



**HAL**  
open science

# Plateforme microfluidique pour l'optimisation des conditions de cristallisation des protéines

Charline J J Gerard

► **To cite this version:**

Charline J J Gerard. Plateforme microfluidique pour l'optimisation des conditions de cristallisation des protéines. Matière Condensée [cond-mat]. Université d'Aix-Marseille 2017. Français. NNT : . tel-01588298

**HAL Id: tel-01588298**

**<https://theses.hal.science/tel-01588298>**

Submitted on 15 Sep 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.



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE  
INSTITUT DE RECHERCHE SERVIER  
ECOLE DOCTORALE 352

UFR Sciences  
CINaM / UMR 7325

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Physique et science de la matière  
Spécialité : Biophysique

Charline J.J. GERARD

Plateforme microfluidique pour l'optimisation des conditions  
de cristallisation des protéines

Soutenue le 23/05/2017 devant le jury :

Valérie DUPRAY	Université de Rouen	Rapportrice
Jean-François GUICHOU	Université de Montpellier	Rapporteur
Béatrice BISCANS	Université Toulouse III – CNRS	Examinatrice
Léonard CHAVAS	Synchrotron SOLEIL	Examineur
Gilles FERRY	Institut de Recherche SERVIER	Examineur
Roland LLOUBES	Université d'Aix-Marseille	Examineur
Nadine CANDONI	Université d'Aix-Marseille	Directrice de thèse
Stéphane VEESLER	Université d'Aix-Marseille – CNRS	Directeur de thèse



# Résumé

**Mots-clefs** : Microfluidique, Cristallisation, Protéine

Cette thèse porte sur le développement d'une plateforme microfluidique polyvalente pour la cristallisation des protéines alliant études statistiques, économie de matière, rapidité d'exécution et facilité d'utilisation. L'objectif est de développer un outil unique pour répondre aux différentes problématiques de la cristallisation des protéines : l'identification d'une condition de cristallisation robuste via le criblage et l'optimisation, ainsi que la co-cristallisation d'une protéine et de ligands pour le *structure-based drug design*. Pour cela, une méthode microfluidique versatile à base de gouttes et sans tensioactif est utilisée. Elle permet la génération de centaines voire milliers de gouttes de quelques nanolitres dans lesquelles la cristallisation peut avoir lieu indépendamment. La composition des gouttes est contrôlée par les débits des différentes solutions à l'aide de pousse-seringues programmable et vérifiée en ligne par spectrométrie UV-visible. De nombreuses conditions de cristallisation différentes peuvent ainsi être testées rapidement : nature et concentration de(s) agent(s) de cristallisation, ajout d'un ligand, etc. De plus, les cristaux obtenus à l'aide de cette plateforme microfluidique sont caractérisés *in situ* et *ex situ* par diffraction des rayons X.

Cette plateforme est appliquée à la cristallisation de deux protéines, tout d'abord une protéine modèle, le lysozyme, puis une protéine d'intérêt pharmaceutique, la quinone réductase de type 2. Ainsi, nous avons développé un outil adapté aux contraintes de l'industrie pharmaceutique qui peut être transféré dans un laboratoire de recherche pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la microfluidique. La plateforme permet d'avoir une approche de criblage à haut débit, ou HTS, et de tendre vers l'automatisation à la fois du criblage et de la diffraction des rayons X.

# Abstract

**Keywords:** Microfluidics, Crystallization, Protein

The aim of this work is the development of a versatile microfluidic platform for protein crystallization, combining statistical studies, material saving, speed of execution and ease of use. The aim is to develop a unique tool to address the different issues of proteins crystallization: identification of a robust crystallization condition via screening and optimization, and co-crystallization of a protein with ligands for structure-based drug design. For this purpose, a versatile droplet-based microfluidic method without adding any surfactant is used. It allows the generation of hundreds or even thousands of droplets of a few nanoliters in which the crystallization takes place independently. Droplets composition is controlled by the flow rates of the different solutions using programmable syringe pumps and checked on-line by UV-visible spectroscopy. Many different crystallization conditions can thus be tested quickly: nature and concentration of crystallization agent(s), addition of a ligand, etc. In addition, the crystals obtained using this microfluidic platform are characterized *in situ* and *ex situ* by X-ray diffraction.

The platform is applied to the crystallization of two proteins, first a model protein, lysozyme, and then a protein of pharmaceutical interest, quinone reductase 2. Thus we have developed a tool suitable to constraints of pharmaceutical industry, in order to be transferred to research laboratories for routine use by non-specialists of microfluidics. This platform permits a high throughput screening approach, or HTS, and tends to the automation of both screening and X-ray diffraction.

# Table des matières



<b>Résumé</b>	<b>2</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>Table des matières</b>	<b>4</b>
<b>Introduction</b>	<b>10</b>
<b>A. Etude bibliographique</b>	<b>16</b>
<b>Chapitre 1. Cristallisation en solution</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Solubilité et sursaturation</b>	<b>18</b>
1.1.1. Solubilité	18
1.1.2. Sursaturation	19
<b>1.2. Nucléation</b>	<b>20</b>
1.2.1. Théorie classique de la nucléation	21
1.2.1.1. Nucléation primaire homogène	21
1.2.1.2. Nucléation primaire hétérogène	22
1.2.2. Mécanisme de nucléation en deux étapes	24
1.2.3. Fréquence de nucléation	25
1.2.4. Obtention d'un monocristal de taille conséquente	25
1.2.5. Réduction du volume du cristalliseur	26
1.2.5.1. Aspects cinétiques	26
1.2.5.2. Aspects thermodynamiques	27
<b>1.3. Croissance cristalline</b>	<b>27</b>
1.3.1. Face, forme, morphologie et faciès	28
1.3.2. Forme de croissance	28
<b>1.4. Polymorphisme et transition de phase</b>	<b>29</b>
1.4.1. Polymorphisme	29
1.4.2. Transition de phase	30
<b>1.5. Mûrissements</b>	<b>30</b>
1.5.1. Mûrissement d'Oswald	30
1.5.2. Mûrissement cinétique	31
<b>1.6. Criblage et optimisation des conditions de cristallisation</b>	<b>32</b>
1.6.1. Principe	32
1.6.2. Robots de cristallisation	32
<b>1.7. Systèmes biologiques étudiés</b>	<b>33</b>
1.7.1. Lysozyme	33
1.7.2. QR2	34
<b>Chapitre 2. Cristallisation des protéines en microfluidique</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Systèmes microfluidiques</b>	<b>37</b>
2.1.1. Principaux matériaux utilisés	37
2.1.2. Systèmes intégrés complexes	38
2.1.3. Simplification du système en puces	39
2.1.4. Systèmes en capillaires	41



<b>2.2. Méthodes de cristallisation en microfluidique</b>	<b>43</b>
2.2.1. FID	43
2.2.2. Contre-diffusion	44
2.2.3. Diffusion de vapeur	46
2.2.4. Microbatch	47
2.2.4.1. Criblage des conditions de cristallisation	48
2.2.4.2. Optimisation d'une condition de cristallisation	49
2.2.4.3. Caractérisation en ligne des gouttes	50
2.2.5. Découplage de la nucléation et de la croissance	51
<b>2.3. Caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique</b>	<b>54</b>
2.3.1. DRX <i>in situ</i> dans un capillaire en verre	54
2.3.2. DRX <i>in situ</i> dans une puce microfluidique	55
2.3.3. DRX <i>ex situ</i> – extraction des cristaux	58
<b>2.4. Conclusion – Cristallisation en microfluidique</b>	<b>59</b>
<b>Chapitre 3. Génération des gouttes – hydrodynamique</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Principe de la microfluidique à base de gouttes</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Nombre de Reynolds</b>	<b>62</b>
<b>3.3. Taille critique des canaux</b>	<b>63</b>
<b>3.4. Nombre capillaire</b>	<b>63</b>
<b>3.5. Taille des gouttes</b>	<b>63</b>
<b>3.6. Régimes de génération des gouttes</b>	<b>64</b>
<b>3.7. Mélange dans les gouttes</b>	<b>65</b>
<b>Conclusion de l'étude bibliographique</b>	<b>67</b>
<b>B. Matériels et Méthodes</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre 1. Système microfluidique</b>	<b>70</b>
<b>1.1. Génération des gouttes</b>	<b>71</b>
1.1.1. Capillaires	71
1.1.1.1. Capillaires fluorés	71
1.1.1.2. Capillaires en verre	71
1.1.2. Jonctions microfluidiques	72
1.1.3. Système du pousse-seringues : débits et gradients	72
<b>1.2. Caractérisation en ligne des gouttes</b>	<b>74</b>
<b>1.3. Incubation et observation des gouttes</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 2. Matériels : solutions et huiles utilisées</b>	<b>77</b>
<b>2.1. Protéines étudiées</b>	<b>77</b>
2.1.1. Le lysozyme	77
2.1.2. La quinone réductase de type 2	77
<b>2.2. Choix de l'huile</b>	<b>78</b>
<b>2.3. Autres solutions</b>	<b>79</b>

<b>Chapitre 3. Méthodes</b>	<b>80</b>
3.1. Mesures d'énergies interfaciales	80
3.2. Mesures d'angles de contact	82
3.3. Traitements de surface	82
3.3.1. Four à plasma d'oxygène	82
3.3.2. Silanisation	83
3.3.3. Aquapel®	83
3.4. Taille, volume et forme des gouttes produites en microfluidique	84
3.4.1. Caractéristiques des gouttes générées	84
3.4.2. Zones de fonctionnement	84
3.5. Mesures de solubilité	86
3.6. Méthodes pour l'étude de la cristallisation	87
3.6.1. Cristallisation en Microbatch®	87
3.6.2. Cristallisation en microfluidique	88
3.7. Cristallographie	88
<b>C. Résultats et discussion</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre 1. Criblage des conditions de cristallisation</b>	<b>92</b>
1.1. Criblage rapide en Microbatch®	92
1.2. Capillaires de 500µm de diamètre interne	93
1.2.1. Validation du système	94
1.2.2. Couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té	96
1.3. Capillaires de 150µm de diamètre interne	99
1.3.1. Choix du type de capillaire	99
1.3.2. Choix de l'huile	101
1.3.3. Validation du système	104
1.4. Caractérisation en ligne des gouttes par spectrométrie UV	105
1.4.1. Temps d'intégration	105
1.4.2. Résultats obtenus dans des capillaires de 500µm ID	106
1.4.3. Absorbance de flux continu dans des capillaires de 150µm ID	107
1.4.4. Absorbance de gouttes dans des capillaires de 150µm ID	111
1.4.4.1. Caractérisation des gouttes générées	111
1.4.4.2. Effets du temps d'intégration	112
1.4.4.3. Gouttes de lysozyme de concentration connue	114
1.4.4.4. Accumulation de plusieurs mesures	118
1.5. Gradient de concentration	122
1.5.1. Lysozyme	122
1.5.2. QR2	125
1.5.2.1. Large gamme de sursaturations	125
1.5.2.2. Réduction de la concentration en sel	126
1.5.2.3. Variation de la concentration en QR2	128
1.6. Conclusion – Criblage des conditions de cristallisation	130

<b>Chapitre 2. Co-cristallisation avec des ligands</b>	<b>131</b>
<b>2.1. Couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té</b>	<b>131</b>
2.1.1. Mise en place du montage	131
2.1.2. Application à la cristallisation du lysozyme	133
2.1.2.1. Ajout du lysozyme dans la jonction en té	133
2.1.2.2. Ajout du PEG-5000 dans la jonction en té	135
<b>2.2. Criblage des ligands dans un capillaire de 150µm ID</b>	<b>137</b>
2.2.1. Remplissage d'un capillaire avec des solutions différentes	137
2.2.2. Ajout de différentes solutions aqueuses dans les gouttes	137
2.2.3. Ajout de solvants dans les gouttes d'eau	139
<b>2.3. Conclusion – Co-cristallisation</b>	<b>142</b>
<b>Chapitre 3. Caractérisation des cristaux produits en microfluidique par DRX</b>	<b>143</b>
<b>3.1. DRX <i>in situ</i> dans un capillaire en verre</b>	<b>143</b>
3.1.1. Traitement du verre	143
3.1.1.1. Silanisation de lamelles en verre	144
3.1.1.2. Silanisation en microfluidique	145
3.1.1.3. Silanisation fluorée – Aquapel®	147
3.1.2. Transfert des cristaux	149
3.1.3. DRX <i>in situ</i>	150
3.1.4. Conclusion – DRX <i>in situ</i>	152
<b>3.2. DRX <i>ex situ</i> sur une MicroMesh™</b>	<b>153</b>
3.2.1. Dépôt d'un cristal choisi	153
3.2.1.1. Capillaires de 360µm OD	154
3.2.1.2. Capillaires de 1,59mm OD	157
3.2.2. DRX <i>ex situ</i>	158
3.2.2.1. Cristal trempé dans le glycérol	158
3.2.2.2. Cristal non trempé dans le glycérol	159
<b>3.3. Conclusion – Caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique par DRX</b>	<b>162</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>164</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>170</b>
<b>Annexes</b>	<b>180</b>

# Introduction



# Préambule

La cristallisation est le procédé au cours duquel la matière passe d'un état désordonné (liquide, gazeux ou solide) à un état ordonné solide, le cristal. Ce phénomène, connu depuis l'antiquité avec la cristallisation du sel dans les marais salants, peut se faire soit en milieu naturel, soit de façon synthétique. Les atomes, ions ou molécules qui composent le cristal sont empilés de façon régulière et périodique dans les trois directions de l'espace. Cette périodicité se traduit, entre autre, par la capacité des cristaux à diffracter les rayons X, les neutrons, et les électrons (Rousseau and Gibaud, 2007).

Ce travail est consacré à la cristallisation en solution. La solution est composée d'un solvant et d'un soluté, dissout, à cristalliser. Il faut pour cela créer un déséquilibre dans la solution, c'est-à-dire agir physiquement ou chimiquement sur la solution pour que la concentration du soluté dans la solution dépasse la concentration d'équilibre. La solution est alors dite sursaturée (Boistelle, 1985).

Largement utilisée dans de nombreux domaines (biologie, pharmacie, minéralogie, optique, agroalimentaire, etc.), la cristallisation permet non seulement la séparation et la purification de molécules, mais également leur mise en forme. Par exemple dans le cas des molécules pharmaceutiques, la cristallisation permet de leur assurer stabilité et/ou biodisponibilité (Almarsson and Zaworotko, 2004).

La cristallisation peut également être utilisée à des fins analytiques. Dans le cas des protéines par exemple, leur cristallisation constitue une étape clef de la détermination de leur structure tridimensionnelle par diffraction des rayons X, permettant une meilleure compréhension du mode d'action de ces macromolécules dans les systèmes biologiques. Il s'agit alors de cristallographie. En permettant d'élucider les mécanismes réactionnels, elle se trouve à la base même du *drug design*, soit de la conception de nouveaux produits actifs en pharmacologie. L'obtention de monocristaux de protéine suffisamment gros (de l'ordre de la centaine de micromètres) et de très bonne qualité reste cependant l'étape limitante dans la détermination de nouvelles structures par diffraction des rayons X (Maeki et al., 2016).

La cristallisation en solution se divise en deux étapes, dont dépendent les propriétés des cristaux obtenus. Tout d'abord, la nucléation (ou germination) est l'étape au cours de laquelle les cristaux apparaissent dans la solution. Elle détermine la phase cristalline. Elle est suivie par une étape de croissance cristalline, qui détermine le faciès, la morphologie et la taille des cristaux (Mangin et al., 2008).

Les différents paramètres influençant la cristallisation sont généralement testés lors d'une étape de criblage des conditions de cristallisation : nature et concentration de(s) agent(s) de cristallisation, pH, température, etc. Cette étape est le plus souvent basée sur le principe de l'essai-erreur, ce qui nécessite de tester un très grand nombre de conditions différentes. A cette étape succède généralement une étape d'optimisation des conditions de cristallisation, visant à améliorer une condition estimée lors du criblage pour obtenir des cristaux plus gros ou de meilleure qualité. Combinées, ces deux étapes nécessitent une quantité importante d'échantillon de protéine.

L'identification des meilleures conditions de cristallisation est donc une étape coûteuse, à la fois en termes de temps et de matière première. Afin de réduire ces coûts, les robots de cristallisation à haut débit, capables de former des gouttes de l'ordre de la centaine de nanolitres, sont largement utilisés pour la cristallogénèse des protéines. La reproductibilité des expériences n'est cependant que rarement étudiée, les conditions expérimentales ne sont que peu (ou pas) répétées. La nucléation étant un phénomène stochastique, elle est d'une part difficile à reproduire et d'autre part difficile à prédire (lieu et moment de l'occurrence). Ainsi, l'identification d'une condition de cristallisation robuste passe par la répétition des expériences jusqu'à obtenir une statistique suffisante (Candoni et al., 2012a).

## Objectifs

Cette thèse porte donc sur le développement d'un outil polyvalent pour la cristallisation des protéines alliant rapidité d'exécution, économies de matière, études statistiques et facilité d'utilisation. Cet outil doit être le plus adapté possible aux contraintes de l'industrie pharmaceutique afin d'être transféré dans un laboratoire de recherche industriel pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la microfluidique. La plateforme doit permettre une approche de criblage à haut débit, ou HTS, et tendre vers l'automatisation à la fois du criblage et de la diffraction des rayons X. Pour cela, à la suite des travaux de Manuel Ildefonso (Ildefonso et al., 2012a) et de Shuheng Zhang (Zhang et al., 2015a), nous avons choisi d'utiliser une méthode microfluidique à base de gouttes. Les cristallisoirs sont remplacés par des gouttes de volume nanométrique qui sont produites par centaines voire milliers.

L'objectif est de développer une plateforme microfluidique unique pour répondre aux différentes problématiques de la cristallisation des protéines : l'identification d'une condition de cristallisation robuste via le criblage et l'optimisation, ainsi que la co-cristallisation d'une protéine et de ligands pour le *Structure-Based Drug Design*. De plus, les cristaux de protéine sont généralement destinés à des études structurales. Ainsi, les questions liées à la caractérisation des cristaux par diffraction des rayons X et à leur qualité sont également traitées. La plateforme sera appliquée à la cristallisation de deux protéines, tout d'abord une protéine modèle, le lysozyme, puis une protéine d'intérêt pharmaceutique, la quinone réductase de type 2.

### **Ce mémoire est organisé en 3 parties.**

- La première partie, consacrée à l'étude bibliographique, est constituée de 3 chapitres. Le **premier chapitre** présente les notions générales de la cristallisation en solution, en regroupant les connaissances théoriques sur les aspects cinétiques et thermodynamiques. Le **deuxième chapitre** décrit les différents outils microfluidiques appliqués à la cristallisation des protéines et à l'analyse des cristaux par diffraction des rayons X. Le **troisième chapitre** expose les aspects théoriques de l'hydrodynamique dans les systèmes microfluidiques et les aspects pratiques de la génération de gouttes.
- La seconde partie, dédiée à la description des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail, est composée de trois chapitres. Le **premier chapitre** est consacré aux différents matériels utilisés, le **second chapitre** décrit la plateforme microfluidique, et le **troisième chapitre** est consacré aux méthodes utilisées.
- La dernière partie décrit les résultats obtenus au cours de cette thèse. Elle est divisée en trois chapitres. Le **premier chapitre** porte sur le développement de la plateforme microfluidique pour le criblage des conditions de cristallisation d'une protéine. Le **second chapitre** est dédié au criblage des ligands d'une protéine-cible pour la co-cristallisation. Enfin, le **troisième chapitre** est consacré au développement d'une méthode de caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique par diffraction des rayons X.





## **A. Etude bibliographique**



Cette partie est consacrée à l'étude bibliographique, dans un premier temps de la cristallisation en solution, puis de la microfluidique, et enfin de l'hydrodynamique des systèmes microfluidiques.

## Chapitre 1. Cristallisation en solution

La cristallisation en solution est un changement d'état au cours duquel un corps va passer de l'état dissout à l'état de solide cristallin. Il existe trois types de cristallisation, en fonction de la phase de départ : la cristallisation en phase gazeuse, en bain fondu ou en solution (Mullin, 2000). Dans ce travail, nous nous intéressons à la cristallisation en solution. Ce premier chapitre est donc consacré à la description et aux définitions générales des phénomènes concernant la cristallisation en solution. Les notions de solubilité et de sursaturation sont exposées, ainsi que les phénomènes de nucléation et de croissance cristalline. L'évolution des cristaux obtenus est ensuite décrite avec les notions de polymorphisme, de transition de phase et de mûrissement. La dernière partie est consacrée aux notions de criblage et d'optimisation des conditions de cristallisation.

### 1.1. Solubilité et sursaturation

Une solution de cristallisation est un mélange d'au moins deux substances qui forment une seule phase homogène. Ici, les solutions sont composées d'un solvant (liquide) et d'au moins un soluté (dissout).

#### 1.1.1. Solubilité

La solubilité ( $C_s$ ) est définie par la quantité maximale de soluté pouvant se dissoudre dans un solvant donné. D'un point de vue thermodynamique, pour une phase donnée, cela correspond à l'équilibre entre une solution de concentration donnée et une phase solide de composition et structure données, à température et pression fixées (Boistelle, 1985).

La solubilité dépend de la composition de la solution, de sa température, ainsi que de sa pression, lorsqu'elle est en équilibre avec une phase cristalline. La solubilité dépend également du couple solvant/soluté considéré. Elle varie ainsi en fonction de paramètres ajustables, appelés paramètres de cristallisation, pouvant être, par exemple, la force ionique, le pH, ou encore la température. Pour la majorité des molécules, la solubilité augmente avec la température, la solubilité est alors dite directe. Cependant, la solubilité d'une molécule peut également diminuer avec l'augmentation de la température, la solubilité est alors dite inverse (Boistelle, 1985). La relation entre solubilité et paramètre de cristallisation est décrite graphiquement par une courbe de solubilité (Figure 1).

### 1.1.2. Sursaturation

La sursaturation ( $\beta$ ) est l'état d'une solution dans laquelle la concentration en soluté est supérieure à la solubilité (Boistelle, 1985). Ainsi, quand un diagramme de phase est établi, trois domaines apparaissent (Figure 1) :

- La zone sous-saturée, en dessous de la courbe de solubilité, zone dans laquelle du soluté peut encore être dissout dans la solution.
- La zone sursaturée métastable, zone dans laquelle les cristaux croissent mais n'apparaissent pas.
- La zone de nucléation spontanée, zone dans laquelle les cristaux apparaissent.

La zone de nucléation spontanée contient la zone de précipitation, zone dans laquelle l'excès de soluté se sépare immédiatement de la solution en une phase amorphe ou microcristalline. Cet excès peut également être exclu sous la forme d'une séparation de phase liquide-liquide. Dans tous les cas, cette zone ne permet pas d'obtenir des cristaux de taille suffisante pour des études structurales.

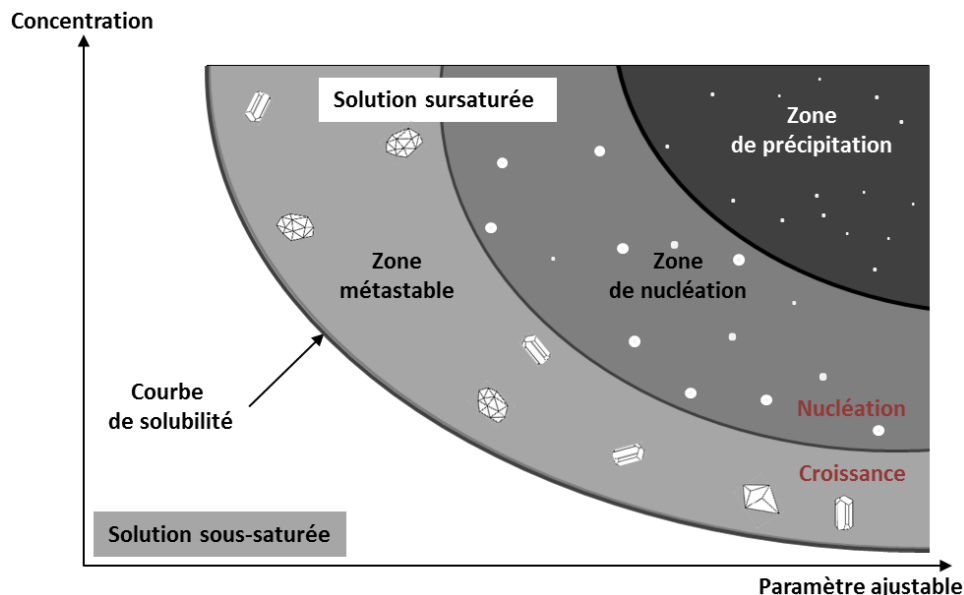


Figure 1 : Diagramme de phase

Dans une solution sursaturée, la force motrice de la cristallisation est la différence  $\Delta\mu$  (en J) des potentiels chimiques  $\mu$  et  $\mu_s$  qu'ont les molécules respectivement dans la solution sursaturée et dans la solution saturée à l'équilibre cristal-solution, telle que:

$$\Delta\mu = \mu - \mu_s = kT \ln \beta$$

Équation 1

Avec  $k$  la constante de Boltzmann ( $\approx 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2} \cdot \text{K}^{-1}$  ou  $\text{J} \cdot \text{K}^{-1}$  en SI),  $T$  la température (en K) et  $\beta$  la sursaturation (Boistelle, 1985). Pour une molécule donnée, la sursaturation est définie par un rapport sans unité :

$$\beta = \frac{C}{C_s}$$

Équation 2

Avec  $C$  la concentration du soluté en solution et  $C_s$  sa concentration à l'équilibre (ou solubilité). Pour les protéines, les concentrations sont généralement exprimées en mg/mL. Ainsi, si  $\beta > 1$ , le cristal croît, si  $\beta < 1$ , le cristal se dissout et si  $\beta = 1$ , le cristal et la solution sont à l'équilibre (Boistelle, 1985). La sursaturation peut également être définie par la différence  $(\beta - 1)$  ce qui donne un autre rapport sans dimension :

$$\sigma = \beta - 1 = \frac{C - C_s}{C_s}$$

*Équation 3*

Une troisième manière de définir la sursaturation est la différence  $C - C_s$ . Cependant, dans ce cas, sa valeur dépend drastiquement de l'unité de concentration choisie (Candoni et al., 2012a).

Il existe différents procédés de cristallisation permettant d'obtenir une solution sursaturée. Les plus utilisées pour la cristallisation des protéines sont la cristallisation par évaporation du solvant (ou diffusion de vapeur) et par relargage, via l'ajout d'un agent de cristallisation (généralement un sel) pour réduire la solubilité de la protéine. Ces procédés de cristallisation seront développés dans la suite de ce travail (§ 2.2).

## 1.2. Nucléation

La nucléation est le processus conduisant à la formation d'une nouvelle phase. Lorsque la solution est sursaturée, elle est dans un état instable. Afin de retrouver l'équilibre, un premier germe cristallin (ou nucleus) se forme. La nucléation est un phénomène stochastique, c'est-à-dire qu'il est difficile de prévoir où, quand et combien de fois elle aura lieu (Ildefonso et al., 2012b). Cette partie est consacrée plus spécifiquement à la formation de germes cristallins. Ces germes ne sont thermodynamiquement stables qu'après avoir atteint une certaine taille, dite critique. Le phénomène de nucléation s'arrête là, vient ensuite l'étape de croissance cristalline.

Il existe trois types de nucléation (Candoni et al., 2012a) :

- La nucléation primaire homogène, c'est à dire la formation de germes dans le volume de la solution (§ 1.2.1.1)
- La nucléation primaire hétérogène, soit la formation de germes sur la surface d'un substrat « étranger » (paroi du cristallisateur, impureté, etc.) (§ 1.2.1.2).
- La nucléation secondaire, correspondant à l'apparition de germes à partir de cristaux de la même phase déjà présents dans la solution, soit parce qu'ils ont été introduits (ensemencement), soit parce que des cristaux existants ont été cassés par agitation (attrition).

Dans le cas de l'ensemencement d'une solution par des cristaux précédemment formés, la nucléation secondaire se trouve en compétition avec la croissance des cristaux existants. Cependant, si la sursaturation de la solution est suffisamment importante, les germes ajoutés peuvent lancer une nouvelle vague de nucléation. La solution doit donc être

métastable vis à vis de la nucléation secondaire (Stura and Wilson, 1991, Candoni et al., 2012a). Dans cette thèse, seule la nucléation primaire sera traitée, la nucléation secondaire ne sera pas abordée.

### 1.2.1. Théorie classique de la nucléation

Dans le cadre de la cristallisation, la théorie classique de la nucléation est utilisée pour décrire le passage d'une molécule de l'état liquide, en solution, à l'état solide, sous forme de cristal. Elle suppose un réservoir infini de molécules, c'est-à-dire que la concentration du soluté dans la solution ne diminue pas lors de la formation des germes cristallins (Grossier and Veessler, 2009).

#### 1.2.1.1. Nucléation primaire homogène

La nucléation primaire homogène n'implique que le solvant et le soluté. Les cristaux germent et croissent dans la solution, sans interaction avec un éventuel substrat étranger (paroi, impureté, etc.). Dans une solution sursaturée, la nucléation ne peut avoir lieu que si les molécules se rencontrent et se réunissent en germes pour donner naissance à des cristaux. Le processus de nucléation met en jeu une certaine énergie, appelée énergie libre d'activation, notée  $\Delta G$  (Boistelle, 1985).

$$\Delta G = -n (\Delta\mu) + S\gamma$$

*Équation 4*

Cette énergie comprend :

- d'une part un terme de volume  $-n (\Delta\mu)$  correspondant à la formation du germe, où  $n$  est le nombre de molécules constituant le germe. En supposant le germe sphérique, ce terme énergétique de volume diminue donc lorsque  $n$ , soit le rayon  $r$  du germe, augmente (Figure 2) ;
- d'autre part un terme de surface  $S\gamma$  correspondant à la création de l'interface ou de la surface du germe, où  $S$  est l'aire de la surface du germe ( $m^2$ ) et  $\gamma$  l'énergie interfaciale cristal-solution ( $J.m^{-2}$ ). En supposant le germe sphérique, le terme énergétique de surface augmente donc avec le rayon  $r$  du germe (Figure 2).

Lorsque  $r$  augmente, il y a donc compétition entre le terme volumique qui est favorable et le terme surfacique qui est défavorable. Et la fonction de l'énergie d'activation de nucléation  $\Delta G$  passe par une valeur critique  $\Delta G^*$  lorsque le germe atteint une taille critique  $r^*$ , pour laquelle, le germe est en équilibre instable avec la solution. S'il perd une molécule ( $r < r^*$ ), il se dissout ; s'il gagne une molécule ( $r > r^*$ ), il croît. Dans les deux cas, le processus se fait avec gain d'énergie ( $\Delta G < \Delta G^*$ ), il est donc spontané.

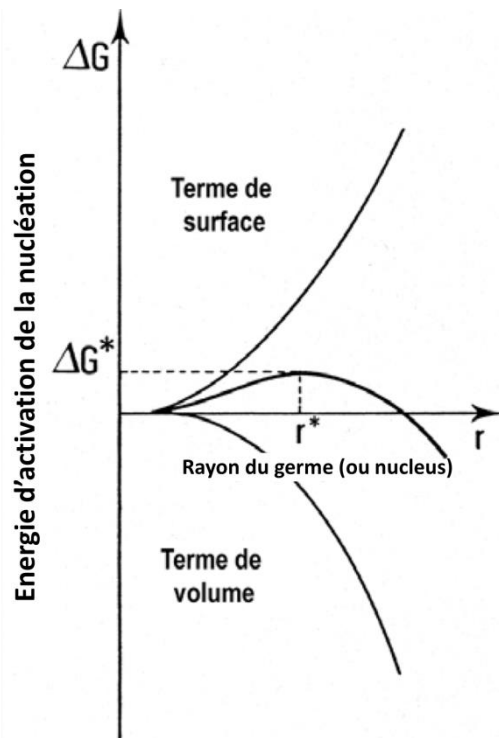


Figure 2 : Evolution de l'énergie d'activation de la nucléation ( $\Delta G$ ) en fonction du rayon  $r$  du germe (Boistelle, 1985).

Jusqu'à récemment, la nucléation d'une solution était décrite seulement par la théorie dite classique qui suppose, pour faire simple, que le germe croît à géométrie et structure constantes. Dans ce cas, la nucléation commence à partir du moment où un groupe de molécules a atteint la taille critique  $r^*$  (m), calculée grâce à l'équation de Gibbs-Thomson (Kashchiev, 2000) :

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

Équation 5

Avec  $\Omega$  le volume d'une molécule dans le cristal ( $m^3$ ). Plus la sursaturation est élevée, plus la taille  $r^*$  du germe critique est faible et donc plus l'énergie libre d'activation critique  $\Delta G^*$  est faible (Boistelle, 1985).  $\Delta G^*$  correspondant à cet équilibre instable s'écrit :

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

Équation 6

### 1.2.1.2. Nucléation primaire hétérogène

Malgré la purification du milieu de cristallisation et la réduction des interactions entre le soluté et le cristallisateur, dans la plupart des cas une nucléation primaire hétérogène est observée. C'est-à-dire que la nucléation est induite par la présence d'un substrat étranger (paroi du cristallisateur, impureté, etc.). Ce substrat permet notamment au cristal de nucléer à des sursaturations plus faibles. En effet, lorsque le germe se forme sur un substrat, il n'est plus sphérique mais sous forme de calotte sphérique (Figure 3).



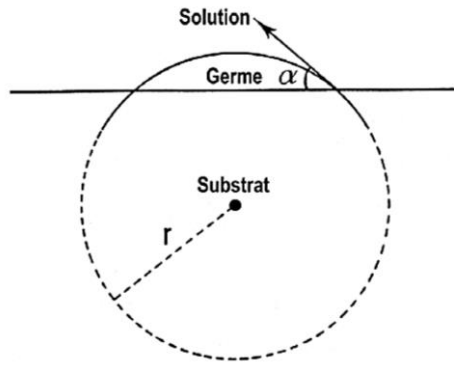


Figure 3 : Nucléation primaire hétérogène d'un germe, avec un angle de contact  $\alpha$  entre le germe et la surface (Boistelle, 1985).

Dans la nucléation hétérogène, le rayon de courbure critique de la calotte sphérique formée par le germe critique ( $r_{\text{het}}^*$ ) est le même que le rayon critique  $r^*$  formé par le germe critique sphérique en nucléation homogène. Cependant, moins de molécules sont nécessaires pour former une calotte sphérique en nucléation hétérogène que pour former une sphère complète en nucléation homogène. Ainsi cette taille critique correspond à une énergie libre d'activation critique de la nucléation hétérogène ( $\Delta G_{\text{het}}^*$ ) qui est inférieure ou égale à celle de la nucléation homogène ( $\Delta G^*$ ). En effet, le rapport entre ( $\Delta G_{\text{het}}^*$ ) et ( $\Delta G^*$ ) dépend de l'angle  $\alpha$  entre le germe et la surface du substrat, tel que :

$$\Delta G_{\text{het}}^* = f(\alpha) \times \Delta G^*$$

Équation 7

Le facteur  $f(\alpha)$ , compris entre 0 et 1, représente la partie thermodynamique de l'effet catalytique de la surface du substrat sur la nucléation (Ildefonso et al., 2013). Trois valeurs particulières de  $\alpha$  permettent de mieux comprendre le rôle du substrat dans la nucléation (Figure 4).

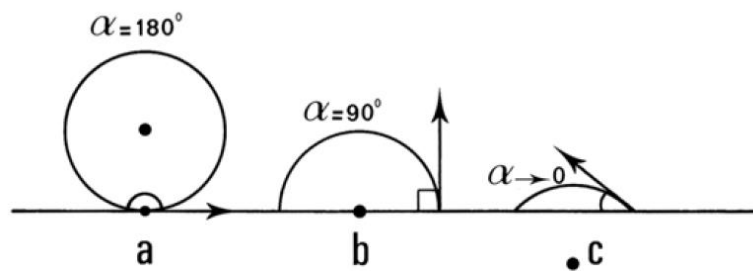


Figure 4 : Nucléation primaire hétérogène d'un germe sur la surface d'un substrat pour trois angles de contact  $\alpha$  différents. (a)  $\alpha = 180^\circ$ , (b)  $\alpha = 90^\circ$ , (c)  $\alpha$  tend vers  $0^\circ$  (Boistelle, 1985).

Si  $\alpha = 180^\circ$  (Figure 4a),  $\Delta G_{\text{het}}^* = \Delta G^*$ . Le germe est alors simplement posé sur le substrat, mais n'a aucune affinité particulière avec lui. Le système doit donc fournir autant d'énergie pour former le germe que dans le cas de la nucléation homogène. Si  $\alpha = 90^\circ$  (Figure 4b), le germe est coupé en son centre par le support, et forme une calotte semi-sphérique :  $\Delta G_{\text{het}}^* = \Delta G^*/2$ . Enfin, si  $\alpha$  tend vers 0 (Figure 4c),  $\Delta G_{\text{het}}^*$  tend aussi vers 0. Ainsi, plus l'affinité du germe pour la surface est grande, plus  $\alpha$  est petit et donc plus l'énergie libre d'activation de la nucléation est faible (Boistelle, 1985).

En pratique, le facteur  $f(\alpha)$  est introduit par l'énergie interfaciale effective, notée  $\gamma_{ef}$ , telle que :

$$\gamma_{ef} = f(\alpha)^{1/3} \gamma$$

Équation 8

Ainsi,  $\gamma_{ef}$  tient compte à la fois de la nucléation primaire homogène et de la nucléation primaire hétérogène.  $\gamma_{ef}$  prend également en compte tous les types d'hétérogénéité pouvant exister (paroi du cristalliseur, poussière, interface, bulle, etc.).

Par exemple, pour une même condition de cristallisation du lysozyme, la littérature propose des valeurs de  $\gamma_{ef}$  différentes. Or s'il s'agissait de nucléation homogène, toutes les valeurs mesurées de  $\gamma_{ef}$  seraient identiques, quelle que soit la technique utilisée. Ainsi, la dispersion des valeurs de  $\gamma_{ef}$  observées dans la littérature montre que dans la très grande majorité des cas il s'agit de nucléation hétérogène et non homogène (Ildefonso et al., 2013).

### 1.2.2. Mécanisme de nucléation en deux étapes

La théorie classique de la nucléation considère que les étapes de densification de la solution d'une part et d'arrangement des molécules en un état ordonné d'autre part se font simultanément. Cependant, bien qu'il ait l'avantage de la simplicité, ce modèle ne semble pas correspondre parfaitement aux observations expérimentales (Erdemir et al., 2009).

Un modèle alternatif en deux étapes a donc été proposé (Wolde and Frenkel, 1997). Dans un premier temps, les molécules se regroupent en une phase amorphe dense sur le modèle d'une séparation de phase liquide-liquide, puis dans un second temps, ces molécules s'organisent (Figure 5). Cette deuxième étape est limitante dans le cas de la cristallisation des protéines à cause de leur taille importante, ce qui expliquerait pourquoi il est plus difficile de faire nucléer des protéines que des petites molécules (Knezic et al., 2004). Les deux théories, « classique » et « en deux étapes », coexistent pour expliquer la formation des germes au sein d'une solution de cristallisation.

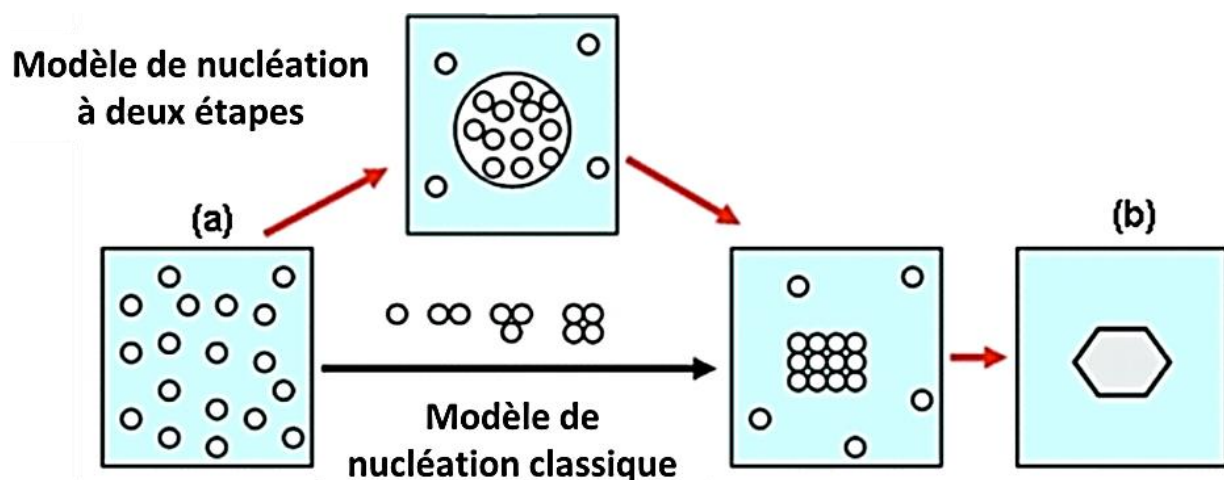


Figure 5 : Représentation des deux mécanismes de nucléation, partant de (a) une solution sursaturée vers (b) le cristal (Erdemir et al., 2009).

### 1.2.3. Fréquence de nucléation

La fréquence de nucléation est le nombre de cristaux formés dans une solution sursaturée par unité de temps et de volume (Boistelle, 1985) :

$$J = \frac{n_c}{V \times t_N}$$

*Équation 9*

Avec J la fréquence de nucléation (nombre de cristaux.m<sup>-3</sup>.s<sup>-1</sup>), n<sub>c</sub> le nombre de cristaux ayant nucléé dans la solution, V le volume total de la solution (m<sup>3</sup>) et t<sub>N</sub> le temps de nucléation (s). J dépend de la concentration de la solution par rapport à la phase qui va cristalliser. J est donc proportionnelle à n fois la solubilité (N<sub>0</sub>) exprimée en nombre de molécules par unité de volume, de sorte que (n × N<sub>0</sub>) soit égale à la concentration du soluté (Boistelle, 1985) :

$$J = nN_0\nu \exp\left(-\frac{16\pi \Omega^2 \gamma^3}{3 (kT)^3 (\ln\beta)^2}\right) = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right)$$

*Équation 10*

Où ν est la fréquence à laquelle chaque germe critique de taille r\* devient supercritique par addition d'une molécule, donnant un cristal. Notons que cette équation peut être généralisée pour les deux types de nucléation primaire (homogène et hétérogène) en y introduisant γ<sub>ef</sub> à la place de γ (Ildefonso et al., 2013).

Le terme (nN<sub>0</sub>ν) peut être décrit comme le facteur pré-exponentiel K<sub>0</sub>. K<sub>0</sub> est un facteur cinétique relié au taux d'attachement des molécules sur le germe critique. Il dépend ainsi de la mobilité moléculaire dans le système cristal/solution. L'Équation 10 montre que la fréquence de nucléation ne dépend pas seulement de la sursaturation β, mais également de la concentration des molécules. Dans des conditions équivalentes, γ compris la sursaturation, plus la probabilité de rencontres intermoléculaires est élevée, plus la nucléation est facile. Ainsi, pour les systèmes de faible solubilité, les molécules de soluté sont séparées par une plus grande distance et un plus grand nombre de molécules de solvant. La probabilité que les molécules entrent en contact est donc d'autant plus faible (Boistelle, 1985). Par conséquent, plus la matière est soluble, plus la fréquence de nucléation est élevée, augmentant ainsi la probabilité d'obtenir un cristal.

### 1.2.4. Obtention d'un monocristal de taille conséquente

Dans le cadre de la cristallisation des protéines à des fins structurales, la nucléation d'un cristal unique dans la solution (monocristal) est recherchée, afin de le faire croître jusqu'à une taille d'une centaine de micromètres. Ce cristal unique correspond à une fréquence de nucléation J=1. Cependant cette valeur de J est difficile à atteindre pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elle se situe dans une gamme de sursaturation très restreinte. La nucléation obéit en effet à une loi exponentielle, dite du « tout ou rien ». C'est-à-dire que l'on obtient en général soit de nombreux cristaux, soit aucun. D'autre part,

la nucléation est un phénomène stochastique, il est donc impossible de prévoir exactement le nombre d'événements de nucléation qui auront lieu dans un système donné, à un temps donné.

La nucléation est hautement dépendante de la sursaturation. Lorsque la sursaturation est faible, la solution peut rester métastable très longtemps, alors qu'à forte sursaturation, la nucléation a lieu spontanément. Dans le cas des protéines, cela se traduit par le fait qu'une condition conduisant à un grand nombre de cristaux peut être optimisée par une diminution de la sursaturation.

La fréquence de nucléation  $J$  est également affectée par l'énergie interfaciale  $\gamma$  cristal/solution. En effet, plus  $\gamma$  est élevée, moins la molécule est soluble dans le solvant considéré, ce qui induit une valeur de  $J$  faible. De plus, lorsque  $\gamma$  augmente, la zone métastable où la nucléation n'a pas lieu spontanément, s'élargit drastiquement.

Pour la croissance d'un monocristal, la difficulté réside dans le fait que la croissance des cristaux se fait généralement à faible sursaturation, dans la zone métastable où la nucléation est cinétiquement inactive. C'est pourquoi les techniques d'ensemencement sont fréquemment utilisées. Cependant, dans le but de contrôler la cristallisation à partir d'une solution métastable, quelques auteurs ont proposé récemment des approches permettant de déclencher la nucléation par un champ externe magnétique (Astier et al., 1998, Sasaki et al., 1997, Surade et al., 2009, Wakayama, 2002, Sasaki, 2009), électrique (Hammadi et al., 2009, Koizumi et al., 2009, Moreno and Sasaki, 2004, Taleb et al., 1999) ou électromagnétique (Tyndall, 1869, Tam et al., 1975, Garetz et al., 1996, Veessler et al., 2006, Ikni et al., 2014). De plus, le contrôle spatio-temporel de la nucléation peut être induit par le confinement du volume de nucléation (Grossier et al., 2011b), et/ou par une action mécanique (Hammadi et al., 2015).

## 1.2.5. Réduction du volume du cristalliseur

### 1.2.5.1. Aspects cinétiques

Plus la sursaturation  $\beta$  est élevée, plus le cristal apparaît rapidement et plus le nombre de cristaux est important. Le temps d'induction de la nucléation  $t_N$  est le temps nécessaire pour obtenir un cristal détectable. Il correspond donc à la somme du temps transitoire nécessaire pour atteindre un état stable de la nucléation, du temps de nucléation et du temps requis pour que le germe critique atteigne une taille détectable.  $t_N$  est mesuré par l'observation du premier cristal, ou par un changement des propriétés physiques de la solution (diffusion de lumière, diffusion des rayons X aux petits angles, turbidité de la solution, indice de réfraction, ...). D'après l'Équation 9, le  $t_N$  de  $n_c$  cristaux s'écrit :

$$t_N = \frac{n_c}{J \times V}$$

Équation 11

$t_N$  dépend donc des mêmes paramètres que  $J$  ( $T$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , ...) (Équation 10) ainsi que du volume du cristalliseur. Pour une valeur de  $\beta$  (et donc de  $J$ ) donnée, plus le volume du

crystallisateur est réduit, plus le temps de nucléation est long. Ainsi, étudier la nucléation par exemple dans un système microfluidique (c'est-à-dire dans des volumes de l'ordre du nanolitre) nécessite de générer des sursaturations élevées pour obtenir des  $t_N$  raisonnables. C'est l'effet cinétique du confinement par le volume.

Il faut cependant prendre en compte que la nucléation est le plus souvent hétérogène. Dans ce cas, la nucléation n'a pas lieu dans le volume du système (une goutte par exemple) mais à sa surface, à l'interface entre la solution et le milieu extérieur. Ainsi, pour mesurer le temps de nucléation, ce n'est pas le volume qu'il faut prendre en compte, mais bien la surface  $S$  du système, telle que :

$$S = a V^{2/3}$$

*Équation 12*

Avec  $a$  le facteur de forme, qui dépend de la forme du système de nucléation. Pour un système sphérique,  $a = (36\pi)^{1/3}$ . Dans le cas de la nucléation hétérogène,  $t_N$  est donc proportionnel à  $1/S$ , soit à  $1/V^{2/3}$  (Kashchiev, 2011).

Pour des valeurs faibles de  $\beta$ , c'est-à-dire lorsque la solution se trouve dans la zone métastable, il est possible de favoriser la nucléation (et donc de réduire  $t_N$ ) en ajoutant une agitation, un ensemencement, des agents de cristallisation ou un champ externe.

### **1.2.5.2. Aspects thermodynamiques**

En plus de l'effet cinétique lié à la réduction du volume de cristallisation, une limitation thermodynamique à la nucléation apparaît. En effet, la théorie classique de la nucléation suppose un réservoir infini de molécules. Or, en milieu confiné, le volume est réduit et le nombre de molécules en solution est fini. La sursaturation n'est alors plus constante au cours du processus de nucléation mais diminue à mesure que les molécules sont intégrées dans le germe. L'appauvrissement de la solution augmente ainsi la taille critique du germe nécessaire à la croissance d'un cristal (Équation 5). Le volume de la goutte étant fini, le germe précritique peut donc, en théorie, ne jamais atteindre la taille critique (Grossier and Veessler, 2009). En d'autres termes, en dessous d'une sursaturation initiale critique, aucun cristal ne peut apparaître. Ainsi, plus le volume de cristallisation est faible, plus la nucléation est difficile (Hammadi et al., 2013). Dans les systèmes microfluidiques utilisant de très petits volumes, des solutions étonnamment hautement sursaturées sont métastables à cause des effets combinés des confinements cinétique et thermodynamique. Il a cependant été montré pour une protéine modèle, le lysozyme, que cet effet de confinement thermodynamique n'apparaît qu'à partir de volumes de l'ordre du picolitre (Grossier and Veessler, 2009, Hammadi et al., 2015).

## **1.3. Croissance cristalline**

Une fois que les germes sont apparus en solution, leurs faces vont croître à des vitesses qui dépendent non seulement du milieu de croissance, mais également de leur nature et des défauts qu'elles présentent.

### 1.3.1. Face, forme, morphologie et faciès

Un cristal est limité par un ensemble de faces et est défini par le système cristallin auquel il appartient. Un même système cristallin peut donner lieu à des ensembles de faces différents, se déduisant les uns des autres grâce aux éléments de symétrie du cristal. Chaque ensemble constitue une forme. L'ensemble des formes qui apparaissent sur le cristal donne la morphologie du cristal. La notion de faciès est plus large, et correspond à l'aspect extérieur du cristal. Par exemple, sur la Figure 6, les cristaux prismatique et aciculaire ont la même morphologie, mais des faciès différents. Le terme « morphologie » est parfois utilisé en lieu et place du concept faciès, il s'agit en fait d'un abus de langage. C'est le développement relatif des faces entre elles qui intervient dans la notion de faciès (Boistelle, 1985). Le faciès cristallin peut être influencé par le milieu de croissance, la présence d'impuretés ou la sursaturation.

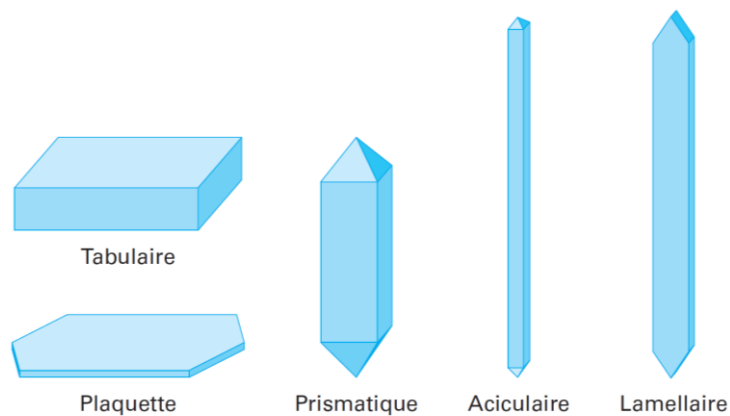


Figure 6 : Principaux types de faciès cristallins (Bauer, 2004).

### 1.3.2. Forme de croissance

La forme de croissance du cristal ne comporte que les faces dont la cinétique de croissance est la plus lente. Ceci est illustré dans la Figure 7 avec l'exemple de la croissance d'un cristal de BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) (Astier and Veesler, 2008).

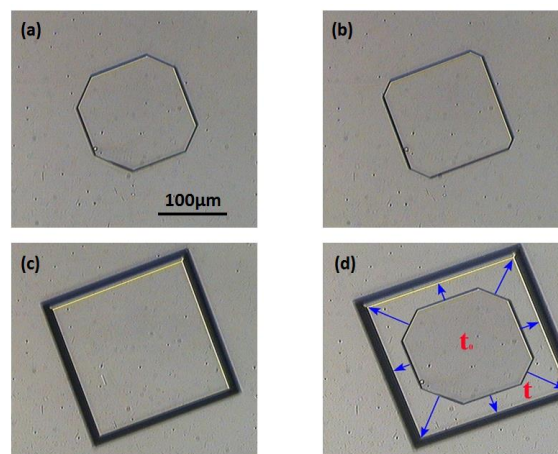


Figure 7 : Croissance d'un cristal de BPTI dans 350mM de KSCN à pH 4,9. Les photographies (a) à (c) sont des images obtenues à différentes températures montrant l'évolution de la forme de croissance du cristal au cours du temps, comme illustré en (d), où les flèches indiquent le déplacement des faces en fonction du temps (Astier and Veesler, 2008).

Supposons qu'un cristal soit limité par des faces de natures différentes dont les vitesses de croissance sont sensiblement différentes. Au temps  $t_0$ , ce cristal a une certaine forme (Figure 7a). Au temps  $t$ , toutes les faces se sont déplacées parallèlement à elles-mêmes et ont parcouru des distances proportionnelles à leurs vitesses de croissance (Figure 7c). Le déplacement des faces est représenté par des flèches sur la Figure 7d. La forme du cristal au temps  $t$  est nettement différente de celle à  $t_0$ . Les faces les plus lentes (vecteurs courts) prennent de l'extension, alors que les faces rapides (vecteurs longs) s'amenuisent. Les faces les plus rapides peuvent entièrement disparaître, tandis que les faces très lentes peuvent apparaître au cours de la croissance du cristal. La forme de croissance dépend donc de facteurs cinétiques.

La forme d'équilibre au contraire dépend de facteurs purement thermodynamiques. Parmi les faces possibles, ce sont celles qui ont la plus faible énergie interfaciale  $\gamma$  qui sont les plus développées dans la forme d'équilibre. D'autre part, si la sursaturation  $\beta$  varie, seule la taille du cristal change, la forme d'équilibre reste identique (Boistelle, 1985).

## 1.4. Polymorphisme et transition de phase

### 1.4.1. Polymorphisme

Un cristal est caractérisé par un arrangement régulier et périodique des atomes et/ou des molécules qui le composent. Des polymorphes ont exactement la même composition chimique, mais des structures cristallines différentes (Figure 8c). Cependant, le polymorphisme n'est pas le seul moyen pour un solide d'exister sous plusieurs formes. En effet, les phases d'un composé diffèrent à la fois par leur structure cristalline et leur composition chimique. Ainsi, dans certains cas, la cristallisation d'une molécule dans des solutions différentes, c'est-à-dire en présence d'agents de cristallisation ou de solvants différents, ne permet pas d'obtenir différents polymorphes, mais bien des phases différentes. Les agents de cristallisation et le solvant font alors partie intégrante de la structure du cristal obtenu (Figure 8a). Néanmoins, ces différentes phases sont, en pratique, également appelées polymorphes, ou pseudo-polymorphes, par abus de langage (Mangin et al., 2008). Enfin, les co-cristaux sont des ensembles à plusieurs composants maintenus ensemble par des interactions réversibles, non covalentes (par exemple une protéine et son ligand, Figure 8b) (Schultheiss and Newman, 2009).

Les polymorphes comme les différentes phases cristallines sont bien des solides différents, avec des propriétés physiques différentes. Un exemple bien connu est celui du diamant et du graphite, deux solides composés exclusivement de carbone, mais ayant des propriétés physiques très différentes : résistance mécanique, conductivité... De la même façon, deux polymorphes auront des densités, des solubilités, des faciès ou des propriétés optiques différent(e)s (Mangin et al., 2008).

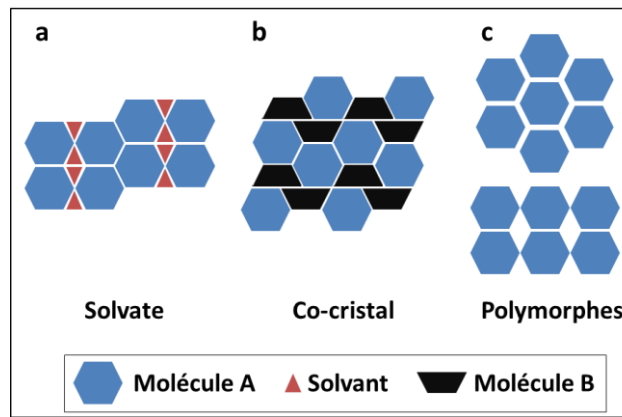


Figure 8 : Différents types de cristaux (Schultheiss and Newman, 2009).

### 1.4.2. Transition de phase

Le polymorphisme est dû au fait que la cristallisation est à la fois un processus thermodynamique et cinétique. La cinétique peut favoriser la formation de la forme métastable, tandis que la thermodynamique favorise la formation de la forme stable (Bernstein, 2002). En effet, d'un point de vue thermodynamique, dans une condition donnée (température, pression, ...), il n'existe qu'une seule phase stable, pour laquelle l'énergie libre du système est minimale. Les autres phases sont donc métastables, comme par exemple le diamant est une phase métastable du carbone. Lorsque la phase métastable cristallise en premier, celle-ci se transformera théoriquement en la phase stable à la fin de la cristallisation. C'est une transition de phase, qui peut être infiniment lente ou relativement rapide en fonction du système étudié (molécule, condition de cristallisation, ...). Il est difficile de prédire quelle phase sera produite dans un système donné. D'autre part, une petite variation de température peut entraîner une transition de phase (Mangin et al., 2008).

## 1.5. Mûrissements

Dans un système fermé, la sursaturation de la solution diminue progressivement à mesure que les cristaux se forment et croissent, entraînant ainsi une diminution de la cinétique de la cristallisation. Le système se déplace alors vers un équilibre entre le cristal (ou les cristaux) et la solution : c'est la fin de la cristallisation.

### 1.5.1. Mûrissement d'Oswald

Lorsque la nucléation et la croissance de la phase stable sont terminées, la solution peut contenir un grand nombre de cristaux de taille et parfois de faciès différents. Cette variété est due à la diminution de la sursaturation au fil des nucléations : les cristaux ont nucléé dans des conditions différentes (Candoni et al., 2012a).

D'après l'Équation 5, seuls les cristaux qui ont atteint la taille critique  $r^*$  sont stables en solution. Or cette taille critique à atteindre augmente à mesure que la sursaturation diminue. Ainsi, à toute sursaturation correspond une taille critique  $r^*$  pour laquelle il n'y a ni croissance, ni dissolution. Tout cristal ayant un rayon  $r < r^*$  se dissout, car, pour lui, la solution est sous-saturée. Au contraire, tout cristal ayant un rayon  $r > r^*$  croît, car pour lui, la



solution est sursaturée (Boistelle, 1985). Ainsi, la matière provenant d'un petit cristal en voie de dissolution est immédiatement récupérée par un cristal voisin plus gros qui en profite pour croître. C'est le mûrissement d'Oswald, un phénomène isotherme. Dans le cas de la cristallisation des protéines, ce phénomène est à l'origine de la croissance de cristaux à partir de certains précipités (Ng et al., 1996). Ces précipités sont en fait composés de microcristaux, les plus petits se dissolvent tandis que les plus gros croissent (Figure 9).

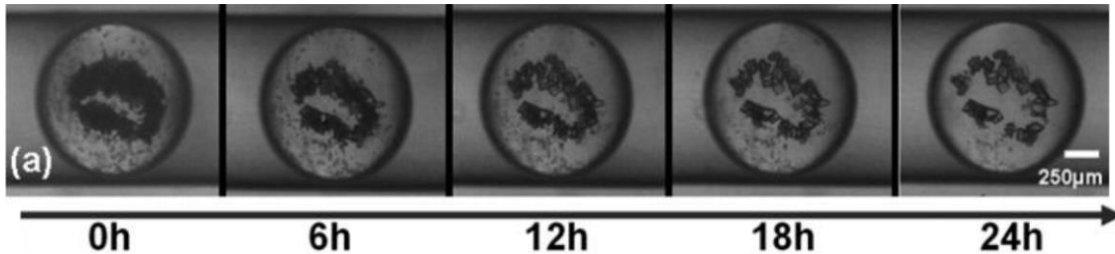


Figure 9 : Mûrissement d'Oswald observé pour la rasburicase. Le précipité observé au moment de la formation des gouttes conduit à la formation de cristaux (Zhang et al., 2015a).

### 1.5.2. Mûrissement cinétique

Dans le cas des protéines, les cinétiques de croissance et de dissolution sont très lentes lorsque la concentration est proche de la solubilité. Le mûrissement d'Oswald est donc rarement observé. Le mûrissement peut cependant être activé par des fluctuations de température aux alentours de la température d'équilibre : c'est le mûrissement cinétique (Boistelle et al., 1992). La Figure 10 montre deux cas de mûrissement cinétique de cristaux de  $\alpha$ -amylase. La Figure 10a présente le cas d'une large distribution en taille des cristaux. Dans un premier temps, une augmentation de la température de quelques degrés conduit à la dissolution des cristaux, petits et gros (Figure 10b). Les plus petits contenant moins de matière, ils se dissolvent plus vite. La température est ensuite diminuée, de façon à empêcher la dissolution complète des gros cristaux. Ces derniers grossissent donc en incorporant la matière disponible en solution suite à la dissolution des petits cristaux (Figure 10c). Cette méthode peut également être appliquée aux cristaux maclés (Figure 10d-f) ou aux précipités (Astier and Veesler, 2008).

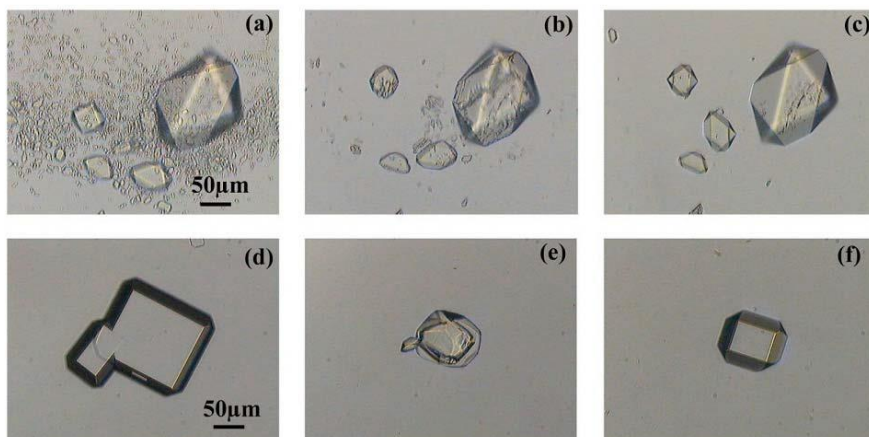


Figure 10 : Mûrissement cinétique de cristaux de  $\alpha$ -amylase en (a) par (b) dissolution partielle et (c) re-croissance. Elimination d'un défaut macroscopique observé en (d) par (e) dissolution et (f) croissance (Astier and Veesler, 2008).

## 1.6. Criblage et optimisation des conditions de cristallisation

### 1.6.1. Principe

La croissance de cristaux de protéine de qualité suffisante est très certainement l'étape limitante de la détermination de structures tridimensionnelles par diffraction des rayons X (DRX). L'identification de bonnes conditions de cristallisation est donc primordiale. De nombreuses variables interviennent dans le phénomène de cristallisation : la nature et la concentration de(s) agent(s) de cristallisation, la nature du tampon et son pH, la concentration en soluté, la méthode de cristallisation, la présence éventuelle d'additifs, etc. Les premières expériences de cristallisation sont généralement basées sur le principe de l'essai-erreur, dont le but est de balayer un éventail aussi large que possible de conditions de cristallisation. C'est le criblage des conditions de cristallisation (Jancarik and Kim, 1991).

Dans le cadre de la cristallisation des protéines, des kits de criblage sont disponibles commercialement. Ils contiennent de nombreuses solutions, très diverses en termes d'agents de cristallisation, de tampons, ou de pH. De nombreuses conditions peuvent ainsi être couvertes. Cette étape nécessite donc généralement une très grande quantité d'échantillon. Il est cependant rare d'obtenir des cristaux de qualité suffisante pour la DRX dès l'étape de criblage. A ce stade, les éléments suivants sont généralement observés : rien, précipitation, multitude de microcristaux (qui ressemble souvent à un précipité), ou quelques très petits cristaux (Smyth and Martin, 2000).

Le criblage permet ainsi d'estimer une condition de cristallisation, qui doit ensuite être affinée dans une étape d'optimisation. L'objectif est de trouver la meilleure condition possible pour la croissance de gros cristaux de qualité suffisante pour la DRX. Bien que simple en principe, l'optimisation est exigeante. Tout d'abord, le nombre de paramètres, parfois grand, peut compliquer l'identification des paramètres pertinents. Il faut également déterminer sur quelle plage faire varier chaque paramètre. Cette étape peut également nécessiter une quantité importante d'échantillon. Ainsi, l'efficacité et l'économie de matière première deviennent des points clefs des étapes de criblage et d'optimisation (McPherson and Cudney, 2014).

### 1.6.2. Robots de cristallisation

Les robots de cristallisation sont très largement utilisés afin de cribler rapidement un très grand nombre de conditions de cristallisation différentes (parfois plus d'un millier) en utilisant un minimum d'échantillon. De nos jours, il existe une grande variété de robots de cristallisation, généralement optimisés pour une ou deux techniques de cristallisation : diffusion de vapeur en gouttes assises ou suspendues, batch ou contre-diffusion (Ferrer et al., 2013).

Les systèmes les plus populaires sont des robots spécifiquement dédiés à la cristallisation, utilisant la méthode de la goutte assise (§ 2.2.3). De nombreux systèmes sont

disponibles commercialement, tels que le Mosquito<sup>®</sup> (TTP LabTech), le Oryx8 (Douglas Instruments Ltd), et le Phoenix (Art Robbins Instruments). Ces systèmes sont généralement utilisés avec des plaques de cristallisation de 96 puits et dispensent typiquement des gouttes hautement reproductibles de 100nL à 100µL. Leur utilisation est largement répandue dans les laboratoires de cristallogénèse (Ferrer et al., 2013).

Il existe également des systèmes plus spécialisés pour la cristallisation de protéines membranaires. Un robot permettant de manipuler des fluides très visqueux comme la phase lipidique cubique (*Lipidic Cubic Phase*, LCP), utilisée pour maintenir un environnement analogue à une membrane pour les protéines membranaires intégrales, a été développé. Il permet de former des gouttes de 20 à 50nL de LCP avec 1µL d'agent de cristallisation (Cherezov et al., 2004). Cette technologie est aujourd'hui implémentée dans différents robots commerciaux, comme le Mosquito<sup>®</sup> LCP (TTP LabTech), le Gryphon LCP (Art Robbins Instruments), le Flexus<sup>®</sup> Crystal IMP (Anachem/Gilson) ou le NT8-LCP (Formulatrix).

Une autre approche vise à accroître l'étendue des conditions de cristallisation explorées dans un volume limité en utilisant la méthode de la contre-diffusion. Cela a conduit à l'utilisation de canaux, seuls ou intégrés dans des puces microfluidiques. Certains de ces systèmes peuvent être facilement chargés manuellement, mais d'autres nécessitent des pompes spéciales, ou même une station complète de chargement automatique. De nombreux systèmes sont aujourd'hui commercialisés, comme le Crystal Harp<sup>™</sup> (Molecular Dimensions), le TOPAZ<sup>®</sup> (Fluidigm), le CrystalSlide<sup>™</sup> (Greiner Bio-One), et la Granada Crystallization Box<sup>®</sup> (Triana Sci&Tech) (Ferrer et al., 2013).

## 1.7. Systèmes biologiques étudiés

Cette partie est consacrée à la description des deux protéines étudiées au cours de ce travail, une protéine modèle, le lysozyme, et une protéine d'intérêt pharmaceutique, la quinone réductase de type 2.

### 1.7.1. Lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire constituée de 129 acides aminés (Figure 11a) pour un poids moléculaire de 14,3 kDa (soit 14307g/mol). Cette enzyme est présente chez de nombreuses espèces d'animaux, dont des vertébrés, des insectes et des acariens. Elle est, entre autres, présente dans un grand nombre de sécrétions (larme, salive, mucus...) et dans le blanc d'œuf. Chez l'homme, cette protéine comprend 130 acides aminés. Le lysozyme dispose de propriétés antibactériennes. En effet, cette enzyme catalyse l'hydrolyse des peptidoglycanes présents à la surface des cellules bactériennes, entraînant la rupture (ou lyse) de leur membrane. Les propriétés antibactériennes du lysozyme sont actuellement utilisées pour des traitements antiseptiques locaux, comme par exemple dans la Lysopaïne<sup>®</sup> (Erlandsen et al., 1974, Pellegrini et al., 1992). Son coefficient d'absorption massique à la longueur d'onde 280nm est de 2,64mL.mg<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (soit 264L.g<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup>).

Depuis la résolution de sa structure par DRX en 1962 (Blake et al., 1962), le lysozyme est très fréquemment utilisé comme molécule modèle pour étudier la cristallisation des protéines (Durbin and Feher, 1986). Le lysozyme est généralement cristallisé dans un tampon d'acétate de sodium à pH 4,5, dans le NaCl (Figure 11b), mais cristallise également en présence d'un mélange de polyéthylène glycol (PEG) et de NaCl. Les PEGs sont des polyéthers linéaires de masse molaire inférieure à 20000 g.mol<sup>-1</sup>, fréquemment utilisés pour la cristallisation des protéines (McPherson, 1976). Ils sont disponibles dans une large variété de longueurs. Pour la cristallisation du lysozyme, on utilise généralement le PEG-5000, c'est-à-dire que le poids moléculaire de la chaîne est de 5000g.mol<sup>-1</sup> (ou Da).

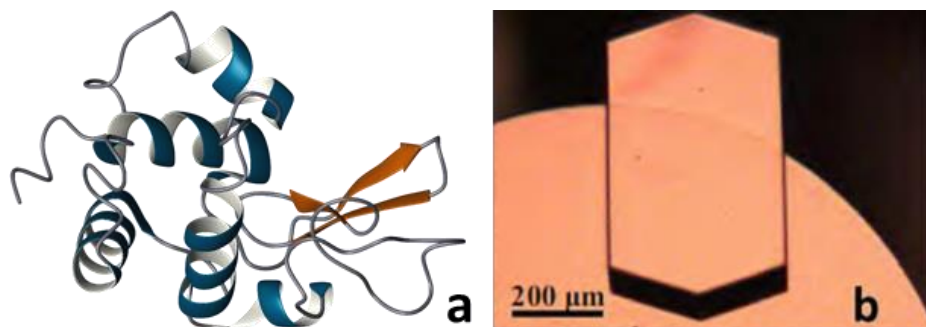


Figure 11 : (a) Représentation de la molécule de lysozyme qui provient du blanc d'œuf et (b) Cristal de lysozyme (Ildefonso, 2012).

### 1.7.2. QR2

La quinone réductase de type 2 (QR2) est une flavoprotéine impliquée dans la détoxification de quinones non physiologiques (Heyno, 2009). Elle catalyse la réduction de quinones en dihydroquinones selon un transfert à 2 électrons. Cette enzyme ubiquitaire utilise un cofacteur, le FAD (Flavine adénine dinucléotide, Figure 12) chez les mammifères et certaines bactéries, ou le FMN (Flavine mononucléotide) chez les plantes, champignons, ou bactéries.

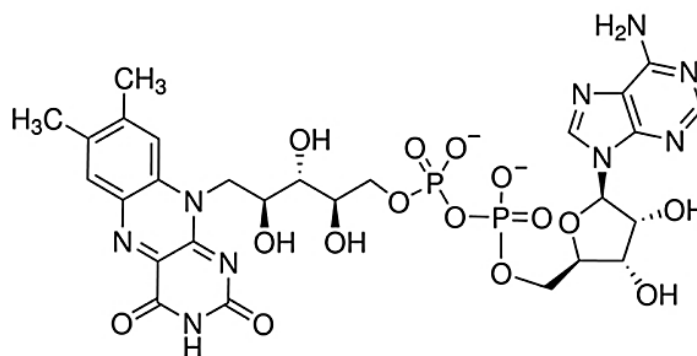


Figure 12 : Formule chimique du FAD

Les rôles physiologiques de la QR2, soupçonnés ou avérés, sont multiples. Tout d'abord, la QR2 semble occuper un rôle central dans les maladies neurodégénératives. En effet, cette enzyme est impliquée dans la maladie de Parkinson (Fu et al., 2008), dans la maladie d'Alzheimer (Hashimoto and Nakai, 2011) ainsi que dans la sénilité (Benoit et al., 2011). Par ailleurs, la QR2 joue un rôle dans le stress oxydatif (Nosjean et al., 2000). Enfin, si

la réduction de quinones en dihydroquinones est généralement détoxifiante, dans certains cas cette réaction conduit à la bioactivation de composés cytotoxiques, comme la ménadione, analogue synthétique de la vitamine K (Celli et al., 2006). L'incrimination de la QR2 dans l'induction de toxicité de l'herbicide paraquat chez l'Homme (Janda et al., 2013) confirme également son rôle bioactivateur. Cette propriété de l'enzyme est utilisée pour l'activation de la mitomycine C, précurseur de l'anti-tumoral CB1954 (Celli et al., 2006). Cette protéine d'intérêt pharmaceutique est actuellement étudiée à l'Institut de Recherches Servier.

De nombreux ligands de la QR2, naturels (Resvératrol, Mélatonine, etc.) ou synthétiques, sont connus (Buryanovskyy et al., 2004, Nosjean et al., 2000). L'Institut de Recherches Servier possède un nombre important de molécules potentiellement inhibitrices de l'activité de la QR2. Une approche globale de co-cristallographie avec ces dizaines de molécules est capitale pour mieux comprendre les règles stériques et chimiques auxquelles obéissent ces molécules. L'approche HTS (*High Throughput Screening* ou criblage à haut débit) de cristallographie s'inscrit parfaitement dans ce contexte.

La QR2 humaine est un homodimère de 52KDa, de 230 résidus par monomère (Foster et al., 1999). L'enzyme comprend deux sites actifs indépendants avec ancrage non covalent du FAD. Un atome de Zinc par monomère est tétra-coordonné en C-ter (Figure 13a). Aujourd'hui, de nombreuses structures de la QR2 (environ 60), seules ou en complexe avec différents partenaires (substrats, co-substrats, inhibiteurs...), sont déposées dans la PDB (*Protein Data Bank*). Les cristaux de QR2 (Figure 13b) sont généralement obtenus par diffusion de vapeur en présence de sulfate d'ammonium à 20°C. Deux tampons de cristallisation sont connus pour cette protéine : tampon 0,1M HEPES pH7 avec 1,4M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou tampon 0,1 M Tris pH8 avec 1,4M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Foster et al., 1999). La concentration en QR2 est, quant à elle, comprise entre 20 et 30mg/mL. Le groupe d'espace des cristaux obtenus est  $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}_1$ . Son coefficient d'absorption massique à 280nm est de  $1,74 \text{ mL}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (soit  $174 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

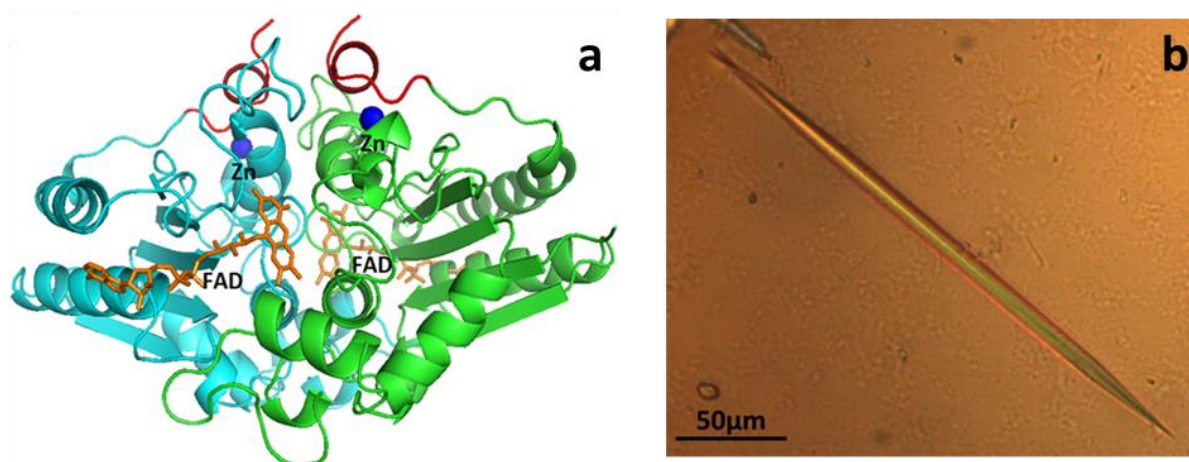


Figure 13 : (a) Structure de la QR2 (1QR2 sur la PDB) et (b) Cristal de QR2.

## Chapitre 2. Cristallisation des protéines en microfluidique

La microfluidique est le terme général désignant l'ensemble des technologies qui permettent de manipuler des fluides à une échelle submillimétrique (du microlitre au femtolitre). Les systèmes microfluidiques permettent aujourd'hui de réaliser de multiples opérations (mélange, analyse, séparation, etc.), et sont donc largement appliqués dans de nombreux domaines.

Les systèmes microfluidiques représentent en effet une approche évolutive pour le haut débit en biologie ou en chimie, et plus particulièrement pour le criblage à haut débit (ou HTS, *High Throughput Screening*), de par les faibles volumes mis en jeu. L'automatisation et la miniaturisation ont permis à ces systèmes de prouver leur efficacité pour de nombreux types de criblage, et de réduire les temps nécessaires aux tests grâce à des acquisitions de données à haut débit, sans perdre en sensibilité (Zhu and Fang, 2013). D'autre part, la microfluidique permet d'éviter les effets de la gravité et donc les instabilités convectives dues à la turbulence. Elle permet ainsi de déterminer des itinéraires cinétiques grâce au contrôle précis du transfert de matière (concentration, diffusion) et de la chaleur (Leng and Salmon, 2009). Les applications sont donc multiples : tests cellulaires, nucléation de petites molécules ou de protéines, enzymologie, PCR numérique...

De plus, la microfluidique offre la possibilité de réaliser des expériences en parallèle. Cela permet soit de cribler un grand nombre de conditions différentes, soit de réaliser une approche statistique d'un phénomène aléatoire. Par ailleurs, en utilisant de faibles quantités de matière première, cette technologie permet de réduire les coûts, mais aussi la pollution engendrée par l'utilisation de ces produits (par exemple pour des produits radioactifs). Enfin, les systèmes microfluidiques présentent une grande adaptabilité. Ces intérêts multiples expliquent le développement rapide que connaît le secteur des systèmes microfluidiques, notamment dans le domaine de la cristallisation des protéines.

La cristallisation des protéines reste encore le plus souvent basée sur le principe empirique de l'essai-erreur, et le criblage des conditions de cristallisation occasionne trop souvent des pertes de temps et de matériel biologique. D'autre part, en recherche pharmaceutique, la co-cristallisation d'une protéine-cible avec de nombreux ligands différents est souvent utilisée pour l'identification et la conception de nouveaux candidats-médicaments. C'est le *Structure-Based Drug Design* (Blundell, 1996). Cependant, les protéines sont généralement disponibles en faible quantité et onéreuses à produire. Les volumes mis en jeu dans les tests de cristallisation sont donc un point clef dans la réduction du coût des expériences. D'autre part, une approche à haut débit de la cristallisation et surtout de la co-cristallisation est nécessaire pour la recherche industrielle et le *drug design*.

La microfluidique apparaît alors comme un outil adapté, permettant de réduire le coût de chaque expérience à la fois en termes de temps et de quantité de matière, tout en

augmentant le nombre d'expériences en parallèle. De plus, la parallélisation des expériences permet d'éliminer les faux positifs et/ou les faux négatifs possibles. En effet, plus une condition est reproduite, plus les données statistiques obtenues sont fiables. D'un point de vue statistique, les données peuvent être considérées comme fiables à partir de 50 expériences par condition, ce qui correspond à une dispersion d'environ 15% (Galkin and Vekilov, 1999). Il s'agit donc de trouver un équilibre entre économie de matières et répétition des expériences.

Dans cette partie bibliographique de la cristallisation en microfluidique, différents types de systèmes microfluidiques sont tout d'abord décrits. Les différentes méthodes existantes pour réaliser le criblage des conditions de cristallisation en microfluidique sont ensuite exposées. Enfin l'analyse des cristaux obtenus en microfluidique par diffraction des rayons X est traitée.

## 2.1. Systèmes microfluidiques

### 2.1.1. Principaux matériaux utilisés

De nombreux matériaux sont utilisés pour fabriquer des systèmes microfluidiques. En règle générale, le choix du matériau de fabrication est déterminé par plusieurs facteurs, tels que l'équipement et les technologies disponibles, le coût, la rapidité d'usinage, les applications du dispositif, et la nature des solutions utilisées (aqueuses, organiques, ...).

L'un des matériaux les plus utilisés en microfluidique est le PDMS (Polydiméthylsiloxane). Il s'agit d'un élastomère hydrophobe souple, optiquement transparent, peu cher, et assez facile à préparer. Cependant, le PDMS est légèrement poreux à l'eau et aux gaz. De plus, il n'est pas compatible avec certains solvants organiques, tels que l'acétone par exemple (Fiorini and Chiu, 2005).

Les dispositifs en verre ou en quartz sont aussi couramment utilisés. En effet, le verre dispose de nombreux avantages : il est compatible avec tous les solvants, il est transparent, n'est pas perméable et sa surface est stable au cours du temps. Cependant, le coût élevé des puces en verre reste un facteur limitant quant à leur utilisation en tant que dispositifs jetables (Fiorini and Chiu, 2005).

Des matériaux thermoplastiques rigides, tels que le COC (Cyclic Olefin Copolymer) ou le PMMA (Polyméthylméthacrylate), sont également utilisés en microfluidique. Ces deux matériaux hydrophobes sont assez peu chers et relativement facile à préparer. Ils disposent d'une bonne clarté optique du visible à l'UV, sont transparents aux rayons X, ne sont pas perméables, et sont compatibles avec des échantillons biologiques. Cependant, ces polymères ne sont pas compatibles avec certains solvants organiques, tels que l'acétone pour le PMMA, ou le toluène pour le COC (Nge et al., 2013).

Enfin, les polymères fluorés, comme le PFA (Perfluoroalkoxy) ou le FEP (Fluorinated Ethylene Propylene) par exemple, présentent de nombreux avantages. Inertes chimiquement et flexibles, ils sont très hydrophobes, présentent une excellente résistance aux solvants organiques, et empêchent toute évaporation pendant plus d'une semaine (Ildefonso et al.,

2012a). Ils ne sont cependant pas totalement transparents dans l'UV ou aux rayons X, ce qui peut en limiter les applications dans le cadre de la cristallographie, notamment des protéines (Nge et al., 2013).

### 2.1.2. Systèmes intégrés complexes

Le but principal du développement des systèmes microfluidiques est de réduire les volumes nécessaires aux expériences de cristallisation, par rapport aux volumes utilisés par les robots de cristallisation. Certains systèmes microfluidiques peuvent être très complexes et coûteux. Il s'agit de puces microfluidiques intégrant un très grand nombre de fonctions (valves intégrées, pompes intégrées, mélangeurs, ...) et nécessitant un appareillage extérieur complexe (arrivées multiples de gaz sous pression par exemple).

Un exemple de ce type de puce est celle développée par Perry et al. (Perry et al., 2013). Il s'agit d'une plateforme microfluidique pour le criblage des conditions de cristallisation. Cette puce, de 24 ou 96 puits, est composée de COC, de PDMS et de Duralar® (Figure 14a). Elle intègre des manipulations de fluides automatisées complexes (Figure 14b).

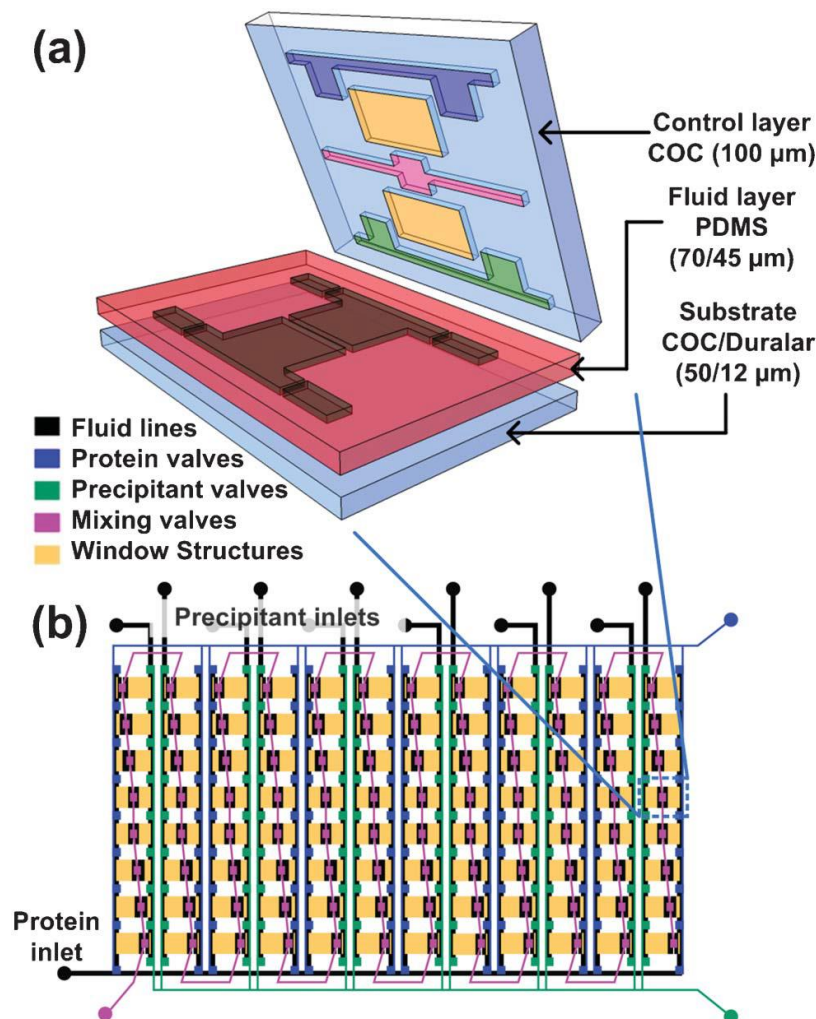


Figure 14 : (a) Schéma 3D éclaté montrant les matériaux utilisés pour former les différentes couches du dispositif microfluidique. (b) Représentation schématique d'une puce de 96 puits, montrant les différentes vannes et canaux permettant le remplissage des chambres avec les différents composants (protéine et agents de cristallisation) (Perry et al., 2013).



Cette puce est constituée de couples de deux puits distincts, pour les solutions de protéine et d'agent de cristallisation. Des canaux dédiés pour chaque ensemble de puits permettent le remplissage des deux solutions indépendamment. Une pompe à vide est reliée au dispositif pour actionner différentes vannes permettant de remplir la puce. Dans un premier temps, les solutions d'agents de cristallisation sont chargées dans la puce en actionnant la vanne correspondante. Puis le même procédé permet ensuite de charger la solution de protéine dans les canaux appropriés. La dernière vanne, située entre les deux premières, permet le mélange des deux solutions. Pour chaque couple agent de cristallisation–protéine, différents ratios de concentration sont testés simultanément, ce qui permet le criblage d'un grand nombre de conditions (Perry et al., 2014). Cependant ce type de puces, très complexe, a généralement un coût élevé, et peut s'avérer difficile à utiliser pour des non-spécialistes de la technique.

### 2.1.3. Simplification du système en puces

Des systèmes moins complexes ont été développés. L'un d'entre eux a été développé au LoF (Laboratory of the Future) par l'équipe de J.B. Salmon. Il s'agit d'une puce microfluidique en PDMS dans laquelle des gouttes sont générées par *flow-focusing* ou *cross-flowing* (§ 3.1) (Laval et al., 2009). En *cross-flowing*, la zone de génération permet d'introduire simultanément deux solutions miscibles « face à face » qui se mélangent juste avant la formation de gouttes. Ces gouttes sont séparées les unes des autres par une phase continue immiscible avec les deux premières solutions, généralement une huile (Figure 15a). Ainsi, le mélange n'est réalisé que quelques instants avant la formation des gouttes, évitant que la réaction n'ait lieu avant la génération des gouttes. Dans cette configuration, chaque puce correspond à une expérience unique.

Afin de réaliser simultanément des expériences de cristallisation dans des conditions différentes (températures, concentrations, etc.), une méthode utilisant deux types de puces microfluidiques a été développée. Les gouttes sont générées dans la *plug factory*, puis conservées dans une puce de stockage. La *plug factory* est reliée à la puce de stockage par un capillaire en téflon. Plusieurs puces de stockage peuvent alors être remplies à l'aide d'une seule *plug factory* en connectant le capillaire successivement à différentes puces de stockage (Figure 15b). Ainsi, en passant d'une puce de stockage à l'autre, il est possible de changer les conditions de température ou de concentration (Ildefonso et al., 2011).

Un exemple de cristallisation du lysozyme dans une puce en PDMS est présenté dans la Figure 16. La génération de nombreuses gouttes de composition identique (Figure 16a) permet de mettre en évidence la stochasticité de la nucléation. En effet la Figure 16b montre que sur quatre gouttes identiques (en termes de température, de volume et de composition chimique), seules deux ont donné naissance à un cristal de lysozyme.

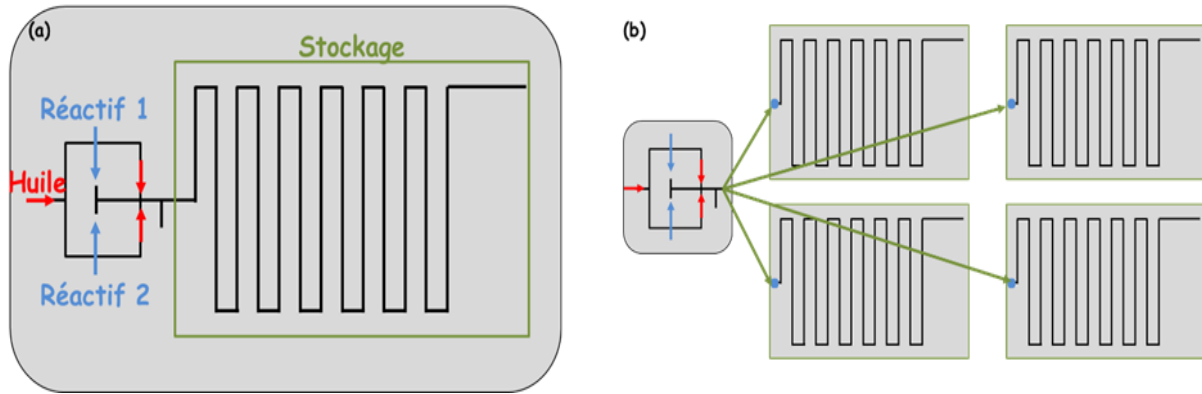


Figure 15 : (a) Puce microfluidique en un seul bloc, avec en rouge l'arrivée de la phase continue (une huile), en bleu l'arrivée des solutions de réactifs (par exemple solutions de protéine et d'agent de cristallisation), et en vert la zone de stockage des gouttes. (b) Utilisation de la puce microfluidique, une seule plug factory (à gauche) alimente en gouttes plusieurs puces de stockage (4 dans cet exemple).

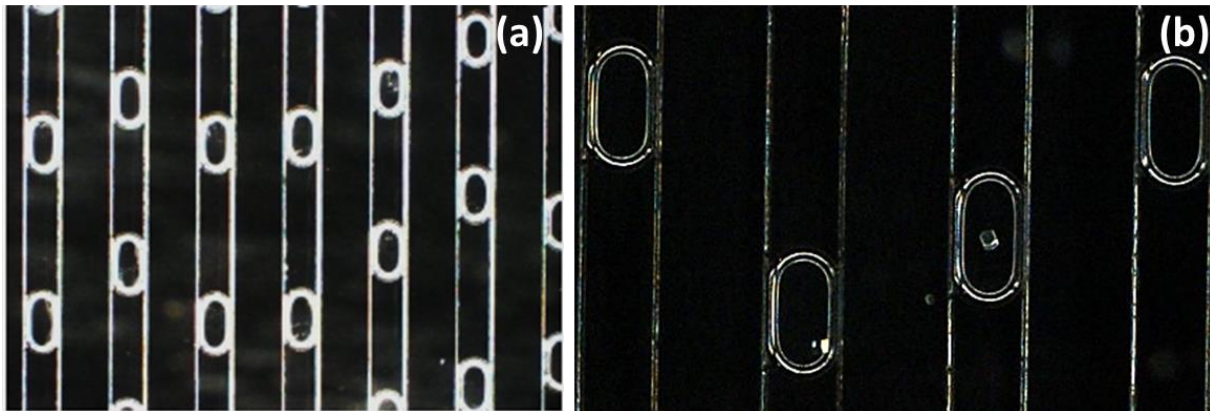


Figure 16 : Cristallisation du lysozyme dans une puce en PDMS. Photographie (a) des nombreuses gouttes stockées (b) de quatre gouttes, dont deux avec un monocristal de lysozyme. Modifié d'après (Ildefonso et al., 2011, Ildefonso et al., 2012b).

Cependant, le PDMS étant légèrement poreux à l'eau, il ne permet pas un stockage à long terme des gouttes, ce qui peut être limitant dans le cadre de l'étude de phénomènes lents comme la cristallisation (Candoni et al., 2012b). D'autres polymères ont donc été utilisés pour fabriquer les puces microfluidiques.

Un exemple de puce en COC a été développé en 2008 par Gerdts et al. (Figure 17a). Les différentes solutions (tampon, protéine et agent de cristallisation) sont mélangées en même temps que les gouttes sont générées, directement dans la puce (Figure 17b). La génération des gouttes nécessite cependant l'utilisation d'un robot, le *Plug Maker*<sup>TM</sup>. L'ensemble est aujourd'hui commercialisé par *Protein Biosolutions*. Un exemple d'application à la cristallisation de protéine (la ribose-phosphate pyrophosphokinase) est présenté dans la Figure 17c.

Ce type de système en puce est plus simple à utiliser que les puces intégrées très complexes présentées précédemment. Cependant, ces puces sont généralement à usage unique, et nécessitent des étapes de design et d'usinage qui peuvent être long. Leur géométrie est donc généralement figée.

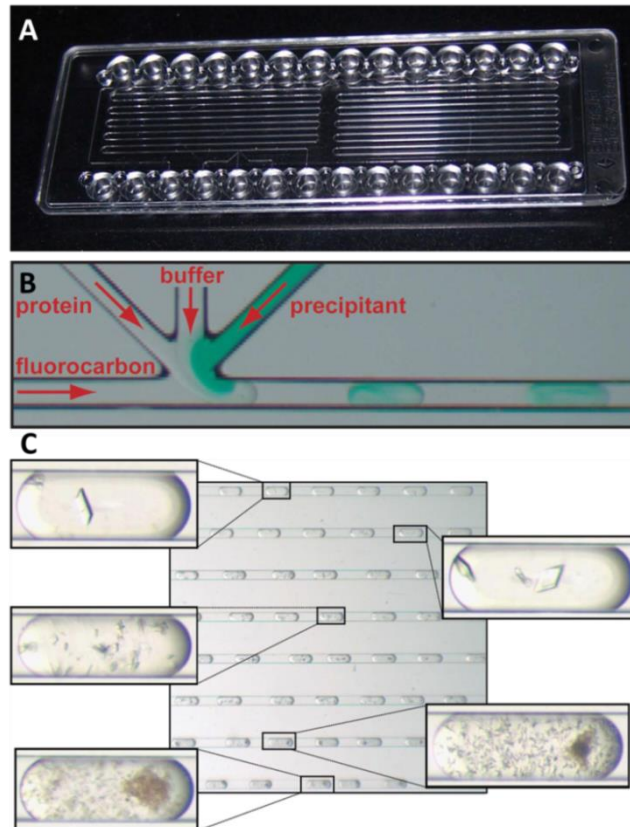


Figure 17 : (a) Photographie d'une puce montrant les deux micro-canaux (Christensen et al., 2011), (b) Microphotographie de la génération des gouttes dans une puce (Gerdtz et al., 2008), (c) Cristaux de la ribose-phosphate pyrophosphokinase obtenus dans la puce (Gerdtz et al., 2008). Le diamètre interne des canaux est de 200 $\mu$ m.

#### 2.1.4. Systèmes en capillaires

Idéalement, les dispositifs microfluidiques devraient permettre un prototypage rapide. Or le design des puces nécessite souvent des étapes de synthèse parfois longues et coûteuses, ou des techniques spécialisées. De plus, les puces créées ne sont pas toujours réutilisables. Pour pallier ces inconvénients, des systèmes microfluidiques permettant de générer des gouttes dans un capillaire avec du matériel de laboratoire commun ont été développés (Trivedi et al., 2010, Quevedo et al., 2005, Su et al., 2007). Ces systèmes microfluidiques ont ensuite été adaptés à la cristallisation des petites molécules (Dombrowski et al., 2007).

Il est en effet possible de simplifier le système de génération des gouttes grâce à l'utilisation de jonctions et de capillaires commerciaux. La microfluidique est ainsi plus facile de fabrication et d'utilisation, même pour des non-spécialistes. De plus, il existe un grand choix de matériaux pour les capillaires (différents polymères, verre, ...). Il est alors possible de choisir entre des surfaces hydrophiles ou hydrophobes, selon la nature des gouttes désirées. Il existe commercialement un large choix de longueurs et de diamètres internes et externes de capillaires. Enfin il est possible de choisir entre des jonctions en T (3 entrées), en croix (4 entrées) ou comprenant jusqu'à 7 entrées, adaptées aux diamètres interne et externe des capillaires. La microfluidique devient alors un outil polyvalent, facile à utiliser et peu coûteux (Trivedi et al., 2010).

Il existe ainsi des systèmes microfluidiques sans « puce ». Un exemple est celui développé par Zhang et al. (Zhang et al., 2015a), qui utilise des jonctions en PEEK (Polyetheretherketone), dérivées de la HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), pour générer les gouttes directement dans un capillaire en téflon (Figure 18). La géométrie utilisée est la même que dans une puce microfluidique, mais ces jonctions commerciales présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'étape de fabrication, il suffit de connecter le capillaire à la jonction pour générer des gouttes. Ce système a été appliqué au criblage des conditions de cristallisation de la rasburicase dans des gouttes de 65nL (Figure 19).

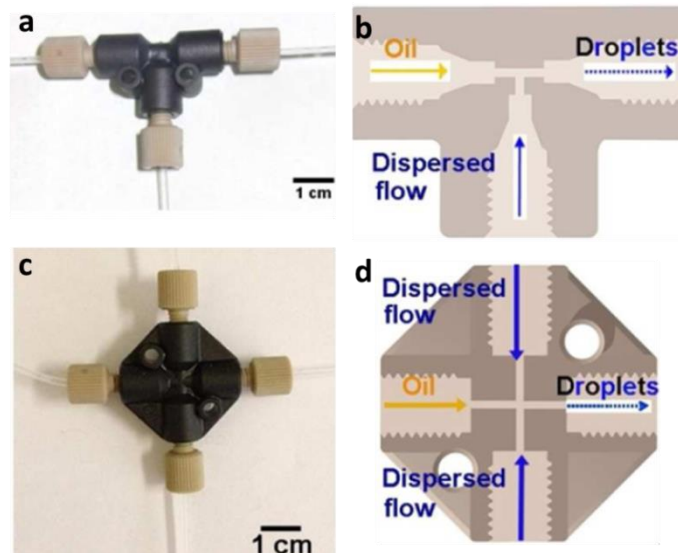


Figure 18 : Photographies et schémas des jonctions en PEEK dérivées de la HPLC permettant la génération des gouttes. (a) et (b) jonction en té ; (c) et (d) jonction en croix (Zhang et al., 2015a).

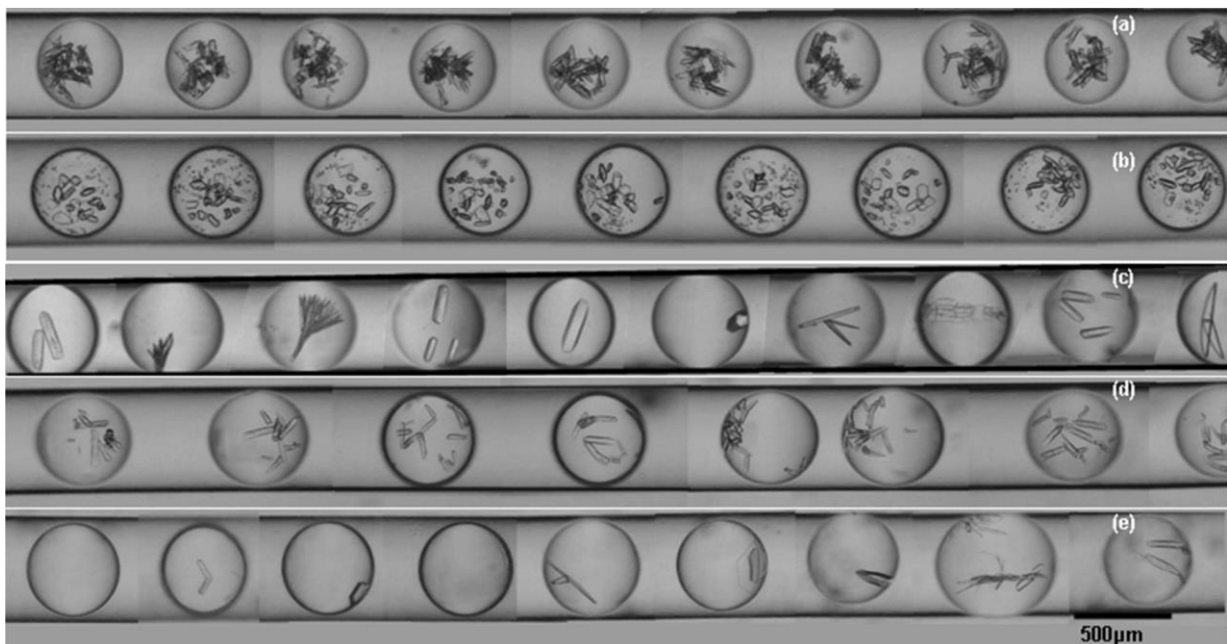


Figure 19 : Cristaux de rasburicase obtenus dans des gouttes de 65nL, dans des capillaires en téflon, pour différentes conditions de cristallisation. (a) PEG 10%, rasburicase 10mg/ml, 5°C. (b) PEG 10%, rasburicase 10mg/ml, 20°C. (c) PEG 5%, rasburicase 10mg/ml, 5°C. (d) PEG 7,5%, rasburicase 5mg/ml, 5°C (e) PEG 7,5%, rasburicase 5mg/ml, 20°C (Zhang et al., 2015a).

Chaque ligne de goutte correspond à une expérience de cristallisation indépendante et à une condition de cristallisation différente (concentration et/ou température). Un morphodrome de la cristallisation de la rasburicase est ainsi obtenu. Pour une même condition de cristallisation, différentes phases cristallines de la rasburicase (Vivares et al., 2006) peuvent être obtenues (aiguilles et plaquettes sur la Figure 19c par exemple), et une grande dispersion du nombre de cristaux est observée. Ces résultats mettent ainsi en évidence la stochasticité de la nucléation, et donc l'importance de la reproduction des expériences pour la réalisation d'études statistiques.

Ce système *plug and play* permet ainsi le prototypage rapide d'une géométrie microfluidique et les jonctions microfluidiques sont réutilisables, ce qui réduit les coûts nécessaires au montage microfluidique.

## 2.2. Méthodes de cristallisation en microfluidique

### 2.2.1. FID

La FID (*Free Interface Diffusion*), comme la contre-diffusion, est une méthode basée sur le fait que lorsque deux liquides sont en contact, sans être mélangés, ils vont diffuser l'un dans l'autre. Lorsque les concentrations en protéine et en agent de cristallisation atteignent des valeurs situées dans la zone de nucléation du diagramme de phase, les cristaux germent et croissent.

En FID, les deux solutions (protéine et agent de cristallisation) sont placées directement en contact. La sursaturation est très élevée dans la zone frontière entre les deux solutions, ce qui peut conduire à un précipité ou à des microcristaux. Il est important de noter que cette méthode est conçue pour générer un événement de précipitation unique à haut niveau de sursaturation. À cet égard, la FID peut être considérée comme une expérience de batch différée, dans laquelle les solutions de protéine et d'agent de cristallisation se mélangent lentement, par diffusion. L'absence de convection est essentielle pour permettre la diffusion des solutions (Bergfors, 2009).

La première application de la microfluidique à la cristallisation des protéines est basée sur la FID, et a été développée par Hansen et al. en 2002. La puce qu'ils ont développée contient 48 unités de réaction indépendantes, chacune comportant 3 paires de réservoirs répartis de part et d'autre d'une vanne centrale (Figure 20a). Durant la première phase, la vanne centrale est fermée et les réservoirs d'un côté de la vanne sont remplis avec un des réactifs tandis que ceux de l'autre côté sont remplis avec l'autre réactif (Figure 20b). La vanne centrale est ensuite ouverte pour permettre aux deux solutions de diffuser l'une dans l'autre (Figure 20c). Sur une puce de quelques centimètres carrés (Figure 20d), 48 agents de cristallisation différents peuvent être testés simultanément et à trois concentrations différentes. Sa version commerciale dédiée au criblage à haut débit (*High-Throughput Screening*, HTS) permet de tester 96 conditions de cristallisation en utilisant moins de 10 $\mu$ L de solution d'échantillon (Fluidigm, CA). De nombreuses protéines ont ainsi été cristallisées (Figure 21).

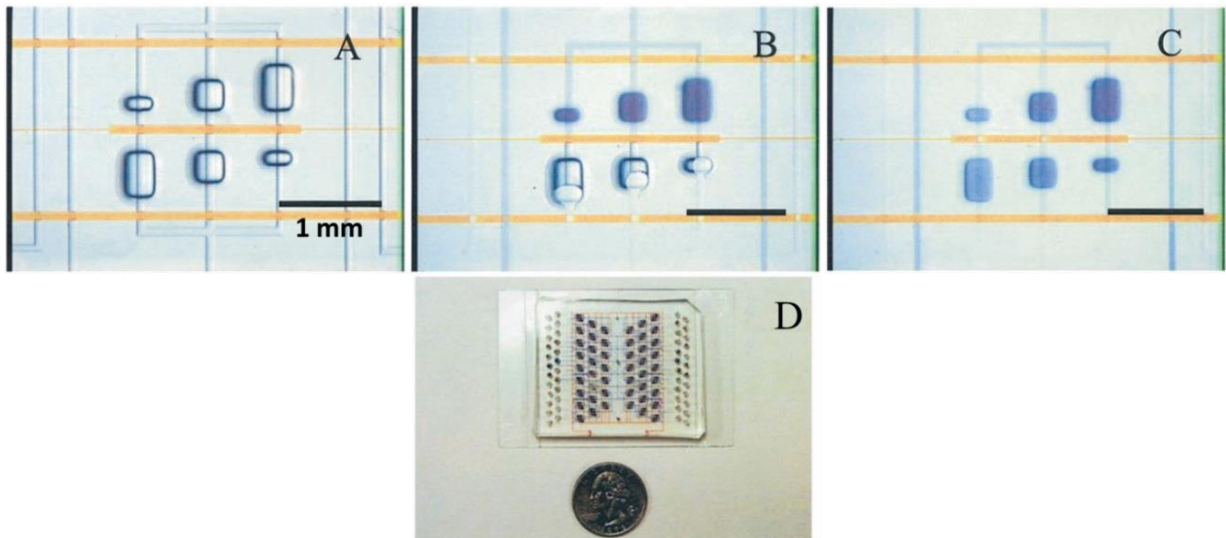


Figure 20: (a) Photographie d'une unité de cristallisation. Les 6 réservoirs vides sont disposés de part et d'autre d'une vanne d'intercommunication en orange. Une paire de puits contient 25nL de solution (protéine + agent de cristallisation). (b) Remplissage des réservoirs par la protéine (38nL), les réservoirs d'agent de cristallisation sont déjà remplis (en bleu). (c) Ouvertures des vannes pour permettre la diffusion. (d) Puce microfluidique entière (Hansen et al., 2002).

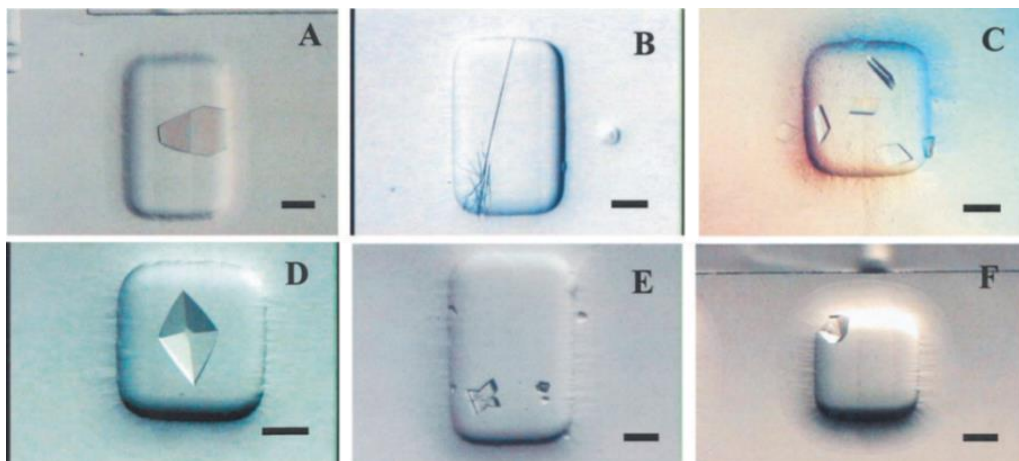


Figure 21 : Cristaux de protéine obtenus par FID dans une puce microfluidique. (a) Lysozyme, (b) Domaine catalytique d'une primase bactérienne, (c) Domaine ATPase de la topoisomérase de type II, (d) Thaumatine, (e) Xylanase, (f) Glucose isomérase. La barre d'échelle est de 100µm (Hansen et al., 2002).

### 2.2.2. Contre-diffusion

Contrairement aux méthodes de FID (Figure 22a et b), les méthodes de contre-diffusion sont conçues pour induire de multiples événements de nucléation à différents niveaux de sursaturation (Figure 22c et d). Ces expériences sont contrôlées par le transport de matière par diffusion, de sorte que la convection doit être limitée. Pour cela, des gels ou des capillaires d'un diamètre interne inférieur à 200µm sont généralement utilisés (Bergfors, 2009).

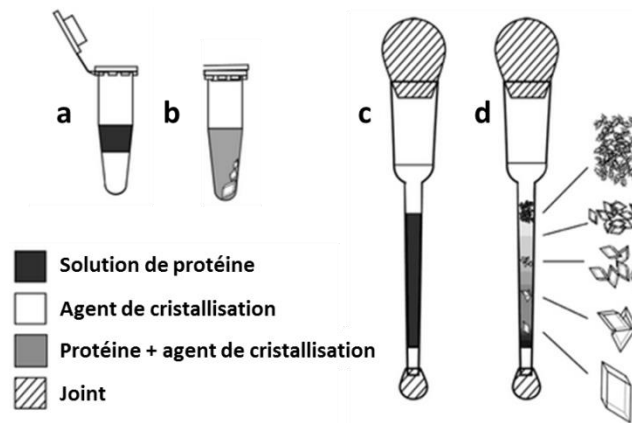


Figure 22 : Comparaison de la FID et de la contre diffusion. (a) FID : les solutions de protéine et d'agent de cristallisation sont placées directement en contact, (b) une grande variété de taille de cristaux peut être obtenue (allant du précipité aux gros cristaux de protéine). (c) Contre-diffusion : l'expérience a lieu dans un long tube pour minimiser les effets de convection dus au mélange des deux solutions. Un capillaire est rempli avec la solution de protéine, puis l'agent de cristallisation est déposé sur le dessus du capillaire, (d) l'agent de cristallisation diffuse à l'intérieur de la colonne dans la solution de protéine, ce qui provoque de multiples évènements de nucléation, à différentes sursaturations (Bergfors, 2009).

Le système est hétérogène à la fois dans l'espace (le long du capillaire) et le temps (temps nécessaire à la diffusion dans le capillaire). Ainsi aucun emplacement dans le capillaire n'a la même condition de cristallisation. Comme le montre la Figure 23, une expérience unique de contre diffusion balaye une large gamme de sursaturations à travers le diagramme de phase. Chaque expérience est donc équivalente à un grand nombre d'expériences par diffusion de vapeur ou en batch. Les événements de cristallisation (et/ou de précipitation) sont observés de façon indépendante à différents endroits du capillaire (Otálora et al., 2009).

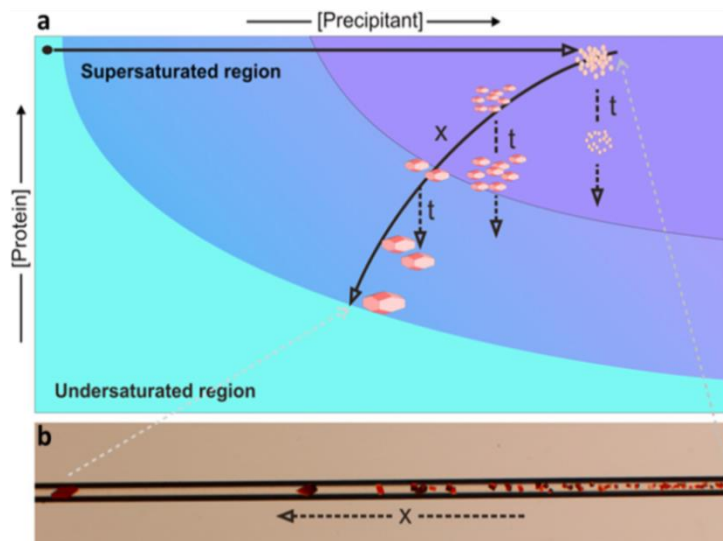


Figure 23 : Evolution de la sursaturation le long d'un capillaire via la méthode de la contre diffusion. (a) L'agent de cristallisation diffuse dans la solution de protéine, créant une onde de sursaturation (x) qui se déplace le long du capillaire au cours du temps (t). (b) Cristallisation de l'hémoglobine. La fréquence de nucléation va d'un très grand nombre de petits cristaux pour des sursaturations très élevées à la nucléation de monocristaux lorsque la sursaturation diminue (Otálora et al., 2009).

Aujourd'hui, la contre-diffusion est principalement effectuée dans des capillaires, car ils permettent de générer un gradient de concentration dans une chambre de cristallisation très allongée. Ces capillaires peuvent être remplacés par des canaux microfluidiques (Sauter et al., 2007, Ng et al., 2008), mais peu de puces basées sur cette méthode ont été développées.

### 2.2.3. Diffusion de vapeur

La diffusion de vapeur est probablement la méthode la plus couramment utilisée en cristallisation des protéines. Elle présente en effet l'avantage d'augmenter simultanément la concentration en protéine et en agent(s) de cristallisation, tout en restant très simple d'exécution. Le principe est basé sur la diffusion d'un solvant (l'eau dans le cas des protéines) d'une solution peu concentrée en sel vers une solution plus concentrée, jusqu'à ce que les concentrations dans les deux solutions soient équilibrées (Dessau and Modis, 2011).

Ainsi, une goutte sous-saturée contenant la protéine et l'agent de cristallisation est mise en équilibre avec une solution d'agent de cristallisation plus concentrée dans une enceinte hermétique. La vapeur d'eau diffuse de la goutte de cristallisation vers le réservoir. Ce mécanisme augmente la sursaturation dans la goutte, ce qui peut favoriser à la fois la nucléation et la croissance des cristaux.

Cette méthode a été adaptée de façon à être utilisée en microfluidique. Pour cela, des gouttes de cristallisation (contenant la protéine et l'agent de cristallisation) sont générées alternativement avec des gouttes d'une solution très concentrée en agent de cristallisation, grâce à l'ajout d'un tensioactif (Figure 24a). La phase continue utilisée est une huile fluorée, qui permet de séparer les gouttes les unes des autres, tout en étant légèrement perméable à l'eau. Ainsi, la goutte de cristallisation, moins concentrée, va perdre son eau au profit de la goutte très concentrée adjacente. Cette déshydratation s'arrête lorsque les concentrations en agent de cristallisation dans les deux types de gouttes sont équilibrées. A la fin de la diffusion, le volume de la goutte de cristallisation est donc plus faible, tandis que le volume de la goutte d'agent de cristallisation a augmenté (Figure 24b). La cristallisation se produit si la concentration dans la goutte de cristallisation dépasse la limite de zone métastable (Figure 24c) (Zheng et al., 2004b).

La quantité d'eau transférée dépend de la différence de pression osmotique, de la taille relative des deux gouttes, de la distance entre les gouttes et de la perméabilité de la phase continue. Le choix de la perméabilité de la phase continue utilisée (l'huile) permet ainsi de contrôler la vitesse de diffusion du solvant (ici, l'eau) dans l'huile (Zheng et al., 2005). L'inconvénient majeur de cette méthode est l'absence de contrôle de l'évolution dans le diagramme de phase. Comme pour une expérience de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte assise ou suspendue, il n'est pas possible de connaître les conditions exactes de nucléation et la cristallisation peut s'avérer difficile à reproduire.



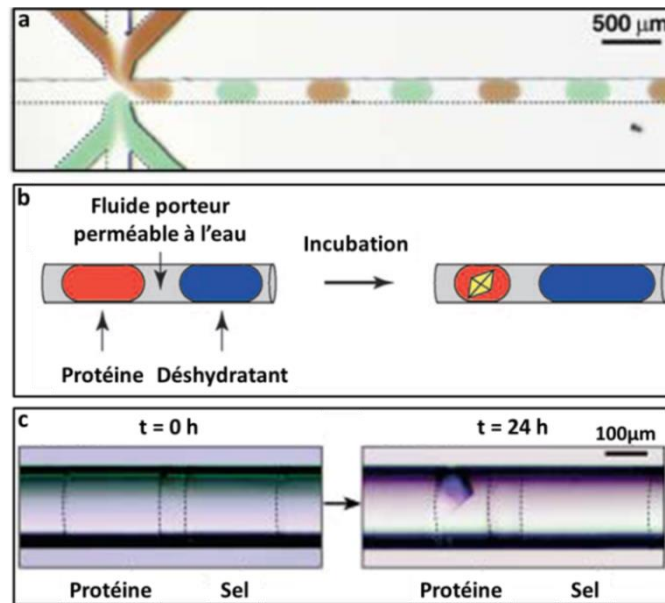


Figure 24 : (a) Photographie de la génération alternée de gouttes en microfluidique. (b) Mécanisme de la cristallisation par diffusion de vapeur en microfluidique. (c) Cristallisation du lysozyme par diffusion de vapeur en microfluidique (Zheng et al., 2004b, Zheng et al., 2005).

#### 2.2.4. Microbatch

La microfluidique est le plus souvent basée sur la méthode du batch (ou microbatch) : les différents composants de la solution de cristallisation (tampon, protéine, agent de cristallisation, additif, etc.) sont mélangés, puis la solution ainsi obtenue est coupée de toute interaction avec l'extérieur (par exemple à l'aide d'une couche d'huile). Le point de départ de la nucléation est ainsi fixé. La concentration en protéine diminue ensuite, à mesure que la nucléation et la croissance ont lieu. La cristallisation s'arrête lorsque la concentration de la goutte atteint la solubilité. Le batch facilite donc l'identification de la meilleure condition pour la croissance de gros cristaux de protéine.

Cette technique a par exemple été appliquée à la cristallisation de la thaumatine (Figure 25a) (Zheng et al., 2004a), de la porine, une protéine membranaire (Figure 25b) (Li et al., 2006) et du lysozyme (Figure 25c) (Ildefonso et al., 2012a).

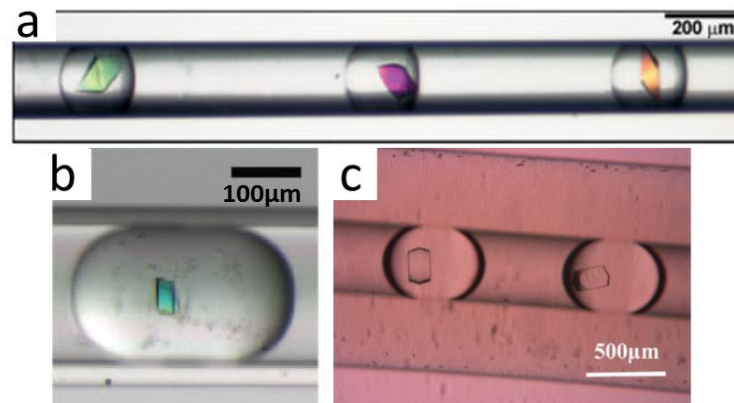


Figure 25 : Exemples de cristaux obtenus en microfluidique avec la méthode du microbatch (a) Thaumatine (Zheng et al., 2004a), (b) Porine (Li et al., 2006), (c) Lysozyme (Ildefonso et al., 2012a).

### 2.2.4.1. Criblage des conditions de cristallisation

Pour cribler un grand nombre de conditions de cristallisation en microfluidique à base de gouttes, il est nécessaire de générer un train de gouttes chimiquement distinctes. Pour cela, il est possible de coupler la génération des gouttes à une étape de séparation par chromatographie (Figure 26) (Trivedi et al., 2010). Les différentes molécules à tester sont tout d'abord mélangées, puis séparées dans une colonne de chromatographie. Les composés sont ensuite injectés dans le système microfluidique et enfermés dans des gouttes à la sortie de la colonne.

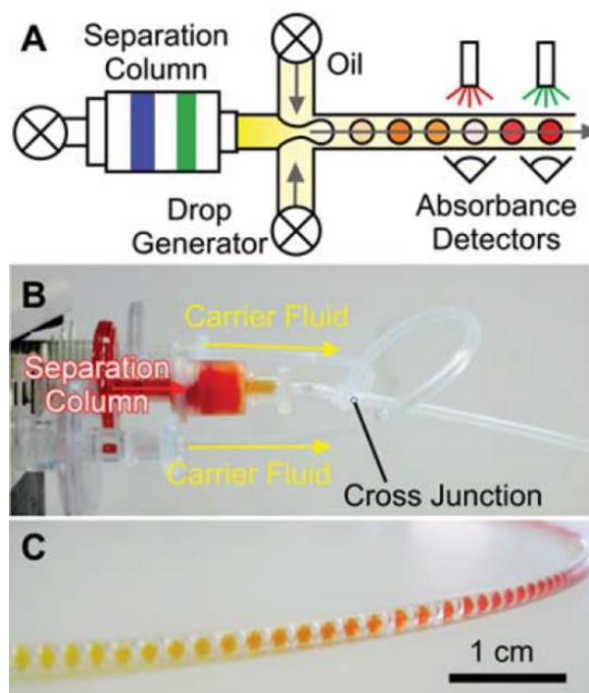


Figure 26 : Génération d'un train de gouttes chimiquement différentes. (a) Schéma du système, qui comprend une colonne de séparation, un générateur de gouttes, et des détecteurs d'absorbance. (b) Photographie du dispositif expérimental. (c) Photographie des gouttes obtenues. Pour cet exemple, la colonne a permis de séparer différents colorants organiques (Trivedi et al., 2010).

Après avoir formé ce train de gouttes, contenant plusieurs réactifs, il est possible d'injecter dans ces gouttes un flux continu d'un second réactif, appelé réactif cible. Pour cela, une jonction en té est utilisée : dans une première entrée arrive le train de gouttes du premier réactif et par une deuxième entrée, le flux du réactif cible vient se mélanger dans chaque goutte qui circule. Les deux phases à mélanger doivent être miscibles entre elles et immiscibles avec la phase continue utilisée (Figure 27).

L'addition du réactif cible à chaque goutte suit un procédé en 4 étapes (Trivedi et al., 2010) :

- L'étape de fixation (Figure 27a) : lorsque la goutte arrive sur la jonction en té, les forces de surface réduisent l'interface entre la goutte et le réactif ajouté par capillarité. En l'absence d'agents tensioactifs pour stabiliser la goutte, ce processus se produit spontanément.
- L'étape de mélange (Figure 27b) : comme la goutte passe à travers la jonction, elle est « nourrie » par la solution de réactif cible et le volume de la goutte augmente.

- L'étape d'étranglement (Figure 27c) : la pression transversale exercée sur la goutte par la phase continue provoque son amincissement à la jonction.
- L'étape de détachement (Figure 27d) : la goutte contenant les deux réactifs se détache et est libérée dans le canal.

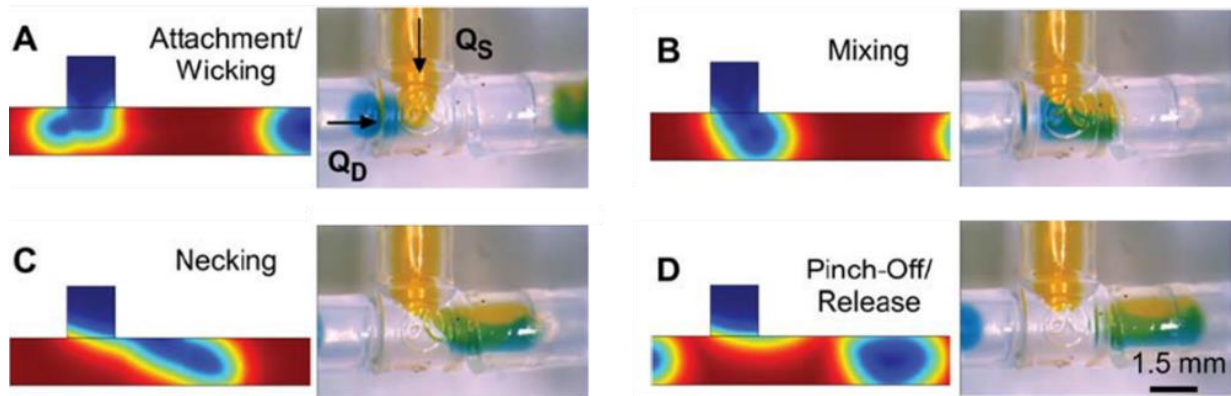


Figure 27 : Mélanges de gouttes et d'un flux continu à l'aide d'une jonction en T. (a-d) Simulation (à gauche) et résultats expérimentaux (à droite) montrant les 4 étapes de la fusion des gouttes (Trivedi et al., 2010).

Dans une certaine gamme de débits, le volume de réactif ajouté dans chaque goutte est proportionnel à son débit. Il est ainsi possible de générer un train de gouttes de compositions différentes contenant, par exemple, différents agents de cristallisation, puis de leur ajouter à chacune un réactif cible, par exemple la solution de protéine à faire cristalliser. Un grand nombre de conditions de cristallisation peuvent ainsi être testées en microfluidique à base de goutte, en une seule expérience.

#### 2.2.4.2. Optimisation d'une condition de cristallisation

Dans la plupart des cas, une fois qu'une condition de cristallisation est identifiée par le criblage (nature de l'agent de cristallisation, pH, additifs, ...), une étape d'optimisation de cette condition de cristallisation est nécessaire afin d'améliorer la qualité des cristaux obtenus. Il s'agit généralement d'ajuster les concentrations des différents composants de la goutte pour permettre la croissance de gros cristaux de bonne qualité. Pour cela, il faut faire varier simultanément les concentrations de plusieurs réactifs (protéine et agent de cristallisation).

En microfluidique à base de goutte, une solution pour faire varier les concentrations des différents composants des gouttes est de faire varier leurs débits respectifs, comme illustré dans la Figure 28. Trois composants sont mélangés lors de la formation des gouttes (réactifs A et B et tampon sur la Figure 28a). La Figure 28c montre les gouttes obtenues pour certains débits particuliers. Par exemple, un débit plus élevé du réactif A (flux vert,  $45 \text{ nL}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se traduit par une plus grande proportion du réactif vert dans la goutte (Figure 28c, à gauche) (Song et al., 2006).

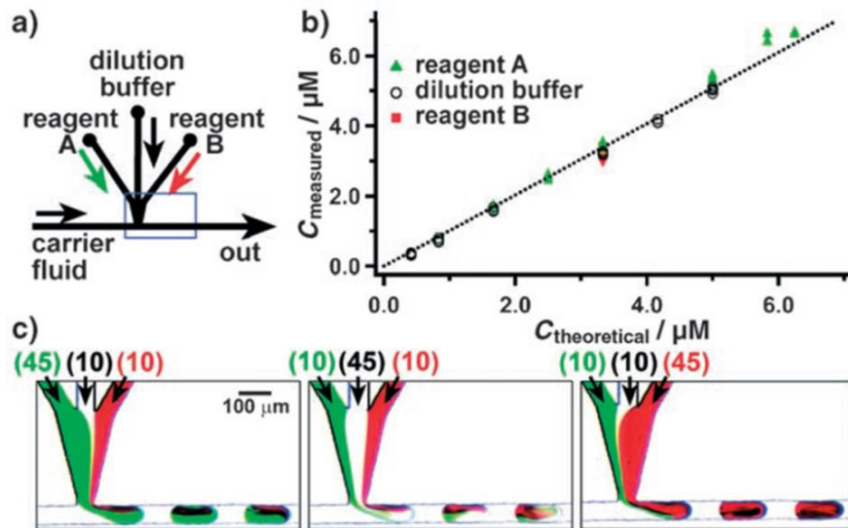


Figure 28 : Contrôle des concentrations de réactifs dans les gouttes par les débits utilisés. (a) Montage expérimental utilisé pour mélanger deux réactifs (en vert et rouge) et le tampon dans les gouttes, (b) Graphique représentant les concentrations mesurées par fluorescence des gouttes en fonction de la concentration théorique calculée à partir des débits utilisés, (c) Photographies des gouttes obtenues en fonction des différents débits utilisés (valeurs entre parenthèses, en  $nL.s^{-1}$ ) (Song et al., 2006).

### 2.2.4.3. Caractérisation en ligne des gouttes

La composition chimique des gouttes pouvant évoluer le long du capillaire, il est important d'identifier, pour chaque goutte, la nature et la concentration des différents composants. Ainsi, pour connaître la composition exacte de chaque goutte, et donc identifier la meilleure condition de cristallisation, il est nécessaire de coupler le montage microfluidique à une méthode de caractérisation en ligne de la composition des gouttes. Dans l'exemple ci-dessus, la concentration des gouttes est vérifiée par fluorescence, et la Figure 28b montre que la concentration des gouttes en réactifs A et B est bien proportionnelle aux débits utilisés pour ces solutions (Song et al., 2006).

Beaucoup de molécules (protéines, principes actifs, etc.) absorbent la lumière à une longueur d'onde donnée dans les domaines de l'ultra-violet (UV) ou du visible. Par exemple, les protéines absorbent la lumière dans l'UV, à 280nm. La loi de Beer-Lambert permet alors de relier cette absorbance à la concentration de la molécule en solution. En effet, cette relation empirique relie l'atténuation de la lumière aux propriétés du milieu qu'elle traverse et à l'épaisseur traversée. Elle établit une proportionnalité entre la concentration d'une entité chimique en solution, l'absorbance de celle-ci et la longueur du trajet parcouru par la lumière dans le milieu considéré :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l C = \text{Log} \frac{I_0}{I}$$

Équation 13

$A_{\lambda}$  est l'absorbance mesurée à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée.  $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire (exprimé en  $L.mol^{-1}.m^{-1}$ ) ou le coefficient d'extinction massique (exprimé en  $L.g^{-1}.m^{-1}$ ), en fonction de l'unité choisie pour exprimer la concentration. Il

dépend de la longueur d'onde et de la nature chimique la molécule.  $l$  est la longueur du trajet optique dans la solution traversée (en m).  $C$  est la concentration de la molécule en solution (en mol.L<sup>-1</sup>).  $I_0$  est l'intensité de la lumière incidente et  $I$  l'intensité de la lumière sortante, détectée par le photodétecteur. La loi de Beer-Lambert n'est cependant valable que sous certaines conditions : la lumière doit être monochromatique, la concentration des solutions doit être faible afin de rester dans le domaine de linéarité de la loi (dans le cas de solutions très concentrées, il est possible de réduire le trajet optique pour rester dans le domaine de linéarité), les solutions doivent être homogènes et le soluté ne doit pas réagir sous l'action de la lumière incidente. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectromètre.

Trivedi et al. (Trivedi et al., 2010) ont décrit la combinaison d'un système de détection d'absorbance avec la génération de gouttes de compositions différentes dans un système microfluidique à base de gouttes. Le spectromètre utilisé se compose d'une source de lumière couplée à une fibre optique fixée orthogonalement au capillaire transportant les gouttes. Une deuxième fibre, fixée sur la face opposée du capillaire, est reliée à un photodétecteur. Le problème principal de la conception du système est l'alignement et la fixation des fibres. Afin d'éviter une perte de lumière, celles-ci doivent être parfaitement alignées axialement et placées à proximité l'une de l'autre, de part et d'autre de la goutte, et donc du capillaire (Figure 29).

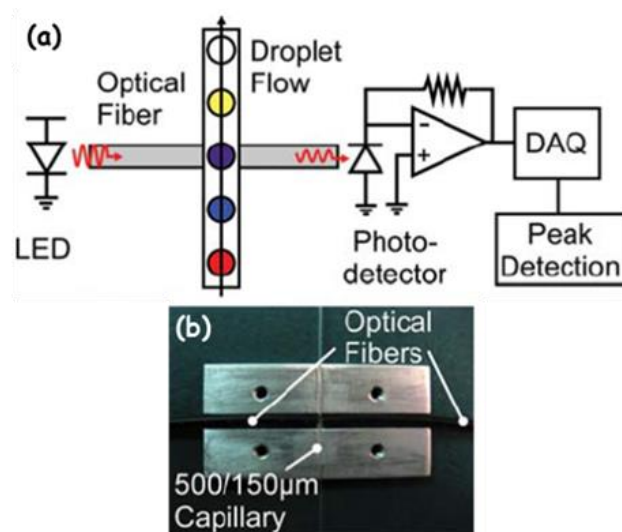


Figure 29: (a) Schéma du montage lampe - fibres optiques - détecteur d'absorbance. (b) Photographie du dispositif expérimental pour l'alignement des fibres optiques, adapté à des capillaires de 500µm et 150µm (Trivedi et al., 2010).

### 2.2.5. Découplage de la nucléation et de la croissance

Dans le cas de la cristallisation des protéines, le but est d'obtenir des monocristaux de bonne qualité, c'est-à-dire que le taux de nucléation doit être le plus faible possible, tandis que la croissance cristalline doit être la plus importante possible. Afin d'éviter la compétition entre croissance et nucléation, certaines approches microfluidiques consistent à découpler ces deux étapes.

Un exemple de découplage des étapes de nucléation et de croissance en microfluidique est la puce dite « *Phase Chip* » (Figure 30). Elle est constituée de deux couches de PDMS scellées ensemble. La partie supérieure (de 5mm d'épaisseur) contient des canaux d'écoulement et des puits de stockage. Dans la partie inférieure, plus mince (40 $\mu$ m), il y a un réservoir scellé par une membrane de PDMS de 15 $\mu$ m d'épaisseur.

Le PDMS étant perméable à l'eau, ce dispositif permet à la vapeur d'eau de circuler non seulement entre la goutte et le réservoir, mais également à travers la couche supérieure de la puce, plus épaisse (Figure 30a). Dans un premier temps, le puits est rempli avec la solution de protéine, et le réservoir est rempli avec une solution concentrée en agent de cristallisation (Figure 30b, à gauche). Du fait de la pression osmotique, l'eau s'écoule de la goutte vers le réservoir. Cette déshydratation conduit à l'augmentation de la sursaturation dans la goutte, et donc à la formation de germes cristallins (Figure 30b, au milieu). Le réservoir est ensuite rempli avec une solution moins concentrée en agent de cristallisation, ce qui modifie la pression osmotique. L'eau retourne dans la goutte et la valeur de la sursaturation se déplace de la zone de nucléation vers la zone métastable sur le diagramme de phase (Figure 1). À ce stade, les germes les plus petits se dissolvent, les germes les plus gros continuent de croître, et aucun nouveau cristal ne se forme (Figure 30b, à droite). Ce mécanisme transforme les petits précipités en un seul gros cristal, un processus connu sous le nom mûrissement d'Ostwald (§ 1.5.1) (Shim et al., 2007).

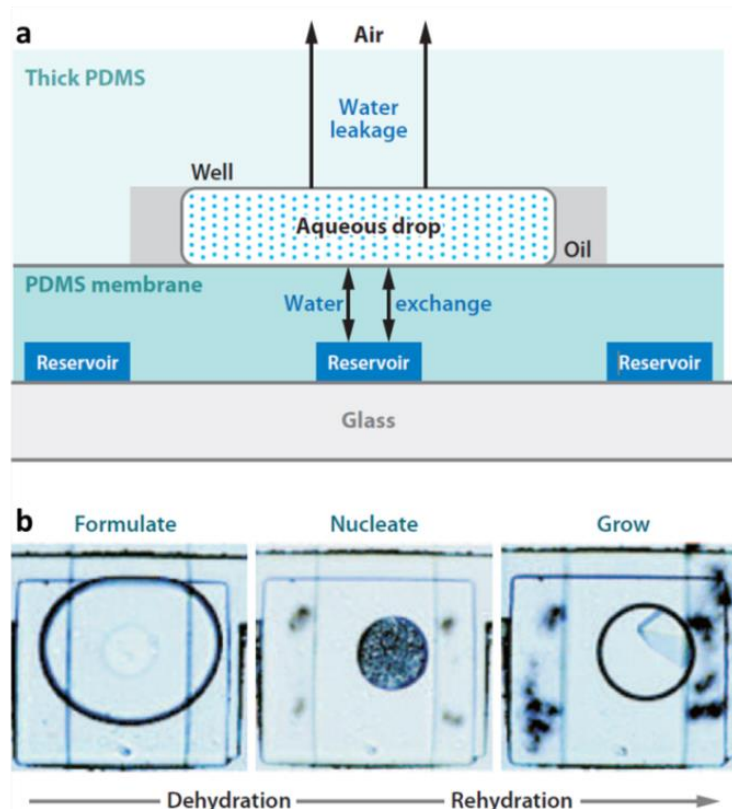


Figure 30 : (a) Coupe verticale de la Phase Chip. (b) La solution de protéine est tout d'abord injectée dans le puits. Le réservoir au-dessus du puits est rempli avec une solution concentrée en agent de cristallisation, provoquant le transfert d'eau de la goutte vers le réservoir, ce qui induit la nucléation de nombreux petits cristaux. Le réservoir est ensuite rempli avec une

solution moins concentrée en agent de cristallisation, le transfert d'eau se fait alors dans l'autre sens, du réservoir vers la goutte. Seuls les cristaux les plus gros peuvent alors croître, tandis que les plus petits se dissolvent (Li and Ismagilov, 2010).

D'autres approches microfluidiques permettent aux étapes de nucléation et de croissance de se faire indépendamment l'une de l'autre, dans des conditions totalement différentes (Figure 31). Pour cela, dans un premier temps des gouttes très sursaturées sont générées, pour favoriser la nucléation (Figure 31a). Après un temps d'incubation (Figure 31b), des solutions de protéine et d'agent de cristallisation moins concentrées sont ajoutées dans les gouttes (Figure 31c), de façon à réduire la sursaturation et donc à favoriser la croissance (Figure 31d). Chaque goutte de nucléation permet ainsi d'ensemencer plusieurs gouttes de croissance (Gerds et al., 2006).

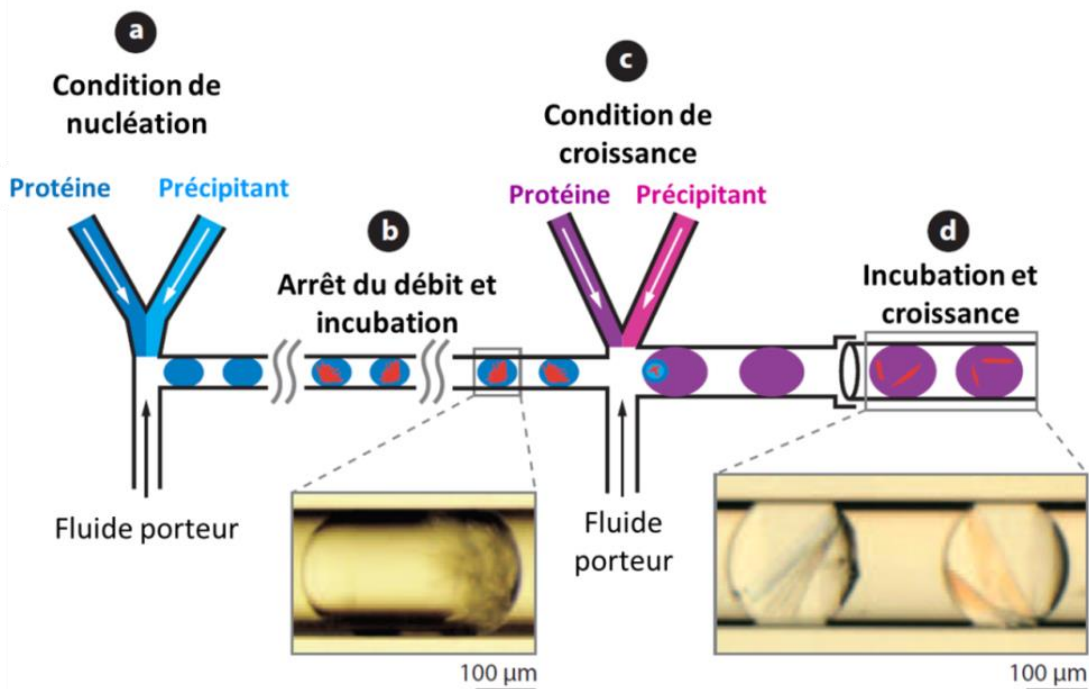


Figure 31 : Approche microfluidique conçue pour séparer les étapes de nucléation et de croissance dans la cristallisation des protéines. (a) Génération de gouttes très concentrées en protéine et agent de cristallisation. (b) Arrêt du débit et incubation des gouttes pour produire des microcristaux (visibles sur la photographie de gauche). (c) Des solutions de protéine et d'agent de cristallisation moins concentrées sont ajoutées pour réduire la sursaturation des gouttes, ce qui favorise la croissance des cristaux. (d) Les gouttes de croissance contenant les germes cristallins sont transférées dans un capillaire en verre et incubées. Le nombre de cristaux par goutte dépend du nombre de germes qu'elle contient. La photographie de droite représente deux gouttes typiques de faible sursaturation qui ont été ensemencées avec les germes de la photographie de gauche (Li and Ismagilov, 2010).

Enfin, une dernière approche, plus simple, consiste à favoriser successivement les étapes de nucléation et de croissance en modifiant la température d'incubation. Les gouttes sont tout d'abord incubées à la température de nucléation, puis la température est réduite, afin de diminuer la sursaturation, jusqu'à atteindre la température de croissance dans la zone métastable du diagramme de phase (Ildefonso et al., 2011).

## 2.3. Caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique

La diffraction des rayons X (DRX) par des cristaux est une méthode d'analyse physico-chimique utilisée pour caractériser la matière cristalline (minéraux, métaux, céramiques, polymères, produits organiques, protéines, ...). Dans le cas de monocristaux de protéine, le but de la cristallographie aux rayons X (CRX) est de déterminer la structure moléculaire tridimensionnelle d'une macromolécule à partir des clichés de diffraction obtenus. Cette technique est actuellement la plus utilisée pour la détermination de la structure des macromolécules biologiques. Pour cela, le cristal doit être de très bonne qualité, le plus gros possible (quelques dizaines à quelques centaines de micromètres) et avec un minimum de défauts. Le *drug design*, la mutagenèse dirigée, la compréhension des mécanismes enzymatiques et la spécificité des interactions protéine/ligand sont quelques-uns des domaines dans lesquels la CRX a permis des avancées majeures (Smyth and Martin, 2000).

### 2.3.1. DRX *in situ* dans un capillaire en verre

L'une des étapes limitantes de l'analyse par DRX est la manipulation des cristaux, qui peuvent être très fragiles, particulièrement dans le cas de cristaux de protéine. La méthode la plus simple serait donc de réaliser la DRX sur le cristal *in situ*, directement à l'intérieur de sa goutte dans le canal microfluidique.

Le PDMS, largement utilisé pour la fabrication de puces microfluidiques car facile à préparer, n'est pas transparent aux rayons X (RX) et n'est donc pas compatible avec de la DRX *in situ*. L'une des solutions est la génération des gouttes dans une puce en PDMS, puis leur transfert vers un capillaire en verre compatible avec les RX. Des cristaux de thaumatococcus ont ainsi été obtenus (Figure 32) (Yadav et al., 2005).



Figure 32 : Cristaux de thaumatococcus obtenus dans un capillaire en verre. Le volume des gouttes est d'environ 20nL (Yadav et al., 2005).

L'un des problèmes de la diffraction *in situ* est l'absence de cryo-protection des cristaux à l'intérieur du capillaire lorsqu'ils sont soumis aux RX. En effet, une exposition prolongée des cristaux aux RX provoque la dégradation de ces cristaux, principalement à cause de la génération de radicaux libres. La congélation des cristaux à des températures inférieures à 140K (généralement dans l'azote liquide) permet de limiter la propagation des radicaux libres dans le cristal, c'est la cryo-protection. Or une analyse par DRX *in situ* se fait à température ambiante. Les cristaux ne sont donc pas protégés, et risquent d'être rapidement dégradés sous le faisceau de RX.

Le grand nombre de gouttes et donc de cristaux disponibles dans le capillaire en verre peut cependant être utilisé pour compenser la durée de vie raccourcie des cristaux exposés. Il suffit en effet de faire diffracter les RX successivement sur plusieurs cristaux



identiques (de la même phase cristalline) dans différentes gouttes pour pallier les dommages subis par les cristaux. La résolution des clichés de diffraction obtenus sur ces cristaux de thaumatococcus *in situ* est de 1,9Å, soit une qualité suffisante pour déterminer la structure d'une protéine (Yadav et al., 2005). Cette puce est aujourd'hui commercialisée par Emerald BioSystems.

Cependant, pour obtenir des jeux complets de données de DRX à haute résolution, il est parfois nécessaire de cryogéniser les cristaux à l'intérieur du capillaire. Pour cela, un cryo-protectant doit être ajouté dans les gouttes, généralement du glycérol, afin d'empêcher la formation de cristaux d'eau et de réduire les dommages causés au cristal. Warkentin et al. ont montré que dans le cas d'une congélation dans de l'azote liquide de capillaires de 150µm de diamètre interne, 30% de glycérol (w/v) sont nécessaires pour vitrifier la solution autour du cristal et empêcher la formation de glace. Il faut cependant prendre en compte que le refroidissement d'un capillaire est plus lent que le refroidissement d'un cristal monté sur une boucle, ce qui augmente les risques de détérioration de l'ordre cristallin lors de la congélation (Warkentin et al., 2008).

Notons que le bruit de fond des clichés de diffraction est significativement plus élevé dans un capillaire. L'avantage majeur de cette méthode est la possibilité de criblage à haut débit des résultats d'expériences de cristallisation et des propriétés de diffraction des cristaux obtenus.

### 2.3.2. DRX *in situ* dans une puce microfluidique

Il est également possible de former les cristaux directement dans une puce dont le matériau est compatible avec les RX. Il existe de nombreux dispositifs microfluidiques permettant l'analyse des cristaux *in situ*. L'une des différences les plus significatives entre eux est la méthode de cristallisation employée. Plusieurs dispositifs utilisant la FID ont été développés (Guha et al., 2012), et même commercialisés, tels que le cristalliseur Topaz™ (Fluidigm Corp.) et le Crystal Former™ (Microlytic Inc.). D'autres puces utilisent la méthode de la contre-diffusion (Ng et al., 2008) ou des gouttes pour de la cristallisation en batch (Christensen et al., 2011). Tous ces dispositifs s'efforcent d'accroître l'efficacité du processus de cristallisation et offrent la possibilité d'analyser les cristaux par DRX *in situ*, jusqu'à la collecte de données de diffraction pour la détermination de structures, dans des cas favorables (Christensen et al., 2011, Hansen et al., 2006, Ng et al., 2008).

Par exemple, une puce en PMMA, transparente aux RX, a été développée pour la cristallisation de biomolécules par contre-diffusion dans des canaux de 100µm de diamètre (Figure 33a). Des cristaux de thaumatococcus ont nucléé dans cette puce (Figure 33b), puis la puce est montée sur une ligne de lumière synchrotron (Figure 33c). La DRX est faite à température ambiante, avec une résolution de 1,85Å (Figure 33d). Dans cette étude, les auteurs exploitent la symétrie cristalline élevée pour atteindre des données quasi-complètes à partir de monocristaux, malgré les contraintes expérimentales, comme la dégradation des cristaux ou la rotation restreinte du bras robotique liée à la taille de la puce (Dhouib et al., 2009).

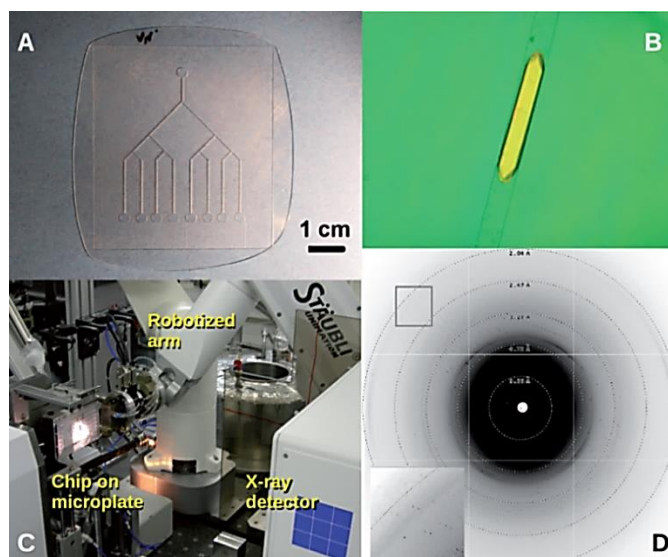


Figure 33 : Analyse in situ d'un cristal à température ambiante en utilisant un rayonnement synchrotron. (a) Puce en PMMA (épaisseur 250 μm). (b) Cristal de Thaumatine remplissant le canal microfluidique de 100 μm de diamètre. (c) Montage de la puce sur la ligne de lumière (d) Cliché de diffraction d'un cristal de thaumatine. La zone encadrée montre les hautes résolutions. La résolution est de 1,85 Å (Dhouib et al., 2009).

Un autre type de puce en PDMS et COC, développé dans l'équipe de S. Fraden (Heymann et al., 2014) permet de produire une grande quantité de cristaux identiques, compartimentés dans des gouttes mono-dispersées, chaque goutte ne contenant qu'un cristal (Figure 34a). L'émulsion est stabilisée grâce à l'ajout d'un tensioactif. Cette puce, semi-transparente aux RX, permet de faire de la DRX *in situ*, à température ambiante (Figure 34b). Le grand nombre de cristaux contenus dans la puce permet d'utiliser plusieurs cristaux pour obtenir un jeu complet de données de diffraction, et ainsi de pallier la détérioration rapide des cristaux. On peut alors parler de cristallographie en série, ou *serial-crystallography*. La structure de la glucose-isomérase a ainsi été résolue, avec une résolution de 2,09 Å, en utilisant les données de diffraction de 72 cristaux.

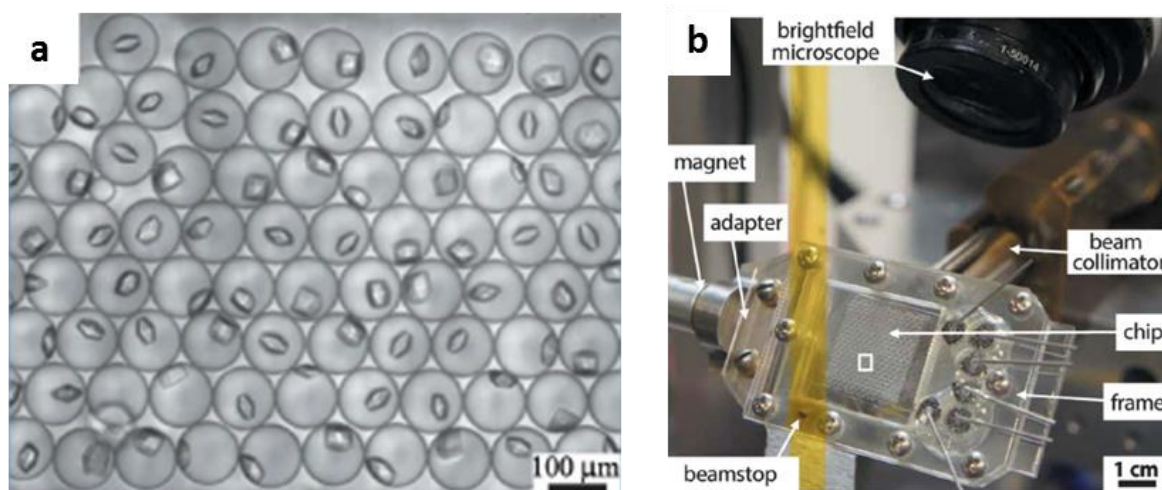


Figure 34 : Photographies (a) d'une émulsion mono-dispersée contenant les cristaux de lysozymes, (b) du montage de la puce semi-transparente aux RX sur le goniomètre d'une ligne synchrotron. La puce peut être déplacée selon les axes x et y, et pivotée de 20° (Heymann et al., 2014).

Un autre exemple de puce microfluidique permettant la DRX *in situ* utilise la dialyse comme méthode de cristallisation. Cette puce en PMMA et kapton (deux matériaux suffisamment transparents aux RX) a été utilisée pour la cristallisation puis pour la DRX *in situ* à température ambiante de différentes protéines modèles : le lysozyme, avec une résolution de 1,6Å ; l'IspE avec une résolution de 2,25Å et l'insuline avec une résolution de 2,15Å (Junius, 2016).

Enfin, certaines puces sont spécifiquement dédiées à la cristallisation de protéines membranaires. C'est le cas de la puce développée par D. Khvostichenko (Khvostichenko et al., 2014) qui permet la cristallisation des protéines membranaires dans une phase cubique lipidique (LCP, *lipidic cubic phase*). Ce système en COC et PDMS permet à la fois d'éviter la préparation de la LCP, préexistante dans la puce, et la manipulation des cristaux. La transparence aux RX de la puce permet la collecte de données de diffraction à partir de multiples cristaux, éliminant la récolte manuelle nécessaire pour l'analyse de cristaux individuels. Le système a été utilisé pour cristalliser une protéine du centre de réaction photosynthétique (*photosynthetic reaction center*). La structure a été résolue à température ambiante, avec une résolution de 2,5Å (Figure 35).

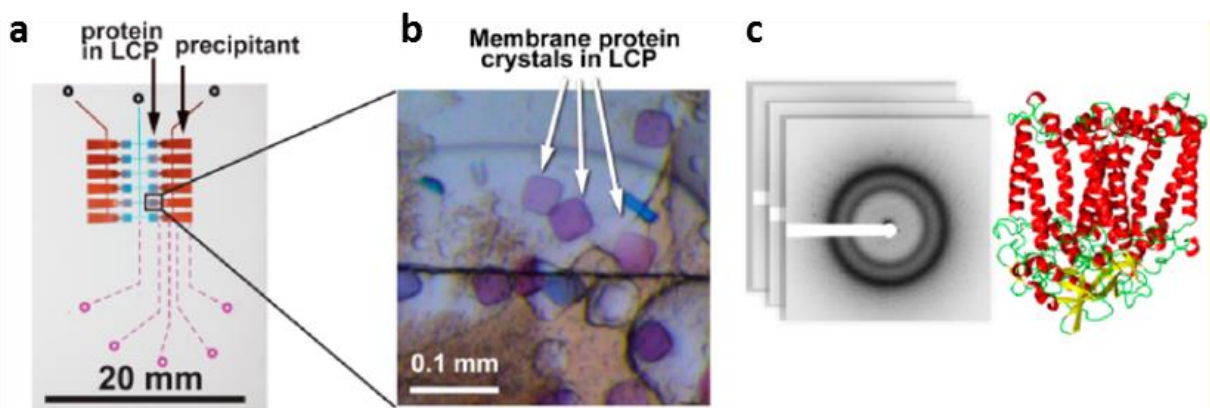


Figure 35 : Photographies (a) de la puce, (b) des cristaux de protéine membranaire dans la puce ; (c) DRX *in situ* à température ambiante et résolution de la structure (Khvostichenko et al., 2014).

Ainsi, les nombreux systèmes disponibles offrent un large choix quant à la méthode de cristallisation et au matériau utilisé pour fabriquer la puce. La DRX à température ambiante directement dans la puce présente donc de nombreux avantages. Tout d'abord, elle évite toute manipulation des cristaux, souvent fragiles. D'autre part, la collecte de données à température ambiante apporte des informations supplémentaires sur la structure des biomolécules et sur la dynamique dans des conditions plus réalistes. Par exemple, un léger changement conformationnel peut être observé lors de la comparaison de structures obtenues à température ambiante avec les structures connues acquises en conditions cryogéniques (Khvostichenko et al., 2014). Enfin, le grand nombre de cristaux disponibles sur la puce permet de palier la faible résistance des cristaux au faisceau de RX. Cependant, ces systèmes à usage unique sont parfois complexes et peuvent s'avérer très coûteux.

Afin d'éviter à la fois les dommages causés au cristal par les RX et la manipulation des cristaux, certains auteurs proposent de rajouter un cryo-protectant après cristallisation, puis

de cryogéniser la puce complète. Dans ce cas, la taille de la puce est un point important : si la puce est trop grande, l'étape de cryogénisation sera plus lente et risque d'endommager le cristal ou de produire des cristaux de glace. Les auteurs montrent qu'avec une puce de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$ , les cristaux ne subissent pas de dommage lors de la cryogénisation (Figure 36). Cette méthode a permis d'obtenir un jeu complet de données de diffraction du lysozyme, avec une résolution de  $1,6 \text{ \AA}$  (Maeki et al., 2015).

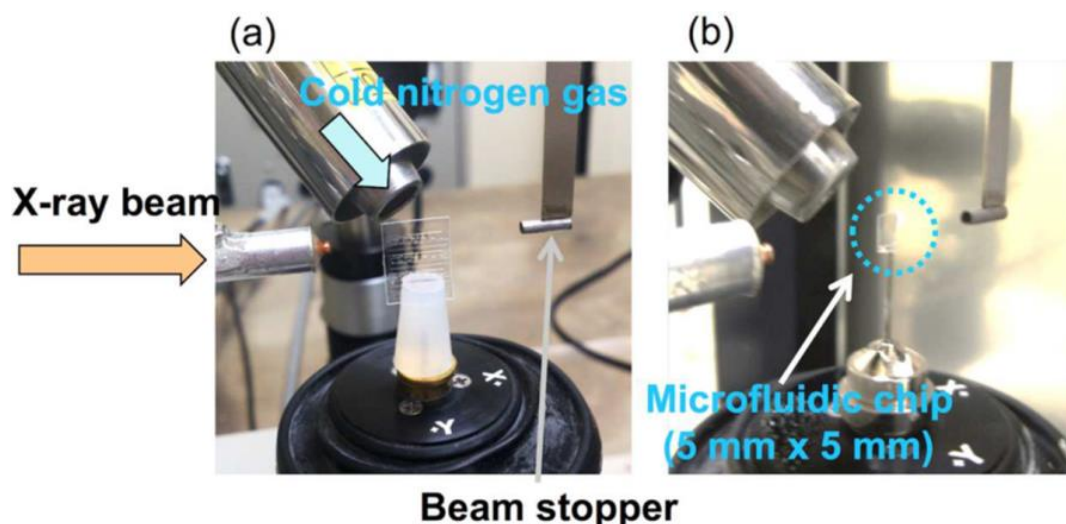


Figure 36 : Comparaison du refroidissement par flux d'azote froid de puces microfluidiques en fonction de leur taille. Photographie de l'expérience de diffraction des rayons X in situ en utilisant (a) une puce microfluidique standard ( $3 \times 4 \text{ cm}^2$ ) à  $277 \text{ K}$ , (b) une puce découpée à une taille de  $5 \times 5 \text{ mm}^2$  (Maeki et al., 2015).

### 2.3.3. DRX *ex situ* – extraction des cristaux

Dans certains cas, la cryogénisation peut s'avérer nécessaire à la collecte d'un jeu complet de donnée, en raison du bruit de fond (lié au dispositif microfluidique), de la fragilité des cristaux, ou encore dans le cas où peu de cristaux sont disponibles. Certaines puces utilisées pour la DRX *in situ* offrent également la possibilité d'extraire un cristal d'intérêt du système microfluidique (Gerds et al., 2010, Dhouib et al., 2009). Cela permet d'éviter la congélation de l'eau sous forme cristalline laquelle provoque l'apparition de taches parasites sur les clichés de diffraction. Cette méthode permet en outre de faciliter la conservation et le transport des cristaux.

Dans le cas du stockage d'une grande quantité de gouttes dans des capillaires ou dans une puce microfluidique, il peut être problématique de récupérer un cristal d'intérêt si, par exemple, la goutte qui le contient se trouve en plein milieu du système. Pour faciliter l'accès aux gouttes (et donc aux cristaux), certaines puces prévoient une ouverture du dispositif. La *CrystalCard*, par exemple, est une puce en COC recouverte d'un film en plastique. Après cristallisation, ce film peut être soulevé pour ouvrir la puce et permettre l'accès aux gouttes (Figure 37a). Le cristal est ensuite récupéré à l'aide d'une cryo-boucle en nylon traditionnelle (Figure 37b) (Gerds et al., 2010). Cependant, cette étape de manipulation des cristaux peut s'avérer délicate, surtout dans le cadre de cristaux de protéines, souvent très fragiles. De nombreuses molécules (dont des protéines) ont ainsi été

crystallisées puis analysées par DRX. Les cristaux obtenus dans la puce microfluidique ont été comparés à ceux obtenus en diffusion de vapeur classique. Pour une même molécule, la résolution des cristaux obtenus est équivalente quelle que soit la méthode de cristallisation utilisée (Gerds et al., 2010).

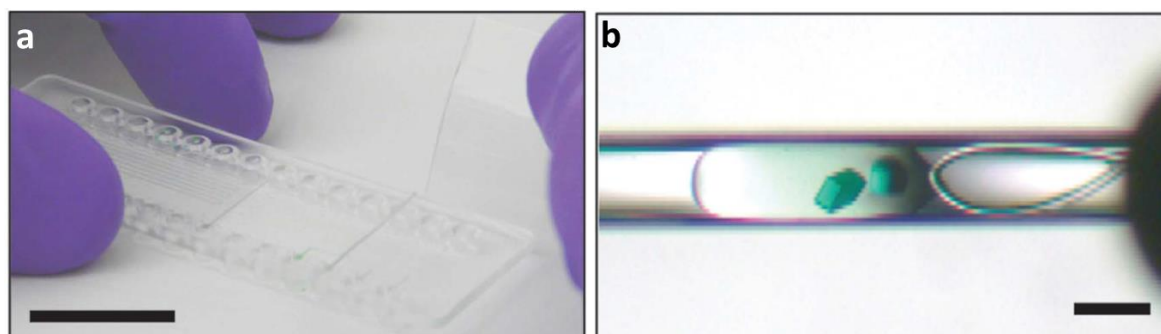


Figure 37 : Photographies (a) d'une CrystalCard ouverte pour permettre l'accès aux cristaux. Barre d'échelle = 1 pouce soit  $\approx 2,54\text{cm}$ , (b) d'un cristal de protéine récolté à partir d'une CrystalCard en utilisant une cryo-boucle de  $0,2\text{mm}$ . Barre d'échelle =  $200\mu\text{m}$  (Gerds et al., 2010).

## 2.4. Conclusion – Cristallisation en microfluidique

En conclusion, les systèmes microfluidiques permettent de réduire fortement les volumes mis en jeu lors des expériences de cristallisation. Les dispositifs développés sont très variés, pouvant être très complexes et intégrés ou simples d'utilisation car *plug and play*. Ces dispositifs peuvent également différer par la méthode de cristallisation, les matériaux utilisés et les conditions de cristallisation qu'il est possible de tester. De plus, de nombreux dispositifs sont adaptés à la caractérisation des cristaux par DRX, soit *in situ*, soit ils prévoient une possibilité d'extraction des cristaux pour la DRX *ex situ*. Toutes ces caractéristiques font de la microfluidique un outil de choix pour la cristallisation des protéines à des fins analytiques. Cependant, les tensioactifs sont très largement utilisés en microfluidique pour stabiliser les émulsions ou faciliter le mélange de solutions différentes, et peuvent perturber la cristallisation ou la structure tridimensionnelle des protéines étudiées.

Dans le cadre de ce travail, l'objectif est de développer une plateforme microfluidique polyvalente pour la cristallisation des protéines afin de tester rapidement de nombreuses conditions différentes tout en étudiant la reproductibilité des expériences. Cette plateforme doit permettre le prototypage rapide d'une géométrie microfluidique en fonction des applications visées : criblage des conditions de cristallisation, optimisation ou co-cristallisation. De plus, elle doit être facile à utiliser afin d'être transférée dans un laboratoire de recherche industriel pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la technique. Une méthode microfluidique *plug and play* à base de gouttes sans tensioactif permet de répondre au mieux à ces différentes contraintes.

## Chapitre 3. Génération des gouttes – hydrodynamique

Dans le cadre de cette thèse, un système microfluidique à base de gouttes (*droplet-based microfluidic*) est utilisé. Ce système permet de générer rapidement de nombreuses gouttes, chacune étant un nanocristalloir indépendant. Dans ce contexte, les processus conduisant à la formation des gouttes, ainsi que leur homogénéité sont cruciaux. Ainsi, le contrôle des écoulements des fluides utilisés est primordial.

Dans cette partie consacrée à l'hydrodynamique des systèmes microfluidiques à base de gouttes, les notions générales sont tout d'abord définies, puis le mélange de différentes solutions au sein des gouttes est étudié.

### 3.1. Principe de la microfluidique à base de gouttes

La microfluidique à base de gouttes repose sur la production de gouttes de taille et de fréquence contrôlées dans des canaux de géométrie précise. Les gouttes sont généralement formées grâce à l'interaction entre deux liquides non miscibles. Le liquide qui mouille le moins la surface du canal microfluidique forme des gouttes et est appelé phase dispersée. Le liquide qui mouille le plus la surface du canal microfluidique est appelé phase continue. La mouillabilité des canaux est donc un point clef du montage microfluidique : des canaux hydrophobes permettent de générer des gouttes d'eau dans une huile (choisie pour sa facilité à mouiller le canal), tandis que des canaux hydrophiles permettent de générer des gouttes d'huile dans l'eau. Les débits des différents liquides utilisés sont contrôlés précisément, soit par des pousse-seringues, soit par des pompes qui appliquent une pression sur les liquides. Il a également été montré qu'un débit contrôlé peut être obtenu par application d'un vide (Abate and Weitz, 2011).

La production contrôlée d'un flux de gouttes mono-dispersées dans un canal microfluidique a tout d'abord été effectuée avec une géométrie de canal en T. La rupture du flux de la phase dispersée est provoquée par le cisaillement induit par le croisement avec le flux de la phase continue. Dans une jonction en croix, la génération des gouttes peut se faire soit par *flow-focusing* (ou focalisation de flux), soit par *cross-flowing* (ou flux transversaux) (Christopher and Anna, 2007). Ces deux méthodes sont illustrées dans la Figure 38. En *flow-focusing*, le flux de phase dispersée est pincé perpendiculairement par deux flux de phase continue, ce qui conduit à la rupture de la phase dispersée en gouttes, parallèlement à l'injection de la phase dispersée (Figure 38a). En *cross-flowing*, la phase continue croise perpendiculairement les flux de phase dispersée, conduisant à la formation de gouttes perpendiculairement aux entrées de phase dispersée (Figure 38b). Dans le contexte de cette thèse, c'est la méthode de *cross-flowing* qui est utilisée pour générer les gouttes, avec une jonction en T ou une jonction en croix.

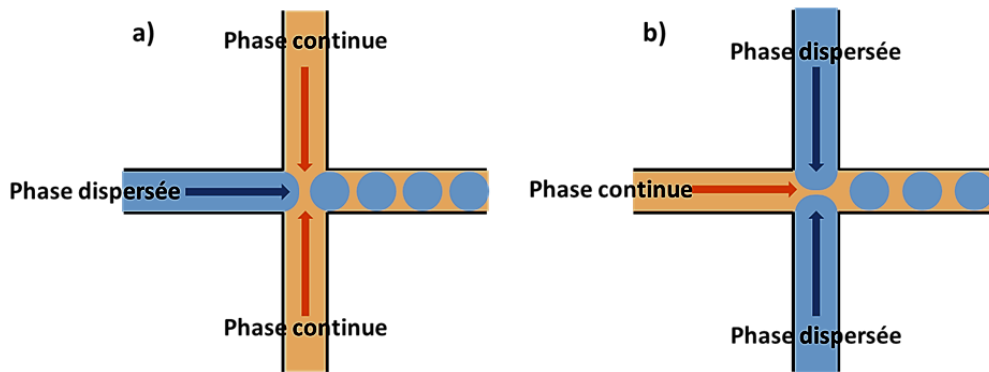


Figure 38 : Schéma de la génération de gouttes (a) par flow-focusing et (b) par cross-flowing.

Dans les deux cas, des tensioactifs sont très souvent ajoutés. En s'adsorbant à l'interface goutte/huile, ils réduisent l'énergie interfaciale entre les deux solutions, facilitant ainsi la formation d'une nouvelle interface, et stabilisent l'émulsion, tout en minimisant les risques de coalescence des gouttes. La nature du tensioactif utilisé dépend de la nature des phases continue et dispersée (Seemann et al., 2012). Il est cependant important de noter que les tensioactifs sont un constituant supplémentaire, et peuvent perturber la cristallisation. En effet, ces derniers peuvent déstabiliser l'interaction des protéines avec le solvant aqueux et donc la structure tridimensionnelle des protéines. Ils peuvent également entraîner la précipitation des protéines. Enfin, ils peuvent avoir un effet dissociant vis-à-vis de la structure quaternaire active d'une protéine par intrusion des chaînes hydrocarbonées flexibles au sein de la structure (Hovers et al., 2011).

Les paramètres tels que les débits, les viscosités, la mouillabilité de la paroi du canal, l'énergie interfaciale, la nature des tensioactifs et leur concentration, les dimensions du canal, et les angles de croisement des canaux microfluidiques sont autant de paramètres physiques dont dépend la formation des gouttes (Seemann et al., 2012).

Enfin, le choix de phase continue est primordial pour la stabilité des gouttes. Deux paramètres sont alors déterminants : sa viscosité, déterminée par sa masse moléculaire, et son énergie interfaciale avec la phase dispersée, déterminée par sa nature. Moins la phase continue utilisée est miscible avec la phase dispersée, c'est-à-dire plus l'énergie interfaciale est importante, plus les gouttes sont stables. Ainsi, dans le cas de l'utilisation d'huiles comme phase continue, les huiles fluorées sont très souvent choisies. Lorsque les conditions de génération des gouttes sont adaptées, les gouttes formées sont homogènes en taille et en fréquence (Figure 39).

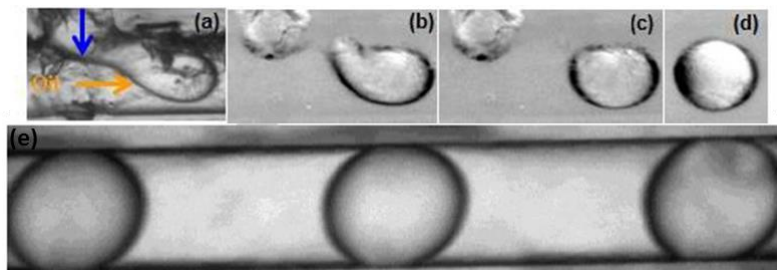


Figure 39 : (a) à (d) Génération de gouttes d'éthanol dans un flux d'huile FC-70 (huile fluorée) dans une jonction en té transparente (ETFE). (e) Gouttes d'éthanol de taille et de fréquence régulières, générées dans l'huile FC-70 (Zhang et al., 2015b).

### 3.2. Nombre de Reynolds

A petite échelle, les phénomènes physiques macroscopiques ne subissent pas seulement une diminution linéaire de leurs effets. Certains phénomènes négligeables deviennent prépondérants, comme la capillarité, alors que d'autres effets, tels que la gravité, deviennent négligeables. Afin d'appréhender les caractéristiques d'un système microfluidique, plusieurs grandeurs sans dimension ont été introduites.

Le nombre de Reynolds  $Re$  (sans dimension) mesure l'importance relative des forces d'inertie liées à la vitesse par rapport aux forces de frottement, liées à la viscosité, permettant ainsi de caractériser un écoulement visqueux.  $Re$  est calculé en utilisant les propriétés de la phase continue : sa densité  $\rho_c$  ( $\text{kg.m}^{-3}$ ), sa viscosité dynamique  $\mu_c$  ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ), sa vitesse d'écoulement  $v_c$  ( $\text{m.s}^{-1}$ ), ainsi que le diamètre interne  $W$  (m) du canal (Squires and Quake, 2005).

$$Re = \frac{\rho_c \times v_c \times (W/2)}{\mu_c}$$

Équation 14

Si les forces liées à la viscosité sont prépondérantes, c'est-à-dire si  $Re$  est faible ( $<1$ ), le frottement entre deux couches fluides maintient leur cohésion et l'écoulement est laminaire (Figure 40b). Lorsque  $Re$  augmente au-delà d'une certaine limite ( $>2000$ ), l'écoulement est déstabilisé et devient turbulent (Figure 40a).

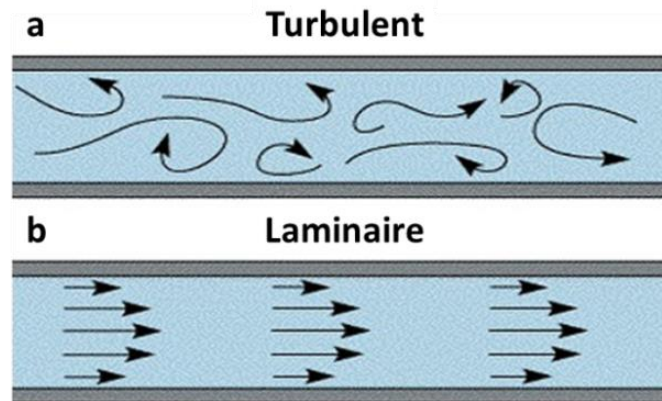


Figure 40 : Schémas des écoulements turbulent et laminaire. Les flèches représentent les champs de vitesse dans le fluide.

Les valeurs de  $Re$  calculées en microfluidique restent faibles (généralement inférieures à 1) (Zhao and Middelberg, 2011). Ainsi, l'écoulement est laminaire et la vitesse moyenne  $v$  ( $\text{m.s}^{-1}$ ) des phases dans un système microfluidique cylindrique peut être évaluée à partir du diamètre  $W$  (m) des canaux et du débit  $Q$  ( $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$ ) comme suit (Zhang et al., 2015b) :

$$v = \frac{Q}{\pi (W/2)^2}$$

Équation 15



### 3.3. Taille critique des canaux

La formation de gouttes dans un canal conduit à la création d'une interface libre entre les deux phases (continue et dispersée), caractérisée par l'énergie interfaciale  $\gamma_{CD}$  ( $J.m^{-2}$  ou  $kg.s^{-2}$ ). Les effets capillaires correspondants sont antagonistes aux effets de la gravité. La taille du canal au-delà de laquelle les effets de la gravité dominent les effets capillaires est donnée par la longueur capillaire  $l_c$  (m) telle que :

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma_{CD}}{\Delta\rho \times g}}$$

Équation 16

Avec  $g$  l'accélération de la pesanteur ( $m.s^{-2}$ ) et  $\Delta\rho$  la différence de densité entre les deux phases ( $kg.m^{-3}$ ). Si le diamètre du canal est supérieur à  $l_c$ , les gouttes sont aplaties contre la paroi du canal par la gravité. En revanche, si le diamètre du canal est inférieur à  $l_c$ , les effets de la gravité sont négligeables devant les forces capillaires (Zhang et al., 2015b).

### 3.4. Nombre capillaire

Le mécanisme de la formation des gouttes est contrôlé par le nombre capillaire  $Ca$  (sans dimension), qui reflète la compétition entre la contrainte de cisaillement imposée par la phase continue et l'énergie interfaciale entre les phases continue et dispersée (Zhao and Middelberg, 2011) :

$$Ca = \frac{\mu_c \times v_c}{\gamma_{CD}}$$

Équation 17

Où  $v_c$  est la vitesse de la phase continue ( $m.s^{-1}$ ),  $\mu_c$  la viscosité dynamique de la phase continue ( $kg.m^{-1}.s^{-1}$ ) et  $\gamma_{CD}$  l'énergie interfaciale entre les phases continue et dispersée ( $J.m^{-2}$  ou  $kg.s^{-2}$ ). Un faible nombre capillaire indique que l'énergie interfaciale domine la contrainte de cisaillement.

### 3.5. Taille des gouttes

La taille des gouttes obtenues peut être caractérisée par le rapport entre sa longueur  $L$  et le diamètre du canal  $W$  ( $L/W$ ). En fonction des débits des phases continue et dispersée,  $L$  peut être inférieure, égale, ou supérieure au diamètre du capillaire. Dans le premier cas ( $L/W < 1$ ) (Figure 41a), les gouttes sont sphériques et mobiles dans la phase continue, ce qui peut conduire à leur coalescence. Dans le dernier cas ( $L/W > 2$ ) (Figure 41b), les gouttes sont allongées, on ne parle plus de gouttes mais de plugs (Zhang et al., 2015a). Dans le cas intermédiaire ( $1 < L/W < 2$ ) (Figure 41c), les gouttes sont stables dans le capillaire, sans être trop allongées.

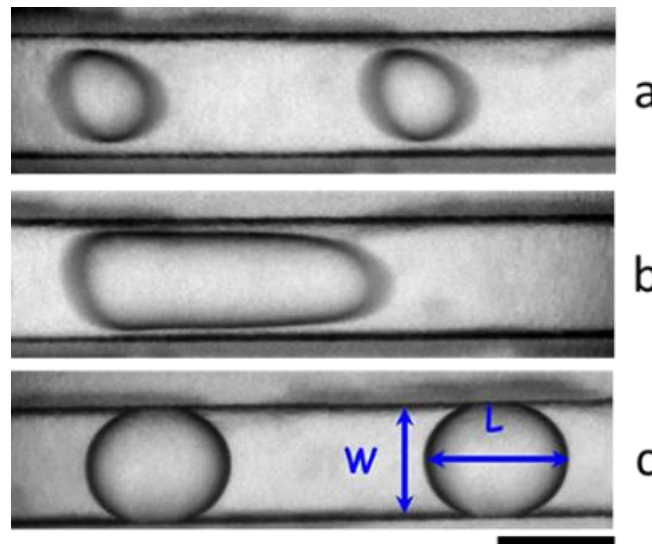


Figure 41 : Différentes formes de gouttes. (a) Gouttes petites et mobiles dans le canal avec  $L/W < 1$ . (b) Goutte avec  $L/W > 2$ , appelée *plug*. (c) Gouttes telles que  $1 \leq L/W \leq 2$ . Barre d'échelle :  $500\mu\text{m}$ . (Zhang, 2015).

### 3.6. Régimes de génération des gouttes

La taille des gouttes générées est influencée à la fois par  $Ca$  et par le rapport des débits (ou des vitesses). Différents régimes de formation des gouttes peuvent être observés dans une jonction en té. En *cross-flowing*, quatre régimes sont couramment décrits (Thorsen et al., 2001) :

- En régime *squeezing*, la goutte en formation remplit le canal de sortie avant de se détacher grâce à la chute de pression interne (Garstecki et al., 2006). La longueur de la goutte est alors supérieure au diamètre du canal de sortie, ce qui lui confère le nom de « *plug* » (Figure 42a). Ce régime est observé aux très faibles valeurs de  $Ca$  ( $< 0,01-0,02$ ).
- Le régime *dripping* correspond à une goutte qui se détache avant d'avoir rempli le canal de sortie (Figure 42b) à cause de la contrainte de cisaillement de la phase continue (Thorsen et al., 2001). Sa taille est donc inférieure à celle du canal de sortie. Ce régime est observé aux valeurs de  $Ca > 0,02$ .
- Le régime *jetting* correspond à un écoulement de la phase dispersée sous forme d'un fil ou d'un jet (Figure 42c). Lorsque l'énergie interfaciale est faible, le jet se déstabilise pour former des gouttes qui sont transportées par l'écoulement de la phase continue (Menech et al., 2008). Ce régime est observé aux valeurs très élevées de  $Ca$  (proche de 0,2). Dans ce régime, la taille des gouttes augmente avec les débits appliqués.
- Le régime transitoire est le régime intermédiaire entre le *squeezing* et le *dripping* (Xu et al., 2008). Le détachement des gouttes est contrôlé à la fois par la chute de pression et la contrainte de cisaillement. Même si la plupart des auteurs ne décrivent pas ce régime transitoire, une valeur critique de  $Ca \approx 0,015$  peut être définie (Menech et al., 2008).

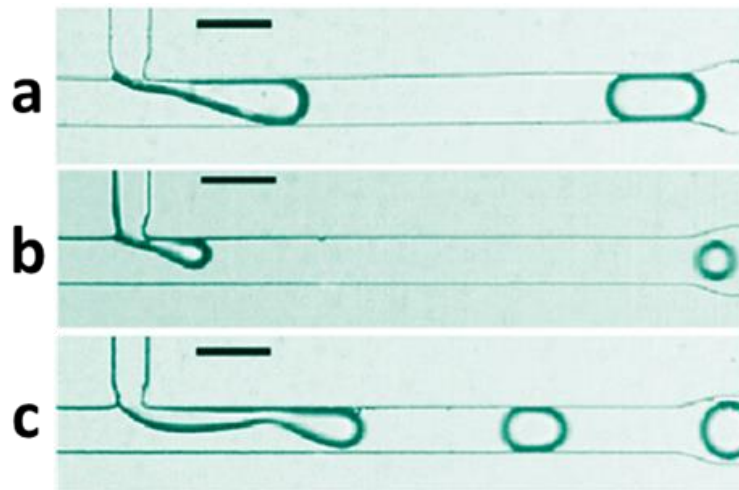


Figure 42 : Principaux régimes de formation des gouttes dans une jonction en té. (a) Squeezing, (b) Dripping, (c) Jetting. Barre d'échelle :  $100\mu\text{m}$  (Zagnoni et al., 2010).

### 3.7. Mélange dans les gouttes

Un aspect important dans le transport des gouttes est lié au champ d'écoulement induit par la présence d'une interface entre deux fluides immiscibles. En microfluidique monophasique, le flux a un profil laminaire classique, et la vitesse est maximale au centre du canal. En présence de gouttes, cet écoulement est modifié par le fait que les phases à l'intérieur et à l'extérieur de la goutte ne peuvent pas se mélanger. En effet, la goutte se déplace à une vitesse constante  $v_g$  inférieure à la vitesse maximale de l'écoulement. Les particules liquides circulant au centre de la goutte avec une vitesse plus grande que  $v_g$  ne peuvent sortir de la goutte, et sont donc rattrapées par la goutte. Elles doivent alors changer de direction quand elles atteignent l'interface. Cela se traduit par l'apparition de zones de recirculation, représentées sur la Figure 43 (Baroud et al., 2010). Cette recirculation est due à des interactions de cisaillement entre le fluide à l'intérieur de la goutte et la phase continue autour de la goutte.

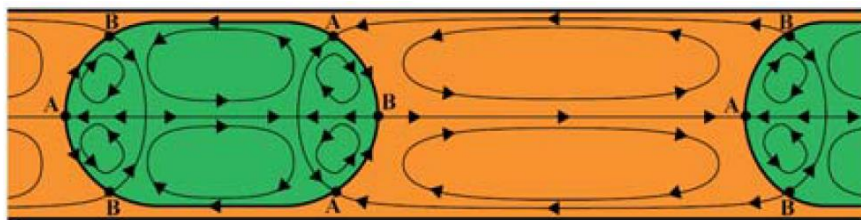


Figure 43 : Zones de recirculation induites par la présence de l'interface entre la goutte, en vert, et la phase continue, en orange (Baroud et al., 2010).

Les flux de recirculation sont principalement localisés au contact des parois, dans les moitiés haute et basse de la goutte. Ainsi, lors du mélange de deux solutions à l'intérieur des gouttes, des réactifs qui sont en avant et en arrière de la goutte (suivant son sens d'écoulement) se mélangent plus facilement que s'ils sont en haut et en bas de la goutte, comme illustré dans la Figure 44 (Tice et al., 2003). En effet, lorsque les deux solutions à mélanger sont initialement injectées à l'avant et à l'arrière de la goutte, la recirculation

permet un mélange efficace et rapide des solutions (Figure 44a). A l'inverse, si les deux solutions sont injectées parallèlement au capillaire, c'est-à-dire respectivement en haut et en bas de la goutte, les flux de recirculation ne permettent pas le mélange des solutions (Figure 44b).

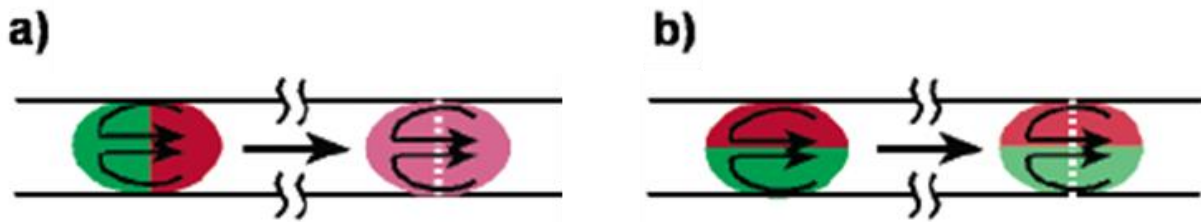


Figure 44 : Effet des positions initiales des solutions sur leur mélange par flux de recirculation dans des gouttes mobiles au sein d'un canal microfluidique droit. (a) Le flux de recirculation (flèches noires) mélange efficacement les solutions initialement situées à l'avant et à l'arrière de la goutte. (b) Le flux de recirculation (flèches noires) ne permet pas un mélange efficace des solutions initialement situées en haut et en bas de la goutte (Tice et al., 2003).

La distribution initiale des solutions dans la goutte dépend de la géométrie utilisée pour générer les gouttes. Lorsque les solutions sont injectées en haut et en bas de la goutte (Figure 44b), la taille de la goutte devient un paramètre important pour son homogénéisation. En effet, lorsque les gouttes sont telles que  $1 < L/W < 2$  (Figure 41c), elles subissent des rotations qui accélèrent le mélange des solutions (Figure 45a). En comparaison, les plugs (Figure 41b) subissent peu de rotation et leur composition est uniquement dépendante de la diffusion des molécules. Ainsi l'homogénéité des plugs est plus longue à atteindre (Figure 45b). La nucléation étant un phénomène lent, un temps de d'homogénéisation des gouttes d'une trentaine de secondes est significativement inférieur au temps de nucléation ( $t_N \geq 1h$ ).



Figure 45 : Temps de diffusion lorsque deux solutions sont mélangées dans des gouttes en circulation au sein d'un capillaire de diamètre interne de 1mm. (a) 30 secondes pour des gouttes avec  $1 \leq L/W \leq 2$  (b) deux minutes pour des plugs avec  $L/W > 2$  (Zhang, 2015).

## Conclusion de l'étude bibliographique

Cette partie consacrée à l'étude bibliographique a permis dans un premier temps de décrire les problématiques liées à la cristallisation des protéines. L'obtention de cristaux de protéine de qualité suffisante pour la résolution de structures par DRX nécessite des étapes de criblage et d'optimisation des conditions de cristallisation. Ces étapes consomment généralement une quantité importante d'échantillon, pourtant souvent rare et cher. La démocratisation de l'utilisation des robots de cristallisation a permis de réduire les volumes impliqués dans les expériences de cristallisation à une centaine de nanolitres. Cependant, la stochasticité de la nucléation n'est que rarement considérée.

Les dispositifs microfluidiques permettent de réduire les volumes impliqués dans les expériences de cristallisation, et donc de réduire les coûts liés à la cristallisation des protéines. Il existe un très grand nombre de systèmes commerciaux dédiés au criblage des conditions de cristallisation. De nombreux systèmes automatisés et complexes ont été développés. Cependant, ces derniers nécessitent un appareillage extérieur complexe et peuvent s'avérer difficiles à utiliser par des non-spécialistes de la microfluidique, et les expériences ne sont que peu voire pas reproduites.

La microfluidique à base de gouttes est généralement moins chère et plus facile à mettre en œuvre. Les nombreuses gouttes produites permettent à la fois de cribler de nombreuses conditions de cristallisation différentes et de reproduire chaque condition un nombre de fois suffisant pour identifier une condition de cristallisation robuste. Ces gouttes sont le plus souvent formées dans des puces à usage unique et nécessitant des étapes de prototypage parfois longues et coûteuses. D'autres systèmes privilégient l'utilisation de jonctions et de capillaires commerciaux permettant un prototypage rapide. Le caractère *plug and play* de ces dispositifs rend la technique très polyvalente, et facile à adapter en fonction des besoins et contraintes de l'utilisateur.

L'objectif de cette thèse est le développement d'une plateforme microfluidique unique pour répondre aux différentes problématiques de la cristallisation des protéines : criblage et optimisation des conditions de cristallisation d'une protéine d'intérêt pharmaceutique et co-cristallisation d'une protéine et de ligands pour le *structure-based drug design*. La plateforme doit également être facile à utiliser et à transférer dans un laboratoire de recherche industriel. L'ensemble de ces conditions nous a conduits à opter pour l'approche *plug and play* de la microfluidique à base de goutte.

## **B. Matériels et Méthodes**



Cette partie présente le système microfluidique, les matériaux (molécules, huiles) et les méthodes utilisés au cours de ce thèse.

## Chapitre 1. Système microfluidique

L'objectif de cette thèse est de développer un outil microfluidique versatile pour le criblage des conditions de cristallisation et des ligands d'une protéine-cible. Conformément à l'étude bibliographique (partie A), un système microfluidique à base de gouttes en capillaires est utilisé. De plus notre désir de rendre la technologie microfluidique plus accessible conduit à la notion de « microfluidique modulable ». Les éléments qui servent à la génération, au mélange, à la détection et au stockage des gouttes sont des parties indépendantes du montage, permettant ainsi leur assemblage en fonction des besoins de l'utilisateur (Trivedi et al., 2010). La Figure 46 présente l'ensemble du montage microfluidique.

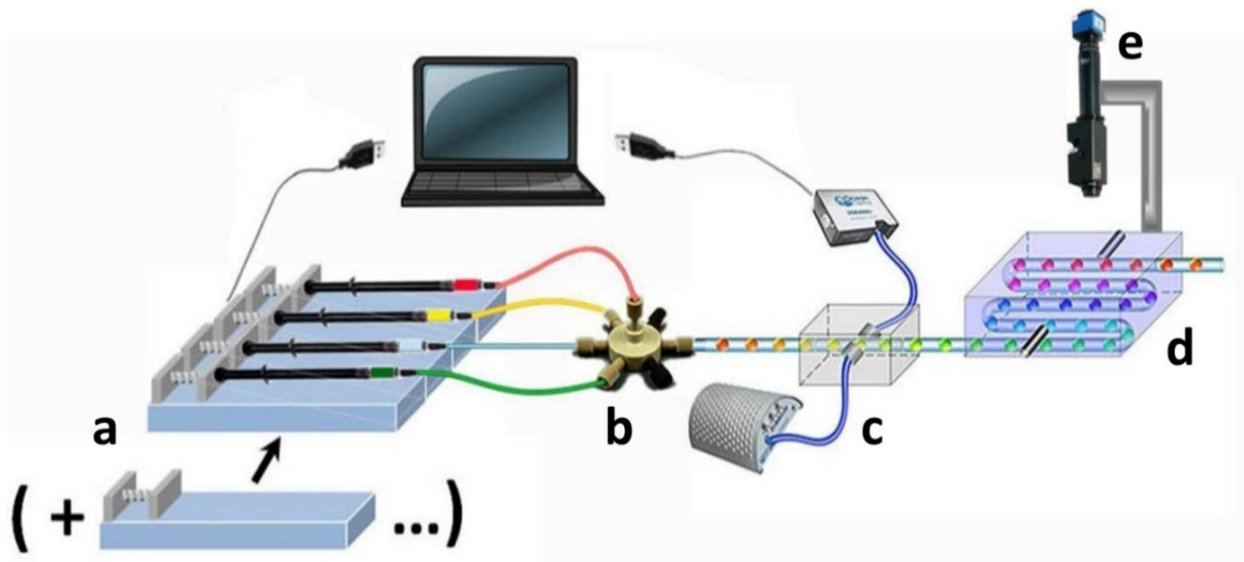


Figure 46 : Ensemble du système microfluidique. (a) Pousse-seringues, (b) Jonction microfluidique, (c) Porte-capillaire et spectromètre UV-Vis, (d) Chambre thermostatée, (e) Caméra avec zoom motorisée en XYZ.

Ce système est composé de quatre modules indépendants :

- Le module de formation des nanocristalloirs, dans lequel les différentes solutions sont mélangées dans les gouttes lors de leur génération dans un capillaire à l'aide d'un pousse-seringues (Figure 46a) et de jonction(s) microfluidique(s) (Figure 46b)
- Le module de caractérisation en ligne des gouttes (Figure 46c)
- Le module d'incubation des gouttes (Figure 46d)
- Le module d'observation de la nucléation et de la croissance des cristaux dans les gouttes (Figure 46e)

L'ensemble du système est flexible, les modules peuvent être associés, démontés et remontés en fonction des besoins de l'utilisateur.



## 1.1. Génération des gouttes

Cette partie est consacrée à la description du premier module du système microfluidique, le module de formation des nanocristalloirs. Les gouttes sont générées dans les capillaires par le croisement de deux phases immiscibles dans une jonction microfluidique. Sont détaillés ici les différents types de capillaires et de jonctions utilisés pour former les gouttes.

### 1.1.1. Capillaires

Il existe un large choix de capillaires, à la fois en termes de matériaux et de diamètres internes et externes. Les diamètres internes et externes des capillaires sont calibrés et uniformisés avec les jonctions microfluidiques pour permettre toutes sortes de connexions. Au cours de ce travail différents types de capillaires ont été utilisés.

#### 1.1.1.1. Capillaires fluorés

Les gouttes sont le plus souvent générées dans des capillaires en polymères fluorés. Quatre types de capillaires fluorés ont été utilisés, de diamètres internes (*internal diameter*, ID) et externes (*outer diameter*, OD) différents (IDEX Health and Science) :

- en PFA (perfluoroalkoxy alkane), de 1,59mm OD et 500µm ID
- en PFA, 360µm OD et 150µm ID
- en FEP (fluorinated ethylene propylene), 1,59mm OD et 150µm ID
- en PTFE (polytetrafluoroethylene), 1,59mm OD et 150µm ID

Ces matériaux, proches du Téflon, ont de nombreux avantages. Ils sont flexibles, inertes chimiquement et imperméables à l'air comme aux huiles et solvants utilisés (Ildefonso et al., 2012a). De plus, leur surface fluorée n'a pas d'affinité ni pour les solutions aqueuses, ni pour les solutions organiques, ce qui les rend compatibles à tout solvant (excepté les acides sulfurique et nitrique très concentrés et probablement l'acide fluorhydrique). Enfin, ils n'absorbent que très peu la lumière dans le domaine UV-Vis, ce qui permet l'observation *in situ* des gouttes, ainsi que la détection d'absorbance en ligne (Galante et al., 2010).

#### 1.1.1.2. Capillaires en verre

Les cristaux obtenus ont vocation à être caractérisés par diffraction des rayons X, et l'une des approches proposées est la caractérisation *in situ*, dans la goutte qui se trouve dans le capillaire. Cependant, les capillaires décrits précédemment ne sont pas suffisamment transparents aux rayons X. Un autre type de capillaire a donc été utilisé, un capillaire en verre de 150µm ID et 360µm OD (IDEX Health and Science, *fused silica tubing*). Il est entouré d'un film de polyimide de 20µm qui permet de faciliter la manipulation du capillaire, en le rendant moins cassant, tout en étant transparent aux rayons X. D'autre part, ce capillaire a les mêmes diamètres internes et externes que le capillaire en PFA. Il est donc facile de l'utiliser avec le montage microfluidique.

### 1.1.2. Jonctions microfluidiques

Dans cette thèse, les jonctions microfluidiques utilisées sont initialement conçues pour les systèmes HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). Ces jonctions sont en PEEK (poly-éther-éther-cétone), un polymère inerte, très résistant aux solvants organiques (IDEX Health science).

Deux géométries ont été utilisées pour former les gouttes, les jonctions en té (Figure 47a) et les jonctions en croix (Figure 47b). Ces dernières permettent de mélanger deux phases dispersées dans les gouttes. Les deux types de jonction existent pour les différents diamètres internes et externes des capillaires utilisés.

Des jonctions linéaires (Figure 48) ont également été utilisées afin de transférer les cristaux d'un type de capillaire à un autre. Elles permettent de modifier le diamètre externe des capillaires utilisés sans modifier le diamètre interne. Elles sont généralement utilisées pour transférer les cristaux des capillaires en téflon (150 $\mu$ m ID, 1,59mm OD) vers les capillaires en verre (150 $\mu$ m ID, 360 $\mu$ m OD).

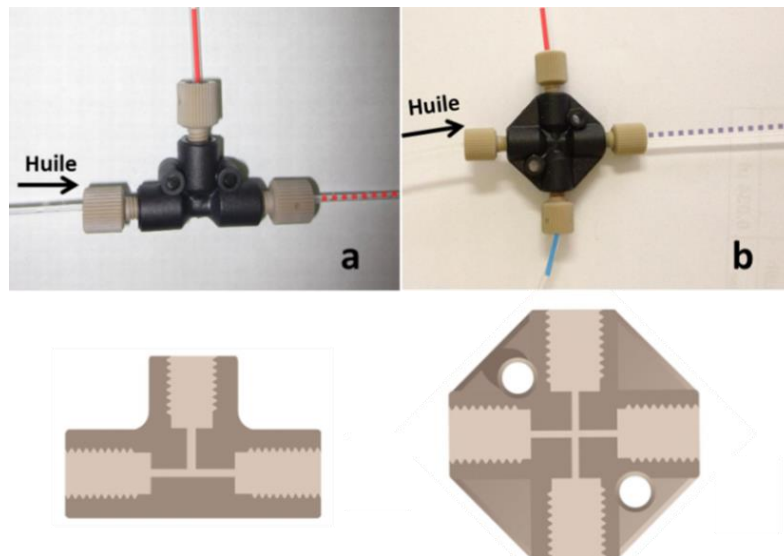


Figure 47 : Photographies (en haut) et schémas des canaux intérieurs (en bas) des jonctions (a) en té et (b) en croix.



Figure 48 : Photographie de la jonction linéaire utilisée pour transférer les cristaux d'un capillaire de 150 $\mu$ m ID et 1,59mm OD vers un capillaire de 150 $\mu$ m ID et 360 $\mu$ m OD.

### 1.1.3. Système du pousse-seringues : débits et gradients

Pour former les gouttes, les phases continue et dispersée(s) sont chargées séparément dans des seringues distinctes (Hamilton 1001 TTL Luer Lock Syringe 1mL) et placées sur une plateforme de pousse-seringues neMESYS (Figure 49). Ce pousse-seringues peut générer des écoulements microfluidiques extrêmement réguliers et sans pulsation, pouvant aller de quelques  $\mu$ L/h à plusieurs milliers de  $\mu$ L/s.



Figure 49 : Photographie du pousse-seringues utilisé pour contrôler les débits des différents fluides.

Cette plateforme neMESYS est programmable par ordinateur via une interface qui permet de délivrer un gradient de débit (Figure 50a). Lorsque deux solutions sont mélangées à l'aide d'une jonction en croix, ce gradient de débit se traduit par un gradient de composition chimique dans les gouttes. Si la somme des débits des deux solutions à mélanger et le débit de la phase continue (l'huile) restent constants, les gouttes générées sont identiques en taille et en fréquence (Figure 50b).

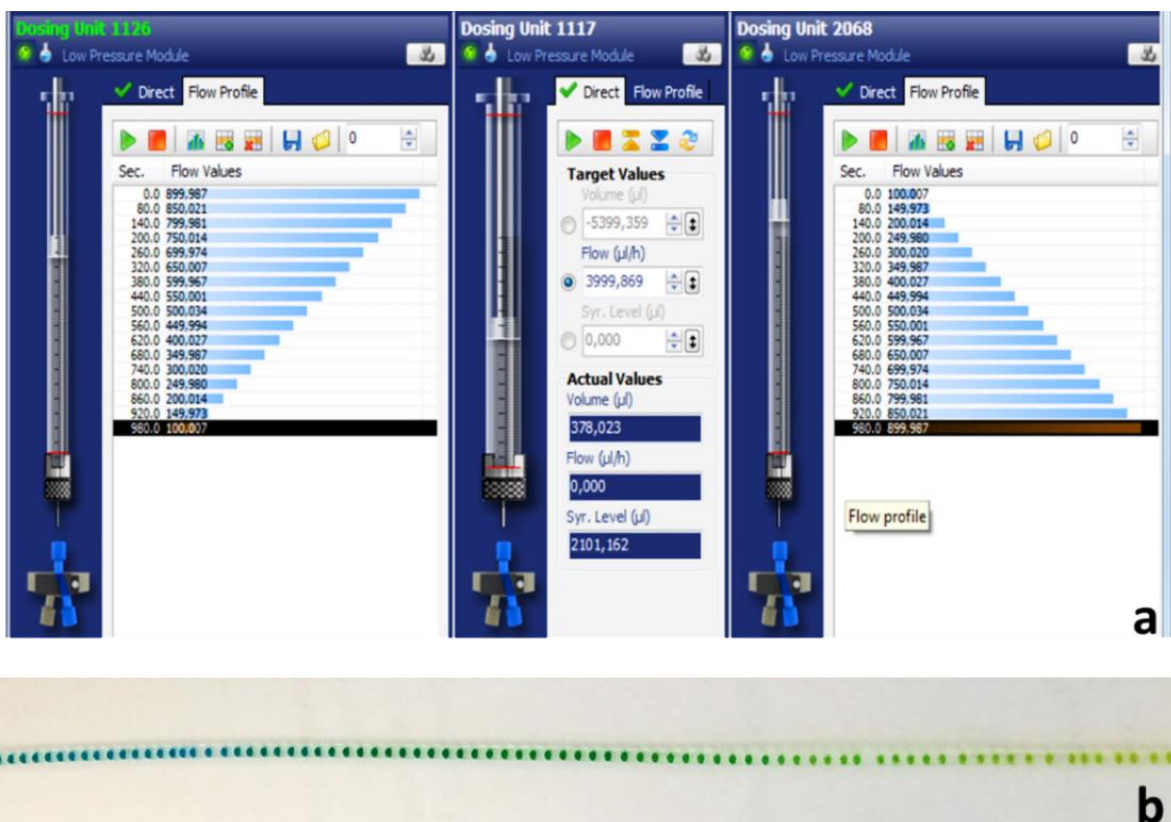


Figure 50 : (a) Interface logicielle programmable du pousse-seringues neMESYS. Les gradients sont appliqués sur le « Dosing Unit 1126 » et le « Dosing Unit 2068 », chacun correspondant à une seringue. (b) Gradient de composition chimique dans des gouttes, illustrés par le mélange de 2 colorants bleu et jaune dans un capillaire de 1mm ID.

Les seringues servant à l'injection des différentes solutions dans le système microfluidique ont un volume minimum de remplissage de l'ordre de la centaine de microlitres. Or la microfluidique ne consommant que peu de matériel, tout le volume prélevé dans la seringue n'est pas consommé pour la formation des gouttes. Afin de minimiser les pertes et le volume mort, il est possible de ne remplir qu'un capillaire avec la solution de protéine, et non pas la seringue. Pour cela, la seringue et un capillaire de longueur choisie sont remplis avec de l'huile (afin de ne pas contaminer la protéine) puis la solution de protéine est aspirée dans ce capillaire. Par exemple, une longueur de 15cm de capillaire de 500 $\mu$ m de diamètre interne correspond à 30 $\mu$ L de solution, ce qui permet de générer environ 500 gouttes de 70nL. De la même façon, une longueur de 15cm de capillaire de 150 $\mu$ m de diamètre interne contient 2,65 $\mu$ L, ce qui correspond à environ 1500 gouttes de 2nL. Le volume utilisé peut ainsi être adapté en fonction des besoins en variant la longueur et le diamètre interne du capillaire-réservoir.

## 1.2. Caractérisation en ligne des gouttes

Le second module du montage permet la caractérisation en ligne de la composition chimique des gouttes par absorbance UV-Vis. Ce module, présenté sur la Figure 51, se compose d'une source de lumière (Figure 51a), d'un porte-capillaire (Figure 51b), de deux fibres optiques (Figure 51c), d'un spectromètre (Figure 51d) et d'une interface logicielle pour la lecture des données (Figure 51e).

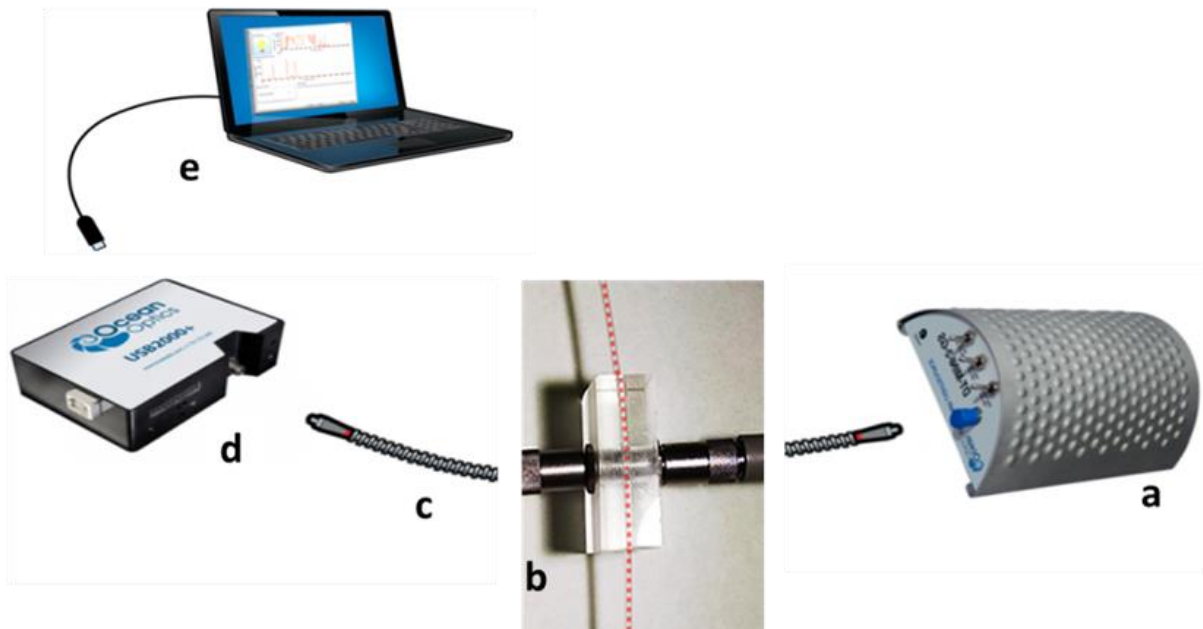


Figure 51 : Module de caractérisation en ligne de la composition chimique des gouttes. (a) Source de lumière, (b) Porte-capillaire, (c) Fibres optiques, (d) Spectromètre UV-Vis-NIR, et (e) Interface logicielle.

La plupart des éléments qui composent ce système sont commerciaux :

- La lampe miniature (DT-MINI-2-GS, Ocean optics) est utilisée comme source de lumière (Figure 51a). Cette lampe combine, dans un chemin optique unique, les spectres continus d'une source de lumière UV, excitée par deutérium, et d'une source de lumière Vis-NIR (visible – proche infrarouge), excitée par halogène-tungstène. Les longueurs d'onde accessibles vont donc de 215 à 2500nm.
- Deux fibres optiques de 400 $\mu$ m de diamètre (Premium-grade Patch Cords, QP400-1-UV-Vis, Ocean optics) sont utilisées pour transporter la lumière de la source de lumière au porte-capillaire et de ce dernier au spectromètre (Figure 51c).
- Le spectromètre miniature (USB 2000+, Ocean optics) permet d'effectuer les mesures (absorbance, transmission, réflexion, émission, et colorimétrie) dans une gamme spectrale comprise entre 190 et 2300nm (Figure 51d).
- L'acquisition et l'analyse du signal provenant du spectromètre sont réalisées en temps réel grâce au logiciel « OceanView » (Ocean optics) (Figure 51e). Les paramètres de mesure (longueur d'onde et temps d'intégration) sont configurés manuellement, et les résultats sont affichés graphiquement en temps réel.

Malgré les fortes concentrations en protéine mises en jeu lors des expériences de cristallisation, l'absorbance UV en ligne est rendue possible par un trajet optique très court (de l'ordre de la centaine de  $\mu$ m), réduisant ainsi les risques de saturation du détecteur.

Le porte-capillaire en PMMA (polyméthacrylate de méthyle) (Figure 51b) a été développé au laboratoire au cours de la thèse de Shuheng Zhang (Zhang, 2015). Il permet d'aligner parfaitement les deux fibres optiques perpendiculairement au capillaire, afin de minimiser les pertes de lumière et de réduire le bruit du signal. Rappelons que les capillaires en téflon utilisés sont suffisamment transparents dans le domaine UV-Vis pour permettre la détection en ligne des gouttes à travers leur paroi.

### 1.3. Incubation et observation des gouttes

L'incubation des gouttes est réalisée dans une chambre thermostatée (ANACRISMAT) (Figure 52a). La chambre est remplie d'eau, d'une part pour faciliter la régulation de température, à l'aide d'un bain thermostaté et d'éléments Peltier, et d'autre part pour immerger le capillaire afin de faciliter l'observation des gouttes par adaptation d'indice optique. La chambre présente plusieurs entrées et sorties qui permettent d'incuber soit un unique capillaire de 170cm contenant environ 3000 gouttes (pour un diamètre interne de 150 $\mu$ m), soit jusqu'à 10 capillaires de 16cm contenant 300 gouttes chacun (pour un diamètre interne de 150 $\mu$ m).

L'observation des gouttes est réalisée à l'aide d'une caméra (Alliance Vision) à zoom variable motorisé, montée sur une table motorisée XYZ (Figure 52b). L'interface logicielle de la caméra permet d'enregistrer les positions des gouttes et donc de suivre la cristallisation au cours du temps.

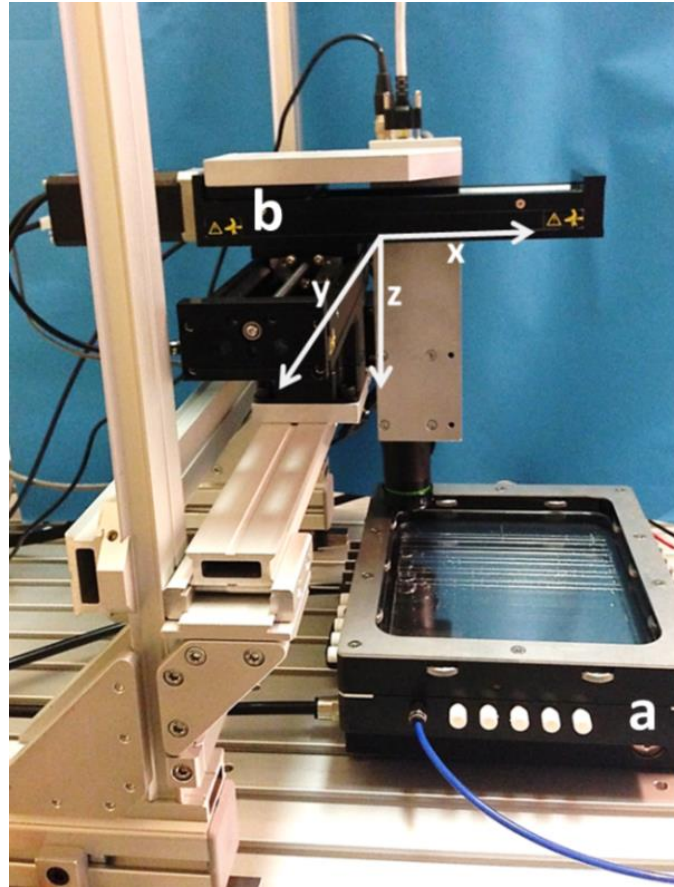


Figure 52 : Photographie (a) de la chambre thermostatée avec plusieurs entrées et sortie et (b) de la caméra motorisée xyz.

## Chapitre 2. Matériels : solutions et huiles utilisées

Ce chapitre décrit les molécules étudiées dans ce travail et leurs milieux de cristallisation, ainsi que les huiles utilisées et leurs propriétés physico-chimiques (structure chimique, viscosité, masse volumique, etc.).

### 2.1. Protéines étudiées

#### 2.1.1. Le lysozyme

Dans ce travail, le lysozyme de blanc d'œuf de poule en poudre (Sigma) est utilisé sans purification complémentaire. Le lysozyme est solubilisé dans un tampon d'acétate de sodium à 80mM à pH 4,5 (pH-mètre pH 210, HANNA Instruments). La concentration de la solution en lysozyme est vérifiée par mesure d'absorbance à 280nm (Nanodrop® ND2000c).

Les solutions de NaCl et de PEG-5000 utilisées sont préparées en dissolvant la quantité voulue de chaque réactif dans ce même tampon acétate. Des solutions de PEG-5000 à 45%, de viscosité environ 0,2 Pa.s (Gonzalez-Tello et al., 1994) sont utilisées. Dans cette thèse, le lysozyme est utilisé pour valider les différents montages microfluidiques utilisés, ainsi que la caractérisation en ligne de la composition chimique des gouttes par des mesures d'absorbance UV-Vis.

#### 2.1.2. La quinone réductase de type 2

La QR2 humaine utilisée dans ce travail est produite en *Escherichia coli* (Protenia). La protéine reçue est caractérisée à l'Institut de Recherches Servier en termes de pureté et d'homogénéité. Avant utilisation, la QR2 est enrichie en FAD, avec un ratio de 1,5mol de FAD pour 1mol de QR2. La protéine est ensuite rincée avec son tampon d'élution (20mM Tris pH 8, 150mM NaCl), puis concentrée à 35mg/mL. Les différentes solutions de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  utilisées pour la cristallogenèse sont obtenues en dissolvant la quantité voulue de sel dans ce même tampon d'élution.

La concentration en QR2 des solutions est vérifiée par mesure d'absorbance à 280nm à l'aide du Nanodrop®. Cependant la présence du FAD dans la solution complique la détermination de la concentration en QR2. En effet, cette molécule absorbe également les UV à 280nm. Pour connaître la concentration exacte en QR2 d'une solution, il faut donc soustraire la contribution du FAD à 280nm. Le FAD absorbant également à 450nm, les mesures d'absorbance sont faites dans un premier temps à 450nm, afin de déterminer la concentration de la solution en FAD. La mesure est ensuite effectuée à 280nm. La concentration en FAD étant connue, il est possible de soustraire sa contribution à 280nm. La concentration en QR2 peut alors être calculée. Les coefficients d'absorption molaire  $\epsilon$  à 280nm et 450nm sont :  $\epsilon_{\text{FAD}}^{450} = 11300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{FAD}}^{280} = 19900 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  et  $\epsilon_{\text{QR2}}^{280} = 44920 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (ExpASy, ProtParam) (Gasteiger et al., 2003).

## 2.2. Choix de l'huile

En microfluidique, le choix de la phase continue est crucial pour la génération de gouttes stables et reproductibles. Celle-ci est donc choisie selon plusieurs critères liés à ses propriétés physiques. L'huile utilisée doit en effet avoir une bonne capacité de mouillage de la paroi du capillaire (en téflon) afin de former des gouttes de la phase dispersée dans l'huile et non des gouttes d'huile dans la phase dispersée. L'immiscibilité entre l'huile et le solvant de cristallisation est indispensable. La densité et la viscosité de l'huile ainsi que l'énergie interfaciale huile/solvant sont déterminantes pour générer des gouttes appropriées pour des expériences de cristallisation. Deux huiles ont été utilisées au cours de ce travail, l'huile FMS (Poly-3,3,3-trifluoropropylmethylsiloxane, Hampton Research) et l'huile FC-70 (3M™ Fluorinert™ Electronic Liquid). Leurs formules chimiques sont présentées dans la Figure 53 et leurs propriétés physiques sont résumées dans le Tableau 1. Ces deux huiles sont immiscibles avec les solutions aqueuses et les solvants utilisés dans ce travail.

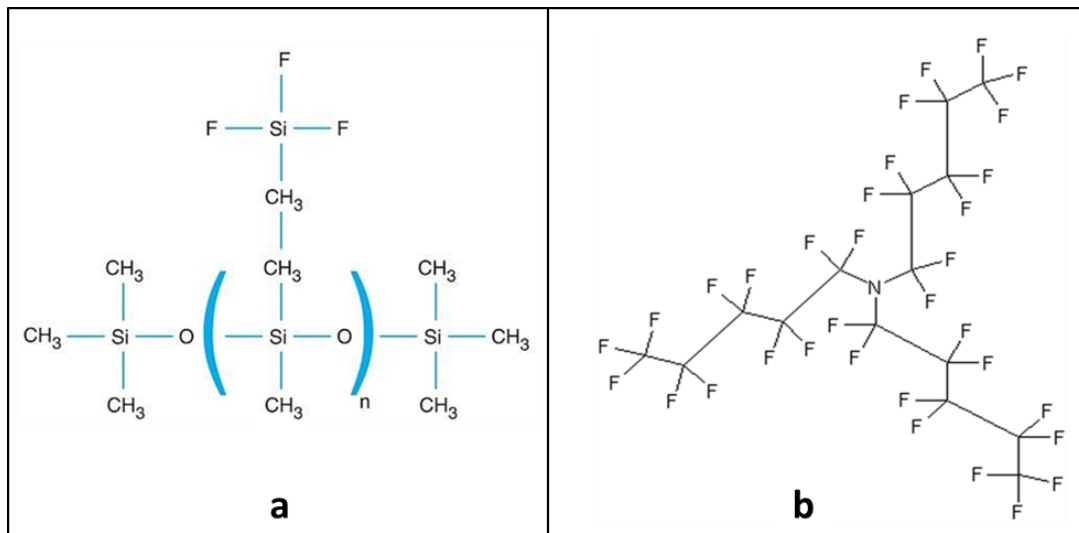


Figure 53 : Formules chimiques des huiles (a) FMS et (b) FC-70.

Nom	Masse volumique (kg.m <sup>-3</sup> )	Viscosité cinématique $\nu$ (10 <sup>-4</sup> m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	Viscosité dynamique $\mu$ (kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	Energie interfaciale avec l'eau (mJ.m <sup>-2</sup> )
FMS	1250	4	0,5	41,0 ± 0,5
FC-70	1930	0,12	0,023	53,7 ± 0,5

Tableau 1 : Propriétés physiques des huiles utilisées.

Deux types de viscosité doivent être différenciés : la viscosité cinématique  $\nu$  (en m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> ou 10<sup>4</sup> St), et la viscosité dynamique  $\mu$  (en kg.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> ou Pa.s), qui sont reliées entre elles par l'Équation 18, avec  $\rho$  la masse volumique (en kg.m<sup>-3</sup>) :

$$\mu = \nu \cdot \rho$$

Équation 18



### 2.3. Autres solutions

Pour la mise au point des différents montages microfluidiques, des colorants ont été utilisés : un colorant jaune (E102, Vahiné) et un colorant rouge (E122, Vahiné). L'ajout de ces colorants modifie de façon négligeable l'énergie interfaciale de l'eau avec le FMS et le FC-70. Le colorant bleu, quant à lui, a un léger effet tensioactif. C'est-à-dire qu'il réduit l'énergie interfaciale entre la goutte et les deux huiles utilisées. Ce colorant ne sera donc pas utilisé pour développer de nouveaux montages microfluidiques (Tableau 2).

	Energie interfaciale ( $\text{mJ.m}^{-2}$ )	
	Avec le FC-70	Avec le FMS
<b>Eau</b>	$53,7 \pm 0,5$	$41,0 \pm 0,5$
<b>Colorant Jaune</b>	$53,5 \pm 0,5$	$40,9 \pm 0,5$
<b>Colorant Rouge</b>	$52,7 \pm 0,5$	$40,8 \pm 0,5$
<b>Colorant Bleu</b>	$45 \pm 1,0$	$39,5 \pm 0,5$

Tableau 2 : Energie interfaciale de l'eau avec le FC-70 et le FMS avec ou sans colorant.

Pour les analyses en ligne par spectroscopie UV, une huile a été utilisée pour remplir le porte-capillaire (Figure 46c), le DMS (polydiméthylsiloxane triméthylsiloxyle terminé, Hampton Research). Cette huile a été choisie pour sa faible viscosité (2 cSt) et son indice optique ( $n_{\text{DMS}} = 1,404$ ), situé entre celui de verre et celui du FEP ( $n_{\text{verre}} = 1,553$ ,  $n_{\text{FEP}} = 1,344$ ).

## Chapitre 3. Méthodes

Ce chapitre est consacré à la description des différentes méthodes utilisées au cours de cette thèse pour mesurer les propriétés des liquides et des surfaces, préparer les surfaces, mesurer les caractéristiques des gouttes, cristalliser les molécules d'intérêt et étudier les cristaux.

### 3.1. Mesures d'énergies interfaciales

Les mesures d'énergies interfaciales sont réalisées par la méthode de la goutte pendante. Pour cela, une goutte du liquide à étudier est formée au bout d'une aiguille verticale. La goutte est filmée par une caméra jusqu'à son détachement. Cette mesure peut se faire dans l'air, ou dans un autre liquide placé dans une cuve. La vidéo permet ensuite au logiciel de calculer l'énergie interfaciale, à partir de l'équation de Laplace-Young. L'équation de Laplace-Young sur chaque point du contour de la goutte peut s'écrire à partir des rayons de courbure principaux :

$$\Delta P = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

*Équation 19*

Avec  $R_1$  et  $R_2$  les rayons de courbure principaux (m),  $\Delta P$  la différence de pression ( $J.m^{-3}$ ) et  $\gamma$  l'énergie interfaciale ( $J.m^{-2}$ ). Le profil de la goutte obtenue sur l'image avant le détachement (Figure 54) peut être comparé à un profil issu de la résolution numérique de l'équation de Laplace qui dicte la forme de la goutte axisymétrique (cette équation non linéaire ne possède pas de solution générale analytique) :

$$\Delta P = \Delta \rho \times g \times y + \gamma \frac{2}{R_0}$$

*Équation 20*

Où  $y$  représente l'ordonnée du point M (en m),  $R_0$  le rayon de courbure au sommet O de l'apex de la goutte (en m),  $\Delta \rho$  la différence de masse volumique entre le liquide de la goutte  $\rho_g$  et celui environnant  $\rho_e$  (en  $kg.m^{-3}$ ) et  $g$  est l'accélération de la pesanteur (en  $m.s^{-2}$ ). Ici,  $\Delta \rho$  prend en compte la poussée d'Archimède.

La théorie de Bashforth et Adams (Arashiro and Demarquette, 1999) qui s'appuie sur l'Équation 19 fait un lien entre l'énergie interfaciale et le profil de la goutte (Figure 54). Voici l'équation qui en résulte :

$$\gamma = \frac{g D_E^2 \Delta \rho}{H}$$

*Équation 21*

Où  $D_E$  est le diamètre équatorial (en m) et  $1/H$  un facteur de forme (sans unité). Le facteur de forme se trouve dans la publication d'Adamson (Adamson and Gast, 1967).

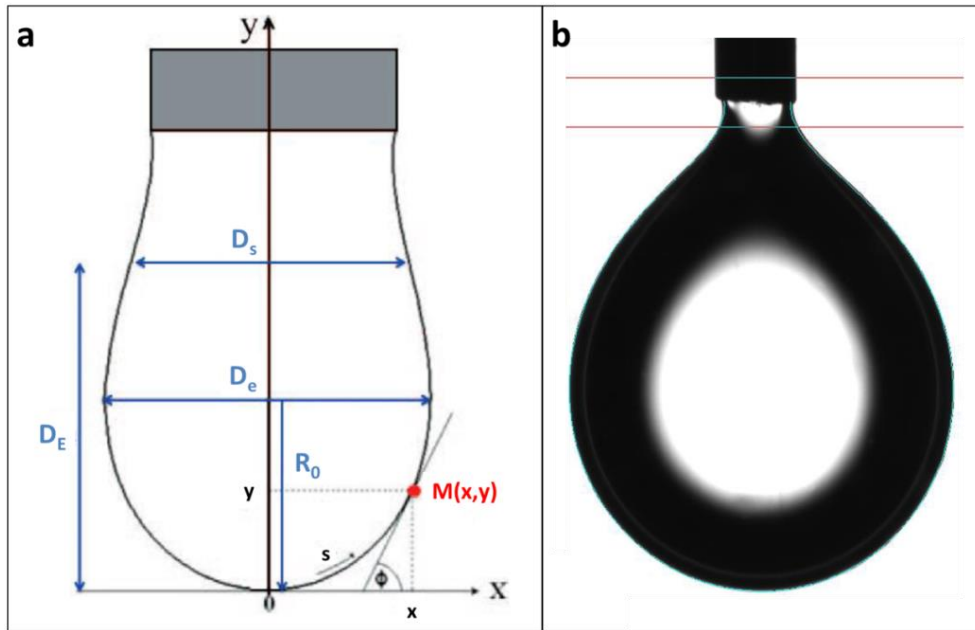


Figure 54 : (a) Schéma et (b) photographie d'une goutte pendante

Les énergies interfaciales sont déterminées à l'aide du tensiomètre optique OCA20 (*Optical Contact Angle*) fourni par dataphysics (Figure 55). Ce tensiomètre est connecté au logiciel SCA20 (*Software Contact Angle*), qui permet de traiter les images des gouttes et de calculer l'énergie interfaciale.

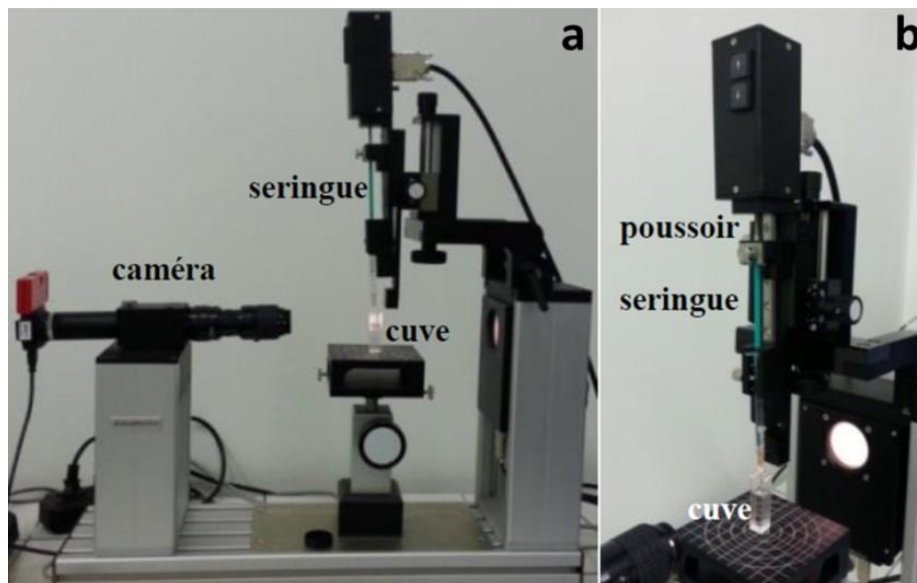


Figure 55 : Photographie du tensiomètre optique OCA 20. (a) Vue d'ensemble. (b) Système de formation des gouttes.

La détermination de l'énergie interfaciale avec cet appareil par la méthode décrite précédemment (Équation 21) est composée de 3 étapes (Arashiro and Demarquette, 1999) :

- Formation de la goutte dans la cuve avec la seringue
- Capture et numérisation de l'image de la goutte pendante par la caméra
- Extraction du contour de la goutte et calcul de l'énergie interfaciale par le logiciel à partir de l'Équation 21.

## 3.2. Mesures d'angles de contact

Le terme d'angle de contact désigne l'angle que forme une goutte de liquide posée sur un solide avec la surface de ce dernier. L'ouverture de l'angle de contact entre le liquide et le solide dépend de l'interaction entre les matières au niveau de la surface de contact. Plus cette interaction, appelée mouillage, est faible, plus l'angle de contact est grand et plus l'adhérence du liquide à la surface du solide est faible. La limite entre mouillage et non-mouillage de la surface par le liquide correspond à un angle de contact de  $90^\circ$  (Figure 56). En d'autres termes, une surface est dite non-mouillante vis-à-vis d'un fluide si l'angle de contact formé avec la goutte déposée est supérieur à  $90^\circ$ . Les mesures sont effectuées à l'aide du tensiomètre optique OCA20 et du logiciel SCA20 décrits précédemment.

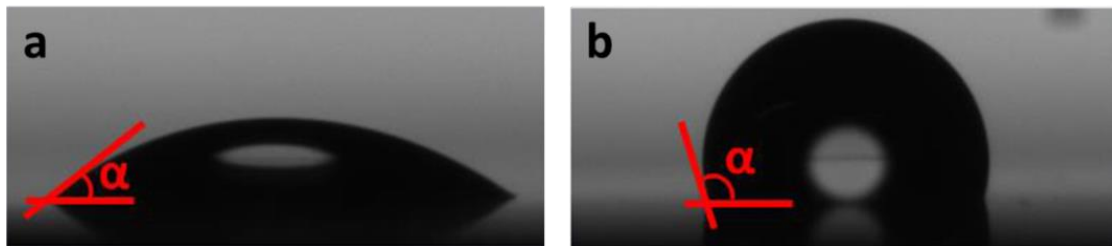


Figure 56 : Angle de contact  $\alpha$  entre une surface et un fluide (a) mouillant, (b) non mouillant.

## 3.3. Traitements de surface

Au cours de cette thèse, différents traitements de surface sont réalisés pour contrôler les propriétés de surface des matériaux utilisés. Les effets de chaque traitement sont contrôlés par la mesure de l'angle de contact entre la surface et une goutte d'eau.

### 3.3.1. Four à plasma d'oxygène

Le nettoyage au plasma permet l'élimination des impuretés et des contaminants d'une surface par l'utilisation d'un plasma énergétique créé à partir d'espèces gazeuses, en utilisant des tensions à haute fréquence (typiquement du kHz au MHz) pour ioniser le gaz à basse pression (inférieure au mbar).

Si le gaz utilisé est de l'oxygène, le plasma permet la rupture très efficace de la plupart des liaisons organiques de surface, ce qui contribue à éliminer les contaminants de poids moléculaire élevé. De plus, les radicaux libres créés dans le plasma réagissent avec les contaminants organiques pour former des hydrocarbures de poids moléculaire inférieur ( $H_2O$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ ). La surface résultante est alors ultra-propre. Dans le cas de toutes les surfaces qui présentent des groupements hydroxyles, comme le verre, l'angle de contact avec l'eau après traitement est très petit, la surface est donc hydrophile (Lim and Lee, 2004). Dans cette thèse, un four à plasma d'oxygène est utilisé (*plasma cleaner ATTO B with manual control, diener electronic*) pour traiter des surfaces en verre ou en polyimide.

### 3.3.2. Silanisation

La silanisation est le revêtement d'une surface par l'auto-assemblage de molécules de silanes organofonctionnelles. Sur du verre, les groupements de surface Si-OH peuvent être silanés via la formation d'une liaison covalente -Si-O-Si- appelée pont siloxane (Figure 57). Comme illustré sur la Figure 57, ces ponts peuvent également se former entre les silanes permettant de stabiliser la fonctionnalisation. L'avantage de la silanisation est qu'elle ne modifie que la surface sans influencer les autres propriétés du matériau. Le choix du radical  $R_1$  permet de contrôler les propriétés de mouillage de la surface : un radical hydrophobe rendra ainsi la surface hydrophobe (Brzoska et al., 1992).

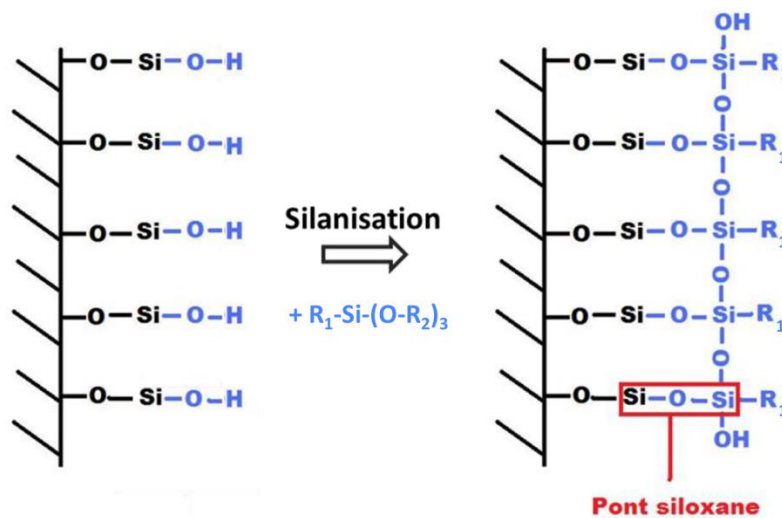


Figure 57 : Schéma de la silanisation.

Dans ce travail, trois silanes ont été utilisés : le triethoxy(octyl)silane (OTES, Sigma-Aldrich, Figure 58a), le trimethoxy(octadecyl)silane (OTMS, Sigma-Aldrich, Figure 58b), et le trichloro(octadecyl)silane (OTS, Sigma-Aldrich, Figure 58c) dans de l'isopropanol ou du toluène (Sigma-Aldrich).

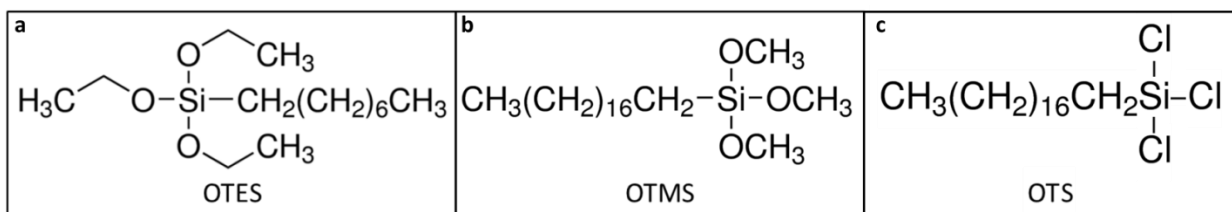


Figure 58 : Formules chimiques des silanes utilisés. (a) le triethoxy(octyl)silane (OTES), (b) le trimethoxy(octadecyl)silane (OTMS) et (c) le trichloro(octadecyl)silane (OTS).

### 3.3.3. Aquapel®

Une seconde méthode de traitement de surface consiste à traiter la surface en verre avec un silane fluoré commercial, l'Aquapel®. Il est fréquemment utilisé pour traiter les pare-brises de voiture contre la pluie ou le givre. L'Aquapel® peut être utilisé pour augmenter l'hydrophobicité des circuits microfluidiques (Mazutis et al., 2009). Sa formule chimique est présentée dans la Figure 59.

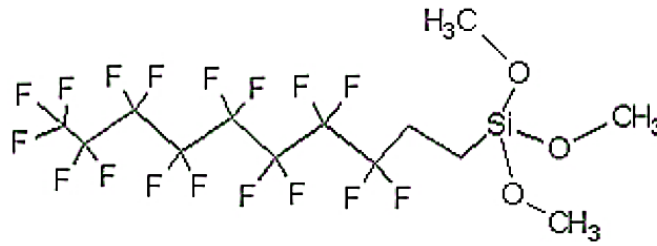


Figure 59 : Formule chimique de l'Aquapel®.

### 3.4. Taille, volume et forme des gouttes produites en microfluidique

#### 3.4.1. Caractéristiques des gouttes générées

Les gouttes sont caractérisées par une taille normalisée donnée par le rapport de leur longueur sur leur largeur ( $L / W$ ) comme illustré sur la Figure 60 (Zhang et al., 2015b).

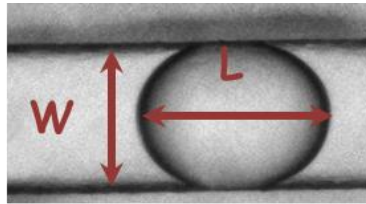


Figure 60 : Caractérisation des gouttes, avec  $L$  la longueur de la goutte et  $W$  sa largeur.

Plus la goutte est ronde, plus la diffusion des composés à l'intérieur se fait rapidement (quelques secondes, Figure 45), ce qui permet d'avoir des gouttes homogènes en composition. Ainsi, les gouttes telles que  $1 \leq L/W \leq 2$  permettent une homogénéisation rapide des différentes solutions. De plus, elles touchent les parois du capillaire, limitant ainsi les risques de coalescence entre elles. Les gouttes obtenues dans ces conditions sont donc les gouttes idéales pour former les nanocristalloirs, car elles sont régulières, stables et reproductibles.

#### 3.4.2. Zones de fonctionnement

Pour chaque montage microfluidique utilisé, il faut déterminer les conditions de débits de chaque phase pour lesquelles les gouttes obtenues sont régulières en taille et en fréquence. Pour cela, la taille des gouttes ainsi que la distance entre ces dernières sont mesurées, sur un effectif d'au moins 50 gouttes pour chaque débit étudié, à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, USA). La méthode utilisée est présentée en Figure 61. Notons que sur les images, la forme des gouttes n'est pas symétrique, car lorsque les images ont été prises, les gouttes étaient en mouvement dans le capillaire. A l'arrêt, les gouttes et plugs reprennent une forme symétrique, comme sur la Figure 60. Les données pour chaque débit sont ensuite rassemblées dans deux histogrammes tels que ceux présentés en Figure 62.

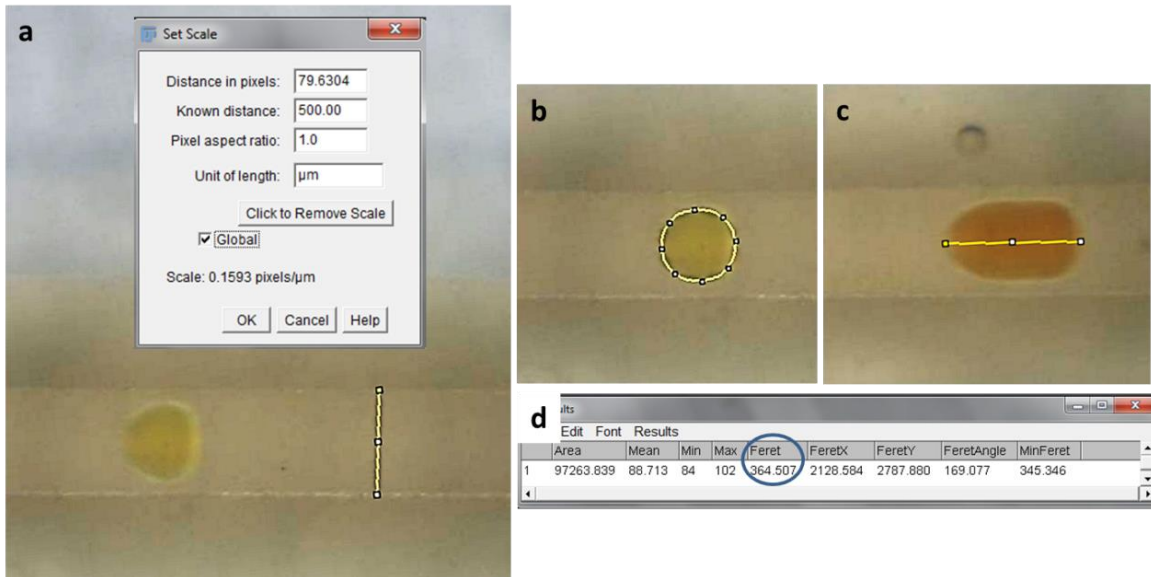


Figure 61 : (a) Calibration de l'échelle : 79,6 pixels = 500µm. (b) Mesure en pixels de la taille d'une goutte ronde. (c) Mesure en pixels de la taille d'un plug. (d) Taille de la goutte en micromètres. Le traitement des données est effectué à l'aide du logiciel ImageJ.

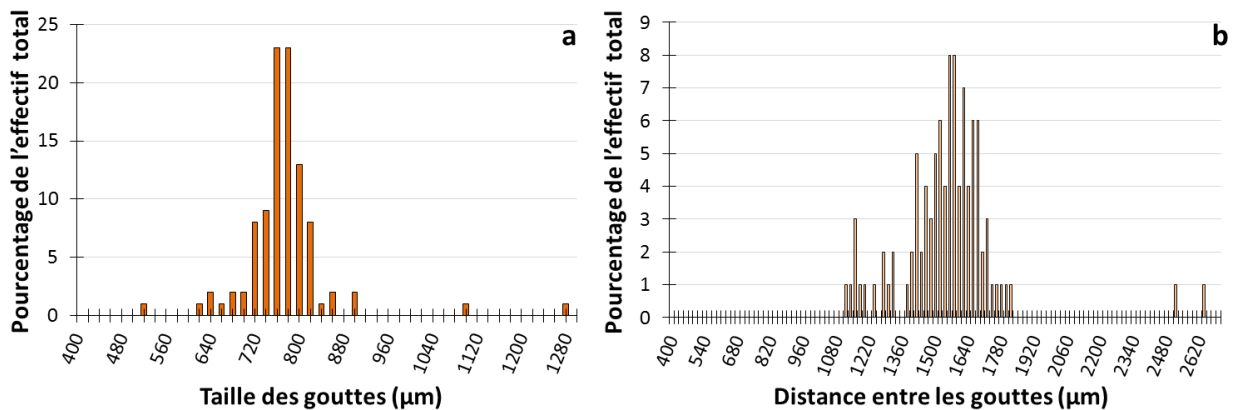


Figure 62 : Histogrammes de la distribution (a) en taille des gouttes et (b) de la distance entre les gouttes. Mesures effectuées sur une série de 100 gouttes. Dans cet exemple, les mesures sont réalisées dans un capillaire de 500µm ID, avec des gouttes d'eau colorée générées dans une jonction en croix, dans de l'huile FMS.

La taille des gouttes permet de calculer leur volume. Pour cela, différentes approximations sont faites : si la goutte est sous forme de plug, son volume est égal à la somme du volume d'un cylindre et de deux demi-sphères à chaque extrémité (Figure 63a). Dans le cas où la goutte a une taille égale ou inférieure au diamètre du capillaire, c'est le volume d'une sphère (Figure 63b).

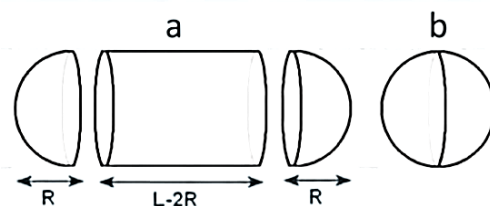


Figure 63 : Illustration du volume et de la forme des gouttes dans le canal microfluidique : (a) un plug, (b) une goutte sphérique.

Dans cet exemple (Figure 62a), les gouttes sont mono-dispersées (leur taille est de  $778\mu\text{m} \pm 46\mu\text{m}$ , pour un volume de  $134\text{nL} \pm 9\text{nL}$ , soit une erreur de 6,8%). D'autre part, la fréquence des gouttes doit également être la plus régulière possible. Dans cet exemple (Figure 62b), la fréquence des gouttes est régulière (les gouttes sont espacées de  $1540\mu\text{m} \pm 155\mu\text{m}$ , soit une erreur de 10%). Ces statistiques sont réalisées pour chaque débit étudié de façon à tracer la zone de fonctionnement dans laquelle les gouttes générées sont régulières. Les débits utilisés par la suite pour les expériences de cristallisation doivent appartenir à la zone de fonctionnement préalablement déterminée.

### 3.5. Mesures de solubilité

La solubilité de la protéine QR2 est mesurée par mise à l'équilibre d'une solution sursaturée de  $40\mu\text{L}$ . Trois concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1M, 1,2M et 1,4M) sont étudiées à  $20^\circ\text{C}$ , avec une concentration initiale en QR2 de  $15\text{mg/mL}$ . Les courbes de solubilité sont obtenues par cristallisation de la solution sursaturée et mesures successives de la concentration en QR2 du surnageant. A la fin de la cristallisation, la solution est à l'équilibre et la concentration en QR2 du surnageant est égale à la solubilité de la QR2 dans ces conditions (température et concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Les mesures effectuées sont présentées dans la Figure 64.

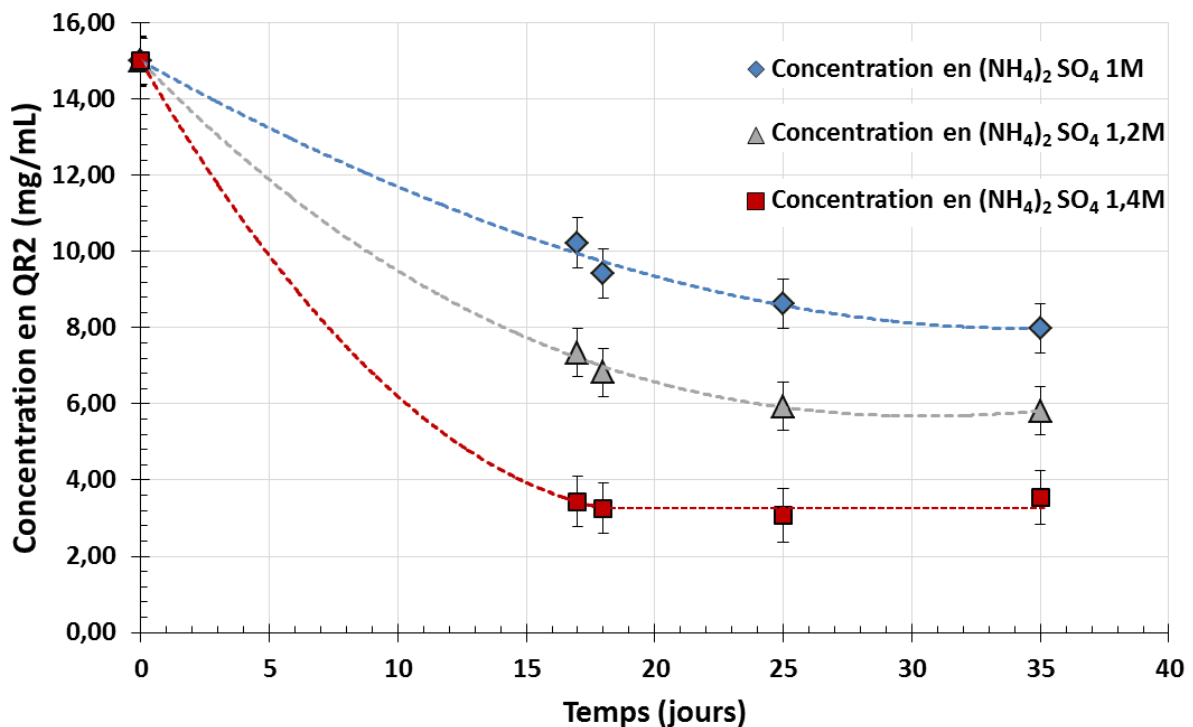


Figure 64 : Mise à l'équilibre de solutions sursaturées de QR2 à  $20^\circ\text{C}$  en présence de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Trois concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont testées : 1M (losanges bleus), 1,2M (triangles gris) et 1,4M (carrés rouges).



Les concentrations en QR2 à l'équilibre pour les trois concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  étudiées permettent de tracer la courbe de solubilité de la QR2 à 20°C en fonction de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figure 65).

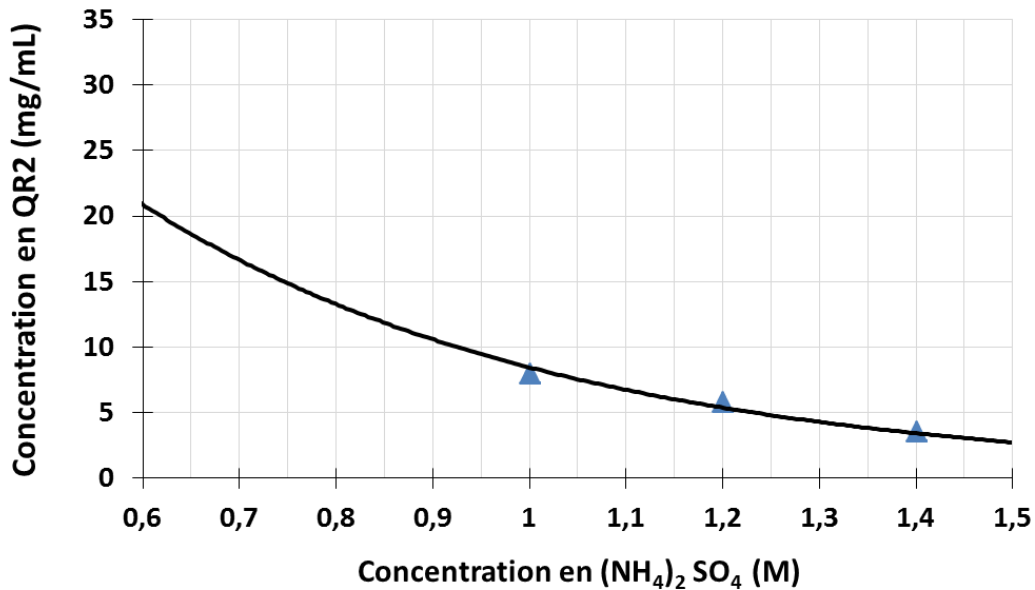


Figure 65 : Solubilité de la QR2 à 20°C en fonction de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 3.6. Méthodes pour l'étude de la cristallisation

#### 3.6.1. Cristallisation en Microbatch®

La méthode du Microbatch® est idéale pour estimer le diagramme de phase d'une protéine en fonction de la concentration en agent de cristallisation (Chayen et al., 1990). La composition de la solution étant parfaitement connue, cette méthode permet d'obtenir un diagramme cinétique délimité en 3 zones : la zone sans cristaux (sous-saturée et métastable), la zone de nucléation spontanée et la zone dite de précipitation. Ce diagramme est mesuré avec un Microbatch® de 72 puits pour QR2 en présence de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (de 0,7M à 1,4M) à 20°C (Figure 66), par variation de la concentration en protéine par pas de 5mg/mL et en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  par pas de 0,2M.

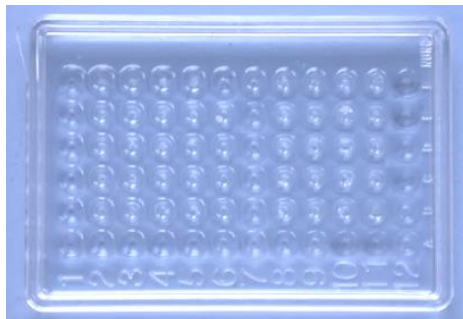


Figure 66 : Photographie d'un Microbatch®

### 3.6.2. Cristallisation en microfluidique

L'objectif de ce travail étant le développement d'un outil microfluidique pour la cristallisation des protéines, les méthodes utilisées pour réaliser les différents montages microfluidiques, la caractérisation en ligne des gouttes ainsi que la caractérisation des cristaux obtenus seront détaillées dans la partie C. Résultats et discussion.

## 3.7. Cristallographie

Les analyses de cristaux par diffraction des rayons X ont été effectuées sur la ligne PROXIMA 1 au synchrotron SOLEIL, équipée d'un détecteur Dectris Pilatus 6M. La longueur d'onde utilisée pour les mesures est de 0,98 Å. Le cristal est monté sur un goniomètre 3 cercles (SmarGon, SmarAct). La distance entre l'échantillon et le détecteur est de 440,5mm. La taille du faisceau de rayons X est de 30 x 40µm.



## **C. Résultats et discussion**



Au cours de ce travail, l'objectif est de développer un outil microfluidique polyvalent pour la cristallisation des protéines alliant rapidité d'exécution, économies de matière, études statistiques et facilité d'utilisation. Cet outil doit être le plus adapté possible aux contraintes de l'industrie pharmaceutique afin d'être transféré dans un laboratoire de recherche industriel pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la microfluidique. La plateforme doit permettre une approche de criblage à haut débit, ou HTS, et tendre vers l'automatisation à la fois du criblage et de la diffraction des rayons X.

Ce travail se divise en trois axes. La première partie présente les résultats obtenus pour l'optimisation des conditions de cristallisation en microfluidique dans des gouttes de quelques nanolitres et l'analyse en ligne des gouttes par spectroscopie UV. La seconde partie est dédiée au criblage des ligands d'une protéine-cible pour la co-cristallisation. La troisième partie présente les différentes méthodes envisagées pour la caractérisation (*in situ* et *ex situ*) des cristaux obtenus dans le système microfluidique par diffraction des rayons X.

## Chapitre 1. Criblage des conditions de cristallisation

L'objectif ici est de présenter la plateforme microfluidique développée au cours de ce travail ainsi que son application à l'optimisation et au criblage des conditions de cristallisation des protéines. Dans un premier temps, les résultats obtenus dans des gouttes de l'ordre de la centaine de nanolitres sont présentés, ainsi que la cristallisation d'une nouvelle molécule dans ce système, la protéine QR2. La mise en place d'un système microfluidique permettant la production de gouttes de quelques nanolitres ainsi que l'analyse en ligne de ces gouttes par spectrométrie UV est ensuite décrite. Les différents problèmes liés au changement d'échelle des gouttes générées (de  $\approx 100\text{nL}$  à  $\approx 1\text{nL}$ ), dus à l'observation et à la détection de ces gouttes cent fois plus petites ainsi qu'à leur fréquence et leur vitesse de circulation dans le canal microfluidique sont traités. Enfin, un exemple d'application de la plateforme microfluidique à l'optimisation des conditions de cristallisation d'une protéine-cible (QR2) est présenté.

### 1.1. Criblage rapide en Microbatch<sup>®</sup>

Dans un premier temps, la méthode Microbatch<sup>®</sup> (§ B.3.6.1) dans des gouttes de  $5\mu\text{L}$  permet de cribler rapidement les conditions de cristallisation de la QR2 en présence de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à  $20^\circ\text{C}$ . Les résultats sont présentés sur la Figure 67.

Ce premier criblage permet d'identifier rapidement les meilleures conditions de cristallisation de la QR2 (zone de cristallisation sur la Figure 67). Celles-ci correspondent à des concentrations en QR2  $\geq 10\text{mg/mL}$  et des concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \geq 1\text{M}$ . En effet la Figure 67 montre qu'en-dessous de ces concentrations, il n'y pas de cristal dans la solution. Pour des concentrations de QR2  $\geq 20\text{mg/mL}$  et des concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \geq 1,4\text{M}$ ,

des précipitations sont observées (Figure 67, zone de précipitation). Néanmoins, dans un système de cristallisation en microfluidique à base de gouttes, le confinement cinétique induit une augmentation du temps d'induction de la nucléation car celui-ci est proportionnel à  $1/V$  (Équation 11). Par conséquent, les concentrations en solutés nécessaires à la cristallisation peuvent être plus élevées en microfluidique. En d'autres termes, la zone de précipitation en Microbatch® peut être favorable à la cristallisation en microfluidique.

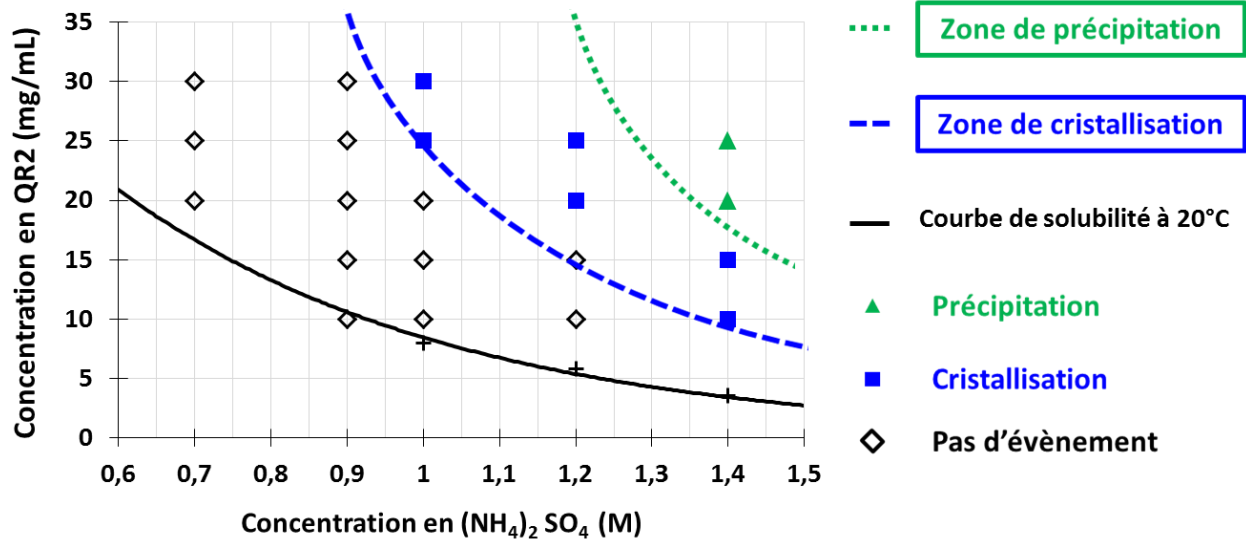


Figure 67 : Diagramme cinétique de la protéine QR2 obtenu en Microbatch® dans des gouttes de 5µL à 20°C (concentration en protéine vs concentration de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La courbe de solubilité à 20°C est reprise de la Figure 65.

## 1.2. Capillaires de 500µm de diamètre interne

La première partie des études en microfluidique est effectuée dans des capillaires en PFA de 500µm de diamètre interne (ID) et 1,59mm de diamètre externe (OD), avec l'huile FMS comme phase continue. Dans ce système, le volume des gouttes générées est de l'ordre de la centaine de nanolitres (Figure 68).

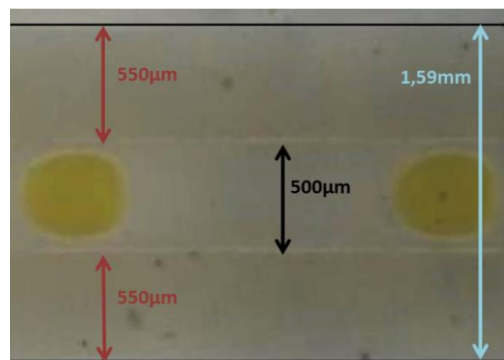


Figure 68 : Capillaire en PFA, ID 500µm, OD 1,59mm.

### 1.2.1. Validation du système

La génération de gouttes à l'aide d'une jonction en croix permet de mélanger la solution de protéine et l'agent de cristallisation directement lors de la formation des gouttes. Ce système, développé par Shuheng Zhang au cours de sa thèse (Zhang et al., 2015a), permet d'éviter que la protéine ne cristallise dans la seringue ou dans un capillaire avant la formation des gouttes. Il s'agit ici d'appliquer ce système permettant de former des gouttes d'environ 70nL à la cristallisation d'une protéine d'intérêt pharmaceutique, la protéine QR2. Pour cela, la solution de protéine est mélangée à une solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , comme illustré dans la Figure 69. Lorsque les débits appliqués aux deux phases dispersées (QR2 et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) sont identiques, la même quantité de chaque solution est ajoutée dans la goutte, soit un mélange 1:1 des deux solutions. La phase continue utilisée est l'huile FMS.



Figure 69 : (a) Schéma et (b) photographie de la formation des gouttes dans une jonction en croix.

Différentes concentrations de QR2 et de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont testées, choisies à partir du criblage en Microbatch® (Figure 67). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 70. Chaque ligne de goutte correspond à un capillaire et à une expérience de cristallisation indépendante. La sursaturation est décroissante de la Figure 70a vers la Figure 70d. Des cristaux de QR2 sont ainsi obtenus en microfluidique, dans des gouttes de 65nL. Les différentes conditions testées permettent d'identifier la meilleure pour favoriser la croissance de peu de cristaux (Figure 70c) par rapport à la nucléation d'une multitude de petits cristaux (Figure 70a et b) ou à l'absence de cristallisation (Figure 70d).

La condition correspondant à la Figure 70c (1,2M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et 20mg/mL de QR2, 20°C) est ensuite reproduite, avec un suivi de la croissance cristalline au cours du temps à l'aide de la caméra motorisée en x, y et z (Figure 52). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 71.

Ces expériences préliminaires ont permis d'obtenir les premiers cristaux de la protéine QR2 en microfluidique dans des gouttes de 65nL, à l'aide du système *plug and play* développé par Shuheng Zhang au cours de sa thèse (Figure 46) (Zhang, 2015). Des conditions favorables à la croissance de peu de cristaux dans les gouttes ont ainsi été identifiées.



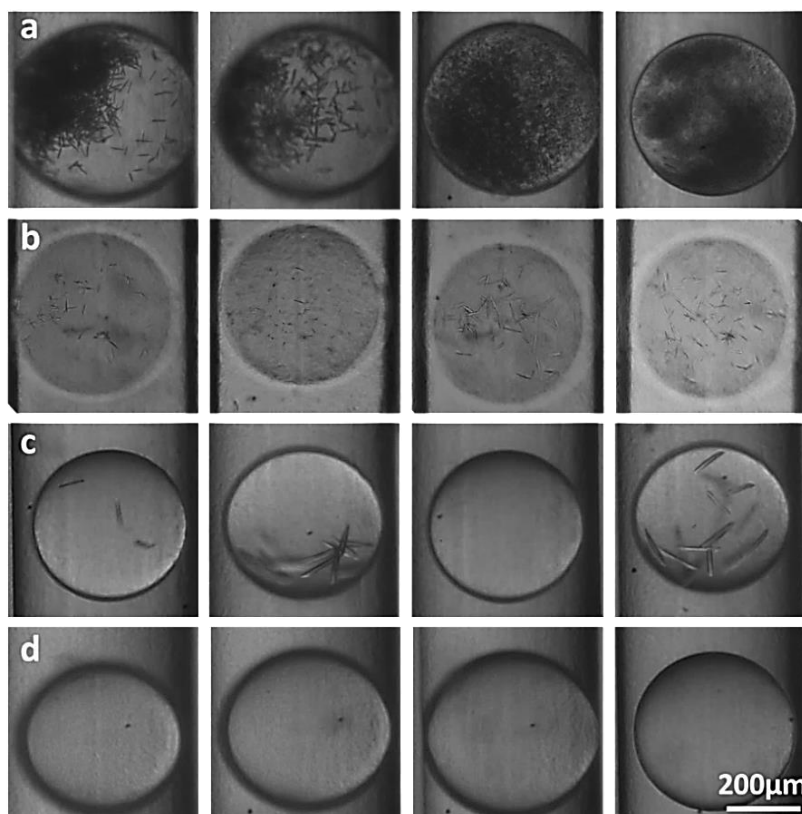


Figure 70 : Photographies des cristaux de QR2 obtenus dans des gouttes de 65nL après 12h d'incubation à 20°C (pH 8, 20mM de tampon Tris, 150mM de NaCl). (a) 1,4M de  $(NH_4)_2SO_4$ , 20mg/mL de QR2. (b) 1,4M de  $(NH_4)_2SO_4$ , 10mg/mL de QR2. (c) 1,2M de  $(NH_4)_2SO_4$ , 20mg/mL de QR2. (d) 1,2M de  $(NH_4)_2SO_4$ , 10mg/mL de QR2. Pour chaque condition, quatre gouttes représentatives ont été sélectionnées à partir d'un minimum de cinquante gouttes.

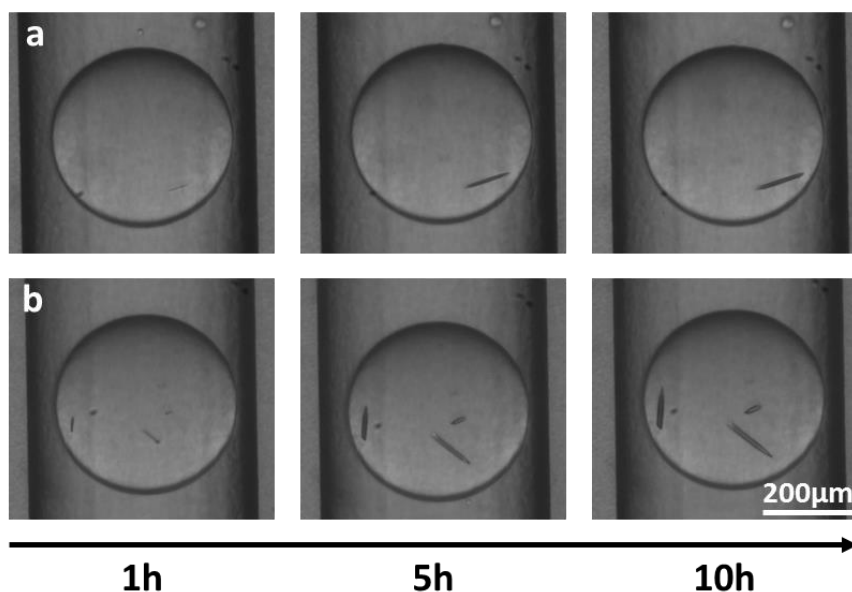


Figure 71 : Observation de la croissance de cristaux de QR2 au cours du temps dans deux gouttes représentatives sélectionnées à partir d'une cinquantaine de gouttes (QR2 20mg/mL,  $(NH_4)_2SO_4$  1,2M, Tris pH 8 20mM, NaCl 150mM).

### 1.2.2. Couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té

L'objectif de ce travail de thèse est de développer un outil microfluidique permettant le criblage des conditions de cristallisation ou des ligands d'une protéine-cible. La jonction en croix présentée précédemment permet de mélanger deux solutions à l'intérieur des gouttes, la protéine et un agent de cristallisation par exemple. Cependant, il peut être nécessaire d'ajouter un additif, un second agent de cristallisation, ou un ligand. Ainsi, une troisième solution doit parfois être ajoutée dans les gouttes. C'est pourquoi un nouveau montage microfluidique est mis en place (Figure 72). Pour cela, la jonction en croix est couplée à une jonction en té, permettant d'ajouter une troisième solution dans les gouttes après leur génération. En effet, si les solutions mélangées dans la croix et la solution ajoutée dans le té sont miscibles, alors dans une certaine gamme de débit, la solution ajoutée se mélangera aux gouttes (§ A.2.2.4.1).

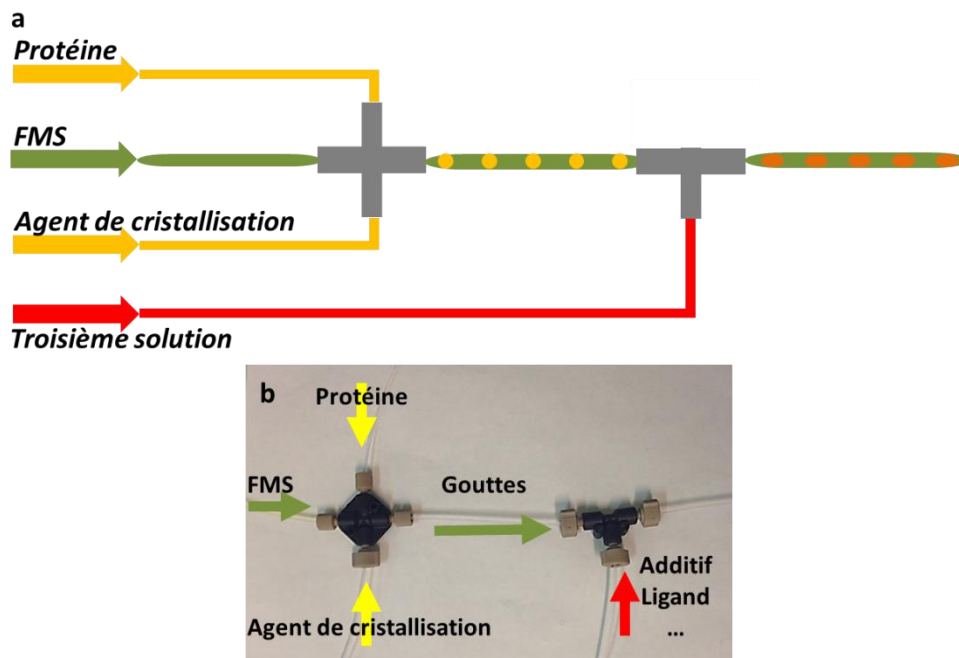


Figure 72 : (a) Schéma et (b) photographie de la formation des gouttes dans une jonction en croix associée à une jonction en té.

Le débit des deux phases aqueuses permettant de former les premières gouttes (en jaune sur la Figure 72), avant mélange, est appelé débit des phases aqueuses primaires. La troisième solution (en rouge sur la Figure 72) est appelée troisième phase aqueuse. La somme des débits des deux premières phases aqueuses et de l'huile est appelée débit des gouttes primaires. Enfin, les gouttes mélangées formées après la jonction en té sont appelées gouttes secondaires. Il s'agit donc ici d'une étude à trois paramètres (débits de l'huile, des phases aqueuses primaires et de la phase aqueuse secondaire). La représentation en deux dimensions sur un graphe peut donc s'avérer complexe.

Une fois le montage mis en place, il faut déterminer les conditions de débit de chaque phase pour lesquelles la troisième solution se mélange bien aux gouttes primaires (sans utiliser de tensioactif pour faciliter la coalescence entre la troisième phase et les gouttes primaires). C'est-à-dire que la troisième solution ne doit pas former de nouvelles

gouttes, et doit être ajoutée de façon régulière aux gouttes primaires. Afin de faciliter l'observation du mélange, des colorants sont utilisés, jaune pour les phases aqueuses primaires, et rouge pour la troisième phase aqueuse. Pour chaque débit étudié (FMS, premières phases aqueuses et troisième phase aqueuse), une étude statistique des caractéristiques des gouttes (taille, fréquence) est réalisée de façon à obtenir une zone de fonctionnement dans laquelle la troisième solution est ajoutée aux gouttes primaires de façon régulière et proportionnelle aux débits utilisés (Figure 73).

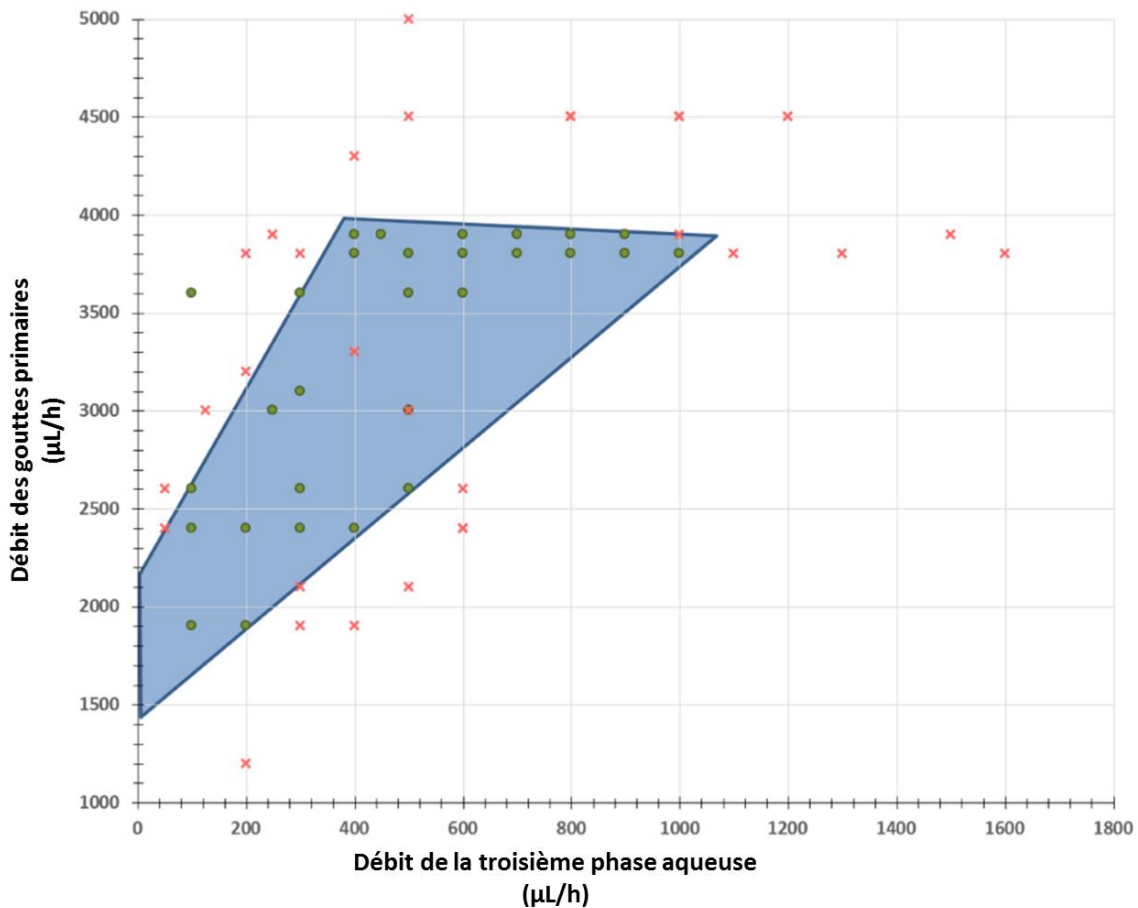


Figure 73 : Zone de fonctionnement représentant les plages de débits pour lesquelles la troisième phase aqueuse est ajoutée aux gouttes primaires dans un capillaire de 500 $\mu$ m ID. Les points verts représentent les débits pour lesquels des gouttes régulières sont formées, les croix rouges les débits pour lesquels les gouttes formées ne sont pas régulières en termes de composition (couleur), de taille ou de fréquence. La zone de fonctionnement est représentée en bleu.

Certains débits situés dans la zone de fonctionnement ne permettent pas de former des gouttes régulières. L'ajout d'une troisième solution dans les gouttes à l'aide d'une jonction en T n'est pas possible pour certaines distributions de gouttes primaires. En effet, ces dernières doivent être suffisamment proches les unes des autres pour favoriser le mélange au lieu de la formation de nouvelles gouttes, mais doivent être suffisamment éloignées les unes des autres pour permettre l'augmentation du volume des gouttes secondaires sans coalescer. Une seconde zone de fonctionnement est alors déterminée, sur laquelle le mélange de la troisième phase aqueuse est représenté en fonction de la somme

des débits des phases aqueuses primaires et du débit d'huile (Figure 74). Dans cette zone, le rapport des débits (somme des phases aqueuses primaires/huile) se trouve autour de 1/4 (trait plein vert), soit approximativement entre 1/3 et 1/6 (traits en pointillés verts).

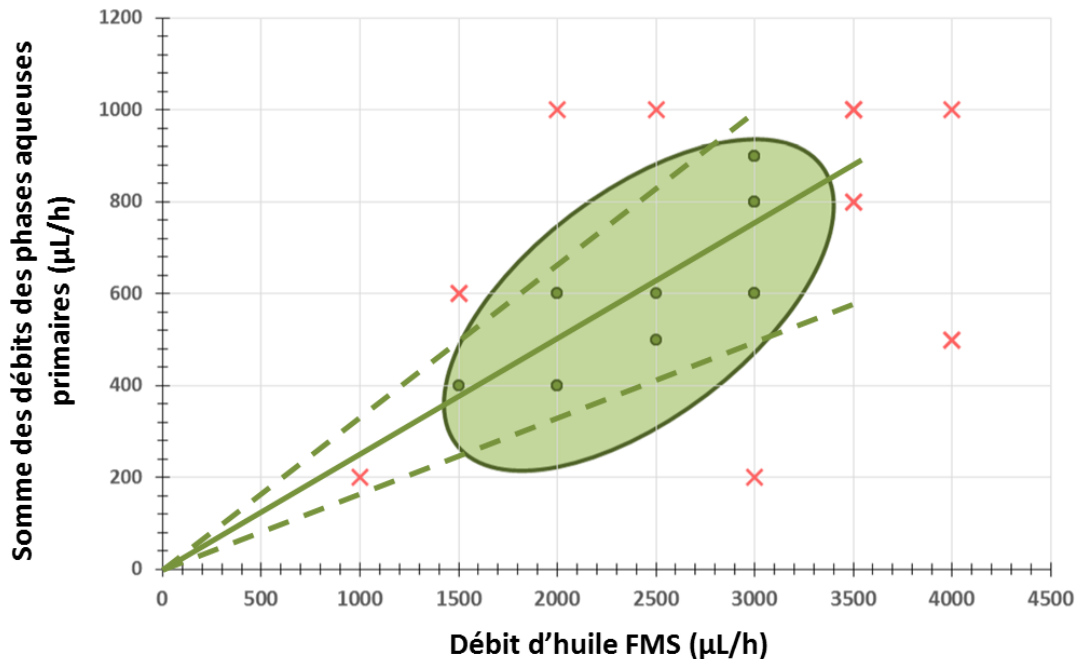


Figure 74 : Diagramme représentant le débit d'huile FMS et la somme des débits des phases aqueuses primaires permettant l'ajout de la troisième phase aqueuse. Les points verts représentent les débits pour lesquels des gouttes régulières sont formées en sortie de té, les croix rouges les débits pour lesquels les gouttes formées ne sont pas régulières en termes de composition, de taille ou de fréquence. La zone de fonctionnement est représentée en vert. L'expérience fonctionne lorsque le rapport des débits (somme des phases aqueuses primaires/huile) se trouve autour de 1/4 (trait plein vert), entre approximativement 1/3 et 1/6 (traits en pointillés verts). Le débit de la troisième phase aqueuse est compris entre 100 et 1000 µL/h.

Lorsque les quatre débits (FMS, phases aqueuses primaires et troisième phase aqueuse) se situent dans les deux zones de fonctionnement (Figure 73 et Figure 74), cela signifie que la troisième solution est ajoutée régulièrement aux gouttes primaires, formant des gouttes secondaires reproductibles en taille, fréquence et composition. Dans ce cas, pour des débits d'huile et de phases aqueuses primaires constants, une augmentation du débit de la troisième phase aqueuse se traduit par une augmentation du volume de cette solution ajoutée dans les gouttes, tel que montré sur la Figure 75.

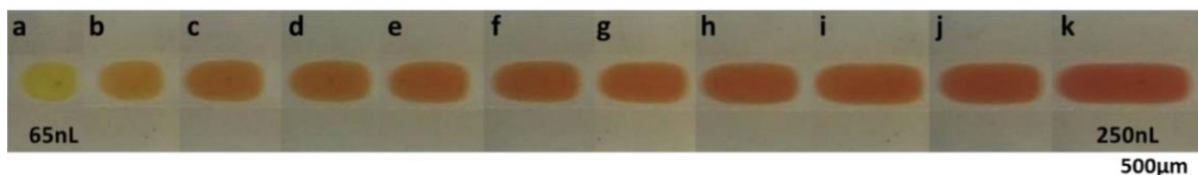


Figure 75 : Gouttes secondaires après mélange dans les gouttes primaires à l'aide d'une jonction en té. (a) goutte primaire jaune, (b) à (k) augmentation progressive du débit de la troisième phase aqueuse (rouge) pour les mêmes gouttes primaires. Une centaine de gouttes sont générées pour chaque condition avant l'augmentation du débit de la troisième phase aqueuse.

Il est ainsi possible de contrôler la quantité de solution ajoutée aux gouttes primaires en contrôlant les débits des différentes solutions. Au fur et à mesure de l'augmentation du débit de la solution rouge, les gouttes sont de plus en plus rouges et leur volume augmente. Le mélange des différentes solutions dans la goutte est d'autant plus rapide que la goutte est ronde (§ A.3.7). Ainsi, une augmentation trop importante du volume de la goutte, et donc un débit de troisième phase aqueuse trop important, ne permet pas d'obtenir une goutte homogène en un temps raisonnable (c'est-à-dire inférieur à une minute). En effet, plus la goutte est allongée plus son temps d'homogénéisation est long. Il est toutefois possible d'accélérer le mélange des solutions dans la goutte par effet dit *twirling* (ou tournoiement) en créant des virages successifs dans le positionnement des capillaires (Tice et al., 2003).

### 1.3. Capillaires de 150 $\mu$ m de diamètre interne

L'utilisation des robots de cristallisation est largement répandue dans les laboratoires de cristallogénèse. Ces robots sont capables de former des gouttes hautement reproductibles de l'ordre de la centaine de nanolitres. Or les gouttes formées précédemment sont du même ordre de grandeur, la centaine de nanolitres. L'un des intérêts de la microfluidique étant la réduction des volumes mis en jeu dans les expériences de cristallisation, le volume des gouttes formées dans les capillaires est donc réduit à moins de 60nL. Pour cela, des capillaires de diamètre interne plus petit, 150 $\mu$ m, sont utilisés, permettant de former des gouttes de quelques nanolitres.

#### 1.3.1. Choix du type de capillaire

Dans un premier temps, des capillaires de 150 $\mu$ m de diamètre interne (ID) et de 360 $\mu$ m de diamètre externe (OD) sont utilisés. Ils sont en PFA, soit le même polymère que les capillaires de 500 $\mu$ m ID utilisés précédemment (Figure 76).

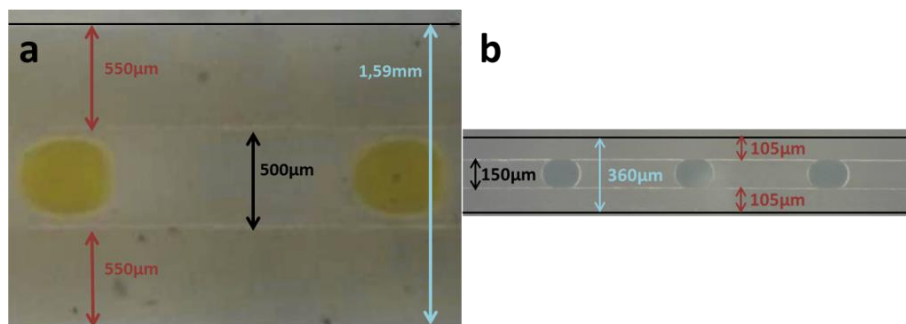


Figure 76 : Photographie des capillaires utilisés. (a) PFA, ID 500 $\mu$ m, OD 1,59mm. (b) PFA, ID 150 $\mu$ m, OD 360 $\mu$ m

Les gouttes sont tout d'abord générées à l'aide d'une jonction en croix seule. Pour cela, le montage présenté en Figure 69 est reproduit avec des jonctions adaptées à ces nouveaux diamètres de capillaire. Cependant, la finesse et la flexibilité des capillaires compliquent l'étape du montage. Les capillaires se tordent et se bouchent facilement, provoquant des à-coups dans les débits et des fuites au niveau des seringues. D'autre part, les

paramètres de torsion et de bouchage des capillaires ne sont pas reproductibles d'un montage à l'autre, empêchant la reproductibilité des gouttes d'une expérience à l'autre (Figure 77).

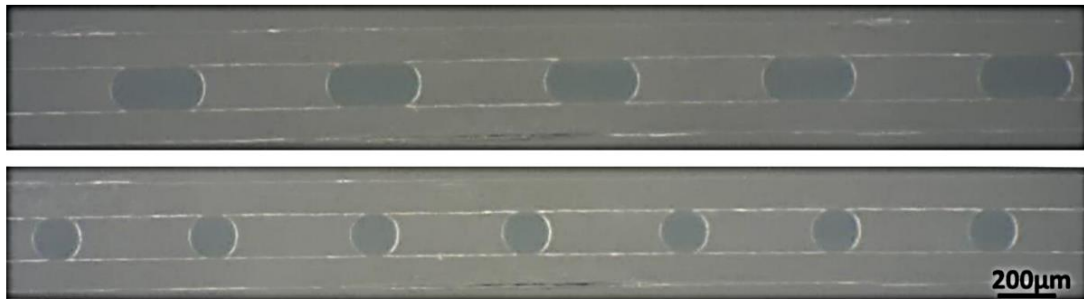


Figure 77 : Deux séries de gouttes d'eau colorée obtenues avec les mêmes débits d'huile FMS et de phase aqueuse dans des capillaires de 150µm ID et de 360µm OD.

Afin de s'affranchir des problèmes de reproductibilité liés au montage et à la flexibilité des capillaires, des capillaires en téflon de 150µm ID, mais de 1,59mm OD, soit le même diamètre externe que les capillaires de 500µm ID, sont utilisés (Figure 78). L'épaisseur de la paroi est alors nettement plus importante, il faut donc trouver des capillaires transparents malgré cette épaisseur. Deux candidats se sont donc imposés, l'un en FEP et l'autre en PTFE (Figure 79). Les propriétés de surface de ces capillaires sont similaires à celles des capillaires en PFA.

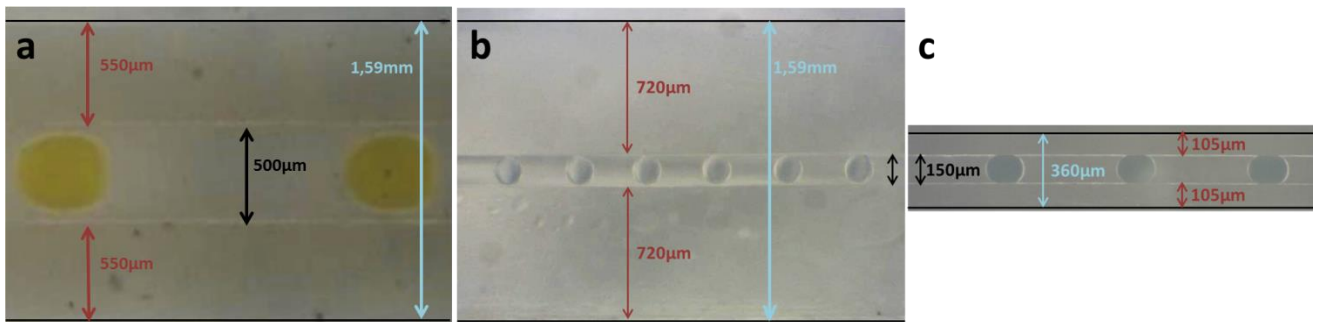


Figure 78 : Photographie des capillaires en téflon utilisés. (a) PFA, ID 500µm, OD 1,59mm. (b) FEP ou PTFE, ID 150µm, OD 1,59mm. (c) PFA, ID 150µm, OD 360µm.

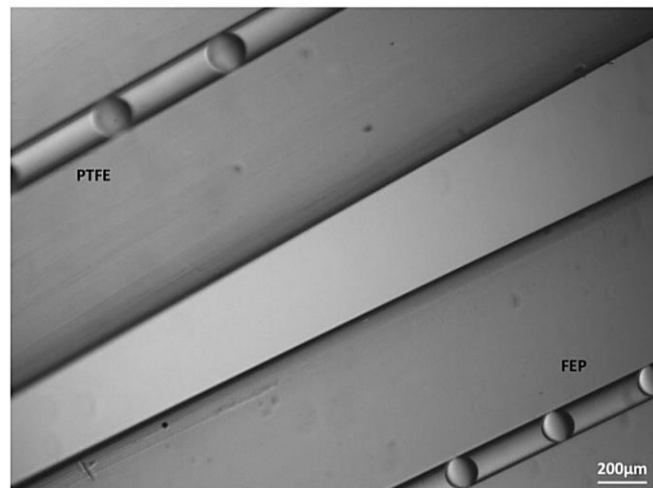


Figure 79 : Photographie du capillaire en PTFE (en haut) et du capillaire en FEP (en bas)

Tout d’abord, malgré l’épaisseur des parois en téflon, les gouttes sont tout à fait visibles à l’intérieur des deux capillaires. Le FEP semble toutefois plus transparent que le PTFE. De plus, ces capillaires permettent de générer des gouttes beaucoup plus facilement, et de façon très reproductible. Les critères sont donc respectés pour ces deux capillaires. Cependant, le montage microfluidique sera par la suite couplé à un spectromètre UV-Vis, le capillaire choisi doit donc être le plus transparent possible aux UV. Les spectres d’absorbances des différents matériaux utilisés (PFA, FEP, PTFE) sont présentés dans la Figure 80 (Galante et al., 2010).

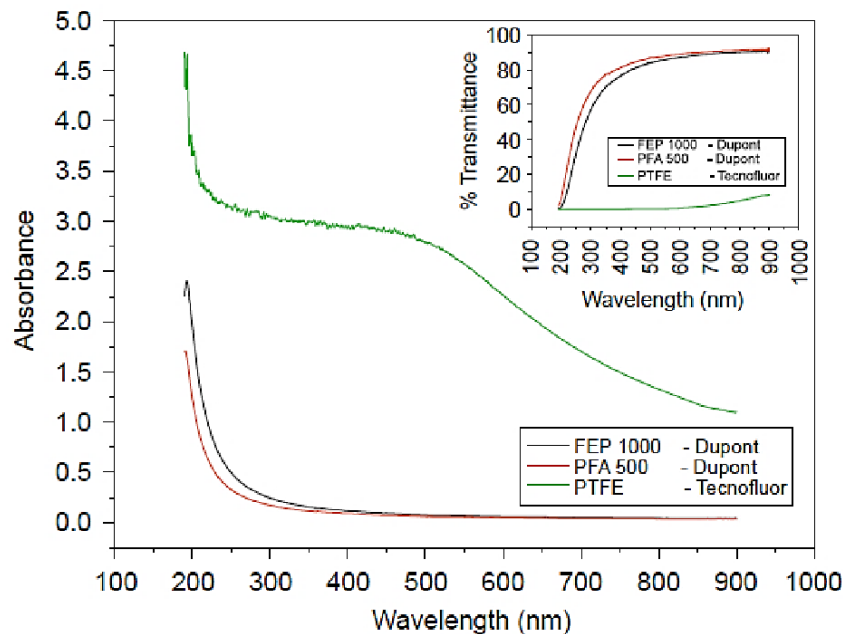


Figure 80 : Spectre d’absorbance du PFA (rouge), du FEP (noir) et du PTFE (vert) en fonction de la longueur d’onde (Galante et al., 2010).

D’après la Figure 80, le FEP est beaucoup plus transparent aux UV que le PTFE. C’est donc ce type de capillaire qui sera utilisé pour la suite de cette étude.

### 1.3.2. Choix de l’huile

La méthode du gradient de concentration permet de générer rapidement et facilement des gouttes de compositions différentes, et ainsi de balayer une large gamme de sursaturations (§ B.1.1.3). Dans les capillaires de 150 $\mu$ m ID, la vitesse des gouttes lors de leur génération doit être faible pour pouvoir les observer. Pour cela, le débit d’huile appliqué doit être faible. D’après la Figure 74, le rapport maximum des débits est de 1/3, ce qui implique que la somme des débits des phases aqueuses primaires doit être la plus faible possible pour réduire le débit d’huile. Sur notre dispositif, les débits en deçà de 10 $\mu$ L/h ne sont pas très précis compte tenu du diamètre des seringues utilisées. Ainsi le débit minimum pouvant être appliqué à chacune des solutions aqueuses (protéine et agent de cristallisation) est de 10 $\mu$ L/h. Pour tester au moins 5 conditions de sursaturation avec un gradient de concentration par pas de 5 à partir de 10 $\mu$ L/h, le débit de chaque solution atteint 30 $\mu$ L/h, soit une somme des débits des deux phases aqueuses de 60 $\mu$ L/h. Le débit d’huile est alors fixé à 180 $\mu$ L/h, puis est réduit peu à peu jusqu’à ce que les gouttes soient régulières et

observables. Dans un capillaire de 150µm ID, ces essais conduisent à un rapport de débit (phases dispersées/huile) maximal de 1/2, ce qui donne un débit d'huile FMS de 120µL/h.

En appliquant ces débits de phases aqueuses primaires (60µL/h au total) et d'huile FMS (120µL/h), le débit total minimum est donc de 180µL/h. Dans ce cas, la longueur de capillaire permettant de contenir toutes les gouttes générées avec un gradient de concentration à 5 paliers de 1 minute (temps nécessaire pour bien stabiliser les débits et obtenir des gouttes régulières et homogènes) est de 30cm. Or il est très difficile de générer des gouttes avec cette longueur de capillaire. En effet, les différentes phases sortent de la jonction en croix par à-coup et il est difficile de générer des gouttes, ce sont essentiellement de très longs plugs. De plus, ces plugs sont très irréguliers en taille et en fréquence, ce qui suscite un doute sur leur composition chimique. Enfin, les solutions les plus visqueuses, comme la solution concentrée de protéine, ont du mal à sortir de la seringue à des débits inférieurs à 20µL/h.

Ces différents problèmes sont résolus dès lors que le capillaire de sortie est raccourci. La longueur du capillaire joue donc un rôle important dans la génération des gouttes. D'autre part, l'impact de la longueur du capillaire est beaucoup plus important dans un capillaire de 150µm ID que dans un capillaire de 500µm ID. Une grande résistance dans le capillaire gêne la formation des gouttes. Cette résistance, appelée résistance hydraulique ( $R_{hyd}$ ), est liée à la perte de charge, due à la dissipation par frottements de l'énergie mécanique du fluide en mouvement dans un canal sous forme de chaleur.  $R_{hyd}$  (en  $kg.s^{-1}.m^{-4}$  ou  $Pa.s.m^{-3}$ ) est donnée par l'Équation 22, qui fait intervenir la viscosité dynamique  $\mu_c$  (en  $kg.m^{-1}.s^{-1}$  ou  $Pa.s$ ) de l'huile dans ce cas car c'est la phase continue, la longueur  $L$  du capillaire (en m) et le diamètre interne  $W$  du capillaire (en m) :

$$R_{hyd} = \frac{8}{\pi} \mu_c L \frac{1}{W^4}$$

*Équation 22*

Ainsi, plus  $W$  diminue, plus  $R_{hyd}$  est élevée et donc plus il est difficile de générer des gouttes stables et régulières. Cependant, les capillaires circulaires utilisés ici sont ceux qui impliquent le moins de résistance hydraulique, en comparaison avec les autres géométries possibles (carré, triangle, etc...).

$R_{hyd}$  augmente également avec la viscosité dynamique de la phase continue et la longueur du capillaire. Le diamètre interne du capillaire et sa longueur étant fixés par la taille des gouttes désirée (150µm ID, soit  $2nL$ ), le seul paramètre pouvant être modulé pour abaisser  $R_{hyd}$  est la viscosité dynamique de la phase continue  $\mu_c$ .

Des huiles de plus faibles viscosités dynamiques sont donc testées, de façon à générer facilement et rapidement des gouttes dans un long capillaire de 150µm ID. Il est important de souligner que moins l'huile utilisée est visqueuse, plus le débit de l'huile doit être important pour générer des gouttes. Ceci implique que, pour une même durée de chaque palier (1min), le nombre de gouttes générées est plus grand, et donc que le capillaire de sortie doit être plus long. Cependant, la relation entre l'augmentation du débit et la diminution de la viscosité n'est pas linéaire. Il est donc possible de réduire la viscosité de



l'huile sans augmenter considérablement la longueur du capillaire. C'est pourquoi dans la suite de ce travail la longueur minimum permettant de contenir toutes les gouttes générées pour réaliser les paliers désirés est fixée à 60cm.

L'huile FC-70 a été testée. Beaucoup moins visqueuse que l'huile FMS utilisée précédemment ( $\mu_{FMS} = 0,5 > \mu_{FC-70} = 0,023 \text{ kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , Tableau 1), cette huile permet de réduire considérablement  $R_{hyd}$  dans un long capillaire de  $150\mu\text{m}$  ID (Figure 81). Grâce à cette très faible viscosité dynamique, la résistance hydraulique provoquée par le FC-70 dans un long capillaire se rapproche de celle induite par le FMS dans un capillaire de  $500\mu\text{m}$  de ID.

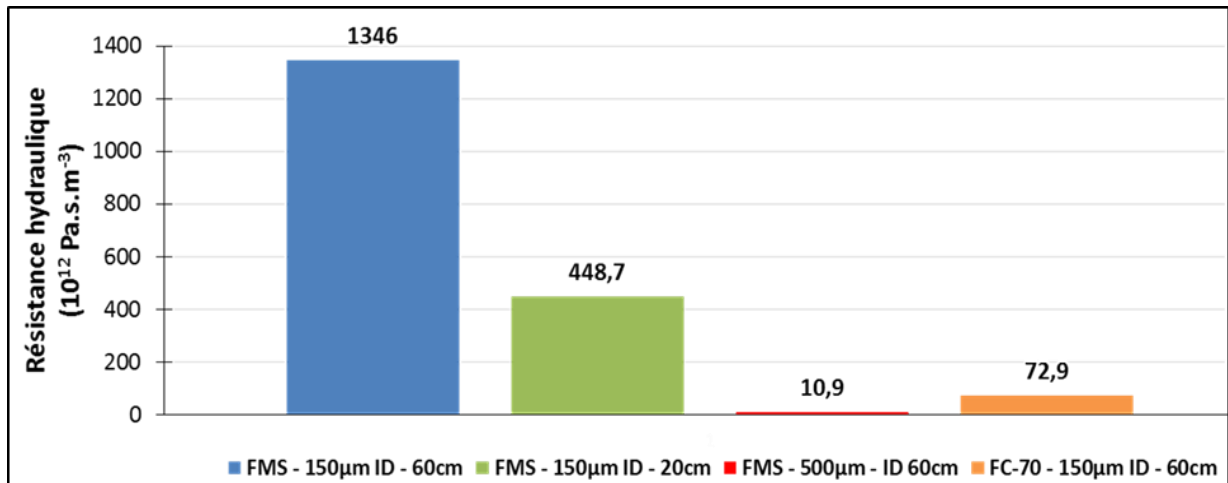


Figure 81 : Comparaison des résistances hydrauliques obtenues pour le FMS et le FC-70 pour différentes longueurs de capillaires et différents diamètres internes. De gauche à droite : en bleu,  $R_{hyd}$  obtenue avec le FMS dans un capillaire de 60cm de  $150\mu\text{m}$  ID ; en vert,  $R_{hyd}$  obtenue avec le FMS dans un capillaire de 20cm de  $150\mu\text{m}$  ID ; en rouge,  $R_{hyd}$  obtenue avec le FMS dans un capillaire de 60cm de  $500\mu\text{m}$  ID ; en orange,  $R_{hyd}$  obtenue avec le FC-70 dans un capillaire de 60cm de  $150\mu\text{m}$  ID.

L'huile FC-70 permet donc de générer plus facilement des gouttes dans un long capillaire, et les gouttes sont reproductibles d'un montage à l'autre lorsque les débits utilisés sont identiques (Figure 82). De plus, il semble que lorsque la viscosité dynamique diminue, l'influence du serrage des jonctions sur la génération des gouttes soit négligeable, permettant une meilleure reproductibilité de la taille des gouttes entre les expériences.

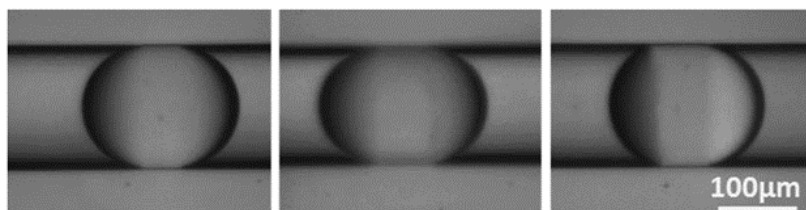


Figure 82 : Gouttes d'eau générées dans l'huile FC-70, dans un capillaire de  $150\mu\text{m}$  ID et de 60cm de long, pour les mêmes débits et lors de trois expériences distinctes.

L'huile FC-70 est donc choisie pour la génération de gouttes dans un long capillaire, afin de tester différents paliers de concentration dans un même capillaire. Cependant, les gouttes générées dans l'huile FC-70 sont généralement plus allongées car, cette huile étant moins visqueuse, il est plus difficile d'obtenir des gouttes rondes bien stables.

### 1.3.3. Validation du système

Afin de valider le système constitué de capillaires en FEP (150 $\mu$ m ID, 1,59mm OD) et d'huile FC-70, des gouttes de QR2 et (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sont générées dans un capillaire de 60cm de long. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 83. Les gouttes de QR2 obtenues sont régulières en taille et en fréquence. L'huile FC-70 est donc bien adaptée à la génération de gouttes de protéine dans un long capillaire de 150 $\mu$ m ID.

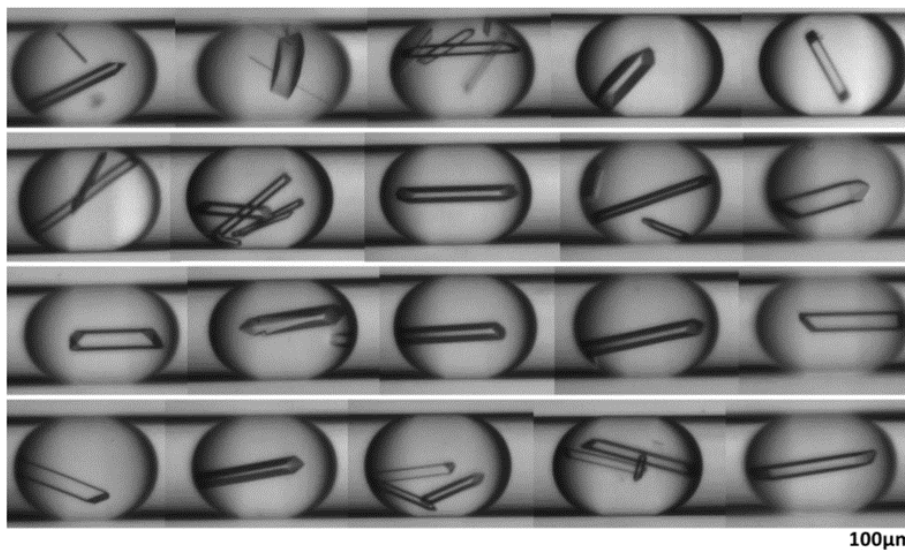


Figure 83 : Cristaux de QR2 obtenus dans un long capillaire (60cm) dans l'huile FC-70, à 20°C, après 10h. QR2 6mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,3M, 150mM NaCl, 20mM Tris, pH8. 20 gouttes représentatives ont été sélectionnées sur environ 300 gouttes de 3nL générées.

D'autre part, les gouttes sont stables au cours du temps. Elles sont cependant un peu plus mobiles dans le capillaire qu'avec l'huile FMS. En effet, l'huile FC-70 étant peu visqueuse, les gouttes peuvent se déplacer légèrement dans le capillaire, sans toutefois coalescer entre elles. Dans certains cas, le cristal peut ne pas suivre le mouvement de la goutte et rester dans l'huile (Figure 84).

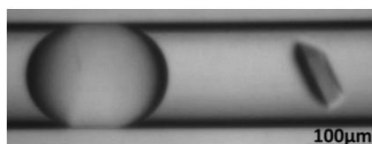


Figure 84 : Cristal de QR2 resté dans l'huile FC-70 après déplacement de la goutte dans laquelle il a nucléé.

La principale cause de mouvement des gouttes est le changement de température, qui peut provoquer la dilatation ou la rétractation du capillaire et/ou des fluides à l'intérieur. Lorsque la goutte se déplace, si le cristal est gros, ou si il est accroché à la paroi du capillaire, il risque de rester sur place, dans l'huile. La présence d'huile autour du cristal peut à long terme endommager le réseau cristallin, et compliquer l'extraction du cristal du capillaire. Cependant, dans la plupart des cas, très peu de cristaux sortent de la goutte. Ces résultats permettent donc de valider le système microfluidique. Les gouttes obtenues sont régulières et reproductibles, et des monocristaux de QR2 ont nucléé dans des gouttes de quelques nanolitres.

## 1.4. Caractérisation en ligne des gouttes par spectrométrie UV

Pour la génération de séries de gouttes de compositions différentes (nature et concentration des sels, ajout d'additifs (polymères, ou polyols) ...), la goutte est formée après mélange de différents composants. La concentration finale des différents composants dans la goutte est alors gérée par le débit des différents flux qui sont mélangés. Cependant, il est primordial de vérifier que la mise en place du mélange de plusieurs solutions et d'un gradient de concentration au sein d'un capillaire conduit à une composition bien contrôlée de chaque goutte. Ainsi, pour connaître la composition des gouttes, et donc identifier la meilleure condition de cristallisation, il est nécessaire de coupler le montage microfluidique à une méthode de caractérisation en ligne de la composition des gouttes. De plus, la petite taille des gouttes limite la vérification de la régularité des gouttes à l'œil nu. Un spectromètre UV-Vis permettant de suivre en ligne la concentration en protéine des gouttes générées est donc utilisé. Ce couplage est d'abord testé avec un flux de solution dans un capillaire de 150 $\mu$ m ID puis avec des gouttes de quelques nanolitres circulant dans ce capillaire. La mise au point de la méthode d'acquisition des données est faite avec le lysozyme, puis celle-ci est appliquée à la QR2.

Etant donné la petite taille des gouttes et leur vitesse de circulation dans le capillaire, les valeurs d'absorbance mesurées à 280nm sont très faibles. Afin de réduire au maximum le bruit de la mesure, le signal brut, c'est-à-dire l'intensité transmise, est utilisé directement. A partir des mesures d'intensité transmise, il est possible de calculer l'absorbance et de la tracer en fonction de la concentration en lysozyme d'après la loi de Beer-Lambert (Équation 13).  $I_0$  correspond à l'intensité transmise par la référence, c'est-à-dire par l'huile FC-70 dans un capillaire. Il faut noter que l'huile FC-70 (comme l'huile FMS) absorbe très peu autour de 280nm. Pour des flux continus de solution de protéine, l'intensité  $I$  utilisée pour calculer l'absorbance de la solution est la moyenne des mesures obtenues au cours du temps.

### 1.4.1. Temps d'intégration

Compris entre 10ms et 65s, le temps d'intégration ( $t_i$ ) est le temps pendant lequel le spectromètre accumule les photons transmis. Sachant que dans le montage l'intensité de la lampe n'est pas réglable, la seule façon d'avoir une intensité suffisamment importante quand l'absorbance de la goutte est forte est d'augmenter  $t_i$ . Ce temps d'intégration est choisi selon les règles suivantes :

- La capacité du détecteur ne doit pas être dépassée pour ne pas saturer le signal (Figure 85, ligne violette). Dans ce travail, seule l'absorbance à 280nm est utilisée pour la caractérisation en ligne de gouttes de protéine,  $t_i$  peut donc être augmenté jusqu'à obtenir un signal suffisant à 280nm, même s'il est saturé pour d'autres longueurs d'onde.
- Le rapport signal/bruit peut être amélioré en augmentant le  $t_i$ . Généralement, il est suggéré de régler  $t_i$  de sorte que, pour les longueurs d'ondes utilisées, le signal corresponde à 85% de l'intensité de saturation du spectromètre (Figure 85, ligne bleue).

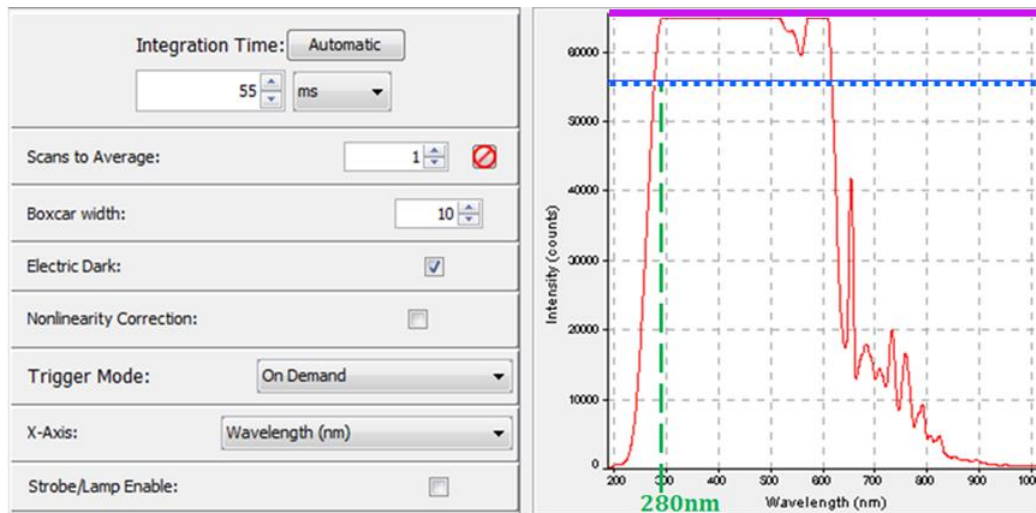


Figure 85 : Interface du logiciel Oceanview pour régler l'intensité transmise grâce au temps d'intégration. Ligne en pointillés bleus : intensité d'environ 85% de la capacité de spectromètre à 280nm. Ligne violette : saturation du détecteur.

Pour mesurer précisément l'absorbance d'une goutte, il faut réaliser plusieurs acquisitions ( $\geq 10$ ) au cours du passage de la goutte à travers le faisceau optique. Idéalement, le  $t_i$  doit donc être au moins 10 fois plus petit que le temps de passage de la goutte. Cela permet de décomposer le passage d'une goutte dans le faisceau et ainsi d'accéder à sa composition et à sa forme. Ainsi, un temps d'intégration très faible permet d'accéder à des informations très locales sur la composition et la forme des gouttes. Cependant, la quantité de signal détectée diminue avec le temps d'intégration, ce qui réduit le rapport signal/bruit. Il y a donc un compromis sur le temps d'intégration pour accéder à des mesures de concentration en protéine dans des gouttes de quelques nanolitres.

#### 1.4.2. Résultats obtenus dans des capillaires de 500 $\mu$ m ID

Le développement de l'analyse en ligne par spectrométrie UV de gouttes produites dans ce montage microfluidique a été réalisé au cours de la thèse de Shuheng Zhang sur des gouttes de 70nL dans des capillaires de 500 $\mu$ m ID. Les résultats d'absorbance en ligne à 280nm qu'elle a obtenus pour des gouttes de lysozyme sont présentés dans la Figure 86.

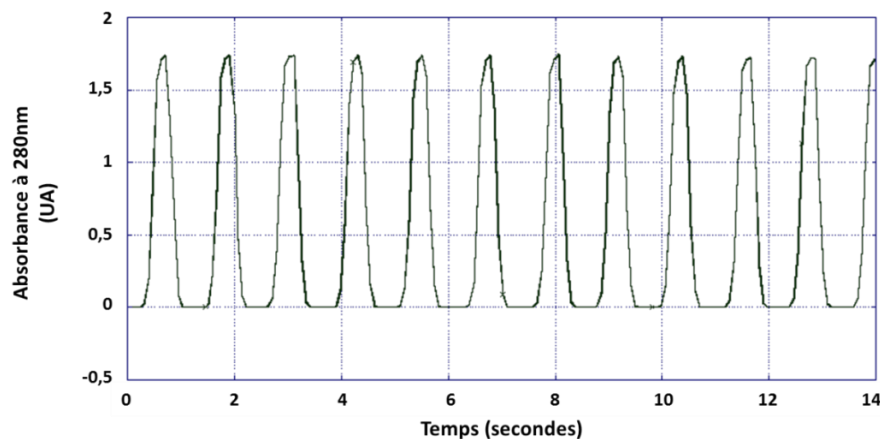


Figure 86 : Absorbance à 280nm de gouttes de lysozyme de 70nL dispersées dans de l'huile FMS en fonction du temps. Chaque pic correspond au passage d'une goutte unique devant le détecteur (temps d'intégration : 80ms).

Ces résultats montrent que la spectrométrie UV est un outil d'analyse complet et adapté à la microfluidique. En effet, cette méthode permet de détecter la concentration en protéine de chaque goutte, chaque pic correspondant à une goutte. D'autre part, la largeur du pic donne une information sur la taille des gouttes à travers le temps de passage de la goutte devant le faisceau lumineux, tandis que la distance entre les pics reflète la fréquence des gouttes. Dans ce cas, la spectrométrie UV peut être utilisée comme un compteur de gouttes, permettant de localiser chaque goutte dans le porte échantillon et de connaître précisément leur concentration.

Cependant, ce type de résultat est difficile à obtenir dans des capillaires de 150 $\mu$ m ID. En effet, les gouttes sont beaucoup plus petites, et la paroi en téflon beaucoup plus épaisse (Figure 87). De plus, les gouttes circulent plus rapidement à l'intérieur du capillaire.

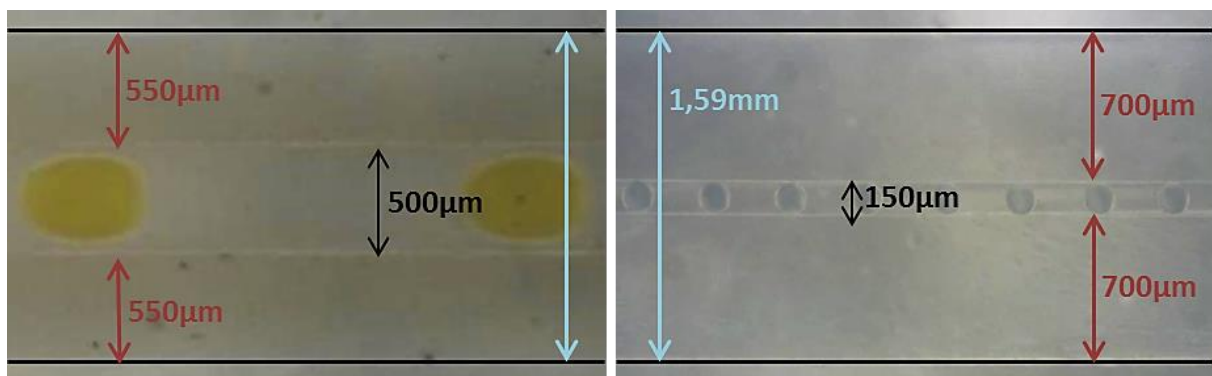


Figure 87 : Différence entre les gouttes formées dans un capillaire de 500 $\mu$ m ID (à gauche) et celles formées dans un capillaire de 150 $\mu$ m ID (à droite).

Dans un capillaire de 500 $\mu$ m ID, les gouttes font environ 70nL, tandis que les gouttes formées dans un capillaire de 150 $\mu$ m ID ont un volume de l'ordre de 2nL. Ainsi, les gouttes 35 fois plus petites absorbent 35 fois moins et le signal est donc réduit d'autant. De plus, la couche de téflon traversée par la lumière est de 1,09mm pour un capillaire de 500 $\mu$ m ID, contre 1,44mm pour un capillaire de 150 $\mu$ m ID de même diamètre externe, rajoutant 40% d'absorption due au téflon (les spectres d'absorbance du PFA et du FEP étant très proches, Figure 80). D'autre part, la taille du faisceau est de 400 $\mu$ m. Si cette largeur est adaptée à des gouttes ayant un diamètre de 500 $\mu$ m, le faisceau est beaucoup plus grand que des gouttes de 150 $\mu$ m de diamètre. Dans ce cas, la majorité du signal est donc due au téflon et à l'huile, augmentant ainsi le bruit de la mesure. La méthode doit donc être adaptée pour la détection d'absorbance UV en ligne pour des capillaires de 150 $\mu$ m ID.

### 1.4.3. Absorbance de flux continu dans des capillaires de 150 $\mu$ m ID

Il s'agit dans un premier temps de tester la capacité du spectromètre à détecter l'absorbance de différentes solutions de protéine à l'intérieur d'un capillaire de 150 $\mu$ m ID. Pour cela, nous avons fait circuler des flux continus de solutions de lysozyme à des concentrations allant de 2mg/mL à 75mg/mL, avec un  $t_i$  élevé (500ms) pour maximiser le signal transmis. Les intensités transmises à 280nm au cours du temps sont présentées dans la Figure 88.

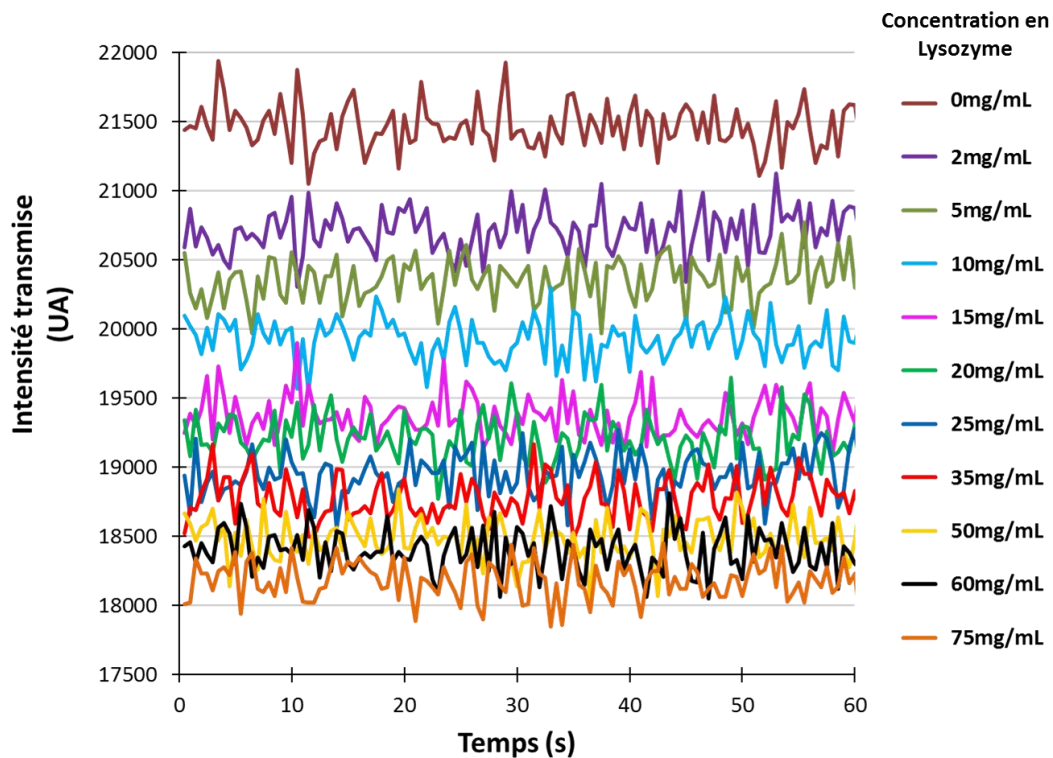


Figure 88 : Intensité transmise à 280nm au cours du temps par des flux continus (de haut en bas) de tampon NaCl 2M (marron), et de solutions de lysozyme à 2mg/mL (violet), 5mg/mL (vert foncé), 10mg/mL (bleu clair), 15mg/mL (rose), 20mg/mL (vert clair), 25mg/mL (bleu foncé), 35mg/mL (rouge), 50mg/mL (jaune), 60mg/mL (noir) et 75mg/mL (orange) dans un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm). Temps d'intégration : 500ms.

Ainsi, lorsque la concentration de lysozyme augmente, l'intensité transmise diminue, le spectromètre détecte bien le changement de concentration. A partir des résultats obtenus en Figure 88, l'absorbance est tracée en fonction de la concentration en lysozyme des solutions (Figure 89).

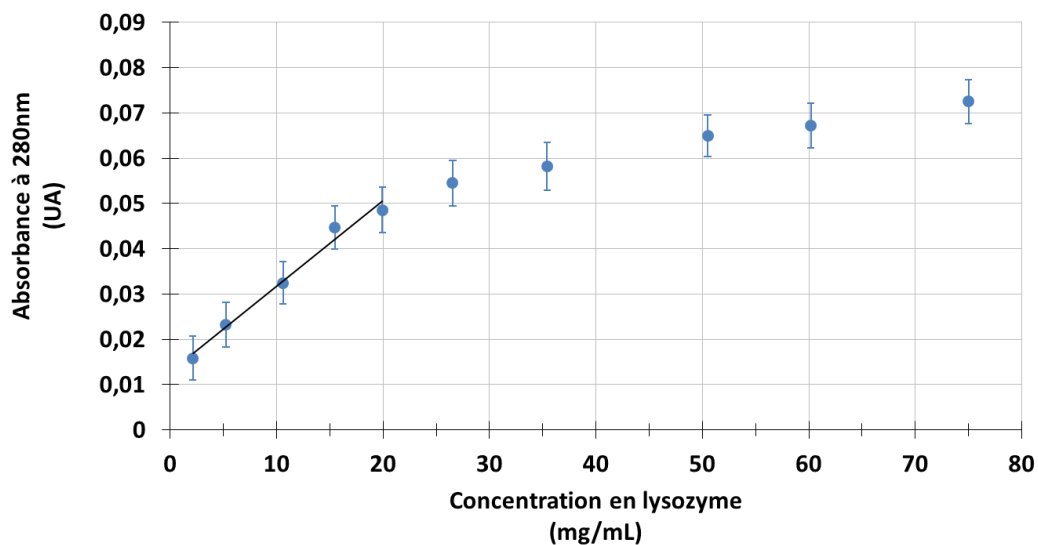


Figure 89 : Absorbance calculée à partir des intensités transmises de la Figure 88 en fonction de la concentration en lysozyme, dans un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm). Temps d'intégration : 500ms.

Sur une gamme de concentrations en lysozyme comprises entre 2 et 20mg/mL, l'absorbance calculée est proportionnelle à la concentration de la solution en protéine. Au-delà, le détecteur est saturé, et l'absorbance sort de la zone de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Malgré l'épaisseur de la paroi du capillaire, il est donc possible de mesurer l'absorbance en ligne d'une solution de protéine à 280nm circulant dans un capillaire de 150µm ID et 1,59mm OD.

Le signal d'absorbance est cependant très faible ( $A < 0,1$ ). La lumière émise par la lampe du spectromètre subit de nombreux changements de milieu avant d'arriver au détecteur. Elle traverse en effet la fibre optique en verre ( $n_{\text{verre}} = 1,553$ ), l'air ( $n_{\text{atmosphère}} = 1,000$ ), le capillaire en téflon ( $n_{\text{FEP}} = 1,344$ ), la solution dans le capillaire, puis de nouveau le FEP, l'air et le verre. Ces multiples changements de milieu entraînent des pertes de lumière, et donc de signal, à cause des phénomènes de réfraction de la lumière. La perte la plus importante se fait au moment du passage dans l'air, l'indice de réfraction de l'air étant plus faible que les indices de réfraction du verre et du FEP. Le porte-capillaire (Figure 51b) a donc été rempli avec une huile dont l'indice de réfraction se trouve entre celui du verre et celui de FEP. Cette huile DMS a été choisie car, d'une part son indice de réfraction se situe entre celui du verre et celui du FEP ( $n_{\text{DMS}} = 1,404$ ), et d'autre part elle est peu visqueuse et donc facile à utiliser pour remplir le porte-capillaire. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 90.

Le temps d'intégration utilisé pour les deux séries de mesures (avec et sans DMS) n'est pas le même. En effet, lorsque le porte-capillaire est simplement à l'air libre, le signal détecté est très faible, et seul un long temps d'intégration permet d'obtenir un signal significatif, d'où le choix d'utiliser un temps d'intégration de 500ms. En revanche, lorsque le porte-capillaire est rempli avec du DMS, le signal détecté est beaucoup plus important et sature très vite le détecteur. Le temps d'intégration est donc réduit à 200ms, temps d'intégration maximal pour lequel le détecteur n'est pas saturé.

La Figure 90 montre qu'avec un porte-capillaire rempli d'air ou de DMS, le lysozyme absorbe clairement autour de 280nm par rapport au tampon qui présente une absorbance proche de 0. De plus, un résultat important est que le signal d'absorbance est significativement plus élevé lorsque l'air est remplacé par de l'huile DMS. Par exemple, pour une concentration de 30mg/mL (courbes violettes), l'absorbance de la solution à 280nm est multiplié d'un facteur 4,5 dans le DMS, malgré la réduction du temps d'intégration. D'autre part, le signal dû à la protéine est très étalé lorsque les mesures sont faites dans l'air (Figure 90b). Il n'y a pas réellement de pic à 280nm, ce qui confirme qu'une partie du signal est perdue. Cela peut également traduire un rapport signal sur bruit moins élevé dans l'air. En revanche, dans le DMS, ce signal se présente sous la forme d'un pic à 280nm. Par conséquent, les mesures faites dans le DMS sont moins bruitées et plus précises que celles réalisées dans l'air, confirmant clairement l'intérêt de l'adaptation des indices de réfraction.

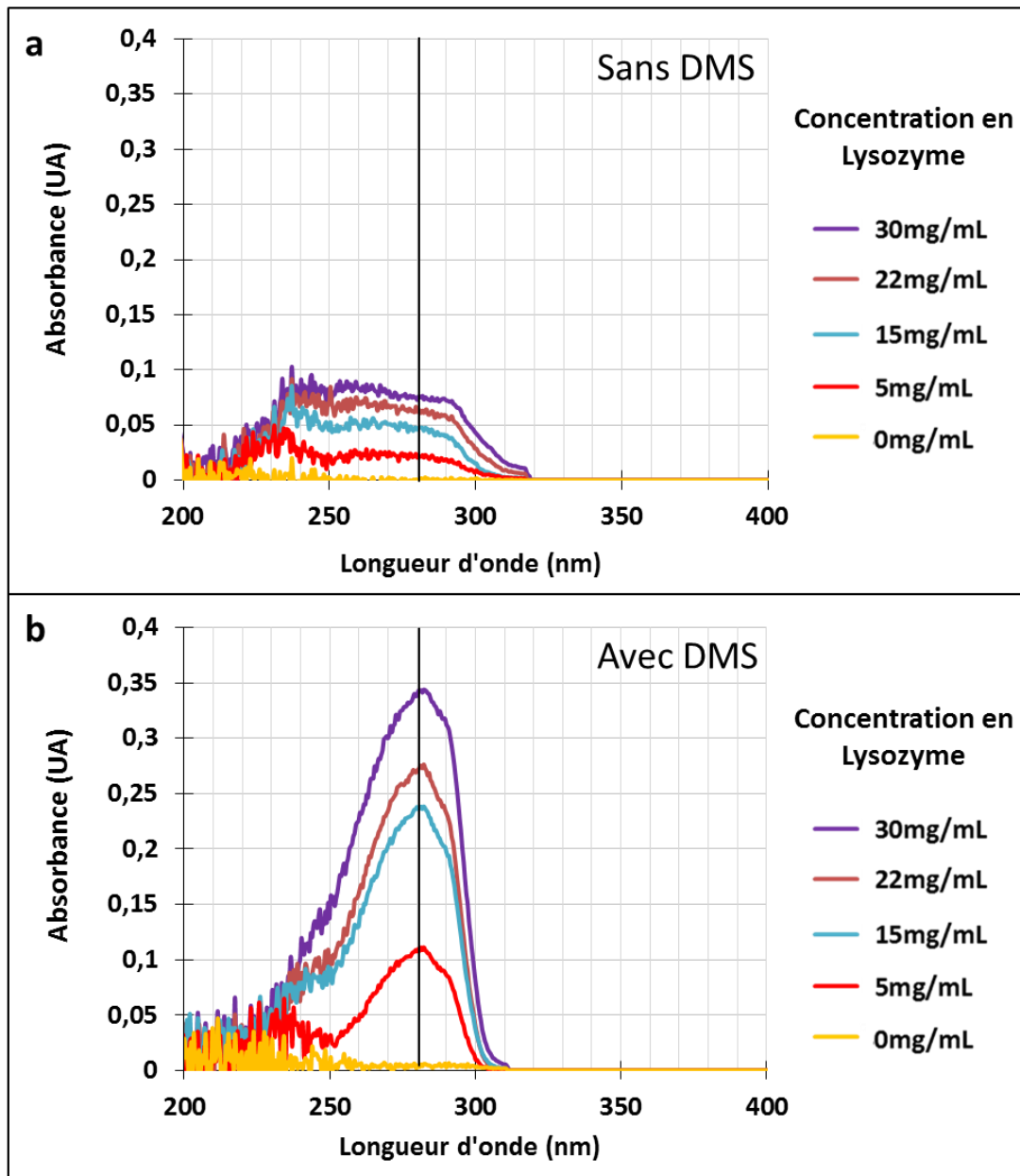


Figure 90 : Spectres d'absorbance obtenus dans un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) pour des concentrations de lysozyme de 0mg/mL à 30mg/mL en flux continu (a) avec de l'air dans le porte-capillaire et (b) lorsque le porte-capillaire est rempli avec de l'huile DMS. Le temps d'intégration est de 500ms pour (a) et de 200ms pour (b). La barre verticale noire marque la longueur d'onde 280nm.

A partir des spectres obtenus en Figure 90, l'absorbance à 280nm est tracée en fonction de la concentration en lysozyme (Figure 91). Le domaine dans lequel l'absorbance est proportionnelle à la concentration de la solution en lysozyme semble légèrement réduit lorsque le porte-capillaire est rempli avec de l'huile, de 20mg/mL à 15mg/mL. Cependant, étant données la forme des pics et la faiblesse des intensités transmises dans l'air, les mesures seront faites avec un porte-capillaire rempli d'huile DMS.



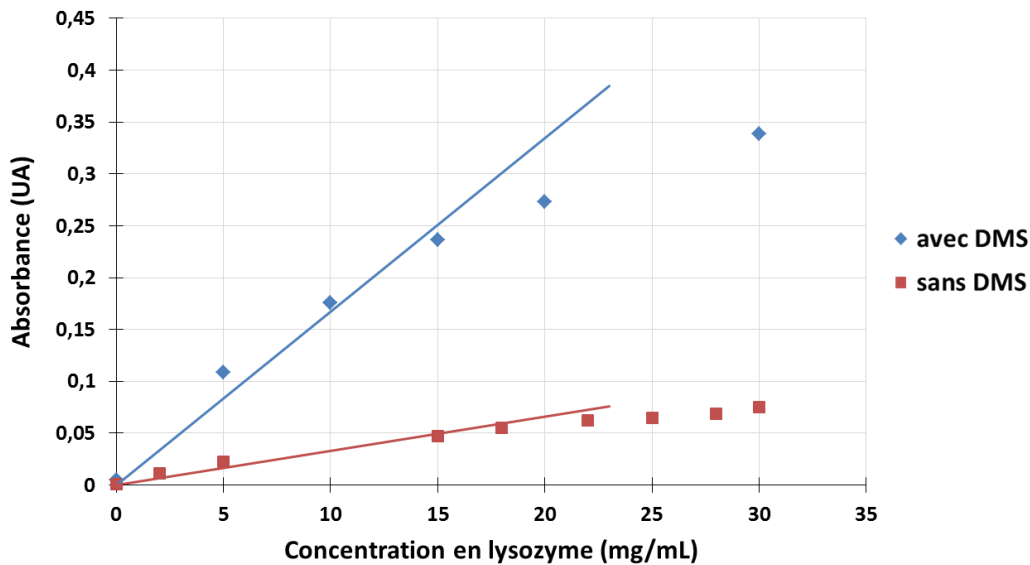


Figure 91 : Absorbance à 280nm en fonction de la concentration en lysozyme, pour des flux continus de solution dans des capillaires en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm). En rouge les points obtenus dans l'air, en bleu les points obtenus dans l'huile DMS. Chaque mesure a été répétée au moins trois fois. Les écarts types des mesures sont masqués par les points.

#### 1.4.4. Absorbance de gouttes dans des capillaires de 150 $\mu$ m ID

Les mesures préliminaires sur des flux continus de solution ont permis de déterminer les conditions de mesures d'absorbance UV. Il s'agit à présent de mesurer la concentration en protéine dans des gouttes générées dans de l'huile FC-70.

##### 1.4.4.1. Caractérisation des gouttes générées

Avant d'analyser la composition chimique des gouttes par spectrométrie UV, les gouttes sont caractérisées en termes de taille et de fréquence. Pour cela, des gouttes de tampon sont générées dans un capillaire à l'aide d'une jonction en té, en utilisant les mêmes débits que ceux qui seront utilisés pour faire l'analyse par spectrométrie UV (Figure 92).

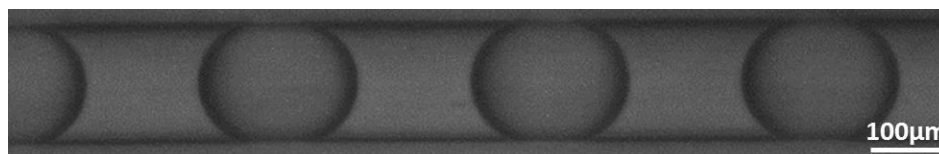


Figure 92 : Photographie des gouttes générées dans une jonction en té pour des débits de 120 $\mu$ L/h pour l'huile et 50 $\mu$ L/h pour la phase aqueuse, dans un capillaire de 150 $\mu$ m ID.

A partir de ces photographies, des débits utilisés et de la taille du capillaire, il est possible de déterminer le temps de passage d'une goutte, celui de l'intervalle entre les gouttes, et donc le nombre de gouttes qui passent devant le faisceau d'UV par seconde. Ces calculs sont faits à partir d'un effectif de 50 gouttes. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 3. En une seconde, environ 7 gouttes traversent le faisceau. D'autre part, la taille d'une goutte associée à la longueur de l'intervalle entre les gouttes est inférieure à la taille du faisceau d'UV (376 $\mu$ m < 400 $\mu$ m). Ainsi, plusieurs gouttes risquent d'être prises en compte dans une seule mesure d'intensité transmise. Le passage d'une goutte à travers le faisceau d'UV est schématisé dans la Figure 93.

Longueur des gouttes	$205 \pm 5 \mu\text{m}$
Longueur de l'intervalle entre les gouttes	$171 \pm 21 \mu\text{m}$
Taille goutte + huile	$376 \pm 26 \mu\text{m}$
Taille du faisceau	$400 \mu\text{m}$
Vitesse du flux	$2,8 \mu\text{m}.\text{ms}^{-1}$
Temps de passage d'une goutte	$74 \pm 2 \text{ ms}$
Temps de passage de l'huile	$61 \pm 8 \text{ ms}$
Temps de passage goutte + huile	$135 \pm 9 \text{ ms}$
Nombre de gouttes devant le faisceau en 1 seconde	7,4 gouttes

Tableau 3 : Caractéristiques des gouttes générées.

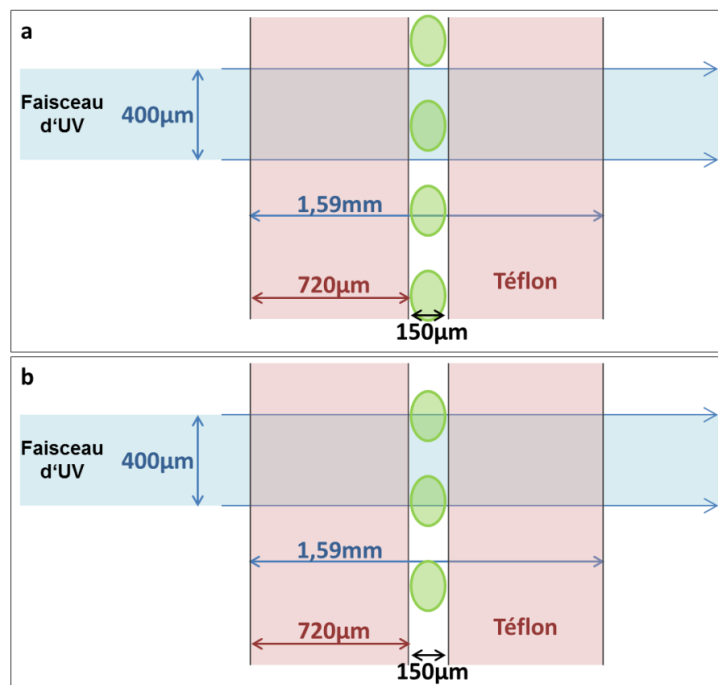


Figure 93 : Passage des gouttes à travers le faisceau d'UV dans un capillaire en FEP (ID  $150 \mu\text{m}$ , OD  $1,59 \text{ mm}$ ). (a) Cas où il n'y a qu'une goutte dans le faisceau d'UV, (b) cas où deux gouttes se trouvent dans le faisceau.

#### 1.4.4.2. Effets du temps d'intégration

Pour une étude sur le lysozyme, des gouttes du tampon dans de l'huile sont générées à l'intérieur d'un capillaire. Le tampon n'absorbe pas à  $280 \text{ nm}$  (Figure 90) et l'huile non plus (§ 1.4). Des gouttes de tampon dans l'huile doivent donc donner une intensité transmise maximale. En variant le temps d'intégration de  $10 \text{ ms}$  à  $200 \text{ ms}$ , l'effet du temps d'intégration sur les mesures d'intensité transmise peut alors être étudié. Les résultats présentés dans la Figure 94 montrent que plus le temps d'intégration augmente, plus l'intensité moyenne transmise à  $280 \text{ nm}$  est élevée (Tableau 4). De plus, cette augmentation devrait être proportionnelle à l'augmentation du temps d'intégration, ce qui permet de calculer le signal moyen attendu à un temps d'intégration donné par rapport à celui mesuré à  $10 \text{ ms}$ .

Cependant, le Tableau 4 montre que lorsque le temps d'intégration augmente, une partie du signal transmis semble perdu. Ce phénomène peut être expliqué par une erreur de l'appareillage qui s'amplifie avec le temps d'intégration. Pour un temps d'intégration donné, cette erreur est fixe. Ainsi, une fois le temps d'intégration choisi pour une expérience, les mesures seront comparables entre elles.

D'autre part, les variations locales d'intensité semblent plus importantes lorsque le temps d'intégration augmente (Figure 94), ce qui augmente l'écart type des mesures (Tableau 4). Cependant, comme l'intensité moyenne augmente également avec le temps d'intégration, cela réduit l'erreur relative donnée par le rapport entre l'écart-type et l'intensité moyenne (Tableau 4). Par conséquent, les mesures d'intensité transmise par les gouttes ont d'abord été effectuées avec un temps d'intégration élevé (200ms).

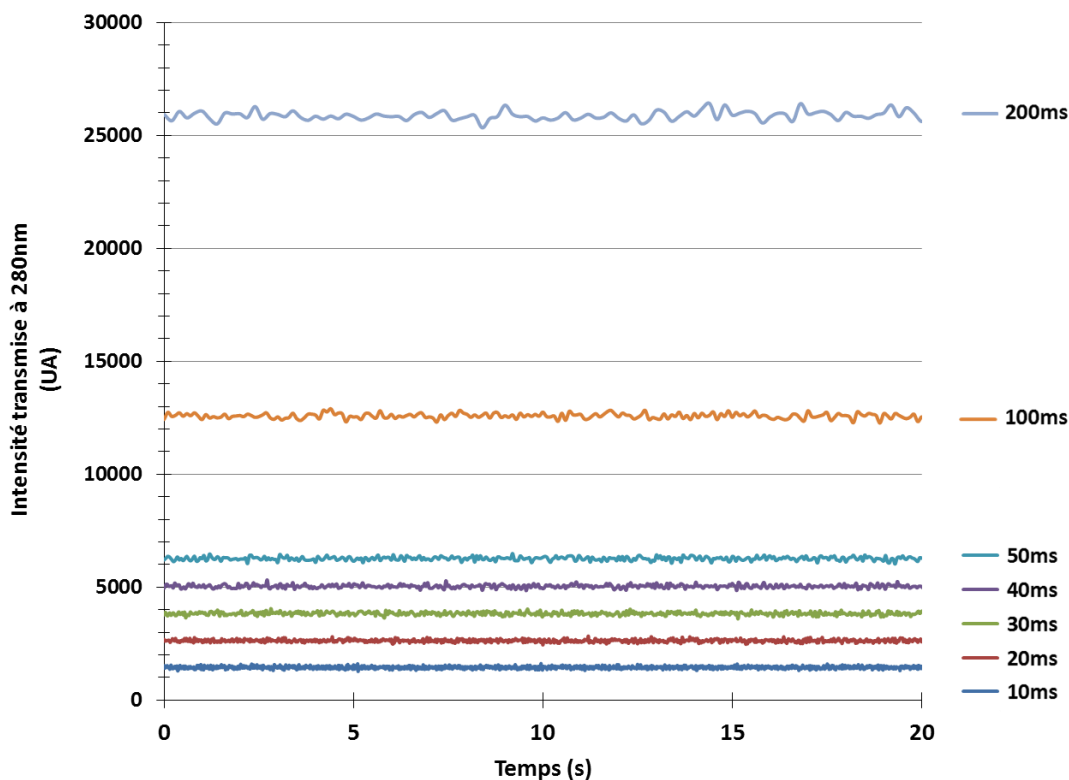


Figure 94 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de tampon dans l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps. Plusieurs temps d'intégration sont testés, de 10 à 200ms.

	Tampon 10ms	Tampon 20ms	Tampon 30ms	Tampon 40ms	Tampon 50ms	Tampon 100ms	Tampon 200ms
Signal moyen mesuré	1447	2632	3834	5042	6270	12589	25874
Signal moyen attendu	1447	2894	4341	5588	7235	14470	28940
Ecart type	48	58	69	78	96	120	181
Erreur relative	3,3%	2,2%	1,8%	1,6%	1,5%	1%	0,7%

Tableau 4: Pourcentage d'erreur relative des données de la Figure 94. Le signal moyen attendu est calculé en multipliant le signal moyen mesuré pour un temps d'intégration de 10ms, par deux pour 20ms, par 3 pour 30ms, par 4 pour 40ms, par 5 pour 50ms, par 10 pour 100ms et par 20 pour 200ms.

### 1.4.4.3. Gouttes de lysozyme de concentration connue

Des gouttes de lysozyme de concentrations connues (de 0 à 30mg/mL) sont générées à l'aide d'une jonction en té, c'est-à-dire sans mélange lors de la formation des gouttes. Elles ont donc toutes strictement la même composition. L'intensité transmise à 280nm par ces gouttes est tout d'abord mesurée pour un  $t_i$  de 200ms, afin de montrer la faisabilité de la détection. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 95.

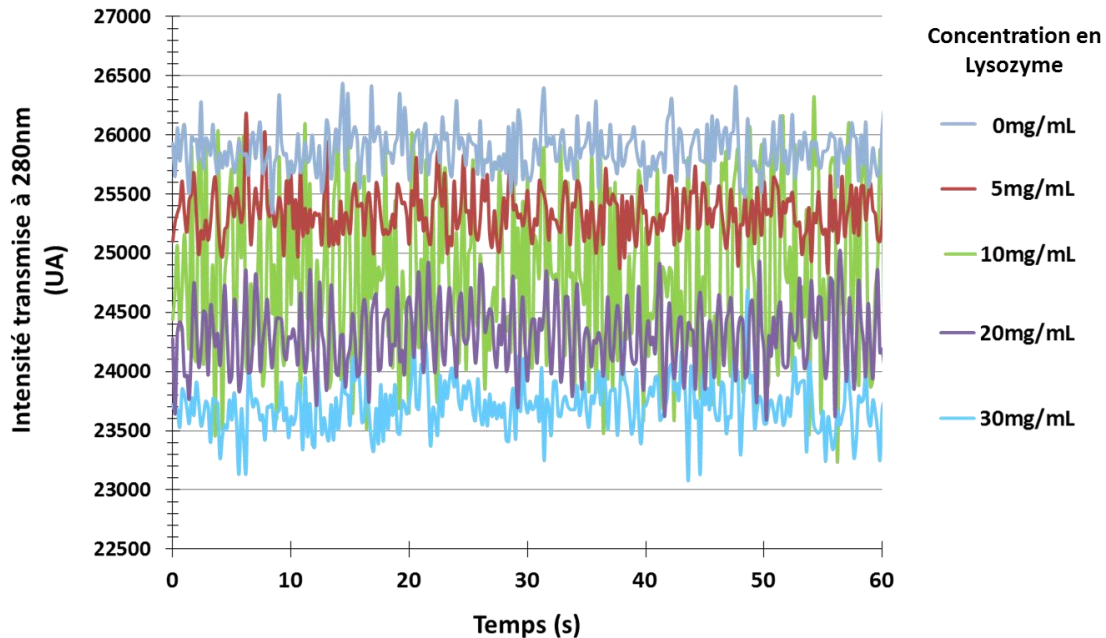


Figure 95 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 200ms.

L'intensité transmise minimale (correspondant à l'absorbance maximale) diminue lorsque la concentration en lysozyme augmente. Le spectromètre détecte donc bien l'augmentation de l'absorbance due à l'augmentation de la concentration en lysozyme dans les gouttes. Ces premiers résultats semblent indiquer que la spectrométrie UV est un bon outil pour détecter la concentration en lysozyme de gouttes de quelques nanolitres dans un capillaire en téflon. Ces mesures avec un  $t_i$  de 200ms montrent donc la faisabilité de la technique.

Cependant, comme montré précédemment dans la Figure 86 pour des gouttes de 70nL dans un capillaire de 500 $\mu$ m ID, le minimum d'intensité transmise doit correspondre au passage d'une goutte dans le faisceau d'UV, tandis que le maximum doit correspondre au passage de l'huile (qui absorbe peu). Par conséquent, ce maximum devrait être le même sur toutes les courbes.

Pour un  $t_i$  de 200ms et des capillaires de 150 $\mu$ m ID, ce maximum n'est jamais atteint. En effet, ce temps d'intégration est bien supérieur au temps de passage dans le faisceau d'une goutte (74ms, Tableau 3) ou de l'huile (61ms, Tableau 3). Une mesure peut donc couvrir deux portions de goutte, ou une goutte plus une ou deux portion(s) de goutte (Figure 93), et ce nombre peut évoluer au cours du temps, ce qui explique les irrégularités du signal.

De la même façon, l'intensité transmise minimale observée sur la Figure 95 ne correspond pas au passage d'une goutte dans le faisceau. Le même type de résultats est obtenu pour un temps d'intégration de 100ms qui peut couvrir une goutte, ou une ou deux portion(s) de goutte.

Il est donc nécessaire de réduire le temps d'intégration. De plus, conformément au § 1.4.1, nous avons choisi le  $t_i$  le plus faible possible afin de maximiser le nombre de mesures par goutte, soit 10ms (Figure 96).

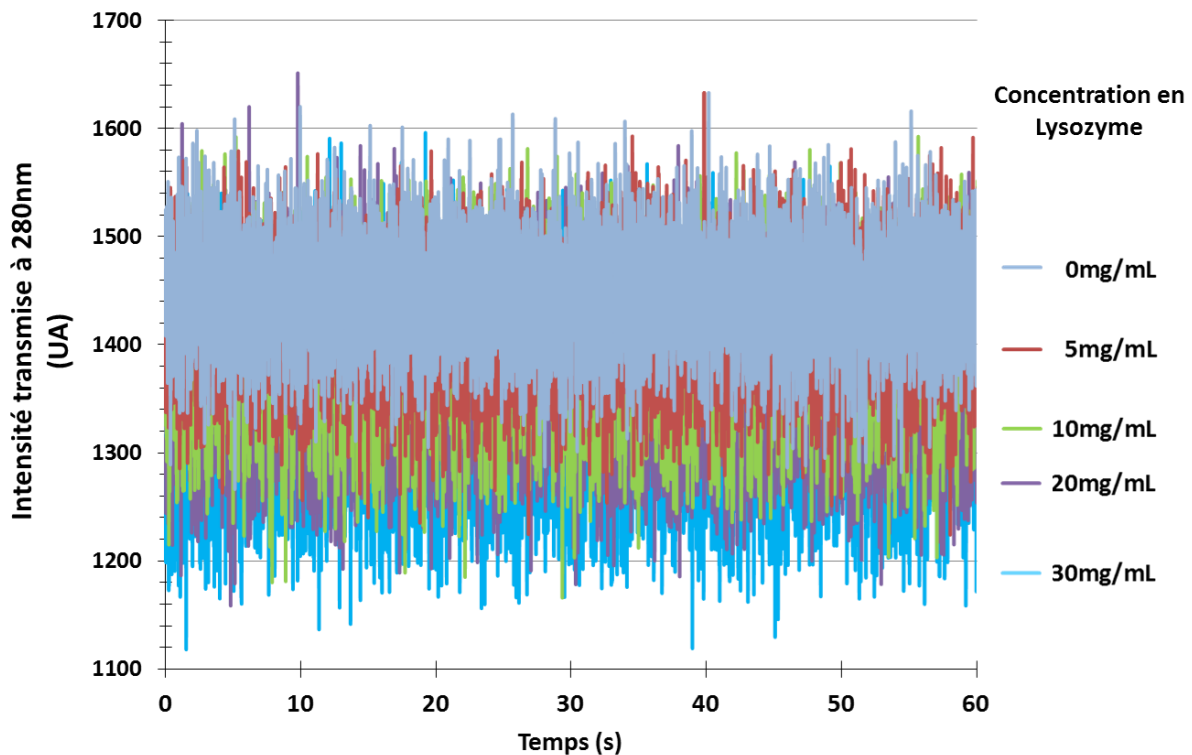


Figure 96 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 10ms.

L'intensité transmise par des gouttes de lysozyme de 5mg/mL se détache difficilement de l'intensité transmise par des gouttes de tampon (respectivement courbes rouge et grise sur la Figure 96). De plus, bien que les gouttes soient identiques en composition, les maxima et minima des pics ne sont pas réguliers. Or  $t_i$  est, dans ce cas, bien inférieur au temps de passage d'une goutte à travers le faisceau (10ms < 74ms). Plusieurs mesures sont donc effectuées pour chaque passage de goutte (environ 7 mesures par goutte), ainsi que pour chaque passage d'huile (environ 6 mesures). Ce  $t_i$  devrait alors théoriquement permettre d'obtenir un pic par goutte, ainsi qu'un retour à la ligne de base entre chaque pic, comme pour un capillaire de 500 $\mu$ m ID (Figure 86). Ces résultats confirment donc qu'un  $t_i$  très court entraîne une augmentation du bruit de la mesure ainsi qu'une réduction du signal, augmentant ainsi l'erreur relative de la mesure (Tableau 4). Le même type de résultats est obtenu pour un  $t_i$  de 20ms. Compte tenu du rapport signal sur bruit, un  $t_i$  de 10ms ou 20ms est donc trop court pour obtenir des mesures d'absorbance de gouttes en ligne exploitables.

Le  $t_i$  est donc augmenté à 50ms. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 97. Dans ce cas, les différentes concentrations en lysozyme sont bien discriminées lors des mesures d'intensité transmise, dès 5mg/mL. Ce  $t_i$  étant inférieur au temps de passage d'une goutte ou de l'huile, l'intensité transmise maximale correspond à l'huile et elle est observée sur toutes les courbes, même si ce maximum n'est pas atteint pour chaque pic. De la même façon, l'intensité transmise minimale observée sur chaque courbe de la Figure 97 correspond au passage d'une goutte unique à travers le faisceau.

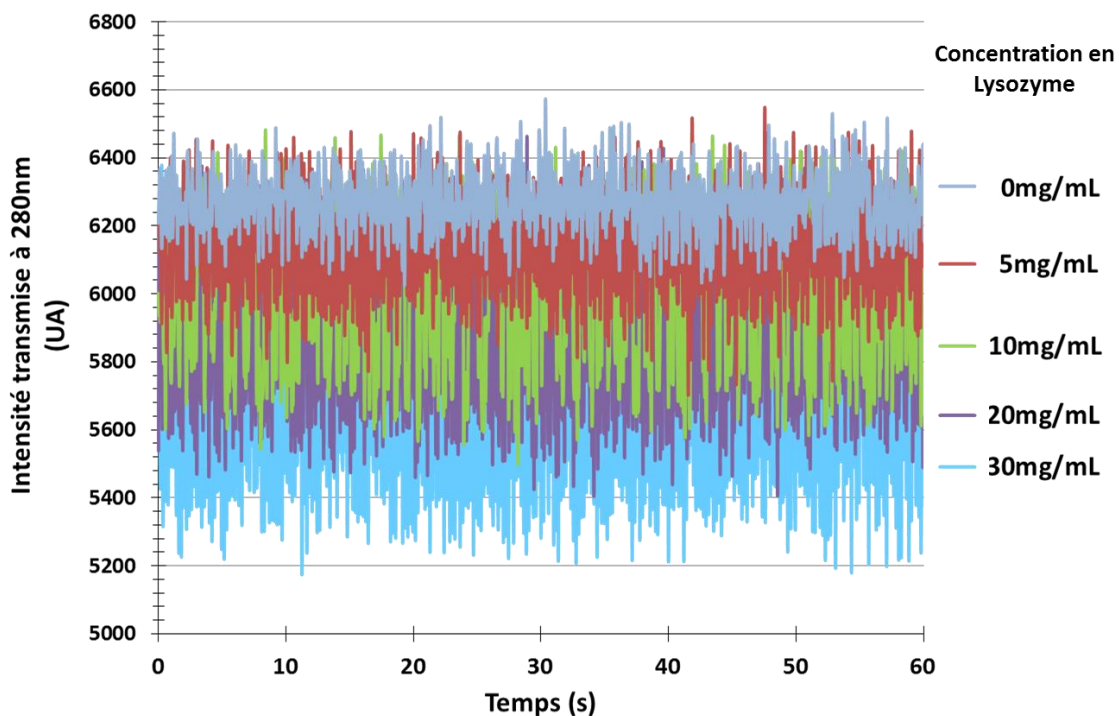


Figure 97 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms.

Les courbes étant superposées sur la Figure 97, les pics ne sont pas toujours visibles. Les courbes correspondant à l'intensité transmise par des gouttes de tampon et des gouttes de lysozyme à 20mg/mL sont donc isolées et zoomées sur la Figure 98. Lorsque les échelles de temps et d'intensité transmise sont réduites, il est plus facile d'observer les pics correspondants au passage des gouttes devant le faisceau. Cependant, bien que la composition de toutes les gouttes soit identique, les minima des pics n'atteignent pas tous la même intensité transmise. Cela signifie que  $t_i$  est trop élevé. Autrement dit, trop peu de mesures sont faites pour chaque passage de goutte à travers le faisceau. La mesure n'est pas toujours faite lorsque la goutte est exactement au milieu du faisceau, ni même lorsque la goutte est entièrement dans le faisceau. Le minimum de l'intensité transmise de la goutte (soit le maximum d'absorbance) n'est pas toujours accessible. De même, le maximum d'intensité transmise (c'est-à-dire le minimum d'absorbance, ou « zéro »), correspondant au seul passage de l'huile dans le faisceau, n'est pas mesuré pour chaque pic.

Cependant, malgré ce problème d'échantillonnage, un  $t_i$  de 50ms permet tout de même de vérifier la fréquence des gouttes. En effet, nous avons vu dans le Tableau 3

qu'environ 7 gouttes passent à travers le faisceau optique en une seconde, et ces résultats sont confirmés par la fréquence des pics de la Figure 98, sur laquelle 7 pics par seconde sont observés. Le même type de résultats est obtenu pour des  $t_i$  de 40ms et 30ms, avec cependant une diminution du signal (et donc une réduction du rapport signal sur bruit), due à la diminution du  $t_i$ .

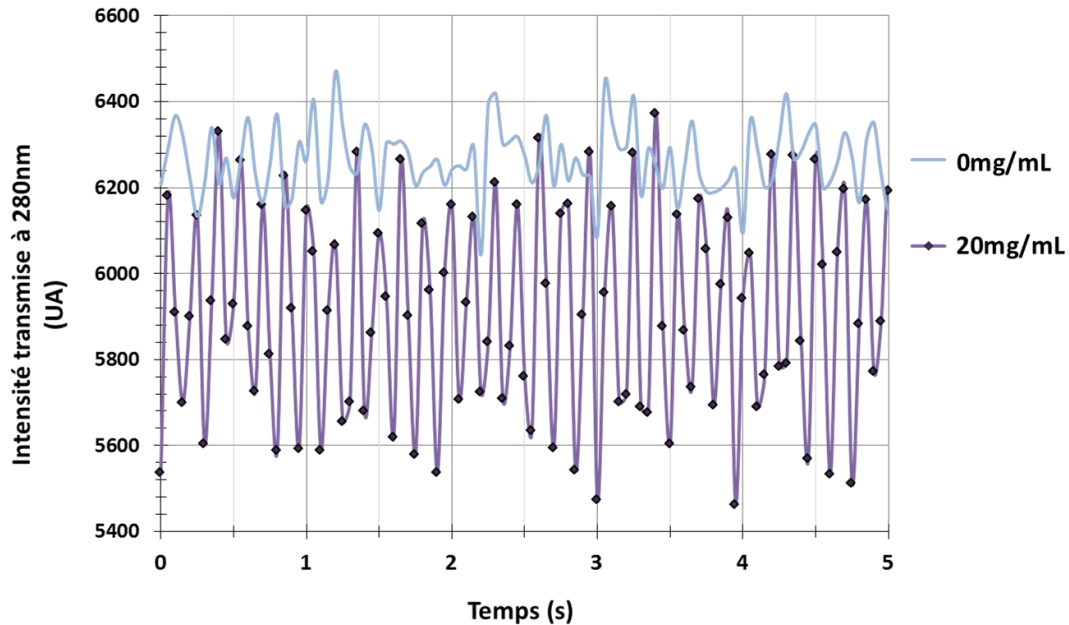


Figure 98 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme à 20mg/mL (violet) et des gouttes de tampon (gris) à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms.

En conclusion, quel que soit le temps d'intégration de la mesure, le spectromètre est capable de détecter un changement d'intensité transmise lorsque la concentration en lysozyme dans les gouttes change. En revanche, il est difficile d'obtenir une information précise sur chaque goutte, car celles-ci sont beaucoup plus petites que le faisceau (les gouttes mesurent environ 220 $\mu$ m en longueur et le faisceau mesure 400 $\mu$ m), et parce qu'elles passent très vite devant le faisceau (Tableau 3). Malgré tout, un  $t_i$  de 50ms permet d'avoir une information sur la fréquence des gouttes, et la différence de signal transmis pour les différentes concentrations de gouttes testées est suffisamment significative pour détecter en ligne un changement de composition des gouttes. Ainsi, comme dans un capillaire de 500 $\mu$ m ID, les gouttes peuvent être comptées et localisées dans le porte-capillaire.

Il est important de souligner que la taille, la fréquence et la vitesse des gouttes dépendent des débits utilisés. Pour un même temps d'intégration, plus les gouttes sont lentes, espacées et longues (plugs), plus la mesure d'intensité transmise sera précise. Cette méthode d'acquisition des données d'intensité transmise est donc adaptée à la détection de gouttes plus longues, lentes et espacées les unes des autres.

#### 1.4.4.4. Accumulation de plusieurs mesures

L'absorbance étant difficile à mesurer pour chaque goutte individuellement, le signal est moyenné sur plusieurs valeurs mesurées. Ainsi, chaque mesure correspond en réalité à une moyenne de 20 valeurs mesurées. Cette démarche permet d'augmenter le temps d'acquisition sans augmenter le temps d'intégration et donc sans risquer de saturer le détecteur. D'autre part, même si l'information par goutte est perdue, la mesure est moins sensible aux variations ponctuelles de la position des gouttes dans le faisceau, et donc moins bruitée. Pour montrer la faisabilité de cette méthode, le temps d'intégration est fixé à 200ms. La mesure de l'intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de différentes concentrations correspond alors à la moyenne de 20 valeurs mesurées, ce qui nécessite un temps d'acquisition total de 4 secondes, c'est-à-dire une fréquence d'acquisition d'une mesure toutes les 4 secondes (Figure 99).

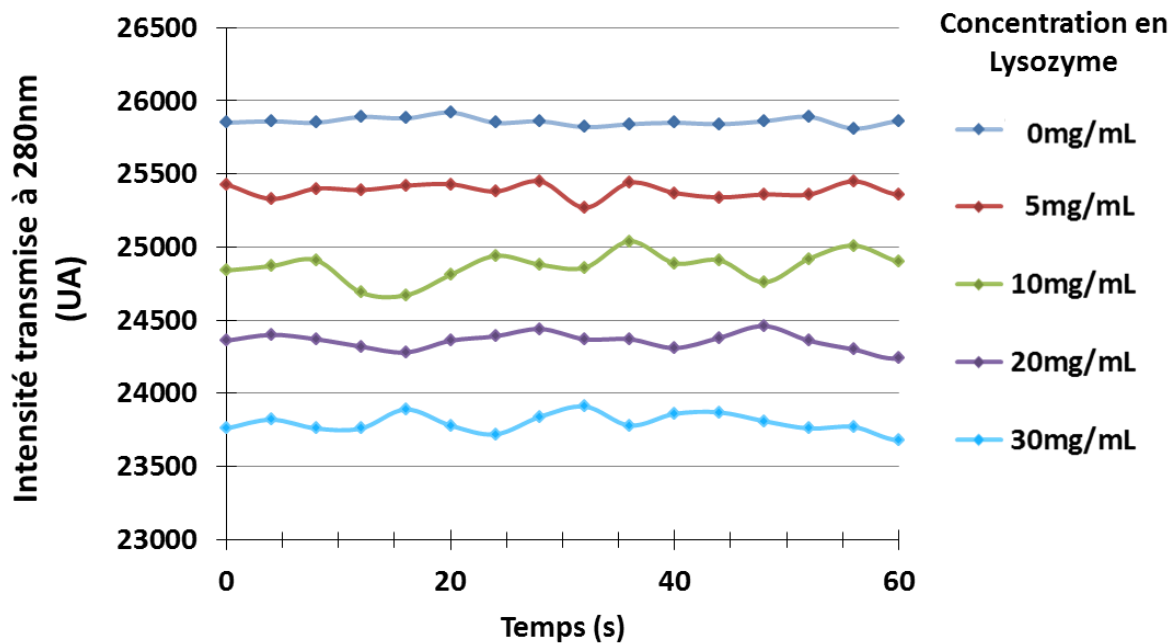


Figure 99 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 200ms. Chaque mesure correspond à la moyenne de 20 valeurs mesurées chacune pendant 200ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure toute les 4 secondes.

L'effet attendu de la moyenne est observé, soit un lissage du signal puisque la moyenne permet de réduire le bruit. En revanche, ce signal prend également en compte le passage de l'huile dans le faisceau au cours des 4 secondes de mesure. Celle-ci n'absorbant pas à 280nm, l'intensité transmise est donc surestimée par rapport à l'intensité qui serait transmise si seules les gouttes de lysozyme passaient devant le faisceau. L'absorbance est, elle, sous-estimée. Cette première expérience permet de valider la méthode de la moyenne. En effet, l'augmentation de la concentration en lysozyme dans les gouttes induit bien une diminution de l'intensité transmise sur la Figure 99. Il faut cependant noter que le fait de n'obtenir qu'une mesure toutes les 4 secondes ne permet pas d'avoir une information en



temps réel sur un éventuel changement de concentration, lors de la génération d'un gradient de concentration par exemple.

Pour permettre le suivi en temps réel de l'absorbance des gouttes générées, le temps d'intégration est réduit à 10ms, ce qui correspond à une fréquence d'acquisition d'une mesure toutes les 200ms. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 100.

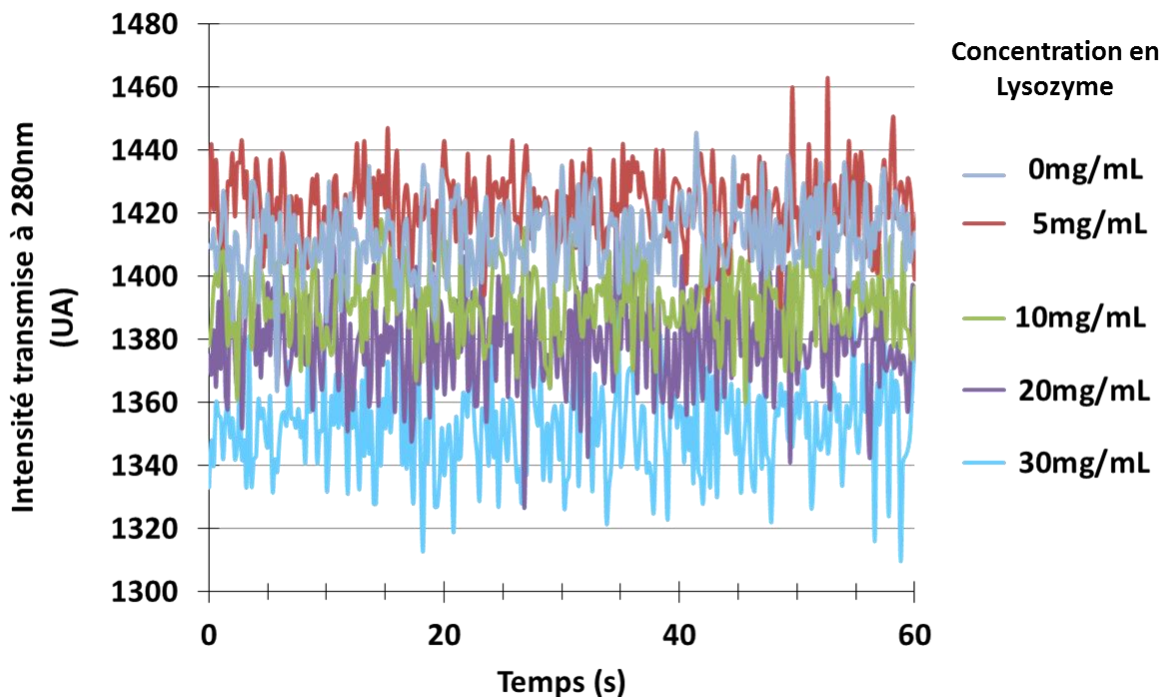


Figure 100 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 10ms. Chaque mesure correspond à la moyenne de 20 valeurs mesurées chacune pendant 10ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure toutes les 200ms.

Pour des temps d'intégration très courts, comme 10ms (Figure 100), la moyenne sur 20 valeurs mesurées ne suffit pas à lisser le signal. D'autre part, l'intensité transmise par des gouttes de lysozyme à 5mg/mL (courbe rouge sur la Figure 100) semble être supérieure à celle transmise par des gouttes de tampon (courbe grise sur la Figure 100). Or les gouttes de tampon dans l'huile correspondent théoriquement au « zéro », c'est-à-dire au minimum d'absorbance (ou au maximum d'intensité transmise). L'intensité transmise par des gouttes de lysozyme à 5mg/mL correspondrait donc à une absorbance négative, ce qui est un résultat incohérent. La différence d'intensité transmise (et donc d'absorbance) entre les gouttes de tampon et les gouttes de lysozyme à 5mg/mL se situe donc dans le bruit de la mesure.

Ainsi, moyenniser des valeurs mesurées sur un temps d'intégration très court ne présente que peu d'intérêt, car cela cumule les désavantages d'un temps d'intégration court, soit un bruit très important et donc un rapport signal sur bruit assez faible, et les désavantages d'un temps d'intégration plus long, soit aucune information goutte à goutte. Des résultats similaires sont obtenus avec un temps d'intégration de 20ms. Le temps

d'intégration est donc augmenté à 50ms. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 101.

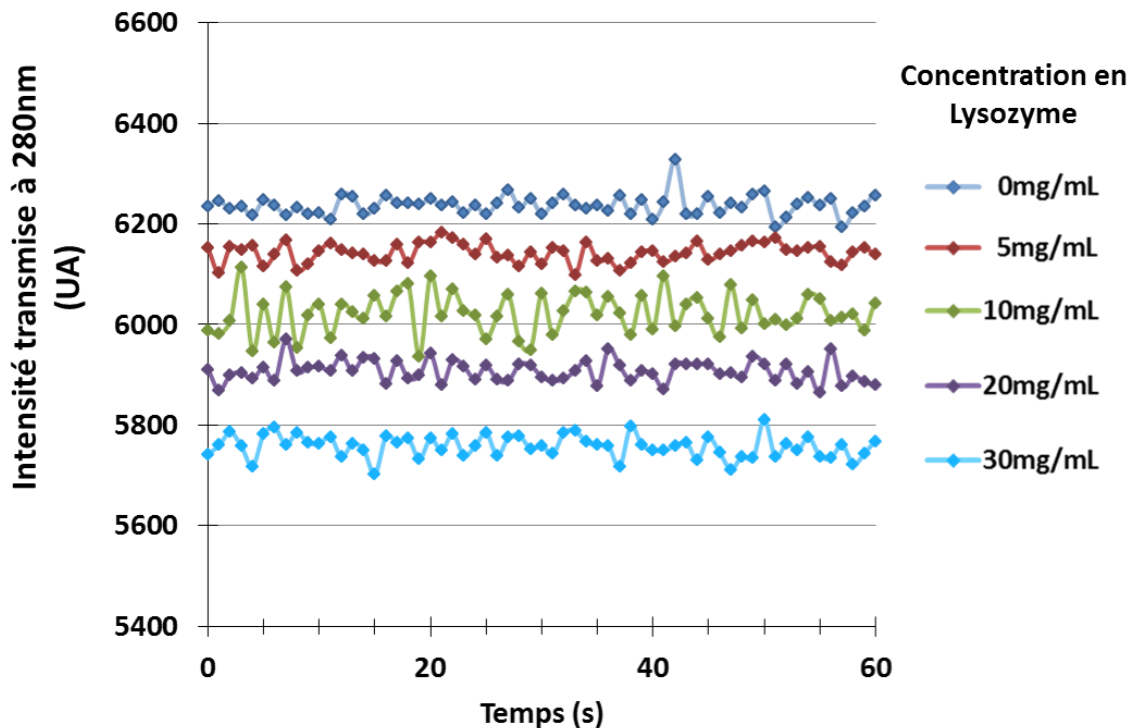


Figure 101 : Intensité transmise à 280nm par des gouttes de lysozyme de 0 à 30 mg/mL à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Chaque mesure correspond à la moyenne de 20 valeurs mesurées chacune pendant 50ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure par seconde.

Une nouvelle fois, l'information goutte à goutte est totalement perdue. En revanche, le signal est plus régulier, et beaucoup moins bruité que lorsque qu'aucune moyenne n'est effectuée (Figure 97). La mesure, quant à elle, est suffisamment précise pour discriminer les différentes concentrations en lysozyme, et assez rapide pour permettre l'observation d'une évolution de la concentration au court du temps. Des résultats similaires sont obtenus pour des temps d'intégration de 40 et 30ms, avec cependant un signal de moins en moins lissé (et donc une augmentation du bruit) à mesure que le temps d'intégration diminue.

Un point important est la linéarité de l'absorbance avec la concentration en lysozyme. Celle-ci est donc vérifiée pour tous les temps d'intégration testés (10ms, 20ms, 30ms, 40ms, 50ms, 100ms et 200ms). Pour cela, la moyenne de toutes les valeurs d'intensité transmise mesurées précédemment, pour un temps d'intégration donné, est utilisée. En effet, chaque mesure étant déjà une moyenne de 20 valeurs mesurées, il est impossible de discriminer le signal dû aux gouttes du signal lié au passage de l'huile dans le faisceau. De même que précédemment, seuls les résultats obtenus pour des temps d'intégration de 200ms, 50ms et 10ms sont présentés ici (Figure 102).

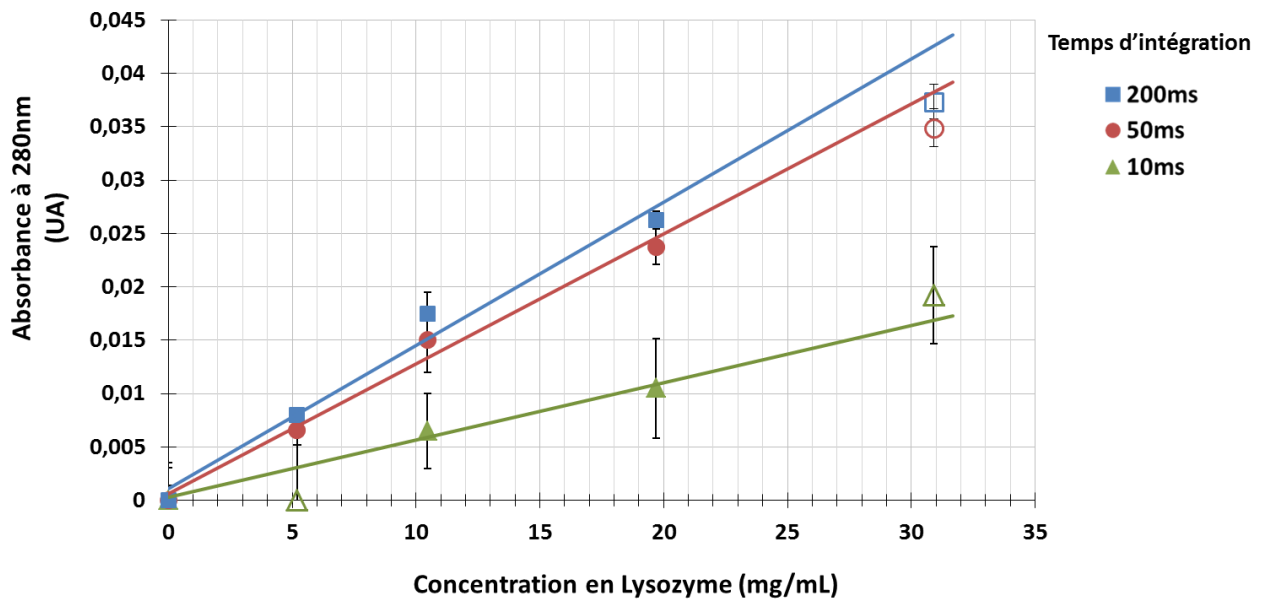


Figure 102 : Absorbance calculée à partir des intensités transmises en fonction de la concentration en lysozyme. En bleu pour un temps d'intégration de 200ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure toutes les 4 secondes (Figure 99). En rouge pour un temps d'intégration de 50ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure par seconde (Figure 101). En vert pour un temps d'intégration de 10ms, soit une fréquence d'acquisition d'une mesure toutes les 200ms (Figure 100). Les symboles remplis correspondent aux mesures pour lesquelles l'absorbance est proportionnelle à la concentration, les symboles vides à celles pour lesquelles elle ne l'est pas.

Quel que soit le temps d'intégration, l'absorbance est proportionnelle à la concentration en lysozyme, bien que la mesure soit une moyenne du passage des gouttes et de l'huile dans le faisceau. D'autre part, le même domaine de linéarité que pour des flux continus est retrouvé, soit jusqu'à 20mg/mL de lysozyme dans les gouttes, et ce quel que soit le temps d'intégration utilisé. Cependant, plus le temps d'intégration diminue, plus les écarts types des mesures augmentent. D'autre part, pour un temps d'intégration très faible (inférieur ou égal à 20ms), la limite de détection est atteinte pour une concentration de 5mg/mL de lysozyme dans les gouttes. C'est-à-dire que l'absorbance est tellement faible par rapport au bruit que le signal ne se détache pas du bruit de fond. Il est donc impossible dans ces conditions de doser une goutte à moins de 10mg/mL. Ainsi, un temps d'intégration de 50ms moyenné sur 20 mesures semble être un bon compromis pour réduire le bruit de la mesure et obtenir une information rapide sur un éventuel changement de la composition des gouttes.

En conclusion, deux méthodes d'acquisition des données d'intensité transmise ont été mises au point. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes dépend de la taille, de la fréquence et de la vitesse des gouttes générées. Dans le cas où les gouttes sont lentes, longues et assez espacées les unes des autres, il est possible d'obtenir un signal d'intensité transmise goutte à goutte suffisamment précis pour connaître la concentration des gouttes en réalisant une mesure pendant un temps d'intégration de 50ms (sans moyenne). En revanche, lorsque les gouttes sont petites et que leur fréquence est élevée (c'est-à-dire que les gouttes sont proches les unes des autres), les gouttes passent vite devant le détecteur et

il est préférable de lisser le signal en utilisant le signal moyen de plusieurs valeurs mesurées successivement. De cette manière, pour le même temps d'intégration (50ms), le bruit du signal est réduit, et donc le rapport signal sur bruit augmenté. Cette méthode ne donne cependant aucune information quant à la taille et à la fréquence des gouttes formées. Dans les deux cas, l'intensité transmise est proportionnelle à la concentration des gouttes en lysozyme jusqu'à environ 20mg/mL. La gamme de concentration pour laquelle le signal d'absorbance est proportionnel à la concentration des gouttes en protéine dépend du coefficient d'absorption molaire  $\epsilon$  de la protéine étudiée. Ainsi, pour des protéines ayant un  $\epsilon$  plus faible, la gamme de concentration linéaire avec l'absorbance est plus grande.

Pour les applications visées, c'est-à-dire pour contrôler la génération d'un gradient de concentration et détecter un changement de composition des gouttes en temps réel, seul un signal d'absorbance relatif est nécessaire. En effet, l'objectif est de connaître le temps de changement effectif de composition des gouttes après le changement des débits appliqués, et de vérifier que la concentration des gouttes est stable pour chaque palier de concentration. Ainsi, la perte de linéarité du signal aux fortes concentrations en protéine n'est pas forcément limitante, tant que la différence d'absorbance de gouttes de concentrations différentes est significative, comme c'est le cas pour des gouttes de lysozyme à 30mg/mL sur la Figure 97 et la Figure 102 par rapport aux gouttes de 20mg/mL.

## 1.5. Gradient de concentration

Une fois la méthode d'acquisition des mesures d'absorbance mise au point, celle-ci est utilisée pour mesurer l'absorbance en ligne de gouttes de protéine (lysozyme puis QR2) lors de la génération d'un gradient de concentrations (§ B.1.1.3). En variant simultanément les débits des solutions d'agent de cristallisation et de protéine, cette méthode permet de balayer dans une même expérience une large gamme de sursaturations en se déplaçant en diagonale dans le digramme de phase, sans modifier le montage utilisé ni la taille des gouttes.

### 1.5.1. Lysozyme

Dans un premier temps, un gradient de concentration en lysozyme et en NaCl est réalisé. Le montage utilisé est présenté dans la Figure 103.

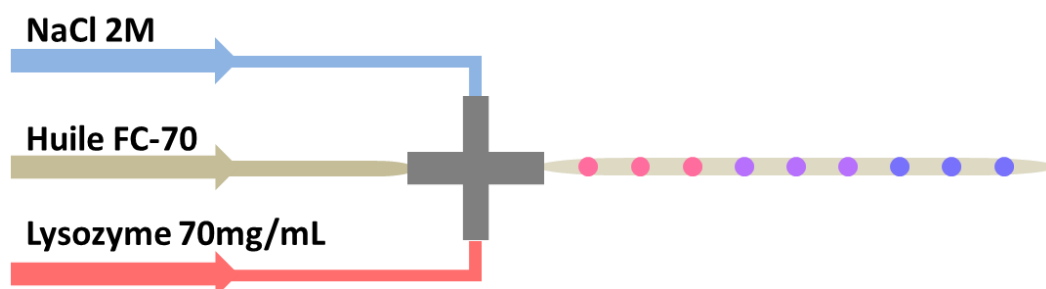


Figure 103 : Montage utilisé pour générer un gradient de concentration en lysozyme et en NaCl dans des gouttes.

Avec les débits utilisés précédemment, les gouttes ne sont pas tout à fait stables lors des changements de débit des phases aqueuses. La taille des gouttes (et donc leur volume) varie légèrement d'une goutte à l'autre. Afin d'obtenir des gouttes régulières en taille et en fréquence, le débit de l'huile est réduit, de façon à générer des gouttes légèrement plus grosses (environ 3,5nL) et plus espacées les unes des autres. Comme les gouttes sont lentes, longues et assez espacées les unes des autres, il est possible d'obtenir un signal d'intensité transmise goutte à goutte suffisamment précis pour connaître la concentration des gouttes en réalisant une mesure pendant un temps d'intégration de 50ms (sans moyenne) comme vu dans le § 1.4.4.3. Ici, trois paliers de concentration sont générés (Figure 104a). Compte tenu de la configuration du système microfluidique (Figure 103), lorsque le débit de la solution de lysozyme augmente dans la goutte, le débit de NaCl diminue. L'évolution de la concentration des gouttes en lysozyme au cours du temps est suivie par spectrométrie UV (Figure 104b).

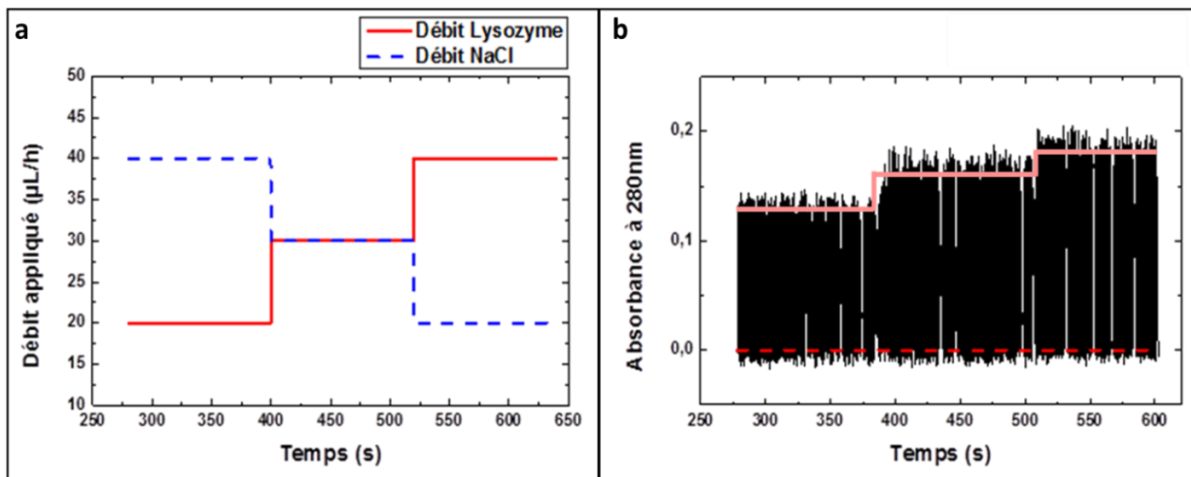


Figure 104 : (a) Débits programmés pour générer un gradient de concentration en lysozyme et en NaCl (tampon de cristallisation). La somme des deux débits est maintenue constante à 60 $\mu\text{L/h}$ . Palier 1 : Lysozyme 23 mg/mL, NaCl 1,33M. Palier 2 : Lysozyme 35 mg/mL, NaCl 1M. Palier 3 : Lysozyme 47 mg/mL, NaCl 0,66M. (b) Absorbance à 280nm des gouttes de Lysozyme dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu\text{m}$ , OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Chaque palier a une durée de 2min.

Ces gouttes, plus grosses, sont plus espacées les unes des autres, le temps de passage de chaque goutte devant le spectromètre est donc plus long. Comme le montre le zoom présenté dans la Figure 105, cela permet d'obtenir un pic par goutte. Ces pics ne sont pas tout à fait de la même taille, ce qui est un signe de bruit de mesure important. De plus, le minimum des pics correspond à une absorbance négative, ce qui est clairement dû à l'imprécision de l'appareil. Cependant, les trois paliers d'absorbance des gouttes sont visibles (trait plein rouge sur la Figure 104), et peuvent être reliés à la concentration en lysozyme attendue dans les gouttes.

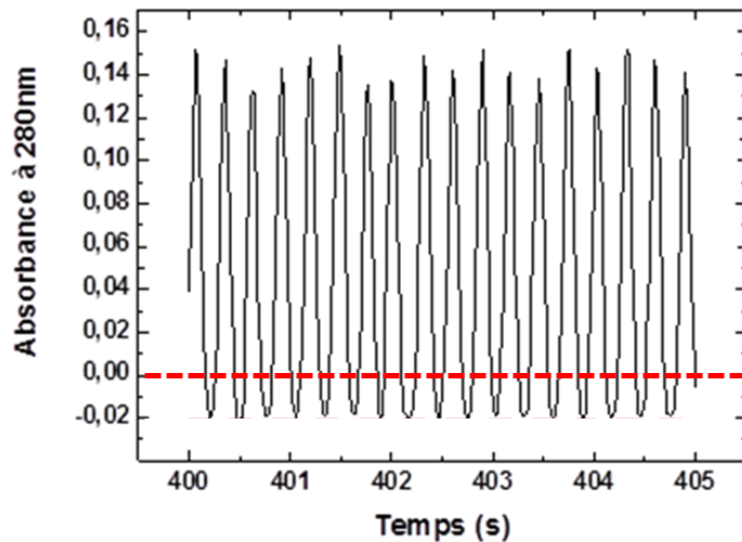


Figure 105 : Absorbance à 280nm des gouttes de lysozyme dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Zoom d'une partie de la Figure 104b.

Les cristaux de lysozyme obtenus sont présentés dans la Figure 106. Les trois paliers de concentration générés sont retrouvés, avec des fréquences de nucléation, des faciès et probablement des phases cristallines différentes (Ildefonso et al., 2012b) en fonction des conditions de cristallisation. De plus, ce genre de représentation (photographies des gouttes en fonction des conditions de cristallisation) est riche en informations pour l'optimisation et la sélection des conditions de cristallisation car elle permet d'identifier rapidement les meilleures conditions de cristallisation. Pour cette expérience, seuls 3 $\mu$ L de protéine ont été nécessaires pour former plus de 700 gouttes (soit plus de 200 gouttes par palier).

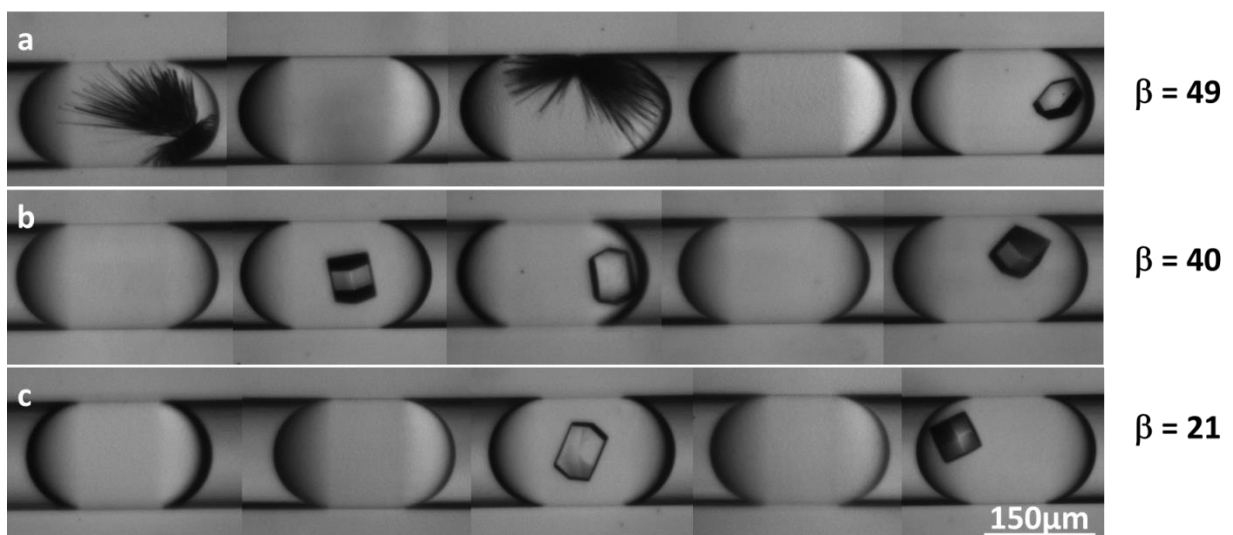


Figure 106 : Cristaux de lysozyme obtenus dans des gouttes de 3,5nL pour les trois débits testés (Figure 104) après 10h à 15°C, 80mM d'acétate de sodium, pH 4,5. (a) Lysozyme 23 mg/mL, NaCl 1,33M, (b) Lysozyme 35 mg/mL, NaCl 1M, (c) Lysozyme 47 mg/mL, NaCl 0,66M. Ces trois séries de gouttes ont été obtenues lors d'une unique expérience.

### 1.5.2. QR2

La méthode du gradient de concentration est ensuite appliquée à l'optimisation des conditions de cristallisation de la protéine QR2. Lors de la génération d'un gradient de concentration, les concentrations en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et QR2 sont variées simultanément dans les gouttes (Figure 107).

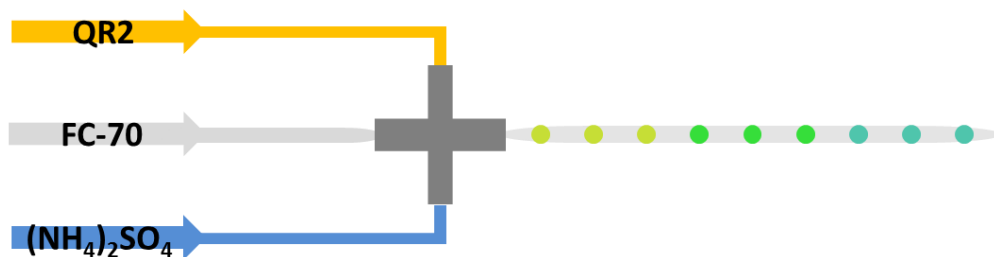


Figure 107 : Montage utilisé pour générer un gradient de concentration en QR2 et en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans des gouttes.

Ainsi, lorsque la concentration des gouttes en QR2 augmente (c'est-à-dire quand le débit de QR2 augmente), leur concentration en sel diminue (le débit de sel diminue). Ceci est dû à la configuration du système microfluidique, comme pour les expériences avec le lysozyme (Figure 104). L'objectif est de trouver une condition dans laquelle la nucléation de peu de cristaux de « grande taille » est favorisée par rapport à la nucléation de nombreux petits cristaux.

Les gouttes générées ici sont petites et proches les unes des autres, elles passent vite devant le détecteur. Il est alors préférable d'utiliser la méthode de la moyenne sur 20 valeurs mesurées pendant un temps d'intégration de 50ms chacune (§ 1.4.4.4). La fréquence d'acquisition est d'une mesure par seconde.

#### 1.5.2.1. Large gamme de sursaturations

Dans un premier temps, une large gamme de sursaturations est balayée (Figure 108), afin de maximiser les chances d'identifier une condition pour laquelle des cristaux nucléent dans les gouttes. La Figure 108b montre le signal d'absorbance lissé avec les trois paliers en relation avec les concentrations générées (Figure 108a).

Ce premier criblage permet d'identifier des conditions dans lesquelles des cristaux de QR2 sont obtenus (Figure 109), sous la forme d'un précipité (Figure 109a) ou d'un grand nombre de cristaux (Figure 109b). Il y a également une condition pour laquelle il n'y a pas de nucléation (Figure 109c). Dans la Figure 109a et b, la fréquence de nucléation élevée semble due à la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  du tampon de cristallisation, par rapport aux concentrations en QR2. Par conséquent, cette fréquence de nucléation peut être réduite en diminuant la concentration des gouttes en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

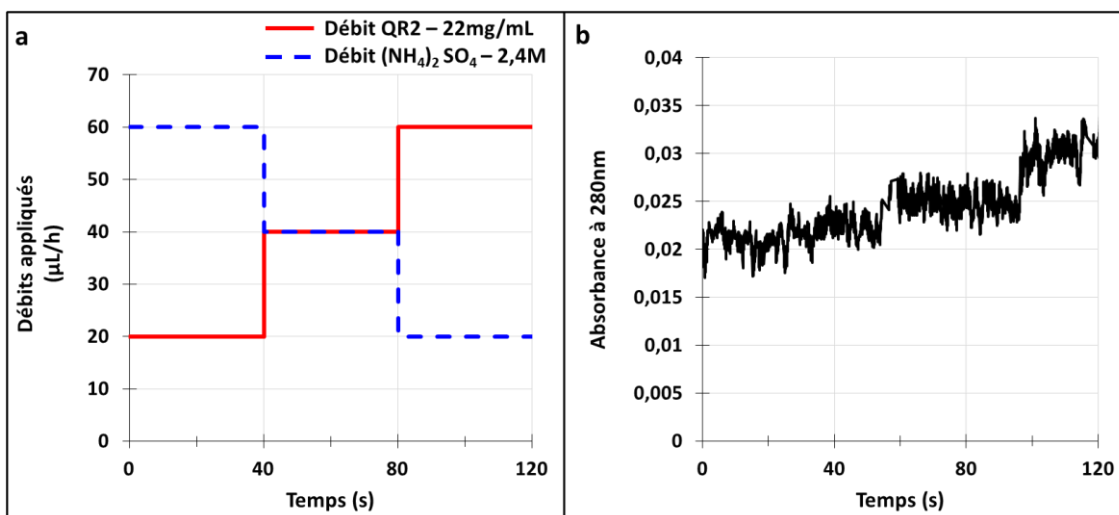


Figure 108 : (a) Débits programmés pour générer un gradient de concentration en QR2 et en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (tampon de cristallisation). La somme des deux débits est maintenue constante à  $80\mu\text{L/h}$ . Palier 1 : QR2  $5,5\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,8\text{M}$ , palier 2 : QR2  $11\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,2\text{M}$ , palier 3 : QR2  $16,5\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0,6\text{M}$ . (b) Absorbance à  $280\text{nm}$  des gouttes de QR2 dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID  $150\mu\text{m}$ , OD  $1,59\text{mm}$ ) au cours du temps, pour un temps d'intégration de  $50\text{ms}$ . Chaque point correspond à la moyenne de 20 mesures de  $50\text{ms}$  chacune, ce qui correspond à une fréquence d'acquisition d'une mesure par seconde.

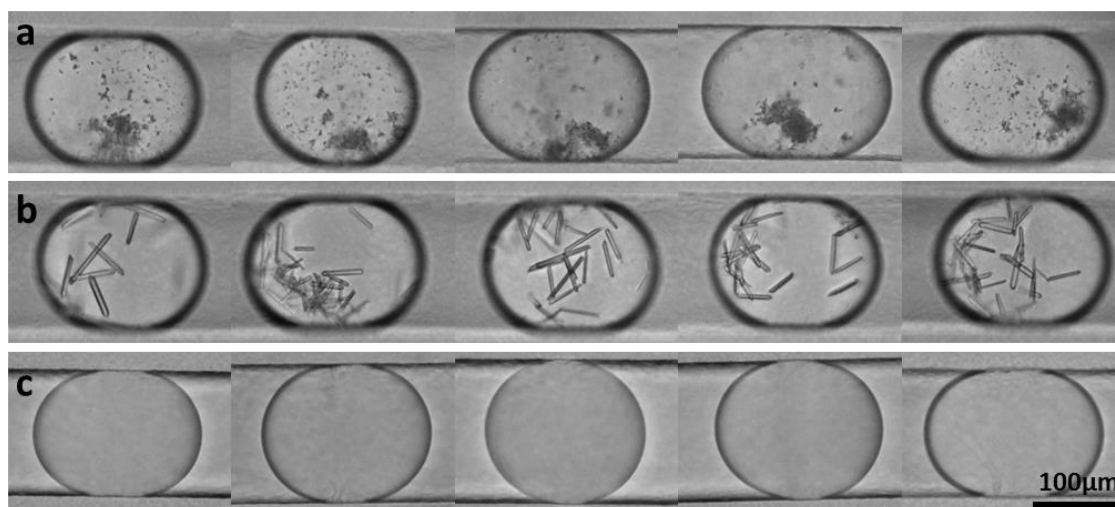


Figure 109 : Cristaux de QR2 obtenus dans des gouttes de  $3\text{nL}$  pour les trois débits testés (Figure 108) après  $5\text{h}$  à  $20^\circ\text{C}$ ,  $20\text{mM}$  de tampon Tris  $\text{pH}8$ ,  $150\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$ . (a) QR2  $5,5\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,8\text{M}$ , (b) QR2  $11\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $1,2\text{M}$ , (c) QR2  $16,5\text{ mg/mL}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0,6\text{M}$ . Ces trois séries de gouttes ont été obtenues lors d'une unique expérience.

### 1.5.2.2. Réduction de la concentration en sel

La fréquence de nucléation est réduite en diminuant la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  du tampon de cristallisation introduit en amont, de  $2,4\text{M}$  à  $1,8\text{M}$ , tout en conservant la concentration de la solution mère de QR2. Puis un nouveau gradient de concentration est effectué (Figure 110). Pour les deux paliers de concentration générés (Figure 108 et Figure 110), les concentrations en QR2 sont identiques (la concentration de la solution mère de QR2 étant la même, ainsi que les débits appliqués). Cependant, les spectres d'absorbance



obtenus sont légèrement différents. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces variations. Tout d'abord, le capillaire (FEP, 1,59mmOD, 150 $\mu$ m ID) n'est pas parfaitement homogène. Ainsi, si le capillaire bouge dans le porte-capillaire sur lequel les fibres optiques sont fixées, l'intensité transmise peut être très différente. Or entre le gradient de la Figure 108 et le gradient de la Figure 110, il s'agit d'un nouveau capillaire, ce qui peut en partie expliquer la différence du signal. De plus, il s'agit également d'un nouveau montage. Or entre chaque expérience, les fibres optiques sont démontées, nettoyées, le porte-capillaire est vidé de son huile DMS, puis les fibres optiques sont remontées, et le porte-capillaire de nouveau rempli avec de l'huile DMS. Ces manipulations impliquent un risque de remonter les éléments de manière légèrement différente. Les fibres optiques peuvent par exemple être plus ou moins serrées autour du capillaire. Ces variations sont ainsi en partie dues au fait que nous avons choisi de développer un outil *plug and play*, facile à utiliser, et pour lequel chaque élément du montage est indépendant. La structure n'est donc pas figée, ce qui peut créer de légères variations d'un montage à l'autre. Cependant, pour les applications visées ici, seul un signal d'absorbance relatif est nécessaire. Ces légères modifications d'un montage à l'autre ne sont donc pas limitantes pour vérifier la génération d'un gradient de concentration, ni pour identifier une condition de cristallisation optimisée et robuste.

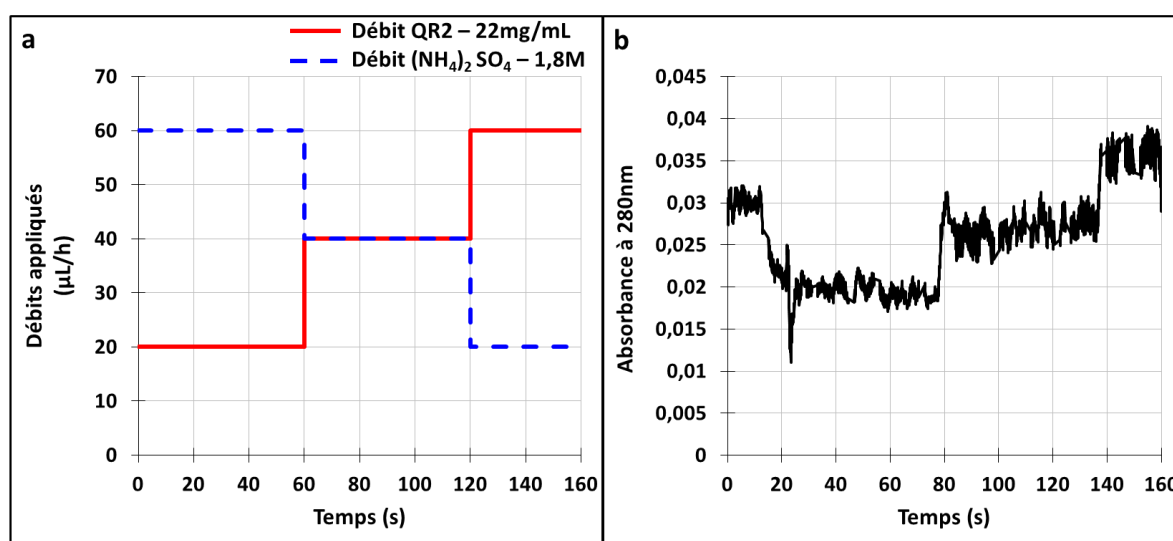


Figure 110 : (a) Débits programmés pour générer un gradient de concentration en QR2 et en  $(NH_4)_2SO_4$  (tampon de cristallisation). La somme des deux débits est maintenue constante à 80 $\mu$ L/h. Palier 1 : QR2 5,5 mg/mL,  $(NH_4)_2SO_4$  1,35M. Palier 2 : QR2 11 mg/mL,  $(NH_4)_2SO_4$  0,9M. Palier 3 : QR2 16,5 mg/mL,  $(NH_4)_2SO_4$  0,45M. (b) Absorbance à 280nm des gouttes de QR2 dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Chaque point correspond à la moyenne de 20 mesures de 50ms chacune, ce qui correspond à une fréquence d'acquisition d'une mesure par seconde.

Les cristaux obtenus sont présentés dans la Figure 111. Il n'y a plus de précipité. De plus, la Figure 111a présente peu de cristaux, la Figure 111b et la Figure 111c n'en présentent pas du tout. Dans tous ces cas, la diminution générale du nombre de cristaux pour des concentrations en QR2 identiques aux expériences de la Figure 109 est donc due à la réduction de la concentration en sel. De plus, ces deux expériences (Figure 109 et

Figure 111) permettent d'identifier une concentration en sel favorable à la croissance de peu de cristaux de QR2, soit autour de 1,35M. La concentration en QR2 est de 5,5 mg/mL dans les deux expériences. La concentration en agent de cristallisation est alors maintenue autour de 1,4M, et la concentration en QR2 variée afin d'étudier son effet sur la cristallisation.

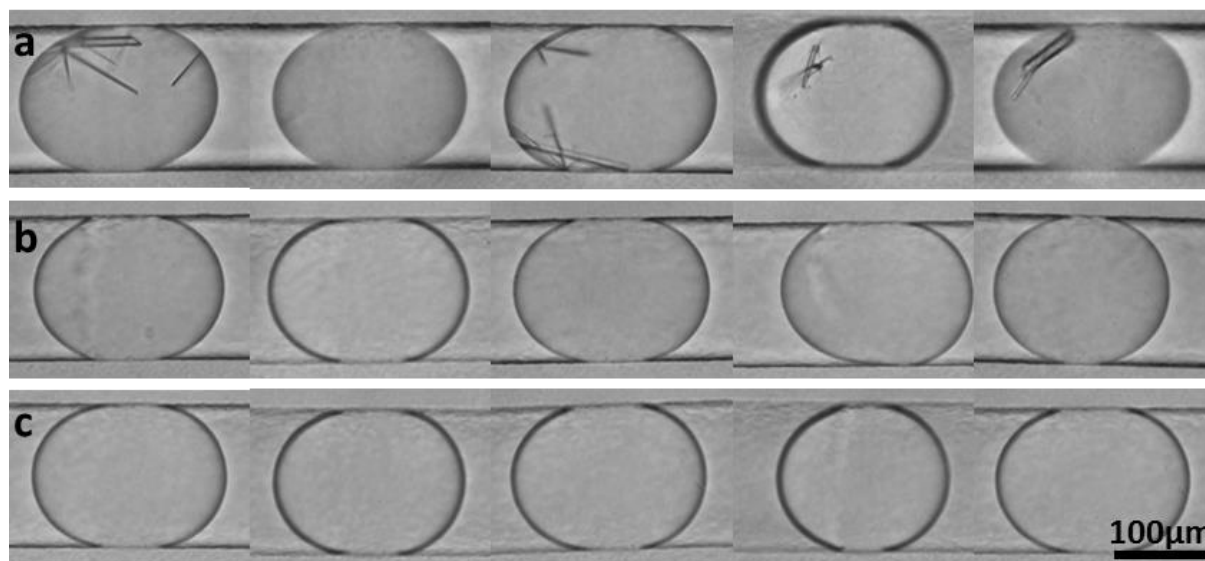


Figure 111 : Cristaux de QR2 obtenus dans des gouttes de 3nL pour les trois débits testés (Figure 110) après 5h à 20°C, 20mM de tampon Tris pH8, 150mM de NaCl. (a) QR2 5,5 mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,35M, (b) QR2 11 mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,9M, (c) QR2 16,5 mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,45M. Ces trois séries de gouttes ont été obtenues lors d'une unique d'expérience.

### 1.5.2.3. Variation de la concentration en QR2

La concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dans le tampon en amont du système microfluidique est de 2,7M afin de conserver des concentrations en sel autour de 1,4M (de 0,8 à 1,85M) quelles que soient les concentrations et donc les débits en solution de QR2 (Figure 112a). La concentration en QR2 en amont du système microfluidique est réduite de 22mg/mL à 11mg/mL afin de générer des concentrations autour de 5,5mg/mL, de 3,7 à 7,33mg/mL. Les deux premières concentrations étudiées (3,7 et 5,5mg/mL) semblent faibles pour être détectée par le spectromètre UV (Figure 112b). Il est alors difficile de distinguer les deux premiers paliers de concentration sur le spectre d'absorbance. Par contre, le dernier palier est visible sur le spectre (Figure 112b, à droite), car sa concentration en QR2 est plus élevée (7,33mg/mL).

Cependant, la Figure 113 montre que les trois paliers de concentration ont bien été générés, et qu'ils se traduisent par une forte différence de fréquence de nucléation dans les gouttes. Cette dernière expérience permet de confirmer les résultats obtenus précédemment, la condition la plus favorable à la croissance de peu de cristaux est 5,5mg/mL de QR2, 1,35M de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

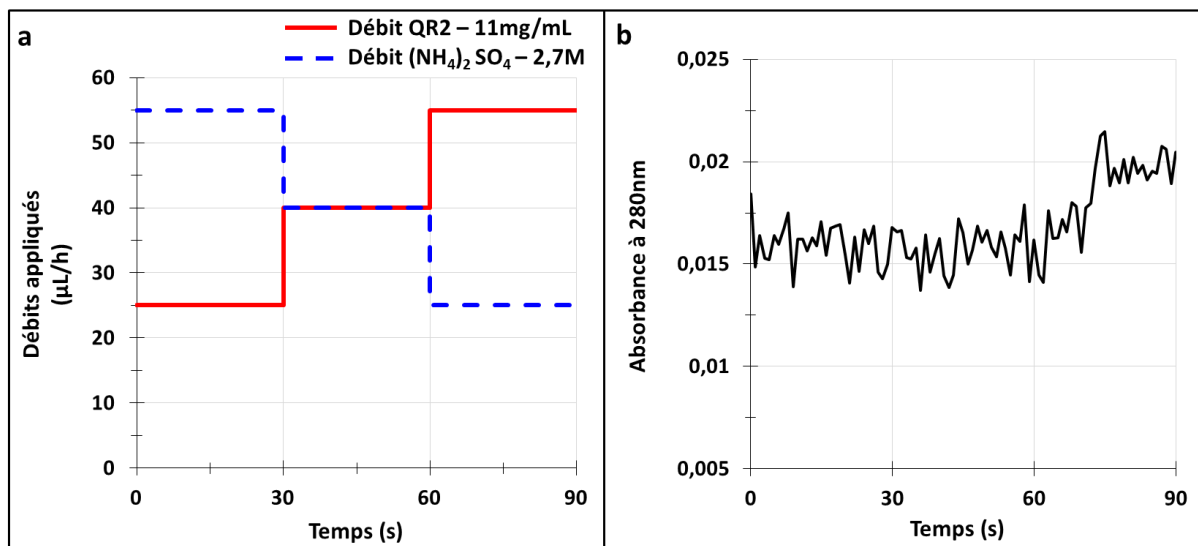


Figure 112 : (a) Débits programmés pour générer un gradient de concentration en QR2 et en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (tampon de cristallisation). La somme des deux débits est maintenue constante à 80µL/h. Palier 1 : QR2 3,44 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,85M. Palier 2 : QR2 5,5 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,35M. Palier 3 : QR2 7,6 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,8M. (b) Absorbance à 280nm des gouttes de QR2 dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150µm, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Chaque point correspond à la moyenne de 20 mesures de 50ms chacune, ce qui correspond à une fréquence d'acquisition d'une mesure par seconde.

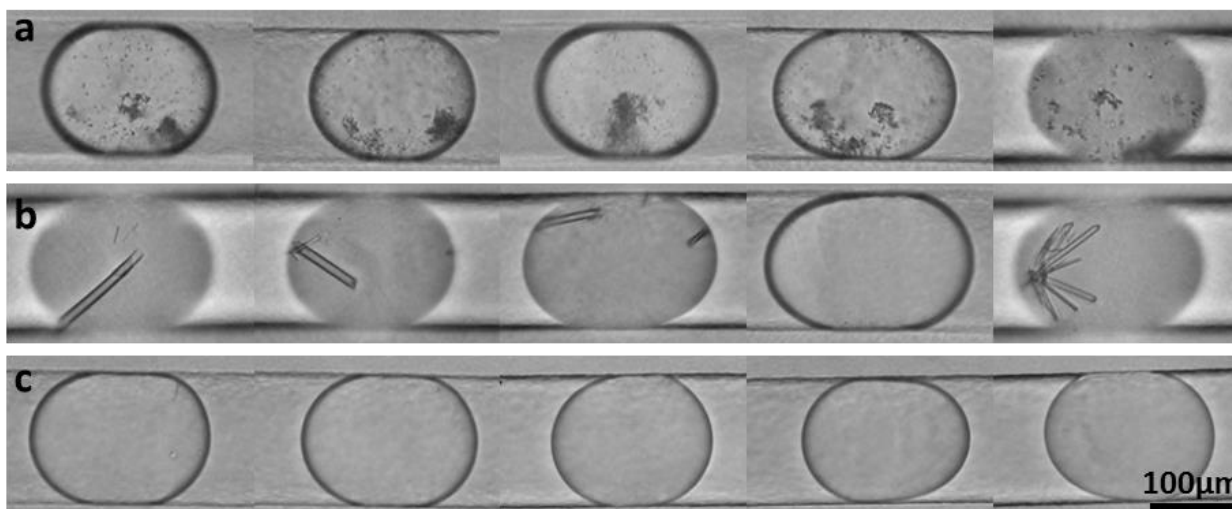


Figure 113 : Cristaux de QR2 obtenus dans des gouttes de 3nL pour les trois débits testés (Figure 112) après 5h à 20°C, 20mM de tampon Tris pH8, 150mM de NaCl. (a) QR2 3,7 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8M, (b) QR2 5,5 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,35M, (c) QR2 7,33 mg/mL, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,9M. Ces trois séries de gouttes ont été obtenues lors d'une unique expérience.

Ainsi, il est possible d'optimiser rapidement les conditions de cristallisation d'une protéine-cible (Figure 114), tout en ne consommant que peu de matière première. En effet, 6µL de solution de protéine sont suffisants pour réaliser ces trois séries de gradients de concentration, avec un volume mort inférieur au microlitre (environ 500nL). Dans cette expérience, 6µL de solution correspondent à environ 100µg de protéine.

Dans cette partie, nous avons montré l'intérêt du système microfluidique pour optimiser les conditions de cristallisation en variant les conditions sur deux solutions qui sont mélangées (QR2 et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

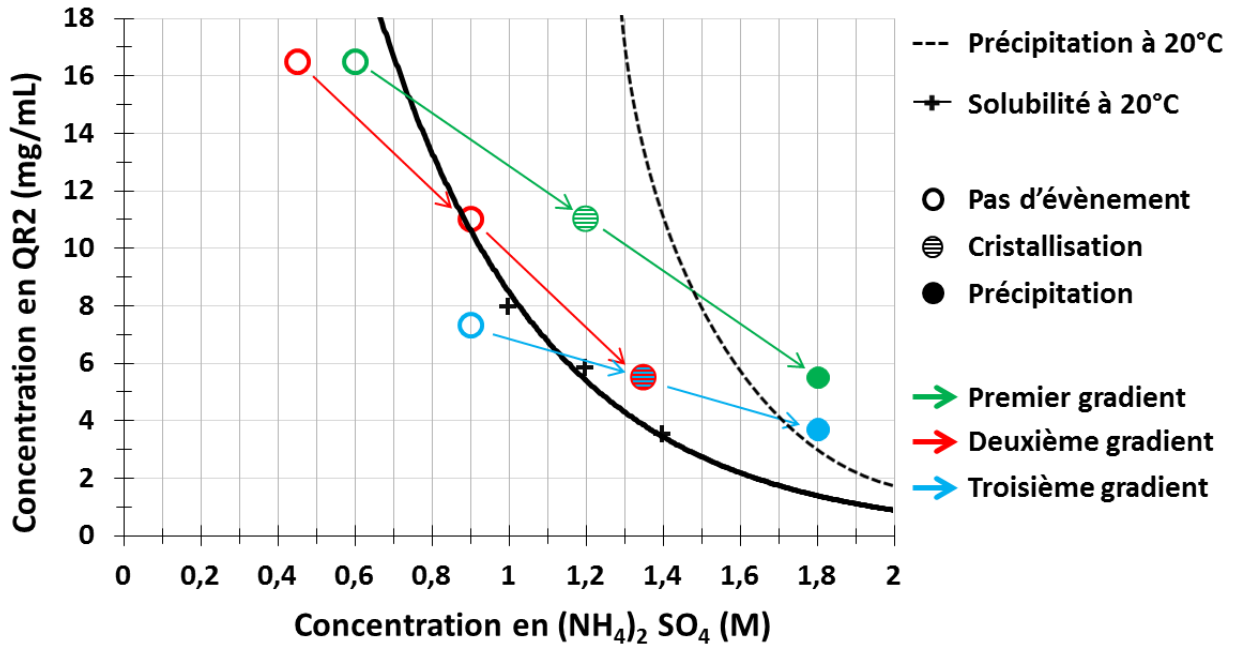


Figure 114 : Optimisation des conditions de cristallisation de la protéine QR2 par la méthode du gradient de concentration. Les symboles creux représentent les concentrations pour lesquelles aucun événement n'est observé, les symboles hachurés celles pour lesquelles des cristaux de QR2 sont obtenus, et les symboles pleins celles pour lesquelles la QR2 précipite. En vert le premier gradient de concentration (Figure 108 et Figure 109), en rouge le second (Figure 110 et Figure 111) et en bleu le troisième (Figure 112 et Figure 113). La courbe noire représente la solubilité mesurée (§ B.3.5) de la QR2 en fonction de la concentration en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la courbe en pointillés noirs la zone de précipitation estimée de la QR2.

## 1.6. Conclusion – Criblage des conditions de cristallisation

Dans cette partie, la plateforme microfluidique polyvalente développée pour l'optimisation des conditions de cristallisation des protéines a été décrite. La formation de gouttes de quelques nanolitres permet de réduire significativement les quantités de matières premières nécessaires aux expériences de cristallisation. De plus, des méthodes d'analyse en ligne des gouttes par spectrométrie UV ont été mises au point, ce qui permet de contrôler la régularité des gouttes (composition, fréquence), et facilite l'identification de la meilleure condition de cristallisation. La méthode du gradient de concentration permet de balayer une large gamme de sursaturations. Plusieurs gradients peuvent être réalisés successivement, jusqu'à l'identification d'une condition de cristallisation favorable à la nucléation de peu de cristaux de taille suffisante pour faire de la diffraction des rayons X.

## Chapitre 2. Co-cristallisation avec des ligands

Pour de nombreuses protéines d'intérêt pharmaceutique (comme la QR2), l'étude des interactions protéine-ligand passe souvent par la co-cristallisation (§ B.2.1.2). Cela nécessite donc d'introduire une troisième solution dans les gouttes, dont le débit, et donc la concentration, pourra être varié.

### 2.1. Couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té

Le couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té, permet d'ajouter une troisième solution dans les gouttes. Ce couplage, déjà réalisé pour des capillaires de 500 $\mu$ m ID (§ 1.2.2), est étudié ici en utilisant des capillaires de 150 $\mu$ m ID.

#### 2.1.1. Mise en place du montage

Dans un premier temps, afin de faciliter la détection, des solutions colorées sont utilisées pour montrer la faisabilité du couplage. Pour cela, des gouttes de colorant jaune sont générées dans la jonction en croix, puis un colorant rouge est ajouté dans ces gouttes à l'aide d'une jonction en té (Figure 115).

Compte tenu de la petite taille des gouttes, il est difficile de distinguer à l'œil nu le changement de couleur des gouttes avec les variations de débit. La quantité de colorant rouge ajoutée est donc suivie par spectrométrie à 520nm (Figure 116), et la quantité de colorant jaune est suivie par spectrométrie à 431nm. Les gouttes étant allongées suite à l'ajout de la solution rouge, il n'est pas nécessaire de faire une moyenne du signal d'absorbance sur plusieurs mesures.

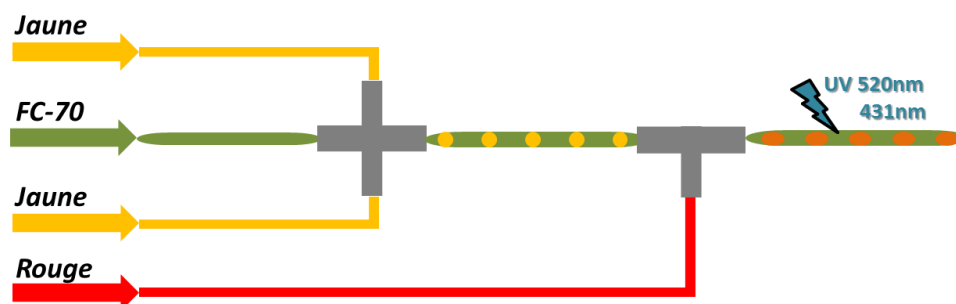


Figure 115 : Montage utilisé. La concentration en colorants rouge et jaune des gouttes à la sortie du té est suivie par spectrométrie UV respectivement à 520nm et 431nm.

Lorsque les débits de colorant jaune sont fixés, nous avons vérifié que l'absorbance à 431nm ne varie pas avec l'ajout de colorant rouge dans les gouttes. En revanche, à 520nm, l'absorbance augmente lorsque le débit de la troisième solution rouge augmente. Ainsi, plus le débit de la troisième solution est élevé, plus la quantité de colorant rouge ajoutée dans les gouttes est grande, et plus ces dernières sont concentrées en cette solution rouge. L'absorbance à 520nm est représentée en fonction du débit de colorant rouge sur la Figure 117.

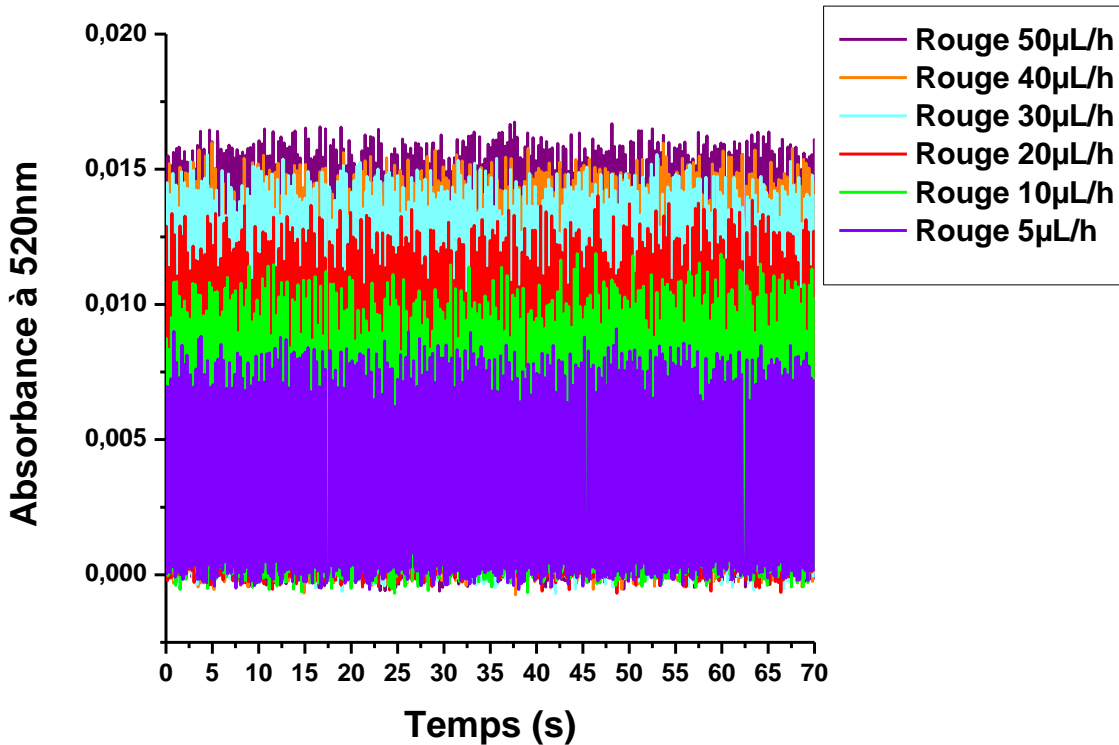


Figure 116 : Suivi par absorbance à 520nm du mélange dans les gouttes à l'aide d'une jonction en té. Absorbance à 520nm des gouttes de colorant dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150µm, OD 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Le débit de FC-70 est de 170µL/h, et le débit des solutions jaunes est de 80µL/h (40 + 40µL/h). Différents débits de troisième solution (rouge) sont testés : 5µL/h, 10µL/h, 20µL/h, 30µL/h, 40µL/h et 50µL/h. Les mesures sont réalisées en intensité transmise puis converties en absorbance.

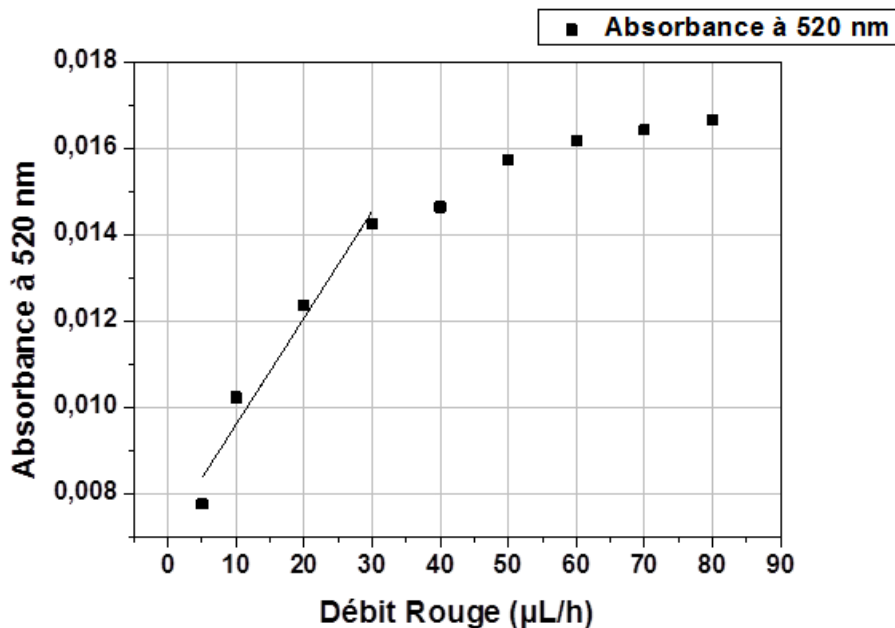


Figure 117 : Absorbance à 520nm des gouttes en fonction du débit de la troisième solution rouge ajoutée à l'aide d'une jonction en té. Les données utilisées sont celles de la Figure 116.

Sur la Figure 117, l'absorbance à 520nm, et donc la concentration de la goutte en colorant rouge, est proportionnelle au débit appliqué jusqu'à un débit de 30 $\mu$ L/h. Au-delà, l'absorbance mesurée sort du domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Il est ainsi possible de contrôler la quantité de solution ajoutée aux gouttes primaires (sortant de la croix) en contrôlant le débit injecté dans la jonction en té. Les gouttes initiales font environ 5nL. Au fur et à mesure de l'augmentation du débit de la solution rouge, les gouttes sont de plus en plus rouges et leur volume augmente significativement.

Cependant, la quantité de solution ajoutée à chaque goutte dépend de la taille et de la fréquence des gouttes primaires. Pour un même débit de troisième phase aqueuse, plus les gouttes primaires sont grosses et espacées, plus la quantité de matière ajoutée est importante. Or nous avons vu précédemment qu'avec l'huile FC-70, les gouttes générées avec la jonction en croix ont tendance à être allongées. Le volume de solution ajoutée est donc d'autant plus important. Par exemple, pour un débit de solution rouge de 80 $\mu$ L/h (soit le même débit que pour les phases aqueuses primaires), les gouttes secondaires font environ 16nL, soit un volume trois fois plus grand que celui des gouttes primaires.

### **2.1.2. Application à la cristallisation du lysozyme**

Pour montrer la faisabilité du mélange d'une troisième solution pour la cristallisation de protéines, le montage associant les deux jonctions, croix et té, est appliqué à la cristallisation du lysozyme. En effet, le lysozyme cristallise en présence de NaCl et de PEG-5000 (§ B.2.1.1). Ce système à trois paramètres est donc adapté à la validation du montage.

D'autre part, la solution de PEG-5000 présente une viscosité importante (environ 200 mPa.s) comparée aux solutions aqueuses (1 mPa.s) utilisées jusque-là dans ce travail. Il faut alors être capable de manipuler cette solution visqueuse avec le système microfluidique et procéder à des mélanges de solutions de viscosités très différentes. L'ajout de PEG-5000 dans les gouttes est donc étudié à travers deux protocoles :

- (1) ajout de la solution la moins visqueuse dans la solution la plus visqueuse
- (2) ajout de la solution la plus visqueuse dans la solution la moins visqueuse

Deux montages sont donc testés. Pour le premier protocole, le lysozyme est ajouté dans des gouttes de tampon de cristallisation (contenant le PEG-5000 et le NaCl) grâce à la jonction en té. Pour le second protocole, c'est la solution de PEG-5000 qui est ajoutée via la jonction en té dans les gouttes de lysozyme et de NaCl. Le seul composant des gouttes dont la concentration dans les gouttes peut être suivie par spectrométrie UV étant le lysozyme, c'est le seul composant dont la concentration est variée dans les deux montages étudiés.

#### **2.1.2.1. Ajout du lysozyme dans la jonction en té**

Dans un premier temps, des gouttes de tampon de cristallisation (PEG-5000 45% et NaCl 2M) sont générées dans la jonction en croix, puis la solution de lysozyme (60mg/mL) est ajoutée dans les gouttes avec la jonction en té, comme illustré dans la Figure 118.

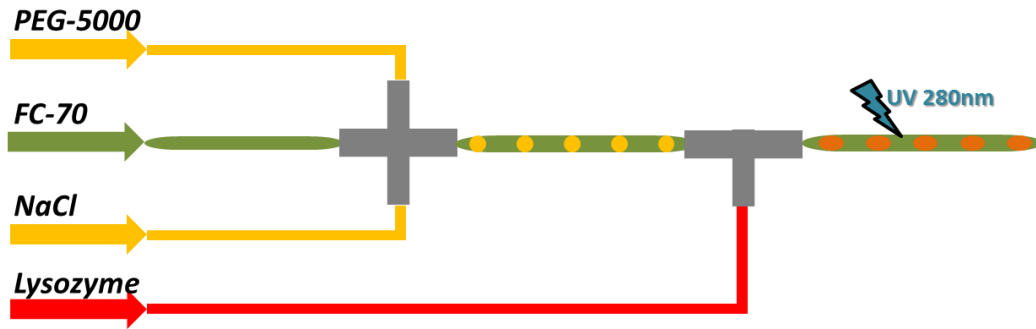


Figure 118 : Montage utilisé. Les concentrations des solutions utilisées sont PEG-5000 45%, NaCl 2M et lysozyme 60mg/mL. La concentration en lysozyme dans les gouttes à la sortie du té est suivie par spectrométrie UV à 280nm.

Le débit de FC-70 est fixé à 130 $\mu$ L/h et les débits appliqués au PEG et au sel sont identiques (30 $\mu$ L/h chacun) de façon à obtenir des gouttes régulières à 22,5% de PEG-5000 et 1M de NaCl. La solution de lysozyme est quant à elle ajoutée dans les gouttes à différents débits, allant de 10 $\mu$ L/h à 60 $\mu$ L/h. Les gouttes en sortie de jonction en té sont très allongées, et sont de plus en plus longues à mesure que le débit de lysozyme augmente. La concentration des gouttes en lysozyme est suivie par spectrométrie UV. Les résultats sont présentés dans la Figure 119.

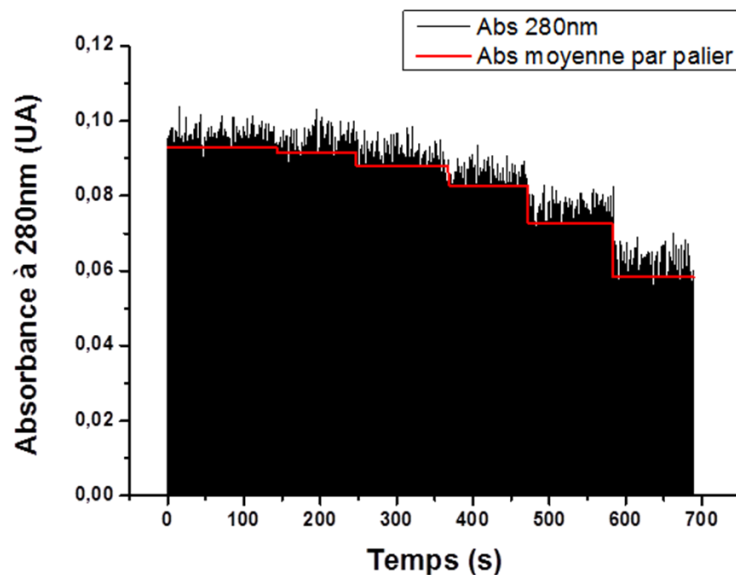


Figure 119 : Suivi par absorbance à 280nm de la quantité de lysozyme ajoutée dans les gouttes de tampon de cristallisation au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Les gouttes sont générées dans l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID 150 $\mu$ m, OD 1,59mm). Le débit de FC-70 est de 130 $\mu$ L/h, et le débit des solutions de PEG-5000 et de NaCl est de 30 $\mu$ L/h chacune. Différents débits de lysozyme ont été testés, de gauche à droite : 60 $\mu$ L/h, 50 $\mu$ L/h, 40 $\mu$ L/h, 30 $\mu$ L/h, 20 $\mu$ L/h et 10 $\mu$ L/h.

Plus le débit de lysozyme est important, plus l'absorbance des gouttes augmente. La protéine est donc bien ajoutée aux gouttes. Ainsi, la jonction en té permet d'ajouter la quantité de protéine voulue dans les gouttes, même si le tampon de cristallisation contenu dans les gouttes primaires est une solution plus visqueuse.



### 2.1.2.2. Ajout du PEG-5000 dans la jonction en té

Dans le second montage, c'est le PEG (PEG-5000 45%) qui est ajouté dans les gouttes avec la jonction en té. Les gouttes primaires sont donc composées de lysozyme (injecté à 60mg/mL) et de NaCl (injecté à 2M), comme illustré dans la Figure 120.

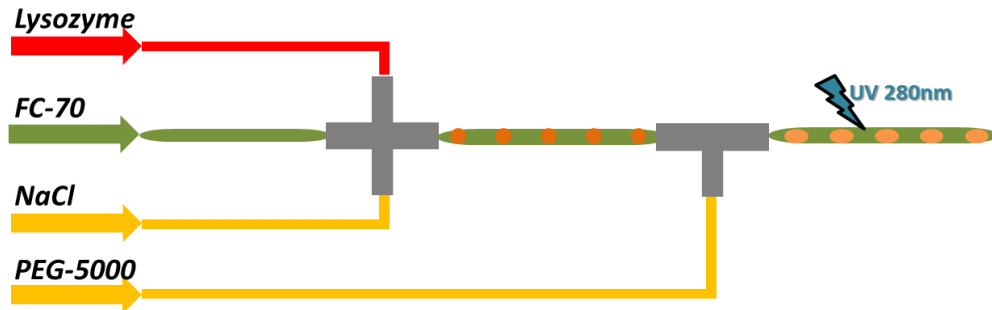


Figure 120 : Montage utilisé. Les concentrations des solutions utilisées sont PEG-5000 45%, NaCl 2M et lysozyme 60mg/mL. La concentration en lysozyme des gouttes à la sortie du té est suivie par spectrométrie UV à 280nm.

Le débit de FC-70 est fixé à 130 $\mu$ L/h et le débit appliqué au PEG-5000 est fixé à 30 $\mu$ L/h. La somme des débits de NaCl et de lysozyme est fixée à 60 $\mu$ L/h (de façon à générer des gouttes identiques en taille et en fréquence aux gouttes générées dans le premier montage), mais leurs débits respectifs varient de façon à générer un gradient de concentration dans la croix. Le débit de lysozyme diminue progressivement, passant de 45 $\mu$ L/h à 15 $\mu$ L/h, tandis que le débit de NaCl augmente, allant de 15 $\mu$ L/h à 45 $\mu$ L/h. La concentration des gouttes en lysozyme est suivie par spectrométrie UV. Les résultats sont présentés dans la Figure 121.

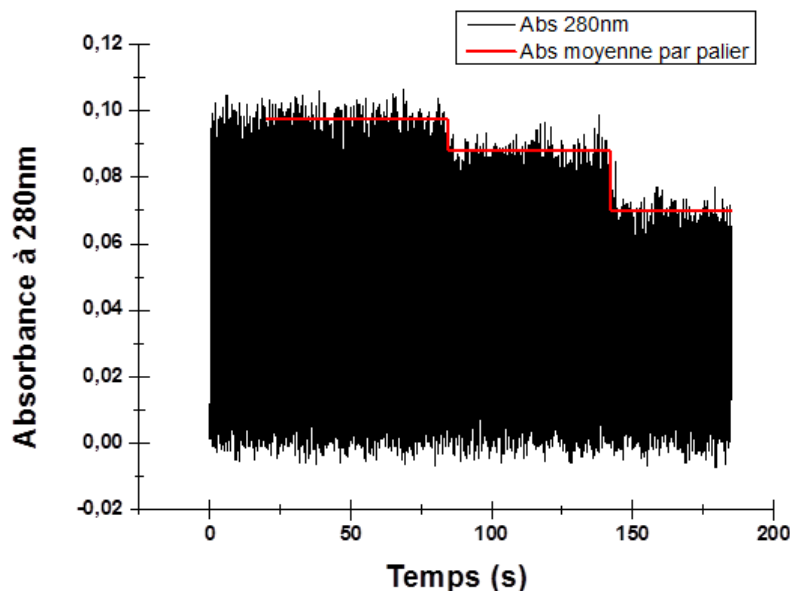


Figure 121 : Absorbance à 280 des gouttes générées dans de l'huile FC-70 à l'intérieur d'un capillaire en FEP (ID : 150 $\mu$ m, OD : 1,59mm) au cours du temps, pour un temps d'intégration de 50ms. Le débit de FC-70 est de 130 $\mu$ L/h, le débit de PEG-5000 est de 30 $\mu$ L/h. La somme des débits de NaCl et de lysozyme est fixée à 60 $\mu$ L/h. Le débit de lysozyme est, de gauche à droite, 45 $\mu$ L/h, 30 $\mu$ L/h et 15 $\mu$ L/h. Le débit de NaCl est, de gauche à droite, 15 $\mu$ L/h, 30 $\mu$ L/h et 45 $\mu$ L/h.

Plus le débit de lysozyme est important, plus l'absorbance à 280nm est importante. Ainsi, l'ajout d'une troisième solution, visqueuse, dans les gouttes avec la jonction en té ne perturbe pas la génération d'un gradient de concentration dans la croix. La Figure 122 présente les cristaux obtenus dans ces conditions.

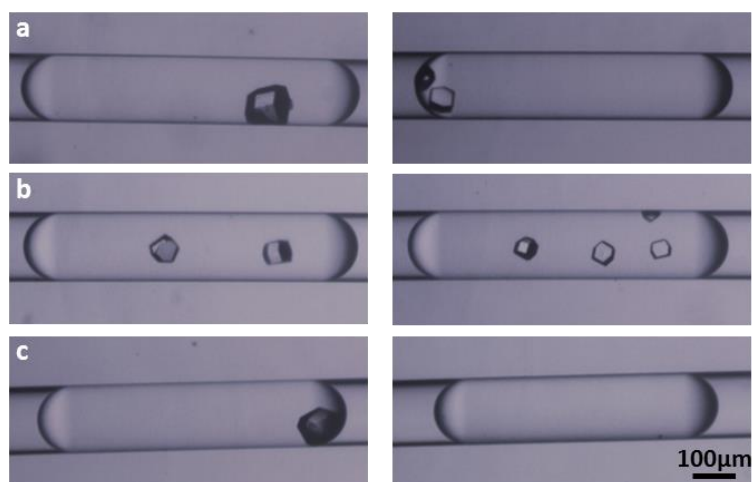


Figure 122 : Cristaux de lysozyme obtenus pour trois débits testés après 12h à 20°C dans 80mM d'acétate de sodium à pH 4,5. Cristaux obtenus pour (a) lysozyme 30mg/mL, NaCl 0,33M, PEG 15%. (b) lysozyme 20mg/mL, NaCl 0,67M, PEG 15%. (c) lysozyme 10mg/mL, NaCl 1M, PEG 15%. Le volume des gouttes est de  $12\text{nL} \pm 0,8\text{nL}$ .

En conclusion, de nombreuses conditions peuvent être criblées en mélangeant trois solutions dans un même capillaire à partir du montage en série d'une croix et d'un té. En effet, il est possible de varier la concentration en deux composés dans les gouttes primaires en sortie de croix et simultanément la concentration du troisième composé dans les gouttes en sortie de té. Ainsi, en appliquant le montage au lysozyme, ses conditions de cristallisation ont rapidement été optimisées. Enfin, l'utilisation d'une solution de PEG-5000 à 45% a également permis de valider le montage pour l'utilisation de solutions visqueuses. A la place de la solution de polymère, du glycérol (fréquemment utilisé pour protéger les cristaux lors de leur congélation) pourrait être ajouté dans les gouttes.

En faisant varier la nature de la solution ajoutée à l'aide de la jonction en té, cette géométrie serait ainsi adaptée au criblage. C'est l'objectif de la partie suivante.

## 2.2. Criblage des ligands dans un capillaire de 150µm ID

Le couplage d'une jonction en croix et d'une jonction en té, développé pour optimiser les conditions de cristallisation, peut également être appliqué au criblage des ligands d'une protéine-cible. Dans ce cas, le flux de solution ajouté dans les gouttes grâce à la jonction en té serait un (ou plusieurs) ligand(s).

### 2.2.1. Remplissage d'un capillaire avec des solutions différentes

Afin de limiter la quantité de solution nécessaire pour générer les gouttes, au lieu de remplir directement une seringue avec ladite solution, il est possible de remplir une seringue et un capillaire d'huile, puis d'aspirer dans ce capillaire la solution d'intérêt (§ B.1.1.3). Ce système peut être appliqué au criblage de ligands. Il suffit en effet d'aspirer successivement des solutions différentes dans un même capillaire, les solutions étant séparées les unes des autres par une longueur d'huile pour éviter qu'elles ne se mélangent (Figure 123) puis de les injecter successivement dans les gouttes avec la jonction en té. Pour cela nous nous sommes inspirés des travaux effectués dans l'équipe de R.F. Ismagilov (Li et al., 2006).

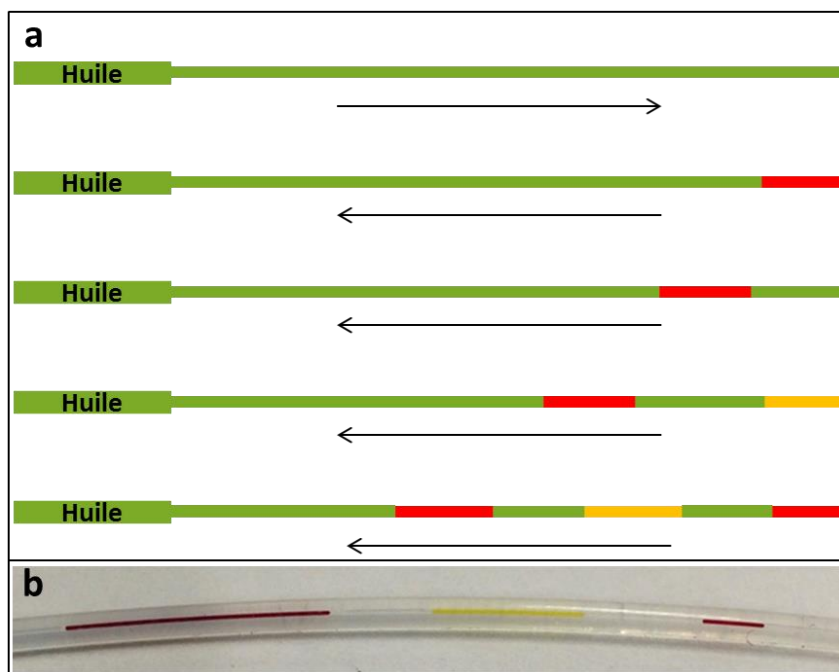


Figure 123 : (a) Remplissage d'un capillaire avec des solutions différentes. Le capillaire est d'abord rempli d'huile (vert), puis la première solution (rouge) est aspirée dans le capillaire. De l'huile est ensuite aspirée de façon à séparer les solutions, puis la seconde solution est aspirée, puis de nouveau de l'huile et ainsi de suite. (b) Photographie d'un capillaire (FEP, 1,59mm OD, 150µm ID) contenant successivement un colorant rouge, jaune, puis de nouveau rouge, séparés par de l'huile FC-70.

### 2.2.2. Ajout de différentes solutions aqueuses dans les gouttes

Dans un premier temps, les différentes solutions aspirées dans le capillaire sont des colorants, de façon à faciliter l'observation des gouttes pour valider le concept. Des colorants rouge, jaune et de nouveau rouge sont donc aspirés successivement dans un



des gouttes liées à l'ajout d'huile facilite l'identification des différents paliers dans le capillaire de sortie. Il est donc possible d'ajouter différentes solutions aqueuses successivement dans les gouttes après leur génération à l'aide d'une jonction en té.

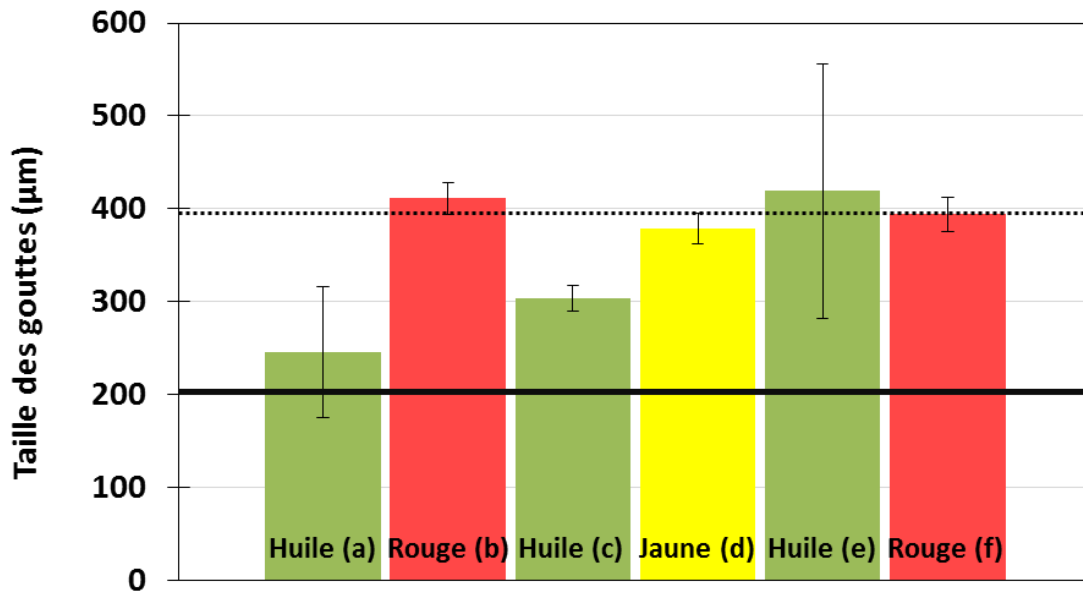


Figure 126 : Taille moyenne des gouttes obtenues en sortie de té pour chaque zone de remplissage du capillaire. La lettre entre parenthèses renvoie à la photographie correspondante sur la Figure 125. La barre noire en pointillés représente la taille moyenne des gouttes dans lesquelles un colorant a été ajouté (environ 400µm), la barre pleine noire représente la taille moyenne des gouttes primaires en sortie de croix (environ 200µm). La barre d'erreur correspond à l'écart type de la mesure.

### 2.2.3. Ajout de solvants dans les gouttes d'eau

Les ligands des protéines sont le plus souvent insolubles dans l'eau. Dans ce cas, ce ne sont donc pas des solutions aqueuses qui doivent être ajoutées dans la jonction en té, mais des solvants organiques. Pour cette étude, les solvants organiques les plus couramment utilisés pour solubiliser les ligands étudiés sont, soit l'éthanol, le méthanol, le DMSO (Diméthylsulfoxyde) et le DMF (N,N-Diméthylformamide). Ces solvants organiques sont tous miscibles avec des solutions aqueuses. Afin de faciliter l'observation du mélange dans les gouttes, un colorant rouge est ajouté dans les solvants organiques (1%). Chaque solvant est ajouté sans ligand dans la jonction en té, comme illustré dans la Figure 127.

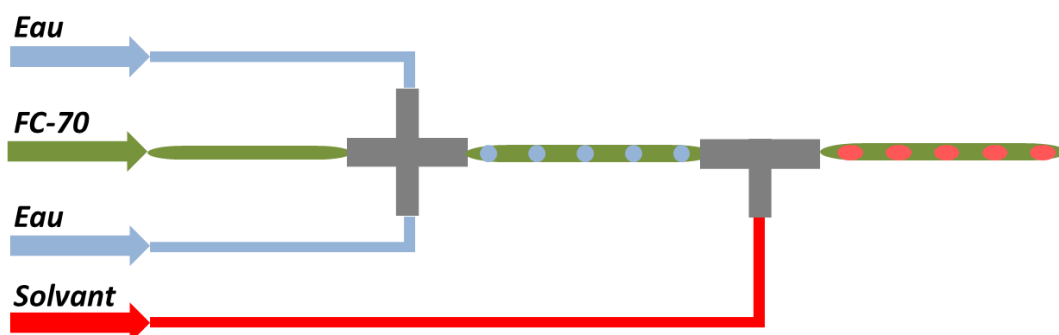


Figure 127 : Montage utilisé pour ajouter un solvant organique dans des gouttes d'eau.

A la sortie du té, les gouttes contenant de l'eau et du solvant organique sont régulières, ces solvants sont donc ajoutés de façon homogène dans les gouttes. Cependant, dès que les gouttes ont parcouru quelques centimètres dans le capillaire de sortie, elles coalescent très vite, et ce quels que soient les débits utilisés et la fréquence des gouttes formées dans la croix.

Cette perturbation des gouttes est probablement liée à l'énergie interfaciale. En effet, l'énergie interfaciale de l'eau dans l'huile FC-70 est beaucoup plus élevée que celle des solvants organiques étudiés dans cette même huile (Tableau 5).

	Eau	DMSO	DMF	Méthanol	Ethanol
<b>Energie interfaciale dans le FC-70 (mJ.m<sup>-2</sup>)</b>	48,40 ± 0,51	18,14 ± 0,06	14,46 ± 0,05	9,81 ± 0,10	7,83 ± 0,02

*Tableau 5 : Energie interfaciale des différents solvants utilisés dans le FC-70.*

L'ajout du solvant dans les gouttes crée dans un premier temps un gradient d'énergie interfaciale entre les zones riches en solvant et les zones riches en eau (avant que la goutte ne soit homogène). Cette variation de l'énergie interfaciale peut conduire à un écoulement de Marangoni, induisant une perturbation du mouvement des gouttes, comme cela a été montré dans le cas de l'ajout d'un tensioactif (Baroud et al., 2010). Cela peut provoquer la coalescence des gouttes. D'autre part, une fois que la goutte est homogène (après le mélange), son énergie interfaciale est plus faible qu'avant l'ajout du solvant. Les gouttes ont alors tendance à mouiller la paroi du capillaire, ce favorise leur coalescence. Il est donc difficile d'ajouter l'un de ces solvants organiques à l'état pur dans les gouttes d'eau précédemment formées, sans perturber l'écoulement des gouttes.

Il faudrait alors réduire les effets liés au changement d'énergie interfaciale lors du mélange afin de stabiliser les gouttes et d'éviter leur coalescence. Pour cela, au lieu d'ajouter un solvant pur, c'est un mélange solvant/eau qui est injecté dans la jonction en té. Pour chaque solvant, différentes proportions d'eau ont été testées. L'énergie interfaciale avec l'huile FC-70 est mesurée pour chaque mélange à l'aide de la méthode de la goutte pendante (§ B.3.1). La stabilité des gouttes dans le capillaire en sortie de la jonction en té est ensuite étudiée. Les résultats sont rassemblés dans la Figure 128.

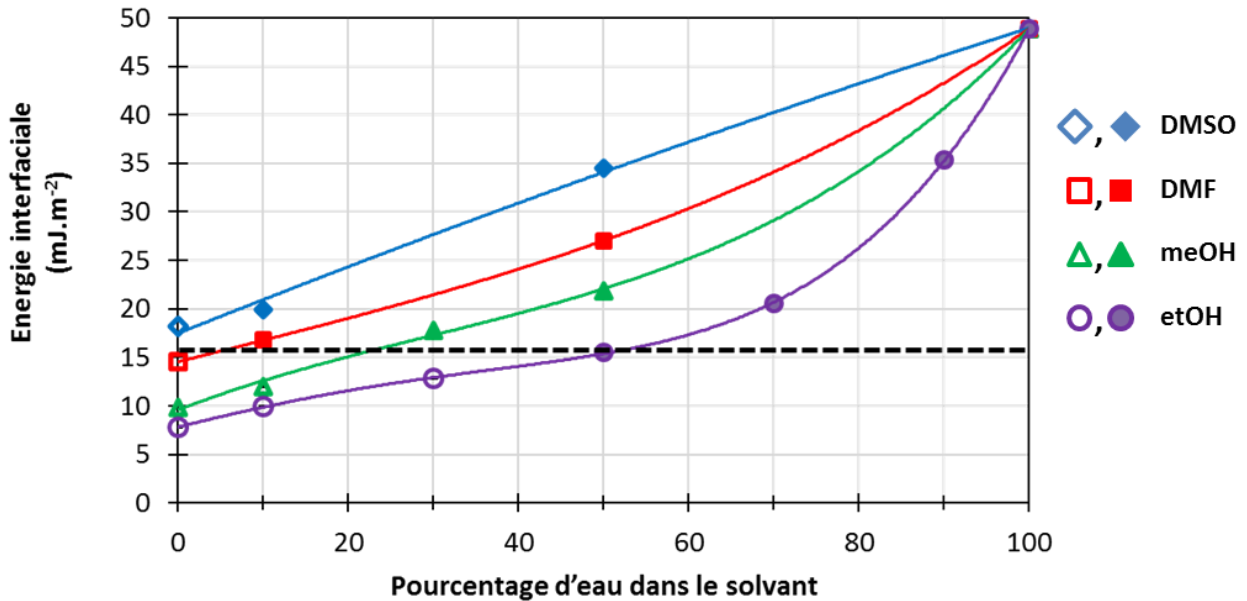


Figure 128 : Energie interfaciale entre les mélanges eau/solvant et huile FC-70, en fonction du pourcentage d'eau dans les solvants organiques. Les solvants testés sont l'éthanol (ronds violets), le méthanol (triangles verts), le DMF (carrés rouges) et le DMSO (losanges bleus). Les symboles vides correspondent aux conditions pour lesquelles les gouttes coalescent rapidement dans le capillaire, et les symboles pleins aux conditions pour lesquelles les gouttes formées sont stables dans le capillaire.

Pour les quatre solvants testés, l'ajout d'eau dans la solution injectée dans le té permet de générer des gouttes stables dans le capillaire. Cependant, la proportion d'eau nécessaire à cette stabilisation est différente en fonction de la nature du solvant. Pour le DMSO et le DMF, seuls 10% d'eau sont nécessaires à la stabilisation des gouttes, contre 30% d'eau pour le méthanol et 50% d'eau pour l'éthanol.

Pour tous les solvants, la valeur de l'énergie interfaciale à partir de laquelle les gouttes sont stables dans le capillaire est dans la gamme de 15-20mJ.m<sup>-2</sup>. Cette valeur semble correspondre à une énergie interfaciale limite, en dessous de laquelle les gouttes ne sont pas stables dans le capillaire. Cette valeur d'énergie interfaciale est proche de l'énergie de surface critique du Téflon, 18mJ.m<sup>-2</sup> (Sharma and Hanumantha Rao, 2002), mesurée par la méthode de Zisman (Shafrin and Zisman, 1964). Cette énergie de surface critique d'une surface solide donne la valeur d'énergie interfaciale maximale que doit avoir un liquide pour mouiller la surface. Comme la surface du FEP ressemble à celle du Téflon, ceci confirme que les gouttes deviennent instables et ont tendance à coalescer lorsqu'elles mouillent la paroi du capillaire en FEP.

Par conséquent, dans ce montage microfluidique en FEP, la phase dispersée doit présenter une énergie interfaciale avec la phase continue de 15-20mJ.m<sup>-2</sup>, par exemple par ajout d'eau, pour éviter que les gouttes ne coalescent.

## 2.3. Conclusion – Co-cristallisation

En conclusion, l'association d'une jonction en croix et d'une jonction en té permet de faire varier simultanément jusqu'à trois paramètres de la composition des gouttes. Ce montage est adapté à la fois au mélange de solutions de viscosités très différentes (comme un mélange d'eau et de PEG-5000 à 45%) et au mélange de solutions de natures différentes (une phase aqueuse et une phase organique). De plus, un capillaire peut être rempli avec des solutions différentes sans que celles-ci ne se mélangent, ce qui permet d'ajouter successivement des solutions différentes dans les gouttes après leur génération. Il est également possible d'ajouter des solvants organiques dans des gouttes d'eau. Ce montage doit encore être appliqué au criblage des ligands de la protéine QR2 pour la co-cristallisation, et pourrait également être utilisé pour un criblage plus large des conditions de cristallisation.



## Chapitre 3. Caractérisation des cristaux produits en microfluidique par DRX

La cristallisation des protéines est généralement effectuée dans un but d'études structurales. En effet, la cristallographie aux rayons X sur des cristaux de protéine permet de déterminer la structure moléculaire tridimensionnelle d'une macromolécule à partir des clichés de diffraction obtenus. Les cristaux obtenus en microfluidique ont donc vocation à être analysés par DRX, que ce soit dans le cadre de l'optimisation des conditions de cristallisation d'une protéine pour en déterminer la structure, ou dans le cadre du criblage des ligands d'une protéine-cible pour l'identification et la conception de nouveaux candidats-médicaments.

Deux méthodes pour caractériser les cristaux sont envisagées ici. La première technique est la DRX *in situ*, dans une goutte qui se trouve à l'intérieur d'un capillaire. La seconde méthode est la DRX *ex situ*, après extraction et cryogénéisation d'un cristal choisi.

### 3.1. DRX *in situ* dans un capillaire en verre

La solution la plus simple serait de faire diffracter les cristaux directement dans le capillaire en téflon dans lequel ils ont nucléés. Cependant, le bruit de fond lié au téflon est important sur les clichés de diffraction, et pourrait réduire la qualité des données de diffraction obtenues (Yadav et al., 2005). Les gouttes contenant les cristaux doivent donc être transférées vers un capillaire compatible avec la DRX. Pour cela, un capillaire en verre entouré d'un film de polyimide de 150 $\mu$ m ID et 360 $\mu$ m OD est utilisé. Ce type de capillaire a les mêmes diamètres interne et externe que les capillaires en PFA utilisés précédemment, et est donc facile à connecter au montage microfluidique. De plus, le film de polyimide (transparent aux RX) permet de faciliter la manipulation du capillaire en verre, en le rendant moins cassant.

Cependant, le verre étant par nature hydrophile, les gouttes d'eau mouillent la surface du capillaire et ne sont donc pas stables dans l'huile. La surface du capillaire en verre doit donc être modifiée pour la rendre hydrophobe et permettre le transfert des gouttes contenant les cristaux. Pour cela, la méthode choisie est la silanisation (§ B.3.3.2).

#### 3.1.1. Traitement du verre

La chimie et la réactivité des silanes sont tout aussi variées que leurs applications. Dans un premier temps, il faut donc mettre au point un protocole permettant de silaniser l'intérieur d'un capillaire en verre de 150 $\mu$ m de diamètre interne, sans le boucher, ni altérer la transparence de la paroi.

### **3.1.1.1. Silanisation de lamelles en verre**

Différents protocoles de silanisation sont testés sur des lamelles en verre. Après le traitement, l'angle de contact entre la surface de la lamelle et une goutte d'eau déposée à sa surface est mesuré (§ B.3.2).

La silanisation étant une réaction de surface, la première étape, la plus importante, est le nettoyage de la surface. Plusieurs méthodes sont testées, en utilisant différents solvants (acétone, isopropanol, toluène, eau), les ultrasons, un four à plasma d'oxygène (§ B.3.3.1) ou une solution piranha (mélange 1:4 d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène). Ces différents tests montrent que le meilleur moyen d'obtenir une surface propre est de nettoyer les lamelles aux ultrasons, successivement avec de l'eau, de l'acétone puis de l'isopropanol. Puis la surface doit être « activée » pour qu'elle présente des groupements Si-OH. Cette étape dite d'hydroxylation est effectuée grâce au passage dans un four à plasma d'oxygène 30 minutes.

Pour silaniser la surface préparée précédemment, différents silanes (triméthoxy(octadécyl)silane (OTMS), triéthoxy(octyl)silane (OTES), trichloro(octadécyl)silane (OTS)) et différents solvants (isopropanol, toluène) peuvent être utilisés. Le protocole de silanisation a vocation à être utilisé en microfluidique, système pour lequel les précautions d'utilisation du toluène (au niveau sécurité) sont difficilement compatibles. C'est donc l'isopropanol qui sera utilisé. De plus, lors de ces tests, il apparaît que l'OTS laisse des traces blanches sur les lamelles testées dès quelques minutes de traitement. Ce silane est donc très réactif et polymérise rapidement, ce qui risque de boucher le capillaire. La silanisation avec l'OTMS ou avec l'OTES (dilués à 1% dans l'isopropanol) sont donc comparées.

Ces deux molécules doivent être hydrolysées de façon à libérer la fonction silane et permettre la réaction avec la surface du verre. Par conséquent, différents protocoles de silanisation sont testés, en faisant varier le temps d'hydrolyse et le temps de silanisation pour chacune des deux molécules. Des lamelles en verres sont traitées puis l'angle de contact entre la lamelle et une goutte d'eau déposée sur sa surface est mesuré. Les temps d'hydrolyse testés sont de 90min, 180min et 360min. Pour chaque temps d'hydrolyse, trois temps de silanisation sont testés : 15min, 30min et 60min. Dans chacun des cas, les lamelles sont chauffées à 120°C après le traitement, pour stabiliser la couche de silane. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 129.

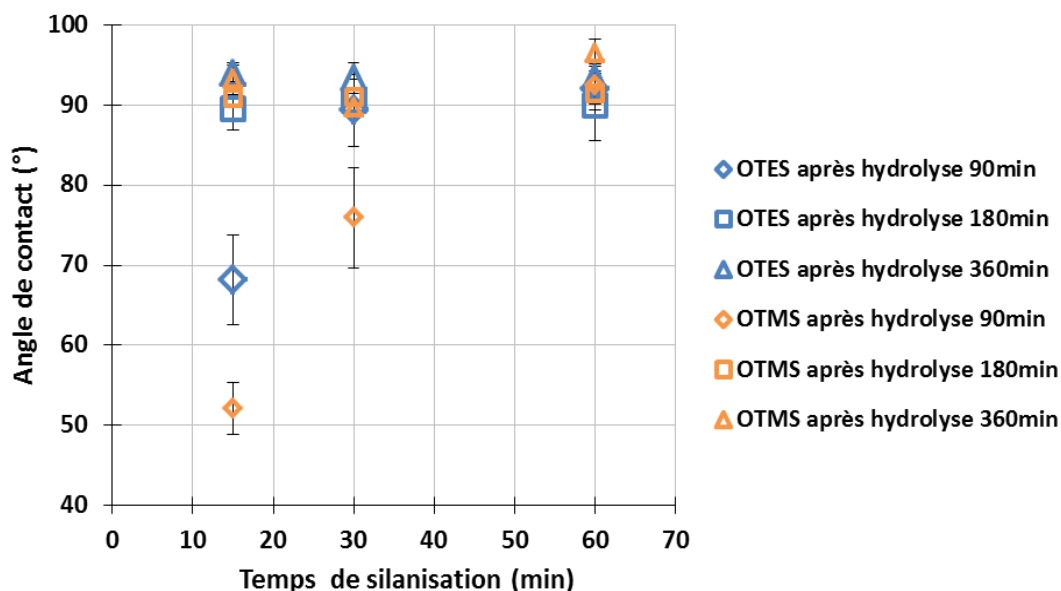


Figure 129 : Angles de contact mesurés entre la surface de verre silanisée et une goutte d'eau déposée en fonction du temps de silanisation pour les deux silanes étudiés. Les symboles losanges, carrés et triangles correspondent respectivement à une hydrolyse pendant 90min, 180min et 360min. La silanisation à des temps différents est représentée par la couleur bleue pour l'OTES et orange pour l'OTMS. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types calculés sur 10 mesures d'angle de contact, pour chaque traitement.

Dans un premier temps, on peut voir que 90min d'hydrolyse (symboles losanges sur la Figure 129) ne sont pas suffisantes avec l'OTES ou avec l'OTMS, bien que l'OTES semble plus réactif que l'OTMS. Même suivi d'un temps de silanisation de 60min, l'angle de contact atteint tout juste 90°. Ces résultats suggèrent que d'hydrolyse n'est pas totale, réduisant la réactivité des silanes. Un long temps de silanisation permet cependant de compenser la faible réactivité avec la surface, peut-être par un dépôt physique des silanes, ou par la prolongation de l'hydrolyse. Puis, à partir de 120min d'hydrolyse (symboles carrés sur la Figure 129), quel que soit le silane et le temps de silanisation, l'angle de contact est autour de 90°, correspondant à une surface qui commence à être hydrophobe. La silanisation n'est donc pas complète. Enfin une hydrolyse de 180min (symboles triangles sur la Figure 129) permet aux deux silanes de réagir avec la surface, dès 15min de silanisation, puisque tous les angles de contact sont supérieurs à 90°. Ainsi une hydrolyse pendant 180min suivie d'une silanisation pendant 15min sont donc suffisantes pour obtenir une surface hydrophobe. L'OTES étant plus réactif plus rapidement, c'est ce silane qui a été sélectionné pour traiter la surface d'un capillaire.

### 3.1.1.2. Silanisation en microfluidique

La méthode utilisée pour rendre hydrophobe la surface d'une lamelle en verre est ensuite adaptée au traitement d'un capillaire en verre en microfluidique. Pour cela, le capillaire en verre est tout d'abord soigneusement lavé en injectant avec une seringue l'acétone à 1500 $\mu$ L/h pendant 1h, puis l'isopropanol à 1500 $\mu$ L/h pendant 1h. Notons que le nettoyage aux ultrasons est difficile à réaliser sur un capillaire en verre, long, fin et fragile. Il est ensuite passé dans le four à plasma d'oxygène pendant 400s. Puis une solution

d'OTES à 1%, solubilisé dans l'isopropanol, est injectée dans le capillaire à un débit de 200 $\mu$ L/h pendant environ 1h. Le capillaire est ensuite rincé à l'isopropanol, puis chauffé 1h à 120°C. Enfin, des gouttes d'eau colorée sont générées directement dans le capillaire en verre modifié. Les gouttes obtenues sont présentées dans la Figure 130 : elles sont stables et régulières en taille et en fréquence, ce qui montre que la surface du capillaire est bien hydrophobe.

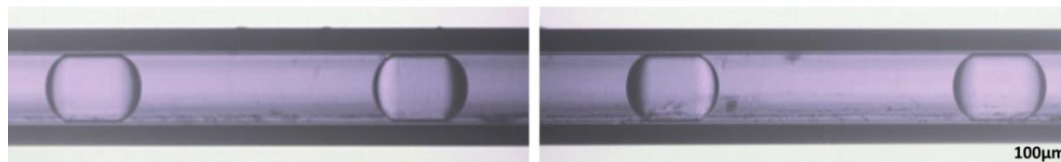


Figure 130 : Gouttes d'eau colorée obtenues dans un capillaire en verre, silanisé avec l'OTES. L'huile utilisée est le FC-70.

Des gouttes de lysozyme et NaCl sont ensuite générées dans un second capillaire traité à l'OTES afin d'observer la formation des cristaux (Figure 131).

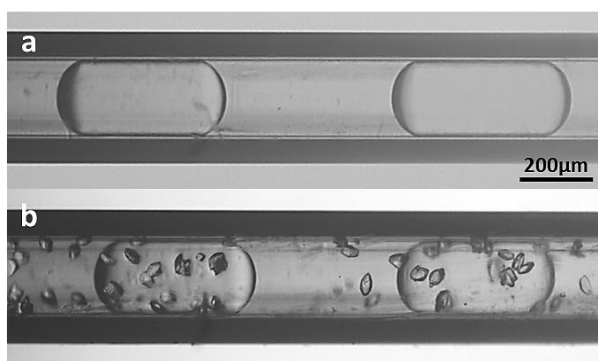


Figure 131 : Gouttes de lysozyme (30g/L) et NaCl (1M) générées dans un capillaire en verre, silanisé avec l'OTES. (a) Avant cristallisation, (b) après cristallisation (1 nuit à 5°C, 80mM d'acétate de sodium, pH 4,5).

Les gouttes obtenues sont régulières en taille et en fréquence (Figure 131a). Après une nuit à 5°C, les gouttes sont toujours stables dans le capillaire. Cependant, les cristaux de lysozyme obtenus ne sont pas à l'intérieur des gouttes, mais ils sont répartis tout le long du capillaire (Figure 131b). Les cristaux semblent avoir nucléé sur le capillaire, comme si la protéine était adsorbée à sa surface. Il semble donc que la chaîne carbonée du silane interagisse avec la protéine et la fixe. De plus, les gouttes ont probablement bougé dans le capillaire après leur génération, car elles ont été formées à température ambiante et incubées à 5°C (§ 1.3.3).

Il est donc nécessaire de chercher un autre silane, dont la chaîne hydrophobe serait fluorée afin de réduire les interactions avec les protéines, et de se rapprocher de la surface des capillaires en téflon utilisés précédemment pour former des gouttes.

### 3.1.1.3. Silanisation fluorée – Aquapel®

L'Aquapel® est un silane fluoré qui peut être utilisé pour augmenter l'hydrophobicité des circuits microfluidiques (Mazutis et al., 2009). Ce produit est tout d'abord testé sur des lamelles en verre afin de pouvoir mesurer l'angle de contact entre la lamelle et une goutte d'eau déposée à sa surface. Comme précédemment, les lamelles sont soigneusement lavées, puis plongées 2min dans le produit. Différentes méthodes pour ôter l'excès de produit sont testées : pas de rinçage, rinçage à l'isopropanol, ou seulement séchage de la lamelle avec de l'air comprimé. Les lamelles sont toutes chauffées 30min à 200°C afin d'activer la réaction. Les angles de contact mesurés dans chacun des cas sont présentés dans la Figure 132. Quel que soit le protocole de rinçage, les lamelles traitées à l'Aquapel® sont toutes très hydrophobes, avec un angle de contact supérieur à 100°, et la surface semble assez homogène (les écarts types des mesures d'angle de contact sont faibles).

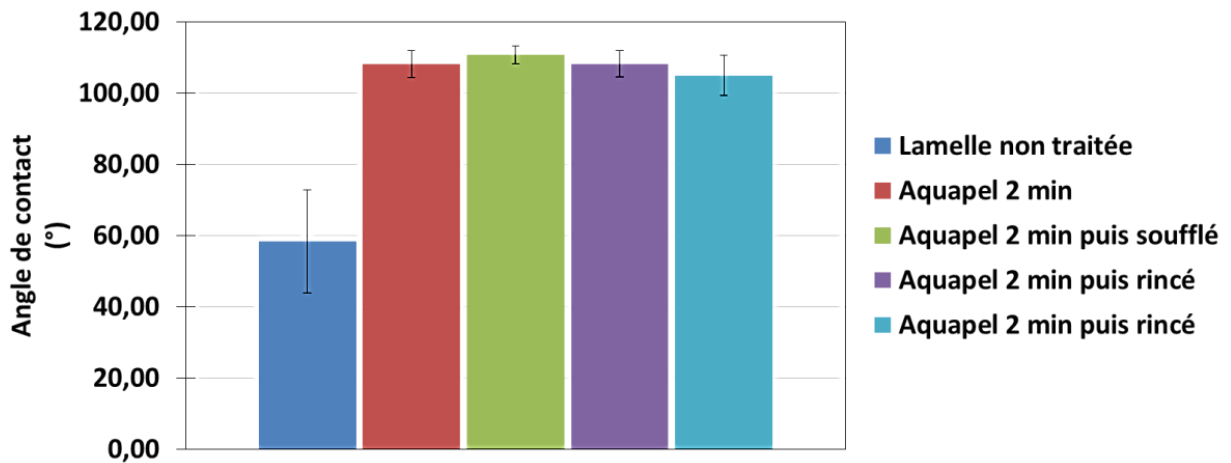


Figure 132 : Angles de contact mesurés entre la surface de verre traitée avec l'Aquapel® et une goutte d'eau déposée. De gauche à droite : lamelle non traitée (bleu foncé), lamelle plongée 2min dans l'Aquapel® (rouge), lamelle plongé 2min dans l'Aquapel® puis séchée avec de l'air comprimé (vert), deux lamelles plongées 2min dans l'Aquapel® puis rincées à l'isopropanol (violet et bleu clair). Les lamelles sont toutes chauffées 30min à 200°C avant la mesure.

Au vu de ces résultats, un capillaire en verre est traité à l'Aquapel® en l'injectant avec le système microfluidique à un débit de 200µL/h pendant 5min, suivi d'un temps de pause de 5min, l'ensemble étant renouvelé 9 fois (soit pendant 1h30min). Après traitement, le capillaire est chauffé 1h à 200°C, puis des gouttes d'eau colorée sont générées à l'intérieur. Les gouttes obtenues sont présentées dans la Figure 133. Les gouttes sont stables dans le capillaire, ce qui montre l'hydrophobicité de ses parois. Les gouttes ne sont cependant pas toutes exactement de la même forme, ce qui implique que la surface n'est pas parfaitement homogène. Généralement, l'Aquapel® est utilisé dans des expériences de microfluidique dans lesquelles des tensioactifs sont présents. Ces derniers rendent alors les gouttes moins sensibles aux éventuelles hétérogénéités de surface. Pour les applications visées, le traitement est tout de même suffisant pour stocker des gouttes aqueuses dans de l'huile.

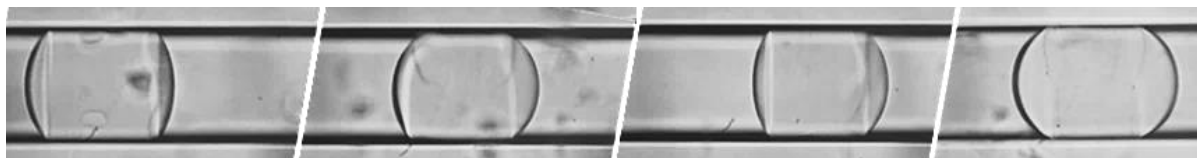


Figure 133 : Gouttes d'eau colorées générées à l'intérieur d'un capillaire en verre dont la surface a été traitée avec l'Aquapel®.

Des gouttes sursaturées de lysozyme et NaCl sont ensuite générées dans un second capillaire traité. Après une nuit à 5°C, des cristaux de lysozyme ont nucléé (Figure 134).

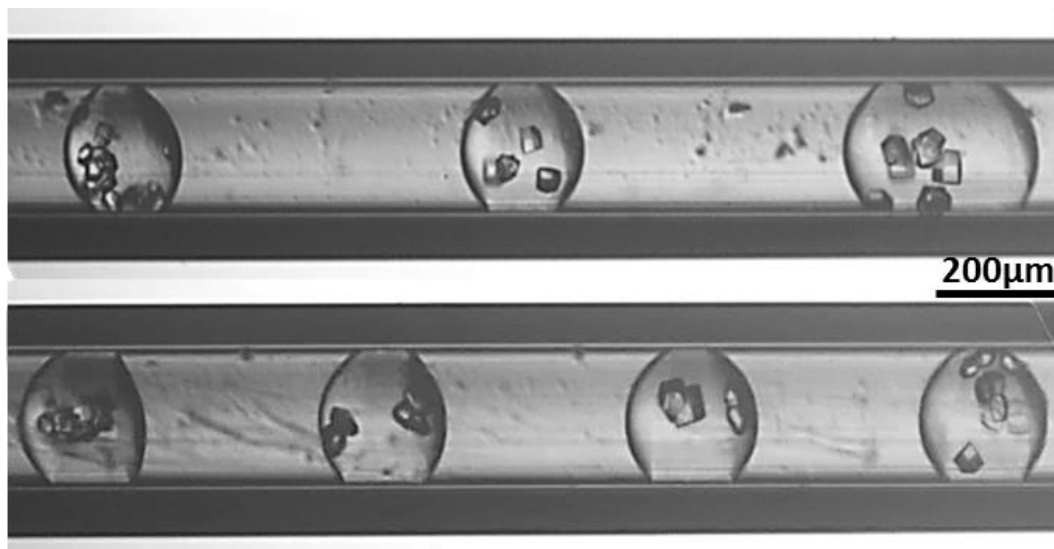


Figure 134 : Cristaux de lysozyme obtenus dans des capillaires en verre traités avec l'Aquapel®. Lysozyme 30mg/mL, NaCl 1M, acétate de sodium 80mM, pH 4,5, une nuit à 5°C.

Les cristaux de lysozyme ont bien nucléé à l'intérieur des gouttes, et ne sont plus adsorbés sur la paroi du capillaire. L'Aquapel® fluoré ne semble donc pas interagir avec la protéine. Le traitement est suffisant pour former des gouttes à l'intérieur d'un capillaire en verre et permettre de les conserver dans le but de réaliser de la DRX. Dans la suite de ce travail, les capillaires en verre seront donc traités avec l'Aquapel®, de façon à limiter les interactions entre la paroi du capillaire et les cristaux. De plus, le traitement à l'Aquapel® est plus rapide et plus simple à réaliser que le traitement à l'OTES, car il n'y a pas d'étape d'hydrolyse préliminaire au traitement du capillaire.

La génération de goutte directement dans un capillaire en verre peut cependant s'avérer compliquée. En effet, il faudrait silaniser un capillaire très long, ce qui pourrait augmenter les irrégularités de surface interne du capillaire. D'autre part, la forme irrégulière des gouttes pourrait perturber le mélange de différentes solutions au sein de la goutte et perturber la cristallisation. Il est donc préférable de ne pas utiliser ces capillaires pour la génération de gouttes ni pour la croissance des cristaux, mais seulement pour transférer quelques gouttes contenant des cristaux d'intérêt pour faire de la DRX.

### 3.1.2. Transfert des cristaux

Des gouttes de QR2 et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont générées dans un capillaire en FEP d'environ 60cm (soit environ 2500 gouttes), puis incubées à 20°C. Les gouttes et les cristaux de QR2 obtenus sont présentés dans la Figure 135.

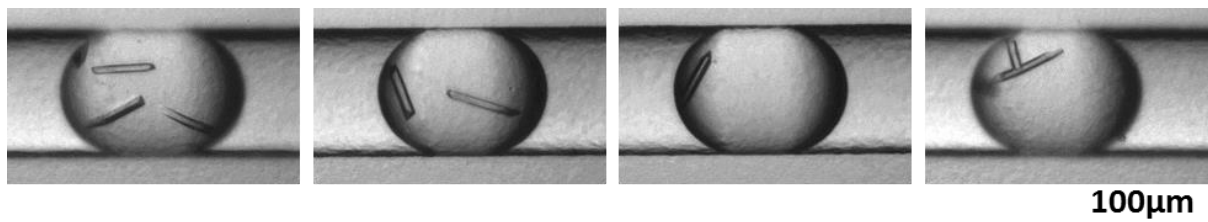


Figure 135 : Cristaux de QR2 dans un capillaire en FEP. Conditions de cristallisation : QR2 5,5mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,35M, 5h à 20°C, 150mM NaCl, 20mM Tris pH8.

Puis, une portion du capillaire d'une dizaine de centimètres contenant environ 400 gouttes est coupée. Les gouttes et les cristaux qu'elle contient sont transférés vers un capillaire en verre traité de même longueur. Une jonction linéaire permet le transfert des gouttes du capillaire en FEP vers celui en verre (Figure 48). Afin d'éviter le contact des cristaux avec l'air lors du transfert, la jonction et le capillaire en verre sont préalablement remplis d'huile FC-70 (Figure 136). La Figure 136 montre que les gouttes sont bien transférées sans subir de coalescence (les gouttes font la même taille). De plus, les cristaux à l'intérieur des gouttes sont également transférés et les gouttes sont stables dans le capillaire en verre. Cette méthode permet donc de sélectionner quelques gouttes d'intérêt avec des cristaux dans un capillaire en FEP, pour ensuite les transférer rapidement vers un capillaire en verre, transparent aux RX.



Figure 136 : Cristaux de QR2 transférés d'un capillaire en téflon vers un capillaire en verre traité avec l'Aquapel®. Conditions de cristallisation : QR2 5,5mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,35M, 20°C, 150mM NaCl, 20mM Tris pH8.

Toutefois, la connexion entre les deux capillaires est délicate, de par différentes situations à risque. Si le capillaire en FEP est serré dans la jonction linéaire, les cristaux risquent de se coincer à l'extrémité du capillaire et de le boucher. Si la jonction n'est pas assez serrée, les gouttes coalescent lors du transfert. Le remplissage de la jonction linéaire avec l'huile FC-70 permet cependant de réduire les risques de coalescence au cours du transfert.

### 3.1.3. DRX *in situ*

Pour réaliser la DRX *in situ*, le capillaire en verre contenant les cristaux est ensuite découpé en morceaux de 2 à 3cm afin d'être monté sur un porte-échantillon magnétique, généralement appelé *cap* ou *pin* (Figure 137). Le capillaire est alors prêt à être monté sur un goniomètre magnétique sur une ligne de lumière synchrotron.

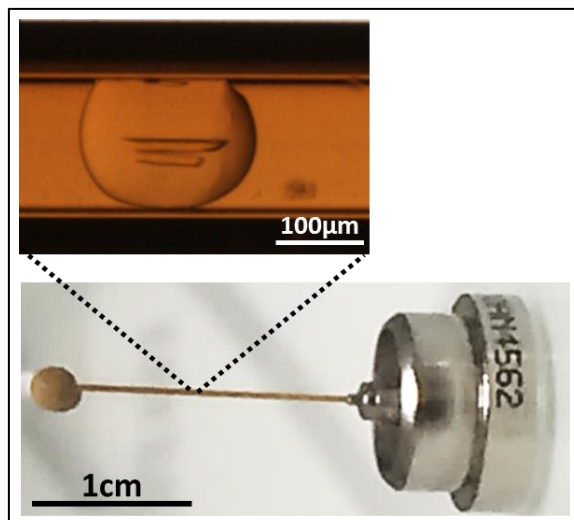


Figure 137 : Montage d'un capillaire en verre (d'environ 2cm) contenant des gouttes avec des cristaux de QR2 sur le porte-échantillon aimanté.

Puis, l'un des cristaux de QR2 est centré sur le faisceau de rayons X (Figure 138).

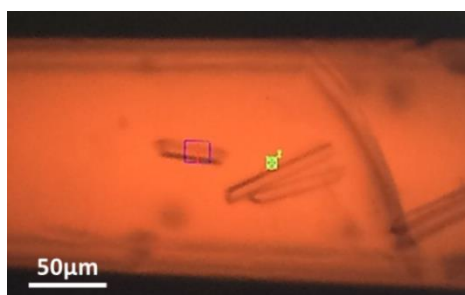


Figure 138 : Centrage d'un cristal de QR2 de 40x10µm sur le faisceau de rayons X. Le carré bleu représente la taille du faisceau.

Un cliché de diffraction *in situ* du cristal de QR2 est alors réalisé à température ambiante (Figure 139). La résolution de ce premier cliché de diffraction est de 2,7 Å. Un anneau de diffusion est visible entre 5,6 Å et 3,8 Å, lié à la présence du verre, du film de polyimide et de la solution autour du cristal. Ce bruit de fond ne masque cependant pas les données de diffraction. Pour la collecte des données, le faisceau est atténué à 80%, ce qui correspond à ce qui est couramment utilisé pour la DRX *ex situ*. Le capillaire en verre semble donc une bonne alternative par rapport FEP pour faire de la DRX *in situ*. Ces données permettent de déterminer le groupe d'espace, ici un  $P2_12_12_1$ , ainsi que les paramètres de maille :  $a = 57,33 \text{ \AA}$  ;  $b = 83,03 \text{ \AA}$  ;  $c = 106,87 \text{ \AA}$ . Lorsque la DRX est effectuée en conditions cryogéniques, le même groupe d'espace est décrit pour les cristaux de QR2, et les paramètres de maille sont :  $a = 56,61 \text{ \AA}$  ;  $b = 83,16 \text{ \AA}$  ;  $c = 106,23 \text{ \AA}$  (Foster et al., 1999).



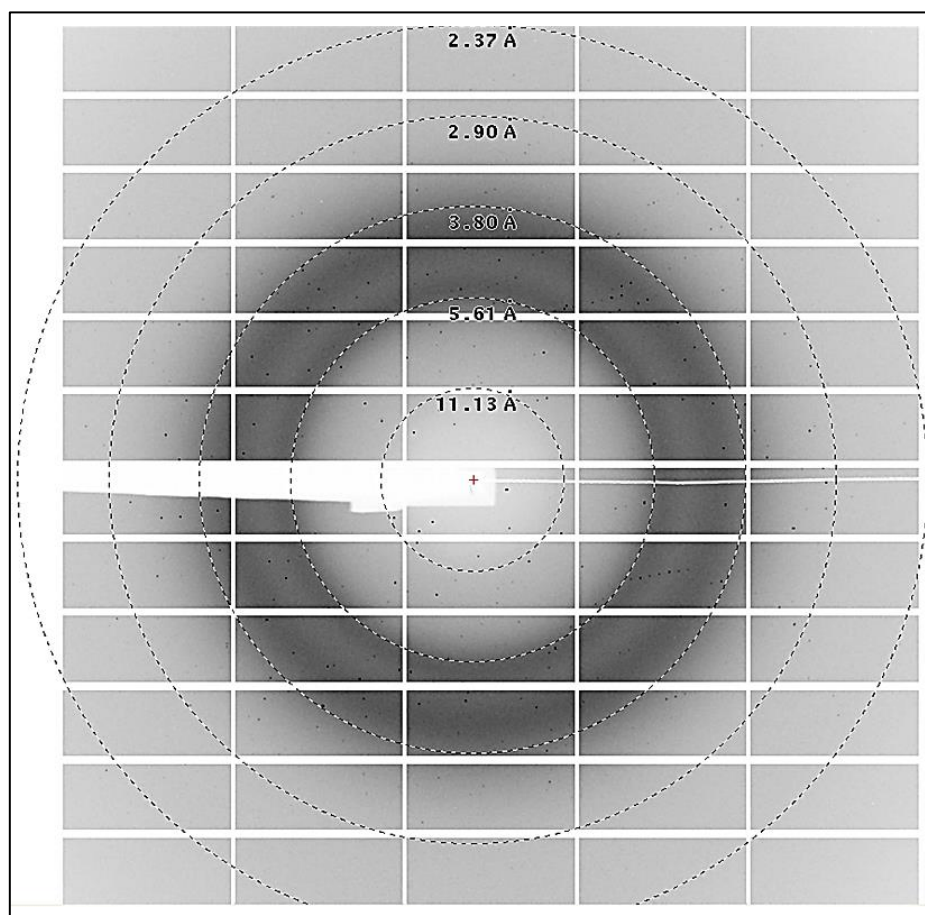


Figure 139 : Cliché de diffraction *in situ* à température ambiante d'un cristal de QR2 dans un capillaire en verre, avec une résolution de 2,7 Å. Les paramètres utilisés sont 1° d'oscillation, 0,1s d'exposition par image, 10 images. Le faisceau a été atténué à 80%. L'image a été prise sur la ligne PROXIMA 1 au synchrotron SOLEIL.

Cependant, les dégâts infligés au cristal par le rayonnement, dus à l'absence de cryogénéisation, pourraient limiter les possibilités d'application de la DRX *in situ*. En effet, le cristal est détérioré après une seconde d'exposition aux RX. Ainsi, la collecte d'un jeu complet de données nécessite d'utiliser successivement plusieurs cristaux de la même phase (Yadav et al., 2005), ce qui est théoriquement possible étant donné que le capillaire contient une quarantaine gouttes et donc beaucoup de cristaux. Cependant, de nombreux cristaux sont mobiles à l'intérieur des gouttes (Figure 140). Il est alors impossible de les centrer sur le faisceau de RX pour obtenir un cliché de diffraction.

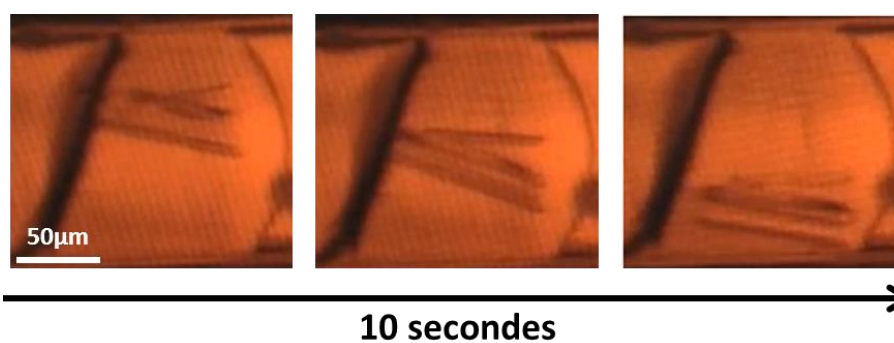


Figure 140 : Séquence de 10 secondes au cours de laquelle les cristaux de QR2 bougent à l'intérieur du capillaire en verre.

### 3.1.4. Conclusion – DRX *in situ*

En conclusion, la DRX *in situ* dans un capillaire en verre est une approche prometteuse pour la caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique. En effet, ce type de capillaire ne génère que peu de bruit de fond pour des conditions *in situ* et la résolution du cliché de diffraction est de 2,7 Å. L'analyse des cristaux par DRX *in situ* a permis de déterminer le groupe d'espace du cristal (P 2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>), ainsi que les paramètres de mailles, proches de celles obtenues pour la DRX *ex situ* en conditions cryogéniques (Foster et al., 1999). La détérioration rapide des cristaux peut être palliée par l'utilisation de plusieurs cristaux pour obtenir un jeu complet de données. Cependant, la mobilité de certains cristaux à l'intérieur du capillaire complique l'acquisition des données et reste limitante. Toutefois, les cristaux seraient probablement moins mobiles dans une solution plus visqueuse, contenant par exemple du PEG (polyéthylène glycol), du glycérol...

La cryogénéisation d'un capillaire entier pourrait également être une solution, à la fois pour empêcher les cristaux de bouger dans le capillaire et pour ralentir leur dégradation. Cela nécessiterait cependant l'ajout d'un cryo-protectant dans la goutte. Dans ce cas, 30% de glycérol sont nécessaires pour vitrifier la solution autour du cristal (Warkentin et al., 2008).

Enfin, Maeki et al. ont montré qu'il est possible de fixer le cristal à l'interface entre la goutte et la phase continue, de façon suffisamment forte pour réaliser la DRX *in situ* dans un capillaire sans mouvement du cristal. Les auteurs attribuent cette fixation à la forte énergie interfaciale entre la goutte et la phase continue. Ils ont ainsi pu obtenir des données de diffraction suffisantes pour déterminer les facteurs de structure de cristaux de deux protéines, le lysozyme et la thaumatine, bien que le cristal se détériore trop rapidement pour obtenir un jeu complet de données (Maeki et al., 2012). Notons cependant que dans leur expérience, l'interface entre les gouttes et l'huile fluorée est stabilisée par la présence d'un tensioactif, ce qui pourrait favoriser la fixation du cristal.

### 3.2. DRX *ex situ* sur une MicroMesh™

La seconde méthode pour caractériser par DRX les cristaux obtenus en microfluidique consiste à extraire un cristal choisi du capillaire en polymère fluoré (FEP ou PFA). Si de nombreuses puces microfluidiques prévoient une ouverture pour accéder aux cristaux, dans le cas des capillaires, leur ouverture est impossible. Les gouttes et les cristaux doivent donc être sortis par l'extrémité du tube. L'objectif est de les déposer ensuite sur une grille en polyimide transparente aux RX, appelée MicroMesh™ (MiTeGen, Figure 141).

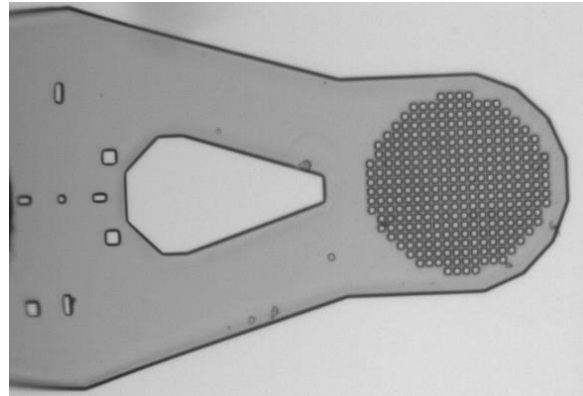


Figure 141 : Photographie d'une MicroMesh™. Le diamètre de la grille est de 400µm, et chaque ouverture mesure 10µm de côté.

#### 3.2.1. Dépôt d'un cristal choisi

Comme vu précédemment, il existe deux types de capillaires de 150µm ID qui présentent des diamètres externes différents, 1,59mm ou 360µm (Figure 142).

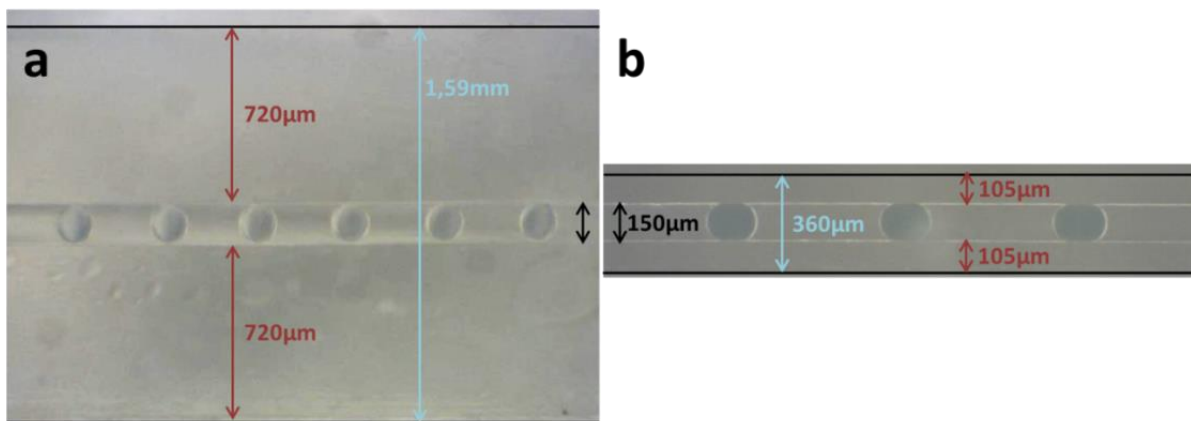


Figure 142 : Photographies des capillaires utilisés. (a) FEP, ID 150µm, OD 1,59mm et (b) PFA, ID 150µm, OD 360µm.

Il est plus facile de générer des gouttes dans le capillaire le plus épais (Figure 142a), mais le plus fin (Figure 142b) est plus transparent, et sa flexibilité facilite la manipulation des gouttes après cristallisation de la protéine.

### 3.2.1.1. Capillaires de 360 $\mu$ m OD

Dans un premier temps, pour faciliter l'étape de dépôt des cristaux, des capillaires de 360 $\mu$ m OD sont utilisés. Des gouttes de lysozyme sont donc générées dans ce capillaire à l'aide d'une jonction en croix. Les cristaux obtenus sont présentés dans la Figure 143.

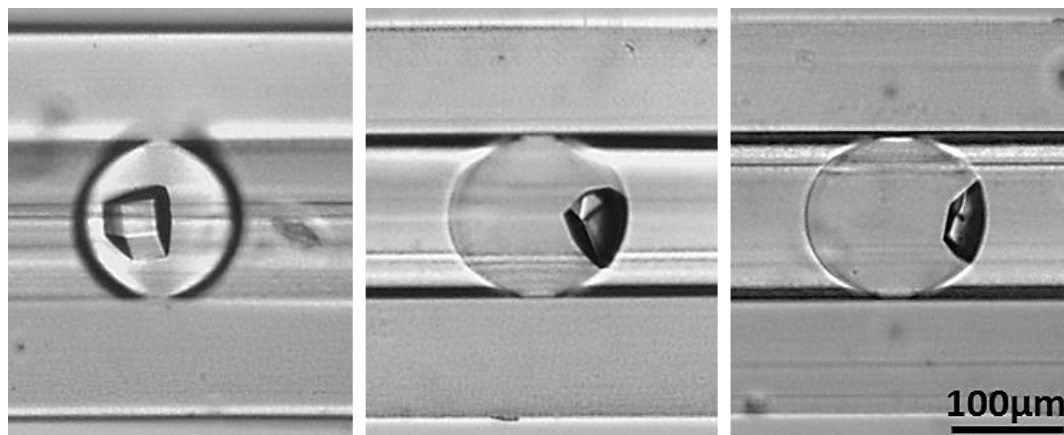


Figure 143 : Cristaux de lysozyme dans un capillaire de 360 $\mu$ m OD et 150 $\mu$ m ID. NaCl 1M, lysozyme 30mg/mL, acétate de sodium 80mM, pH 4,5, 15°C.

Le cristal doit ensuite être déposé sur une grille MicroMesh™ (Figure 141). Pour cela, le capillaire contenant le cristal est connecté à un générateur de pression haute précision permettant de contrôler précisément le débit (OB1 MKII, Elveflow). L'autre extrémité du capillaire et la MicroMesh™ sont fixés chacun à un micro-déplaceur (piézo-électrique, MS30 Mechnics) permettant un déplacement de 18mm en X, Y et Z avec un pas de 16nm dans les trois directions. L'endroit où chaque goutte sera déposée est ainsi contrôlé très précisément (Grossier et al., 2011a). Le tout est placé au-dessus d'un microscope optique (Axio Observer D1, Zeiss) associé à une caméra (DMK 33GP1300, ImagingSource). Le montage est représenté dans la Figure 144. Pour que l'huile FC-70 qui entoure les gouttes ne perturbe pas la sortie des gouttes et pour éviter que les gouttes ne sèchent, l'extrémité du capillaire est plongée dans un bain de FC-70. De plus, la lamelle de verre au fond du bain de FC-70 est traitée dans un four à plasma d'oxygène pour la rendre très hydrophile. L'eau étant moins dense que l'huile, la forte affinité des gouttes d'eau avec la lamelle évite que les gouttes non sélectionnées ne remontent à la surface du bain de FC-70.

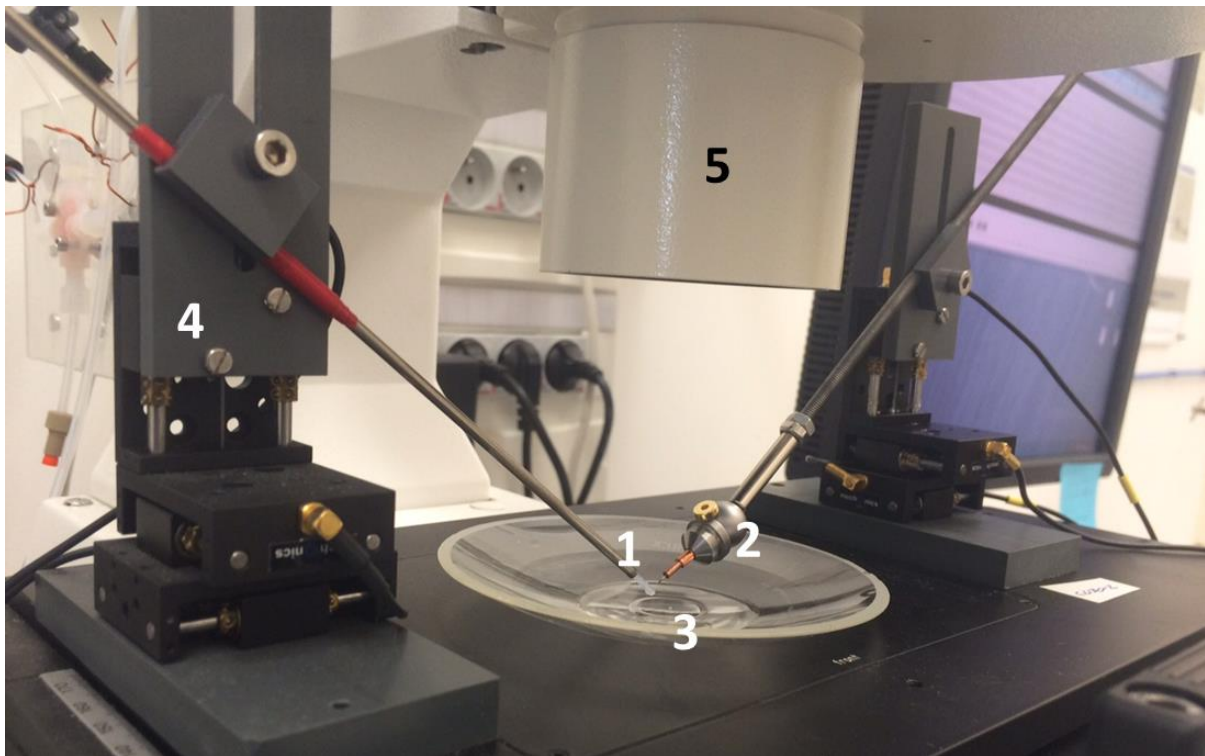


Figure 144 : Montage utilisé pour déposer les cristaux obtenus dans des capillaires en microfluidique. (1) Capillaire contenant les cristaux, (2) MicroMesh™, (3) Bain de FC-70, (4) Micro-déplaceur en x, y, z, (5) Microscope optique.

De l'air est alors injecté dans le capillaire, à pression contrôlée, de façon à pousser lentement les gouttes vers l'extrémité du capillaire. Le capillaire étant fin, il est possible de le poser contre la lamelle en verre au fond du bain d'huile. Les gouttes que l'on ne souhaite pas conserver peuvent ainsi être déposées une à une, sans coalescer à la sortie du capillaire (Figure 145).

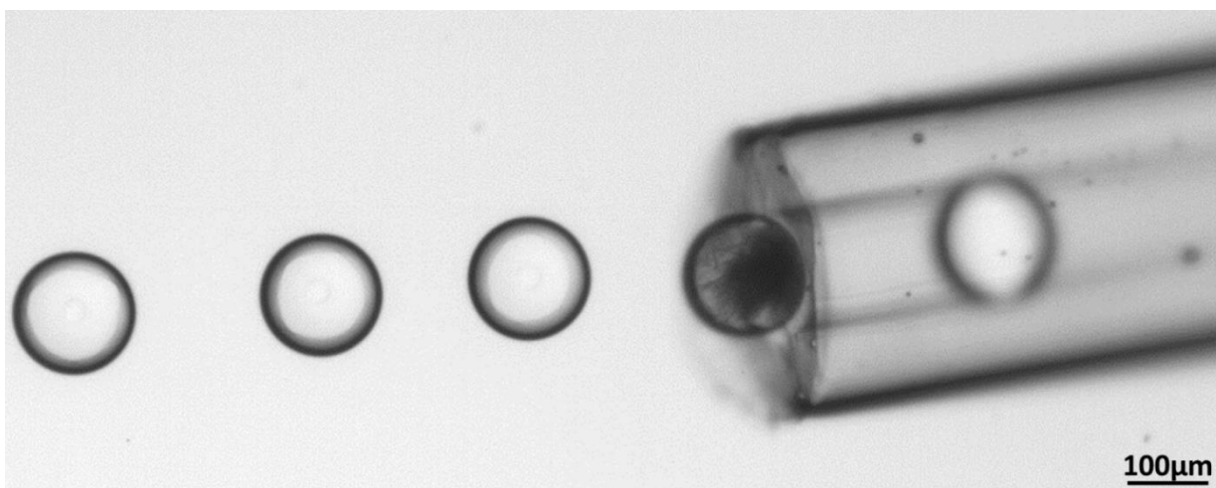


Figure 145 : Photographie de la sortie des gouttes du capillaire (PFA, OD 360µm, ID 150µm) une par une au fond d'un bain d'huile FC-70.

Une fois que la goutte d'intérêt se trouve à l'extrémité du capillaire, celui-ci est placé au-dessus de la MicroMesh™ (Figure 146).

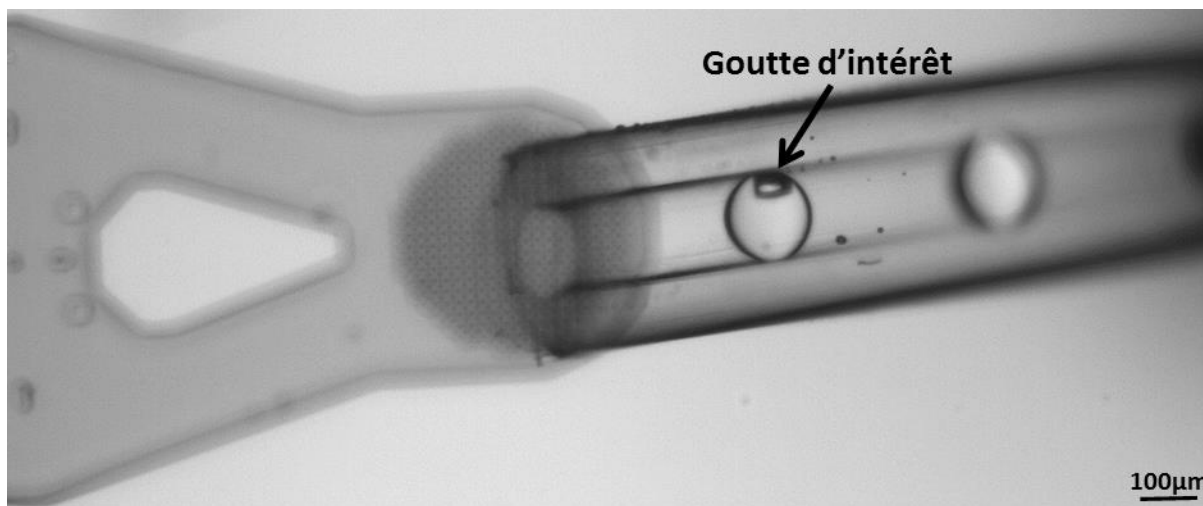


Figure 146 : Photographie du capillaire contenant une goutte avec un monocristal de lysozyme, placé juste au-dessus de la MicroMesh™, dans un bain d'huile FC-70.

La goutte contenant le cristal sur lequel on souhaite faire de la DRX est ensuite poussée, jusqu'à ce que le cristal soit déposé sur la grille de la MicroMesh™ (Figure 147). Notons que la goutte est éjectée lentement du capillaire et que la MicroMesh™ en Kapton est souple. Il s'agit donc d'une méthode de dépôt extrêmement douce, ce qui réduit les risques de chocs mécaniques infligés au cristal.

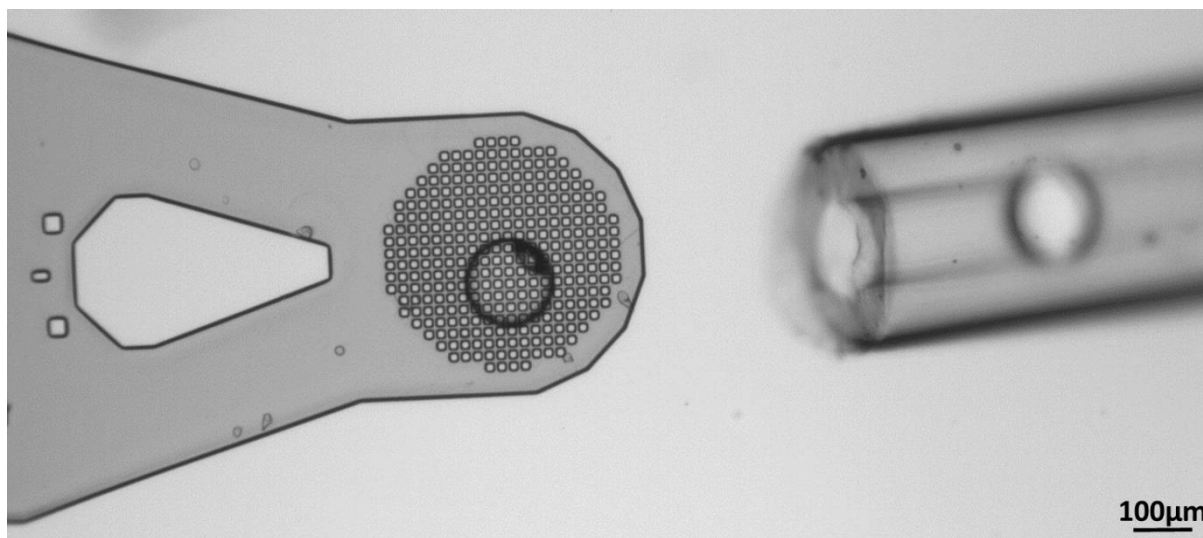


Figure 147 : Photographie de la goutte contenant le cristal de lysozyme déposé sur la grille de la MicroMesh™, dans un bain de FC-70.

Le tampon de cristallisation contenu dans la goutte remonte alors à la surface du bain de FC-70 et le cristal reste sur la grille de la MicroMesh™, entouré d'huile (Figure 148). Ainsi, la grille et le cristal peuvent être sortis du bain d'huile, cryogénisés et testés en DRX. Cette méthode permet de déposer en quelques minutes un cristal sur une MicroMesh™ à partir d'un capillaire de 150µm ID et 360µm OD. Très fin, ce capillaire est transparent et facile à manipuler avec les micro-déplaceurs. Cependant, comme décrit précédemment, la génération de gouttes à l'intérieur de ce type de capillaire est difficile, en raison de sa flexibilité et des risques de torsion et de bouchage.

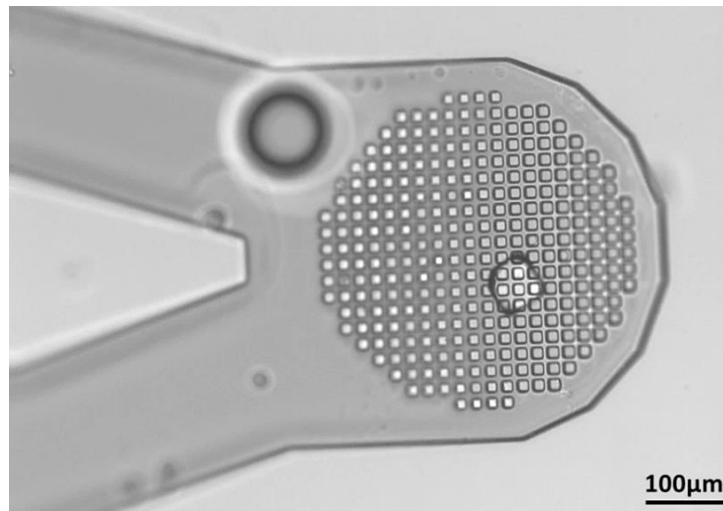


Figure 148 : Photographie d'un cristal de lysozyme (environ 40µm) déposé sur la grille de la MicroMesh™, dans un bain de FC-70.

### 3.2.1.2. Capillaires de 1,59mm OD

En microfluidique, des capillaires de 1,59mm OD (plus épais que ceux utilisés pour l'expérience précédente) et de 150µm ID (même diamètre interne que précédemment) sont généralement utilisés pour la cristallogénèse, c'est donc de ce type de capillaire que les cristaux doivent être extraits. Pour cela, des gouttes de QR2 et  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sont générées dans un capillaire à l'aide d'une jonction en croix. Nous avons dans un premier temps essayé d'extraire une goutte d'un capillaire assez long (environ 50cm). Cependant, la longueur du capillaire génère une résistance hydraulique importante (Équation 22) ce qui provoque des à-coups dans l'écoulement lorsque l'air est injecté dans le tube. Il est alors difficile de contrôler la vitesse des gouttes à l'intérieur du capillaire et de n'extraire qu'une seule goutte du capillaire.

Par conséquent, un morceau de capillaire de moins de 10cm contenant un cristal d'intérêt est sélectionné. Une fois la longueur du capillaire raccourcie, la vitesse des gouttes est plus facile à contrôler. La goutte d'intérêt peut être amenée au bord du capillaire pour être déposée selon la méthode décrite précédemment (§ 0). Cependant, la paroi du capillaire étant épaisse, la goutte a tendance à rester adsorbée sur le capillaire. Il faut légèrement déplacer la MicroMesh™ pour que la goutte et le cristal tombent. Afin de faciliter le décrochage de la goutte du capillaire vers la grille MicroMesh™, celle-ci est préalablement traitée dans un four à plasma d'oxygène pour la rendre hydrophile (B.3.3.1). Ainsi, la goutte a plus d'affinité pour la grille MicroMesh™ que pour le capillaire. Lors du dépôt, la goutte s'étale sur la grille de la MicroMesh™, puis se détache, et seul le cristal reste sur place (Figure 149). Il peut alors être sorti du bain d'huile, cryogénisé et testé en DRX.

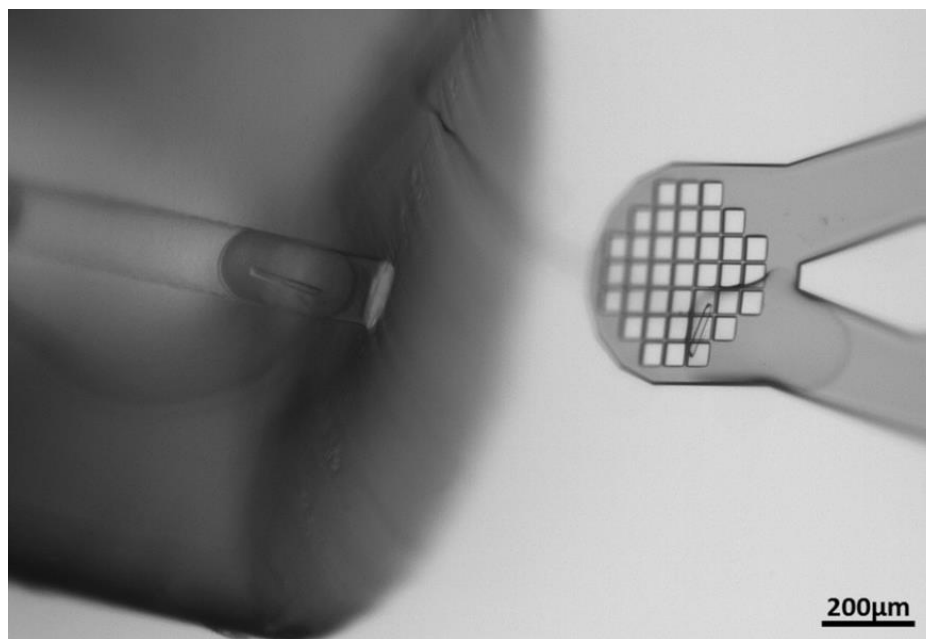


Figure 149 : Cristal de QR2 ayant nucléé dans un capillaire en FEP de 1,59mm OD et 150µm ID, déposé sur la grille de la MicroMesh™, dans un bain de FC-70. La goutte s'étale sur la grille, rendue hydrophile. Conditions de cristallisation : QR2 5mg/mL,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,35M, 150mM NaCl, 20mM Tris pH8, 20°C.

Cependant, il arrive que la goutte ne s'étale pas bien sur la grille. Dans ce cas, il est possible de tremper la MicroMesh™ dans une goutte de glycérol déposée au fond du bain d'huile. L'eau de la goutte quitte alors la grille de la MicroMesh™ pour se mélanger à la solution de glycérol. Comme précédemment, le cristal peut ensuite être sorti du bain d'huile, cryogénisé et testé en DRX.

### 3.2.2. DRX *ex situ*

Deux types de cristaux de QR2 sont déposés sur des MicroMesh™, l'un plongé dans le glycérol, et l'autre non. Après le dépôt, ceux-ci sont plongés dans l'azote liquide afin d'être cryogénisés et envoyés en DRX.

#### 3.2.2.1. Cristal trempé dans le glycérol

Un cristal de QR2 trempé dans le glycérol après son dépôt sur la grille d'une MicroMesh™ est centré sur le faisceau de RX en conditions cryogéniques (Figure 150).

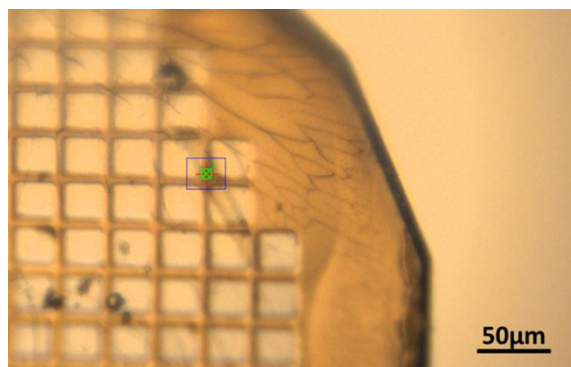


Figure 150 : Centrage d'un cristal de QR2 de 50x15µm trempé dans le glycérol et présenté sur le faisceau de rayons X. Le carré bleu représente la taille du faisceau.



Le cristal de QR2 est suffisamment gros pour pouvoir obtenir un jeu complet de données à chacune des extrémités du cristal. La résolution de ces deux jeux de données est similaire, 2,3 Å (Figure 151).

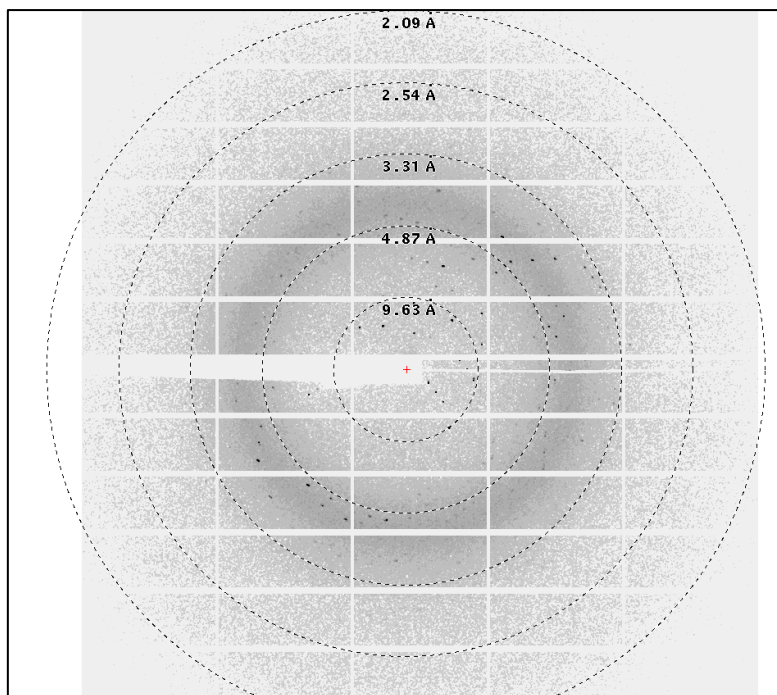


Figure 151 : Cliché de diffraction ex situ en conditions cryogéniques d'un cristal de QR2 plongé dans le glycérol et déposé sur la grille d'une MicroMesh™. La résolution est de 2,3 Å. Les paramètres utilisés sont 0,1° d'oscillation, 0,1s d'exposition par image. Le faisceau a été atténué à 85%. L'image a été prise sur la ligne PROXIMA 1 au synchrotron SOLEIL.

### 3.2.2.2. Cristal non trempé dans le glycérol

Un second cristal de QR2, qui n'a pas été trempé dans le glycérol après son dépôt sur la grille d'une MicroMesh™, est centré sur le faisceau de RX en conditions cryogéniques. Un jeu complet de données de diffraction est ainsi obtenu, dont l'un des clichés est présenté sur la Figure 152. Les paramètres utilisés sont 0,1° d'oscillation et 0,1s d'exposition par image. Le faisceau a été atténué à 80%. La DRX a été effectuée sur la ligne PROXIMA 1 au synchrotron SOLEIL. Des tâches plus intenses, correspondant à des cristaux de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , sont visibles sur le cliché de diffraction. Ces cristaux de sel n'étaient pas présents dans la goutte avant le dépôt. Ils pourraient avoir nucléé rapidement sur la MicroMesh™ lors du décrochage de la goutte. Ils ne sont cependant pas gênants pour la résolution de la structure de la protéine.

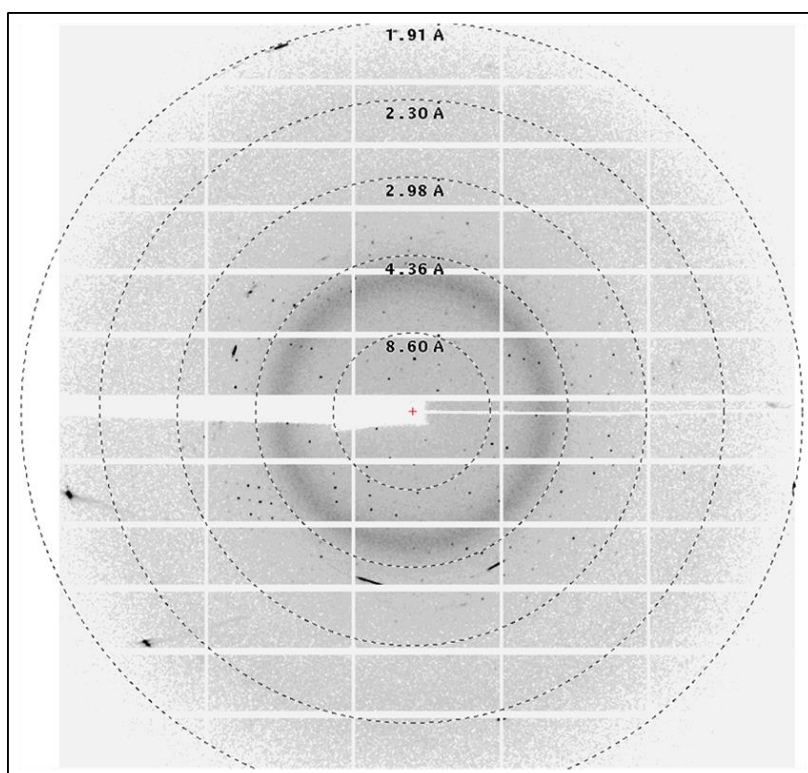


Figure 152 : Cliché de diffraction ex situ en conditions cryogéniques d'un cristal de QR2 déposé sur la grille d'une MicroMesh™. La résolution est de 2,3 Å. Les paramètres utilisés sont 0,1° d'oscillation, 0,1s d'exposition par image. Le faisceau a été atténué à 80%. L'image a été prise sur la ligne PROXIMA 1 au synchrotron SOLEIL.

Ces travaux portent sur la protéine QR2, dont la structure est déjà connue. Quand une protéine connue est cristallisée dans le même groupe d'espace, il est possible de faire un affinement par « corps rigide » (*rigid-body refinement*, REFMAC5), assez rapide, ce qui permet de replacer le squelette de la protéine dans la carte de densité électronique expérimentale (Murshudov et al., 2011). Cette méthode est également valable dans le cas de l'introduction d'un ligand, par trempage ou après co-cristallisation, car cela n'entraîne le plus souvent que de légers changements de conformation, de position ou d'orientation. La structure est ensuite affinée sous contrainte (*restrained refinement*, REFMAC5) (Murshudov et al., 2011). Les données statistiques de la structure sont présentées dans le Tableau 6. La carte de densité électronique obtenue est présentée dans la Figure 153.

<b>Groupe d'espace</b>	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Paramètres de maille</b>	a = 53,12 Å ; b = 81,51 Å ; c = 106,03 Å
<b>Résolution</b>	2.35 Å
<b>R<sub>factor</sub></b>	23.02
<b>R<sub>free</sub></b>	29.3
<b>I/σ</b>	1.92
<b>CC (1/2)</b>	66.5
<b>Complétude</b>	99.7%

Tableau 6 : Statistiques des données de cristallographie

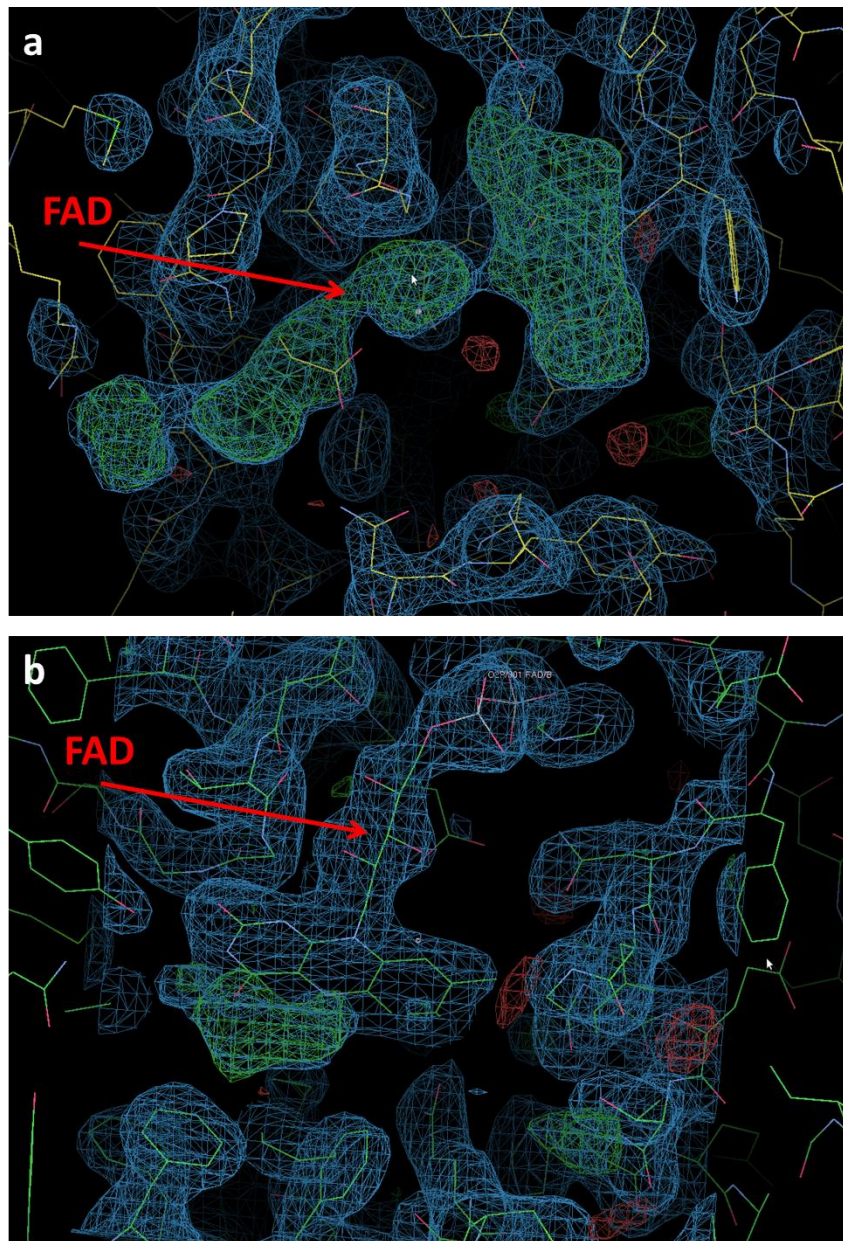


Figure 153 : Carte de densité électronique du site actif de la QR2. Les données ont été intégrées et mises à l'échelle dans le logiciel XDS (Kabsch, 2010). L'affinement de la structure de QR2 dans la carte a été effectué à l'aide du module REFMAC5 de la suite CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994 (Murshudov et al., 2011)). (a) La densité positive (en vert) correspond à la présence du FAD dans le site actif de la QR2. (b) Ajustement de la structure du FAD dans la carte de densité électronique. La figure a été obtenue avec COOT (Crystallographic Object-Oriented Toolkit), (Emsley and Cowtan, 2004).

La résolution du jeu de données est de 2,35 Å. Après ajustement du squelette de la QR2 dans la carte de densité électronique, une densité verte apparaît dans le site actif (Figure 153a). Il s'agit du cofacteur de la QR2, le FAD (Figure 153b). Le jeu de données de diffraction obtenu à partir du cristal de la QR2 extrait d'un capillaire en téflon et déposé sur une MicroMesh™ permet donc de remonter à la structure 3D de la protéine QR2. De plus, la densité correspondant au FAD est clairement visible sur la carte. Ces résultats indiquent qu'un éventuel ligand fixé dans le site actif serait probablement également visible dans le site actif, sur la carte de densité électronique.

### 3.3. Conclusion – Caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique par DRX

Cette partie, consacrée à la caractérisation des cristaux par diffraction des rayons X (DRX), a permis de constater la bonne qualité des cristaux obtenus avec la plateforme microfluidique à l'intérieur d'un capillaire en téflon de 150µm ID et dans une goutte de quelques nanolitres. Deux méthodes pour caractériser les cristaux ont été développées.

La première consiste à transférer les cristaux dans un capillaire en verre pour réaliser la DRX *in situ*. Le faible bruit de fond (lié au capillaire et à la goutte autour du cristal) et la bonne résolution des clichés de diffraction obtenus sont encourageants. Cependant, la mobilité des cristaux et leur dégradation rapide sous le faisceau de RX restent limitants pour la résolution d'une structure de protéine.

La seconde méthode repose sur l'extraction d'un ou plusieurs cristaux choisis, en dehors du capillaire en téflon. Les cristaux sont déposés un à un sur une MicroMesh™, puis cryogénisés. La DRX est alors effectuée *ex situ*, en conditions cryogéniques, ce qui ralentit la dégradation des cristaux sous le faisceau de RX. Cette méthode a permis d'obtenir la carte de densité électronique de la protéine QR2, avec une résolution de 2,3Å. La bonne qualité des cristaux permet d'observer le cofacteur de la protéine dans le site actif. De plus, plusieurs cristaux peuvent être déposés sur plusieurs MicroMesh™ à partir d'un seul capillaire, sans nécessiter un nouveau montage. Ainsi, des cristaux différents peuvent être produits dans un seul capillaire, soit pour comparer leur résolution en fonction des conditions de cristallisation, soit pour observer l'ancrage de ligands différents dans le site actif, puis chaque type de cristal peut être analysé en DRX. Ainsi, si un criblage des ligands d'une protéine-cible est réalisé avec la méthode décrite dans le § 2.2, on s'attend à ce que les co-cristaux obtenus soient de résolution suffisante pour une étude des interactions entre ce ligand et la protéine.



# **Conclusion générale et perspectives**



L'objectif au cours de ce travail de thèse était de développer une plateforme microfluidique polyvalente afin de répondre aux différentes problématiques de la cristallisation des protéines : criblage et optimisation des conditions de cristallisation, co-cristallisation d'une protéine d'intérêt pharmaceutique et de ligands pour le *Structure-Based Drug Design* et résolution de la structure des cristaux obtenus par diffraction des rayons X (DRX). De plus, la plateforme microfluidique devait être facile à utiliser et à implanter dans un laboratoire de recherche industriel, et donc tendre vers l'automatisation et le criblage à haut débit. Cette plateforme a été utilisée pour la cristallisation d'une protéine d'intérêt pharmaceutique, la quinone réductase de type 2 (QR2). Les cristaux obtenus à l'aide de cette plateforme microfluidique ont ensuite été caractérisés *in situ* et *ex situ* par DRX.

Le premier chapitre de ce manuscrit a été consacré à la description de la plateforme microfluidique développée au cours de cette thèse. Dans un premier temps, les volumes impliqués dans les expériences de cristallisation ont été réduits, notamment par rapport aux robots utilisés en cristallisation des protéines. Pour cela, des capillaires de 150 $\mu$ m de diamètre interne ont été utilisés, permettant la génération de gouttes d'environ 2nL. La réduction du volume des cristallisoirs à quelques nanolitres a permis de diminuer significativement les quantités de matière nécessaires aux étapes de criblage et d'optimisation des conditions de cristallisation.

Les robots de cristallisation, largement utilisés en cristallogénèse, sont généralement développés pour cribler un grand nombre de conditions de cristallisation différentes, mais la reproductibilité des expériences n'est que rarement étudiée. Or, la nucléation étant un phénomène stochastique, il est important de reproduire plusieurs fois chaque condition de cristallisation jusqu'à obtenir une statistique suffisante. La réduction des volumes à quelques nanolitres, apportée par les expériences de cristallisation en microfluidique, permet de reproduire chaque condition de nombreuses fois et ainsi d'identifier des conditions de cristallisation robustes, sans consommer de grandes quantités de matière première.

De plus, la réduction de la taille des cristallisoirs à quelques nanolitres permet de favoriser la croissance de peu de cristaux, par rapport à la nucléation d'un grand nombre de petits cristaux. Enfin, la localisation des gouttes permet un meilleur suivi de la cristallisation au cours du temps en facilitant l'observation.

D'autre part, une méthode de caractérisation en ligne de ces gouttes par spectrométrie UV a également été développée. Cette technique permet de surveiller la génération de gouttes régulières. De plus, elle facilite l'identification de la meilleure condition de cristallisation lors de la génération de gouttes de compositions différentes.

Une large gamme de sursaturations a ensuite été balayée par la génération d'un gradient de composition chimique, permettant d'optimiser rapidement les conditions de cristallisation. Cette méthode a été appliquée à la cristallisation de deux protéines, tout d'abord une protéine modèle, le lysozyme, puis une protéine d'intérêt pharmaceutique, la QR2.



Dans le second chapitre, le montage en série de plusieurs jonctions microfluidiques permettant l'ajout de solutions différentes à l'intérieur des gouttes a été décrit. Pour cela, un capillaire a été rempli avec plusieurs solutions différentes, séparées les unes des autres par de l'huile. Ces solutions ont ensuite été ajoutées dans des gouttes différentes, après leur génération, à l'aide d'une jonction en T. Les gouttes dans lesquelles la solution a été ajoutée sont régulières en taille. D'autre part, dans le cas d'ajout de solutions non colorées, le changement de fréquence des gouttes liée à l'ajout d'huile facilite l'identification des différents paliers dans le capillaire de sortie. Le montage a été validé dans le cas de solutions très visqueuses et du mélange de solutions aqueuses et de solvants organiques. Cette méthode peut ainsi être appliquée au criblage de différents ligands de la protéine QR2 pour la co-cristallisation et le *drug design*, mais également au criblage d'un grand nombre de conditions de cristallisation différentes, via l'ajout d'agents de cristallisation différents.

La troisième partie a été dédiée à la caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique par DRX. Deux approches ont été envisagées.

La première consiste à analyser les cristaux *in situ* à température ambiante, dans la goutte, dans un capillaire en verre. Pour cela, le capillaire en verre a tout d'abord été traité afin que sa surface interne soit hydrophobe. Afin d'éviter les interactions entre la surface du capillaire et la protéine, un protocole utilisant un silane fluoré, l'Aquapel®, a été décrit. Il est ainsi possible de transférer dans ce capillaire traité des gouttes contenant des cristaux ayant déjà nucléé dans un capillaire en téflon. Ces cristaux ont ensuite été montés sur une ligne de lumière synchrotron afin de réaliser la DRX. Le faible bruit de fond (lié au capillaire et à la goutte autour du cristal) et la bonne résolution des clichés de diffraction obtenus sont encourageants. Cependant, la mobilité des cristaux et leur dégradation rapide sous le faisceau de rayons X restent limitants pour la résolution d'une structure de protéine.

La seconde méthode consiste à extraire un cristal choisi, du capillaire en téflon. A l'aide de micro-déplaceur et d'un générateur de pression extrêmement précis, il est possible d'extraire les gouttes du capillaire une à une, tout en évitant leur coalescence. Un cristal choisi peut ensuite être déposé sur une grille en polyimide, compatible avec la DRX. Après cryogénéisation, ce cristal est monté sur une ligne de lumière synchrotron. La résolution des jeux de données obtenus est de 2,3Å, soit une résolution suffisante pour résoudre une structure de protéine ou observer les interactions entre une protéine et son ligand. La carte de densité électronique de la protéine QR2 a ainsi été obtenue. De plus, la bonne qualité des cristaux a permis d'observer le cofacteur de la protéine dans le site actif, ce qui suggère qu'un éventuel ligand fixé dans le site actif serait également visible.

La plateforme microfluidique décrite ici est donc un outil polyvalent pour l'étude de la cristallisation des protéines. Elle est composée de plusieurs éléments indépendants, ce qui la rend flexible et modulable en fonction des applications visées. Facile à utiliser, elle est de plus adaptée aux contraintes industrielles, permettant de réaliser rapidement un grand nombre d'expériences de cristallisation tout en utilisant le moins de produit possible. Enfin, les cristaux obtenus dans ce système microfluidique sont de qualité suffisante pour une résolution de structure par DRX.

La plateforme est opérationnelle, mais doit encore être transférée dans un laboratoire industriel pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la technique.

De plus, certains aspects de la plateforme peuvent encore être améliorés. Pour la partie criblage des conditions de cristallisation, nous pourrions envisager de monter en série plusieurs jonctions en té, afin d'ajouter successivement plusieurs solutions dans les gouttes, voire d'automatiser la plateforme pour une utilisation industrielle. La plateforme microfluidique pourrait alors être appliquée au criblage et à l'optimisation des conditions de cristallisation d'une protéine-cible.

En ce qui concerne le criblage des ligands d'une protéine-cible pour le *drug design*, la méthode développée doit encore être appliquée à un criblage. Il faudrait de plus obtenir des co-cristaux et faire de la DRX afin d'étudier les interactions entre la protéine et le ligand.

Concernant la DRX *in situ* dans un capillaire en verre traité, l'ajout d'un élément visqueux dans le milieu de cristallisation, comme un polymère (le polyéthylène glycol par exemple), pourrait réduire la mobilité des cristaux dans les gouttes. Il serait ainsi possible de faire de la DRX successivement sur plusieurs cristaux afin d'obtenir un jeu complet de données. D'autre part, en ajoutant un cryo-protectant dans les gouttes (comme du glycérol), il est possible d'envisager de congeler directement le capillaire contenant de nombreuses gouttes pour faire de la DRX *in situ* en conditions cryogéniques.

La plateforme microfluidique doit tendre vers une utilisation industrielle à haut débit, afin d'utiliser la co-cristallisation entre protéines cibles et ligands comme méthode de sélection de nouveaux candidats-médicaments. Pour cela, le remplissage d'un capillaire avec de nombreux ligands différents pourrait être automatisé, à l'aide de vannes de sélection par exemple. Après cristallisation, l'objectif est la *serial crystallography*, c'est-à-dire la DRX à la chaîne sur des centaines voire des milliers de cristaux. La DRX *in situ*, à température ambiante ou en conditions cryogéniques, permettrait d'éviter totalement les manipulations des cristaux et d'accélérer, voire d'automatiser, l'étape d'obtention des clichés de diffraction.



# Références bibliographiques



- ABATE, A. R. & WEITZ, D. A. 2011. Syringe-vacuum microfluidics: A portable technique to create monodisperse emulsions. *Biomicrofluidics*, 5, 14107.
- ADAMSON, A. W. & GAST, A. P. 1967. Physical chemistry of surfaces.
- ALMARSSON, O. & ZAWOROTKO, M. J. 2004. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chemical Communications*, 1889-1896.
- ARASHIRO, E. Y. & DEMARQUETTE, N. R. 1999. Use of the pendant drop method to measure interfacial tension between molten polymers. *Materials Research*, 2, 23-32.
- ASTIER, J.-P. & VEESLER, S. 2008. Using Temperature To Crystallize Proteins: A Mini-Review. *Crystal Growth & Design*, 8, 4215-4219.
- ASTIER, J. P., VEESLER, S. & BOISTELLE, R. 1998. Protein crystals orientation in a magnetic field. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54, 703-6.
- BAROUD, C. N., GALLAIRE, F. & DANGLA, R. 2010. Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 10, 2032-2045.
- BAUER, M. 2004. Cristallisation et polymorphisme Description du phénomène. *Techniques de l'ingénieur Traité états de la matière*, Volume 1.
- BENOIT, C. E., ROWE, W. B., MENARD, C., SARRET, P. & QUIRION, R. 2011. Genomic and proteomic strategies to identify novel targets potentially involved in learning and memory. *Trends Pharmacol Sci*, 32, 43-52.
- BERGFORS, T. M. 2009. *Protein Crystallization*, International University Line.
- BERNSTEIN, J. 2002. *Polymorphism in Molecular Crystals*, Clarendon Press.
- BLAKE, C. C. F., FENN, R. H., NORTH, A. C. T., PHILLIPS, D. C. & POLJAK, R. J. 1962. Structure Of Lysozyme: A Fourier Map of the Electron Density at 6 [angst] Resolution obtained by X-ray Diffraction. *Nature*, 196, 1173-1176.
- BLUNDELL, T. L. 1996. Structure-based drug design. *Nature*, 384, 23-6.
- BOISTELLE, R. 1985. Concepts de la Cristallisation en Solution. In: FLAMMARION (ed.) *Actualités Néphrologiques*.
- BOISTELLE, R., ASTIER, J. P., MARCHIS-MOUREN, G., DESSEAUX, V. & HASER, R. 1992. Solubility, phase transition, kinetic ripening and growth rates of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase isoenzymes. *Journal of Crystal Growth*, 123, 109-120.
- BRZOSKA, J. B., SHAHIDZADEH, N. & RONDELEZ, F. 1992. Evidence of a transition temperature for the optimum deposition of grafted monolayer coatings. *Nature*, 360, 719-721.
- BURYANOVSKYY, L., FU, Y., BOYD, M., MA, Y., HSIEH, T. C., WU, J. M. & ZHANG, Z. 2004. Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry*, 43, 11417-26.
- CANDONI, N., GROSSIER, R., HAMMADI, Z., MORIN, R. & VEESLER, S. 2012a. Practical physics behind growing crystals of biological macromolecules. *Protein Pept Lett*, 19, 714-24.
- CANDONI, N., HAMMADI, Z., GROSSIER, R., ILDEFONSO, M., REVALOR, E. & FERTÉ, N. 2012b. Nanotechnologies dedicated to nucleation control. *International Journal of Nanotechnology*, 9, 439-459.
- CELLI, C. M., TRAN, N., KNOX, R. & JAISWAL, A. K. 2006. NRH:quinone oxidoreductase 2 (NQO2) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol*, 72, 366-76.
- CHAYEN, N. E., SHAW STEWART, P. D., MAEDER, D. L. & BLOW, D. M. 1990. An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. *Journal of Applied Crystallography*, 23, 297-302.

- CHEREZOV, V., PEDDI, A., MUTHUSUBRAMANIAM, L., ZHENG, Y. F. & CAFFREY, M. 2004. A robotic system for crystallizing membrane and soluble proteins in lipidic mesophases. *Acta Crystallographica Section D*, 60, 1795-1807.
- CHRISTENSEN, J., GERDTS, C. J., CLIFTON, M. C. & STEWART, L. 2011. Salvage and storage of infectious disease protein targets in the SSGCID high-throughput crystallization pathway using microfluidics. *Acta Crystallographica Section F*, 67, 1022-1026.
- CHRISTOPHER, G. F. & ANNA, S. L. 2007. Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40, R319.
- DESSAU, M. A. & MODIS, Y. 2011. Protein crystallization for X-ray crystallography. *J Vis Exp*.
- DHOUB, K., MALEK, C. K., PFLEGING, W., GAUTHIER-MANUEL, B., DUFFAIT, R., THUILLIER, G., FERRIGNO, R., JACQUAMET, L., OHANA, J., FERRER, J.-L., THEOBALD-DIETRICH, A., GIEGE, R., LORBER, B. & SAUTER, C. 2009. Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. *Lab on a Chip*, 9, 1412-1421.
- DOMBROWSKI, R. D., LITSTER, J. D., WAGNER, N. J. & HE, Y. 2007. Crystallization of alpha-lactose monohydrate in a drop-based microfluidic crystallizer. *Chemical Engineering Science*, 62, 4802-4810.
- DURBIN, S. D. & FEHER, G. 1986. Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 76, 583-592.
- EMSLEY, P. & COWTAN, K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D*, 60, 2126-2132.
- ERDEMIR, D., LEE, A. Y. & MYERSON, A. S. 2009. Nucleation of Crystals from Solution: Classical and Two-Step Models. *Accounts of Chemical Research*, 42, 621-629.
- ERLANDSEN, S. L., PARSONS, J. A. & TAYLOR, T. D. 1974. Ultrastructural immunocytochemical localization of Lysozyme in the paneth cells of man. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 22, 401-413.
- FERRER, J.-L., LARIVE, N. A., BOWLER, M. W. & NURIZZO, D. 2013. Recent progress in robot-based systems for crystallography and their contribution to drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 8, 835-847.
- FIORINI, G. S. & CHIU, D. T. 2005. Disposable microfluidic devices: fabrication, function, and application. *Biotechniques*, 38, 429-46.
- FOSTER, C. E., BIANCHET, M. A., TALALAY, P., ZHAO, Q. & AMZEL, L. M. 1999. Crystal Structure of Human Quinone Reductase Type 2, a Metalloflavoprotein<sup>†,‡</sup>. *Biochemistry*, 38, 9881-9886.
- FU, Y., BURYANOVSKYY, L. & ZHANG, Z. 2008. Quinone reductase 2 is a catechol quinone reductase. *J Biol Chem*, 283, 23829-35.
- GALANTE, A. M. S., GALANTE, O. L. & CAMPOS, L. L. 2010. Study on application of PTFE, FEP and PFA fluoropolymers on radiation dosimetry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 619, 177-180.
- GALKIN, O. & VEKILOV, P. G. 1999. Direct Determination of the Nucleation Rates of Protein Crystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 10965-10971.
- GARETZ, B. A., ABER, J. E., GODDARD, N. L., YOUNG, R. G. & MYERSON, A. S. 1996. Nonphotochemical, Polarization-Dependent, Laser-Induced Nucleation in Supersaturated Aqueous Urea Solutions. *Phys Rev Lett*, 77, 3475-3476.
- GARSTECKI, P., FUERSTMAN, M. J., STONE, H. A. & WHITESIDES, G. M. 2006. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction-scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, 6, 437-446.

- GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R. D. & BAIROCH, A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 3784-3788.
- GERDTS, C. J., ELLIOTT, M., LOVELL, S., MIXON, M. B., NAPULI, A. J., STAKER, B. L., NOLLERT, P. & STEWART, L. 2008. The plug-based nanovolume Microcapillary Protein Crystallization System (MPCS). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64, 1116-22.
- GERDTS, C. J., STAHL, G. L., NAPULI, A., STAKER, B., ABENDROTH, J., EDWARDS, T. E., MYLER, P., VAN VOORHIS, W., NOLLERT, P. & STEWART, L. J. 2010. Nanovolume optimization of protein crystal growth using the microcapillary protein crystallization system. *Journal of Applied Crystallography*, 43, 1078-1083.
- GERDTS, C. J., TERESHKO, V., YADAV, M. K., DEMENTIEVA, I., COLLART, F., JOACHIMIAK, A., STEVENS, R. C., KUHN, P., KOSSIAKOFF, A. & ISMAGILOV, R. F. 2006. Time-controlled microfluidic seeding in nL-volume droplets to separate nucleation and growth stages of protein crystallization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 8156-60.
- GONZALEZ-TELLO, P., CAMACHO, F. & BLAZQUEZ, G. 1994. Density and viscosity of concentrated aqueous solutions of polyethylene glycol. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 39, 611-614.
- GROSSIER, R., HAMMADI, Z., MORIN, R., MAGNALDO, A. & VEESLER, S. 2011a. Generating nanoliter to femtoliter microdroplets with ease. *Applied Physics Letters*, 98, 091916.
- GROSSIER, R., HAMMADI, Z., MORIN, R. & VEESLER, S. 2011b. Predictive nucleation of crystals in small volumes and its consequences. *Phys Rev Lett*, 107, 025504.
- GROSSIER, R. & VEESLER, S. 2009. Reaching One Single and Stable Critical Cluster through Finite-Sized Systems. *Crystal Growth & Design*, 9, 1917-1922.
- GUHA, S., PERRY, S. L., PAWATE, A. S. & KENIS, P. J. A. 2012. Fabrication of X-ray compatible microfluidic platforms for protein crystallization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174, 1-9.
- HAMMADI, Z., ASTIER, J.-P., MORIN, R. & VEESLER, S. 2009. Spatial and Temporal Control of Nucleation by Localized DC Electric Field. *Crystal Growth & Design*, 9, 3346-3347.
- HAMMADI, Z., CANDONI, N., GROSSIER, R., ILDEFONSO, M., MORIN, R. & VEESLER, S. 2013. Small-volume nucleation. *Comptes Rendus Physique*, 14, 192-198.
- HAMMADI, Z., GROSSIER, R., IKNI, A., CANDONI, N., MORIN, R. & VEESLER, S. 2015. Localizing and inducing primary nucleation. *Faraday Discussions*.
- HANSEN, C. L., CLASSEN, S., BERGER, J. M. & QUAKE, S. R. 2006. A Microfluidic Device for Kinetic Optimization of Protein Crystallization and In Situ Structure Determination. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 3142-3143.
- HANSEN, C. L., SKORDALAKES, E., BERGER, J. M. & QUAKE, S. R. 2002. A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16531-16536.
- HASHIMOTO, T. & NAKAI, M. 2011. Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 502, 10-2.
- HEYMANN, M., OPHTHALAGE, A., WIERMAN, J. L., AKELLA, S., SZEBENYI, D. M. E., GRUNER, S. M. & FRADEN, S. 2014. Room-temperature serial crystallography using a kinetically optimized microfluidic device for protein crystallization and on-chip X-ray diffraction. *IUCrJ*, 1, 349-360.
- HEYNO, E. 2009. *Enzymes impliqués dans la production des formes réactives de l'oxygène dans les membranes plasmiques, les mitochondries et les chloroplastes*. Université Paris-Sud XI - Faculté des Sciences d'Orsay.
- HOVERS, J., POTSCHIES, M., POLIDORI, A., PUCCI, B., RAYNAL, S., BONNETE, F., SERRANO-VEGA, M. J., TATE, C. G., PICOT, D., PIERRE, Y., POPOT, J. L., NEHME, R., BIDET, M.,



- MUS-VETEAU, I., BUSSKAMP, H., JUNG, K. H., MARX, A., TIMMINS, P. A. & WELTE, W. 2011. A class of mild surfactants that keep integral membrane proteins water-soluble for functional studies and crystallization. *Mol Membr Biol*, 28, 171-81.
- IKNI, A., CLAIR, B., SCOUFFLAIRE, P., VEESLER, S., GILLET, J.-M., EL HASSAN, N., DUMAS, F. & SPASOJEVIĆ-DE BIRÉ, A. 2014. Experimental Demonstration of the Carbamazepine Crystallization from Non-photochemical Laser-Induced Nucleation in Acetonitrile and Methanol. *Crystal Growth & Design*, 14, 3286-3299.
- ILDEFONSO, M. 2012. *Développement d' un outil microfluidique polyvalent pour l'étude de la cristallisation: application à la nucléation de principes actifs pharmaceutiques*. Aix Marseille Université.
- ILDEFONSO, M., CANDONI, N. & VEESLER, S. 2011. Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics. *Crystal Growth & Design*, 11, 1527-1530.
- ILDEFONSO, M., CANDONI, N. & VEESLER, S. 2012a. A Cheap, Easy Microfluidic Crystallization Device Ensuring Universal Solvent Compatibility. *Organic Process Research & Development*, 16, 556-560.
- ILDEFONSO, M., CANDONI, N. & VEESLER, S. 2013. Heterogeneous Nucleation in Droplet-Based Nucleation Measurements. *Crystal Growth & Design*, 13, 2107-2110.
- ILDEFONSO, M., REVALOR, E., PUNNIAM, P., SALMON, J. B., CANDONI, N. & VEESLER, S. 2012b. Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool. *Journal of Crystal Growth*, 342, 9-12.
- JANCARIK, J. & KIM, S.-H. 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24, 409-411.
- JANDA, E., PARAFATI, M., APRIGLIANO, S., CARRESI, C., VISALLI, V., SACCO, I., VENTRICE, D., MEGA, T., VADALA, N., RINALDI, S., MUSOLINO, V., PALMA, E., GRATTERI, S., ROTIROTI, D. & MOLLACE, V. 2013. The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 168, 46-59.
- JUNIUS, N. 2016. *Développement instrumentaux pour le contrôle de la cristallisation par la dialyse : approche microfluidique et analyse aux rayons X*. Université Grenoble Alpes.
- KABSCH, W. 2010. XDS. *Acta Crystallographica Section D*, 66, 125-132.
- KASHCHIEV, D. 2000. *Nucleation : Basic Theory With Applications*, Oxford.
- KASHCHIEV, D. 2011. Note: On the critical supersaturation for nucleation. *The Journal of Chemical Physics*, 134, 196102.
- KHVOSTICHENKO, D. S., SCHIEFERSTEIN, J. M., PAWATE, A. S., LAIBLE, P. D. & KENIS, P. J. A. 2014. X-ray Transparent Microfluidic Chip for Mesophase-Based Crystallization of Membrane Proteins and On-Chip Structure Determination. *Crystal Growth & Design*, 14, 4886-4890.
- KNEZIC, D., ZACCARO, J. & MYERSON, A. S. 2004. Nucleation Induction Time in Levitated Droplets. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108, 10672-10677.
- KOIZUMI, H., FUJIWARA, K. & UDA, S. 2009. Control of Nucleation Rate for Tetragonal Hen-Egg White Lysozyme Crystals by Application of an Electric Field with Variable Frequencies. *Crystal Growth & Design*, 9, 2420-2424.
- LAVAL, P., CROMBEZ, A. & SALMON, J. B. 2009. Microfluidic droplet method for nucleation kinetics measurements. *Langmuir*, 25, 1836-41.
- LENG, J. & SALMON, J.-B. 2009. Microfluidic crystallization. *Lab on a Chip*, 9, 24-34.
- LI, L. & ISMAGILOV, R. F. 2010. Protein crystallization using microfluidic technologies based on valves, droplets, and SlipChip. *Annu Rev Biophys*, 39, 139-58.

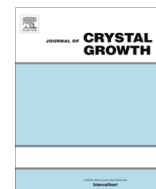
- LI, L., MUSTAFI, D., FU, Q., TERESHKO, V., CHEN, D. L., TICE, J. D. & ISMAGILOV, R. F. 2006. Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 19243-8.
- LIM, K.-B. & LEE, D.-C. 2004. Surface modification of glass and glass fibres by plasma surface treatment. *Surface and Interface Analysis*, 36, 254-258.
- MAEKI, M., PAWATE, A. S., YAMASHITA, K., KAWAMOTO, M., TOKESHI, M., KENIS, P. J. A. & MIYAZAKI, M. 2015. A Method of Cryoprotection for Protein Crystallography by Using a Microfluidic Chip and Its Application for in Situ X-ray Diffraction Measurements. *Analytical Chemistry*, 87, 4194-4200.
- MAEKI, M., YAMAGUCHI, H., TOKESHI, M. & MIYAZAKI, M. 2016. Microfluidic Approaches for Protein Crystal Structure Analysis. *Analytical Sciences*, 32, 3-9.
- MAEKI, M., YOSHIKAWA, S., YAMAGUCHI, H., KAWAMOTO, M., YAMASHITA, K., NAKAMURA, H., MIYAZAKI, M. & MAEDA, H. 2012. X-ray Diffraction of Protein Crystal Grown in a Nano-liter Scale Droplet in a Microchannel and Evaluation of Its Applicability. *Analytical Sciences*, 28, 65-65.
- MANGIN, D., PUEL, F. & VEESLER, S. 2008. Polymorphisme et transition de phases solides en solution. *Techniques de l'ingénieur Principes de formulation*, base documentaire : TIB489DUO.
- MAZUTIS, L., ARAGHI, A. F., MILLER, O. J., BARET, J.-C., FRENZ, L., JANOSHAZI, A., TALY, V., MILLER, B. J., HUTCHISON, J. B., LINK, D., GRIFFITHS, A. D. & RYCKELYNCK, M. 2009. Droplet-Based Microfluidic Systems for High-Throughput Single DNA Molecule Isothermal Amplification and Analysis. *Analytical Chemistry*, 81, 4813-4821.
- MCPHERSON, A. & CUDNEY, B. 2014. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules. *Acta Crystallographica Section F*, 70, 1445-1467.
- MCPHERSON, A., JR. 1976. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J Biol Chem*, 251, 6300-3.
- MENECH, M. D., GARSTECKI, P., JOUSSE, F. & STONE, H. A. 2008. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. *Journal of Fluid Mechanics*, 595, 141-161.
- MORENO, A. & SAZAKI, G. 2004. The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme. *Journal of Crystal Growth*, 264, 438-444.
- MULLIN, J. W. 2000. Crystallization and Precipitation. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- MURSHUDOV, G. N., SKUBAK, P., LEBEDEV, A. A., PANNU, N. S., STEINER, R. A., NICHOLLS, R. A., WINN, M. D., LONG, F. & VAGIN, A. A. 2011. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D*, 67, 355-367.
- NG, J. D., CLARK, P. J., STEVENS, R. C. & KUHN, P. 2008. In situ X-ray analysis of protein crystals in low-birefringent and X-ray transmissive plastic microchannels. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 64, 189-97.
- NG, J. D., LORBER, B., WITZ, J., THÉOBALD-DIETRICH, A., KERN, D. & GIEGÉ, R. 1996. The crystallization of biological macromolecules from precipitates: evidence for Ostwald ripening. *Journal of Crystal Growth*, 168, 50-62.
- NGE, P. N., ROGERS, C. I. & WOOLLEY, A. T. 2013. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chemical Reviews*, 113, 2550-2583.
- NOSJEAN, O., FERRO, M., COGE, F., BEAUVERGER, P., HENLIN, J. M., LEFOULON, F., FAUCHERE, J. L., DELAGRANGE, P., CANET, E. & BOUTIN, J. A. 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 275, 31311-7.

- OTÁLORA, F., GAVIRA, J. A., NG, J. D. & GARCÍA-RUIZ, J. M. 2009. Counterdiffusion methods applied to protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 101, 26-37.
- PELLEGRINI, A., THOMAS, U., VON FELLEBERG, R. & WILD, P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 180-187.
- PERRY, S. L., GUHA, S., PAWATE, A. S., BHASKARLA, A., AGARWAL, V., NAIR, S. K. & KENIS, P. J. A. 2013. A microfluidic approach for protein structure determination at room temperature via on-chip anomalous diffraction. *Lab on a Chip*, 13, 3183-3187.
- PERRY, S. L., GUHA, S., PAWATE, A. S., HENNING, R., KOSHELEVA, I., SRAJER, V., KENIS, P. J. A. & REN, Z. 2014. In situ serial Laue diffraction on a microfluidic crystallization device. *Journal of Applied Crystallography*, 47, 1975-1982.
- QUEVEDO, E., STEINBACHER, J. & MCQUADE, D. T. 2005. Interfacial Polymerization within a Simplified Microfluidic Device: Capturing Capsules. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 10498-10499.
- ROUSSEAU, J. J. & GIBAUD, A. 2007. *Cristallographie géométrique et radiocristallographie - 3ème édition - Livre+compléments en ligne*, Dunod.
- SAUTER, C., DHOUB, K. & LORBER, B. 2007. From Macrofluidics to Microfluidics for the Crystallization of Biological Macromolecules†. *Crystal Growth & Design*, 7, 2247-2250.
- SAZAKI, G. 2009. Crystal quality enhancement by magnetic fields. *Prog Biophys Mol Biol*, 101, 45-55.
- SAZAKI, G., YOSHIDA, E., KOMATSU, H., NAKADA, T., MIYASHITA, S. & WATANABE, K. 1997. Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals. *Journal of Crystal Growth*, 173, 231-234.
- SCHULTHEISS, N. & NEWMAN, A. 2009. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Crystal Growth & Design*, 9, 2950-2967.
- SEEMANN, R., BRINKMANN, M., PFOHL, T. & HERMINGHAUS, S. 2012. Droplet based microfluidics. *Rep Prog Phys*, 75, 016601.
- SHAFRIN, E. & ZISMAN, W. 1964. Contact angle, wettability and adhesion. *Advances in chemistry series*, 43, 145-157.
- SHARMA, P. K. & HANUMANTHA RAO, K. 2002. Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 98, 341-463.
- SHIM, J.-U., CRISTOBAL, G., LINK, D. R., THORSEN, T., JIA, Y., PIATTELLI, K. & FRADEN, S. 2007. Control and measurement of the phase behavior of aqueous solutions using microfluidics. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 8825-8835.
- SMYTH, M. S. & MARTIN, J. H. 2000. x ray crystallography. *Mol Pathol*, 53, 8-14.
- SONG, H., CHEN, D. L. & ISMAGILOV, R. F. 2006. Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 7336-56.
- SQUIRES, T. M. & QUAKE, S. R. 2005. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77, 977-1026.
- STURA, E. A. & WILSON, I. A. 1991. Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 110, 270-282.
- SU, Y. F., KIM, H., KOVENKLIÖGLU, S. & LEE, W. Y. 2007. Continuous nanoparticle production by microfluidic-based emulsion, mixing and crystallization. *Journal of Solid State Chemistry*, 180, 2625-2629.

- SURADE, S., OCHI, T., NIETLISPACH, D., CHIRGADZE, D. & MORENO, A. 2009. Investigations into Protein Crystallization in the Presence of a Strong Magnetic Field. *Crystal Growth & Design*, 10, 691-699.
- TALEB, M., DIDIERJEAN, C., JELSCH, C., MANGEOT, J. P., CAPELLE, B. & AUBRY, A. 1999. Crystallization of proteins under an external electric field. *Journal of Crystal Growth*, 200, 575-582.
- TAM, A., MOE, G. & HAPPER, W. 1975. Particle Formation by Resonant Laser Light in Alkali-Metal Vapor. *Physical Review Letters*, 35, 1630-1633.
- THORSEN, T., ROBERTS, R. W., ARNOLD, F. H. & QUAKE, S. R. 2001. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 86, 4163-4166.
- TICE, J. D., SONG, H., LYON, A. D. & ISMAGILOV, R. F. 2003. Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir*, 19, 9127-9133.
- TRIVEDI, V., DOSHI, A., KURUP, G. K., EREIFEJ, E., VANDEVORD, P. J. & BASU, A. S. 2010. A modular approach for the generation, storage, mixing, and detection of droplet libraries for high throughput screening. *Lab Chip*, 10, 2433-42.
- TYNDALL, J. 1869. On the blue color of the sky, the polarization of skylight, and polarization of light by cloudy matter generally. *Journal of the Franklin Institute*, 88, 34-40.
- VEESLER, S., FURUTA, K., HORIUCHI, H., HIRATSUKA, H., FERTÉ, N. & OKUTSU, T. 2006. Crystals from Light: Photochemically Induced Nucleation of Hen Egg-White Lysozyme. *Crystal Growth & Design*, 6, 1631-1635.
- VIVARES, D., VEESLER, S., ASTIER, J.-P. & BONNETÉ, F. 2006. Polymorphism of Urate Oxidase in PEG Solutions. *Crystal Growth & Design*, 6, 287-292.
- WAKAYAMA, N. I. 2002. Effects of a Strong Magnetic Field on Protein Crystal Growth. *Crystal Growth & Design*, 3, 17-24.
- WARKENTIN, M., STANISLAVSKAIA, V., HAMMES, K. & THORNE, R. E. 2008. Cryocrystallography in capillaries: critical glycerol concentrations and cooling rates. *Journal of Applied Crystallography*, 41, 791-797.
- WOLDE, P. R. T. & FRENKEL, D. 1997. Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations. *Science*, 277, 1975-1978.
- XU, J. H., LI, S. W., TAN, J. & LUO, G. S. 2008. Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping. *Microfluidics and Nanofluidics*, 5, 711-717.
- YADAV, M. K., GERDTS, C. J., SANISHVILI, R., SMITH, W. W., ROACH, L. S., ISMAGILOV, R. F., KUHN, P. & STEVENS, R. C. 2005. In situ data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization. *J Appl Crystallogr*, 38, 900-905.
- ZAGNONI, M., ANDERSON, J. & COOPER, J. M. 2010. Hysteresis in Multiphase Microfluidics at a T-Junction. *Langmuir*, 26, 9416-9422.
- ZHANG, S. 2015. *Approche Microfluidique Polyvalente de la Cristallisation*. Aix Marseille Université.
- ZHANG, S., FERTÉ, N., CANDONI, N. & VEESLER, S. 2015a. Versatile Microfluidic Approach to Crystallization. *Organic Process Research & Development*, 19, 1837-1841.
- ZHANG, S., GUIVIER-CURIEN, C., VEESLER, S. & CANDONI, N. 2015b. Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics. *Chemical Engineering Science*, 138, 128-139.
- ZHAO, C.-X. & MIDDELBERG, A. P. J. 2011. Two-phase microfluidic flows. *Chemical Engineering Science*, 66, 1394-1411.

- ZHENG, B., GERDTS, C. J. & ISMAGILOV, R. F. 2005. Using nanoliter plugs in microfluidics to facilitate and understand protein crystallization. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 548-555.
- ZHENG, B., TICE, J. D. & ISMAGILOV, R. F. 2004a. Formation of Arrayed Droplets by Soft Lithography and Two-Phase Fluid Flow, and Application in Protein Crystallization. *Adv Mater*, 16, 1365-1368.
- ZHENG, B., TICE, J. D., ROACH, L. S. & ISMAGILOV, R. F. 2004b. 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, 2508-2511.
- ZHU, Y. & FANG, Q. 2013. Analytical detection techniques for droplet microfluidics—A review. *Analytica Chimica Acta*, 787, 24-35.

# Annexes



## Microfluidic platform for optimization of crystallization conditions



Shuheng Zhang<sup>a</sup>, Charline J.J. Gerard<sup>a</sup>, Aziza Ikni<sup>a</sup>, Gilles Ferry<sup>b</sup>, Laurent M. Vuillard<sup>b</sup>, Jean A. Boutin<sup>b</sup>, Nathalie Ferte<sup>a</sup>, Romain Grossier<sup>a</sup>, Nadine Candoni<sup>a</sup>, Stéphane Veessler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CINaM - CNRS, Aix-Marseille Université, Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex, France

<sup>b</sup> Institut de Recherches SERVIER, 125, chemin de ronde, F-78290 Croissy-sur-Seine, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

A2. Growth from solutions  
A.2 Single crystal growth  
B.1 Biological macromolecules  
B1. Lysozyme

### ABSTRACT

We describe a universal, high-throughput droplet-based microfluidic platform for crystallization. It is suitable for a multitude of applications, due to its flexibility, ease of use, compatibility with all solvents and low cost. The platform offers four modular functions: droplet formation, on-line characterization, incubation and observation. We use it to generate droplet arrays with a concentration gradient in continuous long tubing, without using surfactant. We control droplet properties (size, frequency and spacing) in long tubing by using hydrodynamic empirical relations. We measure droplet chemical composition using both an off-line and a real-time on-line method. Applying this platform to a complicated chemical environment, membrane proteins, we successfully handle crystallization, suggesting that the platform is likely to perform well in other circumstances. We validate the platform for fine-gradient screening and optimization of crystallization conditions. Additional on-line detection methods may well be integrated into this platform in the future, for instance, an on-line diffraction technique. We believe this method could find applications in fields such as fluid interaction engineering, live cell study and enzyme kinetics.

### 1. Introduction

Over the past few decades, the science of crystallization has attracted vast interest and found widespread applications in both industrial and scientific fields. In all these fields, obtaining suitable quality crystals involves the major challenge of monitoring and controlling the crystallization process. For instance, the optics industry requires large single crystals. In pharmaceutical industry, crystallization is employed as a simple and efficient process of purification, separation and final manufacturing of active pharmaceutical ingredients (APIs). Therefore, final product quality (bioavailability, processability and patient security) is highly correlated with crystal properties (polymorphism, crystal size distribution, crystal habit, morphology). For structural biologists attempting to solve three-dimensional structures of biological macromolecules including proteins via X-ray crystallography, the decisive and rate-limiting step is obtaining diffraction-quality crystals. However, producing suitable crystals is not an easy job. Crystallization is complex and influenced by many parameters (pH, temperature, and types of buffers, salts and crystallization agents), especially for biomolecules like proteins. Because nucleation is of a stochastic nature, it is necessary to perform a large number of experiments in order to obtain reliable data [1]. Furthermore, no current theories are available to predict in which environment or under

what conditions a new protein can be successfully crystallized. Problems in producing suitable crystals can be tackled following two steps: screening for favourable crystallization conditions in the phase diagram and subsequent optimizing of crystal growth by developing a specific kinetic path in the phase diagram. This contrasts with common practise mainly based on trial and error where a vast quantity of conditions are screened, a lengthy and wasteful procedure. As a result, there is a genuine need for improved techniques (of screening and optimization) for automating, miniaturizing and high-throughput crystallization approaches.

In recent years, research advances in high-throughput crystallization trials involving multiple operations such as mixing, analysis, separation [2] have led to achievements in protein crystallization. These state-of-the-art trials are generally based on two categories of techniques. The first category is the high-throughput robotic techniques which rely on automated liquid-handling techniques integrated with micro or nanoliter dispensers and fluidic circuits [3]. Crystallization robots, such as Impax 1–5/Oryx-6, Cyberlabs C-200 and Mosquito® Crystal, enable initial crystallization screening by testing numerous crystallization parameters with up to 10<sup>5</sup> crystallization trials per day and very low consumption of materials [4] (as little as 10nL per trial). However, these robotic systems require substantial dedicated space and generally a high investment, making

\* Corresponding author.

E-mail address: [veessler@cinam.univ-mrs.fr](mailto:veessler@cinam.univ-mrs.fr) (S. Veessler).

them inaccessible to most crystallization laboratories. Moreover, the highly interconnected fluidic circuits lead to an accumulation of particles, which makes maintenance cumbersome, involving breaking the circuit and routing the plug out of the system [5]. The second category is microfluidic techniques, i.e. the control and manipulation of flows to sub-millimeter scale using miniaturized devices called lab on chip (LOC) [6]. Unlike high-throughput robots, microfluidic chips are applied in both fast screening and optimization stages of protein crystallization studies, via the integration of traditional protocols of protein crystallization [7] such as free interface diffusion (FID) [8], counter-diffusion [9], vapour diffusion [10] and microbatch [11]. Microfluidic technology has been applied to protein crystallization either through flow-based or droplet-based microfluidics.

**Flow-based microfluidic** techniques generally refer to liquid-handling methods using specially designed microchannels, valves, or chambers. A good example is the technique developed by Hansen *et al.*, which integrates the FID method into a chamber-and-valve-based microfluidic chip using silicone elastomer sealed to an etched glass substrate [3,12]. This microfluidic chip includes up to 480 reaction units. Each simple reaction unit includes three pairs of microwell chambers, with well-defined volumes, where fluid contact is controlled with a central interface valve, allowing the protein and precipitant solutions to mix by FID. Another technique based on the FID method is that of Du *et al.*, called the "SlipChip®" [13]. In a slipchip®, protein and precipitant solutions are loaded respectively in the microwells of the bottom plate and in the channels of the top plate. Then fluid contact between the microwells and the channels is enabled simply by slipping the top and bottom plates so that the two solutions diffuse one into another. In a third technique, Sauter *et al.* developed a microfluidic chip to crystallize biomolecules in microchannels by counter-diffusion (CD), with direct analysis of crystals by X-ray diffraction [14]. This chip consists of a set of parallel microchannels arranged in a tree-like network where the root-side connects to the protein solution and the branch-side connects to the precipitant. The geometry of the channels was chosen to ensure that crystallization occurs in a convection-free environment. With solutions diffusing gently through the channels, a supersaturation gradient is established. Thus crystal size distribution is observed at the end of the experiment: with amorphous precipitation or microcrystallites seen on the root side, due to the higher protein concentration, and diffraction-quality crystals of sufficient size seen on the branch side.

**Droplet-based microfluidic** techniques for crystallization are generally miniaturized versions of microbatch, i.e. simply mixing protein solution with precipitants, buffers or crystallization agents inside droplets generated in oil [15]. Various droplet systems have been developed for crystallization studies, combined with different crystallization techniques. For example, Ildefonso *et al.* used the double-pulse method to study nucleation kinetics using PDMS chips [16]. Gerdts *et al.* integrated the seeding technique into droplet methods and produced diffraction-quality crystals [17]. These droplet-based microfluidic methods have been proven to provide the advantages of high-throughput, low sample and reagent consumption, rapid mixing and minimal cross-contamination.

However, despite the spectacular achievements in protein crystallization made through these microfluidic techniques several drawbacks remain:

These microfluidic chips rely mainly on microfabrication technologies such as soft-lithography, high-resolution stereolithography and 3D print techniques. Although these technologies are well-developed, microfabrication processes can be expensive and time-consuming, requiring specialist infrastructure and expensive handling. 2. Currently used chip materials such as silicone and glass [18] hydrogels [19] and elastomers [20,21] are not fully compatible with all crystallization solvents. For example, PDMS, the most frequently used material, is not compatible with organic solvents such as acetone. In addition, solvent evaporation due to the permeability of the polymer

need to be taken into account. 3. Single design leads to unchangeable geometry of channel networks, making it complicated to alter the setup. Thus the current microfluidic systems are less accessible to non-specialists. 4. Liquid-handling at microfluidic scale is very sensitive to liquid properties such as flow viscosity and surface tension. Hence, system calibration is obligatory for each working fluid and can be very difficult when handling liquids with high viscosity (i.e. PEG) or low surface tension (i.e. detergent used for solubilization of membrane protein). This is also the main reason why most of the current droplet methods rely on surfactant use. However, the problem with using surfactants is their possible interference with protein molecules, which affects the crystallization process.

Our objective is to develop and validate a universal droplet-based microfluidic platform for crystallization, for both screening and optimization. Such a platform should cover all applications and be able to address all possible challenges in crystallization studies, such as compatibility with all solvents, ease of use, low cost, flexibility, etc. Here we describe in full the design, validation and application of our platform. In Materials and Method, we describe the four separate components of this platform: droplet factory (mixing and generation), on-line characterization (droplet size, frequency and chemical composition), incubation and observation. Results and Discussion is divided into three parts. The first discusses the control of stability and reproducibility of droplets using hydrodynamic law and off-line characterization techniques. The second discusses the development of the on-line characterization module and corresponding measurements, particularly of droplets composition. The third describes an application of high-throughput screening and optimization by a fine tuning of concentration is demonstrated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Protein solutions

Hen-egg white lysozyme (14.6 kDa, pI =11.2) was purchased from Sigma (batch 057K7013 L 2879) and used without further purification. Lysozyme purity was checked by molecular sieving. A suitable amount of lysozyme was dissolved in pure water (ELGA UHQ reverse osmosis system) to obtain the stock solutions required. A 1.4 M NaCl solution was also prepared. The different solutions were buffered with 80 mM acetic acid, adjusted to pH =4.5 with NaOH (1 M), and filtered through 0.22 µm Millipore filters. The pH was checked with a pH meter (Schott Instrument, Prolab 1000) equipped with a pH microelectrode. Lysozyme concentrations were checked by optical density measurements (Biochrom, Libra S22) using an extinction coefficient of 2.64 mL cm<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> at 280 nm. In all the crystallization experiments hereafter, the NaCl concentration was fixed at 0.7 M at pH =4.5. Pentaethylene Glycol Monodecyl Ether (C<sub>10</sub>E<sub>5</sub> – Anatrace) a non-ionic detergent was used as a solubilizing agent in the crystallization experiments with lysozyme, mimicking crystallization of membrane proteins.

### 2.2. Aqueous solutions for mixing and fine-gradient tests

Aqueous solutions are prepared for tests of mixing and fine gradient. Food dyes (~2%, blue dye, Vahiné E102 and yellow dye, Vahiné E133) are added to deionized water for visualization purposes. The extinction coefficients of the food dyes are unknown. However, by performing the absorbance spectrum of mono-dyed solutions, we observe that maximum absorption for the yellow and blue dyes occurs respectively at 430 nm and 631 nm. Consequently, the evolution of the respective maximum absorption represents the evolution of the concentration of respective food dyes for mixing and fine-gradient tests.



### 2.3. Continuous phases

We used FMS oil (Hampton Research) for dye solutions and Fluorinated oil FC-70 (Hampton research, Fluorinert™) for protein solutions. These oils show no or very low miscibility with dye and protein solutions and good wettability with Teflon.

### 2.4. Microfluidic platform

The development and optimization of the whole microfluidic system are based on the notion of modular microfluidics so that microfluidics becomes more accessible to all users, even non-specialists. This idea is analogous with the concept of breadboards in the electronic industry [22,23], discrete components that can easily be assembled, replaced or removed in a plug-and-play mode. This offers several advantages over traditional methods with respect to system cost, planning, evolution and maintenance. Hence, to construct such a modular platform for crystallization, two principles are respected. The first principle consists in using separate micro-junctions to assemble the microfluidic circuit, including the droplet factory and storage chip [24]. The second principle consists in building the whole platform for crystallization with modular sub-functions, including droplet generation, characterization, incubation and observation. The different parts of the microfluidic platform are presented in Fig. 1.

#### 2.4.1. Droplet factory

**2.4.1.1. PEEK & Teflon microfluidic junction.** The droplet factory is built using commercially-available PEEK junctions and Teflon tubing (IDEX Health and Science), initially designed for high-performance liquid chromatography (HPLC) systems. These two materials were previously tested in our group [25] and proved to be compatible with almost all solvents, showing excellent resistance and no solvent evaporation. This is a real benefit, especially when dealing with organic solvents that are problematic for frequently-used silicone-based microfluidic chips [25]. The PEEK & Teflon droplet factory are of a circular cross-section affording hydraulic resistance up to 10-fold lower than commonly-used rectangular cross-section microfluidic set-ups [26]. The different geometries of the droplet factory such as T-, cross- and multiport-junctions (Fig. 2a–f) enable us to generate droplets in oil either by injecting one dispersed phase or by mixing several dispersed phases (crystallization solutions) into droplets. Moreover, using separate microfluidic junctions provides a great deal of flexibility and scalability by creating new geometries combining several junctions according, to experimental requirements (Fig. 2g). Droplet size can be controlled as low as several nano-liters by changing flow-rates or inner diameters of microfluidic junctions (from 1 mm to 100 μm).

**2.4.1.2. Programmable syringe pumps.** Dosing rates of syringes containing oil and dispersed phases are controlled precisely and

steadily (as low as 0.01 μL/s), without any pulses, by a programmable pump system (neMESYS, cetoni GmbH). This pump system can also be programmed to create a tuneable flow-rate gradient from several μL/s to μL/h. This flow-rate gradient will finally be transformed to a concentration gradient among droplets. Fig. 3 shows the generation of a droplet array with a concentration gradient. According Candoni et al. [27], droplet size and frequency are controlled by both total flow-rate and flow-rate ratio. Hence, in order to keep size and volume constant among all droplets in the array, we keep the flow-rate of the oil and the sum of the flow-rates of all the dispersed phases constant. It is important to use a constant crystallization volume because volume affects nucleation [28].

#### 2.4.2. Off-line and on-line characterization of droplets

Direct UV–vis absorbance spectroscopy is considered universally applicable in the analysis of bio-macromolecule samples. Nevertheless, the application of this analytical technique in microfluidic systems is very challenging due to the reduced scale of the optical path involved [29]. Consequently, it is crucial to implement convenient sampling methods as well to optimize measurements. In this study, both off- and on-line characterization techniques were developed.

Firstly, we performed the time-consuming and difficult task of “off-line” characterization to test the “dosing rate – droplet” synchronization and the feasibility of the fine-gradient experiment. The idea is to fish out each droplet using a pipette and measure its chemical composition with the Nanodrop® spectrometer. The correspondence between the gradient of the dosing rates and the chemical composition in droplets is checked. Although the off-line measurements are rough, they provide us with important data for fine-gradient screening and optimization.

The on-line characterization module is divided into two general parts – the in-line miniaturized analytical instruments and the in-line sampling cell (“SC” in Fig. 4).

- The in-line analytical instruments are selected for overall modular system design, including (1) a light source (“LR” in Fig. 4, *DT-MINI-2-GS*, Ocean optics) with a bandwidth of 215–2500 nm; (2) a UV–Vis–NIR spectrometer (*USB2000+*, Ocean optics) with a spectral range of 190–2300 nm; and (3) a software interface (*OceanView*, Ocean optics) that allows in-situ analyses.
- The sampling cell allows the outlets of the microfluidic device to be connected to the UV–Vis instruments using optical fibres (“OF” in Fig. 4, 400 μm ID, QP400-1-UV–VIS, Ocean optics). Both commercial and home-made tailored UV sampling cells are tested, by either collecting droplets from the microchannels for measurements (the commercial UV flow-cell) or detecting droplets directly within the microchannels (the home-made tailored UV SC). The commercial UV flow-cell (*SMA-Z-Cell-2.5*, FIALab) has a Z-shaped inner flow path with 2.5 mm optical path length (see the blue double arrow in Fig. 4C). With the outlet tubing of the microfluidic junction connecting to the flow-cell, the droplet flow travels through the inner flow path. Two optical ports enable the flow-cell to be connected to the light source and spectrometer with the optical fibres and thus droplets to be detected. Although the flow-cell was initially intended for classical flow injection analysis [30], unfortunately, it was not suitable for the detection of a biphasic flow (of droplets) due to the extreme complication of liquid handling when dealing with individual crystallization solutions. Droplets, which are spherical when they enter the UV flow-cell, collapse in the Z-shaped channel and wet the inner channel wall (Fig. 4D). There are several explanations for this: the surface roughness of the inner channel and/or the high shearing stress and/or the hydraulic resistance due to the Z geometry. The home-made and specially-designed UV cell, made of PMMA

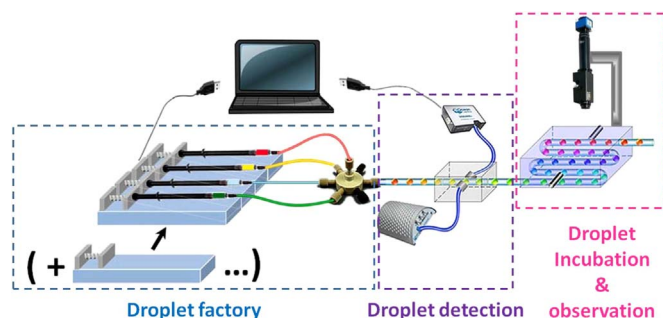
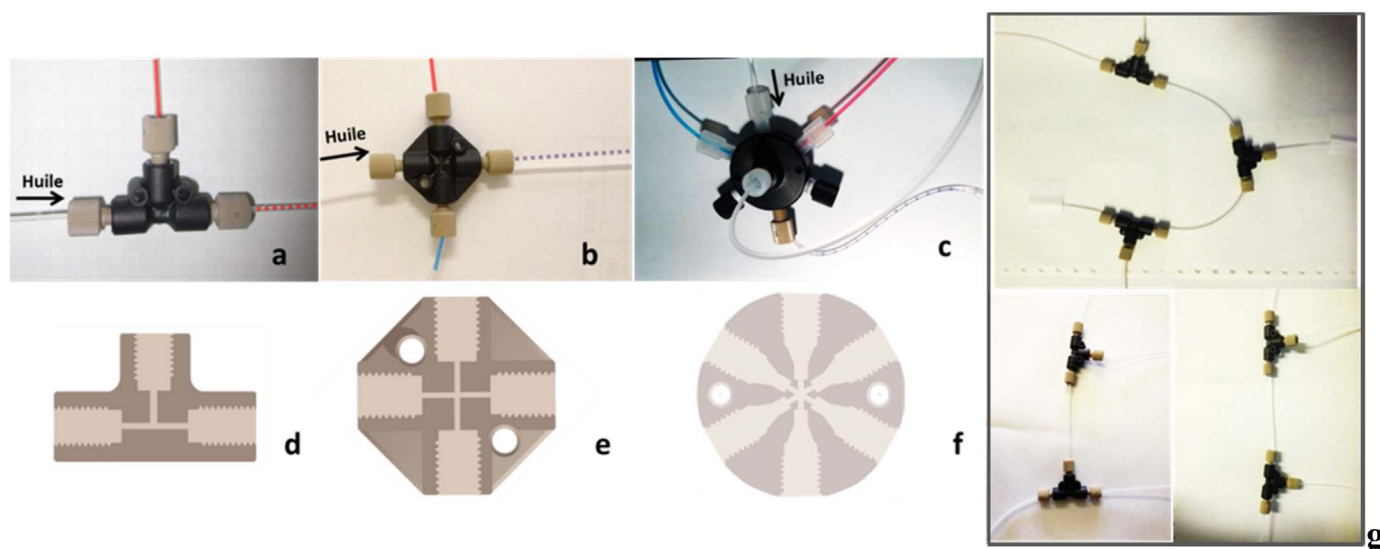
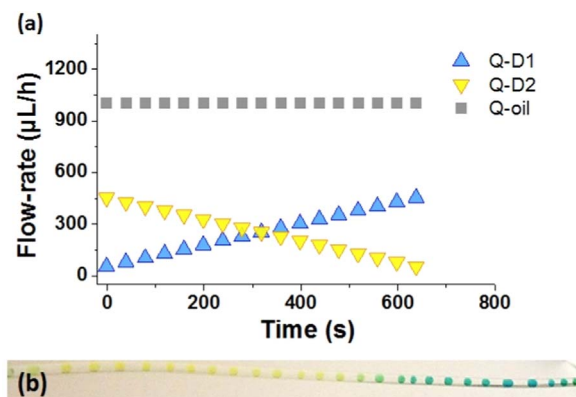


Fig. 1. Schematic illustration of the entire microfluidic platform.



**Fig. 2.** Pictures and diagrams of the microfluidic junctions (a) T-junction, (b) cross-junction, (c) 7-port junction. (d), (e) and (f): Corresponding diagrams of inner geometries of (a), (b) and (c) (From IDEX Health and Science catalogue). (g) An example of flexibility in creating new geometries by regrouping microfluidic junctions.



**Fig. 3.** (a) Illustration of a gradient of flow-rates programmed using “neMESYS” interface. Droplets are formed by mixing two dispersed flows (D1 and D2) into oil.  $Q_{D1}$ ,  $Q_{D2}$  and  $Q_{oil}$  refer to the flow-rates of the dispersed phases 1, 2 and the oil, respectively. Scale bar is 300 μL/h. (b) Partial demonstration of concentration gradient among droplets formed by the flow-rates in (A).

(Poly(methyl methacrylate)), consists of an inner channel of 1.57 mm diameter made by mechanical excavation and which acts as a tubing holder, and two junctions for the connection of optical fibres with no special adjustment for coupling tube to optical fibres. Thus the UV cell is able to combine the tubing carrying the circulating droplets with the optical fibres. The center of the microfluidic tubing is perfectly aligned with the centers of the optical fibres. Thus, instead of fishing droplets out of the tubing for sampling, the UV cell enables direct absorbance measurements within the tubing. The tubing wall material is transparent enough under UV light. Thus, allowing real-time, in-situ spectral analysis of droplets is possible: absorbance at one or several wavelengths can be recorded. Hence, the evolution of the chemical composition can be analyzed using Beer-Lambert’s law.

#### 2.4.3. Droplet incubation and observation

Droplets are sealed in the original Teflon tubing which is then placed and incubated within a tubing-holder water bath (ANACRISMAT) (Fig. 5). Up to thousands of droplets can be incubated using this tubing holder. With matching optical indexes of tubing and water, the water bath also provides the advantage of facilitating observation of the crystallization event [31]. A flow of dry air can be

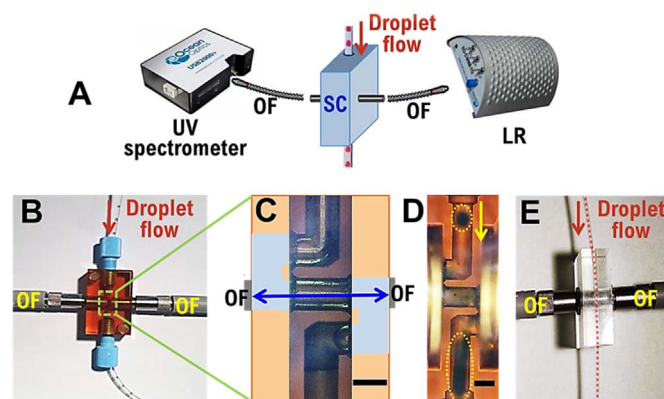
incorporated in the cover of the tubing holder to avoid condensation when working with low crystallization temperature (yellow arrows in Fig. 5A). Observation of droplet evolution is carried out using a digital camera with various zooms (Opto GmbH) attached to a XYZ motorized arm (ANACRISMAT). Thus, this camera can be programmed to memorize the position and focusing of each droplet. Finally, the camera takes photos of each droplet with a pre-set time interval.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Control of droplet size and frequency

In this study, droplet size is characterized with  $L/W$  ( $L$ , droplet length and  $W$ , channel width) and droplet frequency with  $f$  (number of droplets per cm) or  $f_D$  (number of droplets per second).

Fig. 6A shows an example of droplet generation by mixing two aqueous solutions facing each other in a cross-junction. The dispersed flows meet and are mixed at the moment when droplets are formed and released into the microfluidic channel by the flow of oil. Thus no accumulation of particles due to precipitation is observed within the channel. As a result, using cross- or multipoint junctions to form droplets by injecting several dispersed phases can avoid problems such



**Fig. 4.** (A) Schematic illustration of on-line droplet characterization module with sampling cell (SC), optical fibres (OF) and Light source LR; (B) commercial UV flow-cell with (C) Z-shaped inner flow path with 2.5 mm optical path length and (D) with droplets of dyed water in oil collapsing (circle in dotted line) when passing in the Z-shaped channel (inner diameter of 750 μm); (E) home-made UV cell to insert tubing of 1.5 mm outer diameter in a channel of 1.57 mm diameter.

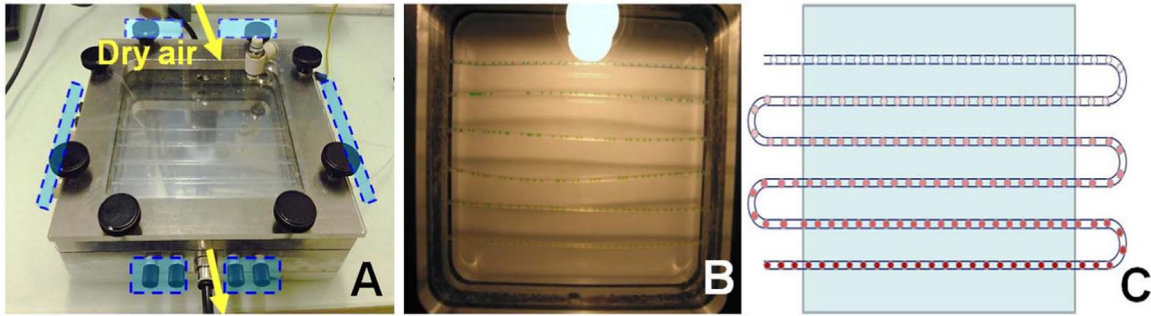


Fig. 5. Photos (A & B) and diagram (C) of the thermostated tubing holder using water bath ( $\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ ). Blue areas in (A) are tubing connections.

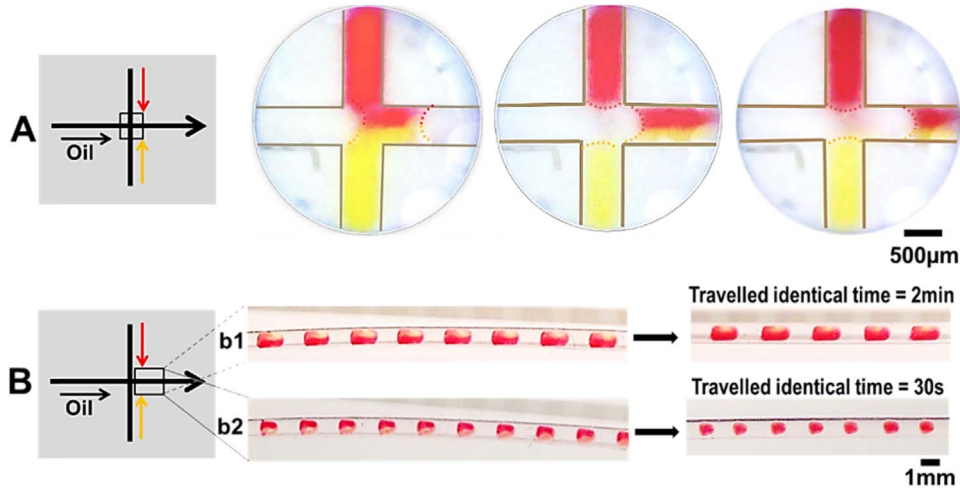


Fig. 6. (A) Generation of droplet by injecting two aqueous solutions facing each other in a  $500\text{ }\mu\text{m}$  ID cross-junction. (B) Diffusion time of circulating droplets generated by mixing two aqueous solutions in a  $1\text{ mm}$  ID channel. (b1) 2 min for elongated droplets with  $L/W > 2$ , (b2) 30 s for drops with  $1 \leq L/W \leq 2$ .

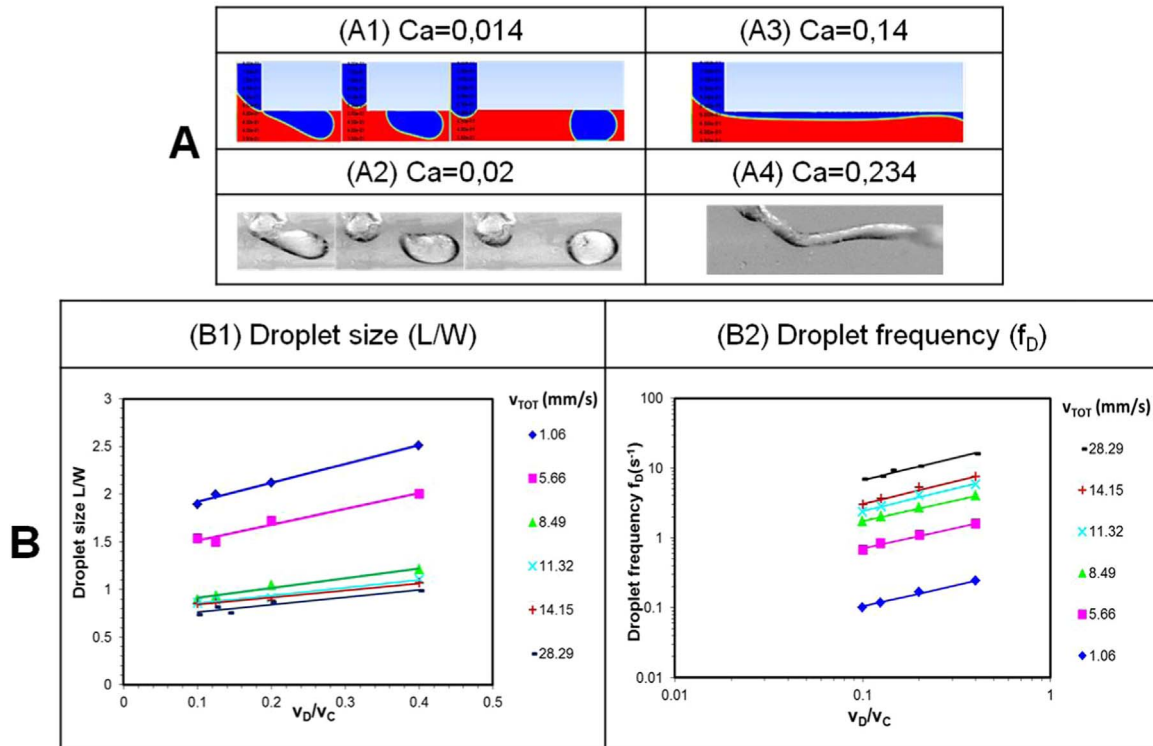
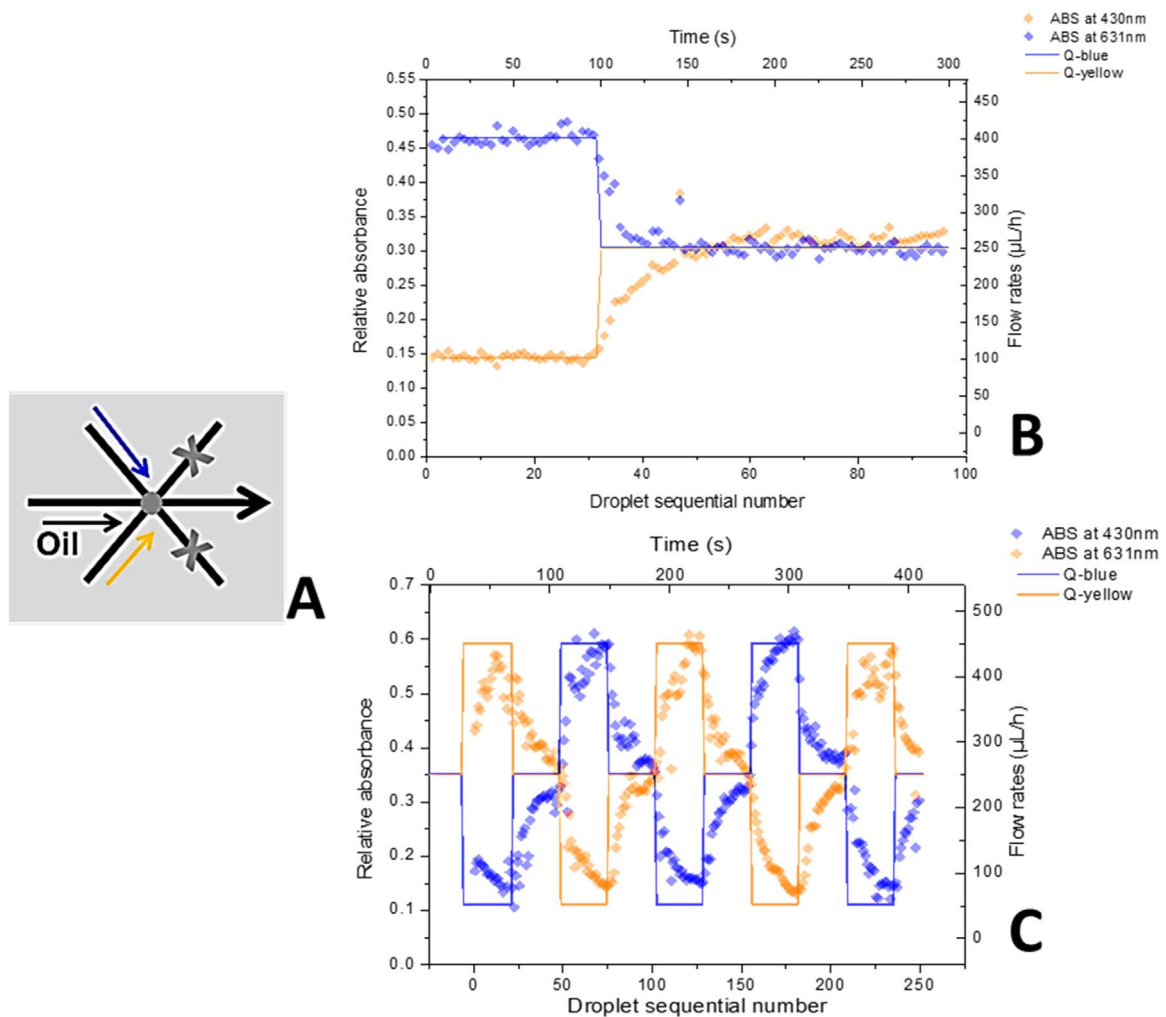


Fig. 7. (A) Droplet regimes observed at various Ca in channels with inner diameter of  $500\text{ }\mu\text{m}$ . (A1) and (A2) are the simulation and the experimental observation of the squeezing regime, respectively. (A3) and (A4) are the simulation and the experimental observation of the jetting regime, respectively. (B) Plots of droplet size (L/W) (B1) and droplet frequency ( $f_D$ ) (B2) versus  $(v_D/v_C)$  for given  $v_{TOT}$  in a  $500\text{ }\mu\text{m}$  ID channel after [27].



**Fig. 8.** Comparison of the evolution of chemical composition within droplets and the gradient of flow-rates. (A) Diagram of the 7-port junction with 2 closed ports. (B) Droplets formed by a gradient with only one variation of flow-rates for both dispersed phases and (C) Droplets formed by a flow-rate gradient with multiple repeated cycles.

as channel clogging. Compared to the commonly used premixing method, this method of direct mixing within microfluidic junction provides is preferable for screening at high-supersaturation conditions, where precipitation is frequently produced.

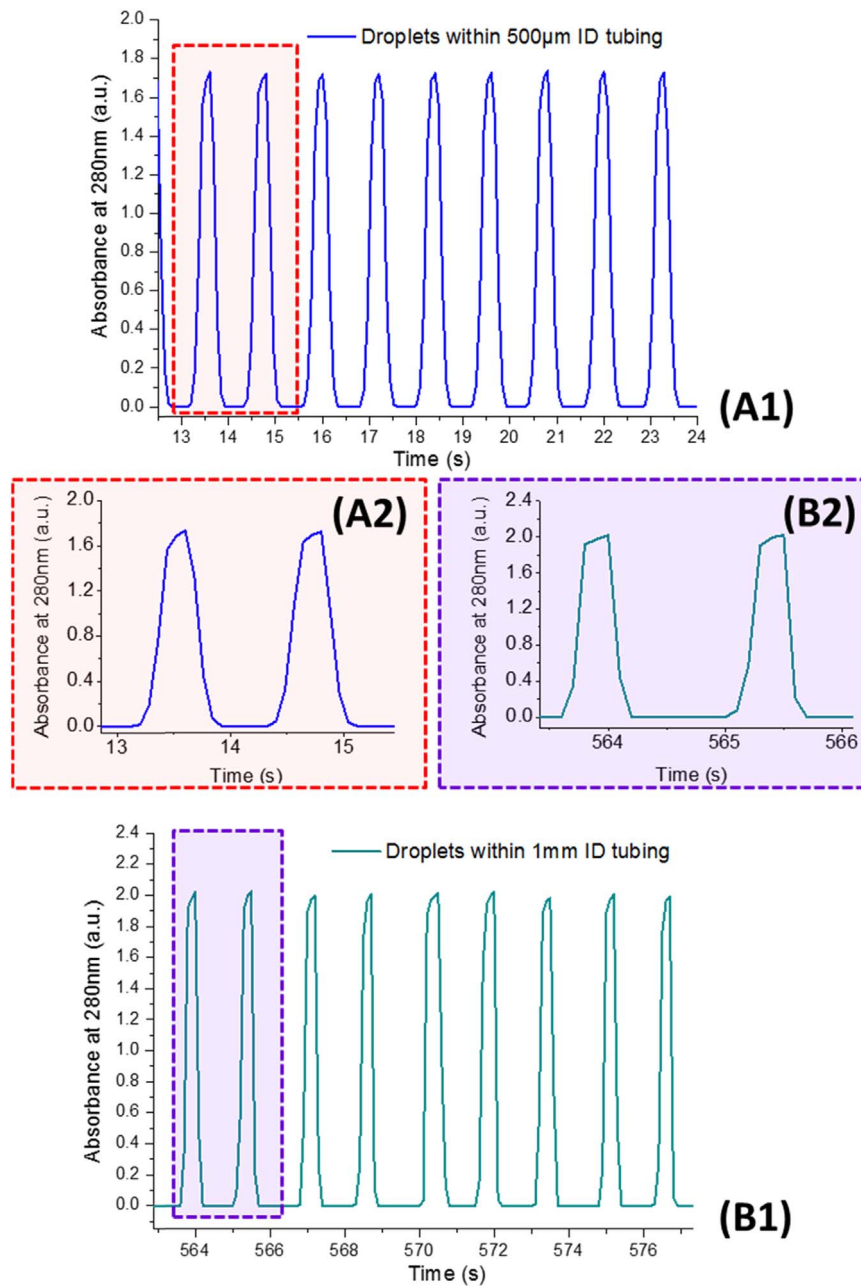
The interface between these two dispersed solutions is observed when the drop is formed (Fig. 6A). In our experiments, as the flow is laminar and convection-free due to negligible gravity, mixing proceeds solely by diffusion at the interface.

Mixing time inside droplets is described by  $t_{\text{mix}} = st^2/2D$ , where  $st$  (m) is the striation length, correlated with the channel width in this study, and  $D$  ( $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) the diffusion coefficient [32]. Mixing in droplets after their break-up is accelerated by droplets twirling [33] with the continuous flow, solely when droplets are spherical. Fig. 6B shows the mixing time observed for droplets of different lengths, circulating within a 1 mm ID channel. Obviously, droplet size is a crucial parameter, as we observe that the elongated droplets require a mixing time 4-fold longer than the spherical ones. Hence, droplet size should be matched to specific purpose:

- In elongated droplets, a sufficiently long diffusion time and a convection-free medium yield optimal crystal quality.
- Small droplets with complete and rapid mixing ensure reaction conditions in nucleation screening. However, droplets smaller than the channel width (inner diameter) are mobile in the tubing and risk to coalesce.

Another crucial factor is droplet frequency. Relatively low  $f_D$  (number of droplets per  $\text{s}^{-1}$ ) is required to reduce droplet coalescence and contamination in case of precipitation. However, in high-throughput gradient screening and optimization trials, the formation of a large number of droplets in long tubing is also required, with high values of  $f$  (number of droplets per cm). This is very challenging because droplets are unstable and tend to collapse while circulating in long tubing, due to the non-negligible hydraulic resistance.

Thus droplet characteristics are to be optimized to attain appropriate droplet mixing time, low mobility and low contamination. When dealing with new molecules or solvents in droplet microfluidic studies, the first question to be asked is, how can droplet characteristics (i.e., droplet size, frequency and chemical composition) be predicted with operational parameters such as flow-rates or velocities? In other words, what flow-rates should be applied in order to obtain the droplet characteristics of interest? The operational parameters are flow-rates of continuous and dispersed phases, which we represent with flow velocities  $v_D$  and  $v_C$  (flow velocity of dispersed and continuous flows, respectively). However, when dealing with new crystallization solutions in droplet generation experiments, flow properties (i.e. viscosity, interface tension between crystallization solution and oil) also need to be re-evaluated or measured. Hence, we take these flow properties into account by describing the capillary number,  $Ca = \frac{\mu_C \times v_C}{\gamma}$ , where  $\mu_C$  and  $v_C$  are the dynamic viscosity ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and the velocity (mm/s) of the continuous flow, and  $\gamma$  the interfacial tension ( $\text{kg}/\text{s}^2$ ) between the continuous and dispersed flow. To summarize, in our experiments,



**Fig. 9.** Real-time recordings of absorbance at 280 nm for different droplet assays. (A1) Droplets of lysozyme solution (13.97 mg/mL) within 500  $\mu\text{m}$  ID channel. Integration time is 80 ms. (B1) Droplets of lysozyme solution (8.12 mg/mL) within 1 mm ID channel. Integration time is 35 ms. (A2) and (B2) are enlarged recordings of (A1) in 12.8–15.7 s and (B1) in 562.8–566.2 s.

operational parameters are flow-rate ratios  $v_D/v_C$ , total flow-rates  $v_{TOT}$  ( $v_{TOT} = v_D + v_C$ ) and capillary numbers  $Ca$ .

In a previous study in our group, Candoni et al. investigated the hydrodynamic effects of operational parameters (i.e.,  $v_D/v_C$ ,  $v_{TOT}$  et  $Ca$ ) on droplet generation regimes and characteristics for PEEK & Teflon circular-channel systems with experiments and simulations, using T-junctions [27]. Empirical relations were determined to define the operating range that ensures homogeneous droplets of ethanol in FC70 oil. In this study, these results are used as an operating protocol of droplet generation without using surfactant. We select a continuous and a dispersed phase, and a droplet size and use the empirical relation to define the operating parameters. This method proves efficient for new solutions.

First, droplets need to be produced in a steady regime. According to Candoni et al., droplet regime behaviour is qualitatively similar for similar values of  $Ca$  in both simulations and experimental observations

(Fig. 7A) [27]. Squeezing and dripping regimes (Fig. 7 A1 and A2), observed at  $Ca \leq 0.2$ , have proved to be steady regimes with low risk of droplet coalescence. By contrast, a jetting regime, observed at  $Ca > 2$  and highly related to  $v_{TOT}$  (Fig. 7 A3 and A4), needs to be avoided: in this regime we observed high droplet mobility in the tubing and thus coalescence. Consequently, in order to produce the steady droplet regime, the viscosity and velocity of the continuous flow first need to be adjusted to maintain  $Ca$  smaller than 0.2. For oil with a given high viscosity, a steady regime can be defined at a range of low values of  $v_C$ . This range of  $v_C$  leads to a large range of  $v_{TOT}$  (according to  $v_D$ ), that we call range I.

The next step is to tune  $L/W$  and  $f_D$  (number of droplets per s), with the operating flow-rates inside the range I of  $v_{TOT}$ . Fig. 7B1 represents  $L/W$  versus  $(v_D/v_C)$  for given values of  $v_{TOT}$ . At a given value of  $v_{TOT}$ , the values of  $L/W$  increase linearly yet very slightly with the values of  $v_D/v_C$ . Obviously, however, these linear fitting curves of  $L/W$  depend

**Table 1**

Analysis and calculation of peak and droplet properties based on analyze of 60 and 113 droplets for 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm ID channel (absorbance at 280 nm). Peak properties analyzed: average of amplitude (h), width (t') and spacing (E). Calculation of droplet properties: measured lysozyme concentration ( $C_{\text{measured}}$ ), length (L) and frequency (f and  $f_D$ ). With  $v_{\text{TOT}}$  the total flow-rates.

Peak & droplet properties	Units	ID	
		500 $\mu\text{m}$	1 mm
h	a.u.	$1.73 \pm 0.01$	$2.04 \pm 0.02$
E	s	$0.64 \pm 0.06$	$0.62 \pm 0.07$
t'	s	$0.56 \pm 0.03$	$1.02 \pm 0.07$
$v_{\text{TOT}}$	mm/s	2.12	1.77
$C_{\text{measured}}$	mg/mL	13.11	7.50
L	mm	0.78	1.09
f	droplets/cm	5.10	3.54
$f_D$	droplets/s	$0.83 \pm 0.06$	$0.60 \pm 0.05$

more on  $v_{\text{TOT}}$ . Similar correlation is observed for  $f_D$ , which is correlated to the previously mentioned droplet frequency f (number of droplets per cm). However, it is interesting to note that the linear fitting curves of  $f_D$  versus  $v_D/v_C$  show a more increasing trend than those of L/W versus  $v_D/v_C$ . We refer to the scaling law and these linearity correlations in the operating method in a droplet trial. First, we run an experiment with  $v_{\text{TOT}}$  within range I. Then the value of  $v_{\text{TOT}}$  is adjusted according to droplet shape observed. After a suitable droplet size is obtained,  $f_D$  is to be adjusted with  $v_D/v_C$  according to the curve in Fig. 7B2, keeping  $v_{\text{TOT}}$  constant.

### 3.2. Off-line droplet chemical composition

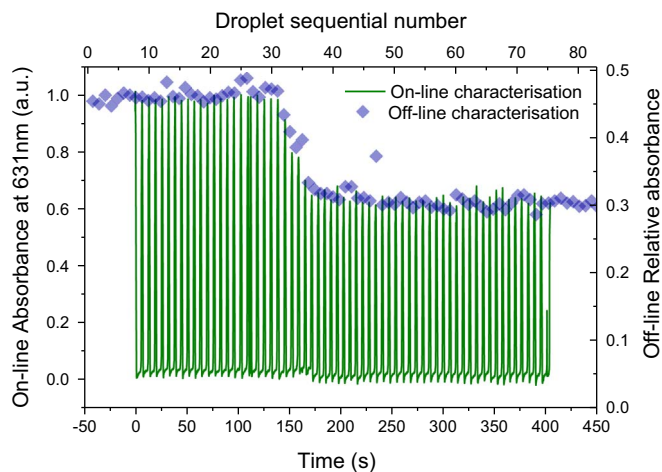
The feasibility of the fine-gradient experiment is firstly verified by the off-line characterization method using aqueous solutions of food dyes. A set of droplets is formed by mixing two food dye solutions (blue and yellow) using the 7-port junction (Fig. 8A). The FMS oil is injected continuously with a constant flow-rate of 4000  $\mu\text{L}/\text{h}$ . The food dye solutions are injected in Y direction. Unutilized ports of the junction are closed with plugs. The total flow-rates of the two to-be-mixed flows are set constant as well (500  $\mu\text{L}/\text{h}$ ). In a first step, a gradient of chemical composition within droplets is accomplished with only one variation of flow-rate for each aqueous flow. All droplets formed are collected manually and the relative absorbance at 430 nm (for blue dye) and 631 nm (for yellow dye) are analyzed. We compare the evolution of both values of absorbance within droplets with the utilized flow-rate gradient in Fig. 8B. The evolution of both absorbance values is highly consistent with the programmed flow-rates for both dispersed

flows. Nevertheless, as soon as the flow-rate switches to the second value, we observe a stabilization zone for the absorbance expressed within droplets. This stabilization zone is highly synchronized with the flow-rates of both dispersed phases. No matter what flow-rates we apply, the width of the stabilization zone remains the same ( $\sim 25$  droplets), showing that the equilibration time ( $\sim 20$  s) remains the same. However, we also observed that this equilibration time decreases with the inner diameter of the microfluidic junction. In a second step, another profile of progressive flow-rate gradient is achieved with multiple repeated cycles. We compare the evolution of the chemical composition within droplets with the gradient of flow-rates in Fig. 8C. The measurements of droplet chemical composition are correctly estimated by this method. However, the results provide a clear indication that the gradient of chemical composition within droplets is well correlated with the flow gradients of both dispersed phases. Thus, fine gradient screening is achievable using this microfluidic platform.

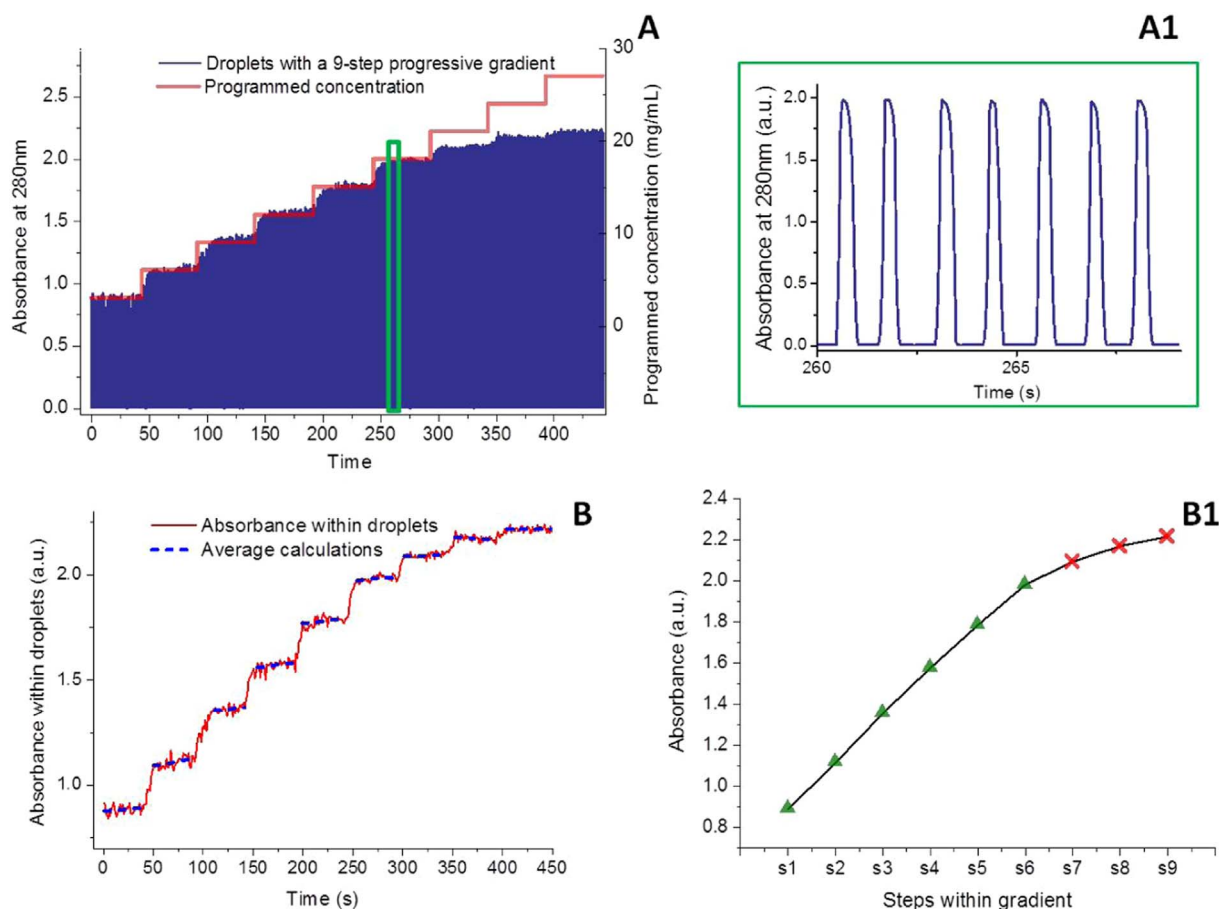
### 3.3. Real-time, in-situ UV monitoring of droplet characteristics

The real-time, in-situ UV monitoring of droplet chemical composition is achieved with our platform, utilizing the home-made UV cell. Droplets of lysozyme solution are used as model system. Here, again, no surfactant is added to the protein solution, the spherical shape of the droplets confirms there is no strong adsorption of protein at the interface between oil and protein solution. Parameters of measurements are optimized (integration time, boxcar width, scans to average, etc.) according to the flow-rate in order to achieve a good signal: noise ratio. Real-time absorbance at 280 nm is recorded for droplet assays within 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm ID tubings (Fig. 9). Since neither the tubing wall nor oil absorbs at 280 nm, the measurements of absorbance are calibrated with tubing filled with oil alone. Real-time signal of the absorbance remains zero when no droplets pass through the optical fibres. The transit of one droplet across the optical fibres results in one peak in the profile of real-time absorbance. Hence, transits of a sequence of droplets correspond to a sequence of peaks (Fig. 9A1 and B1).

Peak maximum occurs at the moment when the center of the droplet is exactly aligned with the UV beam center. At that moment, the droplet diameter corresponds to the hypothetical optical length (that is to say tube inner diameter). Thus, droplet concentration can be measured. Peak width and peak amplitude correspond to droplet size and relative concentration, respectively. Droplet spacing as well as frequency, i.e. number of droplets per second (f), number of droplets per centimeter ( $f_D$ ), can be analyzed with peak spacing and frequency, respectively. Table 1 shows the results of droplets properties obtained



**Fig. 10.** Comparison of on- and off-line characterization of absorbance at 631 nm within 1 mm ID tubing. Droplets are formed using the same flow-rates described in Fig. 8B. Integration time is 20 ms.



**Fig. 11.** On-line characterization for the droplet assay of lysozyme solutions with a progressive 9-step concentration gradient from 3 to 27 mg/mL. (A) Comparison of the programmed concentration gradient and the results of the on-line absorbance recordings. (A1) is enlarged recordings of (A) in 260–268 s (green rectangle). (B) On-line recording of absorbance within droplets, after data processing of (A). (B1) Evolution of average absorbance within each step of the flow-rate gradient.

from peak properties of droplet assays in Fig. 9. The measured lysozyme concentrations  $C_{\text{measured}}$  deviate by 6.1% and 7.6% from the real droplet concentrations for 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm ID tubing, respectively. This is due to the deviation between hypothetical and real optical lengths. Actually, the real optical length is always smaller than the hypothetical one (tubing ID), since the droplets do not fill the zone where the UV beam passes through the tubing because the droplets are surrounded by a film of oil and the tubing has a circular section rather than a square one.

However,  $C_{\text{measured}}$  is very useful to indicate the gradient of droplet chemical composition. We therefore used the on-line UV monitoring module to re-characterize the same gradient droplet assay as in Fig. 8B (with only one variation of flow-rates). We compare results of the on- and off-line characterization of absorbance at 631 nm in Fig. 10. Herein, we are not able to analyze the droplet concentration because we do not know the extinction coefficient of the food dye. Nevertheless, the evolutions of droplet concentration are identical for on- and off-line characterization.

The on-line characterization of a progressive concentration gradient is carried out with the real-time UV monitoring module, by generating droplets of lysozyme with gradients from 3 to 27 mg/mL, using 9 steps of 3 mg/mL each, within 1mmID tubing using a cross-junction. Two dispersed flows, lysozyme (30 mg/mL) and buffer solution (sodium acetate, pH=4.5), are mixed into droplets. Fig. 11A compares the programmed concentrations and the online absorbance recording results. We found that the online monitoring results of relative absorbance within droplets are well correlated to the programmed concentrations from 0 to 300 s, which correspond to the concentration range of 3–18 mg/mL. For high concentrations of lysozyme (from

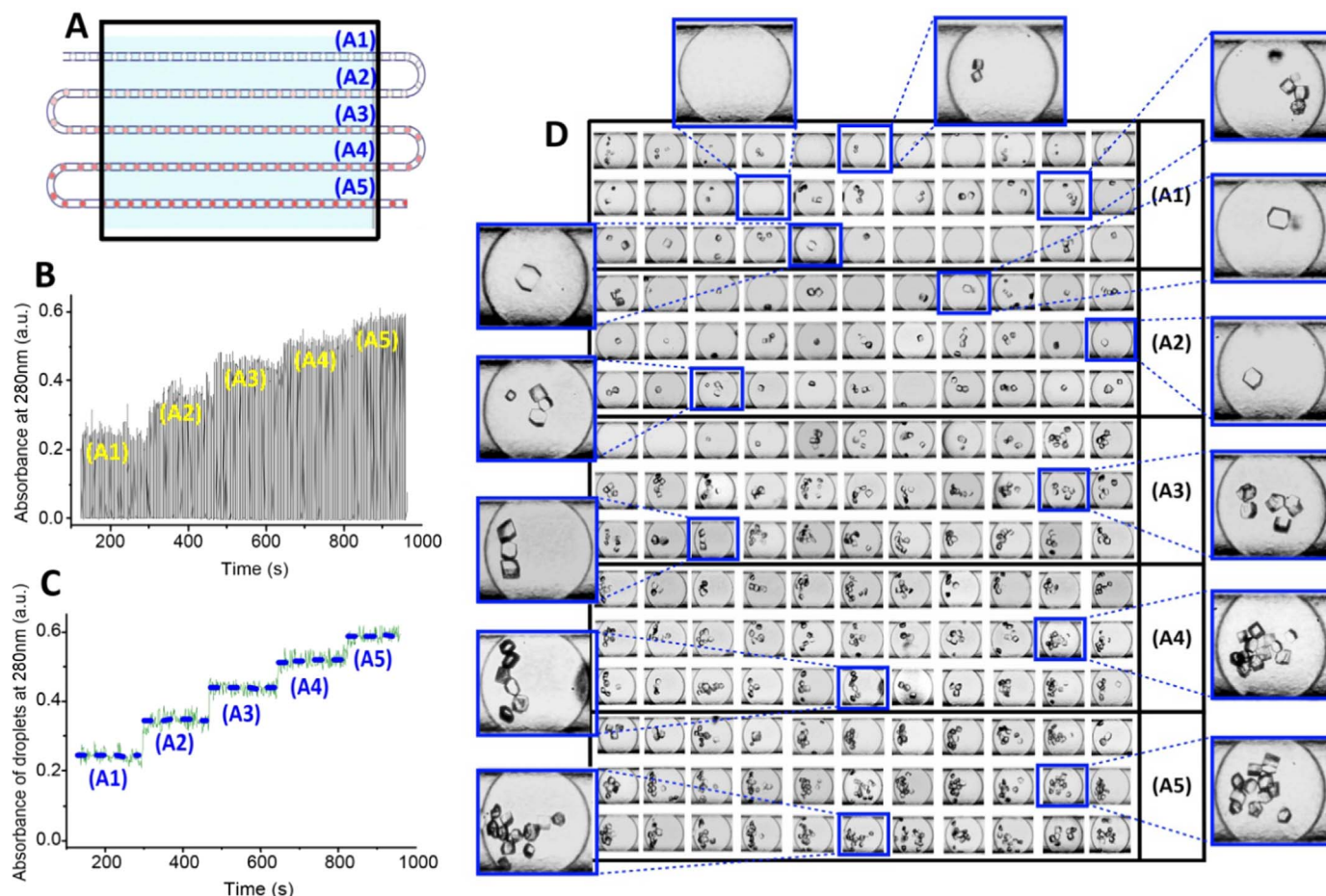
300 s or 21 mg/mL), the absorbance measurements are saturated. With data treatment and calculations of the average absorbance within each step, we found that the evolution of absorbance within droplets is linear up to step 6 (18 mg/mL). This is in accordance with the linear behaviour given by Beer-Lambert's law at low concentrations (Fig. 11B and B1). The measuring range could be enlarged by using optical fibres with smaller diameters, reducing droplet diameter and working with other tubing wall material (optical properties and thickness of tubings).

#### 3.4. Fine-gradient screening and optimization of crystallization conditions

As we have mentioned, one of the toughest issues in droplet microfluidic experiments is the precise handling of solutions with various physico-chemical properties, i.e., viscosity, interface energy, wettability to the tubing wall. Thus, our platform needs to meet more challenging situations of liquid handling and fluidic environment such as membrane proteins. Membrane proteins require agents of crystallization and detergents to solubilize in water. Therefore, we first used lysozyme as model protein (not as complex as membrane proteins) to demonstrate the handling of solutions of viscous precipitants (PEG 5k) and detergent ( $C_{10}E_5$ ) and the feasibility of our platform for fine-gradient screening and optimization.

Preliminary screening is carried out using the microbatch method [11]. To that end, two parameters were varied: concentration of lysozyme from 5 to 40 mg/mL, percentage of PEG 5k from 5% to 20%. It should be noted that the detergent concentration was maintained constant at 0.08%.

This preliminary screening establishes a large range of potentially



**Fig. 12.** Fine-gradient optimization of lysozyme crystallized in aqueous solutions of PEG 5k (15% wt/vol), 0.5 M NaCl and C10E5 (0.08% wt/vol). 5 steps of lysozyme concentration are (A1) 5 mg/mL, (A2) 7.5 mg/mL, (A3) 10 mg/mL, (A4) 12.5 mg/mL and (A5) 15 mg/mL. 500  $\mu\text{m}$  ID tubing and junction is used. (A) Schematic illustration of droplets formed by the gradient used. (B) Online recording of absorbance at 280 nm. (C) Data treatment of (B), which is the online recording of absorbance within droplets. (D) Mapping of crystal morphogram using the 5-step fine gradient (A1–A5).

optimal conditions (5–15 mg/mL lysozyme, 15% wt/vol PEG 5k, 0.5 M NaCl, 0.08% wt/vol C<sub>10</sub>E<sub>5</sub>) that lead to high quality crystals. Subsequent gradient optimization is carried out with our droplet microfluidic platform within the optimal conditions range established by the microbatch method (Fig. 12A). 500  $\mu\text{m}$  ID tubing and 7-port junction are used. The dispersed phases are introduced into the three side channels and the continuous phase is injected into the central channel. The operating parameters were selecting using the correlation of Fig. 7B1 assuming that the effect of the input flowrate in the three side channel for dispersed phase is equivalent to the sum of the input flowrates in a single channel. Experimental operating parameters are given in Table 2. The parameters that can be varied are the concentrations of the ingredients composing the crystallization solution. We set up the fine gradient by using the approach in which one single parameter, protein concentration in this case, is fine-tuned and indexed at one time. Screening of various parameters could be achieved

**Table 2**

Flowrate of the different solutions ( $\mu\text{L}/\text{h}$ ).

Step name and concentration	40 mg/mL lysozyme 0.08% wt/vol C <sub>10</sub> E <sub>5</sub>	80 mM acetate buffer 0.08% wt/vol C <sub>10</sub> E <sub>5</sub>	30% wt/vol PEG 5k 1 M NaCl	FMS
(A1) 5 mg/mL	32.5	97.5	130.0	570.0
(A2) 7.5 mg/mL	48.8	81.2		
(A3) 10 mg/mL	65.0	65.0		
(A4) 12.5 mg/mL	81.2	48.8		
(A5) 15 mg/mL	97.5	32.5		

subsequently. A 5-step concentration gradient of the lysozyme (5–15 mg/mL) is set up by keeping the concentration of PEG 5 K and C<sub>10</sub>E<sub>5</sub> constant. This 5-step gradient leads to an approximate total of 200 droplets in tubing of 2 m approximate length. The whole droplet trial was set up within 1 h, consuming solely 50  $\mu\text{L}$  of lysozyme substrate solution. Since all droplets are optimized using the hydrodynamic operating method described above, they have identical sizes, frequencies, spacing, etc. Consequently, varying only one ingredient in the same volume of crystallization solution leads to comparable and precise mapping in the crystal phase diagram. Real-time monitoring of droplets is carried out at the same time as droplet formation (Fig. 12B & C). Droplet incubation and in-situ observation are accomplished after 24 h of incubation at 20 °C (Fig. 12D). We carefully determined the crystal morphogram and mapped out the transition from mono- to multi-nucleation of crystals for increasing protein concentrations. For instance, mononucleation leads to the growth of large single crystals (> 50  $\mu\text{m}$ ) (insert in Fig. 12DA1, A2 and A3). We also observed an increasing number of crystallized droplets with increasing protein concentration. This fine-gradient optimization provides us further optimal conditions (7.5 mg/mL lysozyme, 15% wt/vol PEG 5k, 0.08% wt/vol C<sub>10</sub>E<sub>5</sub>) that lead to high quality crystals.

#### 4. Conclusion

In this paper, we described a universal, high-throughput droplet microfluidic platform for crystallization. The platform offers four modular functions – droplet formation, on-line real-time UV charac-



terization, incubation and observation. First, we validated the generation of droplet arrays with a concentration gradient in continuous long tubing without using surfactant. We controlled droplet properties (size, frequency and spacing) in long tubing by using the hydrodynamic operating method previously described [27]. Our droplet platform successfully handles the complicated chemical environment of membrane proteins and is therefore likely to perform well in other circumstances. We validated the platform for fine-gradient screening and optimization of crystallization conditions. Using only 10  $\mu\text{L}$  of a substrate solution, a fine-gradient screen of up to 200 trials can be set up to sample concentration conditions over a 6-fold range by one single operator within one hour. The optimized conditions could be scaled up to obtain larger crystals for structure determination with XRD study. In addition, we expect other on-line detection methods to be integrated into this platform in the future, for instance, on-line diffraction technique. We believe this method could find applications in various fields such as fluid interaction engineering, live cell study, enzyme kinetics.

### Acknowledgments

We thank the Institut de Recherche Servier and ANR BAcMolMot (ANR-14-CE09-0023-03) for financial support. We thank T. Bactivelane (CINaM), M. Lagaize (CINaM) and M. Audiffren (ANACRISMAT) for technical assistance. We thank Marjorie Sweetko for English revision.

### References

- [1] Z. Hammadi, R. Grossier, S. Zhang, A. Ikni, N. Candoni, R. Morin, S. Veessler, Localizing and inducing primary nucleation, *Faraday Discuss.* 179 (2015) 489–501.
- [2] J. Leng, J.B. Salmon, Microfluidic crystallization, *Lab Chip* 9 (2009) 24–34.
- [3] C. Hansen, S.R. Quake, Microfluidics in structural biology: smaller, faster... better, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13 (2003) 538–544.
- [4] R.C. Stevens, High-throughput protein crystallization, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000) 558–563.
- [5] K.C. Bhargava, B. Thompson, N. Malmstadt, Discrete elements for 3D microfluidics, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 15013–15018, 2014.
- [6] M. van der Woerd, D. Ferree, M. Pusey, The promise of macromolecular crystallization in microfluidic chips, *J. Struct. Biol.* 142 (2003) 180–187.
- [7] N. Candoni, R. Grossier, Z. Hammadi, R. Morin, S. Veessler, *Pract. Phys. Grow. Cryst. Biol. Macromol. Protein Pept. Lett.* 19 (2012) 714–724.
- [8] F.R. Salemme, A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography, *Arch. Biochem. Biophys.* 151 (1972) 533–539.
- [9] F. Otálora, J.A. Gavira, J.D. Ng, J.M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods applied to protein crystallization, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 101 (2009) 26–37.
- [10] A. McPherson, The Growth and Preliminary Investigation of Protein and Nucleic Acid Crystals for X-ray Diffraction Analysis, in: *Methods of Biochemical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., 2006, pp. 249–345.
- [11] N.E. Chayen, P.D. Shaw Stewart, D.M. Blow, Microbatch crystallization under oil – a new technique allowing many small-volume crystallization trials, *J. Cryst. Growth* 122 (1992) 176–180.
- [12] C.L. Hansen, E. Skordalakes, J.M. Berger, S.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 16531–16536, 2002.
- [13] W. Du, L. Li, K.P. Nichols, R.F. Ismagilov, *SlipChip Lab Chip* 9 (2009) 2286–2292.
- [14] K. Dhoub, C. Khan Malek, W. Pfleging, B. Gauthier-Manuel, R. Duffait, G. Thuillier, R. Ferrigno, L. Jacquemet, J. Ohana, J.-L. Ferrer, A. Theobald-Dietrich, R. Giege, B. Lorber, C. Sauter, Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis, *Lab Chip* 9 (2009) 1412–1421.
- [15] M. Ildefonso, E. Revalor, P. Punniyam, J.B. Salmon, N. Candoni, S. Veessler, Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool, *J. Cryst. Growth* 342 (2012) 9–12.
- [16] M. Ildefonso, N. Candoni, S. Veessler, Using microfluidics for fast, accurate measurement of lysozyme nucleation kinetics, *Cryst. Growth Des.* 11 (2011) 1527–1530.
- [17] C.J. Gerdt, V. Tereshko, M.K. Yadav, I. Dementieva, F. Collart, A. Joachimiak, R.C. Stevens, P. Kuhn, A. Kossiakoff, R.F. Ismagilov, Time-controlled microfluidic seeding in nL-volume droplets to separate nucleation and growth stages of protein crystallization, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 8156–8160.
- [18] G.M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature* 442 (2006) 368–373.
- [19] D.J. Beebe, J.S. Moore, J.M. Bauer, Q. Yu, R.H. Liu, C. Devadoss, B.-H. Jo, Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels, *Nature* 404 (2000) 588–590.
- [20] M.A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, Monolithic micro-fabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, *Science* 288 (2000) 113–116.
- [21] J.C. McDonald, G.M. Whitesides, Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 491–499.
- [22] K.A. Shaikh, K.S. Ryu, E.D. Goluch, J.-M. Nam, J. Liu, C.S. Thaxton, T.N. Chiesl, A. E. Barron, Y. Lu, C.A. Mirkin, C. Liu, A modular microfluidic architecture for integrated biochemical analysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 9745–9750, 2005.
- [23] P.K. Yuen, SmartBuild-A truly plug-n-play modular microfluidic system, *Lab Chip* 8 (2008) 1374–1378.
- [24] V. Trivedi, A. Doshi, G.K. Kurup, E. Ereifej, P.J. Vandevord, A.S. Basu, A modular approach for the generation, storage, mixing, and detection of droplet libraries for high throughput screening, *Lab Chip* 10 (2010) 2433–2442.
- [25] M. Ildefonso, N. Candoni, S. Veessler, A. Cheap, Easy microfluidic crystallization device ensuring universal solvent compatibility, *Org. Process Res. Dev.* 16 (2012) 556–560.
- [26] H. Bruus, *Governing Equations in Microfluidics*, in: *Microscale Acoustofluidics*, The Royal Society of Chemistry, 2015, pp. 1–28.
- [27] S. Zhang, C. Guivier-Curien, S. Veessler, N. Candoni, Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics, *Chem. Eng. Sci.* 138 (2015) 128–139.
- [28] Z. Hammadi, N. Candoni, R. Grossier, M. Ildefonso, R. Morin, S. Veessler, Small-volumes nucleation, *C. R. Phys.* 14 (2013) 192–198.
- [29] J.P. Laffeur, D. Snakenborg, S.S. Nielsen, M. Moller, K.N. Toft, A. Menzel, J.K. Jacobsen, B. Vestergaard, L. Arleth, J.P. Kutter, Automated microfluidic sample-preparation platform for high-throughput structural investigation of proteins by small-angle X-ray scattering, *J. Appl. Crystallogr.* 44 (2011) 1090–1099.
- [30] P.J. Kitson, M.H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, L. Cronin, Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic 'lab on a chip' reactionware devices, *Lab Chip* 12 (2012) 3267–3271.
- [31] S. Zhang, N. Ferté, N. Candoni, S. Veessler, Versatile microfluidic approach to crystallization, *Org. Process Res. Dev.* 19 (2015) 1837–1841.
- [32] J.D. Tice, A.D. Lyon, R.F. Ismagilov, Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 73–77.
- [33] J.D. Tice, H. Song, A.D. Lyon, R.F. Ismagilov, Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers, *Langmuir* 19 (2003) 9127–9133.

## Résumé

Cette thèse porte sur le développement d'une plateforme microfluidique polyvalente pour la cristallisation des protéines alliant études statistiques, économie de matière, rapidité d'exécution et facilité d'utilisation. L'objectif est de développer un outil unique pour répondre aux différentes problématiques de la cristallisation des protéines : l'identification d'une condition de cristallisation robuste via le criblage et l'optimisation, ainsi que la co-cristallisation d'une protéine et de ligands pour le *structure-based drug design*. Pour cela, une méthode microfluidique versatile à base de gouttes et sans tensioactif est utilisée. Elle permet la génération de centaines voire milliers de gouttes de quelques nanolitres dans lesquelles la cristallisation peut avoir lieu indépendamment. La composition des gouttes est contrôlée par les débits des différentes solutions à l'aide de pousse-seringues programmables et vérifiée en ligne par spectrométrie UV-visible. De nombreuses conditions de cristallisation différentes peuvent ainsi être testées rapidement : nature et concentration de(s) agent(s) de cristallisation, ajout d'un ligand, etc. De plus, les cristaux obtenus à l'aide de cette plateforme microfluidique sont caractérisés *in situ* et *ex situ* par diffraction des rayons X.

Cette plateforme est appliquée à la cristallisation de deux protéines, tout d'abord une protéine modèle, le lysozyme, puis une protéine d'intérêt pharmaceutique, la quinone réductase de type 2. Ainsi, nous avons développé un outil adapté aux contraintes de l'industrie pharmaceutique qui peut être transféré dans un laboratoire de recherche pour une utilisation de routine par des non-spécialistes de la microfluidique. La plateforme permet d'avoir une approche de criblage à haut débit, ou HTS, et de tendre vers l'automatisation à la fois du criblage et de la diffraction des rayons X.

## Abstract

The aim of this work is the development of a versatile microfluidic platform for protein crystallization, combining statistical studies, material saving, speed of execution and ease of use. The aim is to develop a unique tool to address the different issues of proteins crystallization: identification of a robust crystallization condition via screening and optimization, and co-crystallization of a protein with ligands for structure-based drug design. For this purpose, a versatile droplet-based microfluidic method without adding any surfactant is used. It allows the generation of hundreds or even thousands of droplets of a few nanoliters in which the crystallization takes place independently. Droplets composition is controlled by the flow rates of the different solutions using programmable syringe pumps and checked on-line by UV-visible spectroscopy. Many different crystallization conditions can thus be tested quickly: nature and concentration of crystallization agent(s), addition of a ligand, etc. In addition, the crystals obtained using this microfluidic platform are characterized *in situ* and *ex situ* by X-ray diffraction.

The platform is applied to the crystallization of two proteins, first a model protein, lysozyme, and then a protein of pharmaceutical interest, quinone reductase 2. Thus we have developed a tool suitable to constraints of pharmaceutical industry, in order to be transferred to research laboratories for routine use by non-specialists of microfluidics. This platform permits a high throughput screening approach, or HTS, and tends to the automation of both screening and X-ray diffraction.