Tableau comportant les fractions atomiques massiques, la densité et la valeur du coefficient d'atténuation linéique calculé à 12 keV pour différents matériaux. . . . .	146





# Chapitre 1

## Introduction

### 1.1 Objectifs pour la cristallisation

#### 1.1.1 Systèmes de protéines

Dans cette section nous présenterons les protéines ayant été utilisées pour les différents objectifs de cette thèse tels que les développements instrumentaux et méthodologiques et les preuves de principes.

##### 1.1.1.1 Lysozyme

Le lysozyme, dont des cristaux sont montrés sur la Figure 1.1, autrement nommé Mucamidase ou mucopolysaccharidase N-acétylmuramoyl hydrolase, est une enzyme antimicrobienne composée de 129 acides aminés (le nombre exact dépend de l'organisme d'origine). Le lysozyme est une enzyme présente dans divers liquides biologiques comme le blanc d'œuf, le mucus nasal, les larmes, le lait ou le mucus cervical. Le lysozyme de l'œuf de poule, utilisé ici comme protéine modèle, permet la destruction de la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des liaisons osidiques  $\beta$ -1,4 entre les résidus de l'acide N-acétylmuramique et du N-acétyl-D-glucosamine des peptidoglycanes (Arnheim et al. [1]). Cette protéine possède un poids moléculaire de 14,6 kDa et un point isoélectrique de 11. Comme mentionné plus haut, nous l'avons sélectionnée comme protéine modèle pour sa relative facilité à cristalliser. De plus, disponible dans le commerce en grande quantité elle est peu onéreuse, ce qui permet de réaliser des prototypages rapides.

Sa séquence est écrite ci-dessous :

10	20	30	40	50
KVFGRCELAA	AMKRHGLDNY	RGYSLGNWVC	AAKFESNFNT	QATNRNTDGS
60	70	80	90	100
TDYGILQINS	RWWCNDGRTP	GSRNLCNIPC	SALLSSDITA	SVNCAKKIVS
110	120			
DGNMNAWVA	WRNRCKGTDV	QAWIRGCRRL		

Elle a été nommée en tant que telle en 1922 par Fleming [2]. La structure du lysozyme fut finalement résolue en 1965 par Blake et al. [3].

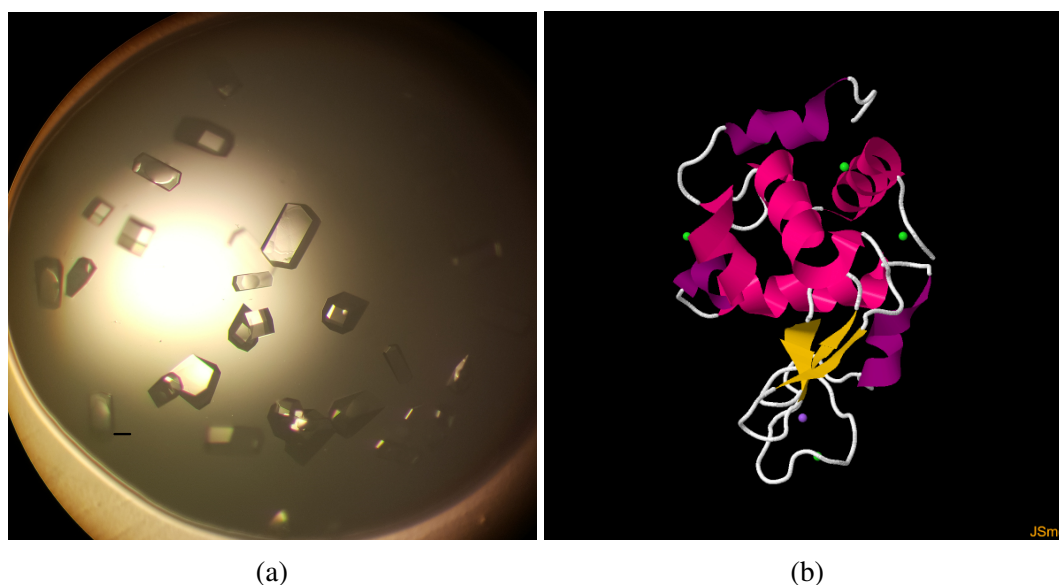


FIGURE 1.1 a) Cristaux de lysozyme obtenus par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Structure du lysozyme quadratique à 0,94 Å d'après [4].

### 1.1.1.2 IspE

La 4-(cytidine-5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol kinase d'*Agrobacterium Tumefaciens*, autrement nommée YchB ou IspE, est une phosphotransférase, c'est-à-dire une enzyme catalysant les réactions de phosphorylation, qui intervient dans la 4ème étape de la voie de synthèse biologique du méthylérythritol phosphate. Elle catalyse plus précisément la conversion du CDP-ME (4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol) en CDP-MEP (4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol-2-phosphate), voir Figure 1.2b. Cette réaction permet la synthèse de l'IPP (isopentényl-pyrophosphate) et du DMAPP (diméthylallyl-pyrophosphate) qui sont des métabolites conduisant notamment à la synthèse des terpénoïdes. Cette protéine a été produite et purifiée dans le groupe synchrotron par Franck Borel. Cette enzyme représente un poids moléculaire de 31800 Da et est composée de 299 acides aminés.  $Mg^{2+}$  intervient comme cofacteur dans la réaction de phosphorylation, il est nécessaire à l'activité de l'enzyme. Le point isoélectrique théorique calculé via ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) est de 6,07.

Sa séquence est écrite ci-dessous :

10	20	30	40	50
MRLHEVSGAT	ETVEAAPAKI	NLALHVTGQR	ADGYHLETL	VTFTAAGDMI
60	70	80	90	100
RIRDAATDSF	SISGPFGLL	SAGDSGDNLV	TRARDILRDA	LASTGQPAP
110	120	130	140	150
VDIHLEKNLP	VASGIGGSA	DAAATLRGLL	RHWDAAIAP	KLKSLALKLG
160	170	180	190	200
ADVPMCLASR	PLIARGIGED	IEALTDLPEL	SMVLANPLKA	VSTPEIFRRL
210	220	230	240	250
QNKVNPHLPT	PSTIGWATTG	WMDFLAQRN	DLQPPAQALL	PEIGEITGLL
260	270	280	290	
SEEGATLVRM	SGSGATCFGI	FHSFDAAKNA	ETSLRKKRPG	WYFHATRTI

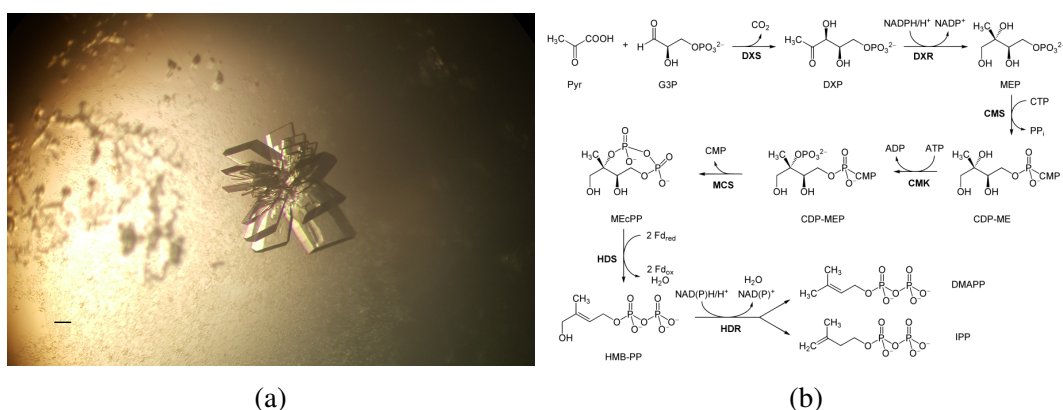


FIGURE 1.2 a) Cristaux d'IspE obtenus par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Voie de synthèse du méthylérythritol phosphate.

### 1.1.1.3 Insuline

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans dont la fonction principale est de maintenir un niveau de glucose normal dans le sang en facilitant la consommation de glucose, en régulant le métabolisme des carbohydrates, des lipides et des protéines et en promulguant la division et la croissance des cellules à travers ses effets mitogéniques [5]. L'insuline de pancréas de porc, dont un cristal est visible sur la Figure 1.3a, est une enzyme de petite taille avec un poids moléculaire de 5777,6 Da et 51 acides aminés. Son point isoélectrique est de  $pI = 5,3$ . Cette protéine nécessite d'être préparée dans l'acide chlorhydrique à pH 2-3. L'insuline est composée de deux chaînes liées par des ponts disulfures dont la séquence est écrite ci-dessous :

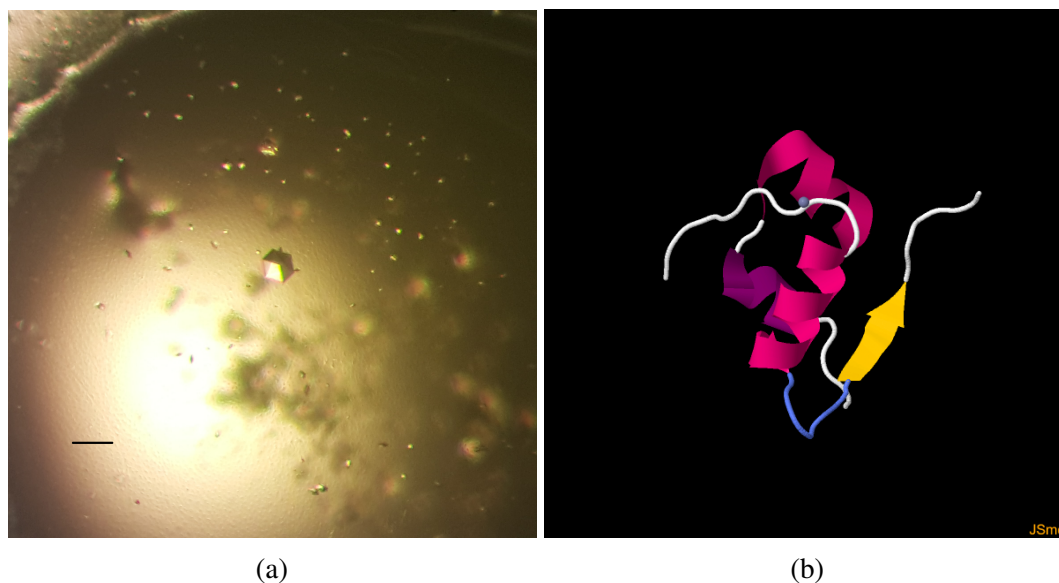
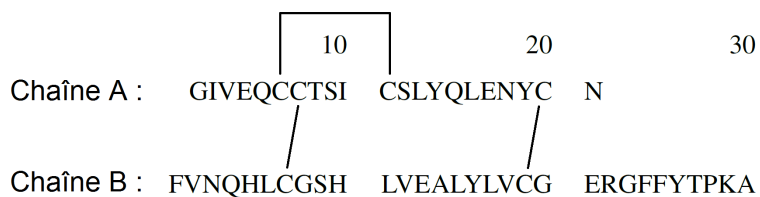


FIGURE 1.3 a) Cristal d'insuline obtenu par diffusion de vapeur en goutte suspendue, échelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Structure de l'insuline de porc trigonal à 1,5  $\text{\AA}$  d'après [6].

## 1.1.2 Principes de la cristallisation des protéines

L'objectif de ce travail concerne des développements instrumentaux qui se basent sur la théorie des diagrammes de phases et la dialyse pour maîtriser et rationaliser la cristallisation des protéines. Par conséquent, dans cette section nous introduirons quelques principes de base dévoilant les concepts physico-chimiques sur lesquelles repose la cristallisation des protéines en solution. Cette section s'appuie notamment sur les travaux de Boistelle et Astier [7], de Budayova [8] et de Durbin et Feher [9].

### 1.1.2.1 Généralités

On définit la quantité de matière par unité de volume comme la concentration initiale  $C$  d'un soluté en solution. Le soluté est dissout en solution par un bon solvant, ou un solvant imposé, qui est un autre constituant de la solution. Cependant pour un volume donné de solution, le solvant ne peut dissoudre qu'une certaine quantité de soluté, cette limite est la solubilité. En dessous de cette limite la solution est dite sous-saturée, à cette limite la solution est dite saturée et au delà la solution est dite sursaturée. On peut définir  $C^*$  comme étant la concentration à saturation après cristallisation.

Dans une configuration sursaturée on pourra obtenir des cristaux et/ou les faire croître. La solution va alors évoluer vers un état d'équilibre qui est la saturation. Dans le cas où une solution est sous-saturée, si des cristaux sont présents en solution, ils vont se dissoudre mais aucun cristal ne se formera en solution. Ainsi une solution sous-saturée sans cristaux n'évoluera pas. La force motrice de la cristallisation est définie comme la différence des potentiels chimiques  $\Delta\mu$  des espèces présentes respectivement dans la solution sursaturée (à la concentration  $C$ ) et dans la solution saturée à l'équilibre cristal-solution (à la concentration  $C^*$ ), équation (1.1).

$$\Delta\mu = k_B T \ln\left(\frac{C}{C^*}\right) \quad (1.1)$$

On définit la sursaturation avec les nombres sans dimension  $\beta$  et  $\sigma$  comme décrit dans les équations présentées en (1.2).

$$\beta = \frac{C}{C^*} \quad \sigma = \frac{C - C^*}{C^*} \quad (1.2)$$

Les différentes zones décrites ici peuvent être représentées sur un diagramme de phase 1.4. Il représente une carte de l'état de la matière en fonction du paramètre étudié (température, concentration d'agent cristallisant, pression etc...). Dans le cas de la Figure 1.4 on a un exemple avec l'évolution de la concentration en agent cristallisant. Le diagramme de phase comprend plusieurs courbes et zones. On trouve la courbe de solubilité, équilibre thermodynamique, qui représente l'évolution de la solubilité en fonction du paramètre d'intérêt et qui sépare la zone sous-saturée de la zone sursaturée. La courbe de supersolubilité, équilibre cinétique, située dans la zone sursaturée et séparant la zone métastable de la zone de nucléation. La zone métastable est une zone où la solution sursaturée peut se maintenir sans former de nouveaux cristaux pendant une longue période de temps. La zone de nucléation quant à elle, est une zone dans laquelle la solution sursaturée va d'abord évoluer, à l'image de la zone métastable, pour donner naissance à des embryons de germes cristallins. Ces embryons, constitués de plusieurs molécules, se font et se défont par capture ou perte d'une molécule par un processus réversible. Mais à la différence de la zone métastable, à un certain moment, ici ces embryons vont atteindre une taille suffisante pour être considérés comme des germes cristallins qui spontanément donneront naissance à des cristaux.

La formation de ces embryons, qui vont par la suite engendrer des cristaux, est donc réalisée lorsque les molécules en solution se réunissent. Cela nécessite de dépasser une certaine énergie moyenne constante qui est obtenue dans une solution par la sursaturation. Les fluctuations d'énergie autour de cette énergie moyenne vont permettre l'apparition de ces germes. La nucléation aura donc lieu si la barrière énergétique est franchie. L'énergie qui décrit ce phénomène est l'énergie libre d'activation de germination  $G$ . L'équation (1.3) décrit cette énergie dans le cas où le germe est assimilé à une sphère de rayon  $r$ . A la formation

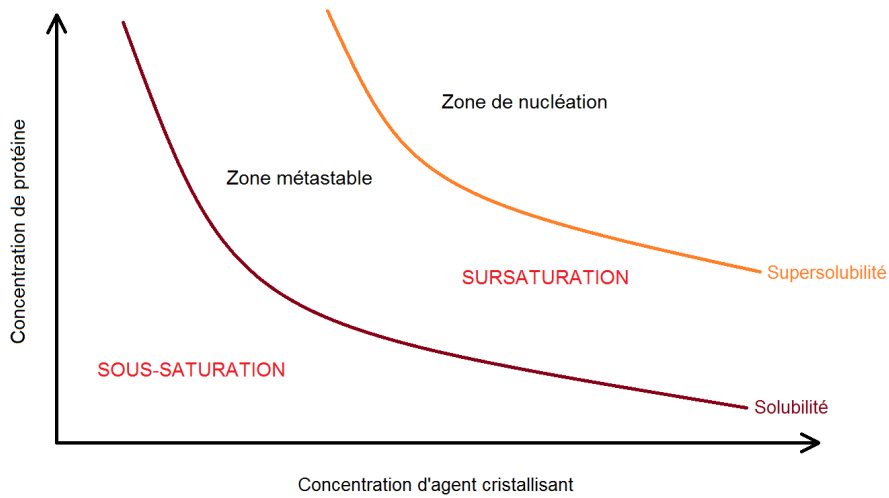


FIGURE 1.4 Représentation schématisée d'un diagramme de phase et de ses différentes zones.

du germe, deux énergies opposées vont intervenir : l'énergie de volume qui va avoir une contribution négative et l'énergie de surface qui va avoir une contribution positive.

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma - \frac{4\pi r^3}{3V} \quad (1.3)$$

Dans l'équation (1.3),  $\gamma$  est l'énergie interfaciale entre le germe et le liquide,  $V$  est le volume d'une molécule dans le germe. On peut voir sur la Figure 1.5 l'évolution de  $\Delta G$  en fonction de  $r$  où l'on peut observer la compétition des termes de surface et de volume. On note la présence d'un maximum qui correspond à l'équilibre entre les deux termes, on obtient alors  $r^*$  le rayon critique du germe, équation (1.4).

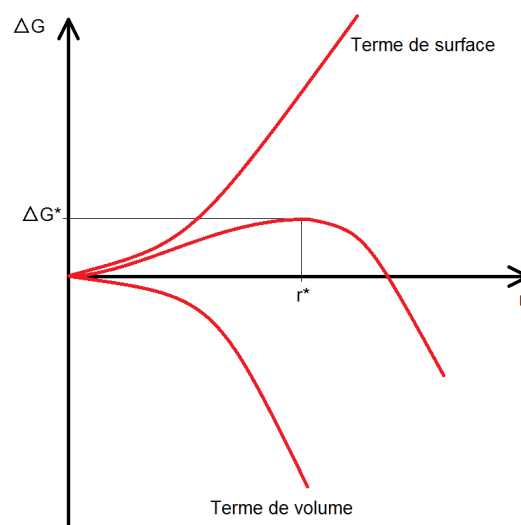


FIGURE 1.5 Energie libre d'activation de germination en fonction du rayon  $r$  du germe selon la théorie classique de la nucléation.

$$r^* = \frac{2V\gamma}{k_B T \ln(\beta)} \quad (1.4)$$

Lorsque  $r = r^*$  le germe est à l'équilibre, si une molécule est retirée du germe on aura  $r < r^*$  donc il se dissout. Si une molécule est ajoutée au germe,  $r > r^*$ , alors il va croître spontanément. Cela décrit la nucléation primaire homogène qui correspond à la formation de germes en solution. Cependant lorsque la nucléation va avoir lieu sur un support solide en solution (paroi de la cuve, poussières...), on parlera de nucléation primaire hétérogène. Dans ce second cas la barrière énergétique à dépasser pour créer un germe est plus faible. Enfin si les germes se forment en solution à partir de cristaux (ou débris cristallins) de même nature, de chocs, de l'agitation etc, on parlera de nucléation secondaire.

Les différentes zones du diagramme de phase ont été décrites dans le cas de l'évolution de la concentration d'agent cristallisant. Toutefois, comme décrit plus haut, d'autres paramètres vont influencer sur la cristallisation. La température est un de ces paramètres d'intérêt. La température est un paramètre souvent négligé lors d'essais de cristallisation en plaque par exemple, car c'est un paramètre difficile à contrôler. Communément deux températures de cristallisation sont utilisées, 277 et 293 K. Pourtant un contrôle précis de la température permet de maîtriser de façon réversible la sursaturation. Les instruments présentés au cours de cette thèse possèdent un contrôle précis de la température ce qui permet d'entreprendre des études de cristallisation en fonction de cette variable. Cependant, la solubilité peut évoluer de deux manières en fonction de la protéine d'étude, des précipitants en solution [10]. Il y a la solubilité dite directe, la solubilité augmente avec la température, et la solubilité indirecte, la solubilité diminue avec l'augmentation de la température. Dans le cas d'une solution idéale, la loi de Van't Hoff décrit la fraction molaire de protéine X en fonction des enthalpie et entropie de dissolution, équation (1.5), R est la constante des gaz parfait et T la température absolue.

$$\ln(X) = -\frac{\Delta H_d}{RT} + \frac{\Delta S_d}{R} \quad (1.5)$$

Il est possible à partir de courbes de solubilités de déterminer l'ordre de grandeur des enthalpies de dissolution [11, 12]. L'effet direct ou inverse de la solubilité avec la température peut être observé par l'intermédiaire de l'entropie de dissolution et l'enthalpie de dissolution. Dans le cas où l'enthalpie de dissolution est positive, cela signifiera que la dissolution de la protéine dans le solvant est endothermique, la solubilité augmente avec la température. Si l'enthalpie de dissolution est négative, on aura l'effet inverse.

Sur la Figure 1.6 on peut voir une représentation schématique d'un diagramme de phase dans le cas où la solubilité est directe et donc augmente avec la température.

On a donc ici un aperçu de quelques notions nous permettant d'appréhender les différentes zones du diagramme de phase, la zone sous-saturée, la zone métastable et la zone de nucléation. En pratique, pour optimiser la croissance de cristaux, on cherche d'abord à atteindre la zone



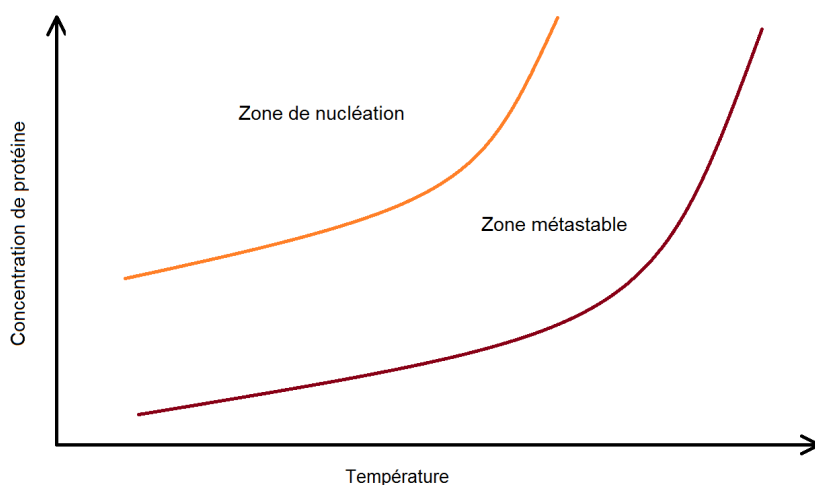


FIGURE 1.6 Représentation schématique d'un diagramme de phase en fonction de la température dans le cas de la solubilité directe.

de nucléation pour créer un certain nombre de germes cristallins en solution. Une fois ces germes formés la croissance des germes existants est favorisée sans qu'il y ait formation de nouveaux germes. Pour procéder de la sorte, et donc optimiser leur croissance, les germes doivent être maintenus dans une condition faiblement sursaturée dans la zone métastable. Par conséquent les molécules en solution vont contribuer à la croissance d'un ou de quelques cristaux contrairement à une solution trop sursaturée où la courbe de supersolubilité serait dépassée et où de nouveaux germes apparaîtraient en solution entraînant la formation d'un grand nombre de petits cristaux. Il est à noter qu'au delà d'une sursaturation donnée la protéine peut précipiter en solution.

### 1.1.2.2 Dialyse

Pour parcourir les différentes zones d'un diagramme de phase et commencer le processus de cristallisation il existe différentes techniques de cristallisation. Parmi les techniques les plus communes on retrouve la diffusion de vapeur (goutte suspendue, goutte assise, goutte en sandwich), le batch, la contre-diffusion, la libre diffusion à l'interface et la dialyse.

La diffusion de vapeur consiste à déposer une goutte (d'un faible volume de l'ordre du  $\mu\text{L}$ ) d'un mélange de protéine et de la solution de cristallisation sur une lamelle de verre (dans le cas de la goutte suspendue) qui va servir à refermer un réservoir contenant un gros volume de la même solution de cristallisation (de l'ordre du mL). Ainsi par la diffusion de vapeur d'eau générée par la différence de concentration entre la solution du réservoir et celle de la goutte, un équilibre s'établit. La concentration en protéine et en agent de cristallisation va augmenter dans la goutte jusqu'à atteindre la concentration du réservoir. Si une condition suffisamment sursaturée est atteinte, on observe la nucléation spontanée dans la goutte.

Le batch consiste à mélanger directement dans un réservoir la protéine avec l'agent précipitant. Suivant le niveau de sursaturation on peut observer la nucléation de cristaux,

"ne rien observer" mais être dans une condition métastable dans laquelle un cristal peut être ensemencé et va croître, ou bien "ne rien observer" mais être dans une condition sous-saturée dans laquelle l'ensemencement d'un cristal entraînera sa dissolution [13]. L'expression "ne rien observer" signifie que le mélange de cristallisation paraît clair à l'aide d'un microscope optique, aucune présence de cristaux, ni de précipités, ni d'autres phases éventuelles (solides ou liquides) n'est détectée.

La contre-diffusion, consiste à déposer la protéine dans un capillaire et l'agent de cristallisation dans un petit réservoir séparés par un milieu tampon (le plus souvent mais pas obligatoire) comme un gel d'agarose par exemple. La protéine et l'agent sont en contact avec ce tampon. L'agent va alors passer à travers ce dernier et diffuser dans le capillaire contenant la protéine. En contre-diffusion le capillaire doit être de grande taille, typiquement plusieurs centimètres [14]. Proche du tampon on observera généralement un précipité et/ou des microcristaux du à la forte sursaturation qui y règne tandis que plus loin la sursaturation sera moins élevée. La zone réservée à la protéine dans le capillaire est plus longue pour permettre un gradient de concentration d'agent le plus étalé possible. Cette technique peut être vue comme une extension de la libre diffusion à l'interface [15].

La libre diffusion à l'interface peut être réalisée en capillaire avec la protéine et l'agent de cristallisation situés à deux extrémités du capillaire mais en contact l'un de l'autre de sorte qu'il n'y ait qu'une interface entre la protéine et l'agent. Ensuite il va se former un gradient de concentration de protéine et d'agent de cristallisation par diffusion des deux liquides l'un vers l'autre. Le mélange des deux solutions va entraîner la formation de cristaux le long du capillaire.

Enfin il y a la dialyse qui consiste à mettre la protéine seule dans un bouton de dialyse qui contient une chambre qui peut être refermée sur un côté avec une membrane semi-perméable. La membrane semi-perméable possède une taille de pore permettant la diffusion des petites molécules telles que les agents de cristallisation, alors que la protéine sera retenue. Le bouton est immergé dans une solution contenant la solution de cristallisation. Les molécules d'eau et d'agent précipitant diffusent à travers la membrane pour équilibrer la concentration de part et d'autre de celle-ci. La concentration augmente dans le bouton de dialyse jusqu'à atteindre la concentration du réservoir.

Chaque technique permet de parcourir différentes trajectoires cinétiques comme le montre la Figure 1.7. La dialyse est en rouge, la concentration en protéine est constante et la concentration en agent cristallisant augmente progressivement. Si une condition suffisamment sursaturée est atteinte, des cristaux se forment en solution diminuant la concentration de protéine. La diffusion de vapeur est en vert, la concentration en protéine et en agent cristallisant augmentent progressivement pour atteindre éventuellement la zone de nucléation et former des cristaux. En violet on a le batch, la protéine et l'agent cristallisant sont placés dans une condition donnée, si la condition se situe dans la zone de nucléation il y aura la formation de cristaux. En bleu et gris on a la libre diffusion à l'interface, la courbe bleue correspond à l'évolution de la concentration du côté de la protéine, qui diminue progressivement dû à la diffusion

vers l'agent de cristallisation dont la concentration augmente également. Finalement pour un certain mélange d'agent et de protéine la concentration en protéine va descendre drastiquement suite à la formation de cristaux. De l'autre côté, en gris, la concentration d'agent va diminuer par diffusion vers la protéine tandis que la concentration en protéine augmente progressivement jusqu'à atteindre un mélange adéquat pour la cristallisation [16].

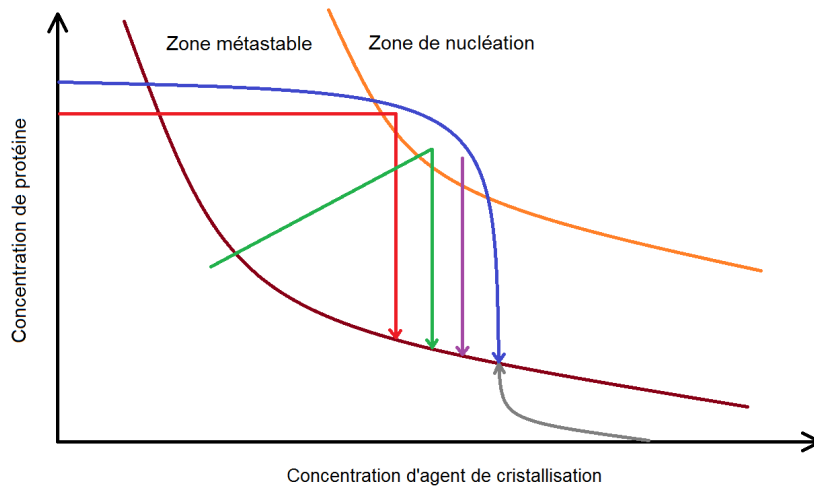


FIGURE 1.7 Représentation schématique d'un diagramme de phase en fonction de la concentration de précipitant avec les trajectoires cinétiques illustrées par des flèches dans le cas de la dialyse (rouge), de la diffusion de vapeur (vert), du batch (violet) et de la libre diffusion à l'interface du côté de la protéine (bleu) et du côté de l'agent de cristallisation (gris).

Nous nous intéresserons principalement à la dialyse car les différents développements présentés par la suite sont basés sur cette technique de cristallisation. La dialyse implique la diffusion et l'équilibrage des molécules de précipitant à travers la membrane. Elle permet d'atteindre de façon progressive la condition à laquelle la protéine va cristalliser. On peut décrire l'évolution de la concentration  $C$  du soluté dans le réservoir (rétenant) au temps  $t$  à l'aide de l'équation (1.6).

$$C = C_0 e^{-Kt} \quad (1.6)$$

Avec  $C_0$ , la concentration initiale du soluté dans le réservoir au temps  $t_0$ ,  $K$  le coefficient de dialyse qui va dépendre d'un grand nombre de paramètres, notamment le seuil de rétention de la membrane, la température, le soluté etc... Ces paramètres seront rediscutés en détail dans la section consacrée à une étude systématique du processus de dialyse (section 3.1.1). Les variations de concentration du soluté en fonction du temps dans le réservoir suivent une loi exponentielle.

Un des avantages majeur de la dialyse provient du fait que la solution de cristallisation peut être échangée pour une autre en retirant la solution du réservoir et en la remplaçant par une nouvelle. Ce changement de condition peut être réalisé autant de fois que nécessaire

tant que la protéine n'est pas endommagée (e.g. dénaturée par la condition de cristallisation). Un nouvel équilibre peut alors s'installer avec la nouvelle condition. Une même quantité de protéine pourra donc être utilisée plusieurs fois sans être consommée suite à l'exploration de plusieurs conditions de cristallisation.

Un autre avantage de cette technique est la possibilité d'exploration dans la région "salting-in" du diagramme de phase. Dans cette région la solubilité de la protéine augmente avec l'augmentation de la force ionique. Cet effet s'explique par la stabilisation de la protéine chargée en solution par les contre-ions du sel à faible force ionique. La solubilité de la protéine est donc favorisée par l'augmentation de la concentration en sel. Il est donc possible d'explorer la partie "salting-in" par diminution de la concentration en sel. Cependant à haute force ionique, la compétition s'établit entre les ions salins ajoutés et la protéine présente en solution pour la solvation des molécules. Pour de fortes concentrations de sels, il y a tellement d'ions solvatés que les autres solutés ne peuvent plus se dissoudre dans le solvant. Ainsi la solubilité de la protéine va diminuer avec l'augmentation de la concentration en sel. C'est la région "salting-out" représentée sur la Figure 1.4.

## 1.2 Microfluidique et cristallisation

### 1.2.1 Notions utiles en mécanique des fluides

Dans cette section nous introduirons quelques principes de base régissant les écoulements en canaux, qui nous permettront d'introduire la notion de résistance hydraulique. Nous présenterons aussi le nombre de Reynolds qui nous permet de caractériser la nature d'un écoulement puis la notion de mouillage. Ces différentes notions sont introduites pour appuyer les résultats expérimentaux présentés par la suite dans les sections 2.2 et 3.2. Cette section s'appuie principalement sur un livre de Tabeling [17] et un livre de Rieutord [18].

#### 1.2.1.1 Ecoulements en microcanaux

Pour choisir la géométrie de notre système il est nécessaire de tenir compte des effets liés aux écoulements dans les micro-canaux. Cependant au vu des dimensions de travail, de l'ordre du micromètre jusqu'au millimètre, la physique classique est de rigueur même si les forces de contact jouent un rôle plus important à cette échelle qu'à l'échelle macroscopique.

Le mouvement d'un fluide monophasique dans l'approche hydrodynamique est régi par 2 équations. L'équation de conservation de la quantité de mouvement (1.7) et l'équation de conservation de la masse (1.8).

$$\rho \frac{D\vec{u}}{Dt} = \vec{\nabla} \cdot \vec{\tau} + \vec{F} \quad (1.7)$$

$$\frac{D\rho}{Dt} + \rho \vec{\nabla} \cdot \vec{u} = 0 \quad (1.8)$$

Avec :  $\rho$  la masse volumique ( $\text{kgm}^{-3}$ ),  $\vec{u}$  la vitesse ( $\text{ms}^{-1}$ ),  $\bar{\tau} = (\tau_{ij})$  tenseur des contraintes visqueuses,  $\vec{F}$  forces extérieures (N). Aussi,  $\frac{D}{Dt}$  est la dérivée particulaire que l'on peut retrouver en considérant une fonction  $f$  de l'espace et du temps. Lors d'un mouvement d'une particule fluide durant  $dt$  selon  $x$  la particule aura parcouru une distance  $dx = x + vdt$ , on aura donc  $df = f(x + vdt, t + dt) - f(x, t) = \frac{\partial f}{\partial x} dx + \frac{\partial f}{\partial t} dt$  soit  $df = \frac{\partial f}{\partial x} vdt + \frac{\partial f}{\partial t} dt$  d'où  $\frac{Df}{Dt} = \frac{\partial f}{\partial x} v + \frac{\partial f}{\partial t}$ .

En hydrodynamique on considère souvent que le fluide est incompressible lorsque sa vitesse est bien inférieure à la vitesse du son. Cependant il peut arriver dans certains cas qu'il ne soit pas possible de considérer le fluide comme incompressible. Ce système d'équation peut être complété par des équations d'états thermodynamiques ou d'autres équations de conservation en fonction du système étudié. Dans le cas des fluides Newtoniens, c'est-à-dire pour les fluides dont les déformations sont proportionnelles aux contraintes via la viscosité constante, l'équation de conservation de la quantité de mouvement devient :

$$\rho \frac{D\vec{u}}{Dt} = -\vec{\nabla} p + \mu \Delta \vec{u} + \vec{F} \quad (1.9)$$

Ici le tenseur des contraintes visqueuses est relié de manière simple à la vitesse car il s'agit d'un cas particulier. L'équation (1.9) est appelée équation de Navier-Stokes.

Dans le cas d'un canal de section rectangulaire de largeur  $\omega$ , de hauteur  $h$  et de longueur  $L$  (très grande devant  $\omega$  et  $h$ ), si on considère le fluide comme incompressible et que l'on est dans le cas d'un écoulement permanent avec une vitesse d'écoulement selon  $x$ , alors on en déduit que :

$$\frac{dp}{dx} = \mu \left( \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right) \quad (1.10)$$

La pression varie longitudinalement et on peut introduire la perte de charge  $\Delta p$  pour une longueur  $L$  du canal :

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{p - p_0}{x - x_0} \rightarrow \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} = \frac{-\Delta p}{\mu L} \quad (1.11)$$

Or dans notre cas particulier et en négligeant les variations en  $y$ , on obtient pour la vitesse, en résolvant l'équation (1.11), le résultat de Poiseuille plan (1.12). En intégrant sur la section rectangulaire on trouve une relation entre le débit volumique  $Q$  et la perte de charge (1.13).

$$u = \frac{\Delta p h^2}{8\mu L} \left(1 - \frac{4z^2}{h^2}\right) \quad (1.12)$$

$$Q = \int_S u dy dz = \frac{\Delta p \omega h^3}{12\mu L} \quad (1.13)$$

Par analogie avec les circuits électriques on peut donc enfin définir la notion de résistance hydrodynamique/hydraulique en considérant que  $\Delta p = RQ \leftrightarrow U = Ri$ . Cette notion de résistance hydrodynamique sera réutilisée par la suite (cf. sections 2.2.4.1 et 3.2.2.2).

### 1.2.1.2 Nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds est un nombre sans dimension qui apporte une information sur la nature de l'écoulement, dans le cas d'un écoulement stationnaire avec un fluide incompressible caractérisé par une seule dimension spatiale. Il est obtenu en adimensionnant l'équation de Navier-Stokes (1.9). Ce nombre est défini dans l'équation (1.14) avec  $U$  la vitesse caractéristique du fluide ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $l$  la longueur caractéristique du système (m) et  $\nu$  la viscosité cinématique du fluide ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ).

$$Re = \frac{Ul}{\nu} \quad (1.14)$$

De manière générale en microfluidique, au vu des dimensions des canaux (de l'ordre de la dizaine à centaine de micromètres) et de la vitesse du fluide (ne dépassant pas le cm par seconde même à grande vitesse) le nombre de Reynolds est inférieur ou de l'ordre de 10. Plus la vitesse sera faible, le fluide visqueux et la dimension du système petite et plus le nombre de Reynolds sera faible. En fonction de la valeur du nombre de Reynolds on pourra considérer 3 écoulements différents. En ordre de grandeur on peut noter : pour  $Re < 2000$ , l'écoulement est laminaire ; pour  $Re > 4000$  l'écoulement est turbulent et pour  $2000 < Re < 4000$  l'écoulement est transitoire, il y a une fluctuation entre les régimes laminaire et turbulent. Ce nombre présente un aspect très important pour la compréhension du système des puces microfluidiques pour la cristallisation en général. C'est particulièrement à considérer dans le cas de cette thèse où un flux continu d'agent de cristallisation est appliqué au niveau d'une membrane de dialyse semi-perméable (voir 3.2). Nous ne sommes plus dans le cas de la dialyse classique permettant un échange en solution via le transport diffusif comme phénomène de transport prédominant. Dans notre cas la convection prend le pas sur la diffusion. Le nombre de Reynolds est en fait le rapport des ordres de grandeur de deux termes de l'équation de Navier-Stokes. Le rapport des termes de convection et de diffusion visqueuse dû au transfert de quantité de mouvement est présenté dans l'équation (1.15). Le

terme  $\rho(\vec{v} \cdot \vec{\nabla})\vec{v}$  se retrouve dans l'équation (1.9) en développant la dérivée particulaire comme décrit dans la partie précédente.

$$Re = \frac{\|\rho(\vec{v} \cdot \vec{\nabla})\vec{v}\|}{\|\eta\Delta\vec{v}\|} = \frac{\text{transport convectif}}{\text{transport diffusif}} \quad (1.15)$$

Si  $Re \ll 1$  l'écoulement est dit rampant ; si  $Re \gg 1$  l'écoulement est dirigé par l'inertie. Pour revenir à l'exemple de la dialyse sans mouvement, il n'y a pas de convection car aucun flux entrant ou sortant du réservoir n'est appliqué alors la diffusion domine. Dans le cas de la dialyse avec un flux, on pourrait avoir un écoulement rampant dominé par la diffusion si le flux appliqué est très faible ou un écoulement dominé par la convection au delà d'une certaine vitesse d'écoulement, dans ce cas le terme inertiel prend le pas sur le terme visqueux.

### 1.2.1.3 Mouillage

Le mouillage désigne la forme et le comportement que prend un liquide lorsqu'il est déposé ou lorsqu'on le fait s'écouler sur un solide. Ce phénomène peut être interprété comme l'effet de forces d'interactions intermoléculaires agissant entre chaque phase. Ces forces sont modélisées par la tension superficielle. A l'échelle microfluidique la mouillabilité d'un liquide, qui est sa capacité à occuper la plus grande surface possible sur un solide, joue un rôle très important pour comprendre les phénomènes d'adhésion aux surfaces. De plus, il est possible de contrôler un écoulement en modifiant la mouillabilité d'une surface par gradients de mouillabilité, gradients thermique, en utilisant des espèces réactives modifiant la mouillabilité, en utilisant des matériaux photosensibles activés par la lumière, en appliquant des différences de potentiels ou par diélectrophorèse [19].

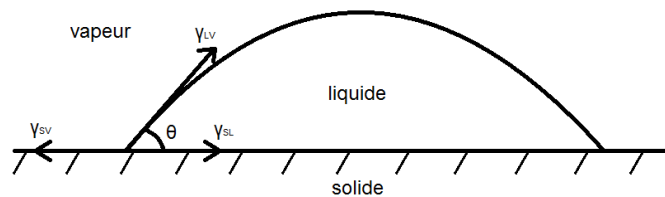


FIGURE 1.8 Goutte en équilibre sur une surface.

La Figure 1.8 montre une goutte en équilibre sur une surface avec  $\gamma_{SV}$  la tension de surface solide-vapeur,  $\gamma_{SL}$  la tension de surface solide-liquide et  $\gamma_{LV}$  la tension de surface liquide-vapeur. Ces différentes forces sont reliées dans l'équation d'Young (1.16).

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma_{LV} \cos(\theta_{eq}) = 0 \quad (1.16)$$

Avec  $\theta_{eq}$  l'angle de contact. Cet angle de contact est relié à la mouillabilité. Un faible angle de contact indique une bonne mouillabilité à la surface, la surface est alors hydrophile. Dans le cas d'un angle de contact élevé la surface est dite hydrophobe.

## 1.2.2 Systèmes développés pour la cristallisation des protéines

Depuis de nombreuses années, les avancées en microfluidique ont menées au développement d'outils adaptés à la cristallisation des protéines. Ces systèmes consistent généralement en la miniaturisation de techniques de cristallisation à macro-échelle vers des volumes inférieurs au  $\mu\text{L}$ . On retrouve toutes les techniques principales de cristallisation des protéines [20, 21]. Ici quelques systèmes microfluidiques seront présentés parmi les plus pertinents au regard du travail de thèse réalisé.

### 1.2.2.1 Batch

La technique du batch en microfluidique peut être réalisée via la formation de nanogouttes contenant le mélange de protéine et de tous les constituants de la solution de cristallisation [22–24]. Dans ce cas là, le mélange de la protéine, des précipitants, additifs et tampons est réalisé par injection périodique des composants dans un flux continu d'huile inerte. Finalement des gouttes de volume inférieur ou de quelques nL vont servir de petits cristallisoirs séparés permettant de réaliser de nombreuses conditions indépendantes. Il est aussi possible d'utiliser cette technique pour la cristallisation de petites molécules, de composés inorganiques en plus de la cristallisation de macromolécules biologiques [25].

Sur ce même principe il est possible de former des émulsions [26, 27] plutôt que de stocker les gouttes formées dans des canaux microfluidiques.

### 1.2.2.2 Libre diffusion à l'interface

La technique de la libre diffusion à l'interface est souvent comparée à la technique du batch de part le fait que la protéine et le précipitant sont mélangés l'un avec l'autre à la différence que le mélange se fera plus lentement et par diffusion pour la libre diffusion à l'interface. Ceci est d'autant plus valable dans le cas de la microfluidique où les volumes sont très réduits et où la comparaison est plus évidente.

Parmi les développements microfluidiques se basant sur la cristallisation par la libre diffusion à l'interface on peut noter le système développé par Hansen et al. [16] qui utilise une technologie de vannes contrôlées par la pression. Ce système est particulièrement bien adapté pour le criblage de conditions de cristallisation. Avec ce dispositif, la solution de protéine et la solution de cristallisation sont introduites séparément dans des puits reliés par un canal fermé par une micro-vanne. Lorsque cette vanne est ouverte la protéine et le précipitant sont libres de diffuser l'un vers l'autre.

On peut citer un autre système nommé le SlipChip [28] où les solutions de protéine et d'agent cristallisant sont déposées par pipetage dans de nombreux puits indépendants. Le



glissement d'une partie de la puce sur une autre permet la mise en contact des différents puits protéine-agent entre eux et ainsi la diffusion peut commencer.

### 1.2.2.3 Contre-diffusion

L'équipe de Claude Sauter a développé des systèmes microfluidiques basés sur la contre-diffusion. Un design particulier de puce est nécessaire, afin d'exploiter cette technique de cristallisation. On retrouve des puces comprenant de long canaux destinés à la solution de protéine d'un côté et des réservoirs contenant l'agent de cristallisation de l'autre [29]. Plus récemment, le ChipX [30] a été développé par la même équipe, permettant de réaliser 8 expériences en parallèle avec des canaux reliés en un point pour injecter la protéine dans tous les canaux simultanément. De plus ce système présente l'avantage de collecter des données RX *in situ* de par le choix des matériaux utilisés dans la confection du système microfluidique.

### 1.2.2.4 Diffusion de vapeur

L'équipe de Stephen Quake a développé un système combinant la libre diffusion à l'interface et la diffusion de vapeur d'eau à travers une membrane en PDMS [31].

Zheng et al. [32] ont eux aussi développé un système permettant la cristallisation par diffusion de vapeur d'eau à travers de l'huile. Leur système est compatible avec le batch et la diffusion de vapeur. Leur technique repose sur la génération de gouttes dans un capillaire. Ils génèrent des gouttes alternativement contenant la protéine en présence de sel à faible concentration suivi d'une goutte contenant du sel à haute concentration. L'eau située dans la goutte avec la protéine diffuse alors dans l'huile vers la goutte contenant la haute concentration en sel afin d'équilibrer les concentrations. Ainsi la sursaturation dans la goutte contenant la protéine augmente jusqu'à y induire la nucléation et la cristallisation.

### 1.2.2.5 Dialyse

L'intégration de membrane de dialyse dans un système microfluidique est particulièrement complexe. En effet le principal problème est lié à la difficulté d'intégrer une membrane sans générer de fuites à son interface. Plusieurs approches permettant de pallier ce problème et d'intégrer des membranes ont été décrites (cf. 2.2.1). Le système décrit ci-après concerne la cristallisation des protéines, toutefois de nombreux autres systèmes permettent d'intégrer des membranes de dialyse pour d'autres applications de la dialyse (cf. section 1.3). D'autres systèmes seront discutés ultérieurement dans la section 2.2.1.

Heymann et al. [33] ont développé un système microfluidique permettant la cristallisation par la méthode de la dialyse. Pour cela une membrane de dialyse est serrée contre plusieurs parties d'une puce tout en la fixant à l'aide d'une colle acrylique. Avec ce système, ils peuvent obtenir des cristaux dans des gouttes contenant la protéine encapsulée dans de l'huile. Ce dispositif est une amélioration d'un autre système précédemment développé dans leur laboratoire, le PhaseChip [34]. Dans cet autre système, également basé sur la dialyse,

seules les molécules d'eau et autres petites molécules sont capables de diffuser à travers une membrane en PDMS pour modifier la sursaturation dans la chambre de protéine.

### 1.2.2.6 Nucléation à l'échelle microfluidique

Ce paragraphe se base sur l'article de Kashchiev et al. [35]. La formation d'embryons menant à la formation de cristaux en solution a été présentée dans la section 1.1.2.1. La nucléation se caractérise aussi par un temps, qui présente un fort intérêt dans le cas des systèmes microfluidiques, c'est le temps d'induction  $t_i$ . Il représente le temps écoulé avant qu'une quantité suffisante de la nouvelle phase (cristalline) ne soit formée. Ce temps est caractéristique de la capacité d'un système donné à rester dans un équilibre métastable. Il est très bien décrit par Kashchiev et al. [35], qui en exprime une formule générale, équation (1.17).

$$t_i = \frac{1}{JV} + \left( \frac{\alpha}{a_n J G^{n-1}} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (1.17)$$

Avec  $\alpha = \frac{V}{V_m}$ , où  $V$  est le volume de la phase parente,  $V_m$  le plus petit volume microscopique détectable expérimentalement dans le cas d'un embryon qui croit en 3 dimensions,  $a_n$  est un facteur de forme numérique dépendant du type de croissance considéré (1D, 2D ou 3D) et  $n$  dépend aussi du type de croissance,  $G$  est le taux de croissance,  $J$  est la fréquence de nucléation en  $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  et est considérée constante.

Cette formule est le résultat de la somme de deux termes, le temps moyen d'induction par l'approche mononucléaire (terme de gauche) et par l'approche polynucléaire (terme de droite). Le terme de droite est indépendant de  $V$  contrairement au terme de gauche. L'approche mononucléaire considère que le premier *nucleus* qui apparaît est l'événement qui amène le système hors de son équilibre métastable. L'approche polynucléaire repose sur la considération que la formation d'un grand nombre statistique de *nuclei* et leur croissance à des tailles détectables sont responsables de la rupture de l'équilibre métastable. Chacun de ces deux mécanismes est valable néanmoins, dans les mêmes conditions, le mécanisme mononucléaire sera adapté aux petits volumes tandis que le mécanisme polynucléaire sera, par opposition, adapté aux volumes plus importants. Ainsi Kashchiev et al. [35] présente une application numérique qui délimite approximativement l'usage du terme de gauche et indique que l'approche mononucléaire ne sera satisfaite expérimentalement que pour  $V \ll 10 \text{ mm}^3$  soit  $10 \mu\text{L}$  (dans un cas particulier qui donne un ordre de grandeur). Dans ce cas, l'équation (1.17) se réduit à l'équation (1.18).

$$t_i = \frac{1}{JV} \quad (1.18)$$

En microfluidique les volumes sont restreints, ainsi plus la miniaturisation du système est importante, plus le temps d'induction est élevé comme le montre la dépendance de  $t_i$  en

$\frac{1}{V}$ . Or la fréquence de nucléation est dépendante de la sursaturation, donc pour que le temps d'induction soit faible, et donc pour observer la nucléation, dans un système microfluidique, il est nécessaire d'atteindre des sursaturations élevées. Dans le cas de la dialyse, même lorsque les concentrations de part et d'autre de la membrane sont à l'équilibre, le temps d'induction est un facteur important dont il faut tenir compte avant de changer de condition de cristallisation.

## 1.3 Aperçu des membranes de dialyse

L'élément principal qui diffère entre la méthode de la dialyse par rapport aux autres techniques de cristallisation est la présence d'une membrane semi-perméable séparant le compartiment de protéine du réservoir contenant la solution de cristallisation. Dans cette section le principe de fonctionnement de ces membranes semi-perméables et leurs applications sera discuté. Finalement puisque nos systèmes fluidiques combinent certains éléments de la dialyse et d'autres de la filtration, un aparté sur la filtration sera fait. Cette section est principalement basée sur un livre de Koller [36].

### 1.3.1 Description

La composition des membranes semi-perméables dépend de leur provenance naturelle ou artificielle, on retrouve ainsi, les membranes inorganiques, organiques ou mixtes. Le transport des espèces à travers la membrane se fait par diffusion ou par convection en fonction de la technique utilisée pour le processus de séparation. Il existe 4 groupes de membranes synthétiques (non biologiques) :

- les membranes microporeuses et membranes denses permettent la sélection de molécules par rapport à la taille de leur pore. Ainsi une molécule dont la taille est inférieure aux dimensions des pores de la membrane peut la traverser par diffusion tandis qu'une molécule de taille supérieure est retenue. Les membranes microporeuses sont des matrices rigides tandis que les membranes denses sont constituées d'un ensemble de polymères à haute densité. Ainsi la diffusion au travers du matériau nécessite la solubilisation préliminaire des particules dans le matériau pour ensuite diffuser au travers.

- les membranes homogènes et composites (hétérogènes). Les membranes homogènes sont composées d'un seul matériau pouvant être un polymère ou un matériau inorganique. Elles peuvent être denses ou microporeuses. Alors que les membranes composites sont composées de deux couches de polymères différents, la couche dense et poreuse.

- les membranes ioniques sont homogènes et localement chargées. On retrouve donc les membranes positives portant des fragments cationiques et les négatives qui portent des fragments anioniques, et amphotères. En appliquant une différence de potentiel à la membrane, seuls les ions dont la charge est opposée à la membrane diffusent et les autres sont repoussés. Les membranes amphotères laissent passer les cations et les anions.

- les membranes anisotropes, ou autrement nommées asymétriques, sont composées d'un film très fin, sélectif, déposé sur un support macroporeux résistant à des hautes pressions pour la tenue mécanique.

Pour chaque membrane une combinaison des différentes catégories décrites ci-dessus est envisageable. Dans le cadre de la dialyse nous utilisons des membranes en cellulose régénérée qui sont symétriques, homogènes microporeuses. Elles sont opaques et souples et possèdent une grande gamme de compatibilité à de nombreux produits chimiques. Les propriétés de ces différents produits sont décrits par le fabricant (SpectrumLabs). La sélectivité de la membrane est choisie en fonction de son seuil de rétention (ou de coupure) exprimé en Dalton. Dans notre cas nous utilisons des seuils de rétention de 3,5 kDa, 6-8 kDa et 12-14 kDa en fonction de la protéine utilisée. Ces seuils de rétention sont définis par le fabricant comme le temps au bout duquel une molécule de poids moléculaire égal au seuil de rétention est retenue à 90 % par la membrane après 17 heures.

### 1.3.2 Apparté sur la filtration

La dialyse est une méthode de séparation qui implique la diffusion d'un soluté à travers une membrane sous l'action d'un gradient de concentration de chaque côté de la membrane. C'est un processus lent où la maximisation de la surface de la membrane permet des échanges plus rapides. La dialyse est très utilisée en biochimie, biologie mais est finalement très peu utilisée en chimie.

La théorie du transport passif de solution à travers les membranes de dialyse est connue bien que de nombreux modèles existent [37]. Un paramètre d'intérêt pouvant être utilisé pour caractériser la diffusion est le temps de demi-échappement qui a déjà été utilisé dans d'autres études [38, 39]. Ce temps est relié au coefficient de perméabilité  $P_m$  en  $\text{cm h}^{-1}$ . Il est décrit dans l'équation (1.19).

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2}\right)P_m A_m} \quad (1.19)$$

Avec  $V_1$  et  $V_2$  les volumes des deux compartiments fermés,  $A_m$  l'aire totale de la membrane. Ce temps sera réutilisé par la suite.

D'autres procédés membranaires existent dont, la microfiltration, l'ultrafiltration, la nano-filtration, l'osmose inverse et l'électrodialyse. En filtration les espèces chimiques diffusent à travers la membrane suite à l'application d'une pression qui induit un écoulement par convection. C'est donc le gradient de pression qui gouverne la séparation des molécules. Dans le cas de l'électrodialyse, le procédé permet la séparation des ions en solution suite à la migration à travers une membrane par l'effet d'un champ électrique. La microfiltration est davantage utilisée pour séparer ou concentrer des particules en suspension et concerne des membranes avec des tailles de pore de l'ordre de 0,1 à 20  $\mu\text{m}$ . L'ultrafiltration est utilisé pour

la séparation ou concentration de molécules à haut poids moléculaire telles que les protéines par exemple. Les seuils de rétention pour l'ultrafiltration sont de l'ordre de 5 à 100 nm. La nanofiltration peut servir à séparer des sels de l'eau, ainsi la taille des pores est de l'ordre du nanomètre. Enfin l'osmose inverse consiste à forcer le passage d'eau d'un compartiment plus concentré en soluté vers un compartiment moins concentré pour séparer l'eau des autres espèces dissoutes en solution par l'application d'une pression. Il est à noter que la pression appliquée est de plus en plus élevée pour les différents processus décrit ici respectivement de quelques bars pour la microfiltration jusqu'à 100 bar pour l'osmose inverse.

# Chapitre 2

## Développements instrumentaux et méthodologiques

### 2.1 Banc de Cristallisation

#### 2.1.1 Présentation

Dans cette section je présente un banc de cristallisation développé précédemment au laboratoire [40] ainsi que les nouveaux développements et modifications apportées afin d'améliorer le fonctionnement de ce dernier. Le banc de cristallisation, visible sur la Figure 2.1, permet la cristallisation de macromolécules biologiques par la méthode de la dialyse. Il comporte une caméra montée sur un microscope optique inversé avec zoom, un système de 3 DEL (diodes électroluminescentes) pour l'illumination de la chambre de dialyse, des modules Peltier pour réguler la température, un circuit fermé d'eau froide pour dissiper la chaleur des modules Peltier, un système d'air sec pour empêcher la condensation, et un contrôleur de flux basé sur la pression pour injecter des liquides dans un réservoir. Le réservoir est la partie haute d'un dispositif de dialyse, destiné à recevoir la solution de cristallisation, comprenant une chambre de dialyse dans laquelle la solution de protéine est séparée du réservoir par l'intermédiaire d'une membrane semi-perméable. La température de l'expérience est contrôlée précisément par un système de contrôle électronique permettant d'envisager l'exploration du diagramme de phase en température de la protéine à cristalliser. De plus l'instrument permet d'échanger la condition de cristallisation au cours d'une expérience de dialyse par le biais du réservoir en flux continu.

Ce système fluide est inséré dans un support en laiton assurant le bon contact thermique avec les éléments Peltier, est composé d'une chambre de dialyse en acier inoxydable de 15  $\mu$ L sur laquelle se trouve une sur-chambre où une membrane de dialyse est maintenue par un anneau élastique. L'ensemble "chambre + sur-chambre" est maintenu en contact et le tout est surmonté d'un réservoir de dialyse contenant environ 1,5 mL d'agent de cristallisation. Le réservoir est refermé à l'aide d'un bouchon équipé d'une fenêtre optique pour permettre

l'éclairage de l'intérieur de la chambre de dialyse. Le bouchon comprend aussi deux entrées pour un fluide, une pour l'injection de l'agent de cristallisation et une pour la sortie de l'agent.

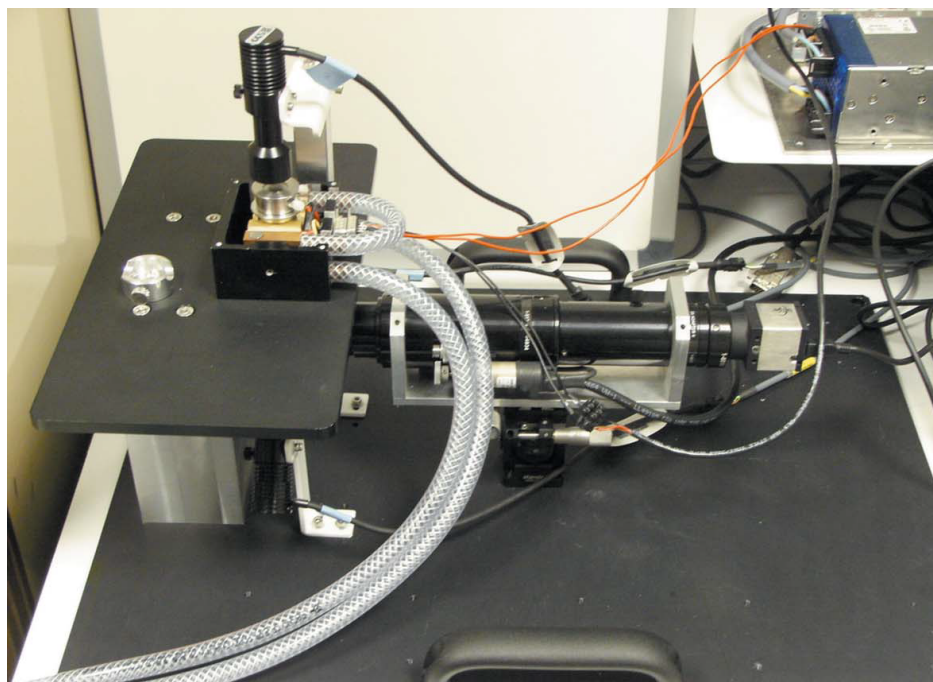


FIGURE 2.1 Photographie du banc de cristallisation.

### 2.1.2 Electronique et programmation

Une problématique majeure du banc de cristallisation concerne l'automatisation et la possibilité de travailler avec un logiciel simple d'utilisation avec une interface conviviale. Pour ces raisons, nous avons développé un logiciel sous LabVIEW (<http://ni.com/labview/>). Les objectifs concernant l'électronique et la programmation sont les suivants :

- minimiser la taille de l'électronique nécessaire au contrôle de toutes les parties du banc.
- interfacier une caméra, contrôler le zoom, les lumières, préparer le mélange de solutions, contrôler l'injection en flux continu du mélange, enregistrer des images à intervalles de temps fixes, effectuer des mesures sur les cristaux...
- développer un logiciel clair, facilement modifiable sous une seule et même interface.
- Diminuer le nombre de tâches non contrôlées. Par exemple, avant mon arrivée en thèse, la base du logiciel avait déjà été commencée et il existait déjà une régulation permettant de contrôler la température de modules Peltier pour effectuer une expérience de cristallisation. Cependant cette régulation était une régulation externe réalisée à l'aide d'une carte PR-59 développée par Laird Technologies. Ce type de carte possède sa propre gestion interne et nécessite l'utilisation d'une thermistance particulière très fragile. Cela diminue la versatilité de l'instrument et les possibilités d'extensions futures. L'utilisation de plusieurs sondes placées aux points cruciaux pour effectuer une moyennation des températures ou simplement le placement de sondes plus résistantes telles que des thermocouples était alors proscrite.



### 2.1.2.1 Logiciel

Le logiciel a été développé sous LabVIEW et comporte plusieurs interfaces graphiques, qui sont des sous-VI (virtual instrument), que nous appellerons vues ou interfaces par la suite : accueil, paramétrage, essai, maintenance. La vue la plus utilisée à l'heure actuelle et qui permet de contrôler un maximum de paramètres est la vue maintenance. Sur les Figures 2.2 et 2.3 sont présentées plusieurs captures d'écran du logiciel. A l'ouverture du logiciel, l'accueil qui comporte des boutons pour naviguer vers les autres vues s'affiche. L'interface "paramétrage" a pour but de définir un scénario d'expérience qui peut être exécuté de façon automatique dans la vue essai. Il est possible de définir par exemple une température de début d'expérience, une température de fin différente, et de choisir le temps pour effectuer les rampes de température. Enfin la dernière vue est l'interface "maintenance". Nous nous attarderons davantage sur cette interface car elle permet à l'utilisateur de contrôler beaucoup plus de paramètres que les deux vues précédemment citées. En effet, à terme, cette vue ne servira qu'à la maintenance du logiciel, d'où son appellation. Si au cours d'une expérience réalisée dans une autre vue un problème technique est rencontré, le débogage et le contrôle des instruments est réalisé grâce à la vue maintenance. Cependant comme certaines parties du banc de cristallisation sont en cours de modification, la vue permettant un contrôle plus efficace de tous les paramètres de l'expérience est la vue maintenance.

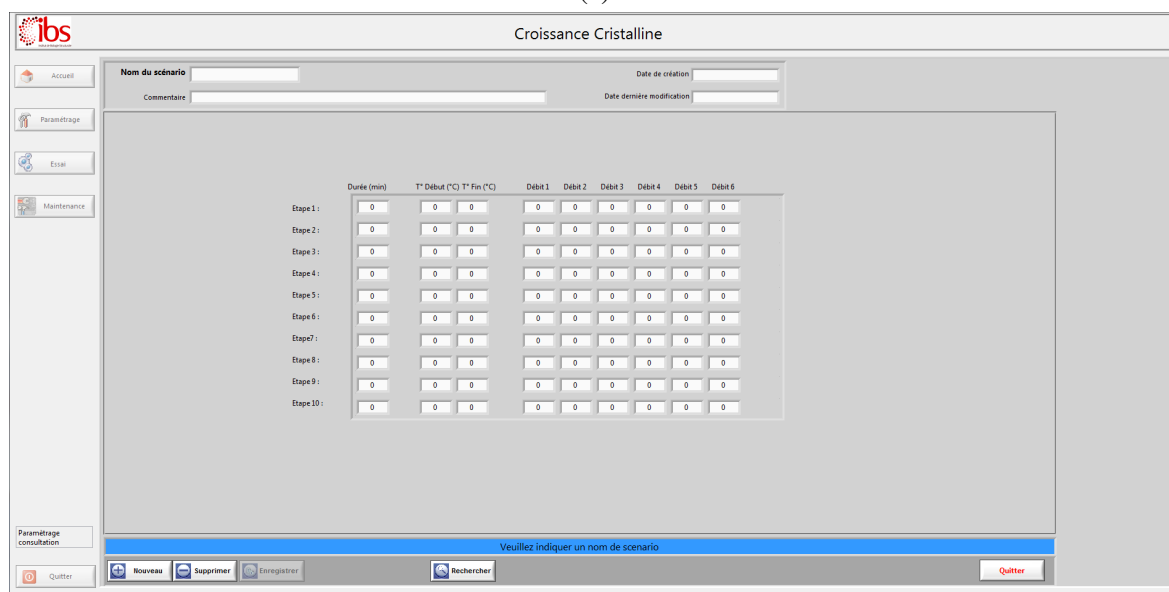
La vue maintenance contient une partie permettant de contrôler et suivre la température de la cellule de dialyse. On y retrouve un graphique représentant la température de consigne et la température actuelle de la cellule de dialyse. Il est possible de modifier les paramètres du PID (Proportionnel Intégrateur Dérivateur) qui est utilisé pour asservir la température. On peut aussi y modifier la limite de puissance en sortie de l'alimentation qui gère les modules Peltier. De même on y retrouve une partie liée à la visualisation des cristaux. Pour une vidéo de l'intérieur de la chambre de dialyse avec 25 images par secondes environ est intégrée à la vue. Il est possible d'utiliser différents outils pour tracer des lignes, rectangles ou polygones sur cette vidéo afin de donner des informations concernant la taille des cristaux à un zoom donné. Deux boutons situés au-dessus de la vidéo permettent de zoomer dans la cellule de dialyse. Sur la droite, l'utilisateur peut rentrer les paramètres de son expérience, à savoir, le nom et les caractéristiques physico-chimiques de la protéine, le seuil de coupure de la membrane de dialyse utilisée, la date, les conditions de cristallisation etc... L'utilisateur peut alors enregistrer des images avec un nombre d'images par unité de temps choisi. Pour cela il doit rentrer un nom de dossier et d'image qui sont créés lors de la capture de la première image. Chaque image enregistrée contient dans son nom la date et l'heure à laquelle elle a été prise. De plus un fichier texte est créé au moment où la première image est capturée et il contient les informations renseignées sur l'expérience, le nom de chaque image accompagné de la température actuelle de la cellule de dialyse. Sur la partie basse de l'interface se trouve, à gauche, le spectre l'intensité lumineuse traversant l'échantillon de protéine à différentes longueurs d'ondes récupéré par un spectromètre. La concentration des solutions stocks et



de la solution à préparer pour réaliser l'expérience de cristallisation peuvent finalement être renseignés dans la partie "pompe" sous la vidéo.



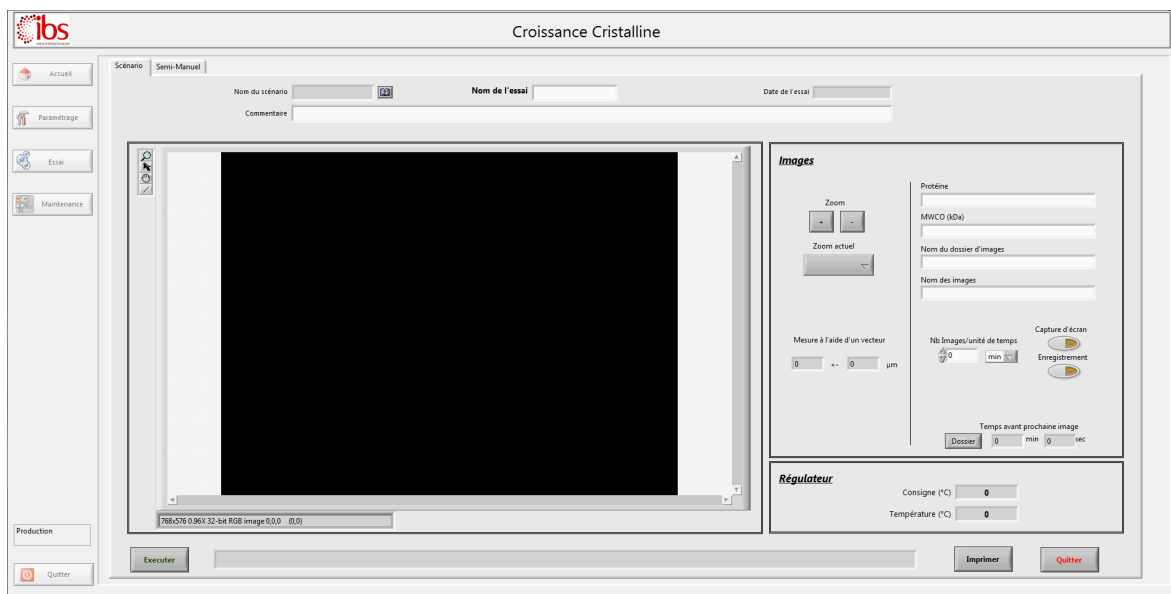
(a)



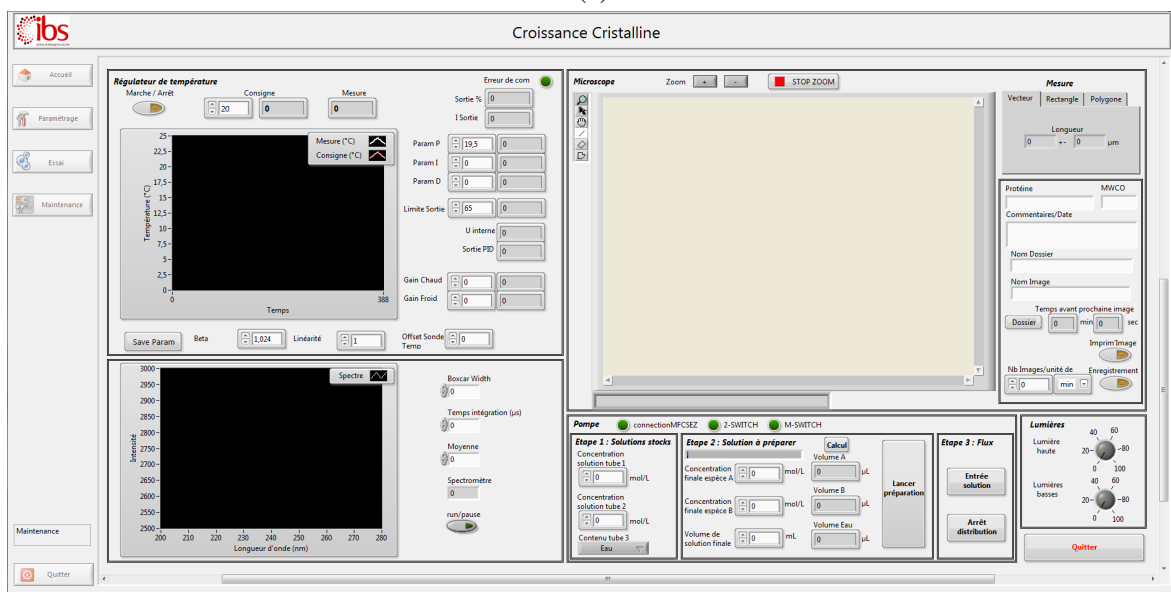
(b)

FIGURE 2.2 Différentes vues du logiciel. (a) Accueil principal lors de l'ouverture du logiciel. (b) Vue paramétrage pour la création de scénario.

Une fois le mélange de cristallisation effectué selon la procédure décrite dans la publication sur l'instrument (section 2.1.2.3) un bouton permettant l'injection de la solution dans le réservoir de dialyse à une pression fixe lui permet de fonctionner en flux continu. Si le système de préparation de la solution de cristallisation à partir des solutions stocks n'est pas utilisé, par exemple dans le cas où il y aurait plus de 3 solutions à mélanger, il est possible de placer une solution de cristallisation préparée au préalable directement dans le tube servant à



(a)



(b)

FIGURE 2.3 Différentes vues du logiciel. (a) Vue essai pour l'exécution des scénarios. (b) Vue maintenance pour contrôler tous les paramètres de l'expérience.

injecter la solution. Enfin tout en bas à droite se trouve le contrôle de l'intensité lumineuse pour visualiser l'intérieur de la chambre de dialyse.

Le cheminement du code réalisé sous LabVIEW est sous-divisé en trois phases, l'initialisation de tous les instruments qui implique la communication avec l'appareillage et la réinitialisation de certains paramètres dans le cas où le logiciel aurait subi une fermeture brusque. Plusieurs boucles "while" sont mises en parallèle et permettent de réaliser très simplement du multitâche (multithreading). Elles permettent notamment de garder le nombre d'images par seconde de la caméra suffisamment élevé et d'arrêter le moteur pas-à-pas du zoom quasi-instantanément en cas de butée en fin de course. Puisque chaque boucle a sa cadence propre, chaque sous tâche peut être réalisée indépendamment et sans ralentir les autres tâches en cours comme par exemple la vitesse d'exécution de la régulation PID. Ce qui ne serait pas le cas si toutes les tâches étaient regroupées dans une même boucle.

### 2.1.2.2 Appareillage et électronique

Dans un but d'uniformisation et de miniaturisation de l'électronique nous avons opté pour une solution d'automatisation *via* l'utilisation de cartes d'entrées/sorties en fonction de l'usage. Sur la Figure 2.4 est représenté l'ensemble des cartes électroniques WAGO nécessaire pour contrôler une partie des éléments du banc de cristallisation. La première carte est un coupleur de bus de terrain Ethernet comportant un connecteur RJ-45 et permet de connecter d'autres cartes (ou modules) WAGO au réseau Ethernet. Le coupleur reconnaît automatiquement toutes les bornes d'entrées/sorties et crée une table image correspondant aux entrées/sorties consultable *via* une page web dédiée. Les modules peuvent être aussi bien des modules analogiques que digitaux. La communication de données par le bus de terrain se fait *via* MODBUS sur TCP/IP. Enfin le coupleur est alimenté *via* une alimentation à découpage de 60 W, 24 V DC, 2,5 A vendue par RS. La seconde carte est une borne d'alimentation de puissance qui alimente les bornes suivantes *via* les contacts de puissance de la carte. Cette carte est alimentée par la même alimentation RS précédemment décrite. Elle sert aussi à fournir la tension nécessaire à un convertisseur 24 V DC - 5 V DC utilisé par la suite (à droite sur la photo). La troisième carte est un contrôleur de moteur pas à pas 24 V/1,5 A utilisée pour contrôler le moteur du zoom situé sur le microscope. Une petite fenêtre composée de plusieurs DEL permet d'attester du fonctionnement de la carte et d'éventuelles erreurs. Les quatrième, cinquième et sixième cartes sont des bornes d'entrées analogiques à 2 canaux pour connecter 2 thermocouples de type K, S, T, J, E, ou L par module. Dans la configuration présentée sur la Figure 2.4 seule la première carte est utilisée avec un thermocouple J branché. La septième carte est à nouveau une borne d'alimentation alimentée en 5 V grâce au convertisseur précédemment cité. La huitième carte est une borne d'entrées digitales à 4 canaux 5 V DC raccordée aux limites de fin de course du zoom et permet d'indiquer l'arrivée en limite du zoom grâce à des capteurs à effet Hall. La neuvième carte est une borne de sorties analogiques à 2 canaux 0-10 V utilisée pour contrôler l'intensité lumineuse des lampes. Le contrôleur est placé en mode "remote", un connecteur 9 broches

(sub-D) est branché à l'arrière de l'appareil et relié à la carte WAGO. Enfin la dixième carte est la borne finale de bus servant de terminaison du bus interne et garantissant une circulation correcte des données. Elle est donc toujours nécessaire.

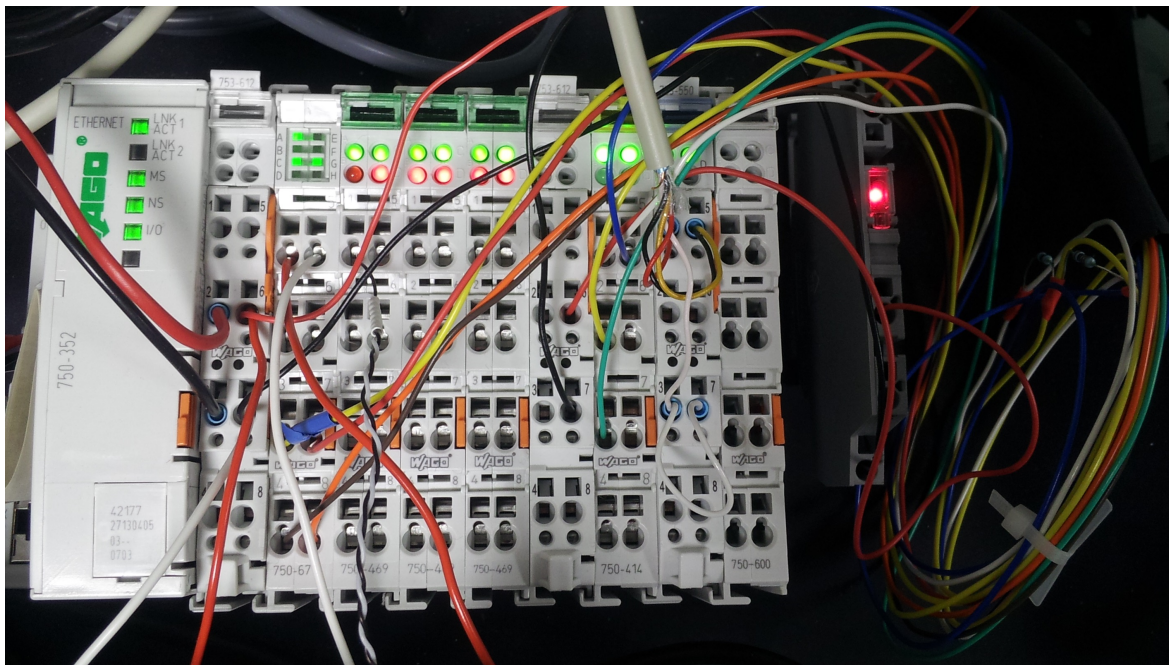


FIGURE 2.4 Système de cartes WAGO pour gérer différentes parties du banc.

Cependant, il n'est pas possible de connecter tout l'appareillage *via* les automates WAGO. Ci-après sont présentés les autres instruments indépendants utilisés pour l'automatisation du banc.

L'alimentation des modules Peltier (surface active 40x40 mm ; 62,3 W ; 5 A ; 20 V) est gérée directement *via* une régulation PID intégrée à LabVIEW. Un contrôleur de température PR-59 développé par Laird Technologies est connecté au PC *via* une connexion série en RS-232. La régulation interne à LabVIEW a été préférée à l'utilisation du PID intégré au contrôleur de température. Ce dernier a donc été utilisé dans le mode "power". Ce mode permet de gérer la puissance de sortie du régulateur de -100 à +100 % selon la valeur calculée dans notre logiciel. Cette valeur est ajustée en temps réel par comparaison de la température de consigne à la température réelle par l'intermédiaire de la régulation PID. Le régulateur permet de délivrer des puissances allant jusqu'à 900 W donc bien au-delà de nos besoins.

La caméra est montée sur le microscope inversé Optique Peter avec Zoom 6000/12X motorisé de Navitar. La caméra est une caméra UEye de la marque IDS. Elle est connectée par USB à l'ordinateur et gérée simplement grâce au VI express Vision Acquisition intégré à LabVIEW. Toutes les informations nécessaires à l'acquisition ainsi que l'image peuvent donc être facilement récupérées. Le taux de rafraîchissement de l'image est dépendant de l'organisation du code LabVIEW.

Il est aussi nécessaire de maintenir une température constante sur une des faces des modules Peltier. Pour cela un circulateur d'eau froide Julabo FL-601 est utilisé et fonctionne de manière autonome.

Enfin 3 autres instruments sont utilisés dans le processus fluide gérant le transport des solutions. Le MFCS-EZ contrôle le flux basé sur la pression, la FRP est une plate-forme pour débitmètre et l'ESS est une plate-forme permettant de gérer des interrupteurs/échangeurs fluidiques. Ces trois instruments sont développés par Fluigent. Ils sont utilisés pour mélanger les solutions stocks de cristallisation puis pour injecter la solution ainsi préparée dans le réservoir du banc de cristallisation. La description du système de mélange des solutions proposé se trouve dans la publication ci-après 2.1.2.3.

### **2.1.2.3 Publication sur l'instrument**



# A crystallization apparatus for temperature-controlled flow-cell dialysis with real-time visualization

Niels Junius,<sup>a,b,c</sup> Esko Oksanen,<sup>a,b,c</sup> ‡ Maxime Terrien,<sup>a,b,c</sup> § Christophe Berzin,<sup>a,b,c</sup> Jean-Luc Ferrer<sup>a,b,c</sup> and Monika Budayova-Spano<sup>a,b,c,\*</sup>

Received 14 December 2015  
Accepted 16 March 2016

<sup>a</sup>Université Grenoble Alpes, IBS, F-38044 Grenoble, France, <sup>b</sup>CNRS, IBS, F-38044 Grenoble, France, and <sup>c</sup>CEA, IBS, F-38044 Grenoble, France. \*Correspondence e-mail: monika.spano@ibs.fr

Edited by F. Meilleur, Oak Ridge National Laboratory, USA, and North Carolina State University, USA

‡ Present address: European Spallation Source, Lund, Sweden.

§ Present address: Laboratory of Pulp and Paper Science and Graphic Arts, Grenoble INP – Pagora, France.

**Keywords:** optimization of crystal growth; phase diagrams; dialysis; temperature control; macromolecular crystallography.

Many instrumentation developments in crystallization have concentrated on massive parallelization assays and reduction of sample volume per experiment to find initial crystallization conditions. Yet improving the size and diffraction quality of the crystals for diffraction studies often requires decoupling of crystal nucleation and growth. This in turn requires the control of variables such as precipitant and protein concentration, equilibration rate, and temperature, which are all difficult parameters to control in the existing setups. The success of the temperature-controlled batch method, originally developed to grow very large crystals for neutron crystallography, demonstrated that the rational optimization of crystal growth has potential in structural biology. A temperature-controlled dialysis button has been developed for our previous device, and a prototype of an integrated apparatus for the rational optimization of crystal growth by mapping and manipulating temperature–precipitant concentration phase diagrams has been constructed. The presented approach differs from the current paradigm, since it involves serial instead of parallel experiments, exploring multiple crystallization conditions with the same protein sample. The sample is not consumed in the experiment and the conditions can be changed in a reversible fashion, using dialysis with a flowing precipitant reservoir as well as precise temperature control. The control software allows visualization of the crystals, as well as control of the temperature and composition of the crystallization solution. The rational crystallization optimization strategies presented here allow tailoring of crystal size, morphology and diffraction quality, significantly reducing the time, effort and amount of expensive protein material required for structure determination.

## 1. Introduction

In X-ray protein crystallography, obtaining crystals of a protein is a delicate step, but it is considerably more laborious to improve these crystals up to a sufficient size and quality for diffraction. The availability of powerful radiation sources, fast detectors and cryocooling techniques has not removed the need for larger and better ordered crystals. Recording data from very small crystals requires significantly longer measurement times and, because of radiation damage, dozens (even hundreds) of crystals may be required in order to collect a complete set of data. The quality of data obtained is often lower than it could be with larger crystals, which may be crucial in experimental phasing, for example (Rice *et al.*, 2000).

Furthermore, a major challenge in fast (sub-millisecond) time-resolved X-ray crystallography where the reaction is initiated by light is the uniform initiation across the whole crystal volume (Levantino *et al.*, 2015). Varying activation fractions across a crystal, or a crystal population in serial



OPEN  ACCESS



femtosecond crystallography, makes accurate downstream scaling and data analysis to examine the time-dependent changes extremely difficult. One way to obtain more even photoexcitation is to have a very uniform population of crystals (in terms of size and morphology); the optimal crystal size for maximum scattering and maximum laser light penetration is  $\sim 10\text{--}20\ \mu\text{m}$ .

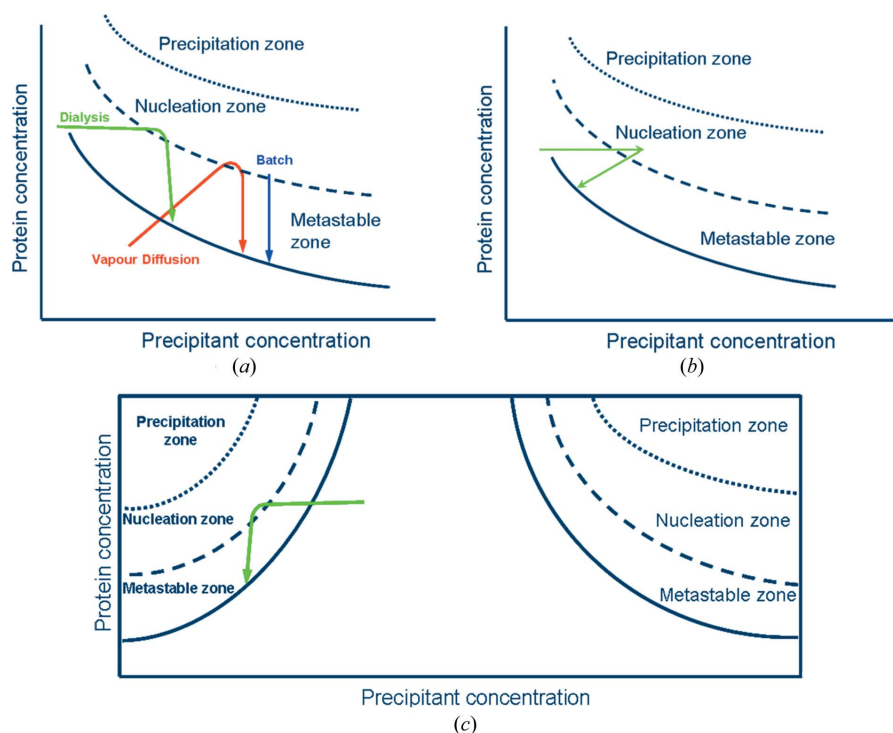
In neutron macromolecular crystallography where the available neutron sources are weak, compared to X-ray sources, the crystal volume required for a neutron data set is most often the factor limiting the more widespread use of this technique. If normal hydrogenated proteins are used, a minimum crystal size of at least  $1\ \text{mm}^3$  is necessary. If perdeuterated proteins are used the minimum crystal size can be as 'little' as approximately  $0.15\ \text{mm}^3$  (Blakeley, 2009). However, even with these large crystals, a single neutron diffraction data set can take several days or weeks to collect. For neutron crystallography to become more accessible to the structural biology community, the ability to control crystal size must become routine. This is particularly important in order to push the limits of neutron crystallography towards more challenging targets such as membrane proteins. Despite the knowledge gained in crystallization of model systems (Asherie, 2004; Vekilov, 2005), the principles are often difficult to implement in practice. Many proteins are not readily available in large quantities, which has driven crystallization methods towards small sample volumes often using vapour

diffusion. One disadvantage of these methods is that the level of supersaturation is difficult to control effectively, especially as a function of time. Novel devices (Talreja *et al.*, 2010; Boudjemline *et al.*, 2011; Pusey, 2011; Meyer *et al.*, 2012; Abdallah *et al.*, 2013) have attempted to address this issue with somewhat different strategies, such as controlling the vapour pressure externally or using (micro)fluidics, dual polarization interferometry or fluorescence-based approaches.

Temperature control and dialysis are powerful tools for the separation of nucleation and growth. Dialysis allows the separation of molecules according to their size by a semi-permeable membrane whose pores are smaller than the macromolecular dimensions. These pores allow small molecules, such as the solvent, salts and small metabolites, to diffuse through the membrane but block the passage of larger molecules.

Dialysis as a crystallization technique involves diffusion and equilibration of precipitant molecules through a semi-permeable membrane as a means of slowly approaching the concentration at which the protein crystallizes (Fig. 1*a*). Initially, the protein solution is contained within the dialysis chamber, which is then equilibrated against a precipitant solution through the semi-permeable membrane. Equilibration against the precipitant in the surrounding solvent slowly achieves supersaturation for the protein within the dialysis chamber, eventually resulting in crystallization. The precipitating solution can also be varied, simply by removing the

initial precipitant solution and exchanging it with another (Fig. 1*b*). The protein material can thus be reused until the correct conditions for nucleation and crystal growth are found. Dialysis can also be used to exploit the salting-in region of the phase diagram where solubility increases with increasing precipitant concentration (Fig. 1*c*). Specifically, for a charge-neutral species (*i.e.* proteins at their pI) the salting-in effect dominates initially (protein solubility increases) and the addition of salts disrupts attractive protein–protein interactions. Then, further increase in (kosmotropic) salt concentration results in strengthening attractive protein–protein interactions as the salting-out effect begins to dominate (protein solubility decreases). The surface charge density of a protein could also dramatically change the above behaviour. At a pH close to the pI or for a large-size protein with a small number of either positive or negative net charges, where the surface charge density is low, only the monotonic salting-in behaviour could be observed because the charge neutralization



**Figure 1**

Schematic view of a phase diagram as a function of the concentration of precipitant, with the kinetic trajectories illustrated by arrows in the case of different dialysis crystallization modes: (a) comparison between vapour diffusion (red), batch (blue) and dialysis (green) salting-out experiments, (b) dialysis by changing the concentration of the precipitant during the crystallization experiment, and (c) a dialysis salting-in crystallization experiment (desalting) where the trajectory is in a different part of the phase diagram.

Table 1

Summary of the diffraction characterization of lysozyme crystals grown by hanging drop vapour diffusion and the temperature controlled dialysis method.

Crystallization method	Hanging drop	Hanging drop	Hanging drop	Dialysis	Dialysis	Dialysis
NaCl ( <i>M</i> )	0.9	0.9	0.75	0.9	0.75	0.75
Largest dimension (μm)	200	100	300	200	300	100
Resolution† (Å)	50–1.36 (1.44–1.36)	50–1.30 (1.38–1.30)	50–1.32 (1.40–1.32)	50–1.25 (1.33–1.25)	50–1.16 (1.23–1.16)	50–1.15 (1.22–1.15)
Mosaicity (°)	0.332	0.235	0.328	0.220	0.128	0.136
<i>I</i> /σ( <i>I</i> )†	27.19 (2.04)	25.33 (2.12)	20.30 (2.11)	25.28 (2.05)	29.19 (2.24)	25.40 (2.02)
CC(1/2)‡	100.0 (73.0)	100.0 (81.8)	100.0 (75.2)	100.0 (78.8)	100.0 (78.4)	100.0 (69.8)

† Highest resolution shell in parentheses. ‡ Karplus & Diederichs (2012).

process is less dramatic. On the other hand, when a protein has high surface charge density owing to either a small size or a large number of positive charges, the anions might not completely neutralize the positive charges even at molar concentration and therefore only a decrease in protein solubility can occur (Zhang, 2012). Accordingly, in the salting-in region the protein can be crystallized by lowering the precipitant concentration and forcing the protein out of solution (Fig. 1c). Finally, dialysis allows the supersaturation to be varied in a reversible manner, so that crystals can be grown and dissolved as long as no irreversible precipitation or denaturation occurs.

Temperature is another useful variable in crystallization of biological macromolecules (Budayova-Spano *et al.*, 2007; Astier & Veessler, 2008; Leng & Salmon, 2009; Selimović *et al.*, 2010). Using precise temperature makes it possible to control the supersaturation reversibly. The full potential of temperature as a crystallization variable is often not realized as it is difficult to control precisely in typical crystallization setups.

We have previously developed an instrument for temperature-controlled batch crystallization (Budayova-Spano *et al.*, 2007), intended specifically for neutron protein crystallography. This instrument allowed the rational optimization of large crystal growth based on a phase diagram, although in many cases an explicit measurement of the solubility curve is actually not necessary.

We describe here a succession of evolutions of the previous instrument. Firstly, we have developed a temperature-controlled dialysis button: a modification to the existing device (Budayova-Spano *et al.*, 2007) that enables a temperature-controlled dialysis crystallization experiment. Secondly, we describe a new crystal growth apparatus with a temperature-controlled dialysis setup. It combines accurate temperature control with control of the composition of the crystallization solution (*e.g.* precipitant concentration, pH, additive) in an automated manner (Budayova-Spano, 2010). The apparatus described here allows sophisticated experiments to be performed, including systematic phase diagram investigation in multi-dimensional space using far less protein material than previously.

## 2. Methods

### 2.1. Crystallization

Chicken egg-white lysozyme was purchased from Sigma Aldrich as a lyophilized powder, dissolved in distilled water

and filtered to obtain a solution with a final concentration of about 30 mg ml<sup>-1</sup>. Atk1, a kinase from *Agrobacterium tumefaciens* (F. Borel, S. Richard, F. Pojer, L. Jacquamet, T. Baiga, J. A. Ramsey, A. Iannello, M. Bowman, J. P. Noel & J.-L. Ferrer, unpublished data), was used with a final concentration of about 10 mg ml<sup>-1</sup>. The protein concentration was measured *via* the UV absorbance at 280 nm. All solutions were filtered through 0.22 μm Millipore filters. The cellulose membranes used in our experiments were the standard RC membrane Spectra/Por (<http://www.spectrumlabs.com/>) with a molecular weight cutoff of 6–8 kDa. Before the start of the experiment, the crystallization mixtures were centrifuged and filtered to remove all solid particles (precipitate, dust or nuclei).

Crystallization condition for dialysis experiment in the case of lysozyme: 15 μl of protein solution was placed in the crystallization chamber of the temperature-controlled flowing dialysis setup. The initial conditions of the reservoir solution were 0.75 and 0.9 M NaCl, 100 mM Na acetate pH 4, and the initial temperatures were 291 and 295 K (see §3).

Crystallization condition for dialysis in the case of Atk1: 25 μl of protein solution was placed in the crystallization chamber of the temperature-controlled dialysis buttons. The initial conditions of the reservoir solution were 18, 19, 20 and 21% of PEG 8000, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, adenosine triphosphate 5 mM, 100 mM Na citrate pH 6.

In the case of Atk1 and lysozyme crystals' characterization with X-rays, temperature-controlled dialysis buttons with a volume of 25 μl of protein solution, rather than a flowing dialysis setup, were used in parallel under the previously described initial conditions of the reservoir solutions at constant temperature (293 K).

Finally, regarding the vapour diffusion crystallization experiment in the case of lysozyme, carried out also at 293 K, drops composed of a mixture of a volume of protein sample with an equal volume of reservoir solution were placed in vapour equilibration with a liquid reservoir solution described previously (Table 1). In order to achieve nucleation by vapour diffusion in the case of Atk1, the reservoir solution used must have a higher PEG 8000 concentration (25%) compared to that which was used in dialysis (18–21%) (Table 2).

### 2.2. Temperature-controlled dialysis button

The temperature-controlled dialysis button allows our previous instrument (Budayova-Spano *et al.*, 2007) to be used for dialysis in addition to batch crystallization. The protein



**Table 2**

Summary of the diffraction characterization of Atk1 crystals grown by hanging drop vapour diffusion and the temperature-controlled dialysis method.

Crystallization method	Hanging drop	Hanging drop	Hanging drop	Dialysis	Dialysis	Dialysis	Dialysis	Dialysis	Dialysis
PEG %	25	25	25	21	20	19	19	18	18
Largest dimension ( $\mu\text{m}$ )	100	200	300	150	100	250	400	200	400
Resolution $\dagger$ ( $\text{\AA}$ )	50–1.85 (1.96–1.85)	50–1.79 (1.90–1.79)	50–1.87 (1.99–1.87)	50–1.61 (1.71–1.61)	50–1.67 (1.77–1.67)	50–1.55 (1.64–1.55)	50–1.34 (1.42–1.34)	50–1.41 (1.49–1.41)	50–1.22 (1.29–1.22)
Mosaicity ( $^\circ$ )	0.354	0.397	0.578	0.270	0.223	0.187	0.259	0.205	0.259
$I/\sigma(I)\dagger$	14.54 (2.03)	13.64 (2.07)	9.29 (2.17)	13.74 (2.08)	16.60 (2.01)	14.61 (2.01)	13.77 (2.06)	13.41 (2.08)	13.12 (2.07)
CC(1/2) $\ddagger$	99.9 (71.4)	99.8 (78.8)	99.6 (91.0)	99.8 (74.0)	99.9 (69.7)	99.9 (69.0)	99.8 (74.3)	99.8 (74.3)	99.8 (79.6)

$\dagger$  Highest resolution shell in parentheses.  $\ddagger$  Karplus & Diederichs (2012).

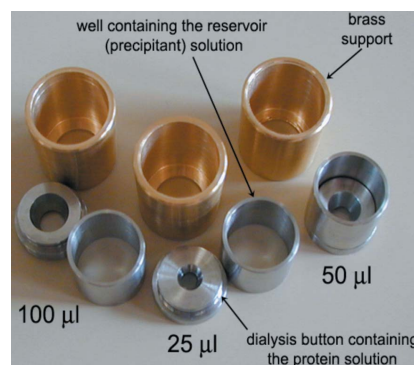
solution is poured into a specially designed stainless steel dialysis button with a polycarbonate window at the bottom (Fig. 2). It is separated from the precipitant solution by a dialysis membrane (of the appropriate molecular weight cutoff and other characteristics). The dialysis membrane is placed over the top of the dialysis chamber containing the sample (a variety of sizes of 25–200  $\mu\text{l}$  are available) and is held in place with an elastic ring in a groove.

A stainless steel reservoir well is then placed over the dialysis button in order to ensure the water tightness. The well contains up to 1 ml of the precipitant solution. The reservoir well is sealed with vacuum grease and a glass cover slide or with sealing tape. The dialysis setup is attached to a brass support incorporating one or several wells of the temperature-controlled crystal growth apparatus (Budayova-Spano *et al.*, 2007). With this setup, control of the temperature of the crystallization experiment is performed in an automated way, while the chemical composition of the reservoir solution must be changed manually by the user.

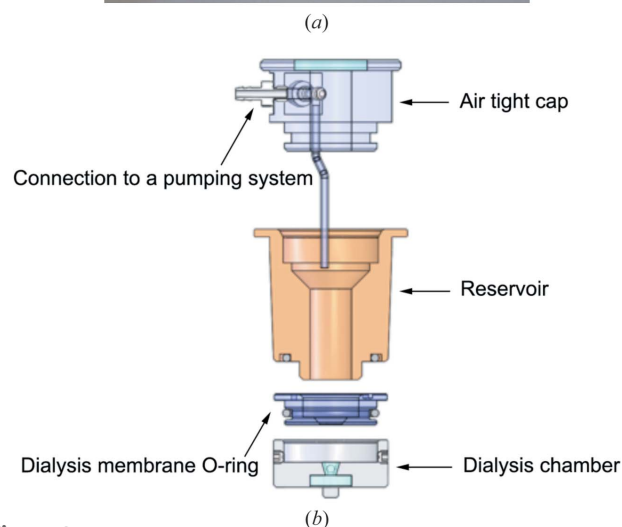
To recover the crystals, the reservoir well containing the precipitant solution is removed and a surgical blade is used to make an incision in the membrane around the outer circumference of the sample chamber opening for crystal harvesting.

### 2.3. Temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup

In this new version, the dialysis button is replaced by a new fluidic system in order to exchange the chemical composition in an automated way during the crystallization experiment. Now, the temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup consists of three main parts (Fig. 3). The crystallization chamber, named hereafter the dialysis chamber, with a volume of 15  $\mu\text{l}$ , houses the protein solution. It has a transparent polycarbonate window at the bottom. The dialysis membrane that separates the dialysis chamber from the reservoir solution is attached to an overchamber that allows the assembly composed of the dialysis chamber and the overchamber to be removed from the dialysis flow-cell setup for crystal mounting without removing the dialysis membrane. The reservoir chamber, which contains crystallization agents, additives and buffers, is placed on top of this assembly. The reservoir is covered by a plug equipped with an optical window to allow top illumination of the dialysis chamber. The reservoir chamber is connected to a pump, thus functioning as a continuous flow cell.



**Figure 2**  
Photograph of various temperature-controlled dialysis buttons.



**Figure 3**  
(a) Photograph of the temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup. (b) Schematic view of the temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup.

The user may adjust the composition of the reservoir solution and hence the crystallization condition. Precise control of the concentration of all components of the flowing reservoir (*e.g.* precipitant concentration) is performed using a pressure-driven flow control system.

The flowing reservoir dialysis setup is inserted into a brass support in thermal contact with Peltier elements of a crystal-growth apparatus that is incorporated on the microscope table (Fig. 4*b*). The crystallization chamber is viewed from below by an inverted microscope (Optics Peter, Lentilly, France) with a digital video camera, a motorized 12× zoom and XYZ translation stages (Fig. 4*a*). Illumination is provided by three

light emitting diodes (one direct light source and two back light sources).

A proportional-integral-derivative electronic temperature controller (Laird Technologies PR-59) allows a temperature range of 233.0–353.0 ± 0.1 K. The cooling of the Peltier elements with a chiller (Julabo) improves temperature control. A dry air flow prevents condensation of air humidity, especially at low temperatures. A Fluigent (FASTABTM-based technology) pressure-driven flow controller allows one to control independently up to four channels of a fluidic system.

This pressure-driven pumping system is controlled by dedicated software that allows the user to specify the nature and the concentration of the required crystallization agents, additives and buffers, and therefore to produce suitable mixtures from the different stock solutions for the reservoir solution of the flow-cell dialysis cell. Fig. 5 illustrates how this mixing system works. The control software is written with *LabVIEW* (<http://www.ni.com/labview/>) and includes a graphical user interface (Fig. 6) for visualization and measurement of crystals and image acquisition, processing and storage, as well as control of each parameter (temperature control, illumination, pumping the solutions and calculating the concentration of different constituents of the crystallization solution).

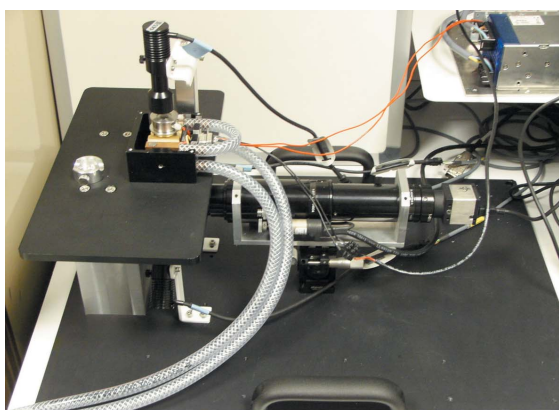
The configuration of the flowing reservoir dialysis setup in three portions enables recovery of the crystals at the end of the experiment. The crystallization solution is removed, for example using the pressure-driven pump, and the reservoir chamber is unscrewed. The overchamber with the dialysis membrane remains attached to the dialysis chamber so as to preserve the crystals against any mechanical damage or drying. The crystals can then be harvested as described above (§2.2) using the integrated microscope.

#### 2.4. Crystal characterization with X-rays

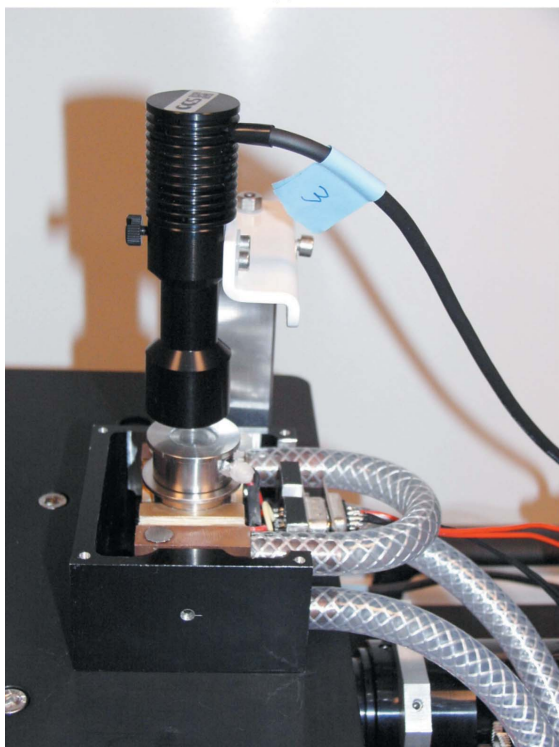
The diffraction data were collected at the FIP-BM30A beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF). One hundred and eighty diffraction images were collected from each crystal using an X-ray wavelength of 0.979 Å. Comparable exposure times were used for all crystals. The data were indexed and integrated using the *XDS* software (Kabsch, 2010).

### 3. Results

The temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup system is an integrated automated version of the existing instrument for temperature-controlled crystallization, where the crystallization batch has been replaced with dialysis. It consists of a crystal growth bench that, in addition to accurate temperature control, allows the chemical composition of the crystallization solution to be varied in an automated manner thanks to a dialysis cell equipped with a flowing reservoir. The current sample volume is 15 µl per experiment, but various volumes from a few to a few tens of microlitres are feasible. With this system, it is possible to optimize the kinetic path



(a)



(b)

**Figure 4** Photograph of the new apparatus for temperature-controlled flowing reservoir dialysis (*a*), with a detailed view of the temperature-controlled flowing reservoir dialysis setup within the apparatus (*b*).

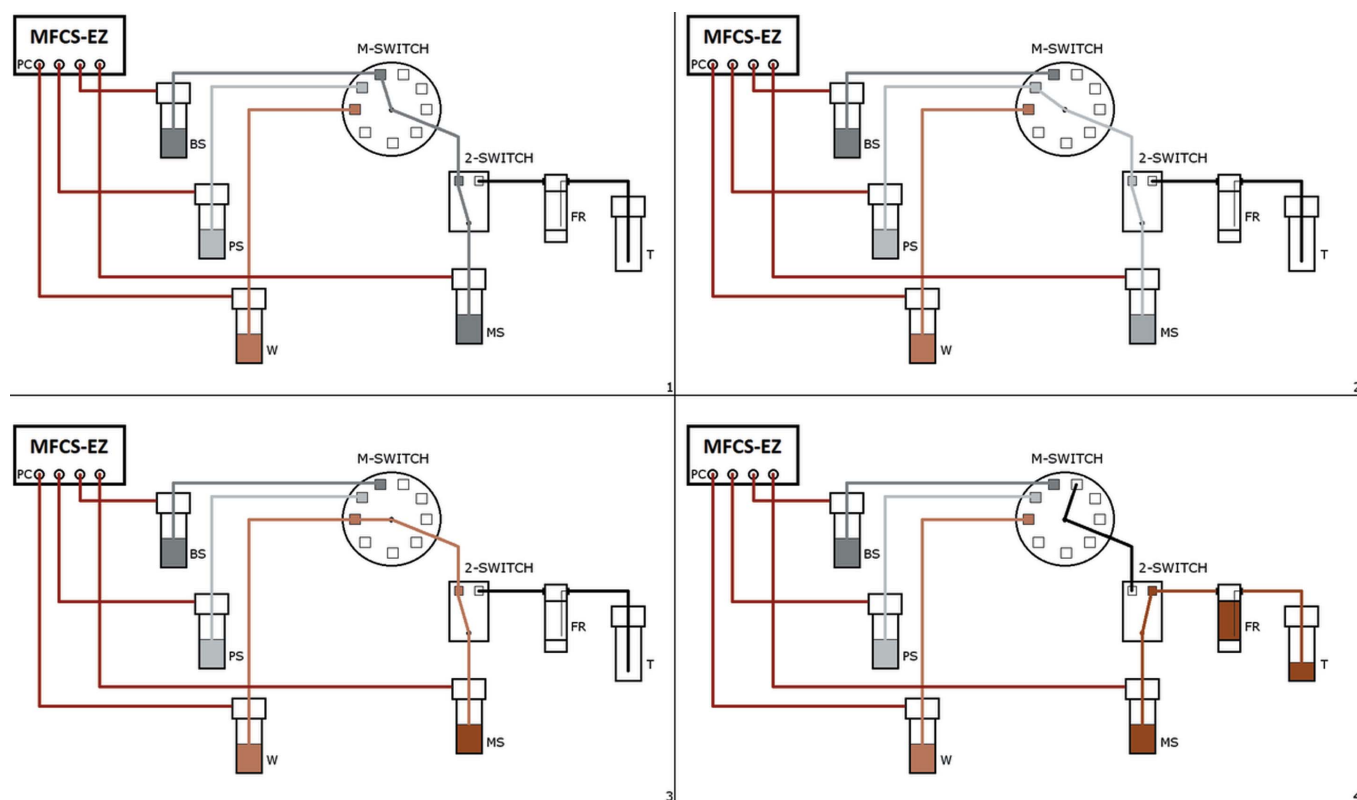


Figure 5

Multichannel fluidic system applications: principle of the fluid mixing system. Pressure channels (PC) allow us to pressurize containers to push the solution from the container into the tubing systems. The first stock solution from the buffer stock (BS) container is injected into the mixing tube solution (MS) via the multiple-switch (M-SWITCH) and the 2-SWITCH (step 1). Then the channel of the M-SWITCH is changed using a switchboard which allows the communication of the M-SWITCH and 2-SWITCH. The second solution from precipitant stock (PS) is then injected in the same manner as the first solution (step 2). Finally the M-SWITCH channel is modified again to complete the mixing of the solution with deionized water (W) (step 3). When the mixed solution is ready to use for crystallization the 2-SWITCH channel is modified to allow the filling up of the flowing reservoir (FR). At the end of the flowing process a trash container (T) is used to collect the solution already used for crystallization (step 4). If all of the mixed solution has been used a new one can be prepared in the same way. If not the tube can easily be removed and replaced by a new container.

though the phase diagram, which controls the nucleation and growth of the crystals, and thus their number, size and morphology.

We performed a proof of principle experiment with chicken egg-white lysozyme to demonstrate the control of nucleation and crystal growth (Fig. 7). Fig. 7(a) demonstrates the controlled large crystal growth of a lysozyme single crystal. In this experiment, the initial condition was 0.75 M NaCl, 100 mM Na acetate pH 4 at 295 K. The estimated time to reach an equilibrium between the reservoir and the dialysis chamber is 90 min. After this time the supersaturation in the dialysis chamber is low enough that a few nuclei are formed, and the first visible nuclei appear 22 h after equilibration. Then the crystal continues to grow until no more macroscopic growth is observed, which is in agreement with the previously established procedure for large crystal growth in batch (Budayova-Spano *et al.*, 2007). After three days the temperature was decreased to 291 K to restart the crystal growth. One day later the temperature was decreased to 288 K, and four days later when the crystal no longer showed visible growth the temperature was decreased again to 285 K until the crystal exceeded the size of 500  $\mu\text{m}$  in the longest dimension. Ten days after the start of the experiment, the

overall crystal growth process was intentionally interrupted in order to demonstrate how to obtain a large single crystal of a model protein with a volume approaching 0.1  $\text{mm}^3$ . This is the volume typically needed in neutron protein crystallography when a protein is perdeuterated.



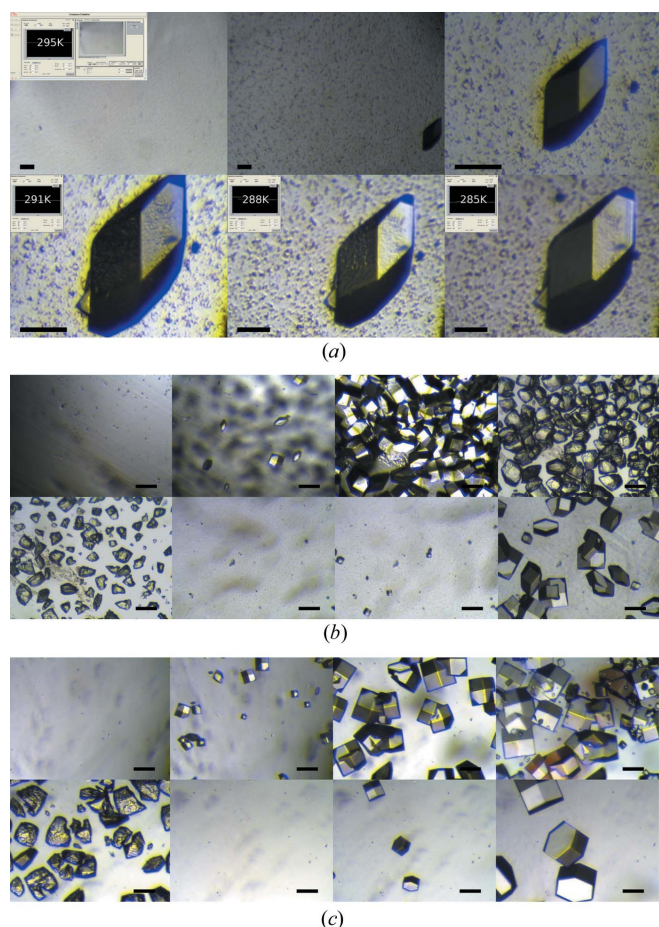
Figure 6

A graphical user interface in LabVIEW for system setup, viewing, monitoring, treating images, recording film sequences, regulating the temperature, pumping the solutions and measuring crystals.



We then performed two experiments to demonstrate the reversibility of the dialysis experiment for nucleation, crystal growth, dissolution and re-growth of crystals using temperature and precipitant variations, respectively. The initial crystallization condition was 0.9 M NaCl, 100 mM Na acetate pH 4 at 291 K in order to induce significant nucleation. After less than 60 min many crystals appeared in the dialysis chamber, and these grew for 3 h at 291 K to medium-sized crystals.

In the first experiment a temperature gradient was used (Fig. 7*b*) while the concentration of the precipitant was kept



**Figure 7**  
The dialysis crystallization experiment with variation of the temperature using the integrated apparatus for optimization of crystallization in the case of chicken egg-white lysozyme. The scale represents 100 μm; images are ordered from left to right. (a) The first three images show the initial growth at 295 K with two different zooms. Then the crystal is shown at the beginning of temperature change to 291 and 288 K (zoom is not the same to fit the crystal size). The last image shows the crystal at the end of the crystal growth process at 285 K. (b) The first three images show the initial nucleation and crystal growth at 291 K. Then the temperature is increased to 313 K until total dissolution of all the crystals (next three images). The two last images show the second nucleation event and related crystal growth at 295 K. The precipitant concentration was kept constant at 0.9 M NaCl during the entire experiment. (c) The first four images show the initial growth at 0.9 M NaCl. Once the precipitant concentration has been lowered gradually to 0 M NaCl, replacing it with only Na acetate buffer at 0.1 M pH 4, successive dissolution of all the crystals is observed (next two images). The two last images show the second nucleation event and related crystal growth at 0.75 M NaCl. The temperature was kept constant at 291 K during the entire experiment.

constant. The temperature was increased gradually to 313 K over 20 min to start the dissolution process. The dissolution of the crystals was complete in 1 h. The temperature was then rapidly decreased to 295 K (typically in a few minutes) to induce less nucleation than at the beginning of the experiment. This is consistent with the fact that the solubility of the lysozyme crystals increases with temperature. As the dialysis chamber was already at equilibrium with respect to the precipitant concentration, the second nucleation event appeared faster than the first one. Thus, in this second nucleation event, after 18 min, the first nuclei appeared and with a lower density, as expected from the theoretical phase diagram.

In the second experiment a concentration gradient of precipitant (Fig. 7*c*) was used at constant temperature (291 K). Here the dissolution process of lysozyme crystals is due to the gradient of the NaCl concentration, which was decreased gradually to 0 M so that finally only the Na acetate buffer at 0.1 M pH 4 was circulating in the reservoir. The dissolution did not appear immediately after the concentration change because of the equilibration time required between the reservoir and the dialysis chamber. The crystals continued to grow for a short period of time, and after 60 min the smallest nuclei began to dissolve. The dissolution was complete in 2 h. Finally the precipitant concentration was increased again to a reservoir NaCl concentration of 0.75 M. As expected from the theoretical phase diagram, nucleation was observed after an equilibration time of 90 min, but with a lower density than originally.

To verify the diffraction quality of the crystals grown in the temperature-controlled dialysis setup we collected X-ray diffraction data from three crystals of lysozyme and six crystals of Atk1 grown in parallel in temperature-controlled dialysis buttons and compared them with three crystals of comparable size and appearance of lysozyme and Atk1, each grown in hanging drops in a vapour diffusion setup. The crystals grown in our temperature-controlled dialysis setup clearly have better diffraction quality than the crystals grown by vapour diffusion for both lysozyme (Table 1) and Atk1 (Table 2). All of the crystals we tested had a lower mosaicity and a higher diffraction limit than the reference crystals grown by vapour diffusion.

#### 4. Discussion

Different empirical approaches have been developed to produce crystals, based on screening and optimization (Caffrey, 2009; Garcia-Caballero *et al.*, 2011; Gourdon *et al.*, 2011; Luft *et al.*, 2014). The knowledge of the phase diagram and the specific control of the crystallization parameters such as the temperature and the concentration of crystallization agents and/or additives will allow the number of crystals and their macroscopic defects to be reduced, as well as the selection of the nucleation and/or growth of the desired phase. Even when the precise position of the solubility curve on the phase diagram is not experimentally known, the ability to control the crystallization parameters in a reversible manner

together with real-time observation of the crystals allows the phase diagram to be explored in a qualitative way.

The devices described here allow multiple crystallization conditions to be explored in a systematic way with the same biological sample. The sample is not consumed in the experiment and, as long as it is not damaged (*e.g.* denatured), the conditions can be explored reversibly. Tailoring of crystal number, size, phase and diffraction quality reduces the time, amount of protein material and effort required for structure determination. The approach differs from the current paradigm in performing serial instead of parallel experiments.

We expect the described devices to be useful in monitoring and controlling the crystallization processes that allow production of crystals of specific sizes and morphology optimized for different downstream structure determination approaches. This will be beneficial for free-electron laser and synchrotron serial crystallography experiments which require large numbers of small crystals (<50  $\mu\text{m}$ ) with a very uniform population of crystals (in terms of size and morphology), and for neutron studies that require large single crystals to provide sufficient scattering volumes (0.1–1.0  $\text{mm}^3$ , depending on the deuteration approach). Several neutron crystallography targets are being investigated with the present system, and the positive results already obtained together with the related crystallization protocols will be published in the near future. Our results indicate that the control of crystal growth does not compromise the diffraction quality, and rather improves it (Tables 1 and 2), but this effect remains to be demonstrated on a larger number of systems.

In addition, the setup is applicable to many other objectives such as studying salting-in and salting-out effects in crystallization, gentle addition and exchange of buffers, additives, ligands, heavy metals, detergents or cryoprotectants, and cross-linking and dehydration or isotope exchange ( $\text{H}_2\text{O}$  versus  $\text{D}_2\text{O}$ ) of crystals for diffraction purposes in X-ray or neutron protein crystallography, respectively.

### Acknowledgements

MBS acknowledges the international doctoral research program (Irtelis) of CEA for the PhD Fellowship to NJ, and

EO acknowledges the European Molecular Biology Organization for a Long-Term Fellowship. MBS acknowledges support from the MRCT CNRS under the contract 2010–2011 and from LABEX VALO GRAL under the contract 2015.

### References

- Abdallah, B. G., Kupitz, C., Fromme, P. & Ros, A. (2013). *ACS Nano*, **7**, 10534–10543.
- Asherie, N. (2004). *Methods*, **34**, 266–272.
- Astier, J. P. & Veessler, S. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**, 4215–4219.
- Blakeley, M. (2009). *Crystallogr. Rev.* **15**, 157–218.
- Boudjemline, A., Saridakis, E., Swann, M. J., Govada, L., Mavridis, I. M. & Chayen, N. E. (2011). *Anal. Chem.* **83**, 7881–7887.
- Budayova-Spano, M. (2010). Patent FR10/57354, UJF (extension: EP117730945, US13821053, JP2013528746).
- Budayova-Spano, M., Dauvergne, F., Audiffren, M., Bactivelane, T. & Cusack, S. (2007). *Acta Cryst. D***63**, 339–347.
- Caffrey, M. (2009). *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 29–51.
- Garcia-Caballero, A. *et al.* (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2112–2121.
- Gourdon, P., Andersen, J. L., Hein, K. L., Bublitz, M., Pedersen, B. P., Liu, X.-Y., Yatime, L., Nyblom, M., Nielsen, T. T., Olesen, C., Møller, J. V., Nissen, P. & Morth, J. P. (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2098–2106.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst. D***66**, 133–144.
- Karplus, P. A. & Diederichs, K. (2012). *Science*, **336**, 1030–1033.
- Leng, J. & Salmon, J.-B. (2009). *Lab Chip*, **9**, 24–34.
- Levantino, M., Yorke, B. A., Monteiro, D. C. F., Cammarata, M. & Pearson, A. R. (2015). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **35**, 41–48.
- Luft, J. R., Newman, J. & Snell, E. H. (2014). *Acta Cryst. F***70**, 835–853.
- Meyer, A., Dierks, K., Hilterhaus, D., Klupsch, T., Mühlig, P., Kleesiek, J., Schöpflin, R., Einspahr, H., Hilgenfeld, R. & Betzel, C. (2012). *Acta Cryst. F***68**, 994–998.
- Pusey, M. (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 1135–1142.
- Rice, L. M., Earnest, T. N. & Brunger, A. T. (2000). *Acta Cryst. D***56**, 1413–1420.
- Selimović, Š., Gobeaux, F. & Fraden, S. (2010). *Lab Chip*, **10**, 1696–1699.
- Talreja, S., Perry, S. L., Guha, S., Bhamidi, V., Zukoski, C. F. & Kenis, P. J. A. (2010). *J. Phys. Chem. B*, **114**, 4432–4441.
- Vekilov, P. G. (2005). *Methods Mol. Biol.* **300**, 15–52.
- Zhang, J. (2012). *Protein–Protein Interactions – Computational and Experimental Tools*, edited by W. Cai & H. Hong, ch. 18. Rijeka: InTech. doi:10.5772/38056.

### Compléments à la publication

Ici je discuterai de quelques éléments complémentaires à la publication concernant la partie instrumentation.

Tout d'abord un nouvel élément a été ajouté au système de préparation des solutions. Un débitmètre a été ajouté juste après le M-SWITCH permettant ainsi d'avoir un mélange des solutions stocks beaucoup plus précis que précédemment. Plutôt qu'une distribution séquentielle des solutions stocks à intervalles de temps donnés, un calcul du volume de solution dispensée est réalisé à partir de la mesure instantanée du débit. Pour cela l'intégrale sous la courbe du débit en fonction du temps est calculée toutes les 100 ms afin d'obtenir le volume distribué à chaque instant. L'erreur sur le volume final n'excède pas 5 %.

La chambre de dialyse ainsi que la sur-chambre ont subi quelques modifications notamment pour améliorer l'étanchéité du système. Comme visible sur la Figure 2.5 la chambre possède désormais une surface intérieure de contact conique avec la sur-chambre. La sur-chambre, quant à elle, possède une surface sphérique permettant un meilleur contact des deux pièces par rapport à deux pièces planes. De plus, 3 volumes de la chambre sont maintenant disponibles sur le nouveau prototype (15, 40 et 80  $\mu\text{L}$ ).

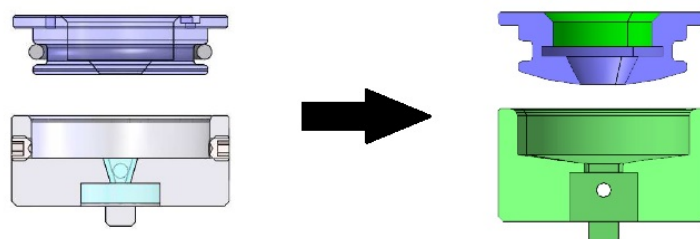


FIGURE 2.5 Ancienne chambre de dialyse à gauche avec surfaces planes. Nouvelle chambre à droite avec surface sphérique pour la sur-chambre et conique pour la chambre.

Dans l'objectif d'améliorer la vitesse et la précision de régulation en température, de nouveaux modules Peltier plus performants ont été ajoutés pour remplacer les anciens modèles. En raison de la taille plus importante des nouveaux modèles (surface active de 40x40 mm), l'agrandissement du support en laiton qui supporte la cellule de dialyse a été nécessaire. La transition de l'ancien modèle au nouveau modèle est représentée sur la Figure 2.12.

### 2.1.3 Nouveau design et intégration d'un spectromètre UV

Une des raisons principales qui a motivé la mise à jour du banc est l'intégration d'un faisceau UV et d'un spectromètre permettant de mesurer la concentration en protéine *in situ* pendant une expérience de cristallisation. Ce système devrait permettre le suivi de la concentration en protéine mais aussi de tracer des courbes de solubilité pour étudier le diagramme de phase de la protéine à cristalliser.

Pour déterminer le diagramme de phase, différentes méthodes ont été développées par différents groupes dans le monde. On peut par exemple mentionner l'utilisation de l'imagerie

SONICC combinée à des simulations numériques pour construire la courbe de supersolubilité et approximer la courbe de solubilité [41]. On retrouve des systèmes moins communs comme l'utilisation de goutte suspendue basée sur l'évaporation et le changement de condition du réservoir. La concentration de protéine et d'agent de cristallisation dans la goutte est obtenue par le calcul en fonction de la condition de réservoir pour déterminer la courbe de solubilité et de supersolubilité [42]. Elles peuvent aussi être établies par une autre approche basée sur le contrôle de l'humidité et de la quantité de précipitant. La concentration est obtenue par mesure de la masse de la goutte, contenant la protéine et l'agent de cristallisation, et à partir de la composition de la goutte [43].

Cependant la mesure de l'absorption UV, plus généralement à 280 nm, est majoritairement utilisée pour quantifier la concentration de protéine en solution. Cette méthode a été utilisée avec succès sur plus de 40 systèmes protéiques [13, 44, 45] et est basée sur la présence d'acides aminés aromatiques : Tryptophane, Tyrosine ou Phenylalanine qui possèdent une absorbance maximale à 280, 275 et 258 nm respectivement [46]. La concentration est mesurée à partir d'une solution diluée de protéine. Toutefois il existe des méthodes permettant de mesurer la concentration de solution de protéine non diluée. La loi de Beer-Lambert permet de relier l'absorbance à la concentration, avec  $A = \epsilon l C$  où  $A$  est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'absorption molaire en  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ,  $l$  la longueur de la cuve en cm et  $C$  la concentration en  $\text{mol L}^{-1}$ . Or cette loi n'est valable que dans une gamme d'absorbance où la relation entre l'absorbance et la concentration est linéaire. En pratique, le suivi de l'absorbance en fonction de la concentration donne lieu à une zone linéaire suivie d'un plateau. Pour agrandir la partie linéaire selon la loi de Beer-Lambert on montre que si on diminue le chemin optique (n.b. la longueur de la cuve) la valeur d'absorbance est diminuée et permet par conséquent d'accéder à des concentration plus hautes. On peut noter que cette méthode a déjà été mise en place [47] et que des instruments se basent sur ce principe pour mesurer des fortes concentrations de protéine sans dilution [48].

Serait-il possible d'utiliser la partie non-linéaire des courbes d'absorbance ? Dans la section 4.3, les causes de cette non-linéarité seront discutées ainsi que les possibilités envisagées pour exploiter cette zone non-linéaire.

### 2.1.3.1 Description du système

La nouvelle cellule de dialyse a été conçue pour laisser passer deux faisceaux, un à travers la chambre de dialyse, et un à travers le réservoir. Le faisceau passant à travers le réservoir sert de référence pour retirer la contribution de la solution de cristallisation à la mesure réalisée dans la chambre de dialyse pour extraire uniquement la contribution de la protéine. Les solutions les plus communes utilisées en cristallisation des protéines ne contribuent pas à l'absorbance à 280 nm (sels, PEGs...). Cependant dans le cas où la protéine cristallise en présence, par exemple, d'ATP, comme c'est le cas pour l'IspE, la contribution de la solution du réservoir sera non nulle, d'où la nécessité de connaître cette contribution. La Figure 2.6 montre une représentation 3D du banc de cristallisation qui illustre l'objectif à atteindre, à



savoir l'intégration d'une lampe UV, d'un spectromètre UV et d'un faisceau passant à la fois dans le réservoir et dans la chambre de dialyse.

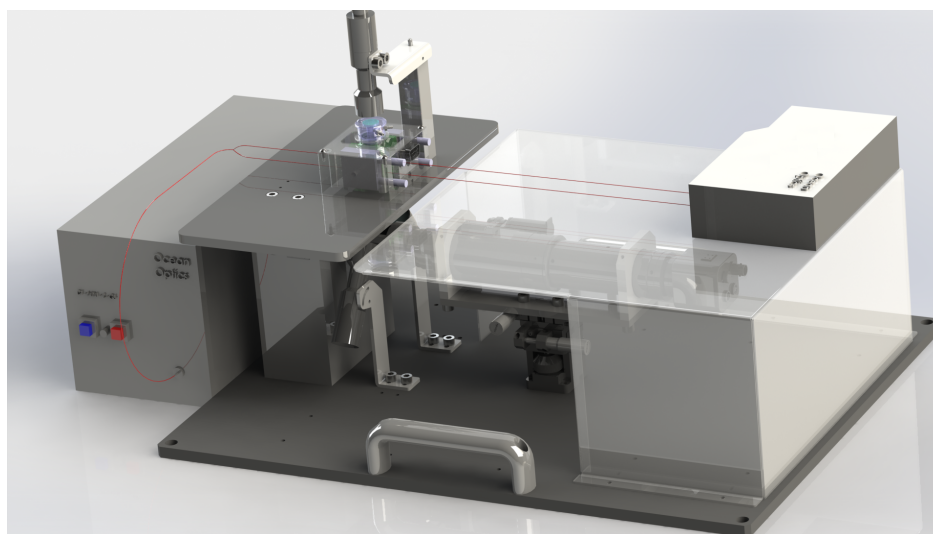


FIGURE 2.6 Représentation schématique en 3D du banc de cristallisation et du système UV final. La source UV est représentée à gauche, le fil rouge représente l'emplacement des fibres optiques et la boîte grise et blanche à droite représente le spectromètre UV.

A partir de ce schéma de principe la liste du matériel adapté à notre expérience a été établie. En pratique, parmi les différents spectromètres UV considérés, un seul modèle possédait 2 entrées pour recevoir les deux fibres optiques, celle du réservoir et celle de la chambre de dialyse. Cependant les performances de ce spectromètre n'étaient pas adaptées à nos exigences en termes d'absorbance (dynamique du signal) et de rapport signal sur bruit. Pour cette raison un système comprenant un spectromètre UV à une entrée et un interrupteur en amont de la cellule de dialyse a été choisi. Le schéma est représenté sur la Figure 2.7. Une première fibre bifurquée sépare le faisceau UV vers un interrupteur laissant passer le faisceau UV séquentiellement vers chacune de ses sorties. L'interrupteur doit être géré *via* un signal TTL (Transistor-Transistor Logic) externe avec une fréquence maximale de 5 Hz. Deux fibres optiques sont ensuite reliées à des collimateurs UV qui permettent l'obtention d'un faisceau parallèle qui passe à travers les échantillons et ressort à travers d'autres collimateurs situés en sortie de la cellule. Une fibre optique bifurquée est connectée aux collimateurs d'un côté et au spectromètre de l'autre. Enfin le spectromètre est connecté à l'ordinateur pour l'analyse des spectres.

### 2.1.3.2 Mesures préliminaires

Quelques mesures préliminaires à l'achat du matériel et au développement des nouvelles pièces ont été réalisées afin d'étudier les limites du système sous développement et les contraintes techniques. Pour cela plusieurs spectromètres ont été utilisés et un banc de test simple a été mis en place. Le spectromètre USB2000 (capteur Sony ILX511B), un spectromètre HR2000 (capteur similaire à l'USB2000), un spectromètre QE65PRO (cap-



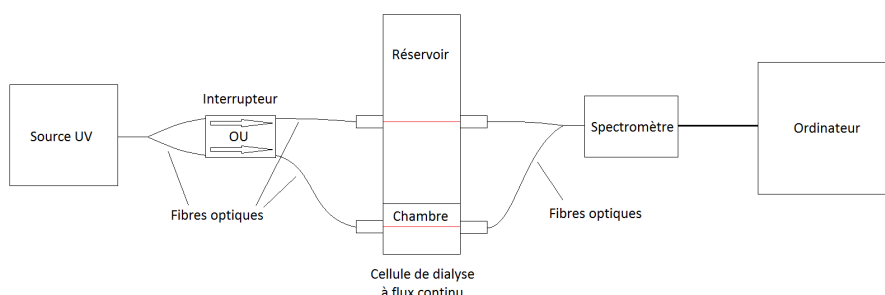


FIGURE 2.7 Schéma du système final avec l'interrupteur, le spectromètre et les différentes fibres optiques bifurquées ou non.

teur Hamamatsu S7031-1006) ont été testés. Les caractéristiques d'absorbance de quelques capteurs proposés par Ocean Optics sont résumées dans le tableau 2.1.

	Absorbance		
	moyenne	min	max
Hamamatsu S7031-1006	1	0,00086	3
	100	$8,7 \times 10^{-5}$	4
	50000	x	5,4
Sony ILX511B	1	0,0034	2,39
Toshiba TCD1304AP	1	0,0029	2,47
Hamamatsu S10420	1	0,001	<3

TABLE 2.1 Tableau comparatif de différents capteurs. Données Ocean Optics, Idil Fibres Optiques.

### Choix du spectromètre

Sur les Figures 2.8 et 2.9 sont présentés deux exemples de mesure de spectres réalisés avec du lysozyme à différentes concentrations avec un spectromètre QE65PRO et un HR2000 respectivement. La mesure avec le QE65PRO a été réalisée avec une moyennation de 10 spectres et un temps d'intégration de 400 ms. Le chemin optique de la cuve était de 2 mm pour les deux. Pour le HR2000 une moyennation de 10 spectres et un temps d'intégration de 300 ms ont été appliqués. Ces spectres nous renseignent sur plusieurs points, tout d'abord, sans surprise le rapport signal sur bruit est plus élevé pour le QE65PRO. Avec l'augmentation de la concentration en protéine on observe sur chacun des graphiques un déplacement progressif du pic (observé initialement à 280 nm) vers les plus faibles longueurs d'onde. Cet effet est relié à une déviation instrumentale qui est la non-linéarité du capteur. Pour visualiser cet effet on peut raisonner en terme de temps d'intégration et d'intensité (nombre de coups). Dans la zone linéaire du capteur, lorsque le temps d'intégration est diminué de moitié, il en va de même pour le nombre de coups. Cependant, dans le cas des solutions à forte concentration, l'absorbance est élevée, donc le nombre de coups est faible. En raisonnant toujours de la même façon, la diminution du temps d'intégration de moitié conduit à la diminution d'un

facteur  $F$  plus élevé ( $> 2$ ) de l'intensité. Donc l'absorbance mesurée ( $A = -\log(\frac{I}{I_0})$ ) est plus élevée que la valeur "réelle". Or cet effet est dépendant de la longueur d'onde, donc si  $F$  est plus élevé à 260 nm qu'à 280 nm par exemple, l'absorbance à 260 nm sera plus élevée que prévu et l'absorbance à 260 nm pourrait dépasser l'absorbance à 280 nm. Pour cela une faible différence dans la valeur de  $F$  est suffisante. C'est l'effet observé ici. Sur la Figure 2.10 on peut voir un exemple de l'évolution de  $F$  (un cas particulier) en fonction de la longueur d'onde pour le spectromètre QE65PRO à différentes concentration de lysozyme.

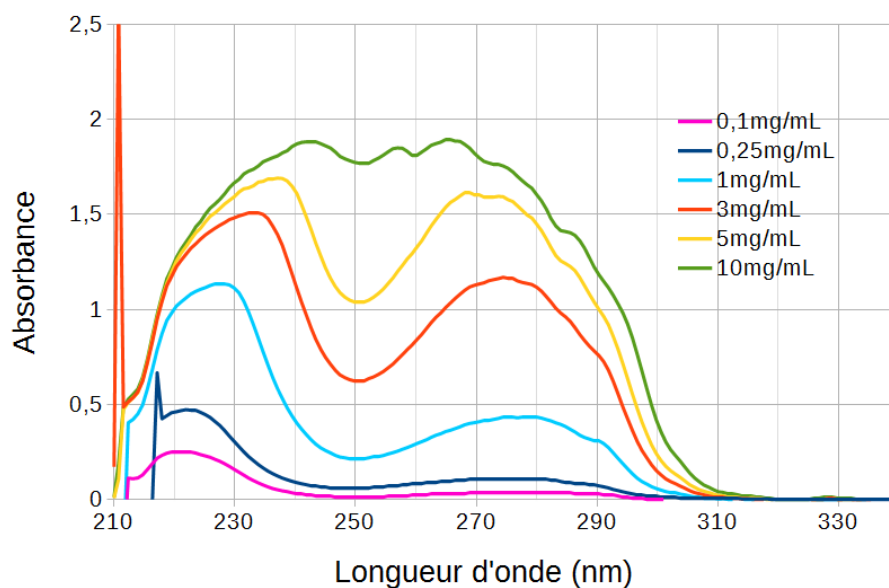


FIGURE 2.8 Absorbance mesurée avec un spectromètre QE65PRO en fonction de la longueur d'onde à différentes concentrations de lysozyme. Les concentrations de lysozyme sont indiquées en légende à droite des spectres en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

$F$  ici représente le rapport de l'intensité avec un temps d'intégration de 200 ms et de l'intensité avec un temps d'intégration de 100 ms. Pour une concentration de  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  le facteur  $F$  est de 2 sur toute la plage de mesure présentant un intérêt pour la mesure de concentration de protéine. Le spectre à cette concentration (cf. Figure 2.8) présente bien un pic à 280 nm caractéristique. En revanche, lorsque la concentration est plus élevée,  $F$  n'est plus égal à 2 et varie beaucoup en fonction de la longueur d'onde. Lorsque la concentration augmente,  $F$  augmente de façon plus sévère aux longueurs d'ondes entre 260 et 270 nm mais aussi aux longueurs d'ondes plus faibles entre 210 et 240 nm, expliquant le rapprochement des deux pics observé sur tout l'intervalle des longueurs d'onde où l'absorbance a été mesurée (2.8 et 2.9). Dans le cas du HR2000 le rapprochement des deux pics est moins marqué car le capteur est beaucoup plus linéaire, la non-linéarité est moins marquée. Il sera donc primordial à l'avenir de corriger cette non-linéarité au vu des concentrations élevées de protéines avec lesquelles nous travaillons.

Nous avons opté pour un spectromètre Maya, une version intermédiaire au QE65PRO et au HR2000 en terme de performances. Le spectromètre Maya est composé d'un capteur proche de celui du QE65PRO (Hamamatsu S10420) avec des performances moindre et un

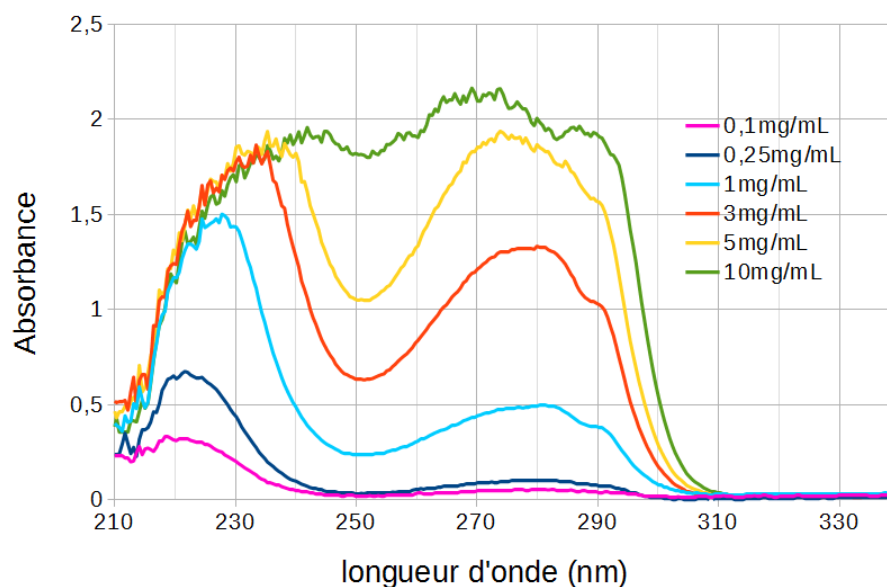


FIGURE 2.9 Absorbance mesurée avec un spectromètre HR2000 en fonction de la longueur d'onde à différentes concentrations de lysozyme. Les concentrations de lysozyme sont indiquées en légende à droite des spectres en  $\text{mg mL}^{-1}$ .

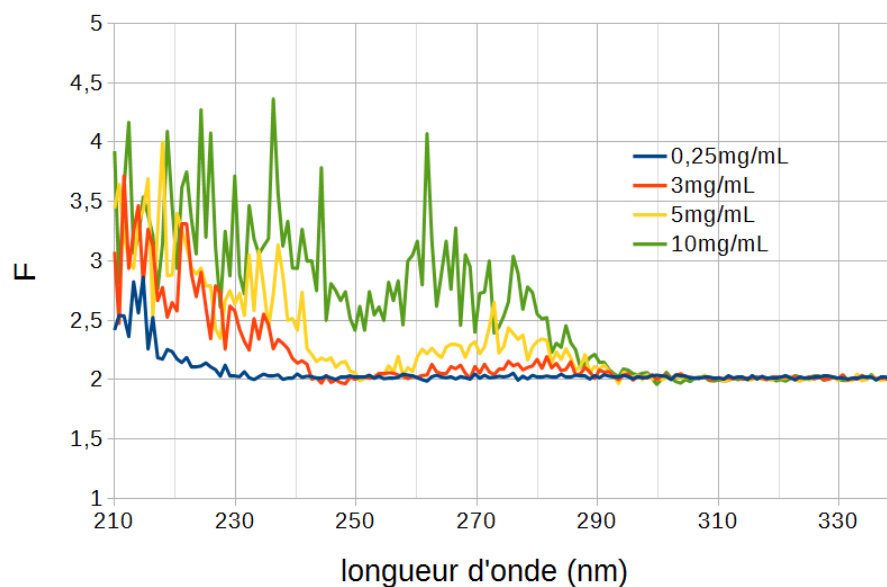


FIGURE 2.10 Evolution du facteur F, évalué par le rapport de deux temps d'intégration, en fonction de la longueur d'onde pour différentes concentrations de lysozyme. Spectromètre utilisé : QE65PRO.

rapport signal sur bruit deux fois inférieur au QE65PRO et environ deux fois supérieur au HR2000. Le choix du spectromètre passe aussi par le choix de la fente du spectromètre. Plus la fente sera petite, plus la résolution optique sera élevée au détriment du signal qui sera plus faible. Nous avons choisi de privilégier le signal à la résolution puisqu'il n'est pas nécessaire de différencier plusieurs pics étroits par exemple. Nous avons donc opté pour une fente de 200  $\mu\text{m}$ .

### Effet du chemin optique

Comme expliqué dans la section 2.1.3, le chemin optique joue un rôle important pour déterminer la gamme de concentration mesurable. La Figure 2.11 présente l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration mesurée à 280 nm pour le lysozyme, à deux longueurs de cuve différentes avec le spectromètre USB2000 et une source DH-2000-BAL. La taille de la zone linéaire varie en fonction de la longueur de la cuve, les plages de concentration mesurable sont donc différentes en se basant sur la loi de Beer-Lambert. Dans le banc de cristallisation, la dilution de la protéine est impossible, aussi le chemin optique doit être minimisé afin d'explorer de plus grandes gammes de concentration.

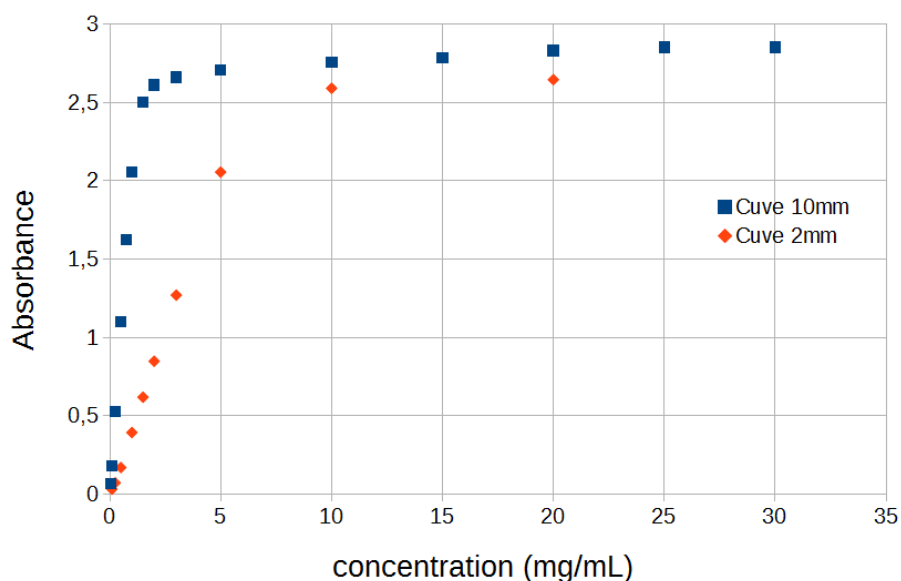


FIGURE 2.11 Absorbance mesurée avec le spectromètre USB2000 à 280 nm en fonction de la concentration en Lysozyme pour deux longueurs de cuve différentes.

### Choix de la source UV, des fibres optiques

Le choix concernant la source UV s'est fait par comparaison d'une source standard qui couvre un grand nombre de longueurs d'onde, ici la DH-2000-BAL de chez Ocean Optics à une source de lumière à fibre couplée DEL à 290 nm, ici LLS-290 de chez Ocean Optics. Pour une mesure avec un nombre de coups donné à la même longueur d'onde, le temps d'intégration est 3 à 4 fois plus court avec la LLS-290 par rapport à la DH-2000-BAL. Par

conséquent pour des mesures avec un très long temps d'intégration il faut donc préférer la DEL. A noter tout de même que la lampe DH-2000-BAL permet de parcourir une plus grande gamme de longueurs d'onde. Puisque les mesures que nous souhaitons réaliser ne nécessitent pas de mesure dynamique et que la lampe DH-2000-BAL permet de couvrir une plus grande plage de longueur d'ondes, au regard des mesures d'absorbance préliminaires, présentées dans les Figures 2.8 et 2.9, elle est de plus grand intérêt pour notre système. Néanmoins, l'utilisation d'une DEL moins couteuse et plus puissante pourrait aussi présenter un intérêt à l'avenir.

Le temps d'intégration va aussi varier avec le choix de la fibre optique. En effet pour un même nombre de coups une combinaison de fibre de 50  $\mu\text{m}$  - 50  $\mu\text{m}$  (entrée-sortie) aura un temps d'intégration approximativement 10 fois plus long qu'une combinaison 50  $\mu\text{m}$  - 200  $\mu\text{m}$ . Ainsi une combinaison 100  $\mu\text{m}$  - 200  $\mu\text{m}$  diminuera d'autant plus le temps d'intégration. Cependant, outre le temps d'intégration, le faisceau en sortie de collimateur ne doit pas excéder le diamètre du trou percé dans la chambre de dialyse fait pour laisser passer le faisceau UV. L'utilisation d'une cible plastique percée avec différents forets a montré qu'avec une fibre de diamètre supérieur à 100  $\mu\text{m}$ , le faisceau est en partie absorbé par les bords de la cible de 1,5 mm en utilisant des collimateurs UV-Vis standards, une partie des photons est donc perdue. Ainsi le compromis doit se faire entre le temps d'acquisition qui nécessite des fibres de grand diamètre et la largeur du trou d'entrée du faisceau dans la cellule de dialyse qui nécessite des fibres de faible diamètre pour ne pas perdre un grand nombre de photons. Néanmoins en maximisant la lumière à l'intérieur de la cellule de dialyse, la perte d'un grand nombre de photons en plaçant une fibre de 400  $\mu\text{m}$  par exemple en entrée reste envisageable. Malgré les pertes on pourrait ainsi maximiser le nombre de photons pour la mesure.

La distance inter-collimateur est également un élément à prendre en compte puisque, malgré la présence des collimateurs, le faisceau tend à diverger ce qui peut entraîner une grande perte d'intensité. Pour évaluer cela des mesures ont été faites avec deux distances entre chaque collimateur en évaluant le nombre de coups à des temps d'intégration équivalents. Il apparaît que lorsque les collimateurs sont espacés de 20 mm ou de 44 mm (distances minimales et maximales atteignables avec notre banc de test) le nombre de coups ne varie pas. Bien que pour la conception il convienne de minimiser la distance entre les collimateurs, aucune différence significative n'est à noter dans la gamme de distance choisie.

Dans le but de minimiser les pertes, nous avons fait construire des collimateurs sur mesure pour obtenir un diamètre de faisceau inférieur à 2 mm sur une distance d'au moins 5 cm. Idil Fibres Optiques a fourni le profil des faisceaux à 3 cm et à 5 cm avec ces collimateurs et il apparaît que le diamètre de faisceau est inférieur à 1,2 mm à 3 cm et inférieur à 1,9 mm à 5 cm.

### 2.1.3.3 Aperçu des pièces mécaniques

Les nouvelles pièces ont fait l'objet d'une étude conduite par Alain Cobessi au SERAS (Service Etudes et Réalisation d'Appareillages Scientifiques) du CNRS à Grenoble. Le cahier

des charges comporte de nombreuses contraintes comprenant la possibilité d'avoir un système modulaire, ajustable et adapté pour les anciennes pièces déjà fabriquées. L'étude s'est déroulée sous forme d'itérations successives pour obtenir le système correspondant à nos besoins.

La Figure 2.12 représente l'ancien et le nouveau bloc support, les deux à la même échelle, permettant de maintenir la cellule de dialyse à flux continu.

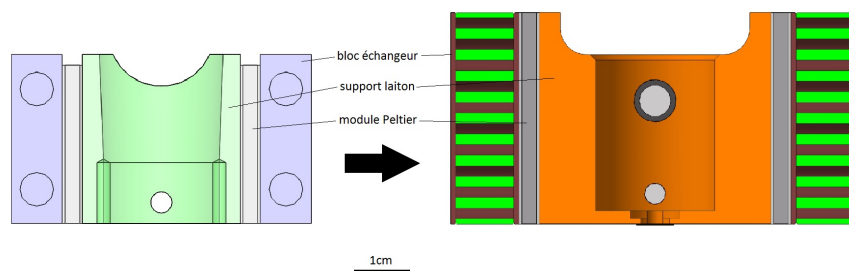


FIGURE 2.12 Ancien bloc support à gauche. Nouveau bloc support à droite. Echelle 1cm.

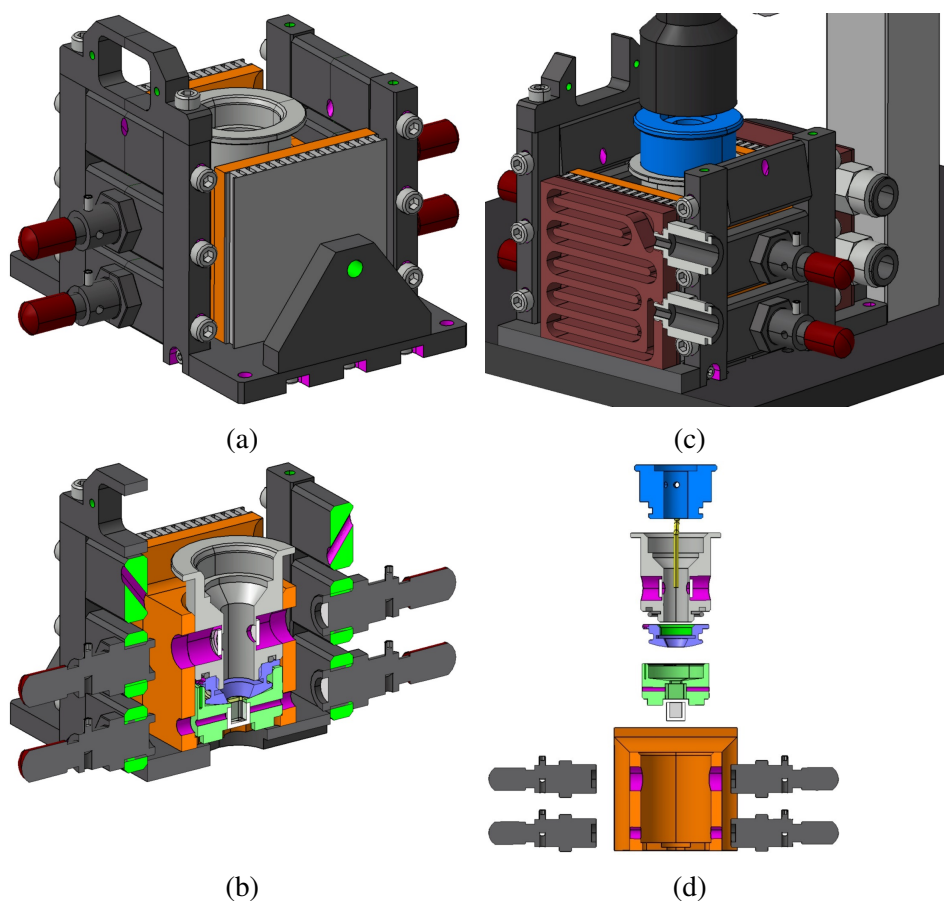


FIGURE 2.13 Différentes vues des pièces composant le nouveau bloc de dialyse. (a) Vue globale sans les échangeurs thermiques. (b) Vue en coupe d'un échangeur et du dispositif complet avec la lumière au dessus. (c) Vue en coupe du dispositif et de la cellule de dialyse à flux continu. (d) Vue en coupe du support et de la nouvelle cellule de dialyse à flux continu.

Sur la Figure 2.13, différentes vues des nouvelles pièces réalisées lors de l'étude correspondant au dispositif final sont illustrées. On retrouve en 2.13a le bloc complet sans les

échangeurs thermiques. En orange est présenté le support en laiton maintenant la cellule de dialyse. En noir un dispositif amovible permettant d'ajuster la hauteur des collimateurs pour l'alignement du faisceau. Au sommet se trouve un bloc percé pour accueillir une prise RS232 pour le contrôle et l'alimentation des modules Peltier. En gris, contre le support en laiton, se trouvent les modules Peltier. La vue 2.13b montre une coupe de la cellule de dialyse avec les trous réservés au passage du faisceau dans le réservoir et dans la chambre de dialyse. Une cuve en quartz est dans la chambre de dialyse ainsi que des fenêtres cylindriques en quartz. Le quartz est représenté en blanc. Sur la vue 2.13c un échangeur à eau est présenté en coupe avec des raccords rapides pour l'arrivée et la sortie d'eau réfrigérée. Enfin la vue 2.13d, montre une vue éclatée de la cellule de dialyse à flux continu.

## 2.2 Microfluidique

### 2.2.1 Contexte - Présentation du système

Dans cette section est présenté un outil microfluidique permettant la cristallisation de macromolécules biologiques. Ce système repose sur la miniaturisation du banc de cristallisation présenté dans la section précédente. La puce microfluidique a été conçue en partenariat avec les spécialistes en microfluidique (Jean-Baptiste Salmon) du Laboratoire du Futur (LOF) à Bordeaux. Une fois le concept validé, les puces microfluidique ont été réalisées dans la salle blanche au sein du Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LIPhy) à Saint-Martin d'Hères. Les contraintes de conception sont les suivantes :

- l'outil doit permettre la cristallisation des protéines par la méthode de la dialyse et incorporer des membranes de dialyses en cellulose régénérée. Différentes stratégies de conception sont envisageables pour intégrer une membrane à un système microfluidique [49]. Par la suite seuls les systèmes intégrant des membranes commerciales seront abordés. L'utilisation de techniques de serrage ou de collage où la membrane est prise en sandwich entre différents étages préfabriqués [50–57], mais aussi l'utilisation d'adhésifs [58], de collage plasma [59], de pressage à chaud [60, 61] va permettre le maintien la membrane dans le système microfluidique et empêcher les fuites.

- l'outil doit permettre l'écoulement en flux continu de l'agent de cristallisation à l'instar de la nanofiltration [62].

- l'outil doit être contrôlé en température. Pour cela de multiples approches ont déjà été utilisées [63] plus ou moins faciles à mettre en œuvre. On peut diviser ces méthodes en 3 catégories : les techniques de chauffage externe [64–72] qui peuvent comprendre le préchauffage de solutions avant injection, l'utilisation de modules Peltier ; les techniques de chauffage intégré [73–86] du type chauffage par effet Joule, l'utilisation de réactions chimiques endo ou exothermique ; et le chauffage direct dans la masse [87–108] où on peut retrouver l'utilisation de micro-ondes, de lasers, de fils chauffants... A noter que les références citées ci-dessus n'ont pas toutes pour objectif de thermoréguler des systèmes microfluidiques,



certaines de ces travaux utilisent les changements de température induits par leur système à d'autres fins, comme réaliser des interrupteurs sur des gouttes par exemple [106]. Les méthodes les plus faciles à mettre en œuvre dans notre cas sont les méthodes externes telles que l'utilisation de modules Peltier comme on retrouve dans le banc de cristallisation.

- l'outil doit être compatible avec le rayonnement aux énergies utilisées en diffraction X des cristaux de protéines. Cet aspect influe sur le choix des matériaux pour confectionner le système microfluidique. Il existe pour cela plusieurs possibilités, notamment l'utilisation de Kapton [109–111], de PMMA [29], de COC [29, 112, 113], de la NOA 81 pour le SAXS [114], de matériaux non cités mais vraisemblablement similaires voire identiques au PMMA ou COC [115].

## 2.2.2 Matériaux utilisés

### 2.2.2.1 PDMS

Le poly(diméthylsiloxane), aussi appelé PDMS, est un polymère se présentant sous la forme d'un liquide visqueux et transparent à l'œil. Une fois réticulé (solidifié), il a la particularité d'être perméable à l'air et d'être suffisamment élastique (module de Young  $\sim 750$  kPa [116]) pour l'utiliser de manière à former des vannes dans certains systèmes microfluidiques [116–121]. Il existe deux types de PDMS très utilisés en microfabrication, le PDMS RTV-615 et le PDMS Sylgard 184 de Dow Corning. Dans les deux cas le mélange à un agent réticulant suivi d'un chauffage est nécessaire pour activer la réticulation du matériau. Le mélange se fait généralement dans les proportions massiques 1 :10 (agent réticulant :PDMS), ce ratio peut toutefois varier en fonction de l'utilisation. Le PDMS est très utilisé en microfluidique et sa technique de fabrication est très bien maîtrisée [122].

### 2.2.2.2 SU-8

La SU-8 est une résine photosensible négative qui est un polymère se présentant sous la forme d'un liquide visqueux. Le processus de réticulation est déclenché par l'exposition aux UV puis chauffage. Il est alors nécessaire de la développer dans un bain de Propylène Glycol Méthyl Ether Acétate (PGMEA) ayant pour but d'enlever la résine non réticulée. Toutes les parties insolées seront solidifiées alors que les parties non exposées disparaîtront avec le développement. Il existe différentes séries de SU-8, notamment les séries SU-8-20XX et SU-8-30XX de chez Microchem. La résine s'utilise habituellement en l'étalant sur une tournette avant exposition. En fonction de la résine choisie et de l'épaisseur de SU8 désirée différents protocoles de préparation sont donnés par le fabricant. Exemples sur la Figure 2.14 des épaisseurs atteignables en fonction du type de résine choisi. Cette résine sert généralement dans la conception de moule mais peut aussi être utilisée pour réaliser des puces complètes [123, 124].



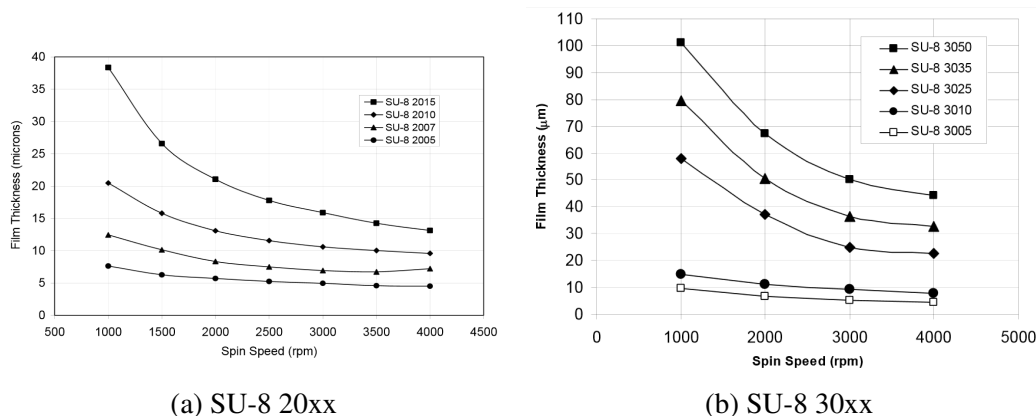


FIGURE 2.14 Épaisseurs atteignables par enduction centrifuge ("spin coating" en anglais) pour différents types de résines. Données Microchem/Kayaku Microchem.

### 2.2.2.3 NOA

La "Norland Optical Adhesive" ou la NOA est une résine photosensible dont le temps de réticulation va de quelques secondes à plusieurs minutes en fonction de la formulation choisie. Elle est visuellement transparente, imperméable à l'eau et l'air [125] et son avantage dans notre cas provient du fait que l'oxygène inhibe la polymérisation des radicaux libres utilisés pour construire le réseau du polymère [125]. Cette propriété permet d'envisager des puces à plusieurs étages en effectuant plusieurs insolations. La polymérisation radicalaire est une voie de polymérisation par laquelle un polymère se forme par l'addition successive de radicaux libres. La polymérisation peut donc être inhibée ou ralentie en présence de dioxygène. Lors de la conception de la puce en NOA 81, ce phénomène est utilisé pour permettre la fabrication d'une puce à plusieurs étages. Lorsque la NOA 81 est déposée par capillarité sous le tampon de PDMS, du fait de la perméabilité à l'air du PDMS, seule une fine couche de la NOA 81 est en contact avec l'oxygène de l'air. Ainsi, lors de l'insolation, cette couche ne réticulera pas complètement permettant ainsi le dépôt d'une lamelle de verre à insoler à nouveau pour fixer le nouvel élément à la puce.

### 2.2.2.4 PMMA

Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) est un polymère thermoplastique optiquement transparent souvent vendu sous la forme de plaque, et qui représente une bonne alternative au verre. Là où une plaque de PMMA de 1 mm sera très rigide (comparable à une plaque de verre de 1 mm), une plaque de 175  $\mu\text{m}$ , quant à elle, sera très flexible. Il a l'avantage de présenter une faible absorption et diffusion (pour des épaisseurs de 230-250  $\mu\text{m}$ ) aux longueurs d'ondes de 0,98  $\text{\AA}$  et 1,54  $\text{\AA}$  [29]. C'est la principale raison qui en fait un matériau de choix pour notre système microfluidique.

### 2.2.2.5 Kapton

Le Kapton est un film de polyimide développé par DuPont. Il est très flexible et existe notamment sous la forme de film adhésif. Le Kapton arbore une couleur jaune orangée (cf. Figure 2.15) et est visuellement transparent pour de petites épaisseurs.

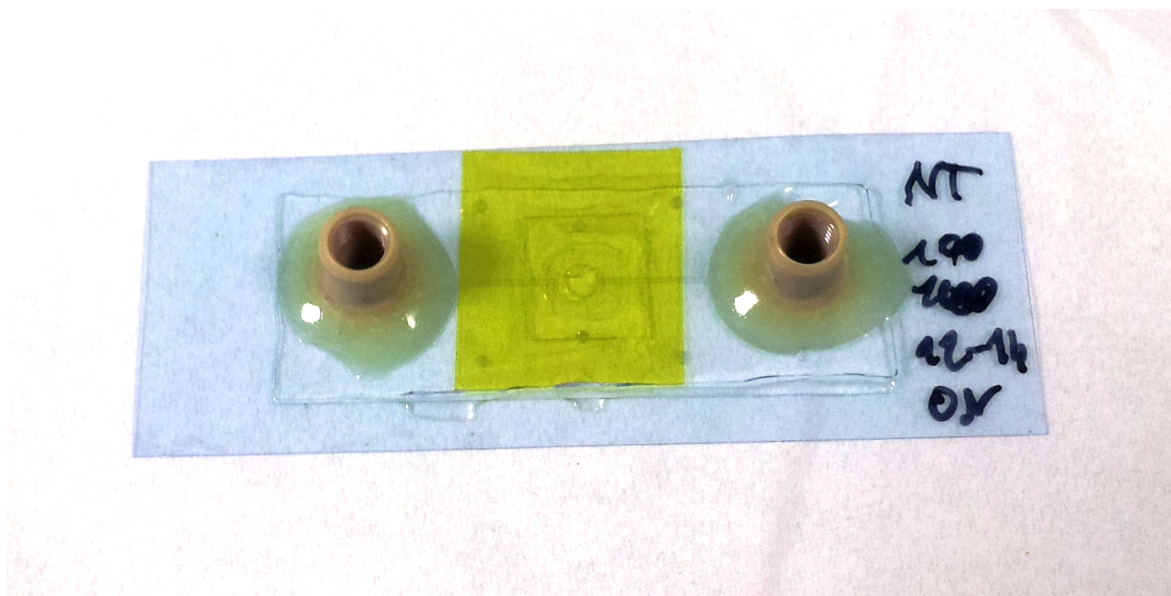


FIGURE 2.15 Photographie d'une puce microfluidique avec un film de Kapton jaune orangé disposé sur une partie de sa surface.

Le Kapton est adapté aux expériences faisant intervenir les rayons X à des énergies intenses car il possède une bonne résistance mécanique, il est relativement insensible aux dommages radiatifs [126] et il est presque transparent aux rayons X [109].

### 2.2.2.6 COC

Le copolymère d'oléfine cyclique (COC) est un polymère amorphe qui existe sous diverses formes. Ces diverses formes sont basées sur des types de cycles monomériques variés et différentes méthodes de polymérisation. Nous ne nous attarderons pas davantage sur le COC car nous n'avons finalement pas utilisé ce type de matériau mais il est intéressant de noter qu'on le retrouve dans divers systèmes microfluidiques faisant notamment intervenir une compatibilité avec le rayonnement X [29, 112, 113].

## 2.2.3 Microfabrication

### 2.2.3.1 Masques pour photolithographie

Afin de concevoir notre système microfluidique il nous faut réaliser des moules en SU-8. La réalisation d'un moule en SU-8 nécessite un ou plusieurs masques qui servent à définir le motif du futur moule. Pour cela le logiciel CleWin3 a été utilisé. Il permet de concevoir des réseaux de canaux pouvant être imprimés sur feuilles transparentes en négatif ou en original.

Si plusieurs masques sont créés pour une même puce il est possible de réaliser un moule à plusieurs couches. Dans le cas d'une superposition de couches, d'un motif d'alignement servant de repère pour caler une épaisseur sur une deuxième. Dans notre cas deux motifs sont superposés comme montré sur la Figure 2.16. L'utilisation des masques sera décrite plus loin.

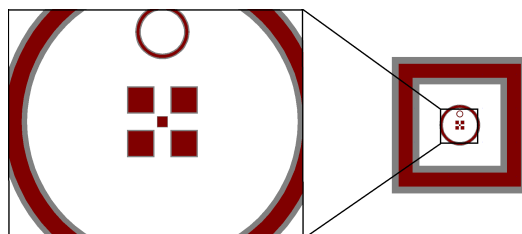


FIGURE 2.16 Schéma du motif d'alignement où l'on peut voir les deux épaisseurs, l'une rouge et l'autre grise, échelle en noir 4 mm.

### 2.2.3.2 Conception de moules SU-8

**Cette partie explique succinctement les grandes étapes pour concevoir nos moules en SU-8 :**

- 1) stocker la SU-8 3000 à température ambiante avant utilisation.
- 2) nettoyer un wafer de silicium à l'aide d'isopropanol, acétone puis isopropanol à nouveau (Sigma Aldrich, pureté  $\geq 99,5\%$ ).
- 3) activer la surface du wafer au plasma pour augmenter la mouillabilité de cette surface et garantir une bonne adhésion avec la SU-8.
- 4) déposer le wafer dans une enceinte à plasma 45 s avec un vide oscillant entre 500 et 1000 mTorr.
- 5) disposer le wafer sur la tournette (machine utilisée : SPIN 150).
- 6) déposer 1 mL environ de SU-8 sur le wafer et choisir le programme de la tournette en fonction de la hauteur voulue (cf. Protocole Microchem SU-8 3000).
- 7) chauffer le tout progressivement (étape "soft bake") en fonction du protocole.
- 8) attendre le refroidissement.
- 9) scotcher le 1er masque sur une plaque de verre de l'aligneur pour la première exposition.
- 10) mettre la plaque dans l'exposeur aux UV au dessus du wafer préparé précédemment.
- 11) ajuster le WEC ("Wedge Error Compensation" voir Figure 2.17) qui sert à paralléliser la plaque de verre avec le masque et le wafer.
- 12) exposer aux UV.
- 13) chauffer le wafer exposé (étape "post exposure bake").

Une fois toutes ces étapes terminées il convient de recommencer à nouveau sur le wafer existant obtenu à l'étape 13). Les différences sont exposées ci-après. A l'étape de l'exposition aux UV (étape 12), le nouveau masque doit être aligné sur le wafer existant grâce aux motifs d'alignement (Figure 2.16). Enfin après l'étape de "post exposure bake", le wafer doit être développé dans du PGMEA (acétate de l'éther monométhyle du propylène glycol)

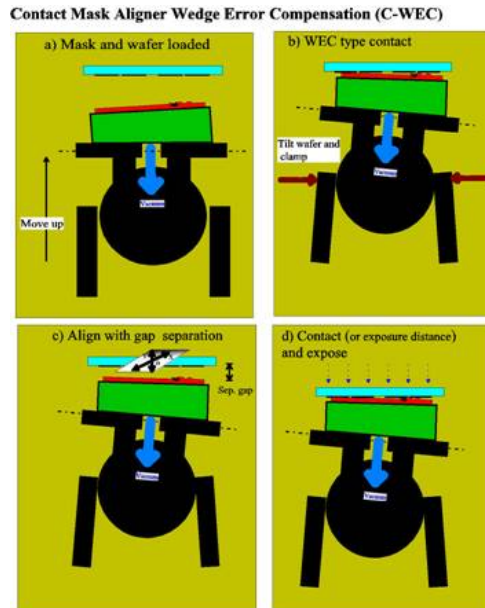


FIGURE 2.17 Schéma indiquant comment disposer le masque sous la plaque de verre du microscope. Depuis le site web de l'EPFL (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne).

pour enlever la résine non réticulée. Pour stopper le développement le wafer est aspergé d'isopropanol puis séché à l'azote.

### 2.2.3.3 Analyse des lithographies

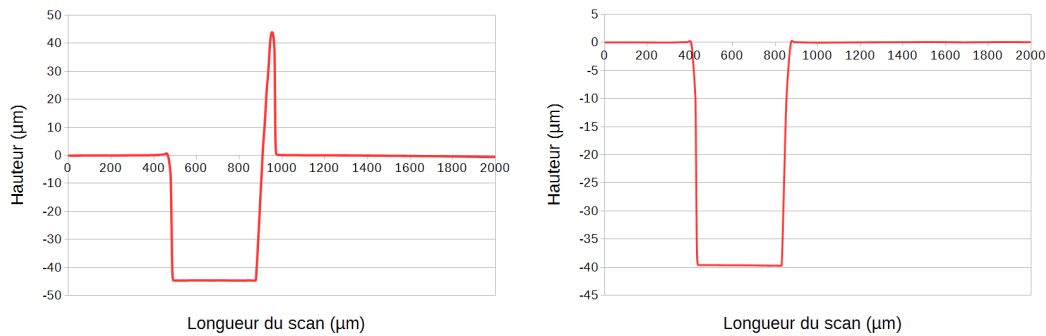
Les épaisseurs des lithographies ont été analysées avec un profilomètre Dektak. L'appareil possède 2 dynamiques maximum susceptibles de nous intéresser : 65  $\mu\text{m}$  ou 252  $\mu\text{m}$ . La longueur à analyser, le temps d'analyse, et le type de profil de surface envisagé « collines » ou « vallées » doivent être choisis. Des profils de hauteur sont présentés sur la Figure 2.18. Cependant la Figure 2.18a montre une forte hausse après le canal permettant de constater que l'étape de développement n'est pas suffisante contrairement à la Figure 2.18b où seul le canal sans excédant est observé. Dektak est donc un bon indicateur pour vérifier la qualité du développement au PGMEA lorsqu'aucune trace apparente de la résine n'est visible à l'œil nu.

### 2.2.3.4 Préparation du PDMS et du tampon

Le PDMS est utilisé dans le but de réaliser des tampons servant à la confection des puces microfluidique.

#### Description succincte du protocole :

- 1) réaliser un moule standard avec un ratio massique 10 :1 de PDMS :réticulant.
- 2) mélanger énergiquement jusqu'à former de nombreuses bulles d'air dans le mélange.
- 3) dégazer sous vide le mélange afin d'éviter la formation irréversible de bulles d'air au niveau du tampon.
- 4) une fois les bulles d'air disparues, verser délicatement le PDMS sur le wafer préalablement préparé comme décrit dans la Section 2.2.3.2.



(a) Résine résiduelle visible à la sortie du canal (b) Profil mécanique sans excédant de résine

FIGURE 2.18 Exemple de deux profils réalisés avec Dektak sur deux moules SU-8 différents, un mal développé où on retrouve un peu de résine résiduelle (a) et l'autre bien développé (b).

5) déposer à 65 °C dans l'étuve pendant 1 h.

A l'issue de cette préparation un tampon de PDMS est obtenu avec le motif inverse (en terme de profondeur) au moule en SU-8.

## 2.2.4 Conception des différents prototypes

### 2.2.4.1 Présentation des prototypes

#### Premier prototype

Pour répondre à tous les objectifs énoncés dans la Section 2.2.1, deux design ont été proposés. Le premier consistait à utiliser les propriétés d'écoulement dans les canaux et en particulier l'augmentation de la résistance hydrodynamique lorsque la dimension du canal diminue, une brève description de cette puce est réalisée dans cette section car ce design est abandonné par la suite. Un deuxième design a été réalisé par la suite car la première méthode n'a pas été satisfaisante. La puce est composée de deux niveaux dans les deux cas et nécessite d'avoir 2 masques qui sont présentés sur la Figure 2.19 pour le premier design.

Le masque rouge représenté sur la Figure 2.19 est le premier masque utilisé lors de la photolithographie. Une fois la première étape réalisée, le second masque en gris sur la Figure 2.19 est utilisé (cf. Section 2.2.3.2). Lors du développement tous les trous présents sur le premier masque traversent toute l'épaisseur de la SU-8 tandis que les zones rouges sont remplies de résine. Les canaux du masque en gris traversent la seconde couche de SU-8 uniquement. Les canaux ont des dimensions de 0,5 mm de large avec une longueur de canal du trou d'entrée au réservoir central d'environ 18,6 mm. Le canal alimentant le réservoir central fait 0,4 mm de large pour 0,1 mm de long. Le réservoir central fait 3 mm de diamètre. Deux lithographies différentes ont été réalisées, la première possède une hauteur de SU8 de 50 μm par couche soit un total de 100 μm, la deuxième 25 μm par couche pour une épaisseur totale de 50 μm.

A l'aide de Dektak le profil mécanique de certaines zones du moule a été mesuré. En pratique le moule de 100 μm, fait un total de 137,5 μm ± 2,3 μm de hauteur. Toutefois la

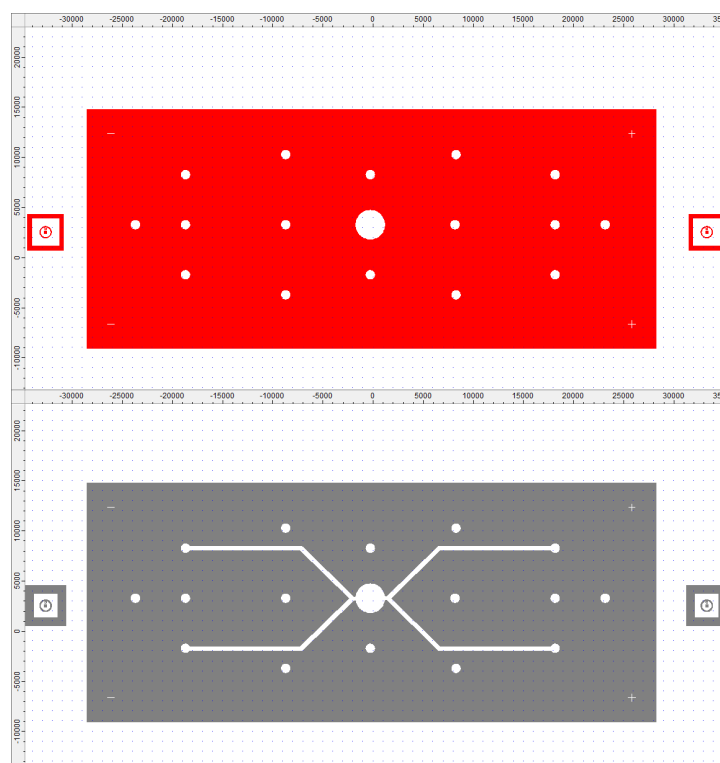


FIGURE 2.19 Représentation des deux masques réalisés sous Clewin3 et utilisés pour le premier prototype. En rouge, le masque utilisé pour la première exposition, en gris le masque utilisé pour la seconde exposition. L'échelle indiquée est en  $\mu\text{m}$ . Les masques sont inversés avant impression.

surface n'est pas homogène et certaines zones présentent un écart maximum de 9 % d'écart par rapport à la valeur moyenne. Les épaisseurs des deux couches sont identiques. Pour le moule de 50  $\mu\text{m}$ , on obtient une hauteur totale de moule de 70  $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ . Les 2 couches ne possèdent cependant pas les mêmes hauteurs, on note 30  $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$  pour la couche du bas et 40  $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$  pour la couche du haut (comprenant les canaux). Des inhomogénéités de la surface sont observées dans certaines zones. Ces premiers moules ont permis la réalisation des premiers prototypes, les écarts observés ne sont en rien gênant pour les expériences puisque les ordres de grandeur sont respectés. A l'issu de plusieurs essais nous avons convenu que la méthode de microfabrication utilisée est bien adaptée pour les hauteurs plus élevées contrairement aux puces plus fines qui ont tendance à être beaucoup plus fragiles lors de la fabrication, entraînant de nombreuses pertes. Aussi par la suite seules les puces réalisées avec le moule de 100  $\mu\text{m}$  seront considérées.

Le premier design a été choisi avec pour objectif de délivrer la protéine selon le schéma de la Figure 2.20. Dans un premier temps remplissage du réservoir de protéine se fait par obturation de deux entrées diagonalement opposées et introduction du liquide (étapes A et B). Une fois le réservoir rempli les deux entrées situées du même côté sont à leur tour obturées et l'huile adaptée (paraffine par exemple) est injectée pour fermer un côté de la puce (étape C). Le processus est réitéré pour l'autre côté de la puce (étape D). Au final une goutte de protéine devrait être encapsulée dans le réservoir central.

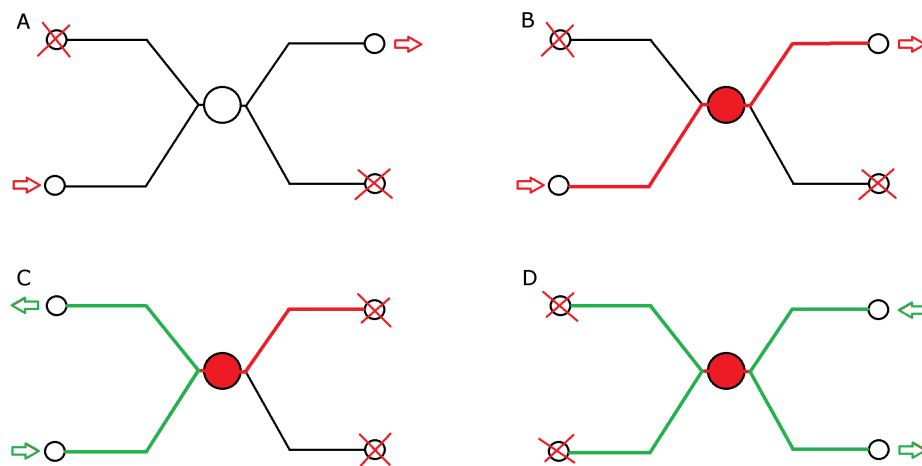


FIGURE 2.20 Schéma des étapes de remplissage du réservoir de protéine. En rouge la protéine, en vert l'huile utilisée pour encapsuler la protéine. Les croix rouges représentent une entrée fermée et les flèches représentent le sens de circulation du liquide.

D'après la théorie la résistance hydrodynamique, dans le cas de canaux rectangulaires, est proportionnelle au produit de la largeur par la hauteur au cube. Donc  $R \propto \omega h^3$  avec  $\omega$  largeur du canal en  $\mu\text{m}$ ,  $h$  hauteur du canal en  $\mu\text{m}$ . Un calcul approximatif ne prenant en compte que ces paramètres permet de calculer le rapport de résistance entre le canal d'entrée de la solution  $R_{sol}$  et le canal d'entrée dans le réservoir  $R_{res}$ . En supposant une hauteur de 100  $\mu\text{m}$  et en reprenant les largeurs précédemment citées pour cette puce, on obtient alors  $\frac{R_{res}}{R_{sol}} \sim 1,25$ .



Ce rapport pourrait être fortement augmenté en diminuant la hauteur de la puce au niveau du canal du réservoir mais compliquerait significativement la microfabrication. Bien que la différence de résistance hydrodynamique ne soit pas élevée, elle est existante et nos tests se sont basés sur cet aspect.

Néanmoins, en pratique des résultats différents sont obtenus. Tout d'abord le réservoir de protéine ne se remplit pas sans capturer de bulles d'air, une fois ces bulles formées il devient quasiment impossible de les éliminer du réservoir cf Figure 2.21.

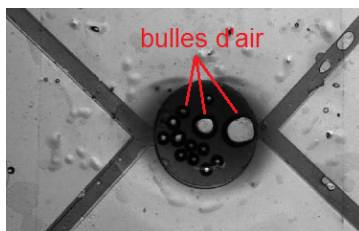


FIGURE 2.21 Image prise au microscope optique. Visualisation de bulles d'air dans le réservoir central après l'ajout d'un colorant.

De plus le remplissage d'un seul canal, comme illustré dans l'étape B de la Figure 2.20 est impossible dû à la compressibilité de l'air et tous les canaux se remplissent, avec toutefois une préférence pour les canaux non bouchés. Enfin lors de l'étape de fermeture, les lignes de courants de l'huile de paraffine passent par le réservoir central. Ainsi l'huile prend la place du colorant (ici le colorant remplace la protéine) dans le réservoir central. Cet effet peut être interprété en terme de mouillage. En effet en déposant une goutte d'eau et une goutte d'huile à la surface d'une puce en NOA 81, l'angle de contact  $\theta_{huile}$  est plus faible que l'angle de contact  $\theta_{eau}$ . Ceci traduit une meilleure affinité de l'huile à la NOA 81 en comparaison à l'eau. Ainsi l'huile a toujours préférence à épouser au maximum la NOA 81 par rapport à l'eau et chasse l'eau du réservoir central.

## Second prototype

Un deuxième design a été réalisé, où la solution de cristallisation est introduite dans les canaux et la protéine déposée sur la puce dans la chambre. L'idée diffère par rapport au premier prototype dans le sens où l'agent de cristallisation est introduit dans la puce et non la protéine. Sur la Figure 2.22 on peut voir 3 puces réalisées selon ce concept.

Ce nouveau prototype peut être utilisé de deux façons différentes décrites sur la Figure 2.23. Bien qu'en théorie les deux méthodes soient réalisables, d'un point de vue pratique la méthode 2.23a est plus aisée à mettre en œuvre. En effet dans la méthode 2.23b la membrane subit une pression vers l'extérieur ayant tendance à la déformer. Il devient alors délicat de déposer une goutte de protéine dans le puits. En revanche dans le cas 2.23a la membrane est parfaitement plane et la protéine est donc facilement déposée sur cette surface plane.



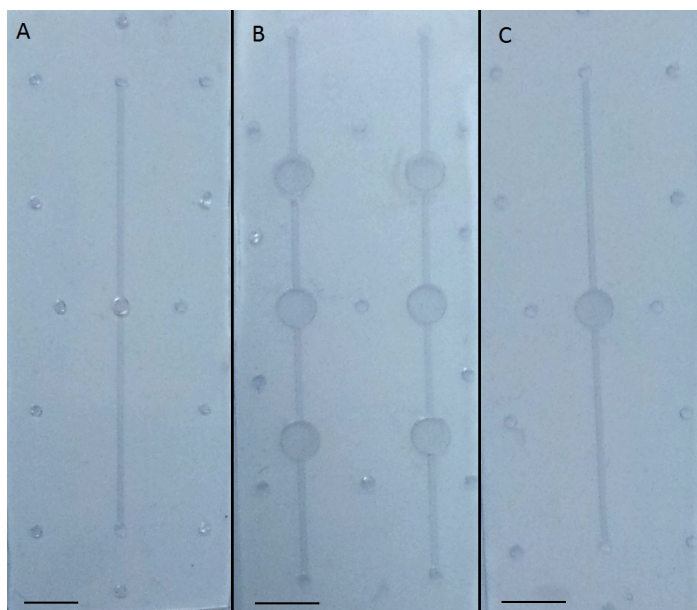
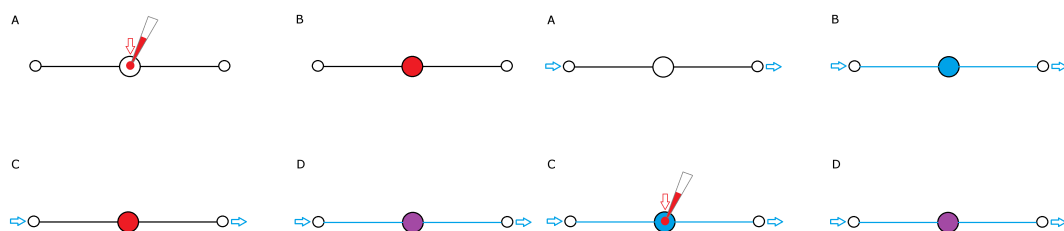


FIGURE 2.22 Photo de 3 prototypes, A, B et C réalisés selon la même procédure mais avec 3 designs différents. Echelle 0,5 cm.



(a) Introduction de la protéine puis de la solution de cristallisation  
(b) Circulation de l'agent de cristallisation puis dépôt de la protéine

FIGURE 2.23 Schéma des étapes de remplissage de deux façons différentes. En rouge la protéine, en bleu l'agent de cristallisation. Les flèches représentent le sens de circulation du liquide. Le triangle gris représente un cône de pipette.

### 2.2.4.2 Base du processus de conception

La conception et le protocole utilisés sont basés sur un processus décrit dans la littérature par Morel et al. [127]. Les autres techniques d'intégration de membrane commerciale telles que les serrages mécaniques ne sont pas pertinentes dans notre cas surtout du point de vue de la compacité de la puce. La taille de la puce ainsi que l'encombrement qu'elle représente doivent être minimisés suite au déplacement qu'elle subira dans le faisceau de rayons X pour les analyses *in situ*. Un nouveau protocole adapté à nos exigences a été établi à partir de cette technique qui utilise la NOA 81. Enfin des membranes en cellulose régénérée sont utilisées contrairement à Morel et al. [127] qui utilisent des membranes en polycarbonate avec une taille de pore trop élevée (pore cylindrique de 400 nm de diamètre) par rapport à nos applications biologiques avec les protéines (pore de taille d'environ 4 nm, donc de plusieurs ordres de grandeur inférieur selon la littérature [128]). Leur système est bien adapté aux applications telles que la culture cellulaire sur des objets biologiques de taille importante. Sur la Figure 2.24 on retrouve les étapes clés de construction du système microfluidique selon ces auteurs [127]. L'intégration de la membrane dans la NOA 81 est montrée 2.24a. Cette partie est ensuite fixée de manière irréversible sur une plaque de verre prétrouée (pour les entrées et sorties des liquides). La fermeture du système avec le serrage de la partie précédemment décrite sur une plaque de verre structurée avec des micropuits pour la culture cellulaire est illustrée en 2.24b, le tout est maintenu à l'aide d'aimants pour que la puce ne soit pas définitivement scellée mais pour que le processus soit réversible.

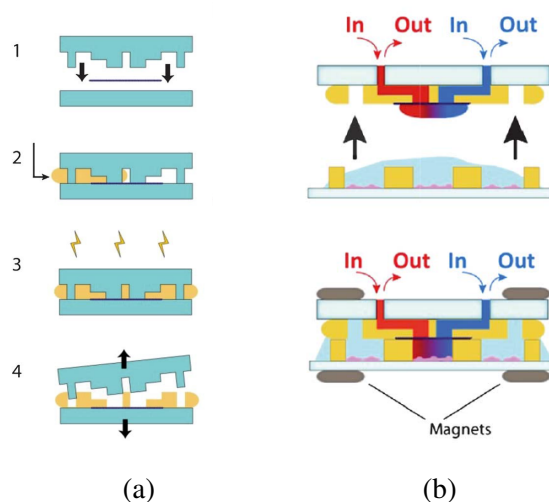


FIGURE 2.24 Schéma du processus de microfabrication développé par Morel *et al.*

### 2.2.4.3 Stratégies de conception

#### 1ère méthode

Ici est décrite succinctement notre première méthode de fabrication de la puce en NOA 81. La lithographie et les tampons associés au moule en question avec du PDMS en proportion

massique 10 :1 (PDMS :agent réticulant) doivent être préparés au préalable comme décrit précédemment. Un deuxième tampon de PDMS plat fabriqué par dépôt de PDMS sur un wafer nu sans structure est nécessaire.

La membrane de dialyse prédécoupée est déposée sur le tampon plat suivi du tampon texturé en coïncidence avec la membrane de dialyse. Le dispositif est dégazé sous cloche à vide puis la NOA est introduite par capillarité entre les tampons de PDMS. L'ensemble est ensuite exposé pendant un court instant à la lumière UV une première fois. Le tampon en relief est ensuite retiré du reste de l'assemblage qui est lui même déposé sur une lame de verre. Finalement une deuxième exposition plus longue visant à finaliser la réticulation de la NOA est réalisée. Après cette seconde exposition le dernier bloc de PDMS est retiré de l'assemblage pour avoir une puce telle que représentée sur la Figure 2.25.

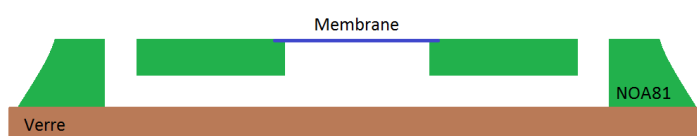


FIGURE 2.25 Représentation schématique de la puce réalisée à la fin du processus de microfabrication par la 1ère méthode.

Cette méthode a été utilisée presque exclusivement sur le premier prototype de puce. Après de nombreux essais il s'est avéré que la membrane n'était pas chimiquement collée à la NOA 81, entraînant des fuites après augmentation de la pression dans les canaux de la puce pour injecter les fluides. Pour palier à ce problème, deux possibilités ont été envisagées. Soit de modifier chimiquement la surface de la membrane pour réaliser un collage chimique de la membrane sur la NOA par fonctionnalisation de la membrane par silanisation, soit d'encaster la membrane entre plusieurs couches de résine.

Selon la littérature, la silanisation de la cellulose nécessite un équipement spécifique à la chimie permettant notamment de travailler sous atmosphère contrôlée pour certains protocoles. Exemple pour le greffage d'une molécule d'aminopropyltriéthoxysilane sur hydroxyapatite (valable pour tout type de polymère comportant des sites OH sur la surface) [129], la fonctionnalisation du matériau nécessite le travail sous atmosphère d'argon. Dans d'autres cas la silanisation n'est pas réalisée sur des fibres de cellulose régénérée mais sur de la cellulose microcristalline [130], perles en cellulose régénérée [131]... Bien que d'autres méthodes, plus récentes, permettant de fonctionnaliser des feuilles de cellulose en une étape existent [132], la méthode d'encastrement nous a paru plus facile à mettre en œuvre. Nous avons établi une autre méthode de fabrication faisant en partie l'objet d'un brevet : Spano M., Salmon J-B., Junius N. (2015) [133].

## 2ème méthode

La première méthode de fabrication a été améliorée en remplaçant le bloc de PDMS plat par un bloc structuré. Cette procédure est comparable à la première méthode, à quelques

exceptions près, mais présente l'avantage d'avoir une membrane complètement enveloppée par la NOA sauf sur la zone d'échange de liquide. Les différentes étapes simplifiées sont représentées depuis l'étape de la lithographie sur la Figure 2.26, à lire de bas en haut.

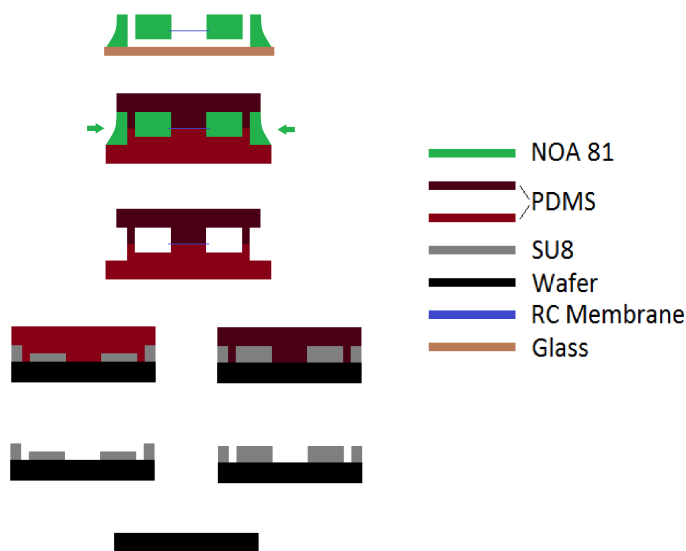


FIGURE 2.26 Seconde méthode de fabrication, du bas vers le haut.

La première étape consiste à concevoir deux lithographies différentes, une à un niveau, avec plots de soutien et entrées des canaux ; l'autre à deux niveaux, avec plots de soutien, entrées des canaux, puis sur une seule épaisseur les canaux. La membrane de dialyse est ensuite intercalée entre les deux tampons. En pratique mettre en coïncidence parfaite les deux tampons est difficile, voire impossible, et ceci d'autant plus que le motif de la puce est simple ne laissant que très peu de repères pour faire coïncider les deux parties. Malgré cette difficulté, les deux blocs sont alignés à l'œil et éventuellement au microscope optique si l'alignement pose problème. La NOA est ensuite insérée par capillarité comme décrit précédemment (section 2.2.4.3) et une première exposition aux UV de courte durée est réalisée. Le tampon supérieur avec la couche de NOA est retiré de l'assemblage. Il est alors déposé sur une plaque de verre ou de PMMA puis exposé une seconde fois de manière prolongée.

Cette méthode a été utilisée sur le second prototype de puce évitant ainsi les fuites de fluides observées avec la première méthode de microfabrication. Des tests en pression ont été réalisés et seront décrits ultérieurement dans la Section 3.2.2.3.

#### 2.2.4.4 Informations complémentaires

Les différentes méthodes de microfabrication décrites ici mettent en jeu la NOA 81 comme résine constituante de la puce. Cependant pour améliorer l'adhésion de la NOA sur le PMMA deux autres résines de chez Norland Optical ont été testées dont l'une possède des propriétés proches de la NOA 81, l'autre étant plus adaptée au collage sur plastique (NOA 61 et la NOA 68). La NOA 61 est décrite comme ayant une bonne adhésion au plastique (similaire à

la NOA 81) bien que la polymérisation ne soit pas inhibée par le dioxygène, et le temps de réticulation un peu plus long que la NOA 81. La NOA 68, quant à elle, est décrite comme ayant une bonne adhésion à de nombreux plastiques comme les "acryliques", autre nom parfois utilisé pour le PMMA, mais aussi les polycarbonates ou les cellulose acétate butyrate.

### **Temps de remplissage de la résine**

Au cours des différents essais de conception de puce avec ces résines la viscosité est apparue comme un paramètre critique dans la production d'un grand nombre de puces en peu de temps. La NOA 61 et 81 ont des viscosités similaires de 0,3 Pas à 25 °C alors que la viscosité de la NOA 68 est de 15 à 18 fois supérieure soit 4,5 à 5,5 Pas. Cette différence entraîne un très long temps de remplissage par capillarité entre les deux tampons. On peut noter un temps variant de 45 à 60min en fonction de l'absence ou présence de bulles d'air entre les tampons alors que la NOA 61 et 81 ont des temps de remplissage de l'ordre de 5 à 10 min.

### **Temps d'exposition**

Les expositions en lumière UV ont été réalisées dans une enceinte UVITEC Cambridge réglée à 365 nm. Deux paramètres influent fortement sur le temps d'exposition de la NOA, le premier est le type de PDMS utilisé. En effet lors des deux expositions la NOA se trouve sous une épaisseur de PDMS, or pour une même énergie déposée la NOA se trouvant sous le PDMS sera plus ou moins réticulée si le PDMS est du Sylgard 184 ou du RTV-615. Expérimentalement on a pu noter un facteur deux en terme de temps d'exposition entre ces deux matériaux. Par exemple pour la première exposition de la NOA 81 avec le PDMS Sylgard 184 on va déposer une énergie de  $100 \text{ mJ cm}^{-2}$  contre  $200 \text{ mJ cm}^{-2}$  pour le PDMS RTV-615. Ces valeurs supposent une épaisseur de PDMS équivalente dans les deux cas. Cette observation est empirique et le facteur entre les deux types de PDMS n'est peut-être pas exactement de deux cependant pour nos expériences ce facteur s'est avéré efficace.

Les résines possèdent également des temps d'exposition différents à une puissance donnée. La NOA 81 est la résine qui réticule le plus rapidement suivie par la NOA 68 qui réticule avec un temps deux fois plus long et la NOA 61 qui réticule avec un temps trois fois plus long par rapport à la NOA 81. Ainsi les deux effets sont cumulatifs, par exemple pour une exposition de NOA 81 avec la Sylgard 184 de  $100 \text{ mJ cm}^{-2}$ , il faudra  $400 \text{ mJ cm}^{-2}$  seront nécessaires pour obtenir le même résultat avec la NOA 68 et un tampon de RTV-615.

#### **2.2.4.5 Conclusion**

Finalement, nous avons réussi à concevoir un système microfluidique intégrant une membrane de dialyse encastrée entre plusieurs épaisseurs de puce et permettant un écoulement en flux continu d'une solution de cristallisation. Le principal défi provient de l'intégration de la membrane de dialyse afin d'éviter toute fuite de liquide. Bien que l'intégration de la

membrane ne soit pas réalisée par un collage chimique, nous avons pu, par une méthode d'encastrement, éviter toutes fuites. Un autre élément important de ce dispositif concerne les matériaux qui composent la puce. Il est possible de réaliser des puces sur verre pour une meilleure rigidité, c'est néanmoins prohibé dans le cas où la puce serait utilisée dans le rayonnement X, ou sur du PMMA si des analyses au rayonnement X ont lieu sur des cristaux par exemple.

Plusieurs prototypes de puces ont été réalisés, un prototype à 6 puits permettant l'écoulement en parallèle de deux solutions de cristallisation dans des conditions différentes et deux prototypes à un puits (cf. Figure 2.22). Le volume de la chambre de protéine est de  $\sim 0,7 \mu\text{L}$  pour les puits les plus volumineux et de  $\sim 0,2 \mu\text{L}$  pour la puce avec le plus petit puits.

De plus la méthode de fabrication est rapide et peu onéreuse. Il est possible de concevoir entre 30 et 40 puces microfluidiques en une journée en travaillant avec plusieurs tampons de PDMS préparés à l'avance. Les tampons sont réutilisables un grand nombre de fois après un nettoyage approprié (lavages successifs à l'isopropanol, acétone puis isopropanol).

## 2.2.5 Thermorégulation

### 2.2.5.1 Présentation du système

De nombreuses méthodes détaillées dans la section 2.2.1 sont envisageables pour assurer un contrôle précis de la température. Dans notre cas une régulation *via* un système externe a été mise en place. Le contrôle est réalisé par l'utilisation de modules Peltier. Deux aspects sont importants pour nous :

- contrôler le plus précisément possible la température d'une puce microfluidique et en pratique avec une précision au minimum de ( $\pm 0,5 \text{ K}$ ).
- avoir plusieurs températures au sein même d'une puce pour parcourir différentes conditions de cristallisation (e.g. +278, +283, +288, +293, +298 K).

### L'effet Peltier

Nous allons à de nombreuses reprises utiliser le terme d'effet Peltier/module Peltier par la suite. Aussi, il convient de présenter succinctement ce phénomène. De manière simplifiée, l'effet thermoélectrique permet de convertir une différence de température en tension et réciproquement.

L'effet Peltier, lui, se manifeste dans des jonctions comprenant deux types de semi-conducteurs différents et parcourus par un courant. Il y a alors une libération de chaleur à une jonction et une absorption de chaleur à l'autre jonction pour chaque alternance de semi-conducteur. Par exemple, dans le cas d'une jonction associant deux semi-conducteurs dopés N et P, la jonction est refroidie quand le courant circule de N vers P et chauffée dans le cas contraire. La relation entre la quantité de chaleur  $Q_{\text{Peltier}}$  et le courant injecté,  $i$ , est décrite dans l'équation (2.1) avec  $\pi_{NP}$  le coefficient Peltier de la jonction.

$$Q_{\text{Peltier}} = \pi_{NP}i \quad (2.1)$$

### 2.2.5.2 Matériels et méthodes misent en œuvre

#### Matériel de mesure et de régulation

Les modules Peltier utilisés dans cette étude sont des modules Peltier de taille 9x9 mm et 12x25 mm (Adaptative, fournisseur Radiospares). Quelques caractéristiques de ces modules sont décrites dans le tableau 2.2. Ces modules ont été alimentés à l'aide d'une alimentation ajustable stabilisée Metrix AX503 dont 2 voies ont été utilisées, une voie par Peltier. La tension de sortie maximale est de 30 V et le courant de sortie maximum 2,5 A.

	Module Peltier A	Module Peltier B
Zone active (mm)	9x9	12x25
Puissance (W)	2,9	10,4
Ampérage (A)	2,2	2,2
Tension (V)	2,1	7,8
Différence de T max (K)	74	74

TABLE 2.2 Données de deux modules Peltier utilisés

Les thermocouples utilisés sont des thermocouples J avec une gamme de température d'opération variant de -50 °C à 250 °C. Bien que leur gamme de température soit plus restreinte que les thermocouples K (les plus communs), ils possèdent une meilleure sensibilité que ces derniers. Cette gamme de température est suffisante pour les mesures effectuées, bien au delà de ce que l'on cherche à mesurer. Sur la Figure 2.27, on peut voir les caractéristiques tension/température de différents types de thermocouples à haute température.

#### Matériel d'acquisition

Les thermocouples sont branchés sur deux cartes d'entrées analogiques WAGO 753-469 pour thermocouples configurables. Chaque carte permet le branchement de 2 thermocouples pour un total de 4 thermocouples. La communication entre les cartes WAGO et l'ordinateur est réalisée en MODBUS via un coupleur Ethernet en tête de station (WAGO 750-352). Enfin une carte 750-600 est ajoutée à l'extrémité, elle sert de terminaison du bus interne et garantit une circulation correcte des données. Sur le PC l'enregistrement est réalisé *via* LabVIEW. La configuration utilisée pour les expériences est représentée sur la Figure 2.28. Le bloc du bas illustre l'alimentation des modules Peltier en tension, le bloc en L schématise l'acquisition des données de température via les thermocouples.

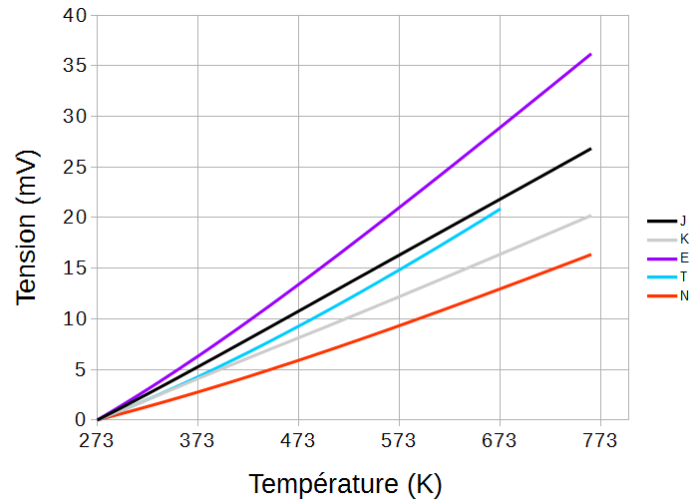


FIGURE 2.27 Caractéristiques tension/température de différentes sondes de température, données publiques obtenues sur le site du "National Institute of Standards and Technology (NIST)".

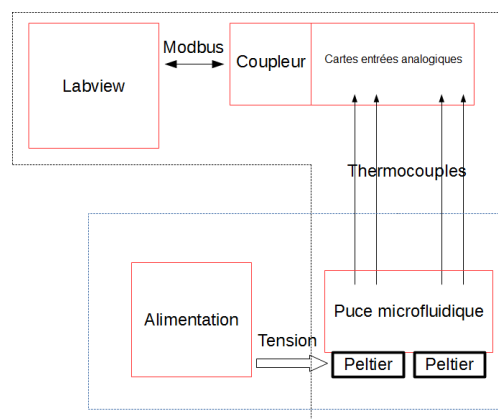


FIGURE 2.28 Diagramme général des communications.



## Pièces conçues pour l'expérience

Pour transférer la chaleur depuis les modules Peltier vers la puce, un système conducteur de chaleur reliant ces deux éléments a été nécessaire. Pour cela plusieurs pièces métalliques ont été fabriquées pour assurer le contact thermique entre les modules Peltier et la puce. Un premier prototype a consisté en une grande plaque en aluminium percée permettant d'y déposer une puce. La plaque est pliée sur un bord (en forme de L) ce qui permet d'y déposer nos modules Peltier. Plusieurs pièces en cuivre séparées les unes des autres ont également été réalisées afin de contrôler la température sur chaque colonne de la puce, ce qui permet d'imposer un gradient de température contrôlé le long des différents compartiments de dialyse, plutôt que de contrôler la température d'une plaque entière.

Afin de maintenir le dispositif complet comprenant le refroidisseur à eau, les modules Peltier, les plaques en métal, les sondes de température et la puce, un portepuce en plastique a été conçu. Ce portepuce a été réalisé par impression 3D à partir d'un modèle que nous avons réalisé sous Solidworks. Sur la Figure 2.29 un aperçu du modèle que nous avons réalisé sur le logiciel de CAO (Conception Assistée par Ordinateur). Le portoir possède un fond percé pour pouvoir visualiser à l'aide d'un microscope dans la puce. Il possède aussi des ouvertures sur les côtés pour recevoir les éléments conducteurs en cuivre et une partie supérieure détachable pour maintenir la puce contre la partie métallique qui va être contrôlée en température.

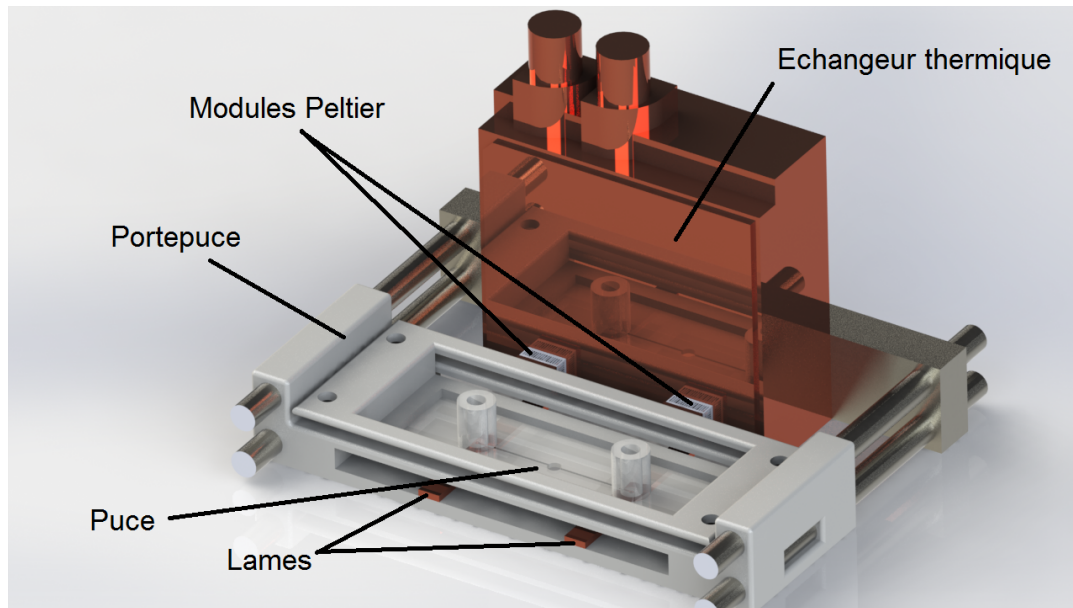


FIGURE 2.29 Le prototype du système de portepuce complet, accompagné d'un bloc à circulation d'eau en cuivre, réalisé avec Solidworks.

## Méthode

La température est récupérée au niveau des thermocouples par l'intermédiaire de la carte WAGO sous Labview via le protocole MODBUS. Une interface graphique dédiée

permet de récupérer la valeur numérique des différents thermocouples, d'afficher le graphique correspondant et d'enregistrer les données toutes les secondes.

Les thermocouples sont disposés sur une puce à 6 puits au niveau des réservoirs extérieurs (cf. Figure 2.30). Le contact est réalisé en maintenant les thermocouples mécaniquement contre la zone à mesurer à l'aide d'un adhésif placé sur les fils du thermocouple à l'extérieur de la zone de mesure. La température circulant dans les blocs échangeurs a été fixée à 285 K et recircule à l'aide d'un refroidisseur Julabo FL601, en pratique la température au niveau des échangeurs thermiques est de 281 K.

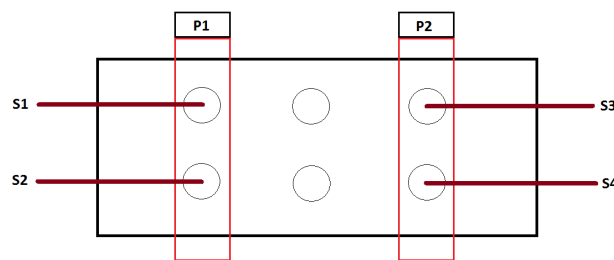


FIGURE 2.30 Schéma du placement des sondes et des modules Peltier pour les mesures sur les lames de cuivre. P1 et P2 correspondent aux modules Peltier. S1 à S4 correspondent aux sondes de température.

Plusieurs tests préalables ont été réalisés afin de corriger les différences de température de chaque thermocouple car à une température donnée, chacun des 4 thermocouples mesurait une température différente. Dans le cas où une mesure absolue s'avère nécessaire, une mesure a été réalisée avec les thermocouples plongés dans un tube contenant de l'eau jusqu'à atteindre l'équilibre statique au niveau thermique. La température de l'eau a été mesurée à l'aide d'un thermomètre classique et d'un thermomètre infra-rouge. La valeur mesurée par les thermocouples a été corrigée pour correspondre à la valeur de température mesurée par les thermomètres à  $\pm 1$  K. Pour certaines mesures la variation relative de température est à définir plutôt que la valeur de température absolue, en fonction de la position de la sonde sur la puce par rapport à la température initiale par exemple. Les contacts des thermocouples avec la puce et de la puce avec les supports en métal n'étant pas parfaits, la température de chaque thermocouple a été corrigée de la façon suivante. Une mesure longue a été effectuée avec les thermocouples en contact de la puce sans appliquer de température jusqu'à ce que la température soit à l'équilibre statique. Les thermocouples sont ensuite corrigés les uns par rapport aux autres par rapport à la température moyenne mesurée sur chaque thermocouple de sorte que la température de chaque thermocouple soit la même. Toutes les courbes présentées ici sont des courbes corrigées du décalage induit par chaque thermocouple.

Les paragraphes suivants décrivent deux méthodes utilisées pour contrôler la température dans les puces microfluidiques.

### 2.2.5.3 Système plaque

Le système plaque consiste en une plaque d'aluminium en forme de L et percée au niveau des réservoirs pour la visualisation dans les puits (cf. Figure 2.31a). L'aluminium, au même titre que le cuivre possède une bonne conductivité thermique dans la gamme de température de nos applications comme montré sur la Figure 2.31b. On peut noter à 293 K une conductivité thermique de l'ordre de  $385,0 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  pour le cuivre contre  $205,0 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  pour l'aluminium pur [134].

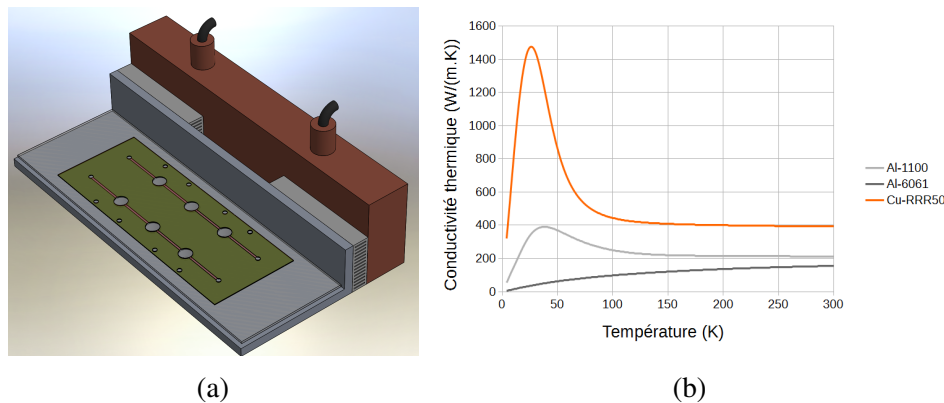


FIGURE 2.31 a) Vue réalisée avec Solidworks du système avec la plaque d'aluminium, les modules Peltier, une puce et un bloc échangeur thermique sans le portepuce b) Conductivité thermique du cuivre RRR50 et de deux type d'aluminium, données publiques obtenues sur le site du "National Institute of Standards and Technology (NIST)".

Les deux modules Peltier étant en contact avec la plaque, la modification de la température sur un des modules va affecter la répartition de la température sur la plaque pour atteindre un nouvel équilibre. Si seul le module Peltier 2 (P2) est utilisé pour chauffer, Figure 2.32, la sonde 3, qui est la plus proche du module monte en température plus rapidement que les autres sondes avec un temps de montée maximal de l'ordre de  $7 \text{ K min}^{-1}$ . Elle atteint aussi une température d'équilibre plus élevée que les autres sondes, de l'ordre de  $+0,4 \%$  au maximum. A titre comparatif la sonde 2, qui est la plus éloignée de P2 met plus de temps à monter en température avec une vitesse approximative de  $6 \text{ K min}^{-1}$  et atteint une température finale plus faible que les autres sondes.

De nombreux effets parasites viennent cependant perturber les mesures, parmi les plus importantes, le contact physique entre le thermocouple et le matériau et les flux d'air dans la pièce. L'erreur maximale sur la valeur donnée par le thermocouple peut être estimée en mesurant plusieurs fois la même température en retirant et en remplaçant le thermocouple, elle est de l'ordre de  $\pm 0,5 \text{ K}$ .

Sur la Figure 2.33, 2 modules Peltier du modèle B (cf. Tableau 2.2) ont été utilisés. Dans un premier temps la tension aux bornes de P1 est de  $-1 \text{ V}$  et l'opposé aux bornes de P2, donc P2 chauffe et P1 refroidit. S3 et S4 sont donc à une température plus élevée que S1 et S2, avec un minimum d'environ  $286,5 \text{ K}$  pour S1 et un maximum de  $288,5 \text{ K}$  pour S3 qui sont les plus proches des modules P1 et P2 respectivement. P1 et P2 sont ensuite alimentés à  $+1 \text{ V}$ . S1 et

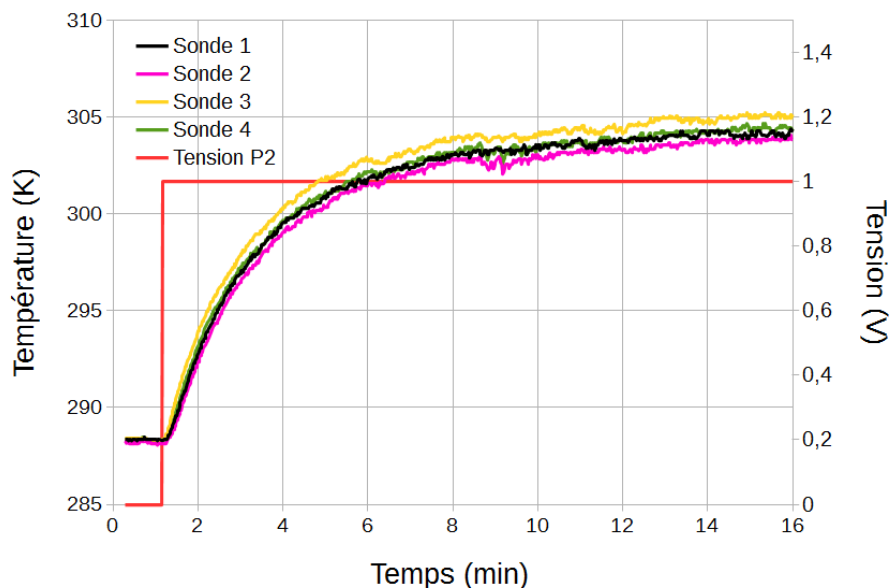


FIGURE 2.32 Chauffage du Peltier 2 avec le modèle de Peltier A (cf. Tableau 2.2) (axe de gauche) et tension appliquée aux bornes du Peltier 2 (axe de droite).

S3 atteignent alors la même température de  $299,0 \text{ K} \pm 0,4 \text{ K}$ . Il en est de même pour S2 et S4 avec la température de  $298,2 \text{ K} \pm 0,3 \text{ K}$ . Le système est ensuite à nouveau ramené dans l'état initial P1 à  $-1 \text{ V}$ , P2 à  $+1 \text{ V}$ . On observe un retour vers des températures proches des valeurs initiales mais avant le retour à l'équilibre le système est à nouveau déstabilisé. P1 et P2 sont à  $+1 \text{ V}$ . On retrouve une gamme de température similaire à la précédente, sous forme de dent de scie, avec une petite augmentation de la température de  $0,5 \text{ K}$  dû à la température des sondes qui n'étaient pas complètement revenues à l'état de départ au moment du changement de la tension. Les temps de chauffe sont équivalents pour cette comparaison. Enfin la dernière partie de la courbe correspond à l'inversion des tensions aux bornes de P1 et P2. Ainsi P1 chauffe et P2 refroidit. On observe cette fois une température maximale pour S1 de  $288,0 \text{ K}$  et un minimum pour S3 de  $286,0 \text{ K}$ .

Il est important de s'assurer de la stabilité temporelle de la température. Une acquisition a été réalisée sur une nuit (pendant 12 h) afin de vérifier l'absence de dérive en température. La Figure 2.34 montre l'évolution de la température sur les 4 sondes en fonction du temps, durant les deux premières heures le système s'est remis en température suite aux expériences précédentes. Puis la température se stabilise sur le reste de la nuit. L'écart-type relatif est calculé à partir de l'écart-type,  $S = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=0}^n (x_i - \bar{x})^2}$ , pour N valeurs  $x_i$  de température en fonction du temps. Finalement l'écart-type relatif est le rapport de S sur la moyenne des N valeurs de température et il est ici de l'ordre de  $0,03$  à  $0,05 \%$ . Les variations proviennent de fluctuations statistiques de la mesure mais aussi de la variation de la température ambiante sur la nuit et ne sont pas représentatives d'une dérive.

Comme expliqué ci-avant, un changement de température sur P1 ou P2 va modifier l'équilibre thermique de la puce entière. Sur la Figure 2.35 la tension de P1 et P2 a été

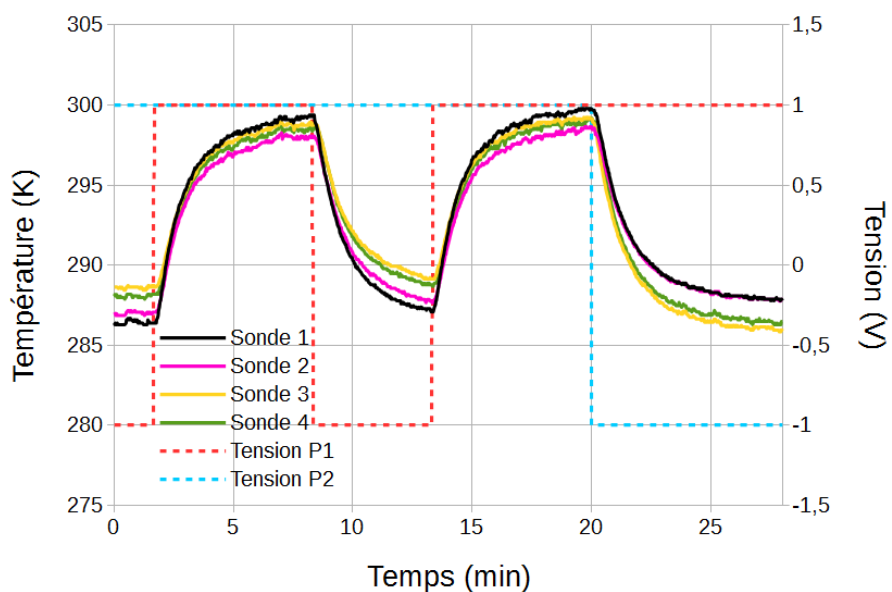


FIGURE 2.33 Variation de la température sur les 4 sondes selon la tension appliquée (axe de gauche) et tension appliquée aux bornes des modules Peltier (axe de droite) avec deux modèles de Peltier B (cf. Tableau 2.2).

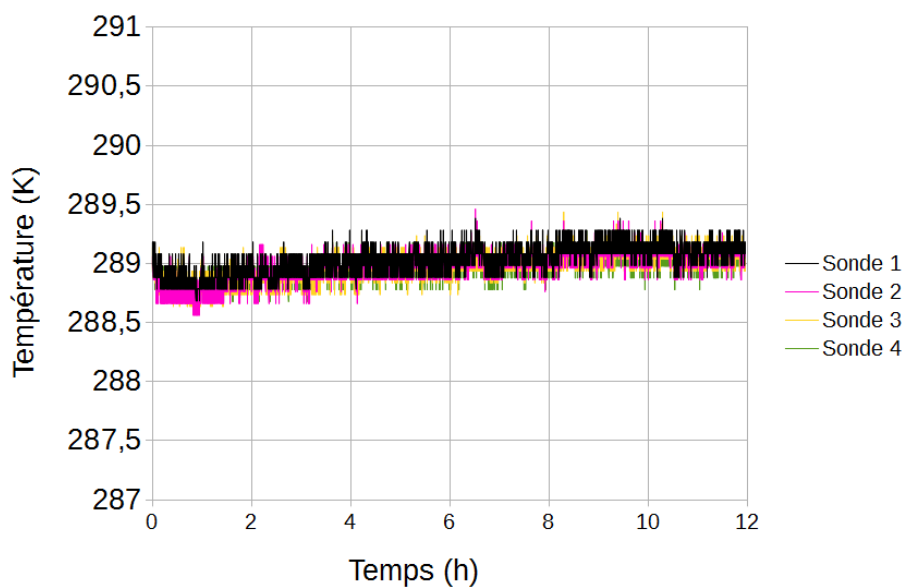


FIGURE 2.34 Evolution de la température sur les sondes de température pendant 12 h.

variée de sorte que P1 chauffe de plus en plus et P2 refroidisse de plus en plus. Ceci permet d'augmenter la différence de température entre S1 et S3 mais aussi l'écart entre S1 et S2 et entre S3 et S4. Ainsi un gradient de température est formé dans deux directions. Plus la différence de tension d'alimentation est élevée et plus le gradient de température est élevé. Cependant à la température locale,  $290\text{ K} \pm 1\text{ K}$ , on voit que le module Peltier chaud a une influence plus importante que le module Peltier froid sur la régulation moyenne de la température.

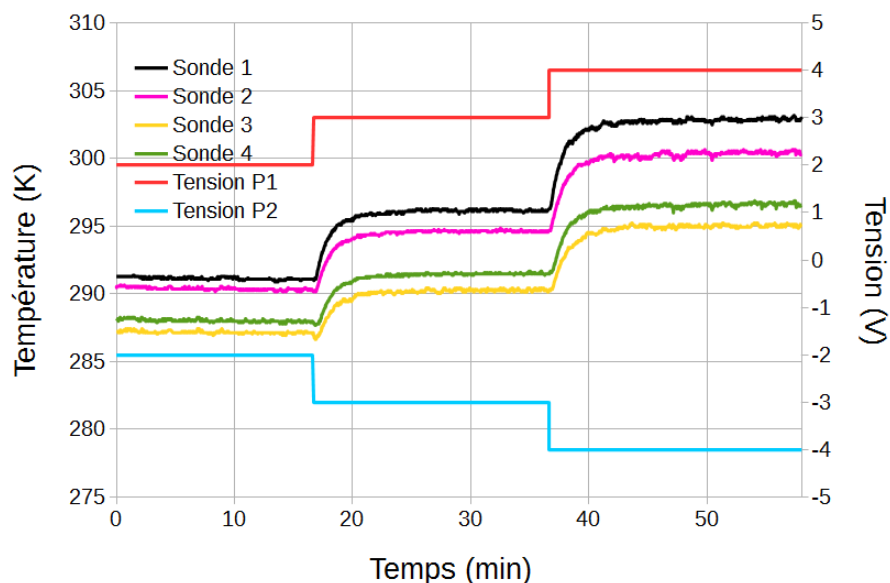


FIGURE 2.35 Augmentation de la différence de tension appliquée au module P1 et P2 (axe de droite) entraînant un écart de température sur les 4 sondes de températures (axe de gauche) situées de part et d'autre de la puce.

#### 2.2.5.4 Système de lames

Le système de lames/lamelles consiste en plusieurs lamelles de cuivre en forme de L et percées de la même manière que la plaque d'aluminium (cf. Figure 2.30). La Figure 2.36 montre deux sortes de lamelles de cuivre que nous avons conçues. Pour faciliter la manipulation de ces lamelles, elles ont été collées sur une plaque en verre. Cela permet de n'avoir qu'un seul bloc complet et d'éviter les différences de hauteur, problèmes de contact etc...

Contrairement au système de plaque, avec ce système il est possible d'attribuer une température sur chaque paire de puits, appartenant à une seule colonne de la puce, indépendamment des deux puits situés juste à côté. Sur la Figure 2.37a, où seuls S1 et S3 sont représentés il apparaît qu'après l'application d'une tension de 1 V sur P1, la température n'est modifiée que sur S1 (et S2). La température sur S3 (et S4) reste, quant à elle, à son état initial, ce qui permet d'envisager le contrôle indépendant de la température de plusieurs zones de la puce. La température de repos, c'est-à-dire quand aucun des modules Peltier n'est en marche est aussi tracée en pointillés pour visualiser l'absence d'écart de température sur S3.

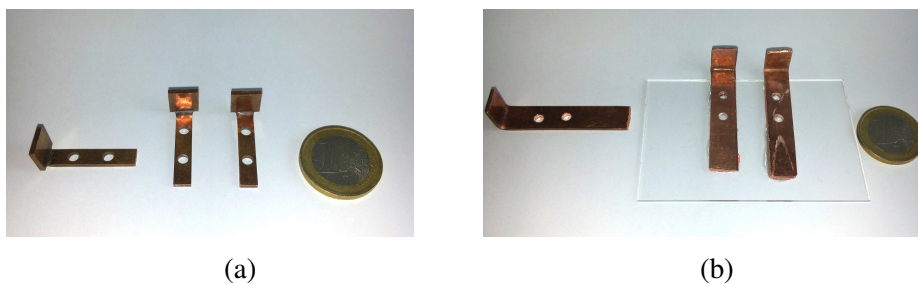


FIGURE 2.36 Deux modèles de lamelles de cuivre avec une pièce de 1 € pour l'échelle. Le modèle de gauche est adapté au contrôle de la température d'une puce sans le portepuce. Le modèle de droite est plus grand pour s'adapter au portepuce.

Cependant la thermorégulation de différentes zones n'est pas totalement indépendante et des variations de température sont parfois enregistrées lors de certaines expériences. Par exemple sur la Figure 2.37b la température de S1 (et S2) varie faiblement alors que seul le module P2 est en fonctionnement. Cet écart est visible par comparaison avec la température de repos. Mais ces variations sont très faibles et donc, le système de rails (lames) permet un meilleur contrôle de la température en un point donné par rapport au système avec une plaque entière où la puce entière subit de très fortes variations de température lorsque la température d'un module Peltier est modifiée. Dans le cas des lames de cuivre, on note un écart-type relatif, calculé comme décrit précédemment de 0,22 % au maximum soit une variation de  $\pm 0,6$  K lorsque la température d'une autre lamelle est variée. Bien sûr dans un système à 3 lames l'effet sera accru du fait de la proximité des lamelles. Cependant, actuellement c'est la solution qui nous paraît la plus adaptée à notre système microfluidique. De plus, l'utilisation de deux lames peut être suffisante dans la mesure où les puits situés au milieu de la puce ont des températures intermédiaires à celles appliquées aux extrémités, permettant d'imposer un gradient de température contrôlé le long des différents compartiments de dialyse. D'un point de vue de la compacité il devient difficile d'ajouter de nombreuses lames entre chaque puits à moins de modifier le design de la puce elle-même ou la taille des lamelles. Il est tout à fait possible d'établir une calibration pour évaluer la température sur chaque puits en fonction de la tension appliquée à chacun des deux modules Peltier situés aux extrémités bien que cette étude n'ait pas encore été réalisée.

### 2.2.5.5 Montage de plusieurs modules en parallèle pour un système à une alimentation

Pour les cas précédemment décrits, chaque module Peltier est alimenté indépendamment ce qui nécessite de posséder plusieurs alimentations ou une alimentation pilotable à plusieurs sorties. L'utilisation de plusieurs alimentations est à proscrire du fait de la compacité du système global surtout si on imagine un système plus complexe avec un plus grand nombre de modules Peltier, 4 à 10 par exemple. En outre la gestion d'une seule sortie est plus simple pour s'assurer que la tension distribuée est identique sur chaque Peltier. Dans cette section la possibilité d'établir des températures différentes sur chaque module Peltier à partir d'une seule alimentation et d'un circuit électrique simple n'incluant que des résistances sera détaillée.



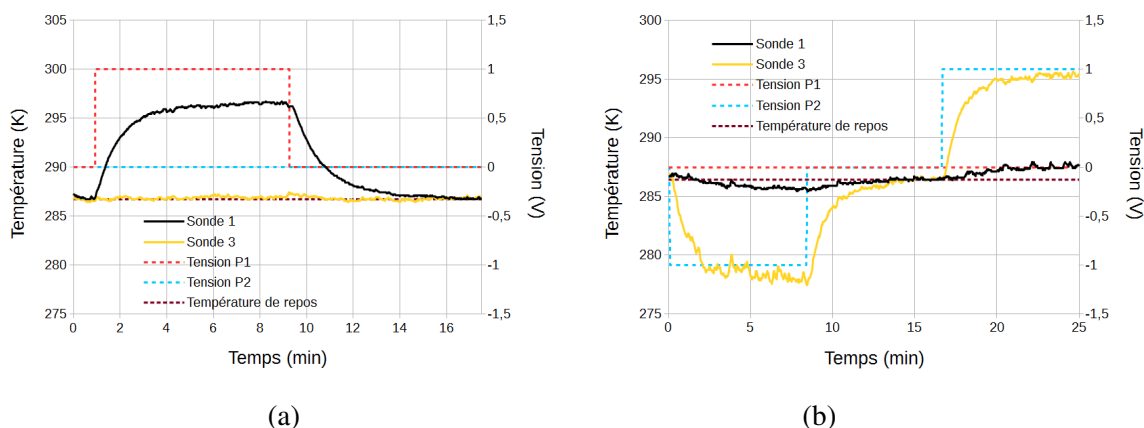


FIGURE 2.37 Evolution de la température sur deux sondes situées sur 2 lamelles différentes lorsque la tension est modifiée sur un module Peltier à la fois.

Dans un système simple à 2 modules Peltier, si les modules sont connectés à la même entrée, la température peut être identique sur 2 lames différentes (même tension sur chaque module) ou au contraire si la polarité est inversée, avoir des tensions opposées sur chaque module, à la dérive des Peltier près. Sur la Figure 2.38 les sondes S2 et S4 ont été disposées directement en contact avec les modules Peltier correspondant, soit respectivement avec P1 et P2. Les sondes S1 et S3 sont toujours situées sur les puits les plus proches des modules Peltier. Le système réagit à tous les changements de température mais la température de S1 et S3 reste toujours la même comme prévu.

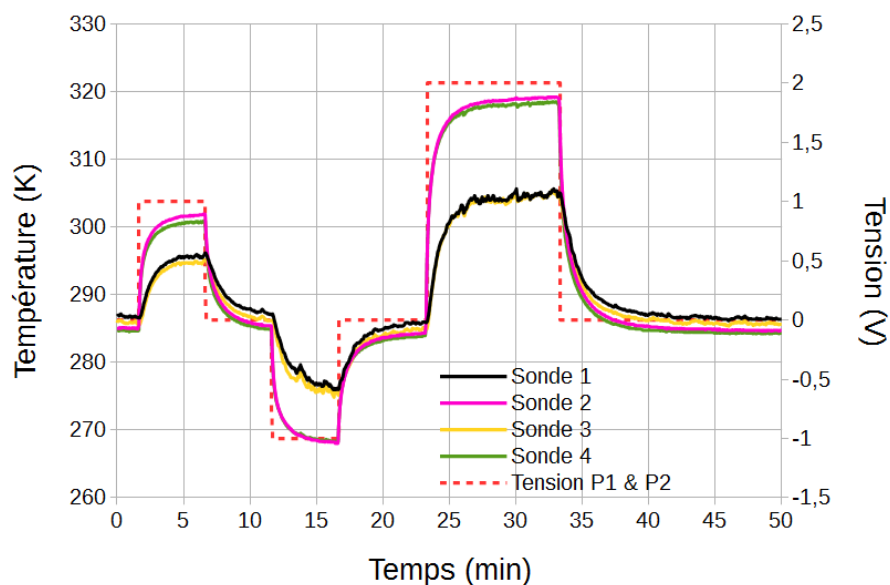


FIGURE 2.38 Evolution de la température sur les modules P1 et P2 et sur les 2 puits les plus proches de ces derniers (axe de gauche) en fonction de la tension appliquée à P1 et P2 (axe de droite).



De plus, pour avoir une tension différente sur chaque Peltier il suffit simplement de connecter en parallèle les deux modules et de réaliser un pont diviseur de courant et de tension en utilisant des résistances variables (cf. Figure 2.39).

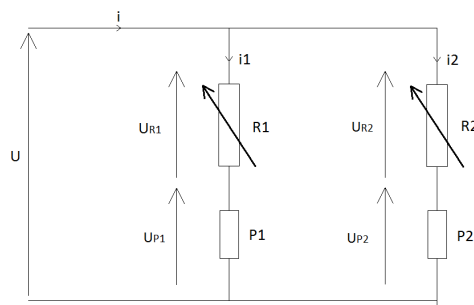


FIGURE 2.39 Schéma électrique du pont diviseur de courant et de tension avec R1 et R2 des résistances variables, U la tension d'alimentation, i le courant et P1 et P2 les modules Peltier 1 et 2.

Pour chaque couple de valeur de résistance la tension théorique appliquée à chaque module Peltier peut être calculée. Cependant comme les modules Peltier sont composés de semi-conducteurs la résistance interne varie avec la température. Pour calculer les tensions appliquées à chacun des modules, la résistance interne des modules Peltier doit être déterminée. Si  $T_h$  est la température du côté chaud du module Peltier et  $T_c$  la température du côté froid, alors d'après [135],  $R_M = \frac{(T_h - \Delta T_{max})V_{max}}{T_h I_{max}}$  avec  $R_M$  la résistance électrique du module en Ohm,  $V_{max}$  la tension maximale du module en volt et  $I_{max}$  le courant maximal du module en ampère,  $V_{max}$  et  $I_{max}$  sont caractéristiques d'un module Peltier. Il apparaît que la résistance dépend de la température. Si la variation de la résistance est calculée pour  $T_h$  entre 273 et 353 K, la variation est de l'ordre de +0,2  $\Omega$  entre les valeurs de résistance à ces deux températures. Par le calcul, en utilisant la formule décrite ci-dessus, une résistance de 2,64  $\Omega$  est obtenue à  $T_h = 291$  K. Expérimentalement, quand on applique une tension de sorte que  $T_h = 291$  K et que l'on mesure le courant, la résistance correspondante calculée par la loi d'Ohm est de  $R_M = 2,63$   $\Omega$ .

Lorsque le pont diviseur de courant et de tension est établi, une résistance différente de celle précédemment mesurée avec le module Peltier seul est observée lors de la mesure du courant circulant dans une branche. Cette résistance sera sélectionnée en tant que  $R_M$  par la suite et sera considérée comme constante dans nos calculs au vu de la variation négligeable de cette dernière. En fonction du circuit électrique réalisé il est donc nécessaire de calculer au moins une fois la résistance du module Peltier dans le circuit en mesurant le courant circulant dans une branche ainsi que la tension aux bornes du module Peltier.

En effet la mesure de la résistance d'un module Peltier ne nécessite pas simplement l'utilisation d'un ohmmètre aux bornes du module. La résistance affichée par l'ohmmètre varie énormément et ceci d'autant plus que la différence de température sur chaque face varie. La valeur lue par l'ohmmètre pourra varier de quelques ohms à des valeurs supérieures à ce que l'ohmmètre peut mesurer (plusieurs M $\Omega$ ). Afin de mesurer la résistance interne d'un

module Peltier des sources de courant alternatif sont habituellement utilisées pour contrer l'effet thermoélectrique. Cependant dans notre cas nous ne recherchons pas une valeur exacte de la résistance mais la résistance équivalente pour notre circuit permettant d'avoir un modèle prédictif.

Si on note  $R_{P1} = R_{P2}$  les résistances des modules P1 et P2 et  $R1$  et  $R2$  les résistances variables, on peut établir les équations (2.2) en tension et (2.3) en courant, idem pour  $U_{P2}$  en remplaçant  $i_1$  par  $i_2$ ,  $R1$  par  $R2$  et vice versa, et P1 par P2 et vice versa. Les tensions sur chaque module peuvent être calculées en fonction de la température pour différentes tensions  $U$  appliquées aux différents couples de résistance. Ce résultat a été obtenu en notant le courant obtenu à l'équilibre en température sur le module Peltier. En effet la régulation étant réalisée en tension, un pic de courant apparaît à l'application de la tension puis le courant se stabilise rapidement vers sa valeur d'équilibre lorsque la température se stabilise. Cet effet est observé en raison de la différence de température entre chaque face qui varie le temps que la température soit à l'équilibre et donc que la différence de température entre chaque face ne varie plus.

$$i_1 = \frac{U}{R_{P1} + R1}; \quad U_{P1} = \frac{R_{P1}}{R_{P1} + R1}U \quad (2.2)$$

$$U_{P1} = R_{P1}i_1; \quad i_1 = \frac{R2 + R_{P2}}{R1 + R2 + R_{P1} + R_{P2}}i \quad (2.3)$$

A une tension donnée, les températures  $T_h$  et  $T_c$  dépendent notamment de la température de refroidissement du bloc échangeur thermique. Dans la plupart des applications, les modules Peltier sont habituellement utilisés pour refroidir un système et sont alimentés par des sources de courant car, comme vu dans la partie 2.2.5.1, la quantité de chaleur émise dépend du courant. Cependant les sources de courant sont souvent onéreuses et de taille importante. C'est pourquoi une source de tension a été préférée dans notre cas. Pour ces raisons il est difficile de calculer théoriquement la température de la face servant à chauffer en fonction de la tension appliquée car le courant varie. Dans les tables de données du fournisseur du module Peltier B, l'évolution de la tension en fonction de la différence de température entre les deux faces pour différentes valeurs de courant à une température  $T_h$  fixe de 298 K est visible. Ces valeurs peuvent être obtenues par la relation  $V = S_M \Delta T + i R_M$  (voir [135]), avec  $S_M$  la tension de Seebeck en  $VK^{-1}$ . Cependant cette équation ne tient pas compte des déperditions de chaleur dues à la température ambiante ou de la chaleur à fournir au système pour maintenir la température d'équilibre. Aussi les températures d'équilibre de la face chaude et de la face froide ont été mesurées à différentes tensions, habituellement utilisées lors de nos expériences, en maintenant le système de refroidissement à une température constante de 281 K (cf. Figure 2.40). En pratique en imposant la température du chiller à 285 K, la température contre l'échangeur thermique est de 281 K comme décrit précédemment (section 2.2.5.2).

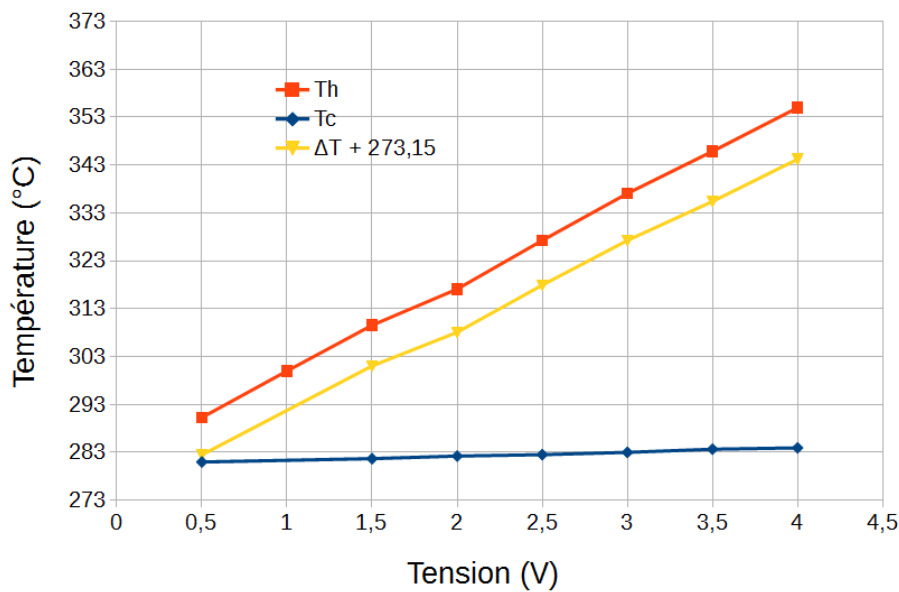


FIGURE 2.40 Evolution de la température sur la face chaude, froide et différence de température  $\Delta T = T_h - T_c$  additionnée à 273,15 K (pour la visualisation) en fonction de la tension d'alimentation du module Peltier modèle B (cf. Tableau 2.2).

Pratiquement, lorsque la courbe de calibration de la Figure 2.40 est réutilisée pour prédire la température de la face chaude (courbe bleue) à partir des tensions/courants calculés *via* le pont diviseur de tension et la valeur de courant notée sur l'alimentation, les résultats théoriques et les mesures de la température sur la face chaude ne coïncident pas en prenant la valeur de  $R_M$  calculée ou mesurée lorsque le module Peltier est seul. En revanche, avec la valeur de  $R_M$  mesurée expérimentalement dans le pont diviseur, il est possible de déduire la température d'équilibre. Cependant pour améliorer la précision de la courbe de calibration il est plus aisé de réaliser cette courbe dans le système final avec le pont diviseur car les charges thermiques diffèrent du cas où le système comporte un unique module Peltier. En pratique la courbe de calibration obtenue dans le pont diviseur a été utilisée et un ajustement linéaire a été réalisé avec l'ordonnée à l'origine fixée à la valeur mesurée lorsqu'aucune tension n'est appliquée. Ainsi, la Figure 2.41 montre les températures d'équilibre mesurées sur S1 et S3 qui se trouvent respectivement sur P1 et P2 ainsi que les valeurs de température prédites par le calcul des tensions/courants sur P1 et P2 et l'utilisation de la courbe de calibration. Finalement, on a mesuré  $R1 = 10,8 \Omega \pm 0,2 \Omega$  et  $R2 = 21,4 \Omega \pm 0,2 \Omega$ .

Après avoir déterminé la tension appliquée à un module Peltier et avoir prédit la température résultante sur la face du module Peltier qui nous intéresse, il reste à définir la température au niveau d'un puits de la puce. Le système n'étant pas isolé, le chauffage est effectué par conduction thermique avec le module Peltier relié au cuivre et à la puce, et le refroidissement a lieu par convection thermique en raison de l'interface air-système. L'équation générale de conduction thermique obtenue à partir de la loi de Fourier est notée dans l'équation 2.4. Avec  $\lambda$  la conductivité thermique en  $\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$ ,  $\Delta T$  le laplacien de la température, P la puissance

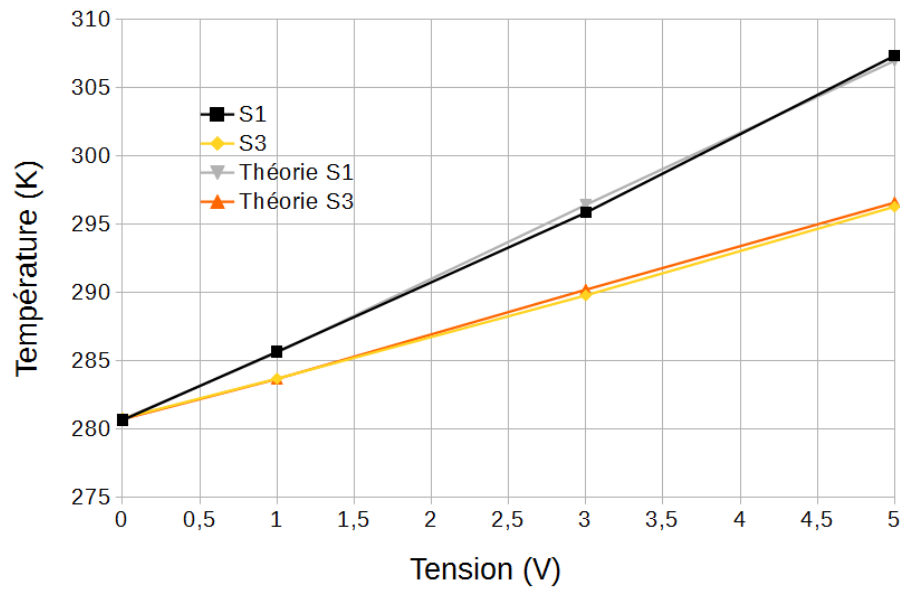


FIGURE 2.41 Comparaison des valeurs de température mesurées à l'équilibre sur P1 et P2 et les valeurs théoriques, obtenues à partir des calculs de tension/courant (équations (2.3)) et ajustement de la courbe de calibration tension-température (Figure 2.40) pour différentes valeurs de tension d'alimentation du système global.  $R1 = 10,8 \Omega \pm 0,2 \Omega$  et  $R2 = 21,4 \Omega \pm 0,2 \Omega$ .

interne volumique en  $\text{W m}^{-3}$ ,  $\rho$  la masse volumique en  $\text{kg m}^{-3}$  et  $C_p$  la capacité calorifique massique du matériau en  $\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$ .

$$\lambda \Delta T + P = \rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (2.4)$$

Si on considère une paroi d'épaisseur  $b$ , de surface  $A$ , dont les deux faces planes sont maintenues à une température constante  $T_1$  et  $T_2$ ,  $Q_t$  est le débit de chaleur transféré tel que décrit dans l'équation 2.5.

$$Q_t = \frac{(T_1 - T_2)\lambda A}{b} \quad (2.5)$$

Dans le cas de la convection thermique, il faut résoudre le bilan différentiel d'énergie entre les deux phases (air-système), en associant l'équation du bilan de matière et de la quantité de mouvement. Cela complexifie beaucoup l'analyse. Dans notre cas nous procédons de la façon suivante,  $T_{sol}$  est la température du solide (puce ou cuivre) et  $T_{ext}$  est la température du fluide (air). Phénoménologiquement la quantité de chaleur reçue  $Q_r$  par le solide par unité de surface et de temps est définie dans l'équation 2.6, avec  $h$  le coefficient de transfert thermique en  $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$ .

$$Q_r = h(T_{sol} - T_{ext}) \quad (2.6)$$

Ces données ont permis la réalisation d'une simulation numérique en éléments finis à l'aide du logiciel RDM6 développé par Yves Debard de l'Institut Universitaire de Technologie du Mans au Département Génie Mécanique et Productique. Ce logiciel est en libre accès depuis le site de l'IUT du Mans (<http://iut.univ-lemans.fr/ydlogi/>).

Dans un premier temps, la géométrie en 2D a été définie comme l'illustre la Figure 2.42. Elle a été sous-divisée en 3 domaines principaux : le domaine A de la lamelle en cuivre la plus profonde, le domaine C de la lamelle en cuivre moins profonde et le domaine B de la puce qui a été assimilée à une épaisseur de 300  $\mu\text{m}$  de PMMA pour l'étude.

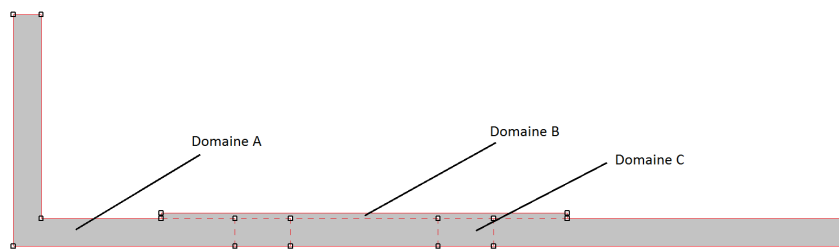


FIGURE 2.42 Géométrie pour la simulation numérique sous divisée en plusieurs domaines.

La température sur la face qui supporte le module Peltier a été fixée à la température de la face chaude du module Peltier. Sur toutes les faces a été ajoutée une charge thermique de convection. La valeur du coefficient  $h$  a été choisie à  $120 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$  pour une température extérieure de 290 K (valeur moyenne mesurée à proximité de la puce). La valeur de  $h$  sous-entend une convection forcée, dans notre cas la salle de cristallisation est climatisée *via* une soufflerie qui engendre un fort flux d'air à proximité de la puce. Malgré tout la valeur reste relativement élevée mais a été ajustée au cours des simulations par rapport aux expériences. Si le système était isolé on pourrait retirer le terme de convection. Dans le cas où le système serait dans un environnement sans flux d'air, une valeur de  $h$  de  $10 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$  suffirait et représenterait la convection naturelle de l'air. Ce modèle n'est pas absolu, il a été réalisé dans un but prédictif. Les paramètres que nous avons en entrée de nos simulations numériques sont des paramètres pour lesquels les résultats expérimentaux s'adaptent le mieux aux simulations.

En régime stationnaire (situation qui simplifie grandement le calcul), le résultat de la simulation numérique pour  $T_h = 301,3 \text{ K}$  est présenté sur la Figure 2.43. La valeur expérimentale mesurée pour cette valeur de  $T_h$  par S1 est de 295,3 K.

Pour les simulations numériques une épaisseur unique totale de matériau a été considérée pour la partie comprenant la puce. Cependant en réalité le système est beaucoup plus complexe, puisqu'il s'agit d'une combinaison de PMMA, de NOA 81, d'air et de la membrane. La conductivité thermique du PMMA est située entre 0,17 et 0,19  $\text{W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , celle de l'air

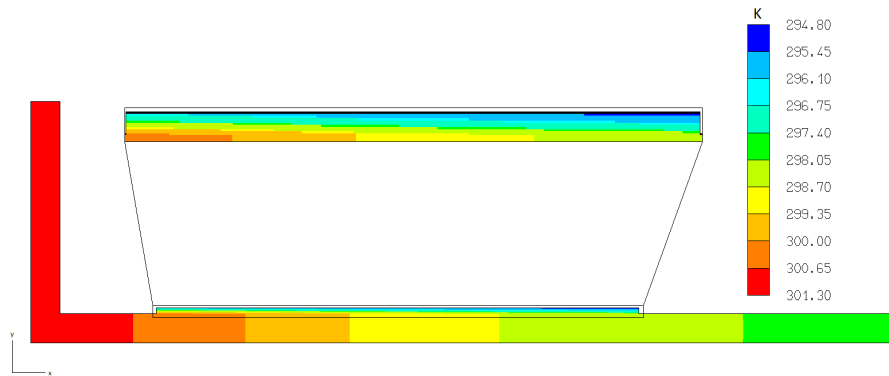


FIGURE 2.43 Résultat de la simulation numérique pour une valeur de  $T_h$  de 301,3 K.

est de  $0,025 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Aucune valeur pour la conductivité thermique de la NOA 81 n'est fournie par le fabricant et aucune expérience permettant de mesurer cette conductivité thermique n'a été conduite. Au vu des considérations faites sur notre dispositif (un seul matériau de conductivité thermique  $\lambda$  et de capacité thermique massique  $C_p$ ), une valeur de conductivité thermique tenant compte de toutes les interfaces avec l'air a été choisie ce qui entraîne une diminution de la conductivité thermique du matériau. Ces interfaces avec l'air se situent dans la puce elle-même, les canaux, le réservoir mais aussi au niveau du thermocouple. Pour tenir compte de tous ces effets une conductivité thermique globale a été choisie en faisant concorder les valeurs simulées aux mesures expérimentales de température. Une valeur de  $0,05 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$  a finalement été retenue bien que cette valeur soit faible. En effet elle correspond à la conductivité thermique d'un isolant, mais est en accord avec les mesures de température réalisées. La capacité thermique massique a été choisie à  $1500 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$  qui est proche des valeurs que l'on peut trouver pour certains plastiques. D'après Professional Plastics on a par exemple pour l'acétate de cellulose entre  $1200\text{-}1900 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , PMMA  $1400\text{-}1500 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , polystyrène  $1200 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , polyimide  $1090 \text{ J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$ . Un gradient de température est observé dans la partie de la puce en direction des axes y et x. Le tracé de la variation en y sur la partie supérieure de la puce à  $T_h = 301,3 \text{ K}$  est visible sur la Figure 2.44. Selon la simulation numérique, la variation de température entre deux puits situés sur une même lame (dans une même colonne) est de l'ordre de  $0,6 \text{ K}$  à cette température et de  $1 \text{ K}$  sur les deux extrêmes. En réalité ce même écart de température est mesuré entre deux puits de la même colonne lorsqu'un bon contact thermique est établi entre la puce et les lamelles. L'écart est bien sûr dépendant de la température de la face chaude du module Peltier.

La combinaison des deux modèles présentés ici permet la comparaison de la température théorique prédite et de la température mesurée sur le premier puits de la colonne pour vérifier la concordance entre la mesure expérimentale et la valeur calculée. Le premier modèle permet de déduire la température sur la face du module Peltier puis cette valeur est introduite en entrée pour les simulations numériques. Sur la Figure 2.45 est notée l'évolution de la température mesurée sur les modules P1 et P2 à l'aide de S1 et S3 respectivement. L'évolution de la température sur le premier puits de la puce le plus proche de P1 et de P2 est également évaluée

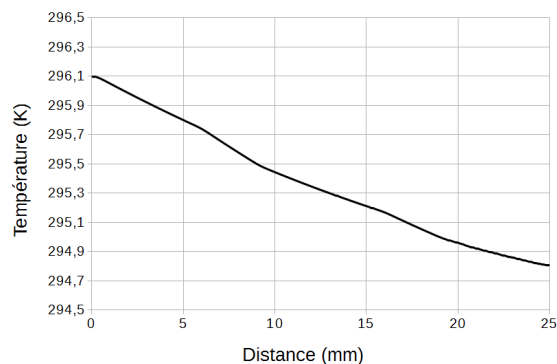


FIGURE 2.44 Gradient de température le long de la plaque de PMMA obtenu par simulation numérique pour  $T_h = 301,3$  K.

à l'aide de S2 et S4 respectivement. Les courbes en pointillées représentent la température théorique d'équilibre pour les modules P1 et P2 à la tension imposée calculée à partir du modèle précédemment décrit. On retrouve en pointillé la valeur de la température d'équilibre sur S2 et S4 obtenues par simulation numérique en imposant en entrée la température du module Peltier théorique calculée par le précédent modèle. On observe sur ce graphique que les températures d'équilibres sont très proches des températures réelles. Bien sûr l'équilibre n'est pas atteint dans la gamme de temps de cette expérience mais par extrapolation les températures d'équilibres théoriques et réelles sont très proches (courbes en pointillés et courbes en traits pleins d'une couleur donnée), l'erreur sur la température est en moyenne inférieure à 1 K.

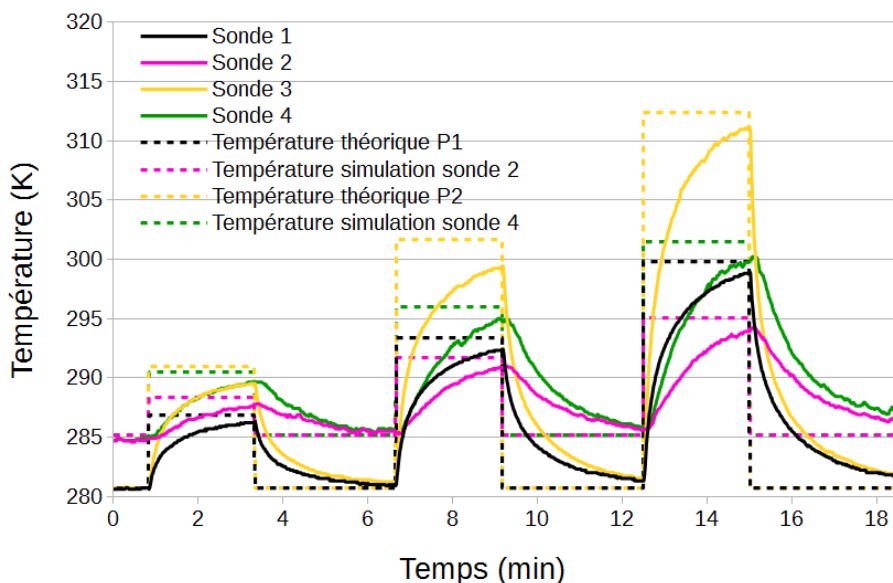


FIGURE 2.45 Evolution des températures sur P1 (S1) et P2 (S3) ainsi que sur le premier puits le plus proche de P1 (S2) et P2 (S4) accompagnées par les températures théoriques d'équilibre obtenues à partir du calcul des tensions et des simulations numériques.

De plus, si la valeur de température mesurée sur les modules Peltier au niveau du pic de température (sur la Figure 2.45) est introduite directement en entrée de la simulation, le résultat de la Figure 2.46 est obtenu. L'écart de température entre la valeur prédite au niveau du pic par la simulation (courbes en pointillés) et la valeur réelle de température au niveau du pic mesurée sur la puce (courbes en traits pleins) décroît par rapport à la situation précédente (cas d'application respective de deux modèles avec le résultat observé dans la Figure 2.45) et il est inférieur à 0,7 K avec en moyenne un écart de 0,4 K.

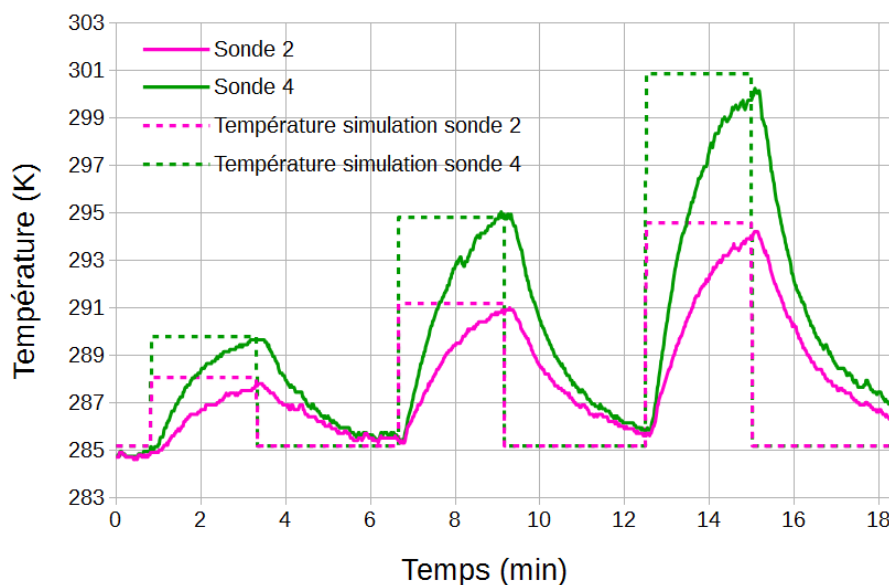


FIGURE 2.46 Evolution de la température sur S2 et S4 situées sur les premiers puits les plus proches de P1 et P2 respectivement accompagnées par les températures théoriques obtenues par simulation numérique pour la valeur spécifique de température mesurée sur chaque module P1 et P2 (cf. 2.45 pour les valeurs réelles de température de P1 et P2).

### 2.2.5.6 Conclusion

Parmi les méthodes de contrôle de la température, une approche externe utilisant des modules Peltier a été préférée. Avec cette approche, deux méthodes ont été testées et sont basées sur l'utilisation de pièces métalliques pour transférer la chaleur du module Peltier vers la puce, là où la protéine doit cristalliser. A l'heure actuelle ce système n'a pas été adapté pour collecter des données de diffraction aux rayons X *in situ* à une température variable. Pour ce faire il serait nécessaire de réaliser un système portable qui intègre les modules Peltier, une alimentation avec une carte de régulation et un système de refroidissement à air. Les expériences de diffraction sont effectuées à température ambiante (cf. section 3.2.4). D'autres approches intégrées sont envisageables à l'avenir, ce qui permettrait d'améliorer la compacité du système et de faciliter le transfert du système sur une tête goniométrique pour la collecte de données.



Parmi les 2 approches présentées ici, la solution la plus adaptée pour contrôler indépendamment la température sur chaque colonne de puits de la puce est la méthode utilisant des lamelles de cuivre. Nous avons pu, à l'aide d'un système simple de pont diviseur de courant et de tension, décrire un dispositif de contrôle de la température. La température du système microfluidique peut être prédite avec une calibration préalable des modules Peltier utilisés et la mise en place d'un modèle simple ne prenant en compte que les phénomènes prédominants, conduction et convection thermique. La variation de température le long d'une lamelle et par conséquent le long de la puce dépend de la température imposée dans l'expérience et de la température extérieure. La technique utilisant une plaque permet, quant à elle, l'application d'un gradient de température le long des deux dimensions principales de la puce qui dépend du module Peltier utilisé à la fois pour "refroidir" et du module servant à "chauffer" quand ceux-ci sont chacun connectés à une entrée d'alimentation.

La technique des lames permet un contrôle de la température d'une lame avec un écart de température final sur la puce, entre deux puits sur une même colonne, inférieur à 1 K pour des températures sur le module Peltier variant de 280 à 310 K. Ce résultat a été obtenu par des simulations numériques.

De plus, le système présenté avec deux modules Peltier en parallèle contrôlés par une seule alimentation est une preuve de principe permettant d'envisager l'implémentation d'un plus grand nombre de modules en parallèle pour avoir un gradient de concentration sur plusieurs colonnes de la puce (e.g. +278, +283, +288, +293, +298 K). En effet il est envisageable de concevoir un système microfluidique plus élaboré dans lequel un grand nombre de puits seraient implantés. Une matrice de puits serait ainsi déposée sur un support sous la forme d'une grille de cuivre permettant le contrôle de la température sur chaque puits par exemple.

# Chapitre 3

## Expériences

### 3.1 Banc de cristallisation

#### 3.1.1 Etude systématique de la diffusion

##### 3.1.1.1 Objectif et méthode

La technique de cristallisation utilisée aussi bien dans la puce microfluidique que dans le banc de cristallisation est la cristallisation par dialyse. La membrane semi-perméable qui sépare la chambre de dialyse du réservoir va limiter la diffusion des molécules du réservoir vers la chambre. Dans l'autre sens la protéine possède un poids moléculaire bien supérieur au seuil de rétention de la membrane si la membrane est correctement choisie. Dans cette partie nous présentons une étude systématique des procédés membranaires permettant d'établir et de comprendre les temps d'équilibre en concentration des réactifs entre le réservoir et la chambre de dialyse. Ces temps sont liés à la diffusion des composés chimiques utilisés dans les expériences de cristallisation. Ici nous avons comparé des agents précipitants communément utilisés pour la cristallisation des protéines.

Nous avons donc effectué une étude systématique des mesures de cinétique de diffusion dans le cadre de la dialyse en fonction : de la nature de l'agent de cristallisation (des Polyéthylène Glycols différents : de PEG 1000 à PEG 8000, différents sels : chlorure de sodium ou NaCl, acétate de sodium ou NaOAc, sulfate d'ammonium ou  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), de la concentration de l'agent de cristallisation, du volume dialysant, du seuil de rétention de la membrane et de la température. Pour cela nous avons mesuré le temps de diffusion caractéristique pour chaque famille d'agents de cristallisation employée. L'étude s'est poursuivie dans le cas d'un mélange de PEG et de sel afin d'étudier l'influence de la concentration en sel sur la diffusion du PEG. En effet il a été rapporté que le sel en association avec le PEG modifie l'action du PEG seul sur les interactions des protéines [136] et nous avons donc souhaité étudier l'influence du sel sur le PEG d'un point de vue du temps de diffusion dans le cadre de la dialyse.

### Description de l'expérience pour la mesure par indice de réfraction

L'expérience consiste à réaliser des boutons de dialyse contenant de l'eau distillée. Chaque bouton est ensuite déposé individuellement dans un réservoir contenant l'agent de cristallisation à étudier. Si l'expérience doit être réalisée à 277 K le réservoir est préalablement déposé dans une enceinte à cette température pendant une heure au minimum. Après un temps donné, 30 min, 1 h, 2 h etc... le bouton de dialyse est récupéré à l'aide d'une pince et la membrane de dialyse est retirée (Figure 3.1). La solution se trouvant dans la chambre de dialyse est ensuite mélangée à l'aide d'une pipette et un volume d'au moins 30  $\mu\text{L}$  est prélevé. Cet échantillon est ensuite déposé à la surface du prisme dans un réfractomètre afin de mesurer l'indice de réfraction de la solution. Le réfractomètre utilisé est un réfractomètre Carl Zeiss avec une précision de  $\pm 0,001$  sur l'indice de réfraction.

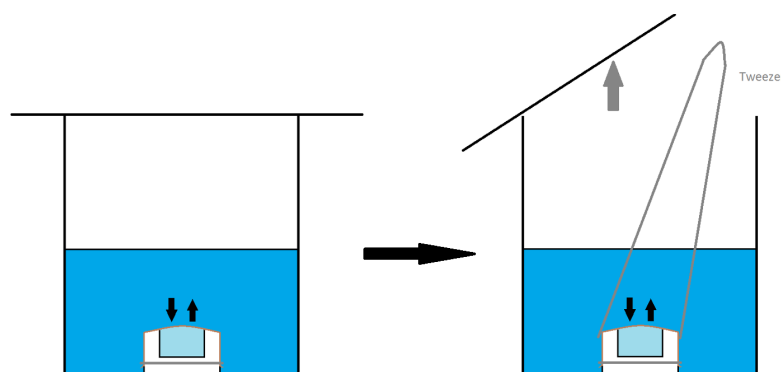


FIGURE 3.1 Schéma des étapes pour obtenir une mesure à un temps donné.

Pour chaque solution étudiée, une courbe de calibration est réalisée afin d'établir la relation entre l'indice de réfraction et la concentration de la solution. L'indice de réfraction  $n = f(T, [C], \lambda, \dots)$  est fonction de plusieurs variables. Pour toutes les mesures d'indice de réfraction la température est maintenue constante à 293 K. Les mesures ont été réalisées en lumière blanche et l'effet de dispersion lié à l'utilisation d'une source polychromatique est compensé à l'aide d'une molette situé sur le réfractomètre servant à l'ajustement de plusieurs prismes de verres différents sur la trajectoire du faisceau. Enfin les mesures ont été réalisées à la pression ambiante. Finalement l'indice de réfraction est ici fonction de la concentration de la molécule d'intérêt. Sur la Figure 3.2 est présenté l'exemple de deux courbes de calibration, celle du PEG 1000 et du PEG 4000. Les barres d'erreur en y correspondent à l'incertitude instrumentale et les barres d'erreur en x sont liées à la préparation des solutions stocks.

Dans le cas des sels, le même type de courbe de calibration est obtenu (Figure 3.3) avec l'indice de réfraction en fonction de la concentration molaire.

### Description de l'expérience pour la mesure par RMN

D'autres expériences ont été réalisées dans le cas des mélanges de sel et de PEG. Cette étude a été réalisée avec du PEG 6000 et du NaCl. Pour les mesures utilisant des mélanges il

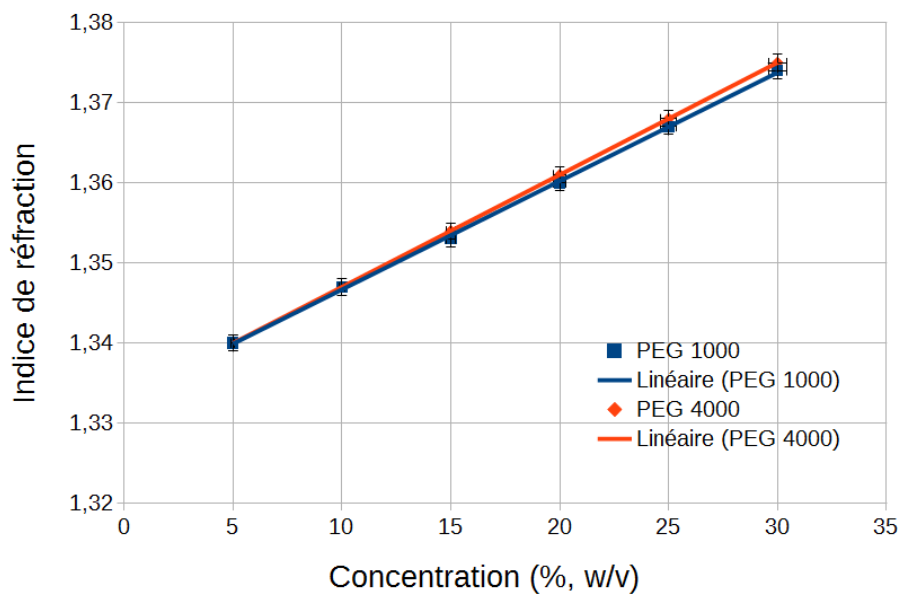


FIGURE 3.2 Variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en PEG pour le PEG 1000, courbe bleue, et le PEG 4000, courbe orange.

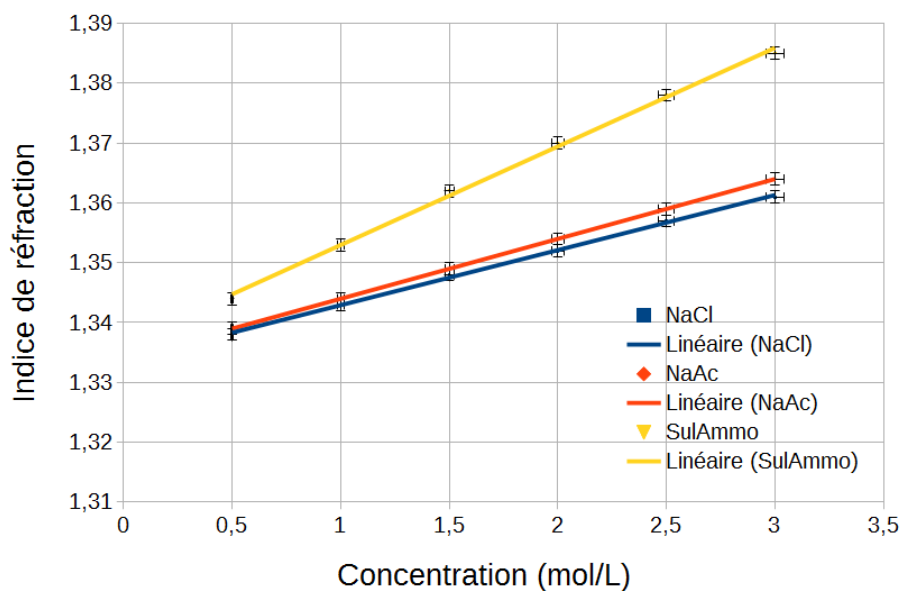


FIGURE 3.3 Variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration en sel pour le NaCl, courbe bleue, le NaOAc, courbe orange, et le  $(NH_4)_2SO_4$ , courbe jaune.

est impossible d'utiliser la mesure d'indice de réfraction car le PEG et le sel ne diffusent pas à la même vitesse et l'indice de réfraction n'a pas permis d'extraire l'information nécessaire pour établir l'influence du sel sur la diffusion du PEG. Pour cela des expériences de RMN 1D du  $^1H$  ont été réalisées en collaboration avec Adrien Favier sur la plateforme RMN de l'IBS/PSB (Institut de Biologie Structurale/Partnership for Structural Biology) à Grenoble. La méthode consiste à effectuer des mesures à différents temps mais la solution du bouton de dialyse est ensuite récupérée et mélangée avec d'autres composés dont une référence. Bien que la RMN soit une technique peu habituelle pour la quantification en solution, on retrouve dans la littérature des méthodes y ayant recours [137]. Ainsi plusieurs solvants ont été testés pour servir de référence compatible avec le PEG. Après plusieurs essais, l'acide acétique à 5 % (v/v) est apparu comme un solvant de référence adapté au vu du déplacement du pic bien distinguable du polymère et de la gamme de concentration à laquelle les expériences sont conduites. La technique consiste donc à mélanger l'échantillon, l'acide acétique en concentration connue et constante, du  $D_2O$  pour régler l'homogénéité du champ magnétique ("le shim") et du  $H_2O$  pour avoir suffisamment de solution dans le tube RMN. Les tubes utilisés sont des tubes de 3 mm et le volume final de solution dans chaque tube est de 155  $\mu L$ . Des mesures à différentes concentrations connues de PEG ont permis de tracer une courbe de calibration du rapport de l'aire sous le pic du PEG sur l'aire sous le pic de l'acide acétique, les deux pics obtenus par RMN, en fonction de la concentration en PEG. La présence de sel influence les spectres RMN notamment d'un point de vue de la sensibilité mais cela est négligeable pour les expériences menées. Sur la Figure 3.4 on peut observer différents spectres réalisés à plusieurs concentrations en PEG 6000. Le premier pic correspond au pic de l'acide acétique normalisé et constant pour chaque expérience. Le deuxième pic correspond au PEG 6000 qui varie avec la concentration en PEG. En gardant la concentration de l'acide acétique constante, il est possible de réaliser une courbe de calibration du ratio PEG 6000 sur acide acétique en fonction de la concentration en PEG 6000.

La séquence RMN utilisée a été maintenue constante tout au long des expériences. Une séquence spécifique annule le signal provenant de l'eau. La séquence de mesure comprend une impulsion  $90^\circ$  suivie de l'acquisition avec un temps de répétition de 60 s, un temps d'acquisition de 5 s avec une durée d'impulsion du  $90^\circ$  d'environ 7,66  $\mu s$ . Il y a 213 k points sur une gamme spectrale de 21306,818 Hz. Le "shim" a été réalisé sur le mélange eau et deutérium présent dans le tube. Enfin les spectres ont été corrigés un à un par un algorithme de correction de ligne de base fourni par le logiciel Topspin et phasés automatiquement avec une inspection visuelle. Ils ont ensuite été analysés en ayant été préalablement apodisés (via exponentiel) avec un facteur d'apodisation de 5 Hz.

### **Analyse des courbes de concentration vs temps**

L'analyse des courbes obtenues utilise un modèle exponentiel pour ajuster les courbes de concentration en fonction du temps et en retirer un paramètre pertinent pour comparer chaque courbe. L'analyse a été effectuée après le temps de demi-échappement (ou temps de demi-

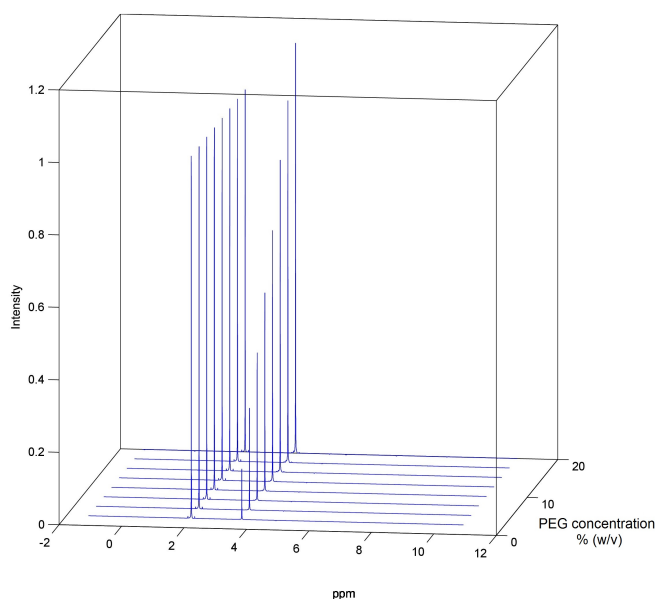


FIGURE 3.4 Spectres RMN représentant l'intensité normalisée sur le pic de l'acide acétique pour différentes concentrations de PEG 6000 et une variation du pic du PEG 6000 avec la concentration.

équilibre)  $\tau_{1/2}$  (section 1.3.2) correspondant au temps au bout duquel la concentration dans le bouton de dialyse est égale à la moitié de la concentration initiale du réservoir.

Ce paramètre est un paramètre d'intérêt qui peut aussi renseigner dans une certaine mesure sur la perméabilité de la membrane, il est bien décrit dans la revue de Schultz and Gerhardt [37] et est relié au volume de la chambre de dialyse et à l'aire de la membrane.

Le terme  $\tau_{90\%}$  défini comme le temps au bout duquel la concentration dans le bouton de dialyse a atteint 90 % de la concentration du réservoir sera également utilisé lorsque nécessaire.

### 3.1.1.2 Cas des PEG et sels séparés

#### Différence entre les PEG et les sels

Les PEG utilisés ont un poids moléculaire allant de  $1000 \text{ g mol}^{-1}$  à  $8000 \text{ g mol}^{-1}$ . Les sels utilisés, quant à eux, vont de  $58,44 \text{ g mol}^{-1}$  à  $132,14 \text{ g mol}^{-1}$ . De plus les PEG possèdent une viscosité beaucoup plus élevée entre 2 et 5 mPas pour le PEG 1000 à 10 % (w/v) [138, 139] (donc peu concentré) contre 1 à 1,3 mPas pour le NaCl de 0 à  $3 \text{ mol L}^{-1}$  [140]. Pour des poids moléculaires et des concentrations plus élevées les valeurs atteignent environ 51 mPas pour le PEG 8000 à 30 % (w/v) [138]. Ces chiffres donnent un aperçu des différences observables d'un point de vue de la diffusion entre les PEG et les sels. Sur la Figure 3.5, la différence entre la diffusion d'un sel, ici le NaCl à  $2 \text{ mol L}^{-1}$  et un PEG, ici le PEG 8000 à 25 % (w/v) est présentée. Cet exemple est montré à titre illustratif mais donne une idée de l'ordre de grandeur des temps à déterminer. Graphiquement, en utilisant les ajustements exponentiels de la Figure 3.5,  $\tau_{1/2}$  le temps de demi-équilibre est de l'ordre de la demi-heure pour le

NaCl et de l'ordre de plusieurs heures pour le PEG 8000. Les ordres de grandeur étant très différents, aucune comparaison supplémentaire ne sera réalisée par la suite et les cas des PEG et des sels seront traités indépendamment.

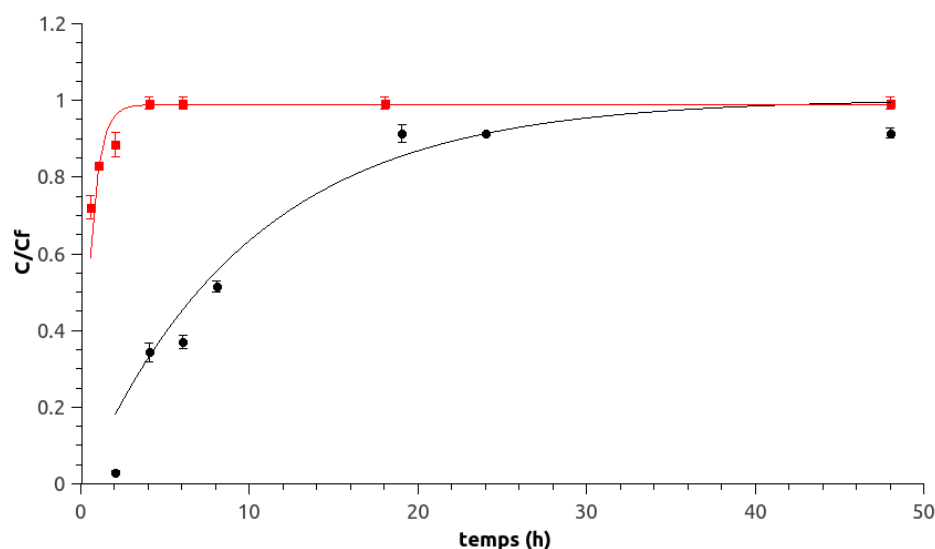


FIGURE 3.5 Evolution de la concentration rapportée à la concentration finale en fonction du temps pour le NaCl à  $2 \text{ molL}^{-1}$ , points rouges, et pour le PEG 8000 à 25 % (w/v), points noirs. Les ajustements associés ont été tracés. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur 3 mesures différentes du même point expérimental.

### Effet de la concentration

L'effet de la concentration sur le temps de diffusion a été étudié sur les PEG 1000, 4000, 6000 et 8000 à des concentrations variant de 5 % à 30 % (w/v) (avec un pas de 5 %) et 3 sels, le chlorure de sodium, l'acétate de sodium et le sulfate d'ammonium de 0,5 M à 3 M (pas de 0,5 M). Sur la Figure 3.6 sont représentées les valeurs de  $\tau_{1/2}$  obtenues pour les PEG précités de 10 % à 30 % (les données à 5 % ne sont pas représentées pour plus de lisibilité). Ces expériences ont été réalisées avec une membrane ayant un seuil de rétention (MWCO : Molecular Weight Cut-Off) de 12-14 kDa, à la température de 293 K et un volume de chambre de dialyse de 200  $\mu\text{L}$ . Lorsque la concentration en PEG augmente, la valeur du  $\tau_{1/2}$  diminue alors que plus le poids moléculaire du PEG augmente et plus  $\tau_{1/2}$  augmente. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'à une taille de pore donnée les molécules plus larges diffuseront plus lentement que les petites molécules.

Au niveau des ordres de grandeur, le  $\tau_{1/2}$  varie entre 1,6 et 3,7 h  $\pm 0,5$  h (écart maximum observé) pour la concentration la plus élevée. L'analyse des  $\tau_{90\%}$  montre que  $\tau_{90\%} = 6,0 \text{ h} \pm 0,1 \text{ h}$  pour le PEG 1000 à 30 %,  $\tau_{90\%}$  varie de 13 à 17 h  $\pm 3$  h (écart maximum observé) pour les PEG 4000 à 8000 à 30 % tandis que  $\tau_{90\%}$  est de l'ordre de 18 h pour le PEG 1000 à 5 %, et de l'ordre ou supérieur à 48 h pour les PEG 4000 à 8000 à 10 % ou inférieur.  $\tau_{1/2}$  est donc

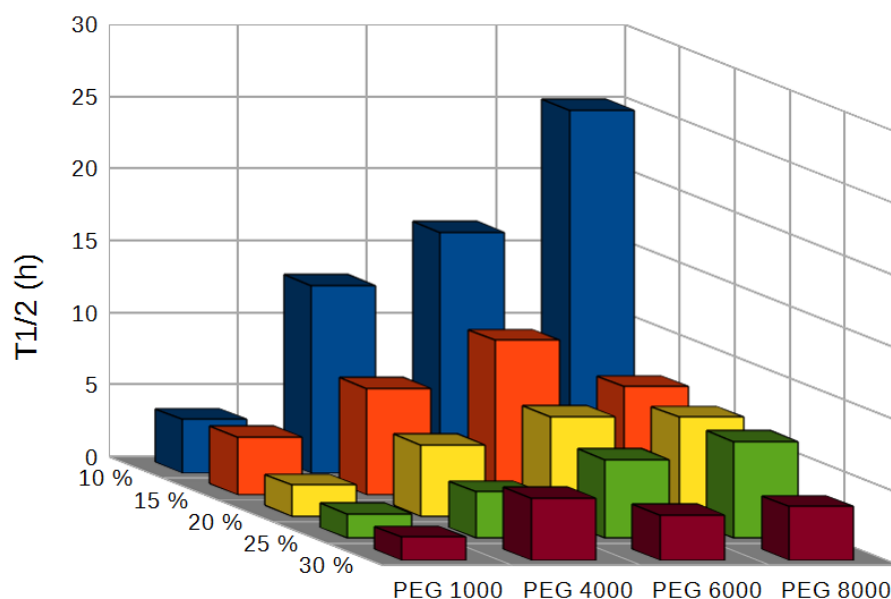


FIGURE 3.6 Evolution du  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en % (w/v) et du poids moléculaire de PEG à 293 K.

très élevé pour les concentrations les plus faibles, on peut noter  $\tau_{1/2} = 3,7 \text{ h} \pm 0,3 \text{ h}$  pour le PEG 1000 à 10 % et  $\tau_{1/2} = 13 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  pour le PEG 4000 à 10 %.

Ces valeurs indiquent qu'une expérience menée avec du PEG 1000 permettra d'atteindre la sursaturation désirée dans la chambre de dialyse en quelques heures pour des concentrations supérieures à 15 % avec une membrane de MWCO 12-14 kDa à une température de 293 K. Dans le cas du PEG 4000 à 8000 les ordres de grandeur sont supérieurs ( $> 20 \text{ h}$  pour des concentrations  $> 15 \%$ ).

Pour les différents sels, les valeurs de  $\tau_{1/2}$  sont représentées sur la Figure 3.7. Les sels, comparés aux PEG, diffusent beaucoup plus rapidement et le  $\tau_{1/2}$  est ici représenté en minutes. Quelle que soit la concentration du sel entre  $0,5$  et  $3 \text{ molL}^{-1}$ ,  $\tau_{1/2}$  sera de l'ordre ou inférieur à 60 min. Les mêmes tendances pour le PEG sont observées concernant l'influence de la concentration et du poids moléculaire.

$\tau_{90 \%}$  est inférieur à 2 h pour tous les types de sels utilisés pour des concentrations supérieures ou égales à  $1 \text{ molL}^{-1}$ .

### Effet de la température

Le rôle de la température sur le temps de diffusion a été étudié par l'analyse à deux températures 277 K et 293 K pour évaluer l'influence de ce paramètre sur la diffusion. Sur la Figure 3.8a on peut voir l'effet de la température sur la diffusion du PEG 1000 et du PEG 8000 à différentes concentrations, dans le cas du PEG 8000 les valeurs de  $\tau_{1/2}$  pour des concentrations  $< 15 \%$  n'ont pas été représentées pour plus de lisibilité (valeurs trop élevées par rapport à l'échelle utilisée).



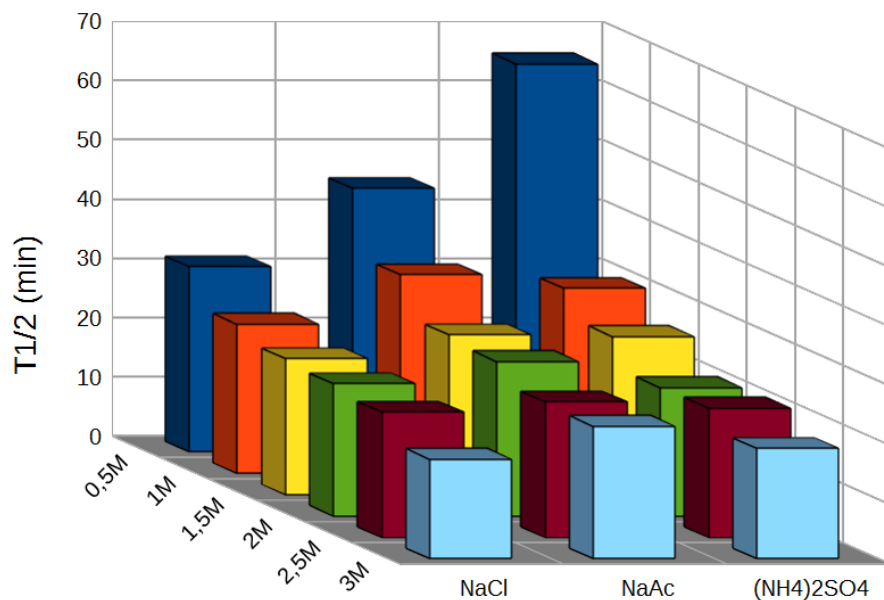


FIGURE 3.7 Evolution du  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en  $\text{mol L}^{-1}$  et du type de sel à 293 K.

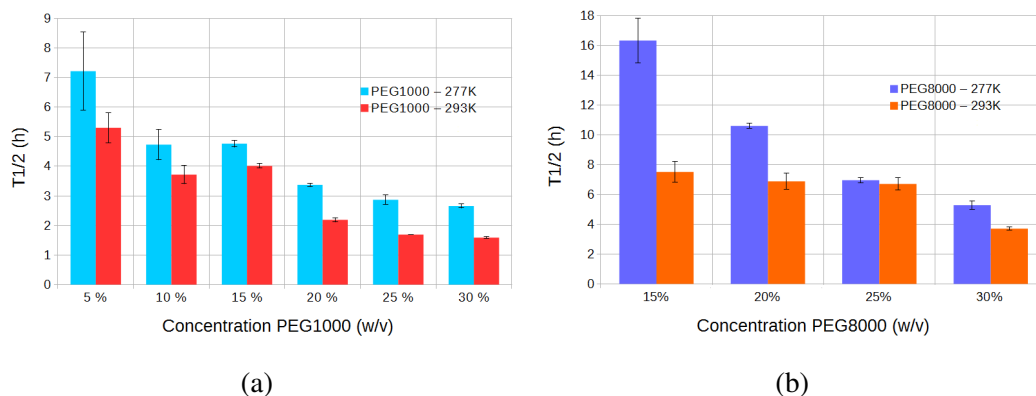


FIGURE 3.8 a)  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en PEG 1000 à 277 K et 293 K. b)  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en PEG 8000 à 277 K et 293 K.

On observe une différence prédictible entre les valeurs de  $\tau_{1/2}$  à 277 K et 293 K. Il est connu que le coefficient de diffusion d'une molécule est dépendant de la température. En première approximation l'équation de Stokes-Einstein pour une sphère dure dans un milieu visqueux peut être appliquée, alors  $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$  où l'agitation thermique est en compétition avec les forces visqueuses. Ainsi si T augmente le coefficient de diffusion D augmente proportionnellement. Cependant le temps de diffusion ne sera pas très différent pour des températures proches.

### Effet du volume de la chambre de dialyse

Pour évaluer l'influence du volume de la chambre de dialyse sur  $\tau_{1/2}$  des expériences ont été effectuées avec deux volumes de bouton de dialyse différents : 50  $\mu\text{L}$  et 200  $\mu\text{L}$ . La Figure 3.9 montre les résultats obtenus avec le PEG 1000 à différentes concentrations. La température des expériences est maintenue à 293 K et la membrane de dialyse sélectionnée a un seuil de rétention de 12-14 kDa.

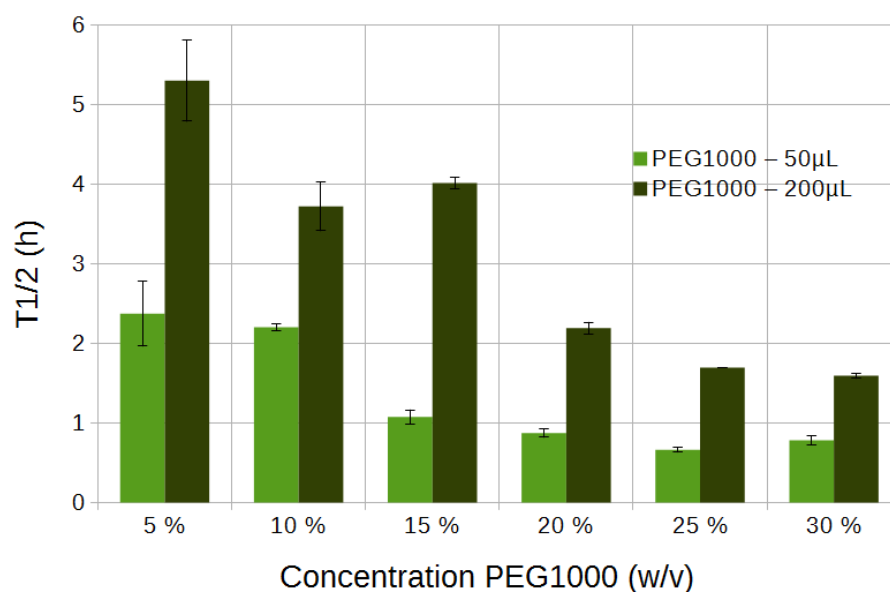


FIGURE 3.9  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en PEG 1000 pour des volumes de chambre de dialyse de 50 et 200  $\mu\text{L}$ .

Dans l'exemple présenté ici, par souci de comparaison, les expériences ont été réalisées avec des volumes de 50  $\mu\text{L}$  et 200  $\mu\text{L}$ . Une différence prononcée apparaît sur la valeur de  $\tau_{1/2}$  entre ces deux cas puisqu'un facteur d'environ 2 ou plus est obtenu sur  $\tau_{1/2}$  lorsque le volume est 4 fois supérieur. En comparant ces derniers résultats à ceux obtenus en faisant varier la température, on remarque que la variation du volume a une influence plus importante que la variation de la température dans la gamme de température et de volume choisie.

Aucun test n'a été poursuivi avec les sels car l'équilibre en concentration entre les compartiments de dialyse est atteint trop rapidement, en moins d'une heure suivant la concentration. Par conséquent la diminution du volume de la chambre de dialyse accélère les échanges

d'une concentration de sel à une autre, permettant la variation manuelle du gradient de sel. Par exemple en cherchant à atteindre la concentration de 1 M NaCl dans la chambre de dialyse, il est possible de changer progressivement la concentration en sel dans un intervalle de temps désiré pour ralentir la vitesse d'équilibration et éviter ainsi un changement brutal de concentration dû au faible temps d'équilibration du sel à cette concentration. Dans le cas d'un PEG ce même processus est très long.

### Effet du seuil de rétention de la membrane

Enfin l'influence du seuil de rétention a été étudié avec 2 membranes de dialyse, d'un MWCO de 3,5 kDa et l'autre de 12-14 kDa. La Figure 3.10 représente les valeurs de  $\tau_{1/2}$  dans ces deux cas pour le PEG 1000 et le PEG 4000. La modification du seuil de rétention de la membrane a une influence comparable au changement de poids moléculaire de l'agent précipitant. Un décalage de 2 à 4 h sur les valeurs de  $\tau_{1/2}$  est observé pour le PEG 4000 entre les deux mesures réalisées avec les deux membranes. Pour le PEG 1000 la même tendance et un décalage similaire de quelques heures entre les deux expériences apparaît. Ces résultats nous permettent de quantifier le temps de diffusion dans le cas de ces deux membranes, mais aussi par extrapolation, dans le cas des membranes de seuil de rétention intermédiaire (6-8 kDa par exemple).

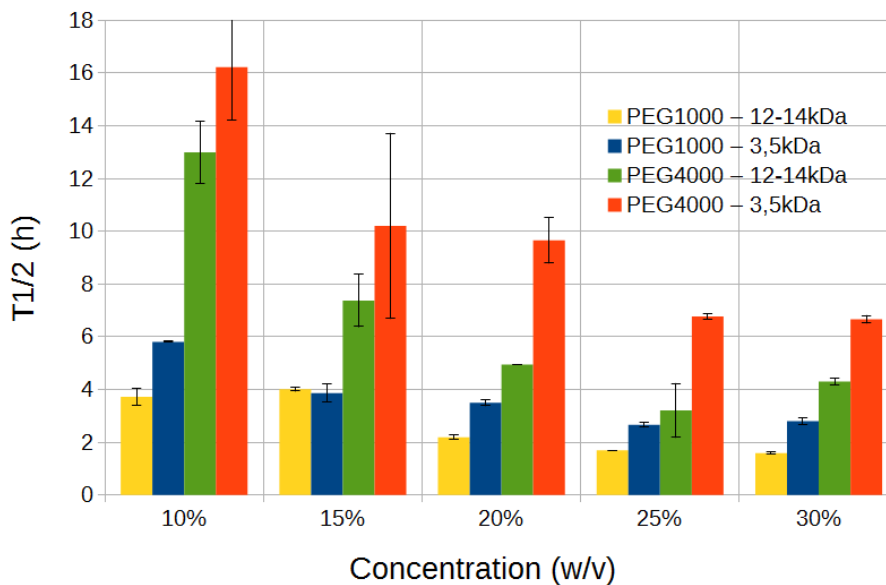


FIGURE 3.10  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en PEG 1000 et PEG 4000 pour deux seuils de rétention différents de la membrane de dialyse.

### Conclusion

En conclusion ces résultats donnent une information quantitative sur les temps d'équilibre entre le réservoir et la chambre de dialyse et l'influence relative de plusieurs paramètres

susceptibles d'être modifiés suivant l'expérience réalisée. Sur la Figure 3.11 sont résumés plusieurs effets observés avec le PEG 1000 tels que, le seuil de rétention (MWCO), le volume, la température, la concentration.

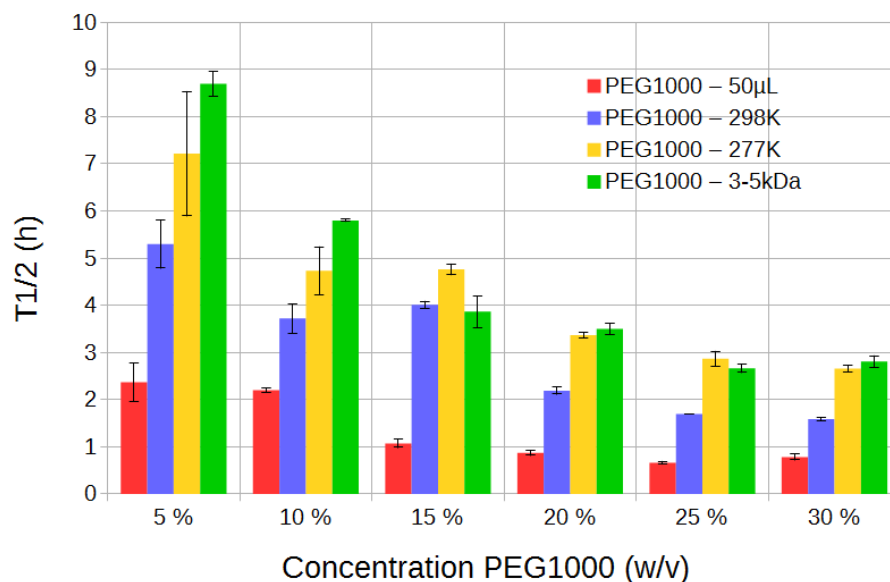


FIGURE 3.11  $\tau_{1/2}$  en fonction de la concentration en PEG 1000 dans plusieurs cas décrit par la légende.

Le volume semble influencer fortement le temps d'équilibrage puisque plus le volume est petit, moins de molécules ont besoin de traverser la membrane pour équilibrer les concentrations. Finalement en extrapolant ce principe, à un volume de réservoir donné l'échange sera extrêmement rapide dans de très petits volumes tels que ceux utilisés en microfluidique.

Il est important de noter que l'échange, dans tous les cas présentés ici, se fait dans les deux sens. Ainsi lorsque l'expérience démarre un flux d'agent de cristallisation entre dans la chambre de dialyse et un flux d'eau sort du bouton. Ces deux flux ont pour but d'équilibrer la concentration de part et d'autre de la membrane. Cet effet est particulièrement important dans le cas où l'agent de cristallisation est un PEG et ceci d'autant plus qu'il est concentré et de poids moléculaire élevé. Lors d'expériences réalisées avec des PEG de poids moléculaire supérieurs à 1000 Da et à des concentrations supérieures à 10 % (w/v) il peut arriver que des bulles d'air se forment dans le bouton de dialyse. Ces bulles proviennent de l'expulsion de l'eau hors du bouton, méthode la plus rapide pour équilibrer la concentration de part et d'autre de la membrane. Cet effet peut être avantageux et contraignant à la fois puisque la protéine risque de précipiter à cause de l'expulsion rapide d'eau du bouton entraînant une augmentation rapide de la sursaturation. Néanmoins si ce phénomène est contrôlé par l'ajout progressif d'un gradient de PEG par exemple, cela pourrait permettre de déshydrater localement des cristaux obtenus par dialyse pour améliorer la qualité cristalline de ces derniers. Il a été montré que la déshydratation des cristaux une fois formés pouvait améliorer leur qualité cristalline, notamment en terme de résolution [141]. De plus, comme expliqué ci-avant, les PEG peuvent être utilisés pour déshydrater des sacs de dialyse par exemple [142], cet effet étant attribué à

la haute pression osmotique atteignable par le PEG [143]. Nous même avons pu observer que la méthode de la dialyse montrait les résultats avec une tendance à l'amélioration de la qualité cristalline [144].

### 3.1.1.3 Cas d'un mélange PEG/sel

En pratique les solutions de cristallisation sont souvent composées d'un mélange de PEG avec des sels et non uniquement de PEG ou d'un sel seul. On retrouve par exemple pour l'IspE une condition comprenant notamment du PEG dans un tampon en présence de sel. De plus comme expliqué dans la section objectif, le sel et le PEG interagissent. Nous allons tenter d'expliquer ce qui semble être un phénomène synergique entre ces deux constituants en solution et qui a pu être précédemment à la fois observé [136] et modélisé [145]. Ces mesures ont été faites exclusivement sur le PEG 6000 à 15 % (w/v) en concentration finale avec deux types de membranes, 6-8 kDa pour être proche du seuil de rétention de la membrane et 12-14 kDa. La concentration et la taille de PEG ont été choisies pour plusieurs raisons : le temps de diffusion ne devait pas être trop long afin de minimiser la dispersion dans les valeurs de  $\tau_{1/2}$  comme c'est le cas pour les concentrations de 5 et 10 % de PEG ; la concentration ne devait pas être trop élevée non plus pour limiter les problèmes d'expulsion d'eau du bouton (problème de dialyse inverse) ; enfin le poids moléculaire ne devait pas être trop proche du seuil de rétention de la membrane (12-14 kDa) de manière à pouvoir effectuer plusieurs mesures, certaines avec un poids moléculaire éloigné du seuil de rétention et d'autres proches (6-8 kDa) pour visualiser un effet plus significatif. La concentration en sel dans le mélange a été choisie aux concentrations plus hautes : 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 0,9 ; 1,3 ; 1,7 molL<sup>-1</sup> pour la membrane 12-14 kDa et aux concentrations plus faibles : 0 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,04 ; 0,08 ; 0,2 molL<sup>-1</sup> pour la membrane 6-8 kDa. Dans un premier temps une grande gamme de concentration en sel a été testée avec la membrane 12-14 kDa. Une fois ces premières mesures réalisées, le seuil de rétention a été abaissé pour vérifier si l'on observait un effet plus révélateur avec cette membrane. La gamme de concentration a aussi été modifiée car d'après Budayova et al. [136] la synergie du PEG et d'un sel sur les interactions protéine-protéine a été observée dès 10 mmolL<sup>-1</sup>.

Sur la Figure 3.12 on peut voir l'évolution de la concentration en PEG 6000 rapportée à la concentration finale en fonction du temps pour 3 mélanges de PEG et de sel. Ces mesures ont été réalisées avec la membrane de MWCO 12-14 kDa. Les barres d'erreur colorées correspondent à l'intervalle de confiance à un  $\sigma$ , soit une déviation standard. Les graphiques ont été obtenus par l'intermédiaire d'un programme réalisé sous ROOT. Les barres d'erreur en y cumulent l'erreur sur le volume final de solution, suivant les pipettes utilisées ; l'erreur liée à la reproductibilité d'une même mesure par RMN, cela tient donc compte aussi de l'étape de phasage et d'intégration des pics. L'erreur sur la dernière valeur du graphique a été diminuée car elle n'était pas représentative. En effet le dernier point du graphique correspond à un état proche de l'état d'équilibre donc la variation d'une mesure à l'autre est faible. Les barres d'erreur en x sont obtenues par répétition de la même mesure à un temps donné (là où les variations en y sont les plus élevées) avec des membranes plus ou moins lavées (pour tenir

compte de ce possible effet parasite). Ensuite l'écart-type est calculé et rapporté au coefficient directeur, à ce temps, de la courbe ajustée pour donner une valeur de  $\Delta x$ . Cette valeur est ensuite extrapolée à tous les autres points.

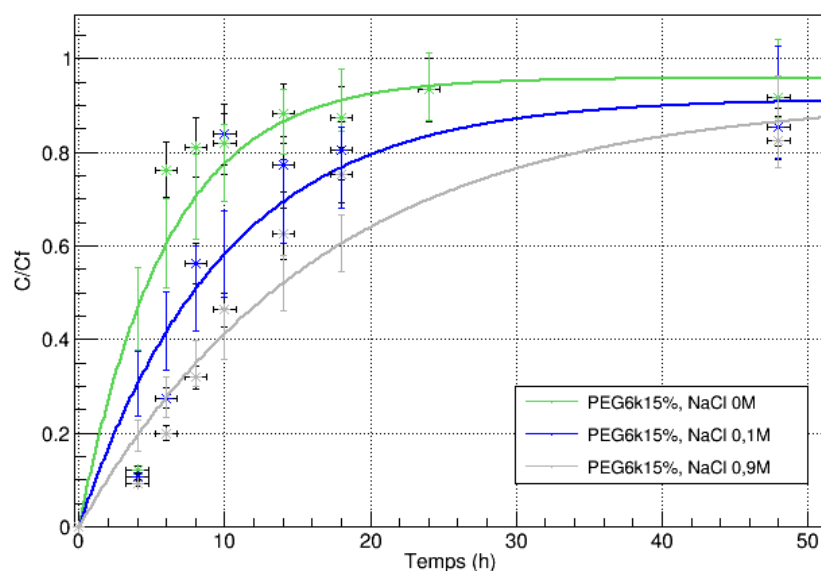
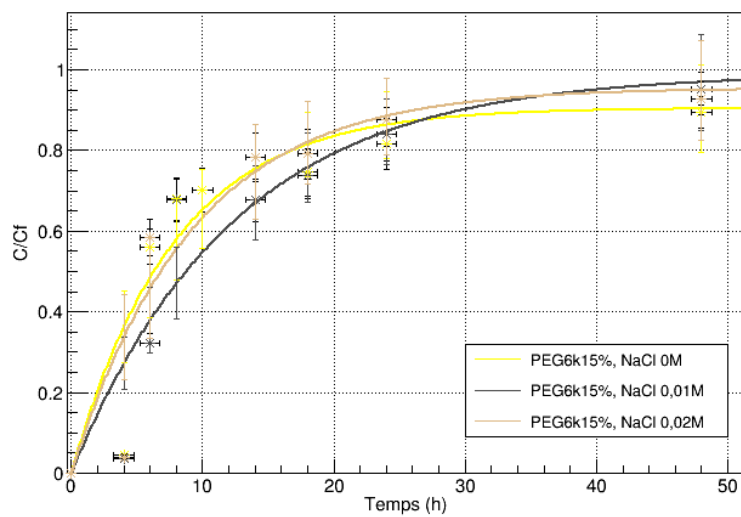


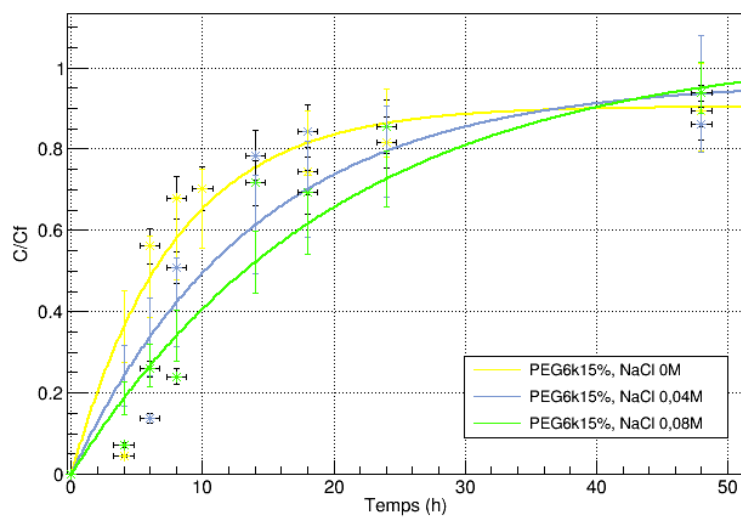
FIGURE 3.12 Concentration en PEG 6000 dans un bouton de dialyse dans 3 conditions différentes. Membrane utilisée 12-14 kDa. La légende représente la condition initiale du réservoir.

La tendance observée sur toutes les concentrations de sel utilisées de 0 à  $1,7 \text{ molL}^{-1}$  est la même :  $\tau_{1/2}$  augmente avec l'augmentation de la concentration en sel dans le réservoir. La méthode d'ajustement utilisée ici diffère un peu de la méthode utilisée pour l'ajustement des courbes obtenues par mesure de l'indice de réfraction. Une différence de valeur de  $\tau_{1/2}$  est observée pour le PEG 6000 seul par rapport aux mesures par indice de réfraction, réalisé avec le même ajustement, de l'ordre de 34 %, soit une variation de  $\tau_{1/2}$  de l'ordre de 2,8 h. Cet écart-type relatif diminue à plus haute concentration (pour les valeurs de  $\tau_{90\%}$  par exemple). Les mesures n'ont cependant pas été réalisées avec les mêmes solutions qui ont été renouvelées, de plus chaque point n'a pas pu être reproduit 3 fois, par rapport à la disponibilité de l'instrument, contrairement aux mesures par indice de réfraction. Ainsi l'erreur sur la valeur de  $\tau_{1/2}$  est plus élevée bien que la tendance observée reste inchangée.

Enfin la deuxième partie des résultats concerne l'utilisation de la membrane 6-8 kDa dans une gamme de concentration moins élevée de sel. La Figure 3.13 ne montre pas de différence significative pour les concentrations en NaCl de 0 à  $0,04 \text{ molL}^{-1}$  où l'on se situe dans les mêmes intervalles de confiance, Figure 3.13a. Pour les concentrations plus élevées on observe les mêmes résultats que pour la membrane 12-14 kDa, à savoir que  $\tau_{1/2}$  est doublé entre la condition sans sel et la condition proche de  $100 \text{ mmolL}^{-1}$ .



(a)



(b)

FIGURE 3.13 Concentration en PEG 6000 dans un bouton de dialyse dans 3 conditions différentes. Membrane utilisée 6-8 kDa. La légende représente la condition initiale du réservoir.

### 3.1.1.4 Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus sur des mélanges de PEG 6000 avec du NaCl montrent que la diffusion du PEG à travers la membrane de dialyse est ralentie par la présence de NaCl et que cet effet est dépendant de la concentration en sel. Plus la concentration en sel est élevée et plus la diffusion du PEG est ralentie. Autrement dit, le temps d'équilibrage des concentrations de PEG de part et d'autre de la membrane est donc plus élevée en présence de sel en concentration croissante. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature dans le cas de la nanofiltration, avec des membranes céramiques [146] ou des membranes en polyimide [147], montre que le taux de réjection (qui correspond à l'unité moins le rapport des concentrations dans le perméat et le réservoir d'alimentation) est plus élevé pour le PEG seul que pour les mélanges de PEG et de différents sels. Ces informations suggèrent que le PEG traverserait plus vite les pores de la membrane en présence de sel.

Le fait que le temps d'équilibrage augmente avec la concentration en sel peut être interprété de plusieurs façons :

L'ajout de sel à la solution de PEG pourrait augmenter la viscosité du milieu et donc le temps de diffusion des molécules en solution. Cependant la viscosité du NaCl à  $0,9 \text{ molL}^{-1}$  est proche de  $1 \text{ mPas}$  d'après [140] en réutilisant une valeur obtenue à  $1 \text{ molL}^{-1}$  ce qui correspond à la viscosité de l'eau. Il existe de nombreuses théories plus ou moins complexes pour évaluer la viscosité d'un mélange [148] mais on peut noter sans calcul que la viscosité du mélange n'augmentera pas suffisamment pour dépasser largement la viscosité du PEG 6000 à 15 % qui est d'après [139] proche de  $8 \text{ mPas}$ .

L'augmentation du temps d'équilibration avec la concentration en sel pourrait être liée à la compétition entre le sel et le PEG et à l'encrassement de la membrane. L'effet d'encrassement de la membrane est un phénomène souvent présenté dans le cas de la filtration [149, 150] mais il n'est jamais décrit dans le cas de la dialyse sans flux. Dans certains cas, comme stipulé sur certains sites de vendeurs de membranes de dialyse, ce phénomène est décrit comme étant de très faible amplitude comparé à la filtration et peut donc être considéré comme négligeable.

On peut supposer que le sel et le PEG vont interagir en solution pour modifier les propriétés de diffusion du PEG à travers la membrane. [151] montre que la présence de NaCl et KCl à  $10 \text{ mmolL}^{-1}$  en solution avec du PEG entraîne une réduction du rapport, volume hydrodynamique spécifique à une concentration de polymère donnée et celui à dilution infinie, plus importante que lorsque le PEG est dans l'eau à une concentration de PEG donnée. Ce rapport a été introduit par Wolf [152] et nous renseigne sur les changements de volume hydrodynamique d'une macromolécule individuelle induits par la présence d'autres macromolécules. Ce changement indiquerait que le volume hydrodynamique du PEG diminue avec une augmentation de la concentration en sel. Cependant il est aussi décrit que la présence du sel charge les molécules de PEG qui pourraient alors interagir avec les cations en solution dû à la présence d'atomes d'oxygène dans les groupements oxyéthylène. C'est en effet ce



qui a été observé à l'aide de simulations numériques dans des nanogouttes dans le cas d'un PEG par Consta and Chung [145]. Une conformation du PEG plus étendue est observée pour un PEG96 lorsqu'une charge critique est atteinte dans la goutte. Ces simulations montrent l'effet du cation sur le PEG. Néanmoins leur application diffère de notre cas notamment de part l'absence de contre-ions dans la solution.

Cependant, d'après Molek and Zydney [153], il a été montré que, en réalisant des expériences d'ultrafiltration avec des protéines ayant subi une PEGylation, le coefficient de tamisage (qui correspond au rapport de la concentration dans la solution filtrée sur celui dans le réservoir d'alimentation) est diminué en présence d'un plus grand nombre de chaînes de PEG conjugués à la protéine pour un même poids moléculaire total. Par exemple le coefficient de tamisage pour l'ovalbumine PEGylatée avec deux PEG de 5 kDa chacun est deux fois plus faible que pour une PEGylation avec un PEG de 10 kDa. Cette dépendance du nombre de chaînes de PEG et non uniquement du poids moléculaire peut être due à la déformation et/ou l'élongation des chaînes de PEG causée par le flux convectif dans les pores de la membrane. Cette observation des chaînes flexibles de PEG est en accord avec le fait que les molécules de PEG ont un coefficient de tamisage plus élevé que les protéines pour un rayon hydrodynamique équivalent.

Finalement cette observation montre que les PEG ne peuvent pas être considérés comme des molécules globulaires en solution. Or l'évaluation du seuil de rétention des membranes de dialyse est basée sur l'usage de molécules globulaires. Des molécules plus linéaires pourraient passer la membrane plus facilement malgré un poids moléculaire plus élevé que le seuil de rétention [154]. L'effet des sels sur le rayon hydrodynamique des PEG aurait ainsi tendance à rendre le PEG plus globulaire et pourrait donc entraver son passage à travers la membrane dans le cas de la dialyse où aucun flux convectif n'est appliqué. Il serait intéressant d'un point de vue fondamental de réaliser des simulations de dynamique moléculaire ainsi que des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) pour évaluer cet effet lors du mélange de PEG et de sel à différentes concentrations de sel.

### 3.1.2 Cristallisation

#### Preuve de principe

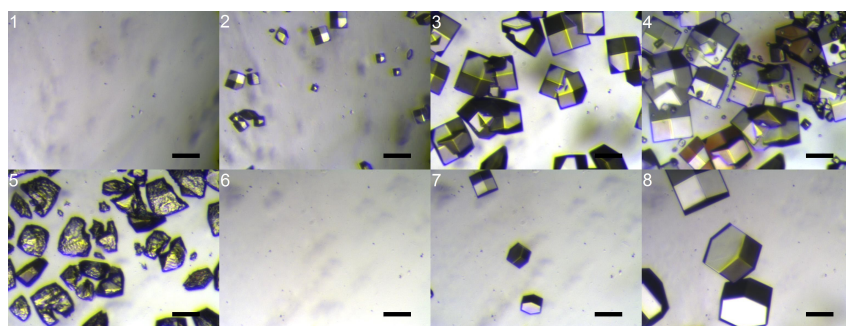
Plusieurs expériences précédemment décrites servent de preuve de principe sur la méthode de cristallisation et les possibilités du banc de cristallisation décrites dans la publication présentée dans la section 2.1.2.3.

Ces expériences ont pour but de montrer le côté réversible de la dialyse *via* la nucléation des cristaux, leur croissance puis dissolution suivi par une nouvelle nucléation et croissance en modifiant la concentration d'agent précipitant et la température. Une troisième expérience a quant à elle pour but de montrer la capacité du banc de cristallisation à maîtriser la nucléation pour croître un gros cristal en utilisant la température comme paramètre de cristallisation. Ces expériences sont décrites dans un travail désormais publié, Junius et al. [144]. Ici seront fournis

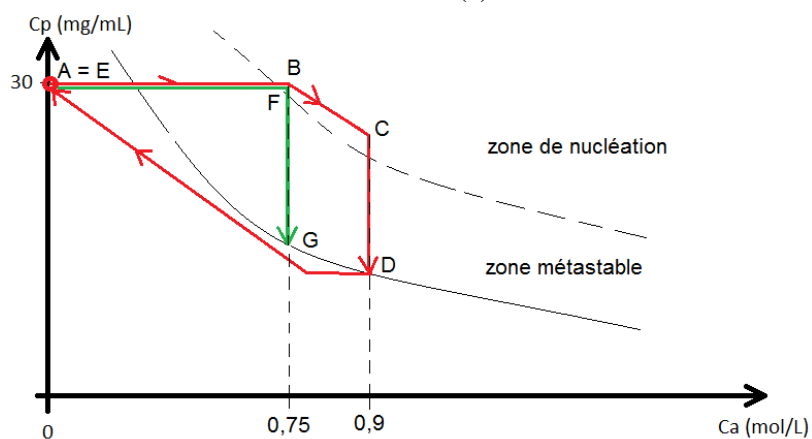
quelques compléments au travail publié, par la représentation schématique de diagrammes de phases (Figures 1.4 et 1.6), permettant d'expliquer les protocoles d'optimisation de nucléation et de croissance cristalline mis en place, pour obtenir ces résultats expérimentaux. La protéine utilisée pour réaliser ces expériences est le lysozyme.

La première expérience est présentée sur la Figure 3.14a et la représentation schématique de cette expérience avec un diagramme de phase relatif est réalisée sur la Figure 3.14b. Elle a été réalisée à une température constante de 291 K. On y voit d'abord la situation initiale dans laquelle la solution de lysozyme à  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  dans l'eau est seule (première image), c'est la situation A (Figure 3.14b). La condition de cristallisation du réservoir est de 0,9 M NaCl ; 0,1 M acétate de sodium pH 4. Le passage progressif de A à B représente l'évolution de la concentration en NaCl dans le bouton (ligne rouge) qui augmente par diffusion de l'agent à travers la membrane de dialyse. La nucléation débute une fois que la sursaturation suffisante est atteinte, point B du diagramme, la concentration de protéine commence donc à diminuer progressivement à mesure que les cristaux se forment (images 2 et 3). La nucléation se poursuit en même temps que la croissance des nuclei déjà formés jusqu'à atteindre la concentration finale de NaCl, point C sur le diagramme. Puis les cristaux présents en solution croissent, ce qui est représenté par la diminution de la concentration de protéine en solution jusqu'au point D. A ce moment un grand nombre de cristaux est présent en solution (image 4). Le processus de dissolution débute lorsque la concentration en NaCl est progressivement diminuée jusqu'à ce que seul le tampon (0,1 M acétate de sodium pH 4) circule dans le réservoir. Cela est représenté par le franchissement de la courbe de solubilité qui entraîne une dissolution des cristaux (image 5) et une augmentation de la concentration de protéine en solution jusqu'à atteindre la concentration initiale de protéine, point E, qui correspond à l'état initial du point A (image 6). La concentration est ensuite à nouveau augmentée de sorte à atteindre une nouvelle condition de cristallisation moins sursaturée et ainsi nucléer un moins grand nombre de cristaux en solution. La concentration en NaCl augmente ainsi jusqu'à atteindre la nouvelle condition de cristallisation, point F et image 7. Une nucléation beaucoup moins importante est observée puis les cristaux formés grossissent sans nucléation supplémentaire jusqu'au point G, image 8.

La seconde expérience est présentée sur la Figure 3.15a et la représentation schématique de cette expérience avec un diagramme de phase est sur la Figure 3.15b. Une fois que l'équilibre de la concentration de part et d'autre de la membrane est atteint, la concentration en NaCl, qui est de 0,9 M, est maintenue constante tout au long de l'expérience. La température initiale est de 291 K pour induire une forte nucléation et correspond au point A du diagramme de phase de la Figure 3.15b. De nombreux cristaux nucléés (3 premières images). Le processus de dissolution est déclenché par une augmentation graduelle de la température jusqu'à 313 K. A mesure que les cristaux se dissolvent la concentration de protéine en solution augmente (passage de B à C), c'est la situation de l'image 6. Afin de former moins de cristaux en solution la température est diminuée jusqu'à 295 K, des cristaux se forment lorsque la zone de nucléation est atteinte (point D) puis les cristaux croissent jusqu'au point E à 295 K. L'image



(a)



(b)

FIGURE 3.14 a) Expérience de nucléation, croissance, dissolution puis re-nucléation et croissance utilisant la concentration de précipitant comme paramètre de l'expérience. Température constante de 291 K. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience.

8 montre clairement que moins de cristaux se sont formés en solution suite à la deuxième nucléation.

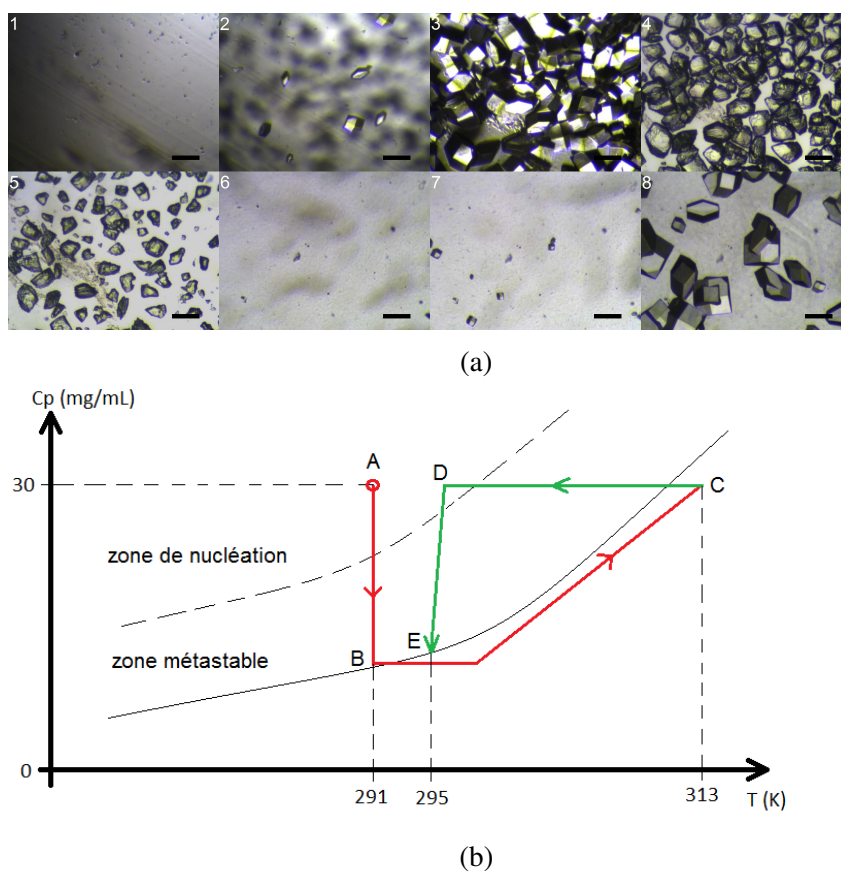
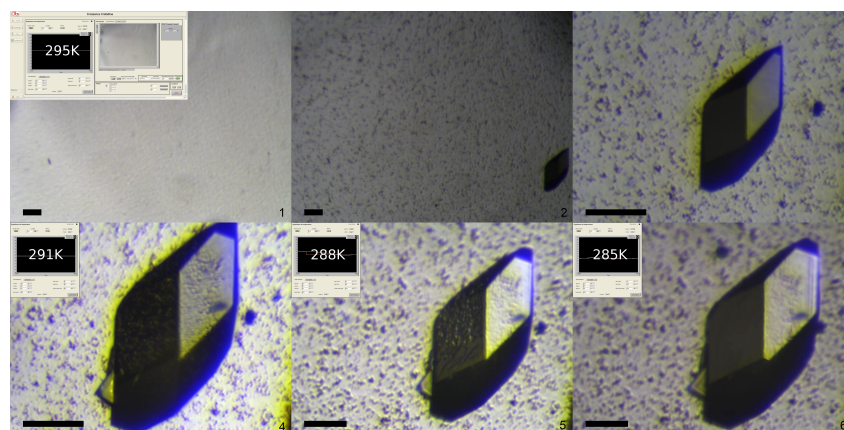


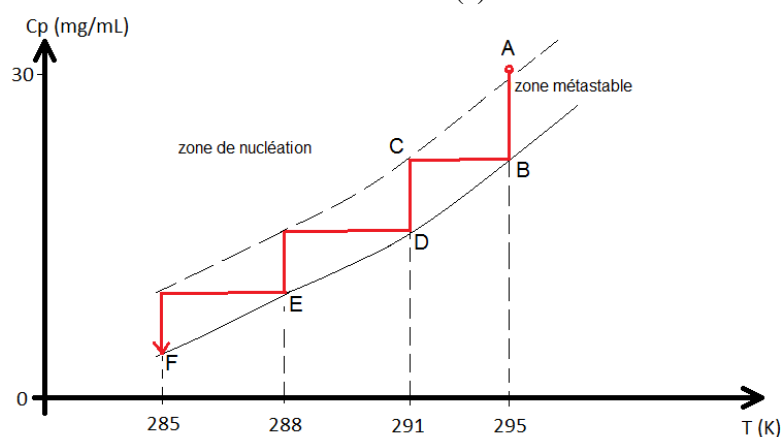
FIGURE 3.15 a) Expérience de nucléation, croissance, dissolution puis re-nucléation et croissance utilisant la température comme paramètre de l'expérience. Concentration de NaCl constante de 0,9 M. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience.

Enfin la troisième expérience est présentée sur la Figure 3.16a et la représentation schématique de cette expérience avec un diagramme de phase est sur la Figure 3.16b. Une fois que l'équilibre de la concentration de part et d'autre de la membrane est atteint, la concentration en NaCl a été maintenue constante, à 0,75 M NaCl dans le tampon acétate de sodium à 0,1 M pH 4, tout au long de l'expérience. La température initiale est de 295 K. Dans ces conditions, très peu de germes sont formés en solution comme le montre l'image 2 où l'on voit un cristal en solution. Ce cristal en particulier est suivi au cours de cette expérience. Le cristal continue de croître à 295 K jusqu'à ce qu'aucune croissance macroscopique ne soit observée (point B et image 3). La croissance est relancée à l'aide d'une diminution de température, passage de B à C. Le cristal continue de croître à la nouvelle température de 291 K, jusqu'au point D, puis le processus de diminution de température est répété dès qu'aucune croissance n'est visible, donc qu'on se situe proche de la courbe de solubilité, comme décrit par Budayova-Spano et al. [13] pour la croissance de gros cristaux pour la cristallographie des protéines aux neutrons. La croissance du cristal se poursuit donc par étapes, de D à E puis de E à F, et aucun nouveau

crystal n'est formé en solution ce qui implique que la zone de nucléation n'est jamais atteinte. Au final le cristal obtenu possède une longueur supérieure à 500  $\mu\text{m}$  dans sa dimension la plus large.



(a)



(b)

FIGURE 3.16 a) Expérience présentant le contrôle de la nucléation et croissance d'un cristal en utilisant la température. Concentration de NaCl constante de 0,75 M. Lecture de gauche à droite et de haut en bas. Description dans le texte. Echelle 100  $\mu\text{m}$ . b) Représentation schématique du diagramme de phase accompagné des trajectoires cinétiques liées à l'expérience.

Finalement la dialyse contrôlée en température permet de modifier la sursaturation de manière réversible et, de parcourir plus facilement les différentes zones du diagramme de phase comparé à d'autres méthodes de cristallisation, citées dans la section 1.1.2.2. Cela est réalisé à condition que les paramètres de cristallisation soient contrôlés ; il est alors possible de faire croître des cristaux et de les dissoudre tant qu'aucune précipitation irréversible ou dénaturation de la protéine n'apparaît.

## Rayons X

Des données de diffraction aux rayons X ont été collectées sur un nombre conséquent de cristaux de lysozyme et d'IspE. Il semble que les expériences réalisées en bouton de dialyse contrôlé en température et en banc de cristallisation, permettent d'améliorer généralement les

cristaux obtenus (morphologie, taille, qualité cristalline) comparé aux expériences témoins réalisées par la diffusion de vapeur en goutte suspendue [144]. Cela s'est traduit par l'obtention des monocristaux avec une meilleure mosaïcité et meilleure résolution, valeurs obtenues *via* les statistiques XDS, sur la même ligne de lumière ESRF, avec le faisceau de photons d'intensité équivalente et sur des cristaux comparables en taille. La mosaïcité est un paramètre important lorsque l'on cherche à caractériser la perfection cristalline, une meilleure mosaïcité sera synonyme d'un meilleur ordre cristallin donc c'est un critère de qualité cristalline [155]. La tendance observée avec ces 2 systèmes protéiques étudiés indique que la qualité cristalline est améliorée par la méthode développée de cristallisation par dialyse. Nous sommes conscients qu'une étude plus approfondie sur un plus grand nombre de protéines et de cristaux, visant à évaluer la valeur exacte de la mosaïcité des cristaux ainsi que l'homogénéité du réseau cristallin par des méthodes appropriées telles que la topographie de diffraction X [156–158], devrait être menée afin de pouvoir discuter de la perfection cristalline le plus justement possible quant aux résultats observés.

### 3.1.2.1 Lysozyme

Le lysozyme du blanc d'œuf de poule étant une protéine dont les conditions de cristallisation sont bien connues, des essais de cristallisation en diffusion de vapeur en goutte suspendue et en bouton de dialyse contrôlé en température ont été menés en reprenant des conditions similaires. La concentration de la protéine a été choisie à  $\sim 30 \text{ mg mL}^{-1}$ . La protéine, issue d'une poudre commerciale, a été dissoute directement dans l'eau distillée et a ensuite été filtrée et centrifugée. La solution de cristallisation est composée de NaCl ainsi que d'acétate de sodium. La concentration de l'acétate de sodium dans la solution finale de cristallisation est de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  avec un pH de 4. La concentration en NaCl varie selon les expériences de  $0,75$  à  $1,2 \text{ mol L}^{-1}$  suivant le niveau de sursaturation désirée.

Le lysozyme a été cristallisé dans le banc de cristallisation comme présenté dans les expériences de preuve de principe (cf. section 3.1.2). Les conditions de cryoprotection utilisées pour le lysozyme sont la concentration initiale en NaCl augmentée de  $0,1$  à  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de ce même sel, pour éviter que les cristaux ne s'abiment, avec le tampon dans sa concentration initiale à savoir  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  d'acétate de sodium et en présence de  $20 \%$  (v/v) de glycérol.

### 3.1.2.2 IspE

A partir des conditions de cristallisation initiales connues pour cette protéine, des essais de cristallisation ont été effectués en faisant varier la concentration, la composition chimique et le pH pour trouver des conditions optimales qui permettraient de contrôler le nombre de cristaux, l'objectif étant d'avoir peu de cristaux dans une seule condition. Cette protéine cristallise en présence d'ATP ou ADP et la présence de  $\text{Mg}^{2+}$  est nécessaire à l'activité de l'enzyme. Les différentes conditions ont d'abord été testées en goutte suspendue puis en dialyse. Des cristaux ont été obtenus en goutte suspendues dans les conditions suivantes : PEG 3350



entre 23 et 25 % (w/v) à pH 6,5, PEG 4000 entre 22 et 28 % (w/v) aux pH 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5, PEG 8000 entre 22 et 28 % (w/v) aux pH 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5. La concentration utilisée de protéine a toujours été d'environ  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Toutefois les cristaux ayant poussés dans des conditions < 25 % étaient peu reproductibles comparés aux conditions > 25 %. Finalement, la cristallisation est apparue comme étant plus reproductible à pH 6 (tampon de citrate de sodium à 0,1 M). Sur la base de la reproductibilité, les meilleurs résultats de cristallisation ont été obtenus pour le PEG 8000. Enfin aucune différence majeure n'a été notée d'un point de vue de la cristallisation en utilisant de l'ATP ou de l'ADP pour la cristallisation en goutte. La protéine cristallise presque exclusivement sous forme de cluster de cristaux en goutte (cf. Figure 1.2a). Aussi en effectuant le macro-ensemencement de cristaux il est apparu que la zone métastable s'étend au moins jusqu'à la condition PEG 8000 14 % (w/v) en présence d'ADP à pH 6.

Dans le cas de la dialyse moins de conditions ont été testées du fait de la nature plus consommatrice en protéine de cette méthode de cristallisation (volumes de boutons entre 10 et 25  $\mu\text{L}$ ). Les conditions optimales diffèrent légèrement, dans tous les cas la concentration en PEG en bouton de dialyse a été diminuée par rapport aux conditions en goutte. Les conditions ayant permis d'obtenir le plus de cristaux de façon reproductibles sont pour le PEG 8000 entre 17 et 22 % (w/v) à pH 5,5 et 6. La cristallisation en présence d'ATP s'est révélée être plus efficace lors de nos tests de cristallisation. Dans le cas de la dialyse contrôlée en température, les cristaux obtenus sont le plus souvent des cristaux uniques comparés aux clusters polycristallins obtenus quasi systématiquement par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue.

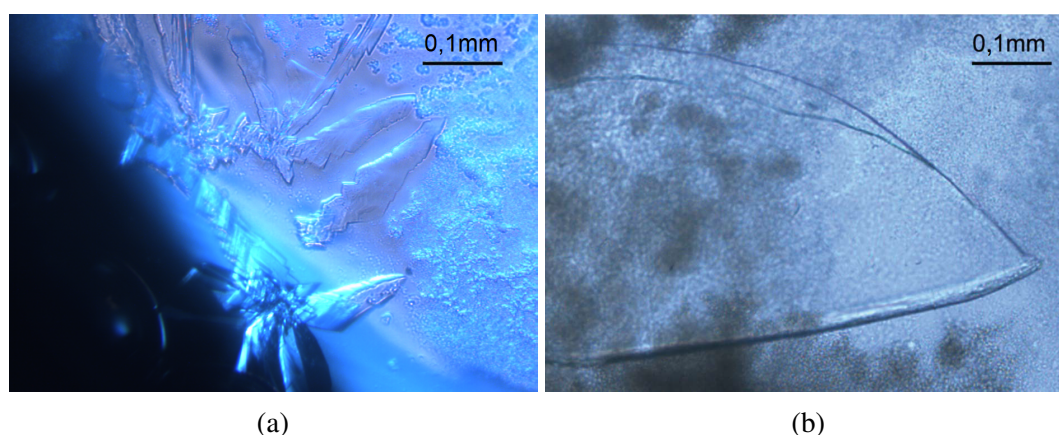


FIGURE 3.17 Cristaux d'IspE obtenus par dialyse contrôlée en température en présence a) d'ADP et b) d'ATP.

Enfin les conditions de cryoprotection utilisées pour l'IspE sont identiques pour tous les composants du mélange sauf pour le PEG dont la concentration est augmentée de +2 à 5 % en présence de 10 à 20 % (v/v) de glycérol.

### 3.1.3 Courbes de solubilité

Une des améliorations majeure du banc de cristallisation vient de la possibilité de mesurer l'absorbance *in situ* de la protéine pendant une expérience de cristallisation. Cet aspect présente un intérêt évident pour étudier les diagrammes de phase et plus particulièrement pour déterminer la courbe de solubilité de la protéine à cristalliser.

Dans cette section sera présenté succinctement le type de courbe de solubilité obtenu à l'aide d'une méthode manuelle de détermination de courbe de solubilité dans le cas du lysozyme et les possibilités futures d'utilisation du banc de cristallisation pour déterminer ce type de courbe. La détermination d'une courbe de solubilité dans le banc de cristallisation n'a pas encore été réalisée en raison des aspects instrumentaux et des corrections à réaliser sur les mesures effectuées mais sera envisageable très prochainement.

#### 3.1.3.1 Méthode manuelle

Des méthodes usuelles existent pour déterminer des courbes de solubilité, à titre d'exemple, on peut citer les travaux d'Asherie [44] et de Budayova [8]. Un point de solubilité peut être obtenu à partir d'une solution sursaturée ou sous-saturée suivant la méthode utilisée. Dans notre cas la méthode adoptée est basée sur celle décrite par Budayova-Spano et al. [13]. Plusieurs batchs de 100  $\mu\text{L}$  ont été réalisés avec un mélange de protéine et d'agent cristallisant afin d'obtenir après mélange la concentration désirée. Dans les cas où la solution est largement sursaturée, il n'est pas nécessaire de déposer un cristal en solution car la nucléation spontanée est apparue. Après une première approximation des points de solubilité, de nouvelles expériences sont menées avec des concentrations de protéine plus faibles pour déterminer plus précisément le point de solubilité à la température donnée. Sur la Figure 3.18 quelques points de solubilités obtenus par cette méthode à 4 températures différentes pour des concentrations de NaCl de 0,75 et 0,9  $\text{molL}^{-1}$  sont montrés. En comparaison 4 points obtenus aux mêmes températures aux concentrations en NaCl de 4 et 5 % (w/v) ont été tracés à partir de la publication de Cacioppo and Pusey [159] (seuls les points obtenus aux mêmes températures ont été tracés à partir des ajustements décrits dans la publication). Dans notre cas les concentrations sont proches de 4,4 et 5,3 % (w/v) respectivement afin de pouvoir les comparer.

La valeur du coefficient d'absorption molaire utilisé est de  $38940 \text{ Lmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Ces résultats sont concordants avec les résultats décrits dans la littérature [159], cependant cette méthode consomme beaucoup de protéine. Ce résultat présente un intérêt dans un but comparatif. En effet ces mesures ont été réalisées afin de comparer les résultats obtenus par la méthode manuelle avec la méthode automatisée du nouveau banc de cristallisation. La comparaison ne sera pas décrite dans cette thèse mais le sera à l'avenir.



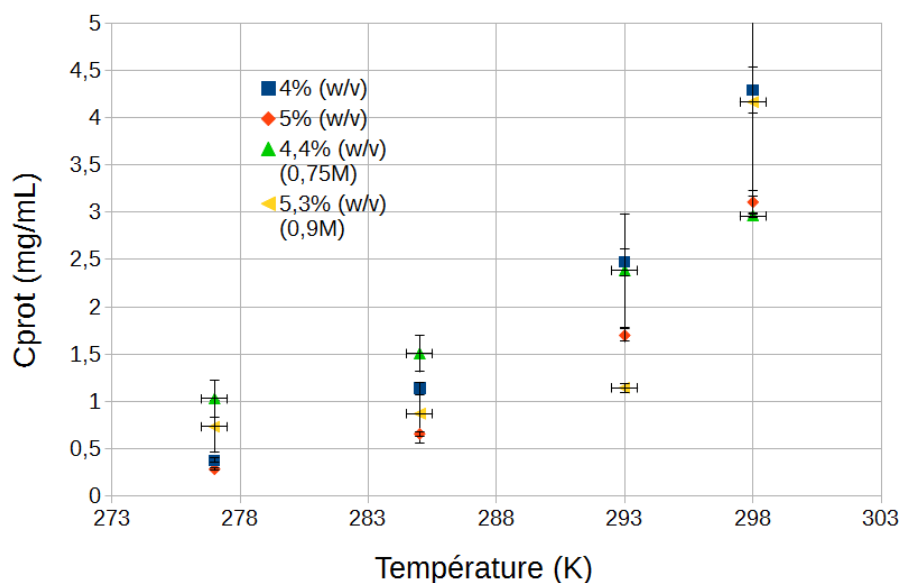


FIGURE 3.18 En vert et jaune : points de solubilités obtenus dans nos expériences à pH 4 pour la forme tétragonale du lysozyme. En bleu et orange : points de solubilités obtenus à pH 4 pour la forme tétragonale du lysozyme d’après la littérature [159].

### 3.1.3.2 Méthode utilisant le banc de cristallisation

La mesure de l’absorbance à haute concentration entraîne des dérives comme celle décrite dans la section 2.1.3.2 qui est liée à la non-linéarité du capteur. De plus d’autres enjeux renforcent la difficulté de la mesure. En pratique lorsque l’on utilise un spectromètre avec le logiciel fourni, on possède différentes options de correction des spectres, des outils pour évaluer l’intensité de la référence etc... Ici aucun logiciel de ce type n’est utilisé et l’interfaçage direct du spectromètre sous LabVIEW a été préféré. Pour cette raison il est nécessaire d’ajouter manuellement chaque option permettant par exemple de passer d’un spectre en intensité, à un spectre en absorbance en fonction des choix de l’utilisateur. Quelques mesures préliminaires ont été réalisées avec le spectromètre MayaPro à différentes concentrations de lysozyme (cf. Figure 3.19). Le temps d’intégration est de 100 ms et les spectres ne sont pas moyennés. Ceci explique le bruit présent sur les mesures à haute concentration (là où l’intensité est très faible).

Plusieurs points sont importants, le premier est que l’effet de non-linéarité du capteur est présent mais semble tout de même moins prononcé que pour le QE65PRO (cf. Figure 2.8). De plus la gamme de concentration atteignable est plus faible que dans le cas des mesures réalisées en cuves de 2 mm, ce qui est attendu puisqu’ici nous avons une chambre de dialyse dont les deux faces sont séparées par une distance interne de 4 mm. Les spectres présentés sur la Figure 3.19 ont été réalisés en introduisant la protéine à différentes concentrations directement dans la chambre de mesure. La mesure de référence a elle aussi été réalisée dans la chambre.

Lors d’une mesure de concentration usuelle par spectroscopie UV, plusieurs étapes sont réalisées. La lampe est mise en marche pendant un certain temps pour que l’intensité délivrée

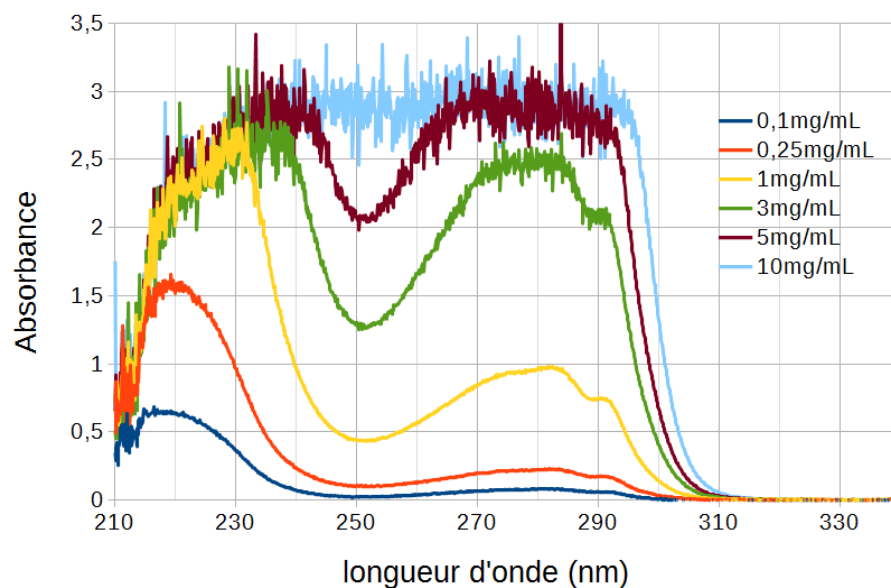


FIGURE 3.19 Spectre d'absorbance en fonction de la longueur d'onde pour le MayaPro réalisé dans le banc de cristallisation avec un temps d'intégration de 100 ms sans aucune moyennation.

soit stable. La référence (tampon par exemple) est introduite dans une cellule et un spectre d'intensité de référence est mesuré, un spectre de "dark", bruit de fond, est acquis en actionnant le shutter de la lampe. Les échantillons à mesurer sont placés dans la cellule et un spectre d'absorbance est obtenu. Néanmoins, ce type de protocole est adapté à une mesure sur une courte durée, et ici la mesure d'un spectre de blanc au début de l'expérience donnera certainement des premiers spectres corrects. Cependant au bout de plusieurs jours d'expérience des dérives pourraient apparaître en raison des différences d'intensité de la lampe (si l'intensité de la lampe n'est pas constante ou si la lampe n'a pas le temps de chauffer suffisamment pour atteindre une stabilité suffisante).

C'est une des raisons pour laquelle un système avec une mesure de la référence et une mesure dans la chambre a été mis en place pour avoir constamment une référence valable. Cependant dans notre système le chemin optique ainsi que l'ouverture permettant de laisser passer le faisceau UV sont différents entre la chambre et le réservoir. Le réservoir possède une large ouverture et un chemin optique de 9mm. Pour faire une mesure successive dans la chambre et dans le réservoir il est nécessaire de corriger l'intensité reçue par le spectromètre par un facteur  $\alpha$  de sorte que  $I_c = \alpha I_r$  avec la même solution à chaque longueur d'onde.

En pratique deux méthodes peuvent être envisagées pour mesurer une courbe de solubilité dans le banc de cristallisation. La première est de diminuer progressivement la température après avoir formé des cristaux en solution, en enregistrant des spectres à chaque température une fois que la croissance macroscopique des cristaux cesse. Une représentation schématisée par un diagramme de phase illustre ce cas de figure sur la Figure 3.20 dans le cas d'une protéine dont la solubilité est directe. La ligne rouge et la ligne verte représentent deux trajectoires envisageables pour échantillonner la courbe de solubilité. Les flèches représentent

le moment où, à partir d'une mesure par spectroscopie UV, il est possible d'accéder à la valeur de solubilité. Dans un cas il y aurait 15 points (rouge) et dans l'autre 5 points (vert).

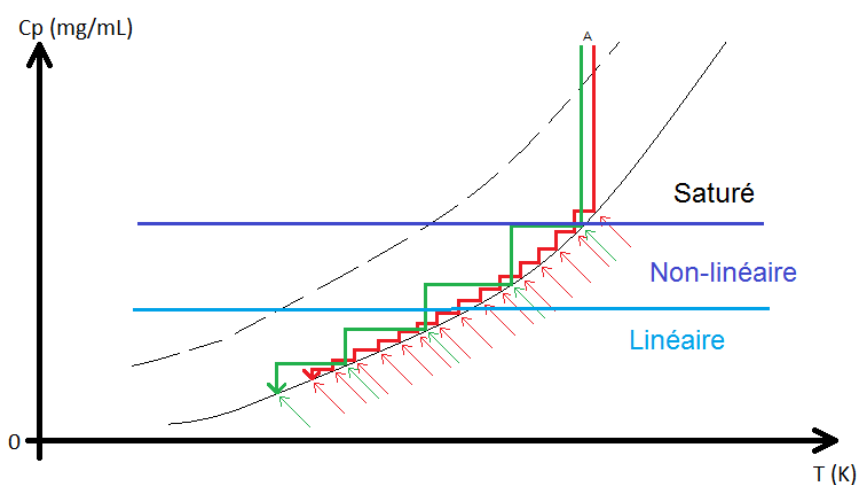


FIGURE 3.20 Représentation schématique de la trajectoire cinétique d'une expérience visant à déterminer une courbe de solubilité par diminution de la température. En rouge, l'échantillonnage est plus élevé qu'en vert. Le point A représente le point de départ d'une expérience. Les lignes bleues délimitent les zones linéaire, non-linéaire et saturée des spectres.

La deuxième possibilité est d'augmenter progressivement la température après avoir formé de nombreux cristaux en solution. Un exemple est illustré sur la Figure 3.21 dans le cas d'une protéine dont la solubilité est directe.

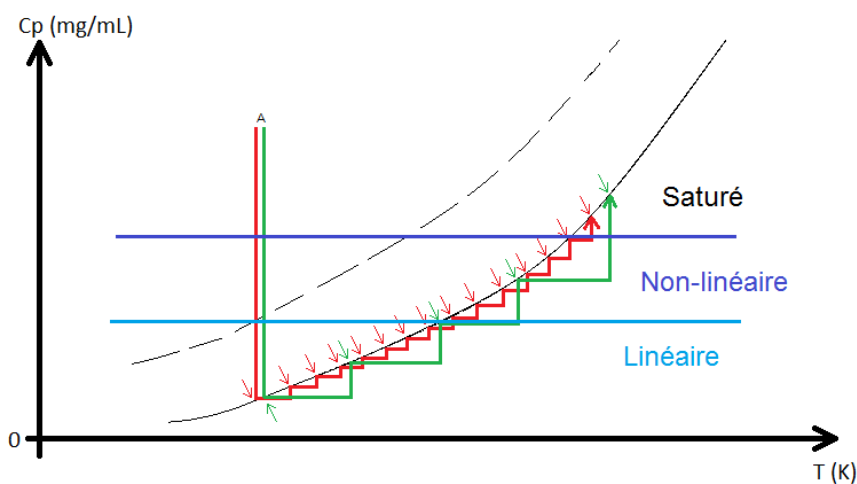


FIGURE 3.21 Représentation schématique de la trajectoire cinétique d'une expérience visant à déterminer une courbe de solubilité par augmentation de la température. En rouge, l'échantillonnage est plus élevé qu'en vert. Le point A représente le point de départ d'une expérience. Les lignes bleues délimitent les zones linéaire, non-linéaire et saturée des spectres.

Dans les deux cas présentés ci-dessus, trois zones délimitées par des traits pleins bleus apparaissent sur les représentations schématiques des diagrammes de phase. Ces zones sont définies ici arbitrairement pour indiquer que : dans la zone linéaire (donc à une concentration de protéine faible) la concentration peut être déterminée par la loi de Beer-Lambert ; dans la

zone non-linéaire un ajustement est nécessaire pour accéder à la concentration de protéine donc la valeur mesurée présente une plus grande incertitude (voir section 4.3.2) ; enfin dans la zone saturée le spectre n'est plus exploitable. La diminution du chemin optique de la cuve dans laquelle sont effectuées les mesures permet de décaler toutes les limites vers des concentrations de protéine plus élevées.

Sur la Figure 3.22 est représentée l'évolution de l'intensité mesurée avec le spectromètre MayaPro, temps d'intégration de 5 secondes, sans moyennage, lors d'une expérience avec du lysozyme en concentration initiale d'environ  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  dans la condition 0,9 M NaCl ; 0,1 M acétate de sodium pH 4 de 283 à 278 K. La nucléation a eu lieu à 288 K puis la température a été diminuée sans attendre que la solubilité soit atteinte. Ainsi à  $t_1$  on est à 283 K, puis la température a été diminuée à 278 K peu de temps avant  $t_2$ , 24 h après  $t_1$  et enfin  $t_3$  correspond à 20 h après  $t_2$ .

Cette expérience est un premier essai qui permet d'appréhender la mesure par spectroscopie UV lors d'une expérience de dialyse. Cette expérience montre la faisabilité de la mesure d'absorbance malgré le nombre de cristaux en solution et met en évidence l'effet de la concentration en temps réel. Il est à noter que les cristaux se forment majoritairement au fond de la cellule de dialyse ou dans le volume de la solution de la chambre de dialyse et finissent par se déposer sur le fond optique de la chambre de dialyse. Ainsi, cela n'empêche pas la mesure par spectroscopie UV.

### 3.1.3.3 Conclusion

Finalement, la mesure par spectroscopie UV dans le banc de cristallisation est envisageable et permet d'accéder à la solubilité via la relation de Beer-Lambert. Plusieurs méthodes sont envisageables et il conviendra à l'avenir de réaliser des mesures de solubilité avec des protéines modèles dans un premier temps pour déterminer la méthode la plus efficace mais aussi pour confronter les résultats obtenus avec une méthode manuelle.

A l'heure actuelle il est nécessaire de finaliser la programmation de l'appareil sous l'interface LabVIEW avec davantage d'options. De plus la cellule actuelle avec un chemin optique de 4 mm a été réalisée sur mesure. Les dimensions d'une telle pièce en quartz semblaient très difficiles à concevoir par le fabricant ayant confectionné cette pièce pour nous. Cependant après cette première réalisation qui s'est révélée être une réussite, le fabricant a suggéré qu'il serait envisageable de réduire les dimensions de la cellule en quartz de sorte à avoir une cellule rectangulaire dont le chemin optique pourrait être de 2 voire de 1 mm. Un tel design permettrait de réduire le volume de la cellule mais aussi de mesurer des concentrations beaucoup plus élevées qu'à l'heure actuelle, pour explorer une étendue plus vaste de la courbe de solubilité. Néanmoins, une telle cellule ne permettrait vraisemblablement pas de récupérer les cristaux formés pour des analyses aux rayons X au vu la difficulté que représente la récupération d'un cristal dans un interstice de 1 mm. Certaines cellules pourraient donc être réservées à l'élaboration de la courbe de solubilité dans un volume très faible et d'autres

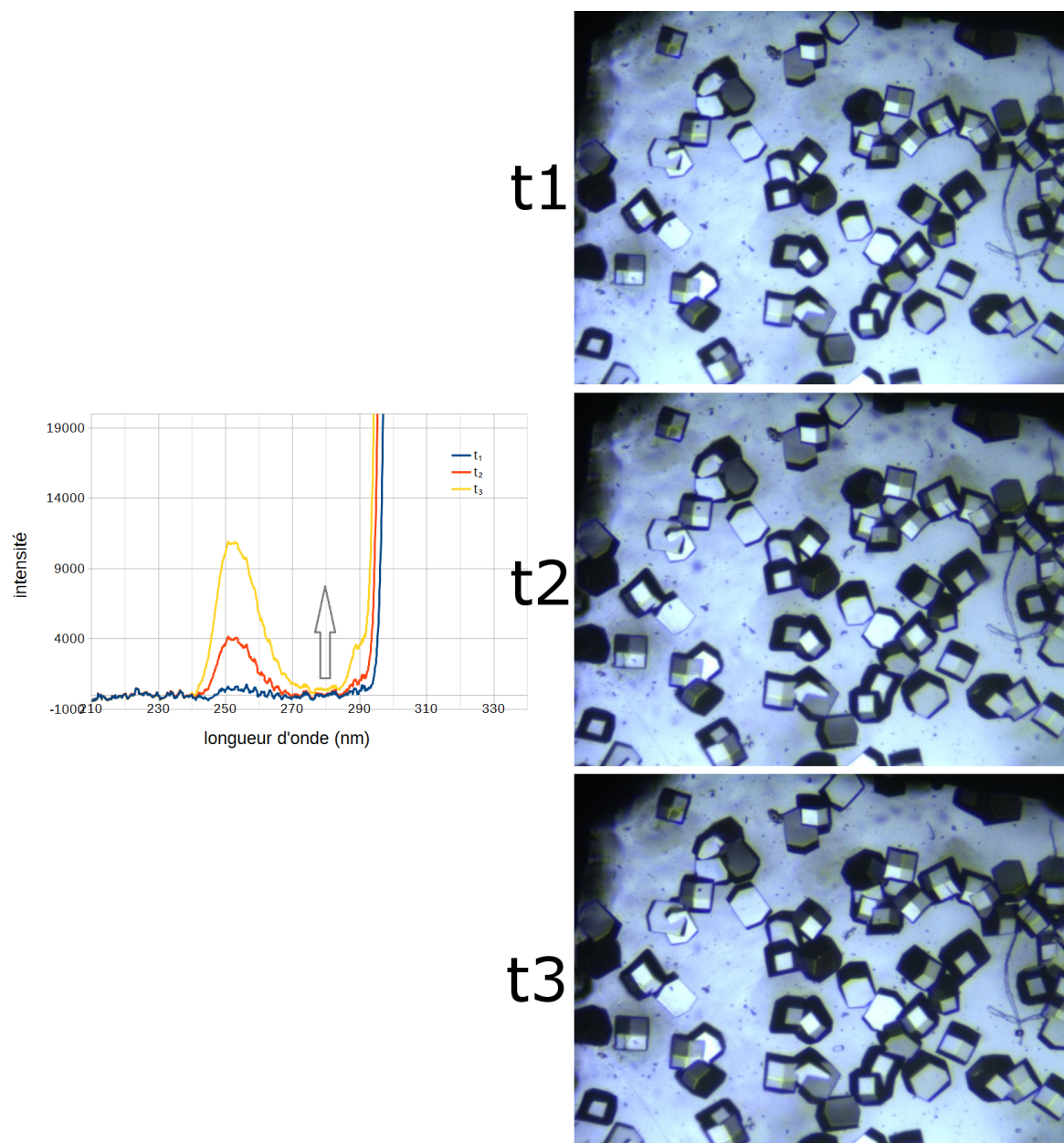


FIGURE 3.22 Evolution de l'intensité en fonction de la longueur d'onde avec le temps lors de la croissance de cristaux en solution :  $t_1 = 0$  h,  $t_2 = 24$  h,  $t_3 = 44$  h.

cellules pourraient servir à l'optimisation de la croissance cristalline pour collecter des données de diffraction sur des cristaux ayant une forte qualité cristalline.

## 3.2 Microfluidique

### 3.2.1 Utilisation

Dans cette section seront présentées les différentes étapes d'utilisation d'une puce microfluidique. Après la conception d'une puce selon les étapes décrites dans la section 2.2.3, des entrées et sorties adaptées doivent être déposées sur la puce pour maintenir les tuyaux acheminant les solutions. Pour cela des connecteurs NanoPorts™ vendus par Upchurch (Oak Harbor, WA, USA) sont utilisés. Ces connecteurs sont directement collés sur la puce à l'aide d'une colle epoxy bi-composants et permettent de visser un bouchon percé dans lequel se trouve le tuyau (tube Teflon FEP, "fluorinated ethylene propylene" UpChurch) acheminant les solutions. Il a été observé expérimentalement qu'avec ce type de colle un temps d'attente d'une dizaine d'heures environ est nécessaire pour un collage efficace.

L'étape suivante consiste à encapsuler la protéine dans la chambre de dialyse. Pour cela nous avons essayé plusieurs méthodes.

1) Pour faciliter la fermeture de la puce, une enceinte générant un plasma peut être utilisée. Pour ce faire, il suffit de déposer la puce et un bloc de PDMS dans un plasma d'air pendant 1 min. Le plasma modifie chimiquement la surface du PDMS pour y créer des terminaisons silanol, il devient hydrophile pendant environ 30 min. Le même effet est observé dans la chambre de la puce. Le dépôt d'une goutte de solution aqueuse dans le puits le remplit parfaitement sans former de dôme. Il suffit ensuite de déposer le bloc de PDMS par dessus le puits pour refermer la puce. Le problème de cette méthode réside dans la perméabilité du PDMS à l'air, sur laquelle certains systèmes microfluidiques se basent pour développer des évaporateurs [160] ou des pompes microfluidiques [161]. Il est aussi possible de faire varier les propriétés de perméabilité à l'air du PDMS en modifiant les proportions d'agent réticulant : PDMS [162].

2) Pour refermer le puits il est aussi possible de déposer une petite plaque fine de PMMA recouverte par un adhésif type Kapton pour maintenir le PMMA contre le puits. L'avantage du PMMA et du Kapton est leur propriété vis-à-vis du rayonnement X (cf. Section 2.2.2). De plus, la perméabilité du PMMA aux gaz est très faible, parfois même annoncé comme imperméable à l'air [163],  $0,1 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \text{ cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  pour l'oxygène d'après Goodfellow contre  $60 \times 10^{-9} \text{ cm}^3(\text{STP})\text{cm s}^{-1} \text{ cm}^2 \text{ cm}^{-1} \text{ Hg}^{-1}$  pour le PDMS [164] soit en convertissant  $4,5 \times 10^{-11} \text{ cm}^3 \text{ cm cm}^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$  [165]. En revanche le PMMA possède une relative sorption à l'eau qui, dans notre cas, n'a pas présenté de problème expérimentalement. Le problème rencontré lors de l'utilisation de cette méthode de fermeture provient de la tendance qu'aura la protéine à s'étaler au maximum sur la plaque de PMMA créant parfois quelques bulles d'air dans le puits lors de sa fermeture.



3) Pour palier au problème de 2) le puits de protéine peut être refermé en déposant un collier d'une très fine couche de la graisse silicone autour du puits puis déposer la plaque de PMMA au dessus en appuyant dans le même temps le collier de graisse. Enfin une couche supplémentaire de Kapton (adhésif) est appliquée autour de la plaque PMMA pour optimiser l'étanchéité de cet ensemble. Dans la plupart des cas aucune bulle d'air ne sera formée de cette manière.

Une fois la protéine encapsulée, le remplissage des puces est réalisé comme décrit sur la Figure 2.20. Les solutions sont poussées dans la puce microfluidique à l'aide du système pressurisé MFCS-EZ décrit précédemment (section 2.1.2.2). La pression d'injection varie en fonction de la solution utilisée. Ainsi pour des solutions dont la viscosité est proche de celle de l'eau, la pression d'injection varie entre 20 et 60 mbar en fonction du flux désiré et entre 50 et 150 mbar pour des solutions plus visqueuses telles que les PEG (type PEG 8000) à des concentrations supérieures à 15 % (w/v).

Après la formation des cristaux dans la puce, les expériences de diffraction *in situ* aux rayons X avec les cristaux obtenus dans la puce sont effectuées. Les bouchons percés sont dévissés de leur support et remplacés par des bouchons fermés. La puce est ensuite disposée sur un support conçu sous Solidworks et fabriqué par impression 3D en plastique, visible sur la Figure 3.23. Le support permet de disposer 3 puces l'une à côté de l'autre et possède les mêmes dimensions extérieures qu'une plaque CrystalQuick™X (Greiner Bio-One). Il permet de disposer le support dans le faisceau de façon automatisée au moyen d'un robot de transfert de plaque tel que le G-Rob, sur la ligne BM30-A FIP [166], qui est une évolution du bras robotique précédemment développé CATS [167]. Le G-Rob permet aussi bien le transfert de plaques de cristallisation que le transfert d'échantillons congelés sur boucle de cristallisation grâce à un échangeur de pince automatisé. Ainsi, sur la ligne BM30-A FIP à l'ESRF, le support est déposé dans un hôtel de plaque de la même manière qu'une plaque de cristallisation classique et utilisé comme tel par le robot. En pratique, avec la plaque correspondant au support des puces microfluidiques confectionné, il est possible de collecter des données sur environ 70 °, de -35 ° à +35 °.

Enfin une fois les données de diffraction collectées, les puces sont réutilisables plusieurs fois en fonction du type de solution utilisée. Pour cela, le réservoir de protéine est ouvert et nettoyé à l'eau pour être réutilisé une fois sec pour une nouvelle expérience. Dans le cas de solutions peu visqueuses telles que des sels, la puce peut être réutilisée plusieurs fois sous réserve de ne pas endommager la membrane ou le collage de la NOA sur le PMMA. Dans le cas de solutions visqueuses comme les PEG, il est parfois difficile de récupérer la puce et dans la majorité des cas il faut démarrer une nouvelle expérience sauf si la solution de PEG peut être chassée du canal via un écoulement d'eau. Les connectiques, par comparaison avec les puces, sont nettoyables et réutilisables presque indéfiniment. Par conséquent, les connectiques sont retirées lors du démarrage d'une nouvelle expérience par la destruction d'une puce qui a déjà servi et qui ne peut plus être réutilisée. Un pistolet chauffant est utilisé pour détacher

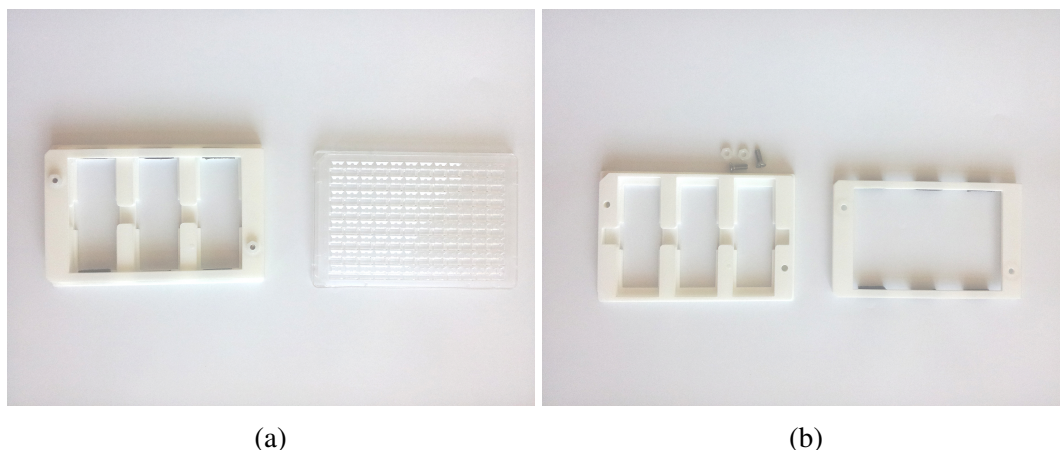


FIGURE 3.23 Support permettant de disposer 3 puces dans le rayonnement synchrotron. a) Comparaison de la dimension du support à gauche avec une plaque CrystalQuickX à droite. b) Support démonté prêt à recevoir les puces. La partie de droite se place au dessus de la partie de gauche. L'ensemble est maintenu par deux vis et écrous.

la colle de la puce et du connecteur. Ainsi il est possible de recoller les connecteurs sur une nouvelle puce.

La durée de vie moyenne d'une puce après conception a été empiriquement estimée à 6 mois. Au delà il peut arriver que les puces deviennent plus fragiles, notamment au niveau de l'adhésion NOA-PMMA qui n'est pas un collage chimique.

### 3.2.2 Expériences de validation

Dans les sections ci-après seront présentées des expériences réalisées en partenariat avec les spécialistes en microfluidique au Laboratoire du Futur (LOF) à Bordeaux dans un objectif de validation du prototype microfluidique. On y retrouve une expérience d'écoulement de microsphères dans les canaux nous permettant de visualiser la présence d'un écoulement constant dans les puces, une expérience utilisant un colorant pour évaluer le temps de vidange des canaux, quelques tests en pression pour déterminer la gamme de pression de travail et les expériences pour réaliser un évaporateur avec Nadia Ziane et Jean-Baptiste Salmon au LOF.

#### 3.2.2.1 Ecoulement dans les canaux

Une première expérience a été réalisée avec des FluoSpheres®Carboxylate-Modified Microspheres (ThermoFisher Scientific) de  $1,0\ \mu\text{m}$ . Ces microsphères sont des particules sphériques aussi nommées latex fluorescent, particules de latex ou latex. Elles sont fluorescentes avec une longueur d'onde d'excitation de  $505\ \text{nm}$  et une longueur d'onde d'émission de  $515\ \text{nm}$ . Ces particules ont tendance à s'agglomérer d'où la nécessité de travailler à concentration diluée pour avoir une dispersion de latex en solution. Les latex peuvent servir à étudier le flux dans une puce microfluidique par traitement d'images.



Dans notre cas lorsqu'une solution de latex est introduite dans le canal de la puce et que la même pression est appliquée de part et d'autre de deux entrées de la puce, un mouvement des particules de latex est observé. Ce mouvement est dû notamment aux larges dimensions de nos canaux et à la faible résistance hydraulique. Ainsi une différence de hauteur de chaque côté du canal entraîne un flux dans un sens ou dans l'autre. Pour notre application ceci n'est en rien gênant et l'injection de solutions visqueuses telles que les PEG à haut poids moléculaire et haute concentration s'en trouve facilitée.

En pratique l'écoulement de latex fluorescent a été induit par l'application d'une pression sur une entrée de la puce. Lorsque l'on applique 0 mbar, Figure 3.24a, un écoulement est tout de même observé et dû à la pression induite par le liquide dans les tuyaux d'injection. Ce phénomène est particulièrement visible au niveau de l'entrée du canal. On peut déduire par un calcul rapide en utilisant les lois de l'hydrostatique des fluides que dans le cas d'un tuyau d'une hauteur  $h = 10$  cm (au dessus de la puce), avec de l'eau à  $\rho = 1000$  kg m<sup>-3</sup> et avec  $g = 9,81$  N kg<sup>-1</sup>,  $P = \rho g h$ , alors  $P \sim 10$  mbar. L'écoulement aura toujours lieu dû à la différence de hauteur entre les canaux et la puce.

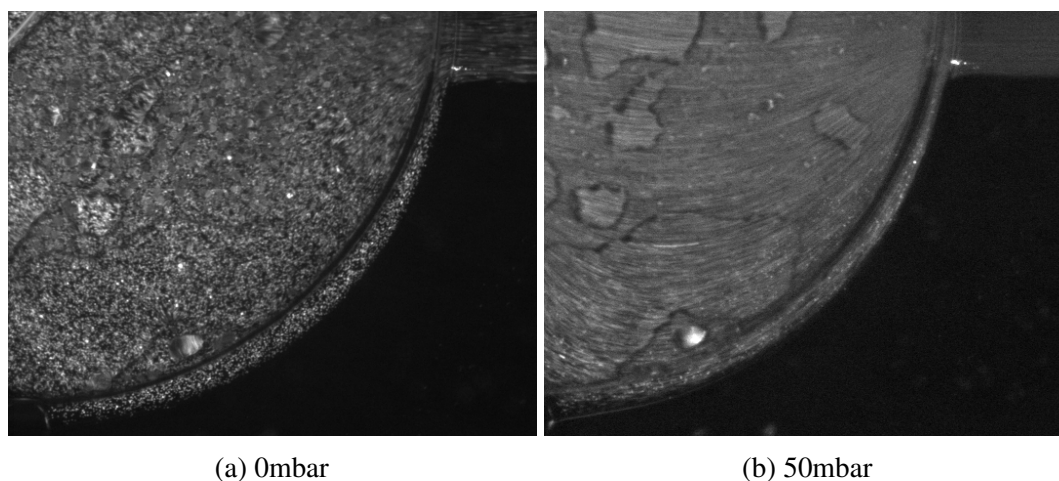


FIGURE 3.24 Images de fluorescence de la partie inférieure (canaux), on y voit un canal d'entrée en haut à droite et le canal du réservoir de forme circulaire. Des microsphères s'écoulent dans la puce à deux pressions différentes.

On peut voir aussi sur la Figure 3.24b l'effet de l'augmentation de la pression d'injection dans les canaux. L'image de fluorescence montre que les microsphères sont en mouvement et que la vitesse des particules est plus élevée dans le canal d'entrée où l'on observe un flou qui ne permet pas de discerner les particules (temps d'exposition de 100 ms) tandis que les lignes de courant sont visibles dans le canal du réservoir. Les termes de canaux et de réservoir sont les mêmes que sur la Figure 3.25 et correspondent tous deux à la partie inférieure de la puce qui est différenciée de la partie supérieure ne comprenant que la chambre. Cette observation est normale car à un débit donné  $Q = S v$  avec  $Q$  le débit,  $S$  la section du canal et  $v$  la vitesse des particules, donc plus  $S$  augmente et plus  $v$  diminue.

### 3.2.2.2 Temps de vidange des canaux

L'expérience décrite ici a pour but d'évaluer le temps de vidange d'une condition de cristallisation par une autre. Pour ce faire une solution de bleu brillant FCF (Sigma Aldrich) a été injectée dans une puce microfluidique puis chassée périodiquement par un flux d'eau, cette expérience a été réalisée à de multiples reprises et cadencée temporellement. A chaque passage de bleu les molécules peuvent diffuser à travers la membrane pour équilibrer la concentration de part et d'autre de la membrane. A chaque passage d'eau l'effet inverse se produit et le bleu s'échappe de la chambre de dialyse et du réservoir en flux continu.

Préalablement la puce a été déposée dans un plasma d'air afin de diminuer au maximum l'angle de contact de l'eau dans la chambre. Le tout est ensuite fermé à l'aide d'un bloc de PDMS. La pression d'injection des solutions est de 100 mbar. La concentration de bleu utilisée est de  $1 \text{ mmolL}^{-1}$ .

Des images de l'expérience ont été enregistrées à intervalles de temps réguliers. Sur chaque image, 4 zones d'intérêt ont été sélectionnées et l'intensité moyenne des pixels a été relevée à chaque temps de mesure. Les zones ont été choisies stratégiquement : le milieu du réservoir, le bord du réservoir, le milieu du canal et une zone extérieure au canal servant de référence (Figure 3.25).

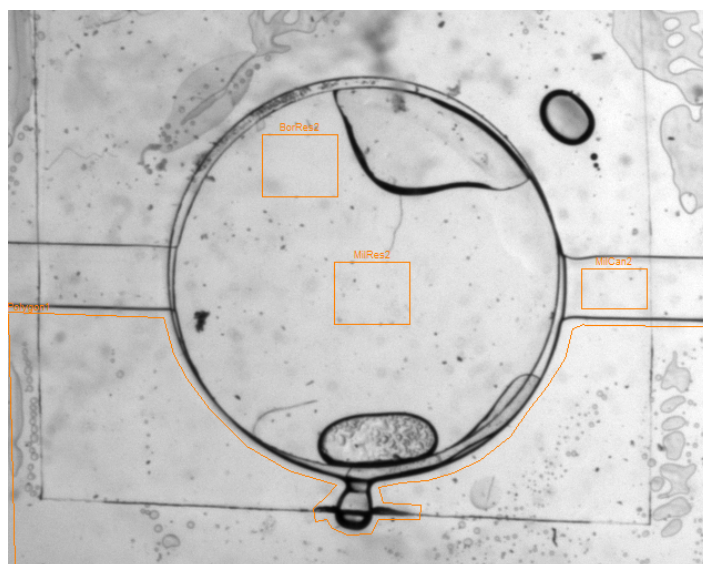


FIGURE 3.25 En orange, différentes zones d'intérêt, utilisées dans l'analyse de l'intensité des pixels.

L'intensité recueillie  $I_X(t)$  avec  $X = \text{MilRes}$  (milieu du réservoir),  $\text{BorRes}$  (bord du réservoir),  $\text{MilCan}$  (milieu du canal) et  $\text{Ref}$  (référence extérieure) a été rapportée à l'intensité des pixels dans la zone  $X$  au temps de référence, c'est-à-dire au début de l'expérience lorsque le bleu n'est pas encore injecté, que multiplie l'intensité de la référence au temps considéré (Equation (3.1)).

$$f(t) = \frac{I_X(t)}{I_X(0)I_{ref}(t)} \quad (3.1)$$

L'absorbance est suivie en fonction du temps avec  $A = -\log(f(t))$ . Enfin, pour normaliser cette courbe en fonction de l'intensité du milieu du canal, qui est notre indicateur concernant le passage de bleu ou d'eau,  $h(t)$  est tracé comme indiqué dans l'équation (3.2).

$$h(t) = \frac{f(t) - \min(I_{MilCan}(t))}{\max(I_{MilCan}(t)) - \min(I_{Milcan}(t))} \quad (3.2)$$

$h(t)$  représente une intensité moyenne de bleu normalisée par rapport à l'intensité moyenne au milieu du canal et sera nommée  $IMoy$  par la suite. Il est possible de comparer les intensités de bleu pour chaque passage de bleu en fonction du temps. Ainsi les courbes d'intensité de bleu ont été découpées à différents temps, temps courts, moyens, longs et sont représentées sur les Figures 3.26 et 3.27.

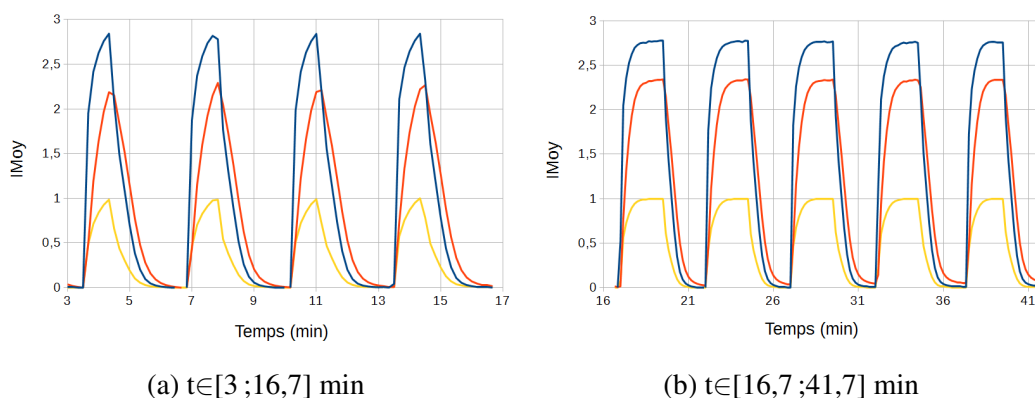


FIGURE 3.26 Courbes d'intensité moyenne de bleu à différents temps de passage, durant les 3 premières minutes de l'eau s'est écoulée dans la puce. Courbe jaune : intensité moyenne de référence correspondant au milieu du canal. Courbe orange : intensité moyenne correspondant au bord du réservoir. Courbe bleue : intensité moyenne correspondant au centre du réservoir.

La Figure 3.26a montre que lorsque l'eau est injectée, après passage de bleu, l'intensité moyenne de bleu diminue jusqu'à atteindre une intensité nulle. En revanche, lorsque le temps d'injection du bleu augmente (cf. Figures 3.26b 3.27a 3.27b), l'intensité de bleu après passage d'eau n'est plus nulle et ceci d'autant plus sur le bord du réservoir qu'au milieu du réservoir. On peut apporter quelques éléments de réponse à cette observation de la façon suivante : une possibilité est qu'une partie du bleu s'écoulant dans la puce reste fixée sur la membrane. Autrement le bleu a pu diffuser à travers la membrane de dialyse et resterait présent dans la chambre, comme l'écoulement est plus important au centre de la puce que sur les bords, les molécules de bleu s'évacueraient alors plus vite du réservoir au centre que sur les bords du puits en raison d'un mélange de l'eau et d'un échange plus rapide dû aux vitesses élevées.

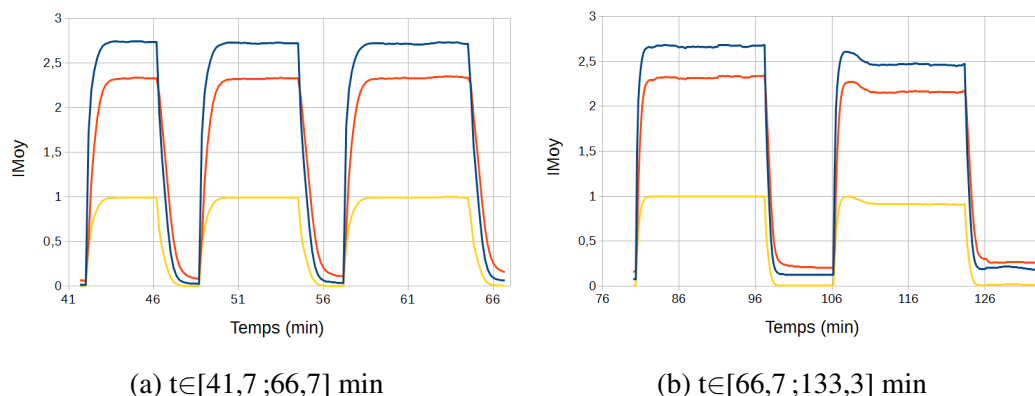


FIGURE 3.27 Courbes d'intensité moyenne de bleu à différents temps de passage. Courbe jaune : intensité moyenne de référence correspondant au milieu du canal. Courbe orange : intensité moyenne correspondant au bord du réservoir. Courbe bleue : intensité moyenne correspondant au centre du réservoir.

D'après les courbes d'intensité de bleu en fonction du temps le passage du bleu et de l'eau peuvent être suivis avec la courbe du milieu du canal. Le temps caractéristique moyen de vidange du bleu des canaux est de l'ordre de 130 s donc au bout de ce temps le bleu restant provient de la chambre de dialyse ou de molécules accrochées à la membrane. Pour connaître le volume d'eau nécessaire au changement de condition une indication sur le débit dans la puce est primordiale. Pour cela la résistance théorique est calculée via l'équation (3.3) valable pour un canal rectangulaire en négligeant la résistance des tuyaux d'entrée, avec  $H$  la hauteur du canal,  $W$  la largeur du canal,  $\mu$  le coefficient de viscosité dynamique de la solution et  $L$  la longueur du canal.

$$R_H = \frac{12\mu L}{WH^3(1 - 0,63\frac{H}{W})} \quad (3.3)$$

Cette équation donne une valeur approximative de la résistance hydrodynamique des canaux dans la puce. Ce calcul donne  $R_H \approx 4 \times 10^{12} \text{ Pas m}^{-3}$ , ce qui signifie d'après les notions de résistance hydrodynamique  $\Delta p = RQ$  que  $Q \approx 3 \mu\text{L s}^{-1}$ . Il est donc nécessaire de faire circuler approximativement 400  $\mu\text{L}$  de fluide pour échanger complètement la solution présente dans les canaux par une autre solution. Cette information est utile en particulier dans le cas de l'utilisation de solutions coûteuses ou dont le volume est limité.

Afin de déterminer d'où provient le bleu persistant dans la puce une expérience sans refermer le puits supérieur de la puce a été conduite en faisant s'écouler la solution de bleu pendant un long moment. Finalement une petite partie du bleu reste présente à certains endroits localisés sur la membrane. De plus une partie du bleu a diffusé à travers la membrane, justifiant également l'écart observé sur les courbes présentées ci-avant.

### 3.2.2.3 Essais en pression

Des tests en pression ont été réalisés pour évaluer la gamme de pression dans laquelle le système microfluidique est utilisable. Ces essais ont été mis en place en appliquant une pression identique à chaque entrée du système microfluidique. La pression a été augmentée progressivement de 0 à 1 bar. La puce a été remplie de latex fluorescents et les images observées par fluorescence. Ainsi la présence des microsphères situées dans les canaux a pu être observée en fonction de la pression. Ces tests ont été effectués sur le second prototype de puce décrit dans la section 2.2.4.1.

Dans une première expérience la pression a été augmentée par pas élevé de 50 puis 100 mbar. L'augmentation brusque de la pression entraîne rapidement des microfuites lorsque la pression d'injection atteint les 500 mbar. La Figure 3.28 montre que les particules de latex se déplacent hors du réservoir donc entre la NOA et la membrane. Toutefois la partie supérieure, la chambre, n'est pas contaminée par les microsphères car elles n'ont pas atteint le bord de la membrane.

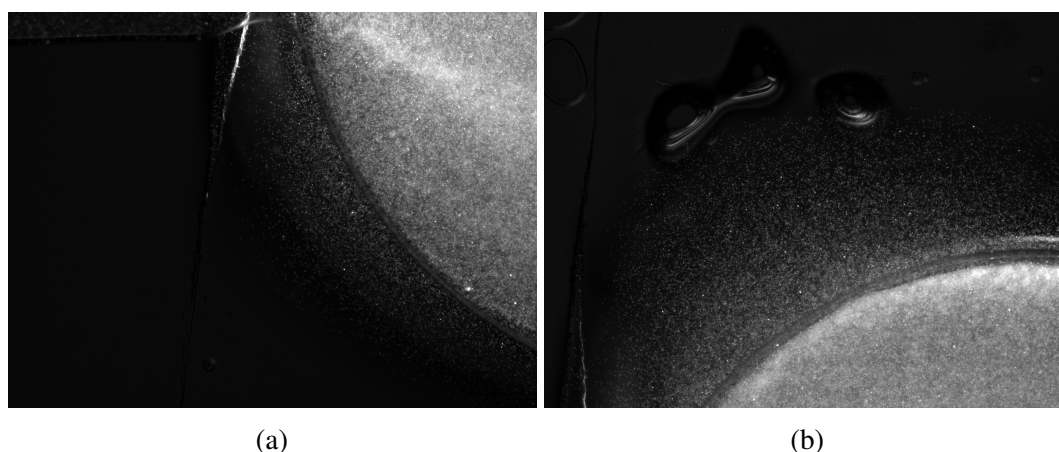


FIGURE 3.28 Visualisation de fuites à partir d'images de fluorescence de la partie inférieure de la puce.

Dans cette expérience la pression est passée de 0 à 500 mbar en 3 min environ. Les fuites sont observées dès le passage de 400 à 500 mbar. L'augmentation de la pression de manière plus drastique encore provoque des fuites à des pressions plus basses. Par exemple en augmentant la pression de 0 à 500 mbar en 2 min environ, des fuites apparaissent dès 400 mbar. En revanche en augmentant progressivement la pression par pas plus petit on peut aisément monter à des pressions atteignant 1 bar. A titre comparatif en augmentant la pression de 0 à 500 mbar en 6 min environ aucune fuite n'est observée. De plus nous avons poursuivi l'augmentation de la pression par pas de 100 mbar jusqu'à atteindre la pression maximale fournie par le MFCS-EZ qui est de 1000 mbar où au final la membrane s'est déchirée au bout de deux minutes.

Finalement il a été possible d'atteindre des pressions très élevées dans le système microfluidique sans observer de fuites tant que la pression n'est pas augmentée brusquement. En pratique à des pressions trop élevées la membrane se déforme de façon extrême et finit par se



rompre. Durant nos expériences de cristallisation une pression n'est appliquée que d'un côté de la puce ce qui conduit à une pression au niveau de la membrane moins élevée que dans les expériences décrites ici. De plus le travail à de telles pressions n'est jamais justifié, même avec des solutions visqueuses tels que des PEG concentrés comme décrit dans la section 3.2.1 sur l'utilisation de la puce. Des pressions inférieures à 150 mbar sont suffisantes pour la plupart nos applications, ce qui est cohérent avec la faible résistance hydraulique de notre système.

#### 3.2.2.4 Autres expériences et applications

Tout comme les expériences d'écoulement dans les canaux et de tests en pression, des tests pour une application particulière de type "évaporateur" ont été effectués. Il a été possible d'utiliser notre puce microfluidique pour assécher le réservoir supérieur et ainsi faire cristalliser des particules de silice (klebosol). Les particules sont déposées dans le puits destiné à la protéine puis la puce est refermé. Dans les canaux, un PEG à haut poids moléculaire ne traversant pas la membrane de dialyse est injecté à une pression de 100 mbar pour entraîner un assèchement du réservoir supérieur. La cristallisation, obtenue par dialyse inverse, a été observée après environ 6 h.

L'utilisation d'un PEG à haut poids moléculaire permet effectivement d'assécher le puits supérieur (chambre de dialyse). A titre illustratif l'assèchement progressif du puits supérieur rempli préalablement d'eau est montré sur la Figure 3.29. L'assèchement est réalisé en faisant passer un PEG de 35 kDa à une concentration de 8 % (w/v) dans le canal de la puce. Le PEG ne traverse pas la membrane et induit le passage de l'eau du puits vers le canal (osmose inverse). Il existe cependant toujours un flux d'eau du canal vers le puits bien que le puits n'est jamais complètement sec. On observe au bout d'un temps la formation de gouttes et un phénomène de coalescence puis l'eau de la goutte diffuse à nouveau à travers la membrane et de nouvelles microgouttes se réunissent à nouveau etc... pour former une sorte d'équilibre.

#### 3.2.2.5 Conclusion

Ces différentes expériences de validation ont permis d'évaluer différents aspects des puces microfluidiques. Des limites en terme de pression ont été évaluées et ne sont finalement pas un problème pour notre application en cristallisation. Les expériences réalisées avec le colorant bleu ont permis d'évaluer le temps de vidange des canaux, qui présente un intérêt notamment dans le cas où une solution coûteuse ou disponible uniquement en faible quantité est utilisée. Les puces peuvent être utilisées en flux continu ou bien les solutions peuvent être injectées pendant une période puis laissées dans la condition en cours. En effet, si l'échange de concentration entre le réservoir (canaux) et la chambre est déjà effectué, la présence du flux continu ne sera pas forcément nécessaire car la chambre aura déjà atteint la sursaturation désirée.

Ce système de puce par dialyse permet aussi d'envisager d'autres applications que la cristallisation des protéines comme mentionné dans le dernier paragraphe. L'assèchement de

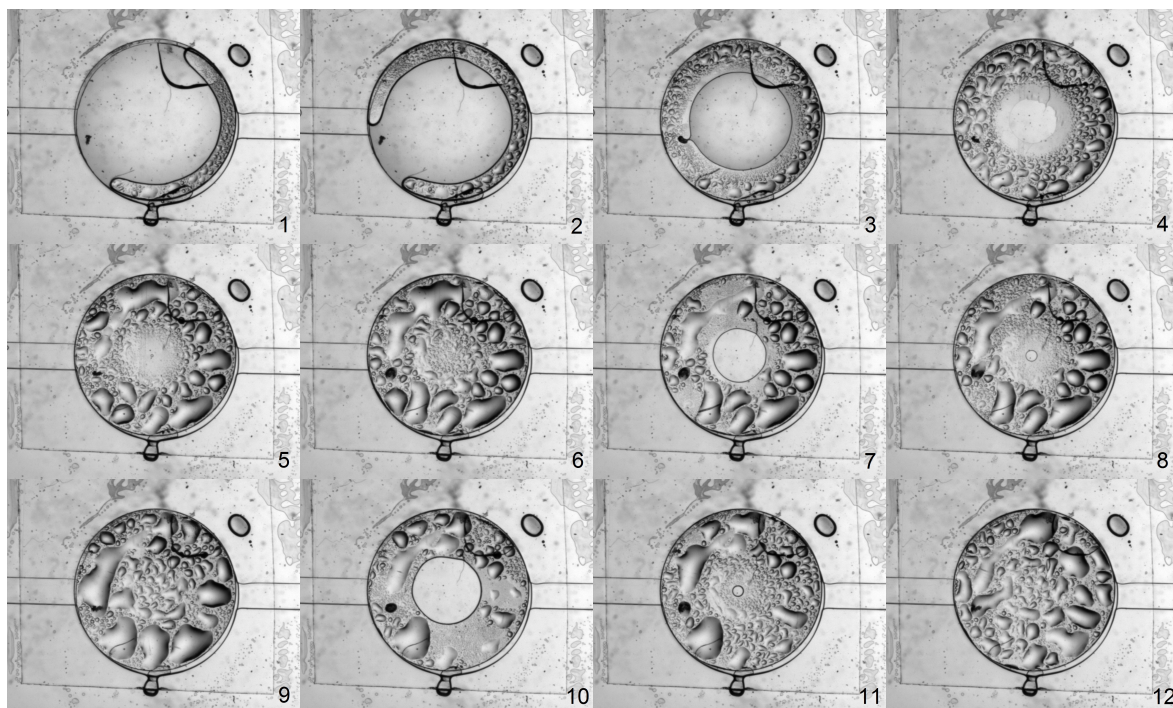


FIGURE 3.29 Observation de l'assèchement du puits supérieur par passage de PEG à haut poids moléculaire dans les canaux. Images à lire de gauche à droite puis de haut en bas. Phénomène de coalescence sur les images 7 et 10. Disparition de la goutte formée sur les images 8 et 11. Temps total de 2 h 45 min.

la chambre par une solution de PEG permettrait l'étude du motif de craquement de gouttes par exemple [168]. Cependant, pour étudier de façon approfondie de tels phénomènes il serait peut-être nécessaire d'adapter la géométrie de notre système.

### 3.2.3 Cristallisation

Dans cette partie seront présentés les essais de cristallisation en puce microfluidique avec 3 protéines différentes, le lysozyme du blanc d'œuf de poule, l'IspE de l'agrobacterium et l'insuline de pancréas de porc.

#### 3.2.3.1 Lysozyme

Suite aux différents essais de cristallisation décrits dans la section 3.1.2.1, des cristaux de lysozyme ont été obtenus dans les puces microfluidiques dans des conditions proches de celles décrites précédemment, à savoir entre 0,75 M et 0,9 M NaCl ; 0,1 M acétate de sodium pH 4. Les membranes utilisées pour les expériences avec le lysozyme sont les membranes 6-8 kDa. Les puces sont décrites et utilisables en flux continu d'agent de cristallisation. Cependant il est aussi possible d'introduire l'agent de cristallisation en flux continu pendant un certain temps, puis de couper le flux pour stocker ensuite le système microfluidique à l'écart. Ceci permet d'utiliser le canal de pression ainsi libéré pour réaliser une autre expérience par exemple. Ces deux modes d'utilisation ont été expérimentés et ont conduits à la formation de cristaux



dans les puces microfluidiques. Sur la Figure 3.30 sont présentés les premiers essais de cristallisation en puce dans les conditions suivantes : 1,4 M NaCl ; 0,1 M acétate de sodium pH 4 à 296 K,  $\sim 30 \text{ mg mL}^{-1}$ , Figure 3.30a et 1,0 M NaCl ; 0,1 M acétate de sodium pH 4 à 296 K,  $\sim 30 \text{ mg mL}^{-1}$ , Figure 3.30b. Les puces ont été injectées à l'aide d'une différence de hauteur des tuyaux entraînant une pression de l'ordre de 20 mbar.

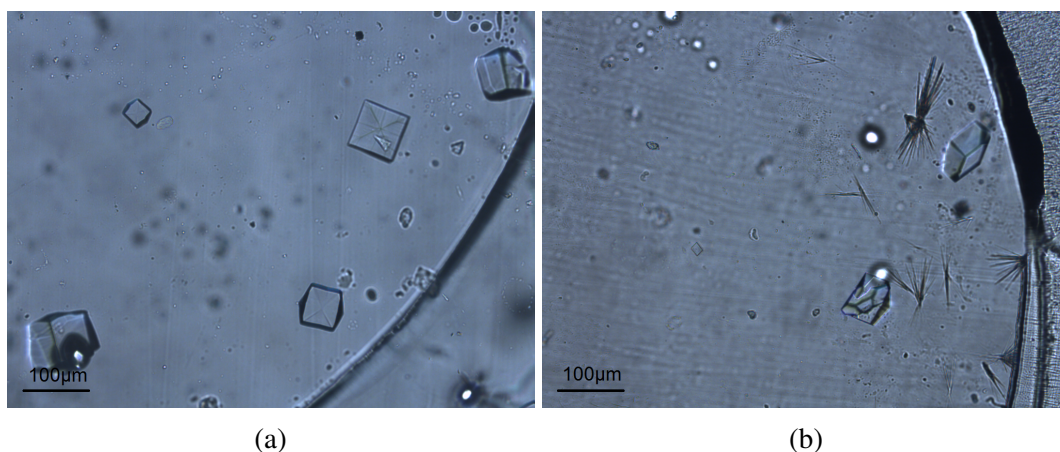


FIGURE 3.30 Premiers essais de cristallisation en puce microfluidique.

En se basant sur ces expériences préliminaires, nous avons ensuite voulu démontrer les capacités dialysantes de la puce et la réversibilité de la dialyse en modifiant la température et la concentration de précipitant. En poursuivant cet objectif, l'expérience représentée sur la Figure 3.31 montre la nucléation, la croissance, la dissolution, la re-nucléation et la re-dissolution de cristaux de lysozyme. 4 images illustrent ces différentes étapes : l'image 3.31a montre la nucléation et la croissance de cristaux à 293 K dans la condition NaCl 0,75 M ; NaOAc 0,1 M pH 4. Une fois l'apparition des cristaux dans la chambre de dialyse, la température est augmentée jusqu'à 300 K de sorte à dissoudre les cristaux 3.31b, ce qui est cohérent pour le lysozyme dont la solubilité est directe. Après la dissolution des cristaux, la température est rapidement revenue à 293 K entraînant la nucléation de nouveaux cristaux plus petits et plus nombreux 3.31c. Enfin la dernière étape a consisté à faire circuler uniquement le tampon de sorte à dissoudre les nouveaux cristaux formés 3.31d. La première dissolution par le biais de la température est très rapide (15 min) tandis que la deuxième dissolution réalisée grâce à l'échange de concentration entre la chambre et le réservoir prend environ 1 h. A chaque changement de condition, l'agent de cristallisation est injecté dans la puce par une différence de hauteur des tuyaux entraînant une pression de l'ordre de 20 mbar.

### 3.2.3.2 IspE

Suite aux différents essais de cristallisation décrits dans la section 3.1.2.2, les premiers cristaux d'IspE dans les puces microfluidiques ont été obtenus.

Sur la Figure 3.32 sont représentées plusieurs images de cristaux d'IspE obtenus dans la condition PEG 8000 18 % (w/v),  $\text{MgCl}_2$  5mM, ATP 5mM, citrate de sodium 0,1M pH6 à 293K.

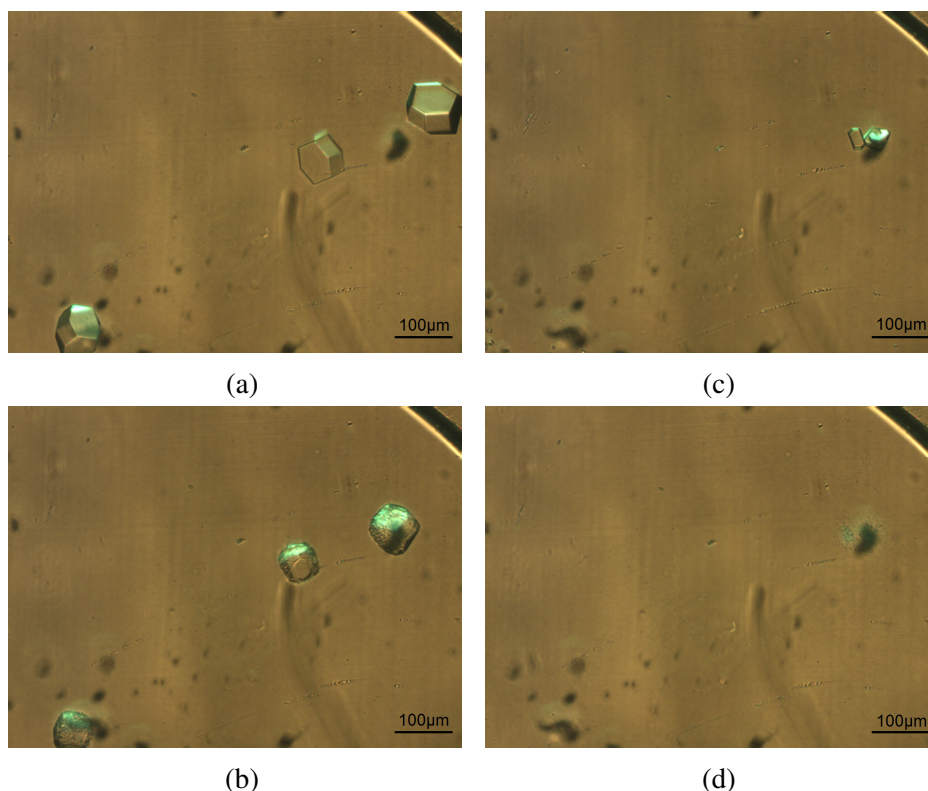


FIGURE 3.31 Expérience de dissolution et recristallisation avec le lysozyme. a) Nucléation et croissance à 293 K, NaCl 0,75 M. b) Dissolution à 300 K, NaCl 0,75 M. c) Nucléation rapide à 293 K, NaCl 0,75 M. d) Dissolution à 293 K, NaCl 0 M.

Les photos 3.32a 3.32b et 3.32c correspondent à la croissance du même cristal aux temps respectifs de 6 jours, 19 jours et 50 jours après le début de l'expérience. Dans cette expérience l'agent de cristallisation est introduit en flux continu pendant 6 jours alternativement, la journée uniquement, à une pression d'environ 90mbar. La membrane employée lors des essais de cristallisation avec l'IspE a été la membrane 12-14 kDa afin de permettre un passage plus aisé du PEG 8000 à travers la membrane de dialyse. La photo 3.32d correspond à un autre cristal ayant poussé dans une autre puce mais dans les mêmes conditions de cristallisation et d'expérience.

Comme expliqué précédemment les cristaux obtenus par dialyse permettent d'obtenir plus souvent des cristaux uniques comparés aux cristaux poussés en goutte suspendue. Ceci est illustré sur la Figure 3.33 où on retrouve un exemple de plusieurs cristaux ayant été obtenus dans la condition PEG 8000 18 % (w/v),  $MgCl_2$  5 mM, ATP 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH 6 à 293 K, cependant ici la cinétique d'équilibration entre la chambre de dialyse et le canal avec le précipitant a été modifiée : un mélange de la protéine avec la solution contenant du PEG 8000 10 % (w/v),  $MgCl_2$  5 mM, ATP 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH 6 a été encapsulée à la place de la protéine seule. Dans ce cas, de nombreux cristaux uniques (et isomorphes) sont formés dans la puce et ont permis d'envisager de collecter *in situ* des données de diffraction aux rayons X en série.

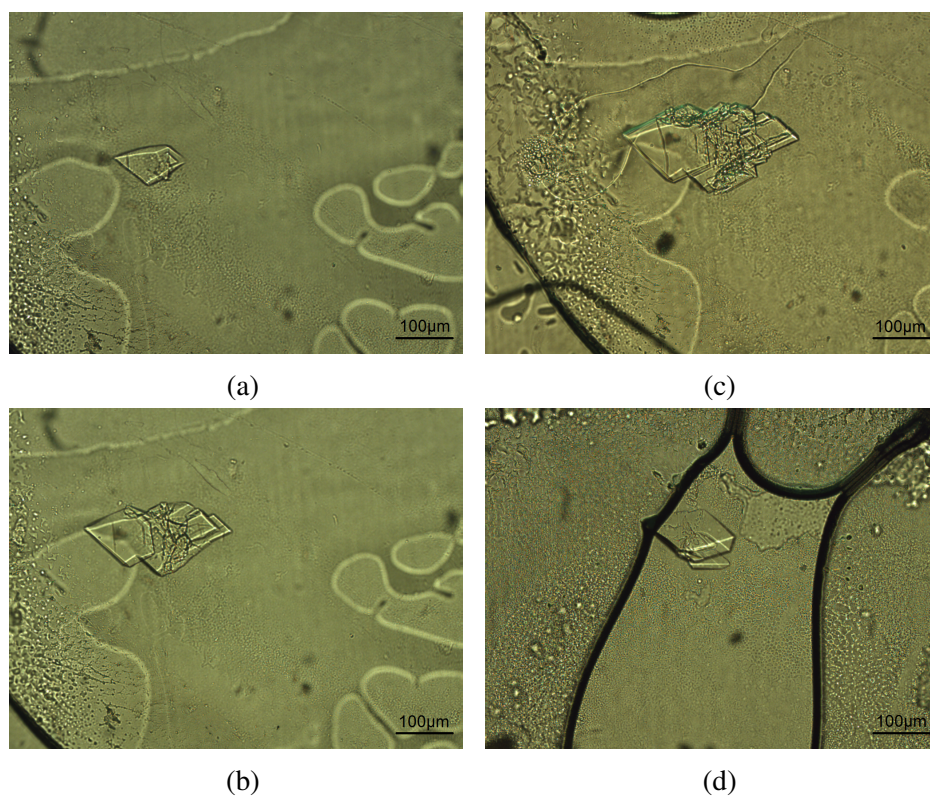


FIGURE 3.32 Croissance d'un cristal d'IspE en puce microfluidique : a) 6 jours, b) 19 jours, c) 50 jours depuis le début de l'expérience. d) Un autre cristal d'IspE obtenu dans les mêmes conditions de cristallisation et d'expérience.

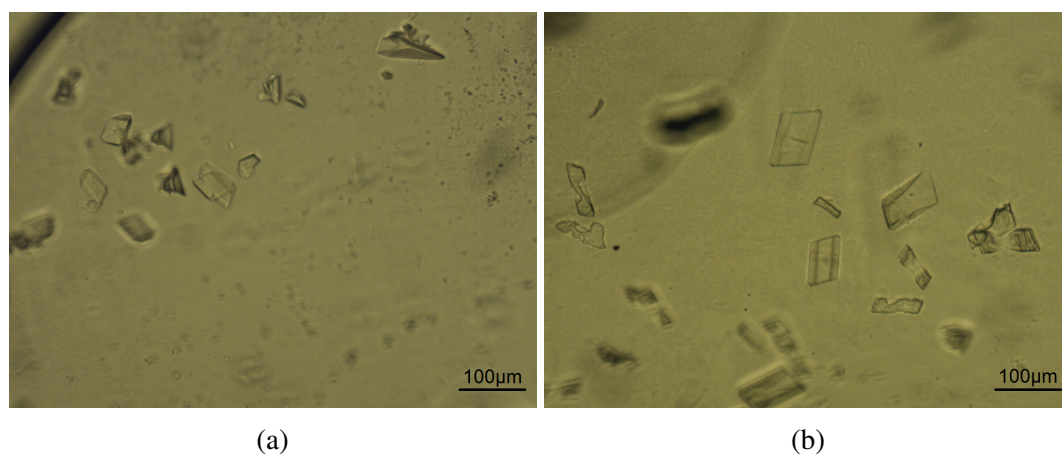


FIGURE 3.33 Cristaux d'IspE permettant de collecter *in situ* des données de diffraction aux rayons X sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes.



### 3.2.3.3 Insuline

L'insuline a été cristallisée en se basant sur des conditions de cristallisation décrites précédemment [169, 170]. Les premiers essais de cristallisation en puce ont été menés dans la condition suivante : 1 mM HCl ; 5 mM  $\text{ZnCl}_2$  ; 50 mM citrate de sodium pH 7 ; acétone 15 % (v/v) avec une membrane de dialyse avec un seuil de rétention de 3,5 kDa en raison de la taille de la protéine. La protéine est dissoute à partir d'une poudre commerciale dans du HCl à 0,5 mM pH 3 à une concentration d'environ  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ces premiers essais de cristallisation n'ont pas donné de résultats satisfaisants et résultaient en l'obtention d'un précipité cristallin. Les essais d'optimisation ont été réalisés autour de cette condition pour aboutir à la condition de cristallisation suivante : 1 mM HCl ; 5 mM  $\text{ZnCl}_2$  ; 50 mM citrate de sodium pH 6 ; acétone 10 % (v/v) avec une concentration de protéine entre 2 et  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ . La principale difficulté de la cristallisation de l'insuline dans ces conditions de cristallisation était la reproductibilité irrégulière des cristaux qui étaient dans la plupart des essais de petite taille. Le problème rencontré est probablement lié notamment à la préparation de la protéine dont le protocole n'a pas été réellement revisité et optimisé, sans oublier le caractère volatil de l'acétone dont la concentration peut éventuellement légèrement varier au cours de l'expérience. Ceci est d'autant plus valable au vu des volumes utilisés en microfluidique. En revanche, l'acétone s'est montrée compatible avec nos puces microfluidiques, ni les puces, ni les membranes de dialyse n'ont subi de dommages irréversibles. Dans le cas de l'insuline nous avons validé le système microfluidique par la cristallisation et la diffraction *in situ* aux rayons X (cf. section 3.2.4).

Sur la Figure 3.34 on peut voir quelques résultats d'essais de cristallisation d'insuline en puce.

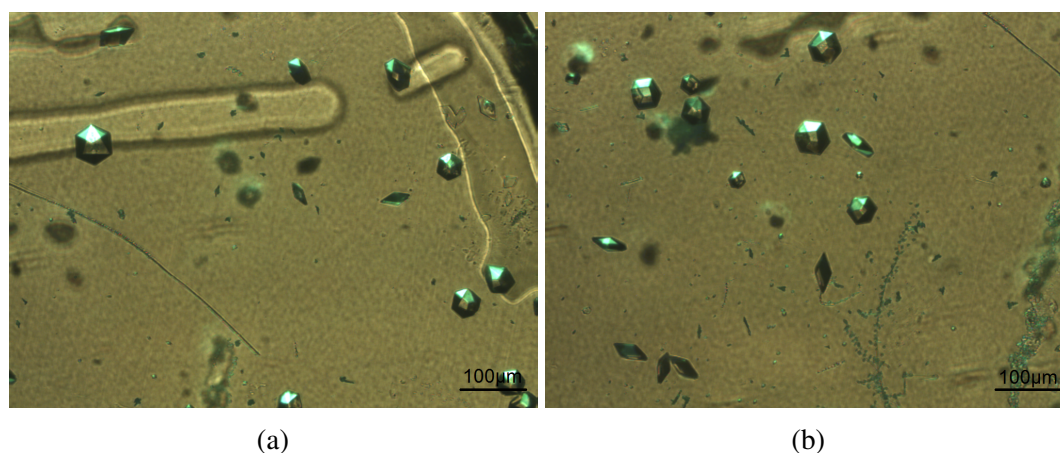


FIGURE 3.34 Cristaux d'insuline permettant de collecter *in situ* des données de diffraction aux rayons X sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes.

### 3.2.3.4 Autre

A titre d'exemple supplémentaire, nous avons effectué aussi quelques essais de cristallisation avec la protéine HCA II (type sauvage), Anhydrase Carbonique Humaine II, dans une condition de cristallisation connue [13] permettant de la faire cristalliser avec succès (Figure 3.35). Cet exemple supplémentaire illustre la possibilité d'obtention de cristaux de grande taille (entre 150 et 250  $\mu\text{m}$  dans la dimension la plus large) mais aussi de nombreux cristaux isomorphes qui sont nécessaires en vue d'expériences de cristallographie des rayons X en série [171].

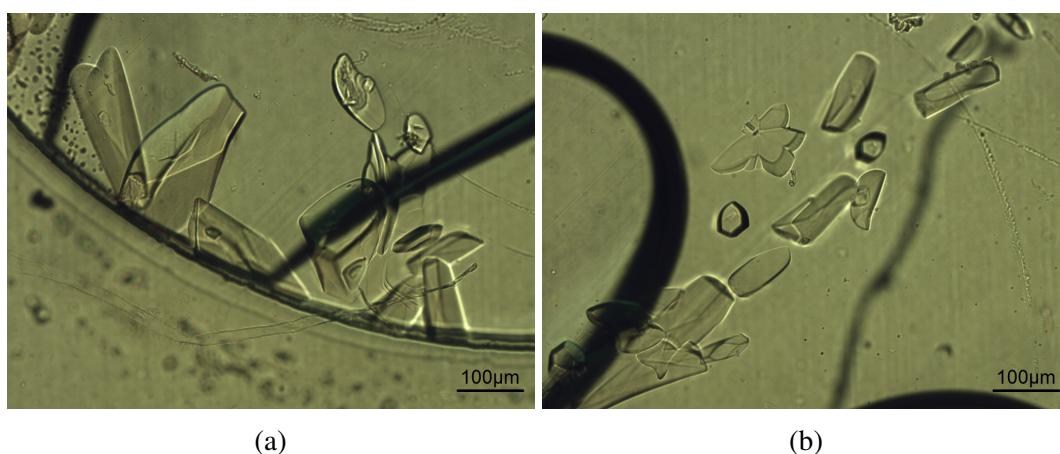


FIGURE 3.35 Cristaux d'HCA II obtenus en puce microfluidique.

## 3.2.4 Analyse RX *in situ*

Dans la section qui suit seront présentés les résultats de diffraction *in situ* de cristaux mais aussi la caractérisation des matériaux composant la puce vis-à-vis du rayonnement synchrotron.

### 3.2.4.1 Caractérisation des matériaux

Lors de l'utilisation de la puce en cristallographie aux rayons X, le signal de diffraction est additionné à ce que l'on pourrait qualifier un bruit de fond. Ce bruit de fond est majoritairement dû à la diffusion des rayons X dans les matériaux traversés jusqu'au détecteur avec en tête la puce elle-même. Par conséquent, il est important de bien caractériser les matériaux constituant la puce afin de minimiser ce phénomène qui dégrade le rapport signal sur bruit de la diffraction d'un cristal. Il est donc nécessaire de choisir des matériaux qui génèrent un fond minimum tout en étant compatible avec les contraintes de tenue mécanique de la puce. Les mesures ont été réalisées sur la ligne BM30A-FIP équipée d'un détecteur ADSC Quantum 315r composé d'une matrice de 3x3 CCD pour une surface active de 315x315 mm avec une résolution de 9,4 méga pixel. La longueur d'onde de travail choisie est de 0,98 Å. Pour ces expériences, les matériaux caractérisés sont exposés pendant 20 s puis immédiatement suivi par une mesure

sans matériaux afin de déterminer la contribution de la diffusion des rayons X dans l'air. Le détecteur est positionné à 200 mm du point échantillon où se situe la puce, ce qui permet une image de diffraction allant jusqu'à 1,5 Å. Pour cette étude les matériaux suivants ont été exposés : PDMS, membrane en cellulose régénérée, Kapton, NOA 81, PMMA, verre, puce microfluidique ouverte (1 épaisseur de PMMA) et fermée (2 épaisseurs de PMMA + Kapton), plaque CrystalQuickX, plaque CrystalCube.

Avec cette méthode de mesure la contribution de l'air soustraite est surestimée. En effet une partie du faisceau est absorbée par le matériau lors de la mesure, diminuant ainsi la contribution à la diffusion de l'air après la plaque. En revanche lors de la mesure sans matériau le faisceau n'est pas absorbé et la diffusion de l'air intervient sur le chemin complet du faisceau. Pour minimiser cette surestimation nous avons travaillé dans un environnement d'hélium entre la sortie du faisceau et l'échantillon. En effet le numéro atomique de l'hélium est 2 tandis que l'air est composé majoritairement de diazote et de dioxygène respectivement de numéro atomique 7 et 8. Or l'amplitude de diffusion des rayons X augmente avec le numéro atomique  $Z$ . Sans complètement corriger la surestimation de la contribution que l'on retranche, cela améliore nettement l'analyse des résultats.

Les courbes présentées ci-après correspondent au profil d'intensité mesuré sur l'image où la distance au centre a été convertie en résolution par la relation  $d = \frac{\lambda}{2\sin(\theta)}$ . Les données d'intensités ont été filtrées avec un filtre passe-bas au moyen d'une fonction d'apodisation de Hamming sur 49 valeurs avec  $f(t) = 0,54 - 0,46\cos(2\pi\frac{t}{T})$  avec  $t \in [0, T]$ .

La Figure 3.36 montre l'intensité diffusée des matériaux composant le système microfluidique en fonction de la résolution en Å ainsi que le système complet de la puce comprenant deux épaisseurs de PMMA, une couche de Kapton et la membrane de dialyse. On observe un pic de diffusion relativement large caractéristique pour des composés amorphes qui ne possèdent qu'un ordre local à courte distance. Les clichés de diffraction de la Figure 3.37 ont été réalisés avec la puce seule puis avec un cristal de lysozyme ayant poussé dans la puce. On y retrouve le bruit de fond généré par la puce mais aussi les tâches de diffraction du cristal clairement distinctes. Les deux images n'ont pas été réalisées au même moment, ni au même temps d'exposition et représentent donc une comparaison qualitative.

Afin de situer la puce par rapport à des supports traditionnellement utilisés en cristallisation à haut débit, le bruit de fond généré par des plaques de cristallisation a été évalué. Sur la Figure 3.38 le bruit de fond généré par la puce est très inférieur au bruit de fond généré par des plaques de cristallisation traditionnelles. Si on compare les valeurs maximales d'intensité relevées (qui ne se situent pas à la même résolution), l'intensité est 15 à 27 fois supérieure pour la plaque CrystalQuickX et CrystalCube respectivement.

Ces résultats indiquent que pour un volume de cristal donné d'une même protéine, le signal de diffraction du cristal sera entaché de très peu de bruit de fond dans le cas de nos puces microfluidiques en comparaison aux cristaux obtenus en plaque de cristallisation traditionnelle. Cependant dans la puce microfluidique la taille des cristaux est limitée par : la géométrie (hauteur) du puits et le volume de protéine. Les différentes courbes obtenues

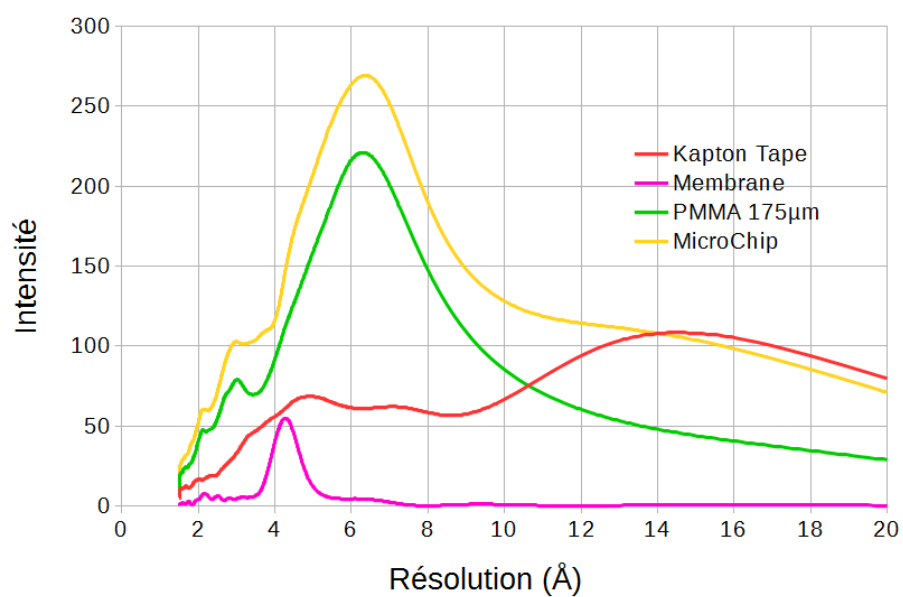


FIGURE 3.36 Bruit de fond généré par les composants de la puce et la puce elle-même. Intensité correspondant à la valeur relevée par le détecteur soustraite des mesures sans échantillon en atmosphère d'hélium.

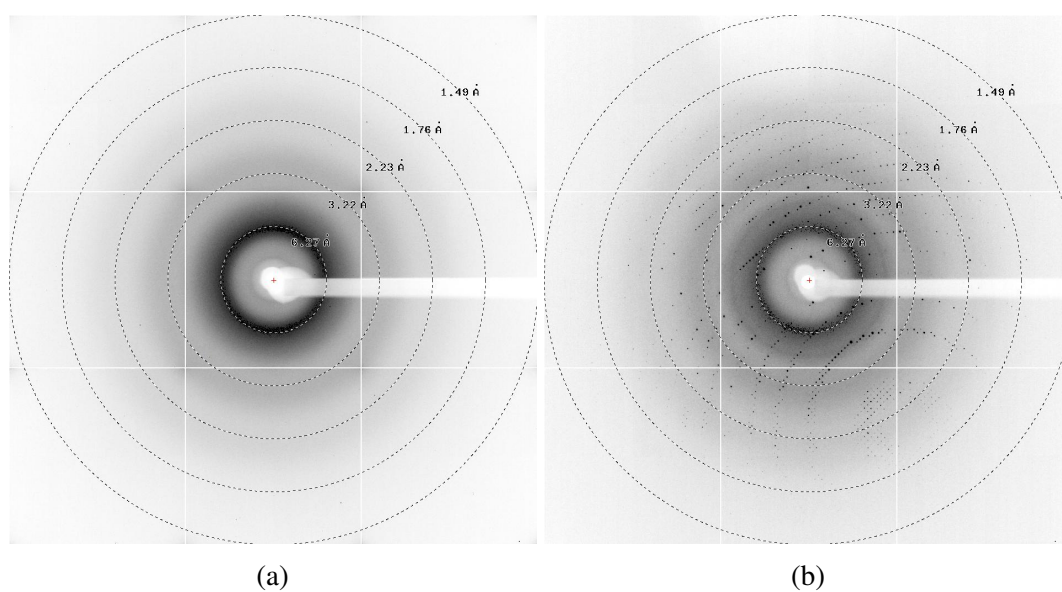


FIGURE 3.37 a) Cliché de diffraction de la puce microfluidique sans cristal. b) Cliché de diffraction de la puce microfluidique contenant un cristal de lysozyme.



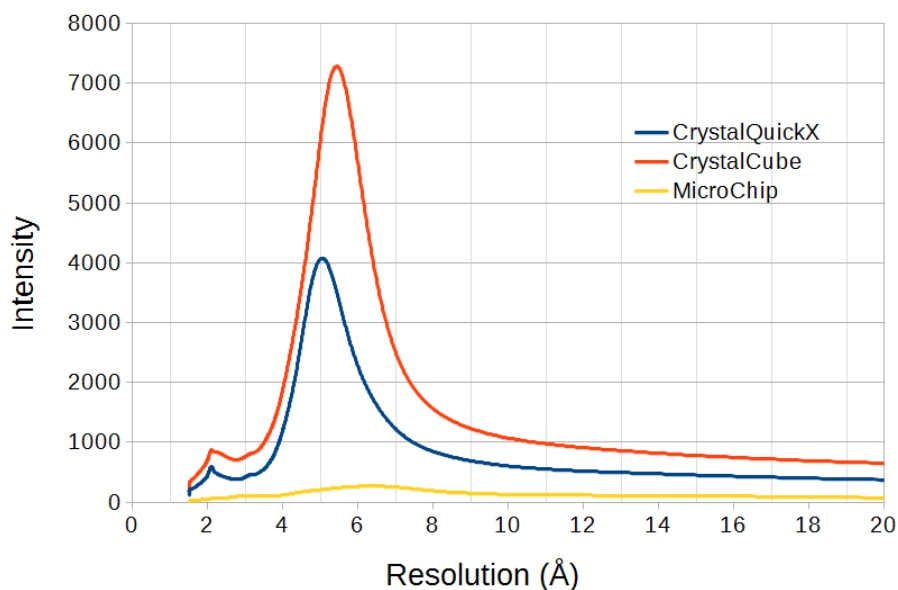


FIGURE 3.38 Comparaison entre le bruit de fond généré par notre puce microfluidique et deux autres plaques traditionnelles de cristallisation. Intensité correspondant à la valeur relevée par le détecteur soustraite des mesures sans échantillon en atmosphère d'hélium.

mettent en évidence, dans le cas de la puce microfluidique, un pic d'intensité plus élevé dans la zone de 6 à 7 Å contre 5 Å pour la CrystalQuickX et entre 5 et 6 Å pour la CrystalCube. La diffusion reste cependant plus étendue pour les puces microfluidiques.

### 3.2.4.2 Lysozyme

Des données *in situ* de diffraction à température ambiante sur des cristaux de lysozyme ayant poussés dans les puces microfluidiques ont pu être collectées. Dans les tableaux 3.1 et 3.2 sont présentés les statistiques obtenues avec XDS sur quelques cristaux de lysozyme. Grâce à la haute symétrie des cristaux de lysozyme, il a été possible de collecter plusieurs jeux de données complets sur ces cristaux sans avoir recours à la cristallographie des rayons X en série.

Dans le tableau 3.2 sont présentés des résultats de diffraction des rayons X avec des cristaux ayant subi un changement de sursaturation par variation de la concentration en agent précipitant et une variation de température. Malgré les manipulations réalisées il a été possible de collecter un jeu de données complet du même ordre de résolution, que pour les cristaux non manipulés ayant poussé directement dans la condition 0,85 M NaCl. Néanmoins on remarque dans toute condition équivalente une légère hausse de la mosaïcité des cristaux (valeurs obtenues via les statistiques XDS, sur la même ligne de lumière ESRF, avec le faisceau de photons d'intensité équivalente et sur des cristaux comparables en taille) ayant subi le changement de température au cours du processus de leur croissance.

En revanche, la comparaison de la mosaïcité (toujours dans des conditions équivalentes) obtenue en puce par rapport à la mosaïcité obtenue avec des cristaux congelés (cf. [144])

---

montre que ce paramètre est significativement (2,5 à 6,5 fois) réduit pour les cristaux résidant en puce. L'absence de manipulation des cristaux et la collecte des données *in situ* à température ambiante représentent ainsi des avantages et semblent être bénéfiques quant à la qualité cristalline.

	LysoA	LysoA2
Condition de cristallisation	0,85 M NaCl 0,1 M NaOAc pH 4	0,85 M NaCl 0,1 M NaOAc pH 4
Méthode de cristallisation	Dialyse microfluidique	Dialyse microfluidique
Température	293 K	293 K
Source RX	FIP	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798	0,9798
Nb images	40	40
Résolution (Å)	50-1,60 (1,70-1,60)	50-1,65 (1,75-1,65)
Mosaïcité (°)	0,06	0,05
Réflexions totales (observées)	50351	46568
Réflexions uniques	14911	13053
Redondance	3,38 (3,13)	3,57 (3,44)
Complétude (%)	90,5 (93,4)	86,7 (91,3)
Rfactor observé (%)	6,0 (40,5)	7,3 (37,1)
I/sigma	13,1 (2,9)	11,3 (3,8)
CC (1/2)	99,8 (79,5)	99,6 (90,2)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 : 79,23 79,23 37,90 90 90 90	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 : 79,24 79,24 37,90 90 90 90

TABLE 3.1 Données XDS de cristaux de lysozyme ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

	LysoD6	LysoD2	LysoD8
Condition de cristallisation	0,75 M NaCl 0,1 M NaOAc pH 4	0,75 M NaCl 0,1 M NaOAc pH 4	0,75 M NaCl 0,1 M NaOAc pH 4
Méthode de cristallisation	Dialyse microfluidique avec changement de concentration de 0,85 M à 0,75 M NaCl	Dialyse microfluidique avec changement de concentration de 0,85 M à 0,75 M NaCl	Dialyse microfluidique avec changement de concentration de 0,85 M à 0,75 M NaCl
Température	293 K avec chauffage puis refroidissement	293 K avec chauffage puis refroidissement	293 K avec chauffage puis refroidissement
Source RX	FIP	FIP	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798	0,9798	0,9798
Nb images	40	40	40
Résolution (Å)	50-1,45 (1,54-1,45)	50-1,50 (1,59-1,50)	50-1,58 (1,68-1,58)
Mosaïcité (°)	0,07	0,07	0,16
Réflexions totales (observées)	65652	61221	52620
Réflexions uniques	12725	15491	15554
Redondance	5,16 (3,83)	3,95 (3,68)	3,38 (3,31)
Complétude (%)	57,8 (63,0)	77,8 (82,1)	91,1 (94,2)
Rfactor observé (%)	5,9 (62,0)	8,0 (51,7)	9,8 (59,1)
I/sigma	15,3 (2,3)	9,9 (2,3)	7,6 (2,0)
CC (1/2)	99,9 (71,1)	99,6 (76,3)	99,2 (67,0)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 : 79,27 79,27 37,94 90 90 90	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 : 79,25 79,25 37,91 90 90 90	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2 : 79,21 79,21 37,90 90 90 90

TABLE 3.2 Données XDS de cristaux de lysozyme ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

### 3.2.4.3 IspE

Dans le cas de l'IspE des données ont été collectées sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes, orientés de façon aléatoire les uns par rapport aux autres, et ont été fusionnés pour obtenir un jeu de données complet. En effet la symétrie de l'IspE ne nous permet pas de collecter un jeu de données complet à partir d'un cristal au vu de l'amplitude angulaire accessible pour la collecte sur un cristal. D'abord, dans le tableau 3.3 les statistiques XDS obtenus sur 3 cristaux d'IspE ayant poussés dans la même condition sont résumés. Le même phénomène qu'avec le lysozyme est observé puisque la mosaïcité obtenue en puce semble être sensiblement meilleure allant pour certains cristaux jusqu'à un ordre de grandeur inférieur de mosaïcité de ce qui est standard pour les méthodes traditionnelles de détermination de la structure [112].

Ensuite, à partir de données partielles obtenues sur plusieurs cristaux, nous avons fusionné les données de 6 cristaux isomorphes orientés aléatoirement et ayant une qualité de diffraction variée pour obtenir un jeu complet avec l'IspE. Pour cela les données ont été traitées indépendamment pour chaque cristal avec XDS. Les fichiers XDS\_ASCII.HKL des 6 cristaux ont été regroupés dans le même dossier et les différentes résolutions ont été choisies à la main. La fusion des données à été réalisée par l'utilisation de la commande xscale. Le résultat du groupement des données est ensuite présenté dans le tableau 3.4.

	IspE	IspE2	IspE4
Condition de cristallisation	PEG8k20 %, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH 6, ATP 5 mM	PEG8k20 %, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH 6, ATP 5 mM	PEG8k20 %, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH6, ATP 5 mM
Méthode de cristallisation	Dialyse microfluidique	Dialyse microfluidique	Dialyse microfluidique
Température	293 K	293 K	293 K
Source RX	FIP	FIP	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798	0,9798	0,9798
Nb images	60	60	70
Résolution (Å)	50-2,30 (2,44-2,30)	50-2,15 (2,28-2,15)	50-2,35 (2,49-2,35)
Mosaïcité (°)	0,09	0,11	0,14
Réflexions totales (observées)	15851	19362	17245
Réflexions uniques	6584	9716	8635
Redondance	2,36 (2,24)	1,99 (1,91)	2,00 (1,89)
Complétude (%)	51,4 (54,7)	62,1 (64,8)	71,6 (73,2)
Rfactor observé (%)	12,5 (61,1)	9,1 (51,4)	13,7 (52,5)
I/sigma	7,0 (1,9)	8,0 (2,0)	5,9 (2,0)
CC (1/2)	99,0 (67,1)	99,5 (65,9)	98,2 (67,2)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	C2 : 72,64 83,11 51,09 90 109,03 90	C2 : 72,48 82,91 51,01 90 109,08 90	C2 : 72,64 82,87 51,07 90 109,05 90

TABLE 3.3 Données XDS de cristaux d'IspE ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

	IspE_merge
Condition de cristallisation	PEG8k20 %, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 0,1 M pH 6, ATP 5 mM
Température	293K
Source RX	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798
Résolution (Å)	50-2,30 (2,40-2,30)
Réflexions totales (observées)	91062
Réflexions uniques	22461
Redondance	4,05 (2,88)
Complétude (%)	89,5 (74,0)
Rfactor observé (%)	19,8 (59,8)
I/sigma	5,8 (1,9)
CC (1/2)	98,3 (68,0)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	C2 : 72,73 82,92 51,17 90 109,20 90

TABLE 3.4 Données XDS obtenues par groupement des données à partir de 6 cristaux d'IspE ayant poussés dans la même condition de cristallisation. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

#### 3.2.4.4 Insuline

Dans le cas de l'insuline nous avons aussi collecté des données obtenues sur plusieurs cristaux uniques et isomorphes, orientés de façon aléatoire les uns par rapport aux autres, que nous avons fusionné pour obtenir un jeu de données complet. Les cristaux collectés ont une dimension inférieure ou de l'ordre de 50  $\mu\text{m}$ . Afin de déterminer le groupe d'espace pour les analyses XDS les résultats collectés sur un des cristaux ayant poussé dans des conditions proches par la méthode de cristallisation traditionnelle de diffusion de vapeur en goutte suspendue ont été utilisés, tableau 3.5. Le groupe d'espace et les paramètres de maille obtenus correspondent bien à ce que l'on peut trouver dans la littérature [6] à savoir groupe d'espace R3 avec  $a = 82,50 \text{ \AA}$  ;  $b = 82,50 \text{ \AA}$  ;  $c = 34,00 \text{ \AA}$  ;  $\alpha = 90,00^\circ$  ;  $\beta = 90,00^\circ$  ;  $\gamma = 120,00^\circ$ .

A partir de ces informations nous avons pu récupérer des données à suffisamment haute résolution pour fusionner plusieurs jeux de diffraction partiels afin d'obtenir un jeu de



Source RX	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798
Nb images	125
Résolution (Å)	50-1,18 (1,25-1,18)
Mosaïcité (°)	0,16
Réflexions totales (observées)	103049
Réflexions uniques	27216
Redondance	3,79 (3,33)
Complétude (%)	99,5 (99,5)
Rfactor observé (%)	4,5 (52,6)
I/sigma	16,0 (2,2)
CC (1/2)	99,9 (74,0)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	R3 : 81,39 81,39 33,66 90 90 120

TABLE 3.5 Données XDS obtenues sur un cristal d'insuline congelé, cristal obtenu par la méthode de diffusion de vapeur en goutte suspendue. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

---

diffraction complet et de démontrer la faisabilité dans le cas de la diffraction de petits cristaux de protéines. Les statistiques obtenues par la collecte des jeux de diffraction partielles sur quelques cristaux sont présentées dans le tableau 3.6.

	Insu1	Insu4	Insu8
Condition de cristallisation	HCl 1 mM, ZnCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 50 mM pH 6, acétone 10 % (v/v)	HCl 1 mM, ZnCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 50 mM pH 6, acétone 10 % (v/v)	HCl 1 mM, ZnCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 50 mM pH 6, acétone 10 % (v/v)
Méthode de cristallisation	Dialyse microfluidique	Dialyse microfluidique	Dialyse microfluidique
Température	293 K	293 K	293 K
Source RX	FIP	FIP	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798	0,9798	0,9798
Nb images	40	40	40
Résolution (Å)	50-2,00 (2,12-2,00)	50-2,10 (2,23-2,10)	50-2,10 (2,23-2,10)
Mosaïcité (°)	0,18	0,14	0,10
Réflexions totales (observées)	7353	6464	6516
Réflexions uniques	4194	3268	2483
Redondance (der coquille)	1,75 (1,66)	1,98 (1,90)	2,62 (2,40)
Complétude (der coquille) (%)	71,5 (74,7)	64,6 (65,6)	48,9 (54,3)
Rfactor observé (der coquille) (%)	8,2 (34,5)	13,7 (41,8)	14,3 (43,8)
I/sigma	6,8 (2,0)	5,2 (2,1)	5,4 (2,1)
CC (1/2)	99,2 (78,9)	98,6 (74,5)	97,9 (71,2)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	R3 : 82,58 82,58 34,11 90 90 120	R3 : 82,57 82,57 34,10 90 90 120	R3 : 82,67 82,67 34,17 90 90 120

TABLE 3.6 Données XDS de cristaux d'insuline ayant poussés dans la puce. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

Le tableau 3.7 montre les statistiques XDS par groupement des données à partir de 6 cristaux isomorphes d'insuline. La fusion des données a été réalisée de façon similaire à la fusion des données pour l'IspE.

	Insulin_merge
Condition de cristallisation	HCl 1 mM, ZnCl <sub>2</sub> 5 mM, citrate de sodium 50 mM pH 6, acétone 10 % (v/v)
Température	293 K
Source RX	FIP
Longueur d'onde (Å)	0,9798
Résolution (Å)	40-2,10 (2,20-2,10)
Réflexions totales (observées)	34986
Réflexions uniques	9612
Redondance	3,64 (2,77)
Complétude (%)	94,9 (91,1)
Rfactor observé (%)	14,9 (42,6)
I/sigma	7,0 (2,7)
CC (1/2)	98,4 (81,6)
Groupe d'espace : paramètres de maille (Å)	R3 : 82,58 82,58 34,12 90 90 120

TABLE 3.7 Données XDS obtenues par groupement des données de 6 cristaux d'insuline ayant poussé dans la même condition. Les valeurs entre parenthèses correspondent à la dernière tranche de résolution.

# Chapitre 4

## Compréhension des phénomènes physiques : modélisation des données expérimentales

### 4.1 Dialyse et diffusion

Dans cette section nous présenterons la démarche suivie dans le but de mieux comprendre et de prédire le transport de matière dans une expérience de dialyse. De plus nous introduirons des grandeurs physiques permettant de caractériser les expériences de diffusion des PEG et des sels à travers les membranes de dialyse.

#### 4.1.1 Présentation du modèle - approche par simulations numériques

Lors d'une expérience de dialyse, aussi bien dans le banc de cristallisation que dans la puce microfluidique, l'agent de cristallisation diffuse à travers la membrane de dialyse afin qu'un équilibre des concentrations de part et d'autre de celle-ci soit réalisé. Il est primordial pour les deux systèmes de pouvoir prédire les transferts de matière qui vont avoir lieu afin d'évaluer les concentrations dans chaque compartiment à chaque instant. A terme, il faudrait coupler ces résultats à une étude thermique afin d'évaluer l'influence évidente de la température (cf. 3.1.1.2) et il faudrait étudier l'effet de mélanges de solutions. En effet la connaissance des temps d'équilibration est cruciale pour élaborer des plans d'expériences dans lesquels les conditions de cristallisations sont modifiées au cours du temps.

Pour étudier le transfert de masse en solution nous avons tenté d'établir un modèle valide par simulations numériques. Un tel modèle comporte de nombreuses inconnues : la viscosité des solutions utilisées, qui influe sur le coefficient de diffusion des molécules dans la phase considérée ; la porosité de la membrane qui est liée à sa perméabilité ; la quantité de matière par unité de surface et de temps qui est appliquée, dans le cas où un flux est appliqué. Pour s'assurer de l'exactitude du modèle que nous souhaitons développer, nous avons essayé de simuler une situation dans laquelle des résultats expérimentaux seraient confrontés aux

simulations. Cependant il est apparu que le travail entrepris nécessite sans doute un travail de thèse complet indépendant pour aboutir avec succès aux modèles valables. Par conséquent, les simulations numériques que nous avons pu mettre en place n'ont pas aboutis aux modèles satisfaisants au cours de cette thèse. Le modèle sera tout de même présenté succinctement ainsi que les équations utilisées pour y parvenir et les futures perspectives pour poursuivre cette étude. A l'avenir il serait important de poursuivre ces simulations numériques pour mieux caractériser le banc de cristallisation et les puces microfluidiques en couplant les transferts de masses et les échanges thermiques.

Dans notre démarche, la géométrie du modèle consistait à reproduire une expérience en bouton de dialyse à la même échelle (en absence de flux continu). Pour cela les mesures des dimensions d'un bouton de dialyse et du réservoir le contenant ont été prises. Au vue de la configuration d'un tel système une géométrie 2D axisymétrique permet de simplifier l'étude 4.1.

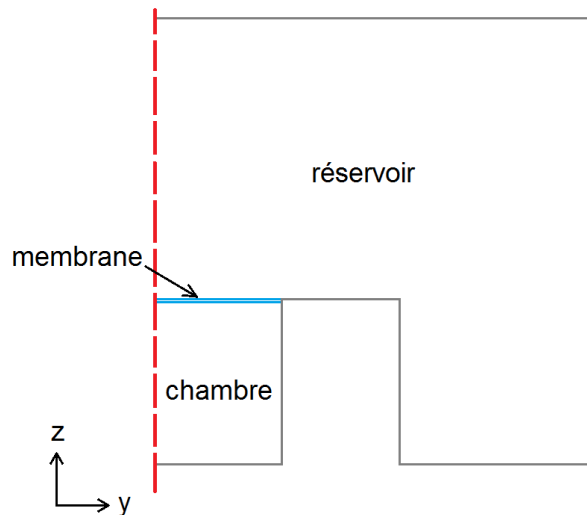


FIGURE 4.1 Géométrie du modèle du bouton de dialyse. Les lignes grises délimitent la solution et une condition d'absence de flux a été appliquée. Les lignes bleues représentent les délimitations de la membrane, où la diffusion des molécules diffère beaucoup par rapport aux zones du réservoir et de la chambre.

Les propriétés de transport en solution sont régies par l'équation de la diffusion décrite dans l'équation (4.1). La variable  $c$  est la concentration de l'espèce  $i$  considérée,  $D$  est le coefficient de diffusion associé.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i) = 0 \quad (4.1)$$

Cette équation est la seconde loi de Fick dérivée de la première loi de Fick ( $J = -D \nabla c$  où  $J$  est le flux de diffusion qui représente la quantité de matière par unité de surface et de temps) et de la conservation de la masse en absence de réaction chimique. Le coefficient de diffusion est un paramètre primordial pour régir la diffusion des molécules en solution. Le

transport d'espèces à travers la membrane est considéré comme s'effectuant avec  $D_m$  qui est le coefficient de diffusion de l'espèce considéré dans la membrane et  $D_0$  le coefficient de diffusion de la même espèce dans le solvant. Il existe plusieurs modèles qui permettent de retrouver le paramètre  $D_m$ . Schultz and Gerhardt [37] présentent plusieurs de ces modèles. Deux de ces modèles se basent sur l'hypothèse que la diffusion d'une molécule est entravée lors de son passage à travers des pores. Une autre se base sur l'hypothèse que la surface effective ouverte accessible pour la diffusion diminue avec une augmentation du poids moléculaire de la molécule dû à la faible probabilité qu'une molécule incidente pénètre dans un pore. Les équations (4.2) et (4.3) se basent sur la première hypothèse, l'équation (4.4) se base sur la deuxième hypothèse.

$$f = \frac{D_m}{D_0} = 1 - 2,104\left(\frac{r}{R}\right) + 2,09\left(\frac{r}{R}\right)^3 + 0,95\left(\frac{r}{R}\right)^5 \quad (4.2)$$

$$f = \frac{D_m}{D_0} = \left(1 - \frac{r}{R}\right)^{2,5} \quad (4.3)$$

$$f = \frac{A_e}{A_p} = \left(1 - \frac{r}{R}\right)^2 \quad (4.4)$$

Dans ces équations,  $f$  est le rapport du taux de perméabilité de l'espèce à travers la membrane et du taux de perméabilité à travers une épaisseur équivalente de solvant pur,  $D_m$  est le coefficient de diffusion effectif de l'espèce dans la membrane,  $r$  est le rayon moléculaire de la substance,  $R$  est le rayon effectif des pores dans la membrane.  $A_e$  est la surface effective ouverte des pores (disponible pour les molécules) et  $A_p$  est la vraie surface ouverte des pores. Les modèles décrits plus haut tiennent compte d'une membrane dont la distribution des pores est répartie de manière équivalente. Cependant en pratique une membrane est constituée de nombreux passages interconnectés. Pour tenir compte de cet effet, Schultz et Gerhardt proposent l'équation (4.5) où le numérateur représente la diminution de la surface ouverte et le dénominateur représente l'augmentation du chemin de diffusion.

$$f = \frac{\left(1 - \frac{r}{R}\right)}{\left(1 + \frac{nr}{R}\right)} \quad (4.5)$$

$n$  est une constante empirique obtenue par ajustement. Un programme de calcul en C++ a été réalisé dans le but d'établir les valeurs de  $D_m$  pour chaque modèle présenté ci-avant. Ce programme nécessite en entrée le seuil de rétention de la membrane utilisée,  $M$ , en Da, le rayon  $r$  de la molécule d'étude en nm, la viscosité dynamique  $\eta$  de l'espèce considérée à la concentration dans le réservoir, la température  $T$  de l'expérience. Le rayon effectif des pores,



$R$ , est approximé à l'aide d'une équation empirique obtenue à partir de la littérature [172]. La relation relie le seuil de rétention en Da à la taille des pores en nm. Finalement  $R = \frac{\sqrt[3]{M/220}}{2}$ . Le coefficient de diffusion de l'espèce considérée est calculé à partir de l'équation (4.6) de Stokes-Einstein (déjà présentée dans la section 3.1.1.2) en utilisant la valeur  $\eta$ ,  $r$  (ici le rayon hydrodynamique) et  $T$  en entrée du programme. Les valeurs de  $r$  proviennent de la littérature [173, 174] ou d'approximation du rayon moléculaire atomique dans le cas du NaCl, la référence [174] renvoie vers plusieurs valeurs pour le PEG 1000 dans l'eau. Pour les PEG, en l'absence de résultats dans la littérature, le rayon hydrodynamique  $R_H$  est approximé de la façon suivante  $R_H = \frac{R_g}{1.5}$  avec  $R_g \approx \frac{r_a}{\sqrt{6}}$  et  $r_a = 75010^{-4}(M_w)^{\frac{1}{2}}$  avec  $M_w$  le poids moléculaire du PEG et  $r_a$  le rayon quadratique moyen bout à bout en nm [175]. Les valeurs de  $\eta$  proviennent aussi de la littérature [138–140]. A partir de ces calculs on peut déduire la valeur de  $D_m$  connaissant la valeur du rapport  $\frac{R}{r}$  et la valeur de  $D_0$ . Sur la Figure 4.2 on peut voir l'évolution de  $\frac{D_m}{D_0}$  en fonction du rapport  $\frac{R}{r}$  pour les différents modèles.

$$D_0 = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (4.6)$$

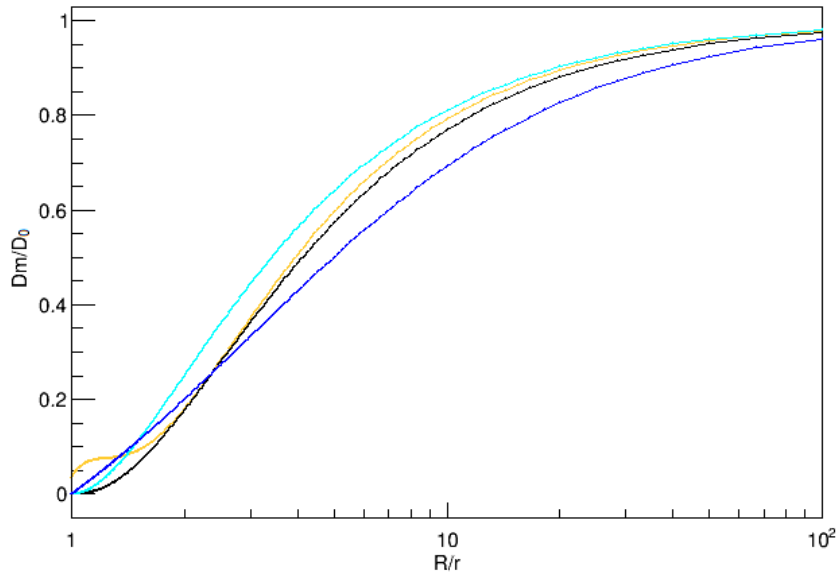


FIGURE 4.2 Evolution de  $f$  en fonction du rapport entre la rayon des pores et le rayon de la molécule pour les 4 modèles présentés ci-dessus. En jaune le modèle de l'équation (4.2), en noir le modèle de l'équation (4.3), en turquoise le modèle de l'équation (4.4) et en bleu le modèle de l'équation (4.5) pour  $n = 3$ , valeur la plus adaptée par ajustement.

Le choix de la valeur de  $D_m$  par cette méthode impose une valeur de  $D_m$  fixe alors que cette valeur varie avec les changements de concentration en solution. Pour tenir compte de cet effet, la valeur de  $D_0$  est calculée en fonction de la viscosité à différentes concentrations à une température donnée. L'évolution de la viscosité en fonction de la concentration est ajustée

par une fonction exponentielle à partir des résultats de la littérature. Pour  $\eta(C) = Ae^{BC}$ , on a  $D_0(C) = \frac{k_B T}{6\pi A e^{BC} r}$  avec A et B deux constantes d'ajustement. On peut donc calculer  $D_m$  comme présenté dans l'équation (4.7) où  $f(\frac{r}{R})$  est un des 4 modèles présenté ci-avant (équations (4.2), (4.3), (4.4), (4.5)).

$$D_m = \frac{k_B T}{6\pi A e^{BC} r} f\left(\frac{r}{R}\right) \quad (4.7)$$

Les valeurs de  $D_0(C)$  et de  $D_m(C)$  ont été introduites dans les simulations de sorte que leur valeur soit dépendante de la concentration. Les mêmes simulations ont aussi été menées avec des valeurs fixes pour ces deux paramètres. Dans tous les cas les résultats des simulations diffèrent des résultats expérimentaux. Sur la Figure 4.3 l'ajustement exponentiel réalisé sur les résultats expérimentaux et la moyenne de concentration dans la chambre sur deux simulations réalisées avec du PEG 1000 est montré, à deux concentrations différentes, en considérant une membrane avec un rayon de pore de 23 Å, un rayon hydrodynamique du PEG 1000 de 0,65 nm et les valeurs de viscosité selon Mei et al. [139].

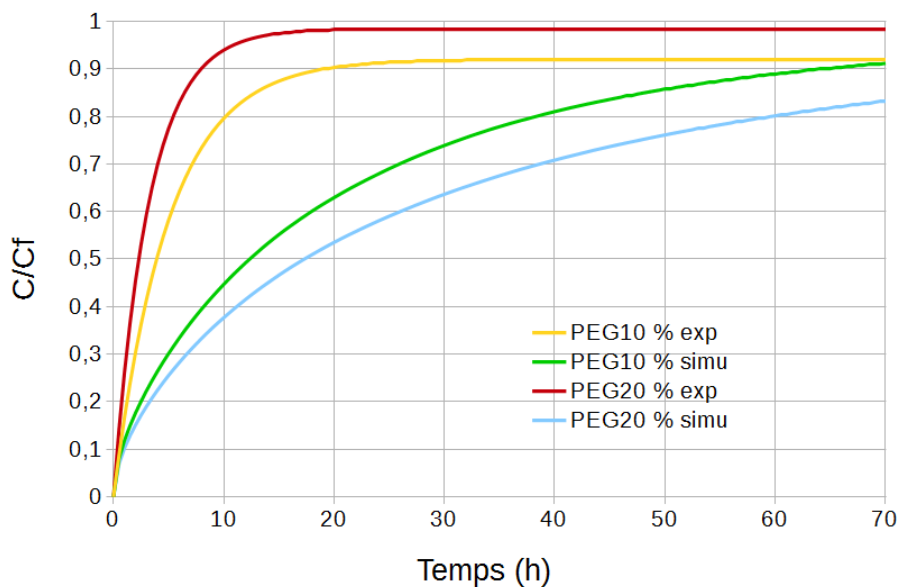


FIGURE 4.3 Evolution de la concentration rapportée à la concentration finale dans la chambre de dialyse en fonction du temps pour le PEG 1000 à 10 % (w/v) réalisé expérimentalement, "exp", et par simulation, "simu" (valeur moyenne dans la chambre).

L'écart est prononcé entre les simulations et les expériences. De plus lorsque la concentration en PEG augmente, le profil des expériences et des simulations n'évolue pas de la même manière. On observe les mêmes tendances avec le NaCl et le PEG 6000. Comme la concentration augmente, la viscosité augmente et le coefficient de diffusion diminue, ralentissant ainsi la diffusion globale des molécules.

Plusieurs raisons peuvent être à l'origine de l'écart observé entre le modèle et l'expérience et permettraient d'expliquer des erreurs du modèle :

- Tout d'abord la relation entre la taille des pores en nm et le seuil de rétention n'est pas une bonne approximation : il n'existe pas de relation directe entre seuil de rétention et taille des pores, les deux façons d'évaluer les propriétés de séparation étant différentes. On retrouve souvent des comparaisons entre ces deux paramètres (notamment chez les vendeurs de membrane) mais il s'agit exclusivement d'une approximation. Les membranes en cellulose régénérée utilisées en dialyse ne sont pas caractérisables par un diamètre de pore (on raisonne en séparation par le poids moléculaire).

- Ce modèle ne tient pas compte de la gravité qui joue ici certainement un rôle significatif. En effet vu l'échelle de notre système et les différences de densité présentes dans la solution il faudrait inclure une force selon  $z$  qui dépend de la masse volumique du type  $-\rho gz$ .

- Ces simulations ne prennent pas non plus en compte le caractère hydrophile et complexe du PEG [176] qui induit une osmose inverse non négligeable par expulsion de l'eau hors de la chambre de dialyse. Cet effet accélère l'équilibration des concentrations de part et d'autre de la membrane grâce à la diminution rapide d'eau de la chambre. Dans le cas du NaCl, l'effet d'osmose inverse est aussi présent mais très certainement de façon moins prononcé que pour le PEG.

#### 4.1.2 Calculs de perméabilités membranaires

A l'aide des mesures réalisées dans la section 3.1.1, il a été possible de remonter à un paramètre physique pouvant présenter un intérêt majeur vis-à-vis des membranes. Il est possible de modéliser une membrane, à l'aide de la première loi de Fick comme une interface semi-absorbante de perméabilité  $\kappa$  de sorte que  $J = \kappa \Delta C$  [127], avec  $\Delta C$  la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. On peut écrire cette équation différemment en considérant la membrane de dialyse comme un film fin de liquide retenu par la matrice poreuse du matériau composant la membrane :  $J = P_m A_m \Delta C$  [37]. Dans ce cas  $P_m$  est un facteur empirique appelé coefficient de perméabilité et doit être déterminé expérimentalement pour chaque membrane et espèce en solution.  $A_m$  est l'aire totale de la membrane, dans le cas d'un bouton de dialyse de 200  $\mu\text{L}$ ,  $A_m = 0,436 \text{ cm}^2$  (mesure au pied à coulisse).

L'accès aux valeurs de  $P_m$  est possible à partir des mesures réalisées, et dans le cas où la concentration initiale de l'agent cristallisant dans la chambre de dialyse est nulle. L'équation (4.8) relie le temps de demi-équilibration et la perméabilité [37].  $V_c$  est le volume de la chambre et  $V_r$  est le volume du réservoir.

$$P_m = \frac{\ln 2}{\left(\frac{1}{V_c} + \frac{1}{V_r}\right) \tau_{1/2} A_m} \quad (4.8)$$

Cependant, du fait de la dépendance du temps de demi-équilibration avec le volume de la chambre et de la taille de la membrane, le  $\tau_{1/2}$  aura un intérêt limité pour comparer ces résultats à d'autres réalisés dans des conditions différentes. Par exemple, l'utilisation du même PEG à la même concentration dans un cas où le volume et/ou l'aire de la membrane seraient

différents pourrait mener à des valeurs de perméabilités relativement différentes. Dans notre cas nous comparons des données réalisées dans les mêmes conditions.

La Figure 4.4 montre l'évolution du coefficient de perméabilité en fonction de la concentration pour plusieurs conditions différentes avec du NaCl. La Figure 4.5 illustre l'évolution du coefficient de perméabilité en fonction de la concentration pour plusieurs conditions différentes avec du PEG 1000.

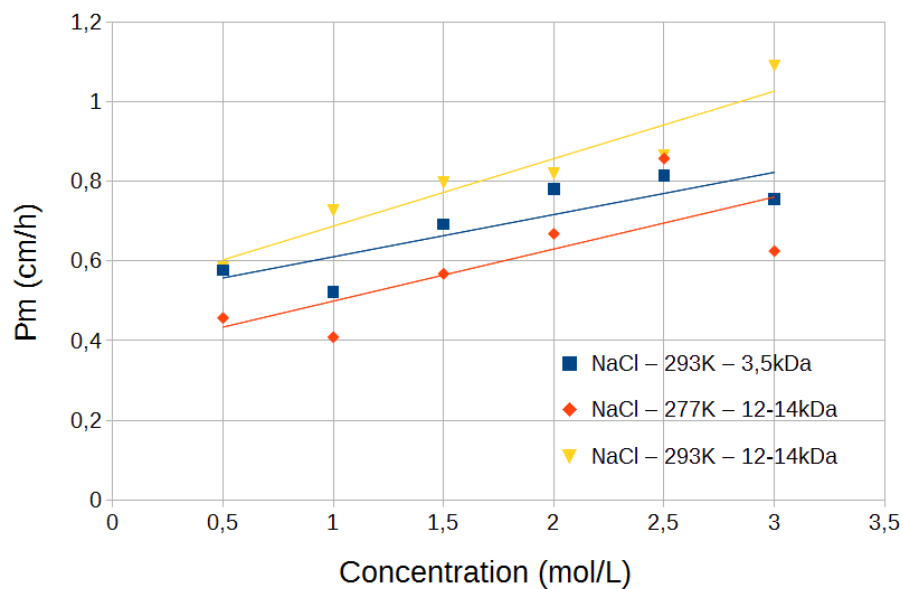


FIGURE 4.4 Coefficient de perméabilité en fonction de la concentration en NaCl pour différentes conditions de température et seuil de rétention de la membrane (indiquées en légende). Les courbes en trait plein représentent un ajustement linéaire pour évaluer la tendance globale.

La perméabilité croît avec la concentration et on peut déduire des conclusions similaires à la section 3.1.1. Le coefficient de perméabilité est plus élevé pour le NaCl que pour le PEG 1000 dans tous les cas étudiés. Le flux de diffusion est similaire pour le PEG 1000 à 277 K avec une membrane dont le seuil de rétention est élevé (12-14 kDa) et celui à 293 K avec une membrane dont le seuil de rétention est faible (3,5 kDa).

Finalement ces deux exemples prouvent qu'il est possible d'évaluer un coefficient de perméabilité qui ne représente pas la perméabilité intrinsèque de la membrane mais qui est un facteur dépendant des conditions expérimentales. Il est utile dans le cas de la comparaison de données réalisées dans les mêmes conditions expérimentales mais sera de moins grand intérêt si les volumes et aires de la membrane varient d'une expérience à une autre.

## 4.2 Etude des matériaux aux rayons X

Cette section a pour but d'expliquer les phénomènes physiques mis en jeu lors de la caractérisation des matériaux, d'expliquer la forme des courbes obtenues et de montrer que les comparaisons réalisées sont cohérentes. Cette partie se réfère notamment au site web du

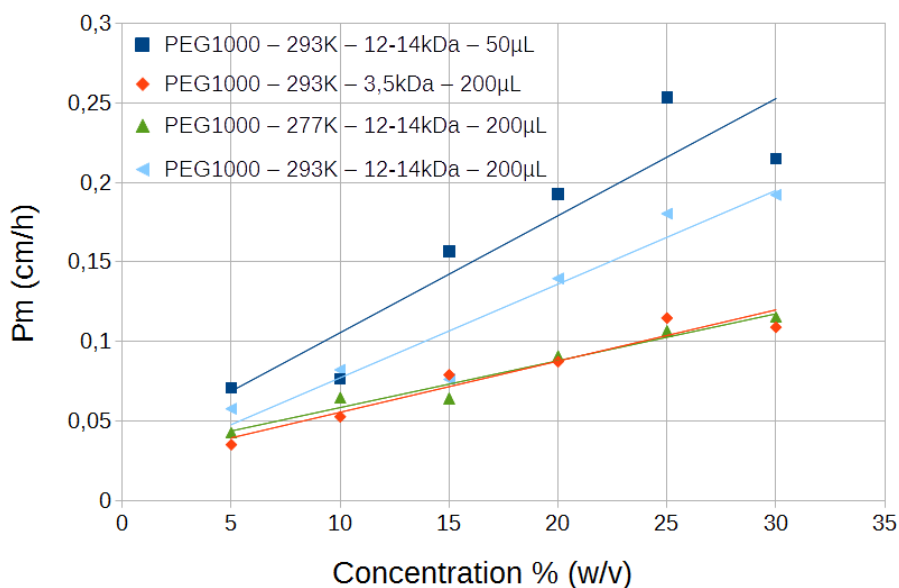


FIGURE 4.5 Coefficient de perméabilité en fonction de la concentration en PEG 1000 pour différentes conditions de température, seuil de rétention de la membrane et volume de la chambre de dialyse (indiquées en légende). Les courbes en trait plein représentent un ajustement linéaire pour évaluer la tendance globale.

CXRO (The Center for X-Ray Optics), qui est un groupe de recherche multi-disciplinaire au Lawrence Berkeley National Laboratory's Materials Sciences Division et au "X-Ray Data Booklet" [177].

#### 4.2.1 Interactions avec la matière

L'évaluation du diffusé de différents matériaux exposés aux rayons X a été présentée dans la section 3.2.4.1. Le système de puce microfluidique et de plaque de cristallisation traditionnellement utilisées y sont comparées en intensité au niveau du détecteur. Cependant cette comparaison *stricto sensu* n'a de sens que si les matériaux ont des transmissions comparables. En effet, pour un matériau absorbant fortement le faisceau X incident, comme c'est le cas du PDMS à certaines épaisseurs [29], l'intensité transmise est faible sans pour autant signifier que sa contribution lors d'expériences de diffraction sur des cristaux soit minime.

Pour interpréter ces résultats il est nécessaire d'introduire la notion de section efficace. La section efficace, notée  $\sigma$  dont l'unité est le barn ( $1 \text{ b} = 10^{-28} \text{ m}^2$ ) est reliée à la probabilité d'interaction d'une particule projectile A avec une particule cible B. La section efficace est indépendante de l'intensité du faisceau et de la cible (géométrie et densité).

Aux basses énergies, les principales interactions des rayons X avec la matière sont :

- l'effet photoélectrique décrit ci-après. On considère un photon d'énergie  $E_p = h \nu$ , avec  $h$  la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence de la particule. Ce photon va interagir avec un électron et lui transmettre toute son énergie  $h\nu$  et donc être absorbé. Cette énergie va servir à

arracher l'électron de son orbite, l'énergie fournie par le photon est égale à l'énergie de liaison  $E_l$  de l'électron. L'électron acquiert alors une énergie cinétique  $E_c$  telle que  $E_c = h\nu - E_l$ . Si un électron d'une couche interne est arraché, après un certain délai, un électron d'une couche externe sera transféré vers la couche interne accompagné de l'émission d'un photon X de fluorescence.

- la diffusion cohérente (diffusion de Rayleigh) [178]. La diffusion de Rayleigh est une diffusion élastique du photon incident sans qu'il y ait de transmission d'énergie. Par exemple si le photon est diffusé sur un électron dont l'énergie de liaison est très élevée. Le photon va alors être dévié.

- la diffusion Compton est une diffusion inélastique où le photon incident va interagir avec un électron libre qui va être éjecté de l'atome tandis que le photon va diffuser. Par conservation de l'énergie on aura  $h\nu = h\nu' + E_c$  où  $h\nu'$  est l'énergie du photon diffusé et  $E_c$  l'énergie cinétique de l'électron éjecté. L'effet Compton est en général moins important que l'effet photoélectrique quand celui-ci existe. Il contribue à produire un fond continu dans toutes les directions.

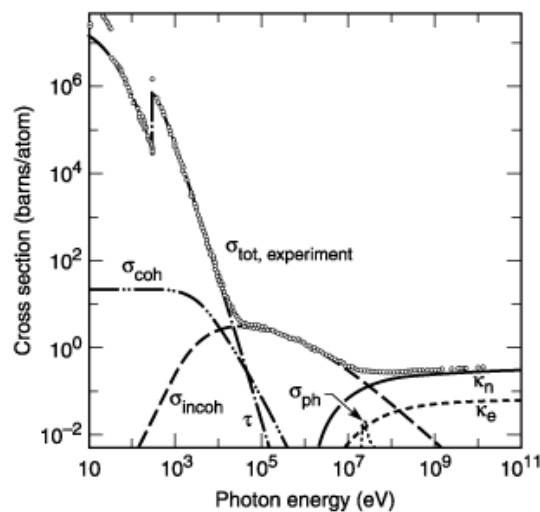


FIGURE 4.6 Section efficace du carbone en fonction de l'énergie des photons.  $\tau$ , effet photoélectrique;  $\sigma_{coh}$ , diffusion Rayleigh;  $\sigma_{incoh}$ , diffusion Compton;  $\kappa_n$ , production de paire (noyau);  $\kappa_e$ , production de paire (électron);  $\sigma_{ph}$ , absorption photonucléaire. D'après [177, 179].

Sur la Figure 4.6 est représentée, dans le cas du carbone, les différentes contribution de ces processus à différentes énergie ainsi que la section efficace totale  $\sigma_{tot}$  [177, 179]. On peut noter qu'à l'énergie de 12 keV, considérée ici, que le phénomène prépondérant est l'effet photoélectrique responsable de l'absorption des rayons X. On peut calculer cette absorption *via* un coefficient de transmission  $T = \frac{I}{I_0}$ , avec  $I_0$  l'intensité incidente, des rayons X à travers un matériau d'épaisseur  $d$ , l'équation (4.9) est utilisée.

$$T = e^{-n\sigma_a d} \quad (4.9)$$

Où  $n$  représente le nombre d'atomes par unité de volume du matériau et  $\sigma_a$  la section efficace de photoabsorption calculée à partir des facteurs de diffusion atomiques basés sur des mesures de photoabsorption des éléments dans leur état fondamental [178]. En introduisant la notion de coefficient d'atténuation linéique,  $\mu$ , avec  $\mu = n \sigma_a$ , on peut écrire l'équation (4.10) qui décrit la transmission en fonction de l'épaisseur du matériau traversé pour un  $\mu$  donné.

$$T = e^{-\mu d} \quad (4.10)$$

Les valeurs de  $\mu$  dans le cas d'un matériau composé de plusieurs éléments peuvent être calculées à partir de la somme des coefficients d'atténuation linéiques indépendants de chaque élément pondéré par la fraction massique de l'élément [180–182]. Cependant la section efficace dépend de l'énergie, de même pour  $\mu$ .

## 4.2.2 Comparaison des matériaux

Dans le tableau 4.1 nous avons consigné les densités de divers matériaux et calculé les fractions massiques atomiques de tous les éléments constituant ces matériaux, et la valeur du coefficient d'atténuation linéique à 12 keV obtenu à partir de l'interpolation des coefficients d'absorption massiques d'après Hubbell and Seltzer [182]. Ce tableau est comparable au tableau que l'on peut retrouver en annexe des publications suivantes [113, 183]. Nos valeurs sont comparables et sont aussi en bon accord avec les valeurs que l'on peut obtenir via <http://physics.nist.gov/PhysRefData/FFast/html/form.html> pour le coefficient d'atténuation linéique.

Elément	Verre	PDMS	COC	PMMA	Kapton
H	-	0,081	0,115	0,080	0,026
C	-	0,324	0,885	0,600	0,691
N	-	-	-	-	0,073
O	0,533	0,216	-	0,320	0,209
Si	0,467	0,379	-	-	-
Densité	2,20	0,97	1,02	1,19	1,43
$\mu$ à 12 keV ( $\text{cm}^{-1}$ )	28,959	9,980	1,329	2,556	2,902

TABLE 4.1 Tableau comportant les fractions atomiques massiques, la densité et la valeur du coefficient d'atténuation linéique calculé à 12 keV pour différents matériaux.

A partir de ces valeurs on peut tracer la transmission en fonction de l'épaisseur d'un matériau donné à 12 keV, Figure 4.7.



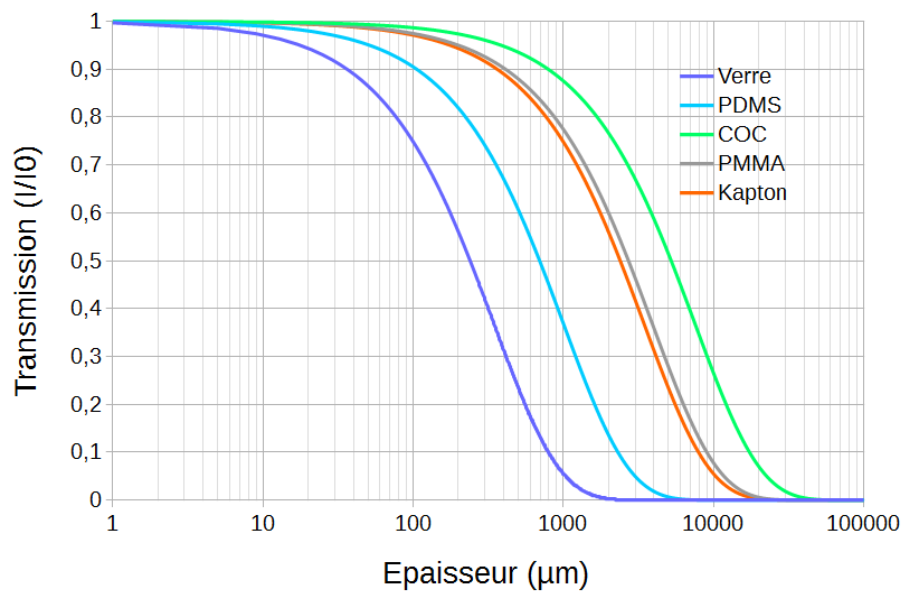


FIGURE 4.7 Evolution de la transmission en fonction de l'épaisseur de divers matériaux.

On observe qu'à une épaisseur donnée la transmission est meilleure pour les matériaux comme le Kapton, le PMMA et le COC comparée au verre ou au PDMS. Le PDMS est reconnu comme étant un matériau relativement inadapté pour être utilisé dans le domaine X à cause de son absorption élevée [29, 113, 184]. De plus, si on trace la transmission en fonction de l'énergie autour de 12 keV ( $\lambda = 0,98 \text{ \AA}$ ) à partir des données du CXRO pour l'ensemble des matériaux composant notre puce microfluidique (nommée MicroChip dans la légende) et pour une plaque CrystalQuickX, la courbe suivante 4.8 est obtenue.

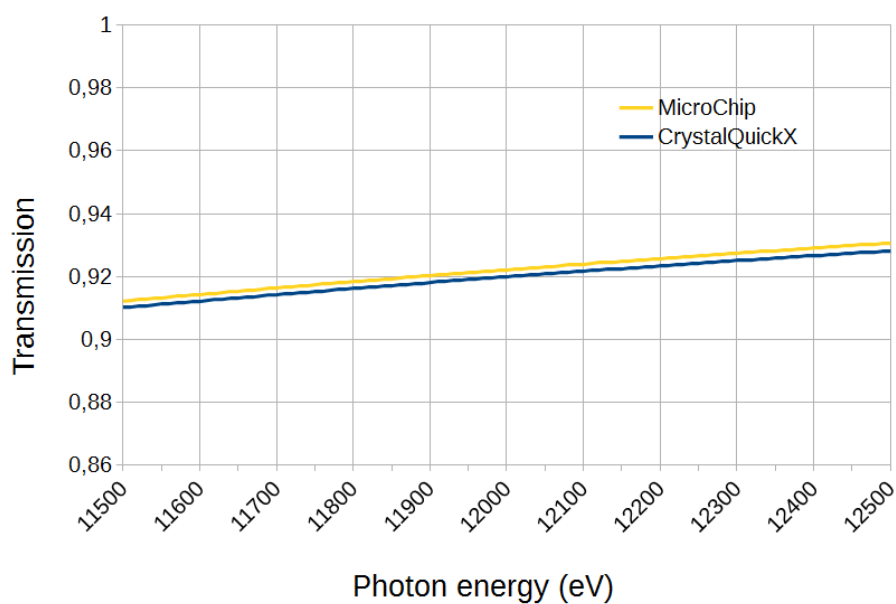


FIGURE 4.8 Evolution de la transmission en fonction de l'énergie pour une gamme d'énergie proche de 12 keV.

Dans le cas de la plaque CrystalQuickX nous avons considéré du COC avec la formule suivante  $C_9H_{14}$ , une densité de 1,02 et une épaisseur de 700  $\mu\text{m}$  (valeur mesurée). Pour la puce nous avons considéré :

- du PMMA avec la formule  $C_5H_8O_2$ , une densité de 1,19 et une épaisseur de 350  $\mu\text{m}$  incluant l'épaisseur provenant de la puce ainsi que l'épaisseur provenant du bouchon servant à fermer le réservoir de protéine

- du Kapton (polyimide) avec la formule  $C_{22}H_{10}N_2O_5$ , une densité de 1,43 et une épaisseur de 20  $\mu\text{m}$  (estimée).

Des valeurs de transmission similaires pour les deux matériaux sont observées dans cette gamme d'énergie ce qui nous permet de comparer les deux de façon fiable.

### 4.2.3 Informations complémentaires

Pour toutes les expériences, nous avons travaillé sous atmosphère d'hélium. Parmi les interactions du rayonnement avec la matière discutées précédemment, l'effet Compton est relativement indépendant de  $Z$  (numéro atomique). La diffusion Rayleigh, quant à elle, apparaît principalement aux basses énergies pour les matériaux dont la valeur de  $Z$  est élevée. Cependant l'effet photoélectrique, qui est prédominant aux basses énergies, est très dépendant de  $Z$  et le coefficient d'atténuation massique photoélectrique est  $\propto \frac{Z^4}{E_p^3}$ , cette équation reste cependant une approximation car l'exposant de  $Z$  varie entre 4,0 et 4,8 [181]. Ainsi pour l'hélium dont  $Z = 2$ , l'interaction des rayons X avec la matière est plus faible que pour l'air composée majoritairement de diazote et de dioxygène dont les valeurs de  $Z$  sont de 7 et 8 respectivement. Ainsi la collecte de données en plaques ou en puces microfluidiques présente un fond diffus moins important sous atmosphère d'hélium.

La forme des courbes obtenues en transmission X (cf. Figures 3.36 et 3.38) pour des polymères comme le PMMA ou le COC (celui des plaques de cristallisation), présente d'abord un pic large entre 4 et 8  $\text{\AA}$  puis l'intensité diminue jusqu'au centre du détecteur matérialisé par le puits qui élimine le faisceau direct. Le pic large observé correspond à la diffusion des rayons X dans le matériau. Dans le cas du Kapton le pic est plus diffus. En revanche même si la contribution de la membrane de dialyse est très faible, on peut voir la présence d'un pic entre 4 et 5  $\text{\AA}$ . Ce pic peut être attribué à l'arrangement des molécules dans la membrane décrivant un comportement cristallin. Toutefois le degré de cristallinité est faible. Des études réalisées sur des films de cellulose et de cellulose régénérée montrent que l'arrangement de la cellulose régénérée est sous la forme d'une structure de cellulose II [185], cette structure étant définie par ses liaisons hydrogène qui diffèrent par rapport à d'autres structures (cellulose I par exemple) [186].

## 4.3 Spectroscopie UV d'absorption

### 4.3.1 Déviations à la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert relie l'absorbance à la concentration par la relation  $A = \epsilon l C$  comme décrite dans la section 2.1.3. Toutefois cette loi n'est valable que dans une certaine gamme de concentration où l'absorbance varie linéairement avec la concentration. Il existe plusieurs types de déviations : les déviations réelles liées aux limites de la loi de Beer-Lambert elle-même, les déviations chimiques dues aux composants en solution et les déviations instrumentales liées à la mesure. Dans cette section ces différents points seront détaillés. Cette section se base notamment sur les travaux de O'Haver [187], le livre de Janin [188] et le résumé de Mehta [189] qui se base notamment sur plusieurs livres de chimie analytique. Il est à noter cependant que la loi de Beer-Lambert n'est jamais fautive, mais que les déviations observées sont dues à des impossibilités de pouvoir faire une mesure parfaite sans limitations instrumentales par exemple [190].

#### 4.3.1.1 Limitations de la loi de Beer-Lambert

La loi de Beer-Lambert est valable dans une gamme de concentration, dépendante de la molécule d'étude. Cependant à haute concentration les molécules en solution peuvent se comporter différemment par rapport à une solution diluée, notamment d'un point de vue de la distribution de charge à leur voisinage, de la proximité des molécules entre elles. Comme la spectroscopie UV est un phénomène électronique, ces changements peuvent induire un décalage de la longueur d'onde d'absorption. Les électrolytes présents en solution peuvent aussi altérer la distribution de charge.

De plus, à haute concentration de molécules à analyser ou de solvant, l'indice de réfraction du milieu peut varier et modifier l'absorbance obtenue.

#### 4.3.1.2 Déviations chimiques

Les déviations liées à la chimie apparaissent dans le cas où des molécules s'associent, se dissocient ou interagissent avec le solvant pour former d'autres espèces qui ont des propriétés d'absorption différentes. Lorsque le pH change, le spectre de la molécule d'intérêt peut changer drastiquement comme c'est le cas pour l'équilibre entre les formes acide et basique du phénol qui n'absorbent pas de la même manière par exemple.

Pour notre cas particulier, dans une protéine non dénaturée certains résidus aromatiques enfouis dans la structure ont un environnement non aqueux et leur spectre d'absorption est perturbé. Si la protéine est à forte concentration en solution cela peut entraîner des interactions qui n'auraient pas lieu avec une solution diluée, notamment une auto-association de la protéine en solution visible à plus ou moins haute concentration en fonction de la protéine [191, 192]. De plus Lucas et al. [193] ont montré que des décalages en longueur d'onde des maxima d'absorption pour la phénylalanine, tyrosine et tryptophane sont observés

à hautes concentrations en sel et que la magnitude et la direction du décalage du pic sont influencées par de nombreux facteurs comme la taille de la protéine, la charge, l'environnement local et l'accessibilité des groupes aromatiques au solvant.

#### 4.3.1.3 Déviations instrumentales

Parmi les déviations instrumentales, les principales sont dues à la lumière parasite et à la polychromaticité.

La lumière parasite peut provenir de l'extérieur (lumière ambiante), c'est-à-dire de la lumière qui n'aurait pas traversé l'échantillon, ou bien de la diffusion de lumière sur les différents éléments optiques du spectromètre ou de la cuve de l'échantillon. Le cas le plus défavorable lié à la lumière parasite est quand elle n'est pas absorbée par l'échantillon. Dans ce cas elle intervient dans la loi de Beer-Lambert et entraîne l'apparition d'une courbure puis d'un plateau de la courbe d'absorbance en fonction de la concentration.

La polychromaticité est une autre déviation à la loi de Beer-Lambert. La loi de Beer-Lambert est valable pour une lumière monochromatique mais en pratique les sources polychromatiques dans une gamme donnée de longueurs d'ondes sont plutôt utilisées. Un spectromètre a une résolution spectrale finie ce qui signifie qu'une mesure à une longueur d'onde donnée sera en réalité réalisée dans un petit intervalle de longueur d'onde. Si le coefficient d'absorption varie dans cet intervalle, l'absorbance calculée ne sera plus une relation linéaire de la concentration.

Sur le site de O'Haver [187] des simulations de ces déviations instrumentales incluent la polychromaticité et la lumière parasite non absorbée.

Il existe d'autres déviations instrumentales telles que la mesure d'absorbance avec un chemin optique non équivalent sur toute la taille du faisceau, si par exemple les faces d'une cuve ne sont pas parallèles entre elles. On peut aussi observer une déviation si la valeur du coefficient d'absorption varie le long du passage du faisceau, dans le cas où la solution ne serait pas homogène par exemple. La présence de particules en solution à fort caractère diffuseur de la lumière est une autre de ces déviations.

#### 4.3.2 Etude de la partie non-linéaire

Comme discuté ci-avant la loi de Beer-Lambert relie l'absorbance à la concentration de façon linéaire. Cependant de nombreuses déviations à cette loi entraînent l'apparition d'un plateau d'absorbance lorsque la concentration augmente. Ainsi la loi n'est valable que dans une gamme de concentration. Lorsque l'on étudie des solutions qui absorbent beaucoup par spectroscopie UV, la concentration de la solution à analyser par dilution peut être abaissée et/ou une cuve avec un chemin optique plus faible peut être utilisée pour étendre la gamme théorique de concentration mesurable. Cependant dans notre cas nous ne pouvons pas diluer la solution de protéine et, vis à vis de nos contraintes techniques d'intégration d'une cellule en quartz dans notre dispositif de dialyse, le chemin optique ne peut être réduit que dans une

certaine proportion. Il paraît donc intéressant d'exploiter au mieux la courbe d'absorbance en fonction de la concentration pour en extraire le maximum d'informations.

Pour cela on peut imaginer utiliser la partie non-linéaire de la courbe d'absorbance lorsque la courbure commence à apparaître pour étendre la gamme de concentration mesurable. Tom O'Haver montre qu'il est possible d'exploiter cette zone en routine *via* l'ajustement de la partie non-linéaire pour toutes méthodes de spectroscopie où la courbe de calibration présente une partie linéaire à faible concentration et une partie non-linéaire à concentration plus élevée [194]. La Figure 4.9 représente la partie linéaire en rouge et la partie non-linéaire qui pourraient être exploitées en vert.

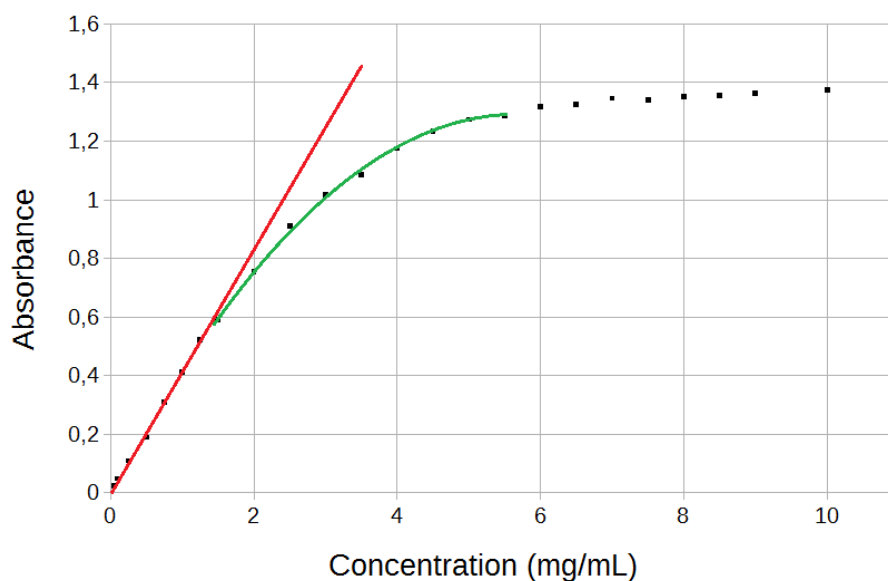


FIGURE 4.9 Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration de lysozyme avec une représentation de la zone linéaire en rouge et de la partie non-linéaire qui pourrait être ajustée en vert.

Les différentes méthodes proposées par Miller-Ihli et al. [194] sont les suivantes :

- La méthode des moindres carrés sans pondération se base sur la minimisation de la somme quadratique de la déviation des mesures par rapport aux prédictions. Cette méthode comprend les ajustements linéaires, quadratiques ou la méthode du rapport. La méthode linéaire est adaptée pour les courbes présentant un aspect relativement linéaire sur toute la gamme de concentration tandis que la méthode quadratique utilise un polynôme du second degré et est plutôt adaptée en cas de courbure de la courbe d'absorbance en fonction de la concentration. Enfin la méthode du rapport consiste à modifier la forme des données sous une forme plus facilement ajustable. Cela consiste à tracer l'absorbance sur la concentration en fonction de l'absorbance. La fonction est alors de la forme  $\frac{A}{C} = a + b A + c A^2$  avec  $A$  l'absorbance,  $C$  la concentration et  $a$ ,  $b$  et  $c$  les coefficients du polynôme du second degré utilisés pour ajuster les données.

- L'interpolation des points. Cette méthode est particulièrement adaptée lorsque les points expérimentaux sont bien déterminés et que l'erreur sur ces valeurs est faible. On retrouve

différentes catégories, l'interpolation linéaire, par spline cubique ou par la méthode Stineman. L'ajustement linéaire consiste à relier les points de données entre eux par des segments. L'ajustement par spline cubique consiste à interpoler les points entre eux par des polynômes cubiques. L'objectif de cette méthode est d'avoir une formule d'interpolation qui est continue pour la première et la seconde dérivée, les deux dans l'intervalle et au niveau des points d'interpolation. Cela résulte en une courbe bien lissée. Enfin l'interpolation de Stineman est similaire à l'interpolation par spline cubique mais permet d'avoir un meilleur ajustement dans le cas où un changement abrupt de pente a lieu dans la courbe ajustée.

Sur les Figures 4.10 et 4.11 sont représentés différents ajustements et interpolations réalisés sur la courbe de la Figure 4.9. La Figure 4.10 montre 3 ajustements, linéaire, quadratique et cubique inversé avec une équation d'ajustement du type  $C = a A^3 + b A^2 + c A + d$ . Les résidus correspondent à la différence des valeurs d'absorbance entre le meilleur ajustement et les valeurs des données expérimentales. En fonction de la méthode d'ajustement on accède à une plus grande gamme de concentration.

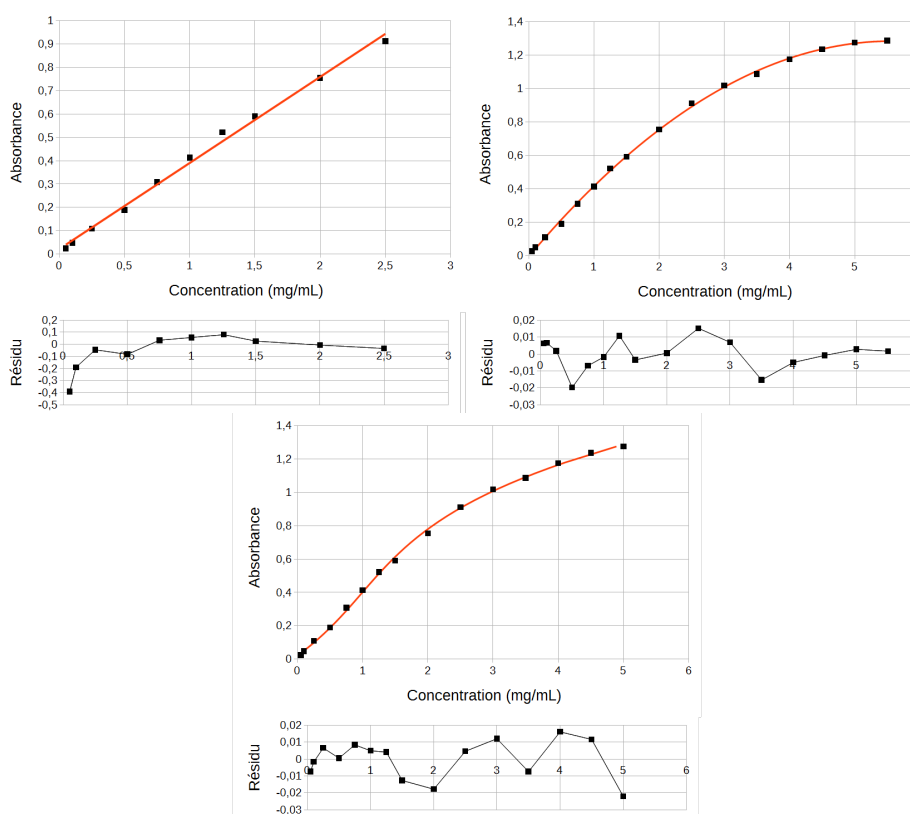


FIGURE 4.10 De gauche à droite et de haut en bas : ajustement linéaire, ajustement quadratique, ajustement cubique inversé.

Sur la Figure 4.11 sont représentés 2 méthodes d'interpolation, l'interpolation linéaire et par spline cubique. Aucune différence fondamentale n'est observée entre ces deux méthodes pour cette courbe de calibration.

En utilisant la méthode d'interpolation on peut accéder à une grande gamme de concentration, cependant l'erreur sur la valeur de concentration sera très élevée. Dans le cas du banc de

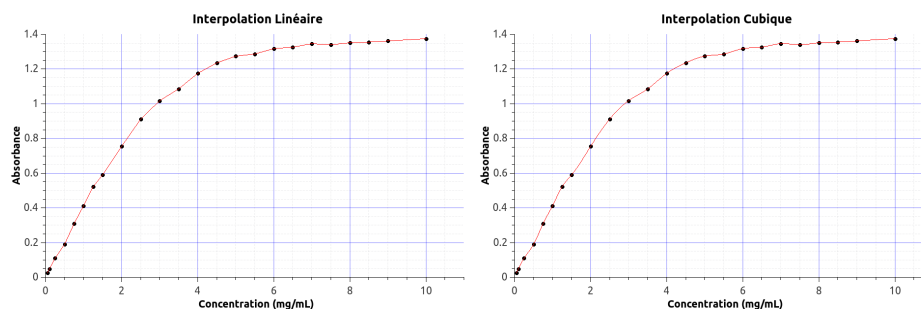


FIGURE 4.11 Interpolation linéaire et interpolation cubique.

crystallisation nous ne cherchons pas forcément à avoir une vraie valeur de concentration (une valeur précise de la concentration) lorsque l'absorbance est trop élevée mais avant tout à observer la diminution d'absorbance en fonction du temps lorsque des cristaux se forment. Ainsi une valeur d'absorbance apparente  $A_{app}$  nous renseigne sur l'évolution de la concentration en solution en fonction du temps. Une fois que la solution de protéine atteint une concentration suffisamment basse, la partie linéaire et la zone non linéaire permettent d'accéder aux valeurs de concentration de la protéine en utilisant une méthode d'ajustement ou d'interpolation.





# Conclusion et perspectives

## Conclusion microfluidique

Le sujet principal de ma thèse a porté sur le développement microfluidique et son application dans le contrôle de la cristallisation des protéines. La première étape a consisté en l'élaboration dudit système qui a été réalisé en collaboration avec nos collègues du laboratoire du futur à Bordeaux experts en microfluidique. Les étapes critiques de la microfabrication ont principalement concerné l'intégration de la membrane de dialyse, sa tenue et l'absence de fuite à l'interface membrane-résine. Cela nous a conduit à faire évoluer la méthode de microfabrication de sorte à prendre en sandwich la membrane de dialyse pour obtenir un système robuste. Finalement le prototype final de puce microfluidique dans laquelle aucune fuite au niveau de la membrane n'a été observé a été obtenue. Des tests en pression ont été effectués pour le vérifier et nous avons pu déterminer une gamme de pression à laquelle la puce peut opérer sans observer de fuites.

Le système microfluidique se rapprochant le plus de notre système est la puce développée par Heymann et al. [33]. Dans leur dispositif, basé sur la dialyse, de nombreuses conditions de cristallisation peuvent être parcourues en appliquant une approche parallèle grâce à un gradient de température et de concentration d'agent de cristallisation. Ainsi, à l'aide de la température un plan d'expérience peut être élaboré dans lequel la sursaturation est augmentée pour permettre la nucléation d'un cristal par goutte puis elle est réduite pour promouvoir la croissance du cristal en solution plutôt que la nucléation. De plus cette technique de fabrication permet d'introduire une membrane de dialyse ou une membrane en élastomère qui ne laisse passer que l'eau et les solutés apolaires.

Notre système permet la modification de la sursaturation de façon réversible par le biais du contrôle de la température et de la concentration d'agent de cristallisation, en appliquant une approche séquentielle. Grâce à l'échange entre le réservoir en flux continu contenant l'agent de cristallisation et la chambre contenant la protéine, l'espace des phases peut être échantillonné, ce qui en fait un dispositif original. Dans une optique de multiplication des expériences, il serait envisageable de combiner dans notre système l'approche séquentielle à l'approche parallèle et d'adapter la puce à 6 puits en intégrant au dispositif davantage de puits afin de bénéficier à la fois de l'avantage du flux continu et de la parallélisation des

expériences tout en contrôlant la sursaturation par changement de la solution de cristallisation ou de la température. La température est contrôlée ici à l'aide d'un système externe composé de modules Peltier et de plaques métalliques conduisant la chaleur. Nous avons pu, à l'aide de mesures de température et de simulations numériques simples utilisant la méthode des éléments finis, concevoir un modèle permettant d'évaluer la température de la puce en fonction de la tension d'alimentation des modules Peltier. Ce système pourrait être adapté pour le contrôle de la température d'une puce microfluidique comportant un plus grand nombre de puits.

Par la microdialyse, il a été possible de cristalliser plusieurs systèmes de protéines dans les puces et de déterminer un cadre précis quant à l'utilisation des puces (gamme de pressions, présence du flux continu ou non...). En effet chaque protéine modèle utilisé a présenté un intérêt différent concernant l'utilisation de la puce. Dans le cas du lysozyme de poids moléculaire 14,6 kDa une membrane de dialyse avec un seuil de rétention de 6-8 kDa a été utilisée avec l'agent de cristallisation composé de sels (NaCl et acétate de sodium). Dans le cas de l'IspE de poids moléculaire 31,8 kDa nous avons employé la membrane de dialyse avec un seuil de rétention de 12-14 kDa. L'utilisation de membrane dont le seuil de rétention est de 6-8 kDa aurait été possible, cependant l'agent de cristallisation est ici composé notamment de PEG de poids moléculaire relativement élevé pour cette membrane (8000 Da) et aurait difficilement traversé cette membrane de dialyse. De plus l'IspE cristallise en présence d'ATP ou ADP, nous avons donc dû ajouter ce composé avec l'agent de cristallisation. A travers ces deux exemples des différences d'écoulement dans les canaux entre les PEG, visqueux, et les sels ont pu être observées. Enfin dans le cas de l'insuline de petit poids moléculaire  $\sim 5,8$  kDa nous avons intégré des membranes de dialyse dont le seuil de rétention est de 3,5 kDa. Le cas de l'insuline a permis de montrer qu'il était possible de cristalliser une petite protéine par la microdialyse. De plus nous avons montré la compatibilité de la puce avec l'acétone présente dans la condition de cristallisation.

Les matériaux composant la puce microfluidique ont été choisis en fonction de leur propriétés vis-à-vis du rayonnement synchrotron. Dans notre cas, les matériaux choisis produisent peu de signal dans le faisceau de rayons X à 12 keV. De plus, la puce microfluidique que nous avons développée permet aussi de collecter *in situ* des données de diffraction sur des cristaux poussés à température ambiante, ce qui évite toute manipulation sur les cristaux. Cela est particulièrement avantageux dans le cas de cristaux fragiles par exemple. Nous avons pu obtenir à l'aide de la diffraction *in situ* des jeux de données complets sur trois systèmes de protéines modèles soit par collecte sur un cristal soit par collecte sur plusieurs cristaux isomorphes dont les jeux de données partiels ont été groupés.

Enfin d'un point de vue pragmatique, il est important de noter que la conception de ces puces microfluidiques est basée sur un processus clairement défini et automatisable. Les

composants de la puce sont des éléments peu onéreux qui permettent d'envisager la production en série d'un grand nombre de puces. Par exemple, à l'issue d'une journée en salle blanche il est possible de produire entre 30 et 40 puces, manuellement, si plusieurs tampons de PDMS ont été réalisés au préalable. La méthode a donc l'avantage d'être rapide et facilement réalisable dans un environnement de salle blanche, ou grise, comprenant un exposeur UV.

## Conclusion banc de cristallisation

Un autre aspect de ma thèse a consisté à poursuivre les développements du banc de cristallisation. L'électronique qui composait le banc de cristallisation a été modifiée de sorte à faciliter l'automatisation des différentes parties du banc. Cela a été réalisé grâce à l'implémentation d'un système de cartes d'automatisation. Dans un premier temps, le développement de la partie de visualisation a été effectué, dans le logiciel préexistant développé sous LabVIEW, par l'interfaçage d'une caméra reliée directement à un microscope optique inversé. Le but était de pouvoir évaluer rapidement la taille d'un cristal en solution en fonction du zoom (motorisé par la suite) adopté. D'autres options ont ensuite été ajoutées pour permettre à un utilisateur d'enregistrer des images à un intervalle de temps choisi et d'ajouter des informations concernant son expérience. Le zoom a été motorisé, à l'aide d'un moteur pas à pas, par l'intermédiaire d'une carte d'automatisation puis intégré au logiciel. Les limites de butées du zoom sont des capteurs à effet Hall déjà intégrés au microscope qui ont été câblés à une carte d'automatisation pour gérer les fins de course du moteur pas à pas. Les lumières du banc de cristallisation ont été interfacées de sorte à pouvoir modifier sur l'interface la luminosité à laquelle les images sont capturées. Dans le but d'obtenir un système de préparation automatique des solutions de cristallisation et d'avoir le réservoir de dialyse fonctionnant en flux continu, trois instruments ont été reprogrammés dans l'interface du logiciel. Un contrôleur de pression permettant de pousser les solutions présentes dans des tubes de 50 mL, un contrôleur d'interrupteurs liquides ("switches") et un contrôleur de débitmètres. Un algorithme simple a été implémenté pour permettre à l'utilisateur de choisir la concentration et le volume de la solution qu'il veut préparer à partir de trois tubes dont l'un contient de l'eau. La gestion de la température a été modifiée de sorte que le contrôle se fasse *via* une régulation PID par une programmation interne au logiciel. Ainsi la puissance délivrée à chaque module Peltier est gérée par une alimentation qui va adapter sa sortie en fonction des calculs réalisés dans le logiciel. Il est ainsi possible de modifier de façon simple et rapide les paramètres de la régulation PID directement sur l'interface du logiciel. Enfin la sonde permettant la récupération de la valeur de température a pu être modifiée grâce à cette régulation interne et l'utilisation des cartes d'automatisation, permettant d'avoir une mesure plus robuste même en présence de condensation au niveau de la sonde de température.

Une évolution majeure du banc de cristallisation a concerné l'intégration d'un système UV permettant la mesure de l'absorbance de la solution de protéine pendant une expérience de

crystallisation pour aboutir à sa concentration. Pour cela le bloc complet comprenant la cellule de dialyse, le support en laiton la soutenant ainsi que l'environnement englobant les modules Peltier et les échangeurs thermiques ont été modifiés. La mesure *via* UV d'absorbance est basée sur le rapport d'intensité entre deux faisceaux, l'un traversant la cellule de dialyse, où se trouve la protéine, et l'autre traversant le réservoir, où se trouve l'agent de cristallisation. Il a donc été nécessaire d'adapter tout le système existant. Par la même occasion la taille du dispositif a été augmentée de sorte à accueillir des modules Peltier plus gros et plus performants. Finalement un nouveau réservoir incluant des fenêtres en quartz a été réalisé, une cuvette en quartz a été fabriquée sur mesure pour s'intégrer au mieux dans la nouvelle cellule de dialyse qui possède une nouvelle géométrie facilitant la fermeture de la chambre de dialyse. Le support de la cellule de dialyse a été réalisé de sorte à laisser passer le faisceau UV et le bloc extérieur a été modifié pour ajuster la position des collimateurs de part et d'autre du bloc support. Ainsi il est possible de régler la position des collimateurs pour les aligner et ainsi maximiser le flux de photons. Les échangeurs thermiques ont eux aussi été modifiés pour y intégrer des raccords rapides à eau pour améliorer la compacité et la versatilité du système. Le spectromètre UV a été interfacé au logiciel pour évaluer l'intensité de lumière traversant l'échantillon et enregistrer les spectres d'intensité en fonction de la longueur d'onde. La mesure de la concentration par l'UV présente l'avantage d'être une méthode non destructive. Ainsi, il est donc envisageable d'échantillonner la courbe de solubilité d'une protéine en fonction de la concentration d'agent de cristallisation et de la température.

## Conclusion générale

En conclusion il a été possible de réaliser un système microfluidique permettant la cristallisation par la dialyse, l'agent de cristallisation pouvant être injecté en continu, et avec la possibilité de contrôler la température du système. Ce système est aussi transférable directement dans le rayonnement X pour collecter des données sur des cristaux formés *in situ* à température ambiante.

Le banc de cristallisation a été amélioré d'un point de vue de l'électronique, de la programmation et de la mécanique, il permet dorénavant d'envisager des mesures UV d'absorbance pour obtenir la concentration de protéine en solution au cours d'une expérience de cristallisation.

Finalement, ces deux systèmes basés sur la dialyse sont des instruments versatiles qui à terme devraient permettre de rationaliser la cristallisation en se basant sur la connaissance des diagrammes de phase et ainsi maîtriser la cristallisation de protéines et améliorer la qualité des cristaux.

## Perspectives

Les différents aspects discutés au cours de cette thèse permettent d'envisager de nouvelles perspectives concernant les développements instrumentaux et méthodologiques. Tout d'abord, d'un point de vue de la microfluidique, il serait possible, sans modifier le principe de micro-fabrication de diminuer davantage le bruit de fond généré par les matériaux composant la puce en réduisant encore plus l'épaisseur des matériaux utilisés à l'instar de Sui et al. [183] pour espérer améliorer l'intensité des spots de diffraction, en particulier dans le cas où de très petits cristaux seraient utilisés. Une autre amélioration de la puce concerne l'injection de la protéine. A l'avenir le remplissage des chambres de protéine par le biais d'un système microfluidique ou l'utilisation d'un robot de pipetage venant distribuer le volume désiré dans un puits devrait être envisagé.

Concernant le banc de cristallisation, plusieurs aspects restent à optimiser. Tout d'abord il serait nécessaire de posséder plusieurs cuves de quartz de différente largeur interne afin d'échantillonner une plus grande partie de la courbe de solubilité. Lors de ma thèse, la production d'une cellule de chemin optique inférieur à 4 mm n'était pas réalisable, le projet était nouveau pour nous et pour le fabricant qui a conçu les cuves utilisées. Cependant, fort de la réussite de la conception d'une si petite cuve, il serait envisageable de réduire à nouveau les dimensions. Dans un objectif de développement de plateforme dédié aux utilisateurs, l'utilisation du banc de cristallisation à distance *via* internet serait implémentable. Il existe sous LabVIEW des moyens de le réaliser et cela permettrait par exemple à un utilisateur de suivre la cristallisation depuis l'extérieur et éventuellement d'agir sur la température, les solutions, le zoom, la luminosité, la cadence d'enregistrement des images etc, dans le cas où le plan d'expérience aurait besoin d'être modifiée en cas d'absence physique du laboratoire.

Qu'il s'agisse du système microfluidique ou du banc de cristallisation, il serait important de pouvoir simuler les transferts de masse combinés au transfert de chaleur dans ces deux systèmes. Cela permettrait une maîtrise complète de ces dispositifs et une prédiction des cinétiques d'équilibre en concentration dans la puce et le banc. C'est un aspect important pour l'établissement d'un plan d'expérience et pour la compréhension du fonctionnement de ces instruments.

D'un point de vu général, les méthodes développées à travers ces instruments présentent de nombreux avantages. Comme expliqué dans ce manuscrit, la dialyse permet un contrôle de la sursaturation de manière réversible. La maîtrise de la sursaturation permet la production des gros cristaux mais aussi d'un grand nombre de petits cristaux. A titre illustratif sur la Figure 4.12 on peut voir des cristaux de lysozyme formés dans la puce microfluidique ayant été dissouts par diminution de la concentration en NaCl suivi par une réaugmentation rapide de la concentration provoquant la formation en solution d'un grand nombre de petits cristaux.

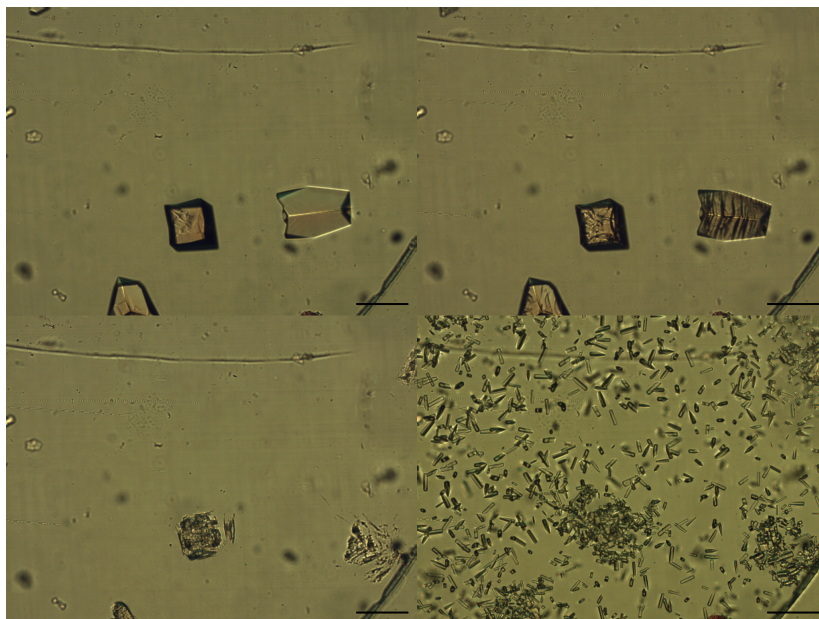


FIGURE 4.12 Images à lire de gauche à droite et de haut en bas. Dissolution de cristaux de lysozyme suivi par une recristallisation rapide pour former un grand nombre de petits cristaux en puce microfluidique. Echelle 100  $\mu\text{m}$ .

Ce type d'expérience pourrait être adaptable pour la production de cristaux pour le X-FEL dans le banc de cristallisation par exemple.

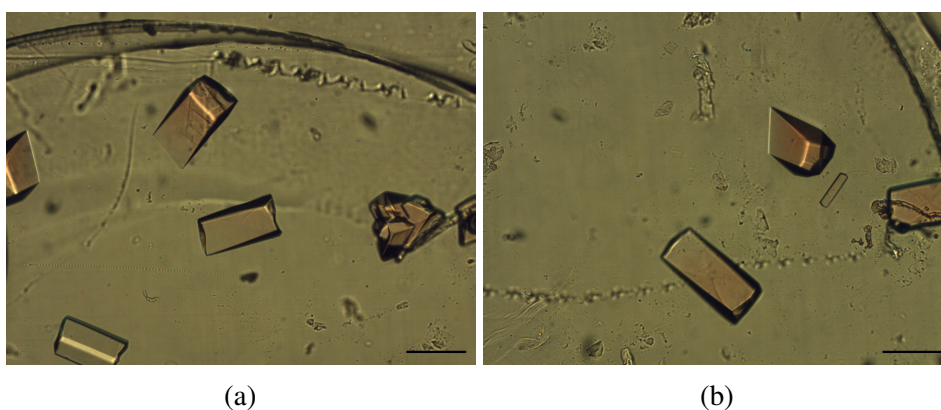


FIGURE 4.13 Cristaux de lysozyme formés dans la puce ayant été colorés à l'aide d'un colorant rouge. Echelle 100  $\mu\text{m}$ .

Une autre application importante de la dialyse concerne la distribution de petites molécules comme des ligands par exemple qui pourraient être dispensés dans le canal microfluidique une fois les cristaux formés. A titre illustratif on peut voir sur la Figure 4.13 des cristaux de lysozyme qui ont été formés dans la puce microfluidique et où un colorant rouge a été dispensé pour colorer les cristaux. La cristallisation de complexes protéine-ligand peut permettre d'étudier les fonctions des protéines et les mécanismes dans lesquels elles sont impliquées. La conception de médicament est aussi un enjeu majeur pour trouver les molécules permettant d'inhiber les protéines impliquées dans des processus pathologiques.



# Bibliographie

- [1] Norman Arnheim, Masayori Inouye, Linda Law, and Anthony Laudin. Chemical studies on the enzymatic specificity of goose egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(1) :233–236, 1973.
- [2] Alexander Fleming. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of The Royal Society B*, 93(653) :306–317, 1922.
- [3] C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma. Structure of hen egg-white lysozyme : A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature*, 206 :757–761, 1965.
- [4] Claude Sauter, Fermín Otálora, Jose Antonio Gavira, Olga Vidal, Richard Giegé, and Juan Manuel García-Ruiz. Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. *Acta Crystallographica*, D57 : 1119–1126, 2001.
- [5] Gisela Wilcox. Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews*, 26(2) : 19–39, 2005.
- [6] Edward N. Baker, Thomas L. Blundell, John F. Cutfield, Susan M. Cutfield, Eleanor J. Dodson, Guy G. Dodson, Dorothy M. Crowfoot Hodgkin, Roderick E. Hubbard, Neil W. Isaacs, Colin D. Reynolds, Kiwako Sakabe, Norio Sakabe, and Numminate M. Vijayan. The structure of 2zn pig insulin crystals at 1.5 a resolution. *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 319(1195) :369–456, 1988.
- [7] Roland Boistelle and Jean-Pierre Astier. Crystallization mechanisms in solution. *Journal of Crystal Growth*, 90(1-3) :14–30, 1988.
- [8] Monika Budayova. Cristallisation et caractérisation de protéines en solution : Diagrammes de phases, cinétiques de croissance et associations moléculaires. 1998.
- [9] S. D. Durbin and G. Feher. Protein crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47 :171–204, 1996.
- [10] Sylvaine Lafont, Stéphane Veesler, Jean Pierre Astier, and Roland Boistelle. Comparison of solubilities and molecular interactions of bpti molecules giving different polymorphs. *Journal of Crystal Growth*, 173(1-2) :132–140, 1997.
- [11] Roland Boistelle, Jean Pierre Astier, Guy Marchis-Mouren, Véronique Desseaux, and Richard Haser. Solubility, phase transition, kinetic ripening and growth rates of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzymes. *Journal of Crystal Growth*, 123(1-2) :109–120, 1992.
- [12] Monika Budayova, Jean-Pierre Astier, Stéphane Veesler, Mirjam Czjzek, Anne Belaich, and Roland Boistelle. Characterization and crystallization of the endoglucanase a from clostridium cellulolyticum in solution. *Journal of Crystal Growth*, 196(2-4) :297–304, 1999.

- 
- [13] Monika Budayova-Spano, François Dauvergne, Michel Audiffren, Thirou Bactivelane, and Stephen Cusack. A methodology and an instrument for the temperature-controlled optimization of crystal growth. *Acta Crystallographica*, D63 :339–347, 2007.
- [14] Juan Ma García-Ruiz. Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods in Enzymology*, 368 :130–154, 2003.
- [15] Alexander McPherson and Jose Antonio Gavira. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section*, F70 :2–20, 2014.
- [16] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26) : 16531–16536, 2002.
- [17] Patrick Tabeling. *Introduction to Microfluidics*. Oxford University Press, 2005.
- [18] Michel Rieutord. *Une introduction à la dynamique des fluides*. Masson, 1997.
- [19] Todd M. Squires and Stephen R. Quake. Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3), 2005.
- [20] Jacques Leng and Jean-Baptiste Salmon. Microfluidic crystallization. *Lab on a Chip*, 9(1) :24–34, 2009.
- [21] Liang Li and Rustem F. Ismagilov. Protein crystallization using microfluidic technologies based on valves, droplets, and slipchip. *Annual Review of Biophysics*, 39 : 139–158, 2010.
- [22] Bo Zheng, L. Spencer Roach, and Rustem F. Ismagilov. Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37) :11170–11171, 2003.
- [23] Delai L. Chen, Cory J. Gerdts, and Rustem F. Ismagilov. Using microfluidics to observe the effect of mixing on nucleation of protein crystals. *Journal of the American Chemical Society*, 127(27) :9672–9673, 2005.
- [24] Manuel Ildefonso, Eve Revalor, P. Punniam, Jean-Baptiste Salmon, Nadine Candoni, and Stéphane Veessler. Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool. *Journal of Crystal Growth*, 342(1) :9–12, 2012.
- [25] Shuheng Zhang, Natalie Ferté, Nadine Candoni, and Stéphane Veessler. Versatile microfluidic approach to crystallization. *Organic Process Research and Development*, 19(12) :1837–1841, 2015.
- [26] Sathish V. Akella, Aaron Mowitz, Michael Heymann, and Seth Fraden. Emulsion-based technique to measure protein crystal nucleation rates of lysozyme. *Crystal Growth and Design*, 14(9) :4487–4509, 2014.
- [27] Michael Heymann, Achini Opathalage, Jennifer L. Wierman, Sathish Akella, Doletha M. E. Szebenyi, Sol M. Gruner, and Seth Fraden. Room-temperature serial crystallography using a kinetically optimized microfluidic device for protein crystallization and on-chip x-ray diffraction. *IUCrJ*, 1 :349–360, 2014.
- [28] Wenbin Du, Liang Li, Kevin P. Nichols, and Rustem F. Ismagilov. Slipchip. *Lab on a Chip*, 9(16) :2286–2292, 2009.

- [29] Kaouthar Dhouib, Chantal Khan Malek, Wilhelm Pflöging, Bernard Gauthier-Manuel, Roland Duffait, Gaël Thuillier, Rosaria Ferrigno, Lilian Jacquamet, Jeremy Ohana, Jean-Luc Ferrer, Anne Théobald-Dietrich, Richard Giegé, Bernard Lorbera, and Claude Sauter. Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal x-ray analysis. *Lab on a Chip*, 9 :1412–1421, 2009.
- [30] Franziska Pinker, Mathieu Brun, Pierre Morin, Anne-Laure Deman, Jean-François Chateaux, Vincent Oliéric, Christian Stirnimann, Bernard Lorber, Nicolas Terrier, Rosaria Ferrigno, and Claude Sauter. Chipx : A novel microfluidic chip for counter-diffusion crystallization of biomolecules and in situ crystal analysis at room temperature. *Crystal Growth and Design*, 13(8) :3333–3340, 2013.
- [31] Carl L. Hansen, Scott Classen, James M. Berger, and Stephen R. Quake. A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination. *Journal of the American Chemical Society*, 128(10) :3142–3143, 2006.
- [32] Bo Zheng, Joshua D. Tice, L. Spencer Roach, and Rustem F. Ismagilov. A droplet-based, composite pdms/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip x-ray diffraction. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(19) :2508–2511, 2004.
- [33] Michael Heymann, Achini Opathalage, Markus Ludwig, and Seth Fraden. Microfluidic devices to map protein phase diagrams and nucleation kinetics for in situ x-ray diffraction of protein crystals. *17th International Conference On Miniaturized Systems For Chemistry and Life Sciences, Microtas*, 2 :1135–1137, 2013.
- [34] Jung uk Shim, Galder Cristobal, Darren R. Link, Todd Thorsen, and Seth Fraden. Using microfluidics to decouple nucleation and growth of protein crystals. *Crystal Growth and Design*, 7(11) :2192–2194, 2007.
- [35] D. Kashchiev, D. Verdoes, and G. M. van Rosmalen. Induction time and metastability limit in new phase formation. *Journal of Crystal Growth*, 110(3) :373–380, 1991.
- [36] Emilian Koller. *Aide-mémoire - Génie chimique*. Dunod, L'Usine Nouvelle, 3e édition édition, 2010.
- [37] Jerome S. Schultz and Philipp Gerhardt. Dialysis culture of microorganisms : design, theory, and results. *Bacteriological Reviews*, 33(1) :1–47, 1969.
- [38] Philipp Gerhardt and D. M. Gallup. Dialysis flask for concentrated culture of microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 86(5) :919–929, 1963.
- [39] J. D. Herold, Jerome S. Schultz, and Philipp Gerhardt. Differential dialysis culture for separation and concentration of a macromolecular product. *Applied Microbiology*, 15 (5) :1192–1197, 1967.
- [40] Monika Budayova-Spano. Patent FR10/57354, UJF, (extension : EP117730945, US13821053, JP2013528746), 2010.
- [41] Bahige G. Abdallah, Christopher Kupitz, Petra Fromme, and Alexandra Ros. Crystallization of the large membrane protein complex photosystem i in a microfluidic channel. *ACS Nano*, 7(12) :10534–10543, 2007.
- [42] Sameer Talreja, Sarah L. Perry, Sudipto Guha, Venkateswarlu Bhamidi, Charles F. Zukoski, and Paul J. A. Kenis. Determination of the phase diagram for soluble and membrane proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114 :4432–4441, 2010.

- [43] Arne Meyer, Karsten Dierks, Dierk Hilterhaus, Thomas Klupsch, Peter Mühlig, Jens Kleesiek, Robert Schöpflin, Howard Einspahr, Rolf Hilgenfeldg, and Christian Betzel. Single-drop optimization of protein crystallization. *Acta Crystallographica*, F68(8) : 994–998, 2012.
- [44] Neer Asherie. Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34 :266–272, 2004.
- [45] Yingxin Liu, Xiujuan Wang, and Chi Bun Ching. Toward further understanding of lysozyme crystallization : Phase diagram, protein-protein interaction, nucleation kinetics, and growth kinetics. *Crystal Growth and Design*, 10(2) :548–558, 2010.
- [46] Franz-Xaver Schmid. Biological macromolecules : Uv-visible spectrophotometry. *eLS.*, 2001.
- [47] Lyn Watson and Kannappan Veeraragavan. Dilution-free protein concentration measurement for high protein concentration samples. *BioPharm International*, 27(2), 2014.
- [48] Scott Huffman, Keyur Soni, and Joe Ferraiolo. Uv-vis based determination of protein concentration : Validating and implementing slope measurements using variable pathlength technology. *BioProcess International*, 2014.
- [49] Jorrit de Jong, Rob G. H. Lammertink, and Matthias Wessling. Membranes and microfluidics : a review. *Lab on a Chip*, 6 :1125–1139, 2006.
- [50] Micha Kornreich, Michael Heymann, Seth Fraden, and Roy Beck. Cross polarization compatible dialysis chip. *Lab on a Chip*, 14 :3700–3704, 2014.
- [51] Kåre Hartvig Jensen, Jinkee Lee, Tomas Bohr, and Henrik Bruus. Osmotically driven flows in microchannels separated by a semipermeable membrane. *Lab on a Chip*, 9 : 2093–2099, 2009.
- [52] Yun Jiang, Pen-Cheng Wang, Laurie E. Locascio, and Cheng S. Lee. Integrated plastic microfluidic devices with esi-ms for drug screening and residue analysis. *Analytical Chemistry*, 73(9) :2048–2053, 2001.
- [53] Aissa Ould-Dris, Patrick Paullier, Laurent Griscom, Cécile Legallais, and Eric Leclerc. Analysis of the mass transfers in an artificial kidney microchip. *Journal of Membrane Science*, 353(1-2) :116–125, 2010.
- [54] Fan Xiang, Yuehe Lin, Jenny Wen, Dean W. Matson, and Richard D. Smith. An integrated microfabricated device for dual microdialysis and on-line esi-ion trap mass spectrometry for analysis of complex biological samples. *Analytical Chemistry*, 71(8) : 1485–1490, 1999.
- [55] Naxing Xu, Yuehe Lin, Steven A. Hofstadler, Dean Matson, Charles J. Call, and Richard D. Smith. A microfabricated dialysis device for sample cleanup in electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 70(17) :3553–3556, 1998.
- [56] Robert D. Greenlee and Cornelius F. Ivory. Protein focusing in a conductivity gradient. *Biotechnology Progress*, 14(2) :300–309, 1998.
- [57] Chijung Kim, Choonghan Ryu, Byung Woo Kim, Sang Jun Sim, and Heeyeop Chae. Microfluidic dialysis device fabrication for protein solution enrichment and its enrichment enhancement by plasma surface treatment of a membrane. *Journal of the Korean Physical Society*, 51(3) :993–999, 2007.

- [58] Ryoji Kurita, Norikuni Yabumoto, and Osamu Niwa. Miniaturized one-chip electrochemical sensing device integrated with a dialysis membrane and double thin-layer flow channels for measuring blood samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8) : 1649–1653, 2006.
- [59] Junjie Ou, Tomasz Glawdel, Razim Samy, Shuwen Wang, Zhen Liu, Carolyn L. Ren, and Janusz Pawliszyn. Integration of dialysis membranes into a poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip for isoelectric focusing of proteins using whole-channel imaging detection. *Analytical Chemistry*, 80(19) :7401–7407, 2008.
- [60] David J. Guckenberger, Theodorus E. de Groot, Alwin M. D. Wan, David J. Beebe, and Edmond W. K. Young. Micromilling : a method for ultra-rapid prototyping of plastic microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 15 :2364–2378, 2015.
- [61] Gerardo Perozziello, Patrizio Candeloro, Francesco Gentile, Maria Laura Coluccio, Marco Talerico, Antonio De Grazia, Annalisa Nicastrì, Angela Mena Perri, Elvira Parrotta, Francesca Pardeo, Rossella Catalano, Giovanni Cuda, and Enzo Di Fabrizio. A microfluidic dialysis device for complex biological mixture sers analysis. *Microelectronic Engineering*, 144 :37–41, 2015.
- [62] Jack T. Rundel, Brian Paul, and Vincent T. Remcho. Organic solvent nanofiltration for microfluidic purification of poly (amidoamine) dendrimers. *Journal of Chromatography A*, 1162(2) :167–174, 2007.
- [63] Vincent Miralles, Axel Huerre, Florent Malloggi, and Marie-Caroline Jullien. A review of heating and temperature control in microfluidic systems : Techniques and applications. *Diagnostics*, 3(1) :33–67, 2013.
- [64] Sébastien Teychené and Béatrice Biscans. Microfluidic device for the crystallization of organic molecules in organic solvents. *Crystal Growth and Design*, 11(11) :4810–4818, 2011.
- [65] Philippe Laval, Nicolas Lisai, Jean-Baptiste Salmon, and Mathieu Joanicot. A microfluidic device based on droplet storage for screening solubility diagrams. *Lab on a Chip*, 7 :829–834, 2007.
- [66] George Maltezos, Alvaro Gomez, Jiang Zhong, Franck A. Gomez, and Axel Scherer. Microfluidic polymerase chain reaction. *Applied Physics Letters*, 93 :243901, 2008.
- [67] Julia Khandurina, Timothy E. McKnight, Stephen C. Jacobson, Larry C. Waters, Robert S. Foote, and J. Michael Ramsey. Integrated system for rapid pcr-based dna analysis in microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 72(13) :2995–3000, 2000.
- [68] Jianing Yang, Yingjie Liu, Cory B. Rauch, Randall L. Stevens, Robin H. Liu, Ralf Lenigk, and Piotr Grodzinski. High sensitivity pcr assay in plastic micro reactors. *Lab on a Chip*, 2 :179–187, 2002.
- [69] Guilhem Velve Casquillas, Chuanhai Fu, Mael Le Berre, Jeremy Cramer, Sebastien Meance, Adrien Plecis, Damien Baigl, Jean-Jacques Greffet, Yong Chen, Matthieu Piela, and Phong T. Tran. Fast microfluidic temperature control for high resolution live cell imaging. *Lab on a Chip*, 11 :484–489, 2011.
- [70] Guilhem Velve-Casquillas, Judite Costa, Frédérique Carlier-Grynokorn, Adeline Mayeux, and Phong T. Tran. A fast microfluidic temperature control device for studying microtubule dynamics in fission yeast. *Methods in Cell Biology*, 97 :185–201, 2010.

- [71] Hanbin Mao, Tinglu Yang, and Paul S. Cremer. A microfluidic device with a linear temperature gradient for parallel and combinatorial measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 124(16) :4432–4435, 2002.
- [72] George Maltezos, Matthew Johnston, and Axel Scherer. Thermal management in microfluidics using micro-peltier junctions. *Applied Physics Letters*, 87 :154105, 2005.
- [73] Jung-Hao Wang, Liang-Ju Chien, Tsung-Min Hsieh, Ching-Hsing Luo, Wen-Pin Chou, Ping-Hei Chen, Pei-Jer Chen, Da-Sheng Lee, and Gwo-Bin Lee. A miniaturized quantitative polymerase chain reaction system for dna amplification and detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 141(1) :329–337, 2009.
- [74] Zhenjun Jiao, Xiaoyang Huang, Nam-Trung Nguyen, and Patrick Abgrall. Thermocapillary actuation of droplet in a planar microchannel. *Microfluidics and Nanofluidics*, 5 (2) :205–214, 2008.
- [75] Zhenjun Jiao, Xiaoyang Huang, and Nam-Trung Nguyen. Manipulation of a droplet in a planar channel by periodic thermocapillary actuation. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(4) :045027.1–045027.9, 2008.
- [76] Bertrand Selva, Isabelle Cantat, and Marie-Caroline Jullien. Temperature-induced migration of a bubble in a soft microcavity. *Physics of Fluids*, 23 :052002, 2011.
- [77] Bertrand Selva, Julien Marchalot, and Marie-Caroline Jullien. An optimized resistor pattern for temperature gradient control in microfluidics. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19(6) :065002, 2009.
- [78] Bertrand Selva, Julien Marchalot, and Marie-Caroline Jullien. Thermocapillary actuation by optimized resistor pattern : bubbles and droplets displacing, switching and trapping. *Lab on a Chip*, 10 :1835–1840, 2010.
- [79] Andrew J. de Mello, Matthew Habgood, N. Llewellyn Lancaster, Tom Welton, and Robert C. R. Wootton. Precise temperature control in microfluidic devices using joule heating of ionic liquids. *Lab on a Chip*, 4 :417–419, 2004.
- [80] Efe Mavraki, Despina Moschou, George Kokkoris, Nikolaos Vourdas, Stavros Chatzandroulis, and Angeliki Tserepi. A continuous flow  $\mu$ pcr device with integrated microheaters on a flexible polyimide substrate. *Procedia Engineering*, 25 :1245–1248, 2011.
- [81] Daniele Vigolo, Roberto Rusconi, Roberto Piazza, and Howard A. Stone. A portable device for temperature control along microchannels. *Lab on a Chip*, 10 :795–798, 2010.
- [82] Alex I.K. Lao, Thomas M.H. Lee, I-Ming Hsing, and Nancy Y. Ip. Precise temperature control of microfluidic chamber for gas and liquid phase reactions. *Sensors and Actuators A : Physical*, 84(1-2) :11–17, 2000.
- [83] Bertrand Selva, Pascaline Mary, and Marie-Caroline Jullien. Integration of a uniform and rapid heating source into microfluidic systems. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8 (6) :755–765, 2010.
- [84] David Ross, Michael Gaitan, and Laurie E. Locascio. Temperature measurement in microfluidic systems using a temperature-dependent fluorescent dye. *Analytical Chemistry*, 73(17) :4117–4123, 2001.



- [85] Rosanne M. Guijt, Arash Dodge, Gijs W. K. van Dedem, Nico F. de Rooij, and Elisabeth Verpoorte. Chemical and physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 3 :1–4, 2003.
- [86] Rosanne M. Guijt, Arash Dodge, Gijs W. K. van Dedem, Nico F. de Rooij, and Elisabeth Verpoorte. Evaporative cooling in microfluidic channels. *Applied Physics Letters*, 89 : 074107, 2006.
- [87] Robert P. Oda, Michael A. Strausbauch, Andreas F. R. Huhmer, N. Borson, S. R. Jurrens, J. Craighead, Peter J. Wettstein, Bruce Eckloff, B. Kline, and James P. Landers. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of dna. *Analytical Chemistry*, 70(20) :4361–4368, 1998.
- [88] Jerome P. Ferrance, Qirong Wu, Braden Giordano, Casandra Hernandez, Yien Kwok, Karen Snow, Steve Thibodeau, and James P. Landers. Developments toward a complete micro-total analysis system for duchenne muscular dystrophy diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, 500(1-2) :223–236, 2003.
- [89] Braden C. Giordano, Jerome Ferrance, Sally Swedberg, Andreas F.R. Hühmer, and James P. Landers. Polymerase chain reaction in polymeric microchips : Dna amplification in less than 240 seconds. *Analytical Biochemistry*, 291(1) :124–132, 2001.
- [90] Cathy Ke, Helen Berney, Alan Mathewson, and Michelle M. Sheehan. Rapid amplification for the detection of mycobacterium tuberculosis using a non-contact heating method in a silicon microreactor based thermal cycler. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 102(2) :308–314, 2004.
- [91] Hemanth Jagannathan, Goksen G. Yaralioglu, Arif S. Ergun, and Butrus T. Khuri-Yakub. Acoustic heating and thermometry in microfluidic channels. *Micro Electro Mechanical Systems, 2003. MEMS-03 Kyoto. IEEE The Sixteenth Annual International Conference on*, pages 474–477, 2003.
- [92] Jun Kondoh, Norifumi Shimizu, Yoshikazu Matsui, Mitsunori Sugimoto, and Showko Shiokawa. Development of temperature-control system for liquid droplet using surface acoustic wave devices. *Sensors and Actuators A : Physical*, 149(2) :292–297, 2009.
- [93] Goksen Yaralioglu. Ultrasonic heating and temperature measurement in microfluidic channels. *Sensors and Actuators A : Physical*, 170(1-2) :1–7, 2011.
- [94] Yu V. Bykov, Kirill Rybakov, and Vladimir E. Semenov. High-temperature microwave processing of materials. *Journal of Physics D Applied Physics*, 34(13) :R55–R75, 2001.
- [95] Jayna J. Shah, Jon C. Geist, and Michael Gaitan. Microwave-induced adjustable nonlinear temperature gradients in microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20 :105025, 2010.
- [96] A. Kempitiya, Diana A. Borca-Tasciuc, Hisham S. Mohamed, and Mona M. Hella. Localized microwave heating in microwells for parallel dna amplification applications. *Applied Physics Letters*, 94 :064106, 2009.
- [97] Kirsty J. Shaw, Peter T. Docker, John V. Yelland, Charlotte E. Dyer, John Greenman, Gillian M. Greenway, and Stephen J. Haswell. Rapid pcr amplification using a microfluidic device with integrated microwave heating and air impingement cooling. *Lab on a Chip*, 10 :1725–1728, 2010.



- [98] Kristina Orrling, Peter Nilsson, Mats Gullberg, and Mats Larhed. An efficient method to perform milliliter-scale pcr utilizing highly controlled microwave thermocycling. *Chemical Communications*, (7) :790–791, 2004.
- [99] Jayna J. Shah, Siddarth G. Sundaresan, Jon Geist, Darwin R. Reyes, James C. Booth, Mulpuri V. Rao, and Michael Gaitan. Microwave dielectric heating of fluids in an integrated microfluidic device. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 17 (11) :2224, 2007.
- [100] Jon C. Geist, Jayna J. Shah, Mulpuri V. Rao, and Michael Gaitan. Microwave power absorption in low-reflectance, complex, lossy transmission lines. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 112(4) :177–189, 2007.
- [101] Adam C. Siegel, Sergey S. Shevkopyas, Douglas B. Weibel, Derek A. Bruzewicz, Andres W. Martinez, and George M. Whitesides. Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Angewandte Chemie Communication*, 45(41) :6877–6882, 2006.
- [102] C. Oliver Kappe and Doris Dallinger. The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 :51–63, 2006.
- [103] Christian Fermér, Peter Nilsson, and Mats Larhed. Microwave-assisted high-speed pcr. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(2) :129–132, 2003.
- [104] David Issadore, Katherine J. Humphry, Keith A. Brown, Lori Sandberg, David A. Weitz, and Robert M. Westervelt. Microwave dielectric heating of drops in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 9 :1701–1706, 2009.
- [105] Jinbo Wu, Wenbin Cao, Weijia Wen, Donald Choy Chang, and Ping Sheng. Polydimethylsiloxane microfluidic chip with integrated microheater and thermal sensor. *Biomicrofluidics*, 3(1) :012005, 2009.
- [106] Matthieu Robert de Saint Vincent, Régis Wunenburger, and Jean-Pierre Delville. Laser switching and sorting for high speed digital microfluidics. *Applied Physics Letters*, 92 :154105, 2009.
- [107] Hanyoup Kim, Siarhei Vishniakou, and Gregory W. Faris. Petri dish pcr : laser-heated reactions in nanoliter droplet arrays. *Lab on a Chip*, 9 :1230–1235, 2009.
- [108] Aaron T. Ohta, Arash Jamshidi, Justin K. Valley, Hsan-Yin Hsu, and Ming C. Wu. Optically actuated thermocapillary movement of gas bubbles on an absorbing substrate. *Applied Physics Letters*, 91 :074103, 2007.
- [109] Ray Barrett, Marc Faucon, John Lopez, Galder Cristobal, Fanny Destremaut, Arash Dodge, Pierre Guillot, Philippe Laval, Chloé Masselon, and Jean-Baptiste Salmon. X-ray microfocussing combined with microfluidics for on-chip x-ray scattering measurements. *Lab on a Chip*, 6 :494–499, 2006.
- [110] Rossella Catalano, Gerardo Perozziello, Giuseppina Simone, Patrizio Candeloro, Francesco Gentile, Maria Laura Coluccio, Francesca Pardeo, Manfred Burghammer, Giovanni Cuda, Christian Riekkel, and Enzo Di Fabrizio. Optimized fabrication protocols of microfluidic devices for x-ray analysis. *Microelectronic Engineering*, 124 :13–16, 2014.
- [111] Britta Weinhausen and Sarah Köster. Microfluidic devices for x-ray studies on hydrated cells. *Lab on a Chip*, 13 :212–215, 2013.

- [112] Sarah L. Perry, Sudipto Guha, Ashtamurthy S. Pawate, Amrit Bhaskarla, Vinayak Agarwal, Satish K. Nair, and Paul J. A. Kenis. A microfluidic approach for protein structure determination at room temperature via on-chip anomalous diffraction. *Lab on a Chip*, 13 :3183–3187, 2013.
- [113] Sudipto Guha, Sarah L. Perry, Ashtamurthy S. Pawate, and Paul J.A. Kenis. Fabrication of x-ray compatible microfluidic platforms for protein crystallization. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 174 :1–9, 2012.
- [114] Martha Elisabeth Brennich, Jens-Friedrich Nolting, Christian Dammann, Bernd Nöding, Susanne Bauch, Harald Herrmann, Thomas Pfohl, and Sarah Köster. Dynamics of intermediate filament assembly followed in micro-flow by small angle x-ray scattering. *Lab on a Chip*, 11 :708–716, 2011.
- [115] Gera Kisselman, Wei Qiu, Vladimir Romanov, Christine M. Thompson, Robert Lam, Kevin P. Battaile, Emil F. Pai, and Nickolay Y. Chirgadze. X-chip : an integrated platform for high-throughput protein crystallization and on-the-chip x-ray diffraction data collection. *Acta Crystallographica Section D*, 67(6) :533–539, 2011.
- [116] William H. Grover, Marcio G. von Muhlen, and Scott R. Manalis. Teflon films for chemically-inert microfluidic valves and pumps. *Lab on a Chip*, 8(6) :913–918, 2008.
- [117] Todd Thorsen, Sebastian J. Maerkl, and Stephen R. Quake. Microfluidic large-scale integration. *Science*, 298(5593) :580–584, 2002.
- [118] Marc A. Unger, Hou-Pu Chou, Todd Thorsen, Axel Scherer, and Stephen R. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288(5463) :113–116, 2000.
- [119] Bobak Mosadegh, Hossein Tavana, Sasha Cai Lesher-Perez, and Shuichi Takayama. High-density fabrication of normally closed microfluidic valves by patterned deactivation of oxidized polydimethylsiloxane. *Lab on a Chip*, 11(4) :738–742, 2011.
- [120] William H. Grover, Alison M. Skelley, Chung N. Liu, Eric T. Lagally, and Richard A. Mathies. Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 89 (3) :315–323, 2003.
- [121] Hoyin Lai and Albert Folch. Design and dynamic characterization of “single-stroke” peristaltic pdms micropumps. *Lab on a Chip*, 11(2) :336–342, 2011.
- [122] James Friend and Leslie Yeo. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. *Biomicrofluidics*, 4(2) :026502, 2010.
- [123] Santeri Tuomikoski and Sami Franssila. Design and dynamic characterization of “single-stroke” peristaltic pdms micropumps. *Sensors and Actuators A*, 120(2) :408–415, 2005.
- [124] Jasbir N. Patel, Bozena Kaminska, Bonnie L. Gray, and Byron D. Gates. Pdms as a sacrificial substrate for su-8-based biomedical and microfluidic applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18(9) :95028–11, 2008.
- [125] Denis Bartolo, Guillaume Degré, Philippe Nghe, and Vincent Studer. Microfluidic stickers. *Lab on a Chip*, 8(2) :274–279, 2008.
- [126] Janez Megusar. Low temperature fast-neutron and gamma irradiation of kapton polyimide films. *Journal of Nuclear Materials*, 245(2-3) :185–190, 1997.

- [127] Mathieu Morel, Jean-Christophe Galas, Maxime Dahan, and Vincent Studer. Concentration landscape generators for shear free dynamic chemical stimulation. *Lab on a Chip*, 12(7) :1340–1346, 2012.
- [128] Alessandro Tarantino, E. Romero, and Y.J. Cui. *Advanced Experimental Unsaturated Soil Mechanics*. CRC Press, Technology & Engineering, 2005.
- [129] Marie-Christine Durrieu, Damien Quemener, Charles Vincent Baquey, and Valérie Sabaut-Heroguez. Biomateriaux bioactifs pour le relargage controle de principes actifs. WO 2006008386 A1 ; DE602005022862D1, EP1758621A1, EP1758621B1, US20080004398, 2006.
- [130] Mekki Abdelmouleh, Sami Boufi, Abdelhamid ben Salah, Mohamed Naceur Belgacem, and Alessandro Gandini. Interaction of silane coupling agents with cellulose. *Langmuir*, 18 :3203–3208, 2002.
- [131] Xiaopeng Xiong, Lina Zhang, and Yifeng Wang. Polymer fractionation using chromatographic column packed with novel regenerated cellulose beads modified with silane. *Journal of Chromatography A*, 1063(1-2) :71–77, 2005.
- [132] Julie Credou, Hervé Volland, and Thomas Berthelot. Photolinker-free photoimmobilization of antibodies onto cellulose for the preparation of immunoassay membranes. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(6) :1079–1088, 2015.
- [133] Monika Spano, Niels Junius, and Jean-Baptiste Salmon. Puce microfluidique pour la cristallisation de molécules, procédé de préparation, dispositif la comprenant et procédé de cristallisation de molécules. Patent FR 1561715, UJF, 2015.
- [134] Hugh D. Young. *University Physics*. Addison Wesley, 7th ed. edition, 1992.
- [135] Zhaoxia Luo. A simple method to estimate the physical characteristics of a thermoelectric cooler from vendor datasheets. *Electronics Cooling*, 2008.
- [136] Monika Budayova, Françoise Bonneté, Annette Tardieu, and Patrice Vachette. Interactions in solution of a large oligomeric protein. *Journal of Crystal Growth*, 196(2-4) : 210–219, 1999.
- [137] Santosh Kumar Bharti and Raja Roy. Quantitative  $^1\text{H}$  nmr spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35 :5–26, 2012.
- [138] Pedro Gonzalez-Tello, Fernando Camacho, and Gabriel Blazquez. Density and viscosity of concentrated aqueous solutions of polyethylene glycol. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 39(3) :611–614, 1994.
- [139] Le-He Mei, Dong-Qiang Lin, Zi-Qiang Zhu, and Zhao-Xiong Han. Densities and viscosities of polyethylene glycol + salt + water systems at 20 .degree.c. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 40(6) :1168–1171, 1995.
- [140] Joseph Kestin, H. Ezzat Khalifa, and Robert J. Correia. Tables of the dynamic and kinematic viscosity of aqueous nacl solutions in the temperature range 20-150 °c and the pressure range 0.1-35 mpa. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10 (71), 1981.
- [141] Begona Heras and Jennifer L. Martin. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallographica Section, D61* :1173–1180, 2005.

- [142] John H. McClendon and G. Fred Somers. Simple large scale ultrafiltration using osmotically forced dialysis. *Plant Physiology*, 30(5) :485, 1955.
- [143] John H. McClendon. The osmotic pressure of concentrated solutions of polyethylene glycol 6000, and its variation with temperature. *Journal of Experimental Botany*, 32 (129) :861–866, 1981.
- [144] Niels Junius, Esko Oksanen, Maxime Terrien, Christophe Berzin, Jean-Luc Ferrer, and Monika Budayova-Spano. A crystallization apparatus for temperature-controlled flow-cell dialysis with real-time visualization. *Journal of Applied Crystallography*, 49 (3) :806–813, 2016.
- [145] Styliani Consta and Jun Kyung Chung. Charge-induced conformational changes of  $\text{peg}-(\text{na}^+)_n$  in a vacuum and aqueous nanodroplets. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(35) :10447–10455, 1984.
- [146] Saliha Bouranene, Anthony Szymczyk, Patrick Fievet, and Alain Vidonne. Influence of inorganic electrolytes on the retention of polyethyleneglycol by a nanofiltration ceramic membrane. *Journal of Membrane Science*, 290(1-2) :216–221, 2007.
- [147] Aurélie Escoda, Patrick Fievet, Sophie Lakard, Anthony Szymczyk, and Sébastien Déon. Influence of salts on the rejection of polyethyleneglycol by an nf organic membrane : Pore swelling and salting-out effects. *Journal of Membrane Science*, 347 (1-2) :174–182, 2010.
- [148] Victor A. Bloomfield and R. K. Dewan. Viscosity of liquid mixtures. *Journal of Physical Chemistry*, 75(20) :3113–3119, 1971.
- [149] Georges Belfort, Robert H. Davis, and Andrew L. Zydney. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 96(1-2) :1–58, 1994.
- [150] Lianfa Song. Flux decline in crossflow microfiltration and ultrafiltration : mechanisms and modeling of membrane fouling. *Journal of Membrane Science*, 139(2) :183–200, 1998.
- [151] Cristina-Eliza BRUNCHI and Luminita GHIMICI. Peg in aqueous salt solutions. viscosity and separation ability in a tio2 suspension. *Revue Roumaine de Chimie*, 58 (2-3) :183–188, 2013.
- [152] Bernhard A. Wolf. Polyelectrolytes revisited : Reliable determination of intrinsic viscosities. *Macromolecular Rapid Communications*, 28(2) :164–170, 2007.
- [153] Jessica R. Molek and Andrew L. Zydney. Ultrafiltration characteristics of pegylated proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(3) :474–482, 2006.
- [154] Paul Haney, Katherine Herting B.S., and Suzanne Smith M.S. Molecular weight cut-off (mwco) specifications and rates of buffer exchange with slide-a-lyzer dialysis devices and snakeskin dialysis tubing. <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-biology-application-notes/separation-characteristics-dialysis-membranes.html>, 2013.
- [155] Claude Sauter and Richard Giegé. La cristallogenèse des macromolécules biologiques. *Regard sur la Biochimie*, 3 :21–31, 2001.

- [156] Bernard Lorber, Claude Sauter, Joseph D. Ng, D.W. Zhu, Richard Giegé, Olga Vidal, Marie-Claire Robert, and Bernard Capelle. Characterization of protein and virus crystals by quasi-planar wave x-ray topography : a comparison between crystals grown in solution and in agarose gel. *Journal of Crystal Growth*, 204(3) :357–368, 1999.
- [157] Haruhiko Koizumi, Satoshi Uda, Kozo Fujiwara, Masaru Tachibana, Kenichi Kojima, and Jun Nozawa. Technique for high-quality protein crystal growth by control of subgrain formation under an external electric field. *Crystals*, 6(8) :95, 2016.
- [158] Vivian Stojanoff, B. Cappelle, Y. Epelboin, J. Hartwig, A.B. Moradela, and F. Otalora. High resolution imaging as a characterization tool for biological crystals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1027 :48–55, 2004.
- [159] Elizabeth Cacioppo and Marc L. Pusey. The solubility of the tetragonal form of hen egg white lysozyme from ph 4.0 to 5.4. *Journal of Crystal Growth*, 114(3) :286–292, 1991.
- [160] Jean-Baptiste Salmon and Jacques Leng. Application of microevaporators to dynamic exploration of the phase diagram. *Journal of Applied Physics*, 107 :084905, 2010.
- [161] Mark A. Eddings and Bruce K. Gale. A pdms-based gas permeation pump for on-chip fluid handling in microfluidic devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16 :2396–2402, 2006.
- [162] Andrea Lamberti, Simone L. Marasso, and Matteo Cocuzza. Pdms membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications. *RSC Advances*, 4 :61415, 2014.
- [163] Hsih Yin Tana, Weng Keong Lokea, and Nam-Trung Nguyen. A reliable method for bonding polydimethylsiloxane (pdms) to polymethylmethacrylate (pmma) and its application in micropumps. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 151(1) :133–139, 2010.
- [164] W. L. Robb. Thin silicone membranes-their permeation properties and some applications. *Materials in Biochemical Engineering*, 146 :119–137, 1968.
- [165] Gas barriers : An introduction basic reference 2.
- [166] Lilian Jacquamet, Jeremy Ohana, Jacques Joly, Franck Borel, Michel Pirocchi, Philippe Charrault, Alain Bertoni, Pascale Israel-Gouy, Philippe Carpentier, Frank Kozielski, Delphine Blot, and Jean-Luc Ferrer. Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an x-ray beam. *Structure*, 12(7) :1219–1225, 2004.
- [167] Jeremy Ohana, Lilian Jacquamet, Jacques Joly, Alain Bertoni, P. Taunier, L. Michel, Philippe Charrault, Michel Pirocchi, Philippe Carpentier, Franck Borel, Richard Kahn, and Jean-Luc Ferrer. Cats : a cryogenic automated transfer system installed on the beamline fip at esrf. *Journal of Applied Crystallography*, 37(1) :72–77, 2004.
- [168] Zhang YongJian, Liu ZhengTang, Zang DuYang, Qian YiMeng, and Lin KeJun. Pattern transition and sluggish cracking of colloidal droplet deposition with polymer additives. *SCIENCE CHINA Physics, Mechanics and Astronomy*, 56(9) :1712–1718, 2013.
- [169] Christo N. Nanev, Feyzim V. Hodzhaoglu, and Ivaylo L. Dimitrov. Kinetics of insulin crystal nucleation, energy barrier, and nucleus size. *Crystal Growth and Design*, 11(1) :196–202, 2011.
- [170] Jose V. Parambil, Marc Schaeperstoens, Daryl R. Williams, and Jerry Y. Y. Heng. Effects of oscillatory flow on the nucleation and crystallization of insulin. *Crystal Growth and Design*, 11(10) :4353–4359, 2011.



- [171] Sarah L. Perry, Sudipto Guha, Ashtamurthy S. Pawate, Robert Henning, Irina Kosheleva, Vukica Srajer, Paul J. A. Kenis, and Zhong Ren. In situ serial laue diffraction on a microfluidic crystallization device. *Journal of Applied Crystallography*, 47 : 1975–1982, 2014.
- [172] Andreas F. von Recum. *Handbook Of Biomaterials Evaluation : Scientific, Technical And Clinical Testing Of Implant Materials*. CRC Press, second edition edition, 1998.
- [173] Hwankyu Lee, Richard M. Venable, Alexander D. MacKerell Jr., and Richard W. Pastor. Molecular dynamics studies of polyethylene oxide and polyethylene glycol : Hydrodynamic radius and shape anisotropy. *Biophysical Journal*, 95(4) :1590–1599, 2008.
- [174] Monique P. J. Dohmen, Ana M. Pereira, J. Martin K. Timmer, Nieck E. Benes, and Jos T. F. Keurentjes. Hydrodynamic radii of polyethylene glycols in different solvents determined from viscosity measurements. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 53(1) :63–65, 2008.
- [175] R. López-Esparza, M.-A. Guedeau-Boudeville, Y. Gambin, C. Rodríguez-Beas, A. Maldonado, and W. Urbach. Interaction between poly(ethylene glycol) and two surfactants investigated by diffusion coefficient measurements. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300(1) :105–110, 2006.
- [176] Jacob Israelachvili. The different faces of poly(ethylene glycol). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16) :8378–8379, 1997.
- [177] Albert C. Thompson, David T. Attwood, Eric M. Gullikson, Malcolm R. Howells, Jeffrey B. Kortright, Arthur L. Robinson, James H. Underwood, Kwang-Je Kim, Janos Kirz, Ingolf Lindau, Piero Pianetta, Herman Winick, Gwyn P. Williams, James H. Scofield, and Douglas Vaughan. *X-RAY DATA BOOKLET*. Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California, Berkeley, California 94720, second edition, january 2001 edition, 2001.
- [178] B. L. Henke, E. M. Gullikson, and J. C. Davis. X-ray interactions : Photoabsorption, scattering, transmission, and reflection at  $e = 50\text{--}30,000$  ev,  $z = 1\text{--}92$ . *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 54(2) :181–342, 1993.
- [179] J. H. Hubbell, H. A. Gimm, and I. O/verbo/. Pair, triplet, and total atomic cross sections (and mass attenuation coefficients) for 1 mev-100 gev photons in elements  $z=1$  to 100. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 9(4) :1023, 1980.
- [180] J. H. Hubbell. Photon cross sections, attenuation coefficients, and energy absorption coefficients from 10 kev to 100 gev. *National Bureau of Standads report NSRDS-NSB 29*, 15, 1969.
- [181] G. Nelson and D. Reilly. Gamma-ray interactions with matter. *Passive Nondestructive Analysis of Nuclear Materials*, pages 27–42, 1991.
- [182] J. H. Hubbell and S. M. Seltzer. Tables of x-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients from 1 kev to 20 mev for elements  $z = 1$  to 92 and 48 additional substances of dosimetric interest. *NIST Standard Reference Database*, 1996.
- [183] Shuo Sui, Yuxi Wang, Kristopher W. Kolewe, Vukica Srajer, Robert Henning, Jessica D. Schiffman, Christos Dimitrakopoulou, and Sarah L. Perry. Graphene-based microfluidics for serial crystallography. *Lab on a Chip*, 16(16) :3082–3096, 2016.

- 
- [184] Eduardo D. Greaves and Andreas Manz. Toward on-chip x-ray analysis. *Lab on a Chip*, 5(4) :382–391, 2005.
- [185] Zhen Liu, Hui Wang, Zengxi Li, Xingmei Lu, Xiangping Zhang, Suojiang Zhang, and Kebin Zhou. Characterization of the regenerated cellulose films in ionic liquids and rheological properties of the solutions. *Materials Chemistry and Physics*, 128(1-2) : 220–227, 2011.
- [186] Julie Credou and Thomas Berthelot. Cellulose : from biocompatible to bioactive material. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(30) :4767–4788, 2014.
- [187] Thomas C. O’Haver. Interactive computer models for analytical chemistry instruction, copyright © 2016.
- [188] Joël Janin. *Méthodes biophysiques pour l’étude des macromolécules*. Hermann Paris, Collection Méthodes, 1985.
- [189] Akul Mehta. Ultraviolet-visible (uv-vis) spectroscopy - limitations and deviations of beer-lambert law.
- [190] D. F. Swinehart. The beer-lambert law. *Journal of Chemical Education*, 39(7) :333, 1962.
- [191] Santosh V. Thakkar, Kevin M. Allegre, Sangeeta B. Joshi, David B. Volkin, and C. Russell Middaugh. An application of ultraviolet spectroscopy to study interactions in proteins solutions at high concentrations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101 (9) :3051–3061, 2012.
- [192] Atul Saluja and Devendra S. Kalonia. Nature and consequences of protein–protein interactions in high protein concentration solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 358 :1–15, 2008.
- [193] Laura H. Lucas, Baran A. Ersoy, Lisa A. Kueltzo, Sangeeta B. Joshi, Duane T. Brandau, Nagarajan Thyagarajapuram, Laura J. Peek, and C. Russell Middaugh. Probing protein structure and dynamics by second-derivative ultraviolet absorption analysis of cation- $\pi$  interactions. *Protein Science*, 15(10) :2228–2243, 2006.
- [194] N.J. Miller-Ihli, Thomas C. O’Haver, and J.M. Harnly. Calibration and curve fitting for extended range aas. *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy*, 39(12) : 1603–1614, 1984.