



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

M. DIMITRI RADAJEWSKI

le vendredi 13 octobre 2017

Titre :

Etudes de nucléation de protéines à l'aide de dispositifs expérimentaux
microfluidiques

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME BEATRICE BISCANS

M. SEBASTIEN TEYCHENE

Rapporteurs :

M. JEAN-BAPTISTE SALMON, UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

M. STEPHANE VEESLER, UNIVERSITES D'AIX-MARSEILLE ET DE TOULON

Membre(s) du jury :

M. STEPHANE VEESLER, UNIVERSITES D'AIX-MARSEILLE ET DE TOULON, Président

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit est la concrétisation de trois années et demie de travail. Mais pas seulement. Ces années ont également été marquées de moments de partage, de joie, et de rigolade. Je souhaite par conséquent remercier ici les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce projet, aussi bien d'un point de vue professionnel, que personnel.

Mes premiers remerciements sont adressés à mes directeurs de thèse, Béatrice BISCANS et Sébastien TEYCHENE. Un grand merci à vous pour votre soutien, votre écoute, votre confiance, et vos précieux conseils. Ce travail n'aurait pas pu se faire sans l'apport de vos connaissances scientifiques qui m'ont aidé à tenir le cap tout au long de ces années. Au-delà de l'aspect professionnel, nous avons également partagé des moments de vie, et je peux aujourd'hui me vanter d'avoir rencontré deux personnes humainement remarquables.

Je tiens ensuite à remercier Françoise BONNETE qui a su me faire profiter de ses connaissances et qui a contribué à la réalisation de ce travail. Merci pour ton aide, ton implication, et aussi pour le courage dont tu as fait preuve pour braver la longueur des journées/nuits grenobloises. Tu as également été la personne sur qui j'ai pu compter pour m'aider, me guider, et me rassurer, lorsque j'ai été propulsé dans mon premier congrès international à Hambourg. Pour toutes ces raisons et tant d'autres, merci à toi.

Concernant les nuits grenobloises, je souhaite bien entendu également remercier toutes les personnes qui nous ont accueillis et qui nous ont aidés dans un environnement qui m'était jusque-là inconnu. Merci alors aux personnes travaillant sur la ligne BM29 de l'ESRF et particulièrement à Petra PERNOT, Martha BRENNICH et Adam ROUND pour le temps et l'énergie que vous avez consacré à la poursuite de ce projet.

Je souhaite de même remercier les personnes qui nous ont accueillis sur la ligne SWING à SOLEIL et qui ont été d'une aide précieuse aussi bien sur le plan technique, que scientifique. Ainsi, merci à Javier PEREZ, Thomas BIZIEN, Aurélien THUREAU et Youssef LIATIMI.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Génie Chimique. C'était un plaisir de travailler à vos côtés au cours de ces années. Mes remerciements vont alors à l'équipe technique du LGC, pour l'aide fournie aux doctorants et à l'ensemble du personnel. Merci à Ignace COCHE pour son savoir-faire précieux qui a été d'une grande aide. Je remercie également Kévin ROGER, avec qui j'ai pu avoir d'intéressantes discussions autour du projet, que ce soit au laboratoire, ou à ID02 et qui a pu apporter un œil extérieur aux expériences. Merci aussi à Florent BOURGEOIS, d'avoir participé au développement du modèle de nucléation qui m'a été d'une grande utilité dans ces travaux. Egalement merci à Jean-Luc TROMPETTE pour les discussions échangées, en français ou en polonais. Enfin, je remercie grandement Alain PHILIP pour l'attention bienveillante qu'il accorde au bien-être des membres du laboratoire et pour sa bonne humeur communicative.

Mes prochains remerciements sont adressés aux étudiants avec qui j'ai partagé de très bons moments. Merci d'abord à Kemie qui m'a accueilli, et avec qui j'ai partagé un bureau, et des moments de rigolade. Je remercie aussi, pour les moments agréables passés ensembles, les doctorants de l'équipe et du labo de cristallisation, Norinda, Cham, Audrey, Brice, Marina, Sara,

Alex et Dima. J'adresse également d'immenses remerciements à mes partenaires et amis Isaac et Nhất qui sont très certainement les personnes avec qui j'ai passé le plus de temps, aussi bien au laboratoire, qu'en dehors, et dont je garde d'incroyables souvenirs, en attendant de les revoir, en France, en Espagne, au Vietnam ou ailleurs.

Enfin, mes derniers remerciements vont tout naturellement à mes proches, mes amis, et l'ensemble de ma famille. Merci à mes parents et à mes frères. On ne s'est pas beaucoup vu ces dernières années mais je n'ai eu de cesse de penser à vous. Merci pour votre soutien et votre amour.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
SOMMAIRE	9
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE I ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	23
I.1 GENERALITES SUR LA CRISTALLISATION.....	25
I.1.1 <i>Aspects thermodynamiques de la cristallisation</i>	25
I.1.2 <i>Nucléation</i>	26
I.1.3 <i>Croissance</i>	27
I.2 LES MECANISMES DE NUCLEATION	29
I.2.1 <i>Théorie classique de la nucléation</i>	29
I.2.2 <i>Mécanisme de nucléation en deux étapes</i>	36
I.2.2.1 <i>Origine du mécanisme</i>	36
I.2.2.2 Observations expérimentales du mécanisme en deux étapes	39
Diffusion de la lumière	39
Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)	41
I.2.3 <i>Conclusion sur les mécanismes de nucléation</i>	46
I.3 LA MICROFLUIDIQUE	48
I.3.1 <i>Origines et généralités de la microfluidique</i>	48
I.3.1.1 Intérêts pour la microfluidique.....	48
I.3.1.2 Matériaux de fabrication	49
I.3.1.3 Propriétés des systèmes microfluidiques	50
Temps caractéristiques	50
Rapport surface/volume élevé.....	51
Nombre adimensionnels caractéristiques	52
I.3.1.4 Ecoulements monophasiques.....	54
I.3.1.5 Ecoulements diphasiques	56
I.3.2 <i>Détermination de cinétiques de nucléation</i>	61
I.3.2.1 A partir de mesures de temps d'induction	61
I.3.2.2 Méthodes plus sophistiquées.....	61
I.3.2.3 Méthodes microfluidiques	63
I.3.3 <i>Couplage de la microfluidique avec des techniques d'analyse par rayons X</i>	67
I.4 CONCLUSION SUR LES ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES.....	71
CHAPITRE II PROTEINES ET DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES.....	73
II.1 SOLUTIONS DE PROTEINE	75
II.1.1 <i>Rasburicase</i>	75
II.1.2 <i>Glucose isomérase</i>	79
II.1.3 <i>Lysozyme</i>	82
II.1.3.1 Purification	85
II.1.3.2 Concentration.....	86
II.2 FABRICATION DES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES.....	88
III.2.1 <i>Design et fabrication des moules rigides</i>	88
III.2.1.1 Matériel utilisé	88
III.2.1.2 Préparation du substrat.....	89
III.2.1.3 Laminage des films secs.....	90

III.2.1.4	Exposition à la lumière UV.....	90
III.2.1.5	Développement de la résine non réticulée	92
III.2.1.6	Modification des propriétés surfaciques du moule rigide.....	93
III.2.2	<i>Fabrication des moules souples en PDMS.....</i>	<i>93</i>
III.2.3	<i>Fabrication des puces microfluidiques</i>	<i>95</i>
III.2.3.1	Puce en PDMS support verre.....	95
	Fabrication	95
	Modification de surface	96
	Avantages/Inconvénients	97
III.2.3.2	Puces en OSTEMER.....	98
	Le matériau OSTEMER	98
	Puce en OSTEMER avec support en verre.....	98
	Traitement de surface.....	99
	Puce en OSTEMER avec fenêtres en Kapton.....	101
III.2.3.3	Conclusions sur les dispositifs microfluidiques et leur utilisation	104
	Connectiques	105
	Alimentation des puces, contrôle en température et observation.....	105
CHAPITRE III ECHELLE MACROSCOPIQUE CINETIQUES DE NUCLEATION		109
III.1	THEORIE ET MODELES DE NUCLEATION PROBABILISTES.....	112
III.1.1	<i>Origine du modèle : loi de Poisson et modèle de Pound et La Mer.....</i>	<i>112</i>
III.1.2	<i>Modèle d'Akella et Fraden</i>	<i>116</i>
III.1.3	<i>Modèle de Bourgeois et al.</i>	<i>119</i>
III.2	PRESENTATION DU SYSTEME MICROFLUIDIQUE.....	122
III.2.1	<i>Choix des matériaux pour la puce microfluidique</i>	<i>122</i>
III.2.2	<i>Design de la puce</i>	<i>122</i>
	III.2.2.1 Insertion des fluides et zone de mélange.....	123
	III.2.2.2 Formation des gouttes dans la zone de stockage.....	126
III.2.3	<i>Contrôle de la température du système.....</i>	<i>128</i>
III.3	EXPERIENCES REALISEES	131
III.3.1	<i>Présentation des résultats expérimentaux.....</i>	<i>132</i>
	III.3.1.1 Expérience réalisée à 20°C	133
	III.3.1.2 Expérience réalisée à 15,5°C	134
	III.3.1.3 Expérience à 14,5°C.....	135
	III.3.1.4 Expérience réalisée à 13,5°C	136
	III.3.1.5 Expérience à 12,5°C.....	137
	III.3.1.6 Expérience à 10,5°C.....	137
	III.3.1.7 Récapitulatif des expériences.....	140
III.3.2	<i>Régressions avec les trois paramètres m, k_0 et k variables</i>	<i>141</i>
III.3.3	<i>Régressions avec le paramètre m fixé</i>	<i>142</i>
	III.3.3.1 Expérience réalisée à 20°C	143
	III.3.3.2 Expérience réalisée à 15,5°C	144
	III.3.3.3 Expérience réalisée à 14,5°C	145
	III.3.3.4 Expérience réalisée à 13,5°C	146
	III.3.3.5 Expérience réalisée à 12,5°C	147
	III.3.3.6 Expérience réalisée à 10,5°C	148
	III.3.3.7 Récapitulatif et discussion sur les résultats.....	149
III.3.4	<i>Analyse des paramètres cinétiques à l'aide de la théorie classique</i>	<i>150</i>

III.3.4.1	<i>Régression des paramètres de nucléation</i>	154
III.3.4.2	<i>Estimation de la tension interfaciale cristal/solution</i>	154
III.3.4.3	<i>Estimation de la barrière énergétique à franchir</i>	155
III.3.4.4	<i>Estimation de la taille du nucleus critique</i>	156
III.3.4.5	<i>Estimation de la densité de sites de nucléation</i>	157
III.3.5	<i>Analyse des paramètres cinétiques à l'aide des fluctuations de concentration.</i>	159
III.3.5.1	Compressibilité isotherme et décomposition spinodale	159
III.3.5.2	Décomposition spinodale et fluctuations de concentration	160
III.3.6	<i>Conclusion des expériences</i>	162
CHAPITRE IV ECHELLE MICROSCOPIQUE DIFFUSION DE RAYONS X AUX PETITS ANGLES		165
IV.1	PRINCIPE ET THEORIE DE LA TECHNIQUE SAXS	168
IV.1.1	<i>Considérations mathématiques en milieu dilué</i>	169
IV.1.2	<i>Loi de Guinier et rayon de giration</i>	171
IV.1.3	<i>Particules en interaction</i>	172
IV.1.4	<i>Interactions entre protéines</i>	173
IV.2	PRESENTATION DES LIGNES SYNCHROTRON	176
IV.2.1	<i>Ligne BM29 à l'ESRF</i>	176
IV.2.2	<i>Ligne SWING à SOLEIL</i>	177
IV.3	ETUDES SUR LA LIGNE BM29 A L'ESRF	179
IV.3.1	<i>Présentation des montages sur la ligne BM29</i>	179
IV.3.1.1	Dispositif 1 : mélange et envoi direct à température ambiante	180
IV.3.1.2	Dispositif 2 : mélange, mesure de concentration en ligne et envoi à température ambiante	180
IV.3.1.3	Dispositif 3 : mélange, mesure de concentration en ligne, stockage et envoi avec un capillaire thermostaté	182
	By-pass et stockage des gouttes	182
	Contrôle en température	183
IV.3.1.4	Acquisition/traitement des données	185
IV.3.2	<i>Premières études sans cristallisation</i>	187
IV.3.2.1	Validation des composants du dispositif	187
	Huile	187
	Tensioactif	187
IV.3.2.2	Mesure de concentration en ligne et études SAXS correspondantes	190
	Partie optique et mesures de concentrations	190
	Partie SAXS et mesures d'interactions macromoléculaires	192
IV.3.2.3	Etudes d'interactions inter-protéines	196
IV.3.3	<i>Etudes avec cristallisation</i>	202
IV.3.3.1	Cristallisation de la glucose isomérase	202
	Mécanisme de déplétion	202
	Cristallisation de la glucose isomérase	203
IV.3.3.2	Cristallisation du lysozyme à différents endroits du diagramme de phase	206
	Lysozyme à 60 mg/mL (loin de la séparation liquide-liquide)	207
	Lysozyme à 100 mg/mL (proche de la séparation liquide-liquide)	209
IV.3.4	<i>Conclusion sur les expériences sur la ligne BM29</i>	211
IV.4	ETUDE SUR LA LIGNE SWING A SOLEIL	213
IV.3.5	<i>Présentation du montage expérimental</i>	213
IV.3.6	<i>Expériences et résultats</i>	218

IV.3.7	<i>Conclusion de l'expérience sur SWING</i>	221
IV.4	CONCLUSION	223
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	225
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233
	LISTE DES FIGURES	249
	LISTE DES TABLEAUX	256

INTRODUCTION GENERALE

La cristallisation correspond au passage d'un état désordonné liquide ou gazeux à un état ordonné solide. Les exemples de cristallisation que l'on retrouve dans la nature sont nombreux et variés et peuvent être réalisés sur des périodes extrêmement longues, lors de la formation de stalactites par exemples, ou sur des périodes bien plus courtes, lors de la formation de flocons de neige.

En génie des procédés, c'est une des opérations unitaires la plus ancienne, qui permet d'obtenir un produit sous sa forme solide cristallin. Elle est utilisée pour isoler un produit, et le purifier tout en lui donnant des propriétés contrôlées. On retrouve ainsi ce procédé dans de nombreuses industries, comme les industries pharmaceutiques (pour la purification de principes actifs par exemple), les industries cosmétiques, les industries agroalimentaires, etc.

La fabrication de cristaux est particulièrement intéressante dans le domaine de la biologie et de la biochimie. En effet, toutes les cellules vivantes contiennent des protéines, qui sont possiblement les molécules les plus actives dans les organismes vivants. On retrouve par exemple parmi ces protéines, les enzymes, qui sont notamment capables de catalyser des réactions chimiques avec une grande spécificité. Nous pouvons également citer les protéines de défense, comme les anticorps, qui permettent de lutter contre les systèmes infectieux. Nous avons également les protéines structurelles, qui procurent raideur et rigidité à des constituants biologiques, comme le collagène, ou la kératine. Comme dernier exemple, nous pouvons évoquer les protéines membranaires, qui se positionnent sur la membrane des cellules et permettent par exemple de faire transiter des molécules d'intérêt entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Cette liste, non exhaustive, de quelques types de protéines, illustre leur intérêt particulier dans les organismes vivants. Ces protéines comportent la plupart du temps un site actif qui permet d'effectuer les actions évoquées précédemment. Les anticorps possèdent ainsi une partie agencée de telle façon qu'ils sont capables de neutraliser tel ou tel agent infectieux. Les protéines membranaires ont des sites actifs en forme de canal qui permet de laisser passer certaines molécules. Afin de comprendre le mode d'action d'une protéine, il est par conséquent nécessaire de connaître la structure de cette dernière et en particulier celle de son (ou de ses) site(s) actif(s).

La résolution de structure de protéines appartient au domaine de la biologie structurale. Pour réaliser cette opération, il est courant de procéder à de la diffraction de rayons X sur un monocristal de protéine. Néanmoins, pour mener à bien un tel projet, il est nécessaire d'effectuer cette analyse sur un cristal de grande taille et de très bonne qualité. Il faut donc être capable de le fabriquer. Comme pour toute les macromolécules, l'obtention d'un cristal est très longue. En général, la force motrice de la cristallisation d'une protéine est la diminution de sa solubilité dans un solvant donné, par l'ajout d'un « anti-solvant » à pH contrôlé. Pour cela, des méthodes de « screening » sont mises en place dans une multitude de puits recevant des solutions de protéine et d'anti-solvant de différents types, dans des proportions différentes et à différents pH. C'est pourquoi une telle démarche est généralement très coûteuse, en terme de temps, et d'argent. Cette approche empirique se justifie par le manque de connaissance en terme de mécanisme de cristallisation. Si l'on savait a priori, par quel chemin exact, une protéine passe d'un état liquide désordonné à un état solide très structuré, il serait facile d'élaborer des procédés de cristallisation permettant d'obtenir rapidement et en réduisant considérablement le nombre d'essais, un cristal de dimension importante et de bonne qualité.

C'est notamment dans cet objectif, que quelques groupes de recherche se sont penchés sur les mécanismes de la cristallisation, et plus particulièrement de la nucléation. Le modèle de la théorie classique de la nucléation a été proposé au début des années 1900 et semble décrire avec assez de précision la nucléation de petites molécules. En revanche, pour des molécules de taille plus importantes, les macromolécules, dont les protéines font partie, il apparaît que ce modèle n'est pas forcément approprié. Cela est d'autant plus vrai que les protéines possèdent la particularité d'avoir dans leur diagramme de phase liquide-solide, une zone de démixtion liquide-liquide. Des travaux très récents de la littérature, suggèrent qu'à l'approche de cette zone, d'importantes fluctuations de concentration interviennent et contredisent les hypothèses de la théorie classique. Dans une telle situation, il semblerait que la nucléation se déroule en deux étapes, avec une première étape de concentration, dans laquelle, poussées par les fluctuations de concentrations, les protéines forment des agrégats denses, mais désordonnés. Ensuite, une seconde étape de structuration intervient au sein de ces agrégats pour former un cristal.

L'objectif des travaux présentés ici est alors d'étudier ces mécanismes de nucléation, et notamment de voir dans quelle mesure il est possible d'observer un mécanisme en accord avec la théorie classique ou bien un mécanisme en accord avec les hypothèses de la théorie des deux étapes. Pour se faire, nous développons et utilisons des systèmes microfluidiques qui présentent l'avantage de pouvoir notamment générer des gouttes se comportant comme des microréacteurs de cristallisation car les gouttes sont en mouvement, et d'étudier un grand nombre de conditions expérimentales rapidement. De plus, à l'aide de tels dispositifs, le volume d'étude est grandement réduit par rapport aux procédés usuels, et il est ainsi plus facile d'observer des objets de petites tailles, comme ceux à l'origine de la nucléation. Ces dispositifs feront alors l'objet d'études à différentes échelles : une première étude est menée à l'échelle macroscopique et la seconde à l'échelle microscopique.

Ce manuscrit est alors composé de quatre parties qui traduisent la démarche retenue pour mener ces études.

Le premier chapitre est consacré à une revue des éléments bibliographiques qui constituent le canevas de cette étude et est organisé en trois parties. Dans un premier temps, quelques généralités sur la cristallisation sont présentées avec notamment la définition de termes importants que nous retrouverons tout au long du manuscrit. Une deuxième partie est consacrée à la présentation détaillée des deux mécanismes de nucléation, la théorie classique, et le modèle en deux étapes. Enfin une troisième partie est destinée à la présentation de la microfluidique.

Le deuxième chapitre présente l'ensemble du matériel et des techniques utilisées dans ces travaux. On y retrouve notamment la présentation de l'ensemble des protéines étudiées avec leurs propriétés respectives ainsi que les procédés de fabrication des dispositifs microfluidiques utilisés.

Le troisième chapitre correspond à la première étude menée d'un point de vue macroscopique, c'est-à-dire à partir de la mesure des fréquences de nucléation. Nous y retrouvons dans un premier temps un descriptif des modèles de nucléation probabilistes permettant d'obtenir des

paramètres cinétiques à l'aide de dispositifs microfluidiques et nous présentons ensuite le système expérimental développé ainsi que les expériences réalisées.

Enfin, la quatrième et dernière partie est dédiée à l'étude de la nucléation d'un point de vue microscopique, à l'aide d'une technique d'analyse permettant de sonder la matière à l'échelle du nanomètre, la diffusion de rayons X aux petits angles. Nous présenterons alors la théorie sur laquelle s'appuie cette technique, avant de décrire les deux lignes synchrotron sur lesquelles nous avons travaillé ainsi que les expériences que nous y avons réalisées.

Chapitre I

ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

Ce premier chapitre a pour objectif de positionner notre étude par rapport aux travaux existant, concernant la cristallisation en volume confiné, et de poser les questions scientifiques auxquelles nous avons cherché à répondre. Nous allons par conséquent dans un premier temps, rappeler les principaux concepts de la cristallisation, en centrant ensuite cette analyse sur les différents mécanismes de nucléation. La partie suivante sera consacrée à la présentation générale de la microfluidique en illustrant ses principaux intérêts et ses applications pour l'étude de la nucléation.

I.1 Généralités sur la cristallisation

La cristallisation peut simplement se définir comme le passage d'un composé d'un état désordonné liquide ou gazeux, à un état ordonné solide. En Génie des Procédés, c'est une opération unitaire qui permet d'obtenir un produit sous forme de particules solides cristallines (Tavare, 2013). Cette étape est par conséquent utilisée pour isoler un produit, pour le purifier tout en conférant aux particules obtenues des propriétés physiques ou chimiques contrôlées. , C'est donc tout naturellement qu'on la retrouve depuis longtemps dans un grand nombre d'industries (pharmaceutiques, cosmétiques, agroalimentaires, etc.) comme l'illustre cette citation : « *Crystallization from solution must surely rank as the oldest unit operation, in the chemical engineering sense and it is known since the dawn of civilization* » (Mullin, 1961). En se référant à la théorie classique, la cristallisation à partir d'une solution sursaturée, est composée de deux étapes majeures, qui sont la nucléation et la croissance.

I.1.1 Aspects thermodynamiques de la cristallisation

Pour parler de la cristallisation, il est nécessaire d'introduire quelques notions thermodynamiques, et quelques définitions. D'abord, la *solubilité*, est un paramètre pouvant se définir comme la quantité maximale de soluté que l'on peut dissoudre dans une quantité de solvant donnée, à pression et température fixés. Pour une telle concentration de soluté en solution, le soluté en phase cristalline est en équilibre avec le soluté en phase aqueuse, et on note communément cette concentration s ou $C_{\text{éq}}$.

Il est commun d'affirmer que la force motrice de la cristallisation, est l'écart à cette solubilité. Ainsi, on introduit la notion de *sursaturation*, qui se définit comme l'écart (absolu ou relatif) entre l'activité (ou concentration) d'un soluté en solution, et celle du soluté dans une solution à l'équilibre.

Si la concentration en soluté est inférieure à la solubilité, on parle de solution sous-saturée, dans laquelle il sera impossible de cristalliser. A l'inverse, si la concentration en soluté est supérieure à la solubilité, on parle cette fois de solution sursaturée, et il sera possible de cristalliser, ou de précipiter selon les conditions. On représente souvent ces différentes conditions à l'aide d'un diagramme de phase à deux dimensions semblable à celui présenté sur la Figure I.1 sur laquelle apparaissent les différents états stables (liquide, cristallin, précipité) en fonction de deux variables de cristallisation.

Lorsque la concentration d'une solution est amenée au-dessus de sa solubilité, la solution devient sursaturée, et selon le niveau de sursaturation, il est possible de diviser le diagramme de phase en trois régions : les très hautes sursaturations (zone de précipitation), où les molécules forment rapidement des agrégats amorphes, les sursaturations intermédiaires (zone labile) où la nucléation et croissance peuvent se produire, et les sursaturations faibles (zone métastable) où seule la croissance est possible. Quoiqu'il en soit, comme évoqué précédemment, partant d'une condition dans la zone de nucléation, un ou plusieurs nuclei vont se former et la concentration du soluté en solution va par conséquent diminuer, en faveur de la croissance du ou des cristaux, et cela jusqu'à atteindre la valeur de la solubilité, pour laquelle la croissance va s'arrêter et où on aura un équilibre en la phase cristalline, et la phase en solution.

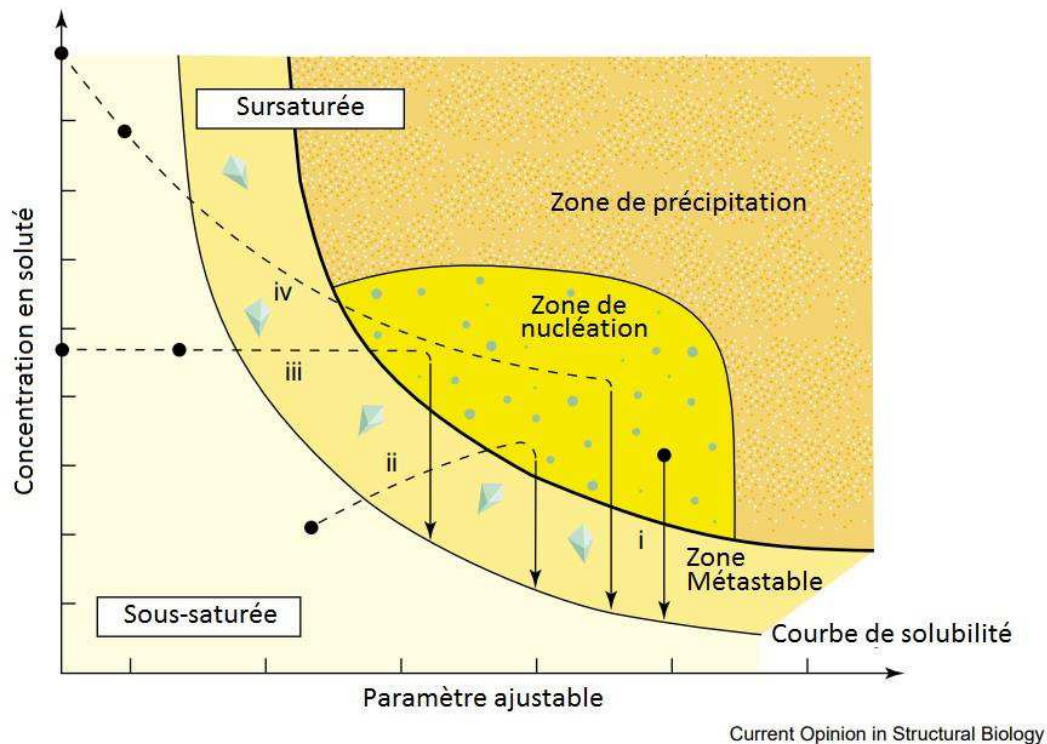


Figure I.1. Illustration d'un diagramme de phase de cristallisation. Tracé de la concentration en soluté en fonction d'un paramètre ajustable pouvant être le pH, la température ou la concentration en agent de cristallisation par exemple. On retrouve 4 régions distinctes : la zone sous-saturée, la zone métastable, la zone de nucléation et celle de précipitation. Les flèches avec des points noirs (conditions initiales) sont des techniques permettant d'obtenir des cristaux : (i) réacteur, (ii) diffusion de vapeur, (iii) dialyse et (iv) diffusion par interface libre (Chayen 2004).

I.1.2 Nucléation

La nucléation est l'étape de formation des plus petites entités thermodynamiquement stables, les germes (ou nuclei). Pour un système binaire, cette étape se produit lorsque le mélange soluté/solvant se trouve dans un état sursaturé hors équilibre. Elle peut avoir lieu spontanément, ou bien être déclenchée artificiellement, par agitation (Liu et al., 2015) ou aujourd'hui avec l'utilisation de lasers (Ward et al., 2015) par exemple. Les différents types de nucléation ont été classés (Mullin, 1961) et sont présentés sur la Figure I.2. La nucléation primaire homogène

intervient en l'absence d'impureté. La formation de nouveaux cristaux, issus du mécanisme de nucléation homogène, n'est donc possible que sous des conditions bien spécifiques, la majeure partie du temps, la formation d'une nouvelle phase solide a lieu en présence de particules étrangères, comme des impuretés ou des poussières en solution. Ces dernières agissent alors comme des catalyseurs de nucléation, on parle dans ce cas de nucléation hétérogène. Enfin, on parle de nucléation secondaire, lorsque les cristaux issus de la nucléation primaire, ou introduits par ensemencement, sont eux-mêmes catalyseurs d'une nouvelle nucléation.

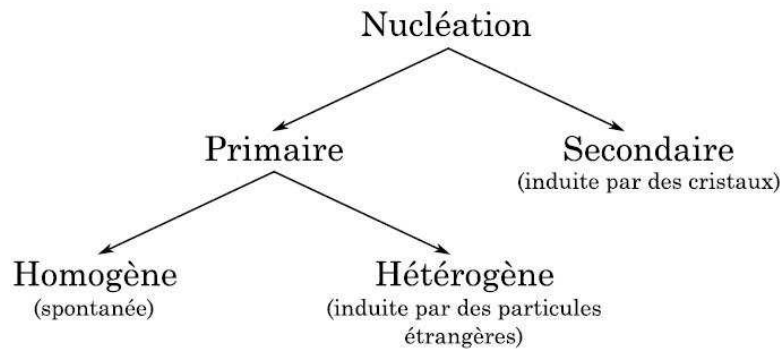


Figure I.2. Différents types de nucléation (Mullin 1961)

Il apparaît alors que la nucléation est une étape primordiale de la cristallisation et il convient de la comprendre et de la maîtriser pour réaliser une cristallisation efficace, selon les propriétés souhaitées (tailles, structure cristalline, etc.). Ainsi, les modèles de nucléation issus de la littérature seront développés dans la partie I.2.

I.1.3 Croissance

La seconde étape de la cristallisation est la croissance. En effet, dès que les nuclei stables sont formés dans le système sursaturé, ils continuent à croître tant que la sursaturation persiste, et cela éventuellement jusqu'à une taille observable. Le cristal tend vers un état plus stable en augmentant sa taille traduisant une diminution de l'enthalpie libre, et la croissance s'arrête lorsque l'équilibre est atteint. En fonction des conditions opératoires de cristallisation, la vitesse de croissance cristalline n'est cependant pas forcément identique pour les différentes faces d'un cristal et c'est pourquoi il est courant d'observer un grand nombre de facies différents pour des particules d'un même produit. Il existe de nombreux modèles de croissance (Nývlt, 1985). On peut les classer en trois catégories:

- Les modèles basés sur les théories d'énergie de surface supposent que la forme que prend un cristal en train de grossir correspond à celle qui a une énergie de surface minimale. Cette théorie est toutefois peu utilisée.
- La théorie de Volmer (1939) suppose que la croissance est un processus discontinu se produisant par adsorption, couche par couche, sur la surface d'un cristal.
- Les théories de la diffusion supposent que la matière est déposée de façon continue sur la surface du cristal avec une vitesse dépendant de la différence de concentration entre le point de dépôt et celle de la solution mère. Il s'agit d'un mécanisme similaire à celui du transfert de matière dans une double couche au voisinage d'une surface.

Nous ne développerons que ce dernier processus, décomposé en deux étapes principales, une première étape de diffusion, avec transfert du soluté vers la surface du cristal, et une étape d'intégration, avec l'intégration du soluté au réseau cristallin. Ces étapes sont consécutives et chacune a sa propre force motrice. Lorsque l'étape de transfert est limitante, on parle de régime diffusionnel. Au contraire, si l'étape limitante est celle de l'intégration au réseau cristallin, le régime est dit chimique. Ces deux étapes du processus sont représentées sur la Figure I.3.

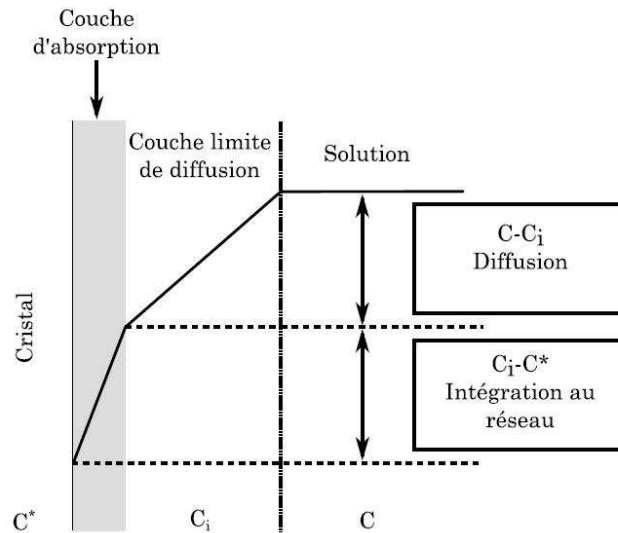


Figure I.3. Représentation schématique du modèle du film en croissance cristalline (Mullin 1961)

Chacune de ces étapes peut se traduire par une vitesse de déposition ou vitesse de croissance :

$$\frac{dm}{dt} = k_d A (C - C_i) \quad (\text{diffusion}) \quad \text{Eq. I-1}$$

$$\frac{dm}{dt} = k_r A (C_i - C^*)^r \quad (\text{réaction}) \quad \text{Eq. I-2}$$

k_d est le coefficient de transfert de matière par diffusion et k_r une constante de vitesse pour la réaction de surface (procédé d'intégration).

Ces deux équations sont peu utilisées en pratique car elles font intervenir la concentration à l'interface C_i , difficilement mesurable. Une force motrice globale ($C - C^*$) est donc généralement exprimée et la vitesse de croissance massique s'écrit :

$$\frac{dm}{dt} = K_G A (C - C^*)^g \quad \text{Eq. I-3}$$

où K_G est un coefficient de croissance global.

Au vu de ces observations, il apparaît donc que l'étape de nucléation est à l'origine de la formation du cristal et c'est en partie elle qui va en définir les propriétés finales, c'est pourquoi il est intéressant de s'intéresser aux différents mécanismes de cette nucléation indiqués dans la littérature.

I.2 Les mécanismes de nucléation

La partie précédente a permis d'illustrer l'intérêt du mécanisme de nucléation dans le phénomène plus global de cristallisation. Ainsi, de nombreuses recherches ont été menées sur le sujet et cela depuis une petite centaine d'années, au cours desquelles on a vu apparaître un premier mécanisme basé sur la « théorie classique de la nucléation », plus souvent abrégé en CNT pour « Classical Nucleation Theory ». Cette théorie a été développée et utilisée durant de nombreuses années (Becker and Döring, 1935; Frenkel, 1939; Volmer and Weber, 1925) avant de voir apparaître un nouveau mécanisme, dit en deux étapes (Erdemir et al., 2009; Sauter et al., 2015a; Vekilov, 2010). Dans cette partie nous allons donc présenter plus en détails ces mécanismes et présenter leurs spécificités.

I.2.1 Théorie classique de la nucléation

La CNT est la théorie décrivant le phénomène de nucléation la plus simple et la plus largement utilisée. Initialement développée pour décrire la condensation d'une vapeur en liquide, elle a ensuite été utilisée par analogie pour expliquer la formation de cristaux à partir de solutions sursaturées. Elle repose sur les considérations thermodynamiques proposées par Gibbs (Gibbs, 1876, 1878) qui définit la variation d'enthalpie libre nécessaire pour la formation d'un cluster (ΔG) comme étant la somme de deux contributions. Une contribution surfacique (ΔG_S) qui correspond à la variation d'enthalpie libre nécessaire à la formation d'une nouvelle surface, et une contribution volumique (ΔG_V) qui correspond à l'enthalpie libre nécessaire à la transition de phase. Ainsi, lors de la formation d'un cluster solide, contenant n molécules, de surface A_n , de tension interfaciale avec la solution σ_n , et de différence de potentiel chimique avec le soluté en solution $\Delta\mu$ (lié à la sursaturation) on a :

$$\Delta G = \Delta G_S + \Delta G_V \quad \text{Eq. I-4}$$

Avec :

$$\Delta G_S = A_n \sigma_n \quad \text{Eq. I-5}$$

Et :

$$\Delta G_V = -n \Delta\mu \quad \text{Eq. I-6}$$

Ensuite, certaines hypothèses simplificatrices sont émises pour exprimer plus aisément ces équations, mais restreignent l'application de la CNT à certaines conditions. En effet, les hypothèses principales de la théorie classique de la nucléation sont les suivantes :

- (i) Un cluster solide est modélisé comme un objet sphérique homogène, de rayon r_n bien défini. Les propriétés de ce cluster sont indépendantes de sa taille et correspondent à celles du cristal. Cette hypothèse implique que les blocs de construction sont ordonnés, et que l'arrangement moléculaire dans un embryon de cristal est identique à celui présent dans un grand cristal.
- (ii) Les clusters sont considérés incompressibles.
- (iii) La tension de surface d'un cluster solide est la même que celle correspondant à une interface infiniment plane entre la phase solide et la phase liquide à la même température

T , c'est l'approximation capillaire (Laaksonen and Napari, 2001) et on peut la noter $\sigma_\infty(T)$. Cela suppose que la tension de surface ne dépend pas de la courbure (donc de la taille) des clusters.

Avec ces hypothèses, l'Eq. I-4 devient alors :

$$\Delta G(n) = -n \Delta\mu + \sigma_\infty A(n) \quad \text{Eq. I-7}$$

dans laquelle $(n) = 4\pi r_n^2$, r_n étant le rayon du cluster en formation.

De plus :

$$r_n = r_1 n^{1/3} \quad \text{Eq. I-8}$$

avec r_1 la distance intermoléculaire moyenne dans le cluster, pouvant s'exprimer :

$$r_1 = \left(\frac{3v_1}{4\pi}\right)^{1/3} \quad \text{Eq. I-9}$$

où v_1 correspond au volume moléculaire dans le cluster.

La combinaison des équations précédentes donne alors :

$$A(n) = s_1 n^{2/3} \quad \text{Eq. I-10}$$

avec s_1 la surface d'un monomère constituant du cluster en formation s'exprimant :

$$s_1 = (36\pi)^{1/3} (v_1)^{2/3} \quad \text{Eq. I-11}$$

On a donc jusqu'à présent :

$$\Delta G(n) = -n \Delta\mu + \sigma_\infty s_1 n^{2/3} \quad \text{Eq. I-12}$$

De plus, des considérations thermodynamiques permettent de dire (Kalikmanov, 2013) que loin de la température critique, on a :

$$\Delta\mu = k_B T \ln S \quad \text{Eq. I-13}$$

avec k_B la constante de Boltzmann, T la température, et S la sursaturation définie précédemment.

Alors, en divisant l'Eq. I-12 par $k_B T$, on obtient une version réduite ΔG_r de l'enthalpie libre de formation d'un cluster :

$$\Delta G_r(n) = -n \ln S + \theta_\infty n^{2/3} \quad \text{Eq. I-14}$$

avec donc l'enthalpie libre réduite de formation du cluster :

$$\Delta G_r(n) = \frac{\Delta G(n)}{k_B T} \quad \text{Eq. I-15}$$

et la tension de surface réduite :

$$\theta_{\infty} = \frac{\sigma_{\infty} S_1}{k_B T} \quad \text{Eq. I-16}$$

Ainsi, il est courant de représenter graphiquement l'évolution de l'enthalpie libre, ou enthalpie libre réduite de formation d'un cluster, en fonction de sa taille, ou du nombre de molécules à l'intérieur de ce dernier, en accord avec la CNT, comme illustré sur la Figure I.4. On observe graphiquement les deux contributions, surfacique et volumique, et l'enthalpie libre totale. Pour un petit nombre de molécules dans le cluster, le terme surfacique domine, ce qui rend défavorable d'un point de vue énergétique la formation d'un petit cluster car l'énergie surfacique requise n'est pas compensée. Pour un nombre de molécules plus important, le terme volumique domine et cette fois il est favorable d'un point de vue énergétique de former un tel cluster.

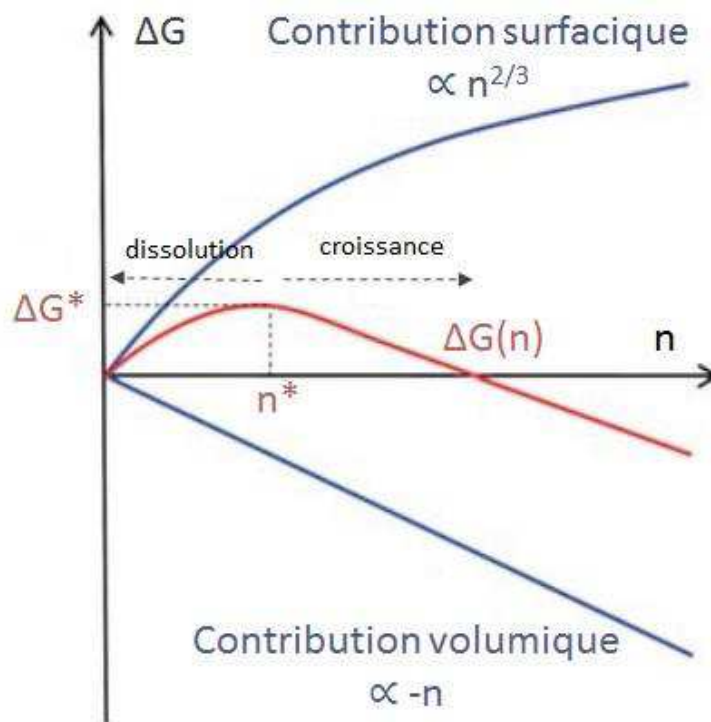


Figure I.4. Représentation graphique de l'évolution de l'enthalpie libre de formation d'un cluster, en fonction du nombre de molécules à l'intérieur de ce dernier. Il apparaît en bleu les deux contributions surfacique et volumique à l'enthalpie libre et en rouge, l'enthalpie libre totale. On note la présence d'un maximum correspondant à l'enthalpie libre et au nombre de molécules critiques, un cluster de plus petite taille pourra se dissoudre, tandis qu'un cluster plus grand ne pourra que croître.

La fonction présente un maximum pour un certain nombre de molécules qu'il est possible d'obtenir en dérivant l'Eq. I-4, et on obtient :

$$n^* = \left(\frac{2 \theta_{\infty}}{3 \ln S} \right)^3 \quad \text{Eq. I-17}$$

Le cluster qui contient alors n^* molécules est appelé « cluster critique » et l'enthalpie libre de formation qui lui correspond $\Delta G(n^*) = \Delta G^*$ représente une barrière énergétique qu'il faut franchir pour former une nouvelle phase stable. Les clusters possédant un nombre de molécules

inférieur à n^* auront tendance à se dissocier, alors que ceux possédant un nombre de molécules supérieur vont croître pour former un cristal. En combinant les équations Eq. I-4 et Eq. I-17 il est possible de calculer l'enthalpie libre de formation d'un cluster critique, aussi appelée barrière de nucléation :

$$\Delta G^* = \frac{1}{3} \sigma_\infty A(n^*) = \frac{16\pi}{3} \frac{v_1^2 \sigma_\infty^3}{(k_B T \ln S)^2} \quad \text{Eq. I-18}$$

ou encore, en variables réduites :

$$\Delta G_r^* = \frac{4}{27} \frac{\theta_\infty^3}{(\ln S)^2} \quad \text{Eq. I-19}$$

A partir de là, il est possible d'utiliser ces résultats pour remonter à la vitesse de nucléation J (nombre de nucleus apparaissant par unité de temps et de volume) à l'aide d'une équation analogue à celle d'Arrhenius (Volmer, 1939) :

$$J = J_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. I-20}$$

Avec J_0 un facteur pré-exponentiel résultant des paramètres cinétiques d'attachement au niveau moléculaire. Il est possible d'explicitier cette relation en exprimant plus en détails le facteur pré-exponentiel :

$$J = \rho_N Z j \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. I-21}$$

avec ρ_N la densité de sites de nucléation, Z le facteur de Zeldovich qui correspond à la probabilité qu'un nucleus critique a de former une nouvelle phase et non de revenir à l'état métastable et j la vitesse à laquelle les molécules individuelles s'attachent à un nucleus critique. La vitesse j peut s'exprimer :

$$j = 4\pi\rho D r^* \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. I-22}$$

avec ρ la densité des monomères, D la constante de diffusion des monomères, r^* le rayon du cluster critique et ΔF l'énergie d'activation pour l'addition d'un monomère à un cluster. Finalement on a :

$$J = 4\pi\rho_N \rho D r^* Z \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. I-23}$$

Enfin, en combinant les équations Eq. 0-24 et Eq. 0-25 on obtient :

$$J = 4\pi\rho_N \rho D r^* Z \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \left[\frac{v_1}{\ln S}\right]^2 \left[\frac{\sigma_\infty}{k_B T}\right]^3\right) \quad \text{Eq. I-26}$$

Toute la théorie classique de la nucléation amène donc à ce résultat primordial, car il permet, à l'aide simplement de paramètres connus, ou possibles à obtenir, de calculer des cinétiques de nucléation, donc de savoir en combien de temps des cristaux vont être obtenus. C'est d'ailleurs cette possibilité de calcul qui rend la CNT populaire et c'est pourquoi elle est utilisée dans de nombreux domaines pour par exemple dimensionner des réacteurs de cristallisation ou optimiser des paramètres afin de rendre une cristallisation plus ou moins rapide.

Néanmoins, elle repose sur des hypothèses simples et discutables et plusieurs groupes de recherche ont illustré ses limites. La CNT appliquée à la cristallisation est dérivée de celle correspondant à une transition vapeur/liquide. On peut par conséquent se demander si les petits clusters de nucléation, contenant quelques dizaines de molécules peuvent être réellement assimilés à une goutte liquide (Mokross, 2003). Il a été montré que cette hypothèse ne fonctionne pas pour des clusters contenant entre 20 et 50 molécules pour lesquels l'interface est nettement courbée ce qui change son enthalpie libre. Il semble ainsi difficile pour des clusters de petite taille de séparer les contributions surfacique et volumique, et par conséquent la notion de tension de surface semble inadaptée pour de tels objets. Des travaux portés sur l'observation de la nucléation de l'apoferritine à l'aide de la microscopie à force atomique (Yau and Vekilov, 2001) ont montré que les clusters critiques d'apoferritine contiennent entre 20 et 50 molécules, arrangées de manière identique à celles trouvées dans un cristal, mais forment une structure en deux dimensions composée d'une ou deux couches monomoléculaires. Une telle structure est de toute évidence en désaccord avec l'hypothèse du modèle de goutte et d'un cluster de forme sphérique. Un exemple d'image obtenue par microscopie à force atomique dans cette étude est présentée sur la Figure I.5.

Une étude a également été menée sur le lysozyme où il a été montré que la taille du cluster critique était d'une dizaine de molécules (Vekilov, 2004) et il semble difficile d'affirmer que l'arrangement moléculaire dans de tels clusters est identique à celui rencontré dans des cristaux, puisque des clusters si petits ne peuvent a priori pas avoir la structure d'un cristal tétragonal de lysozyme. Il apparaît également dans les travaux de Cölfen (Gebauer et al., 2014) que la CNT ne permet pas d'expliquer les phénomènes de nucléation qui interviennent dans certaines conditions, dans lesquelles apparaissent des clusters de pré-nucléation. Selon la CNT, les premiers agrégats formés ont une structure cristalline. Or il a été montré que pour des espèces comme la silice, les oxydes de fer, ou encore les phosphates et carbonates de calcium, les premiers agrégats formés ne sont pas forcément cristallins. Un exemple de clusters de pré-nucléation de carbonate de calcium observés par cryo-TEM est présenté sur la Figure I.6

Ces clusters de pré-nucléation ont également été observés dans d'autres travaux (Maes et al., 2015) portant sur l'observation d'une solution de glucose isomérase sursaturée, à l'aide de la technique de microscopie oblique en champ sombre. En analysant les images de microscopie avec des polariseurs parallèles il a été possible d'observer l'apparition de ces clusters comme illustré sur la Figure I.7.

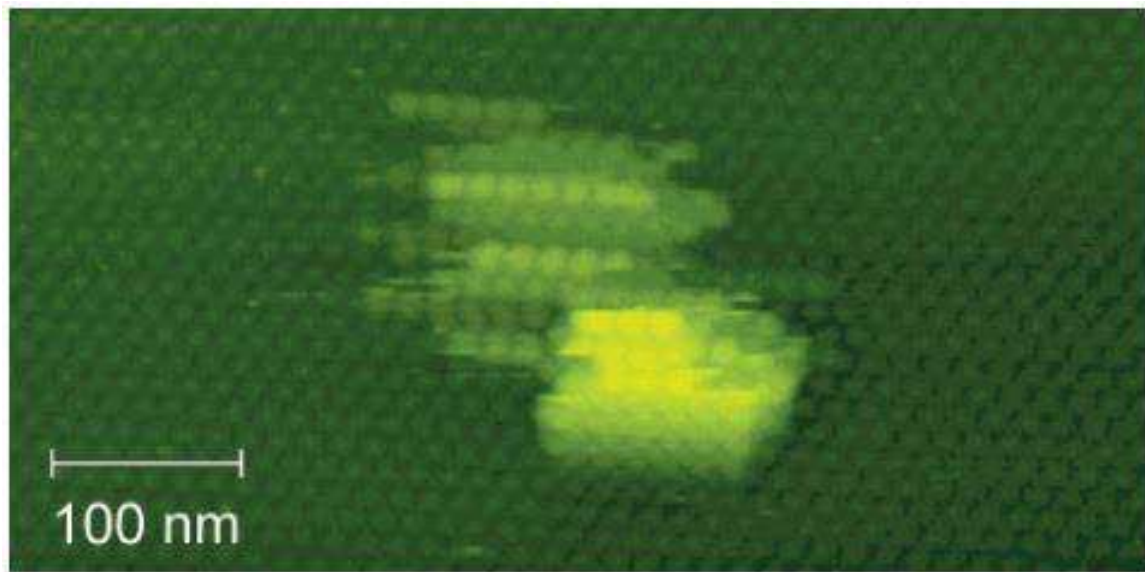


Figure I.5. Image de microscopie à force atomique de clusters d'apoferritine (Yau and Vekilov, 2001). Les zones plus jaunes représentent les clusters d'apoferritine qui s'assemblent en formant des lignes plutôt que des sphères. Cette structure bidimensionnelle est en contradiction avec l'hypothèse d'une forme tridimensionnelle sphérique de la CNT.

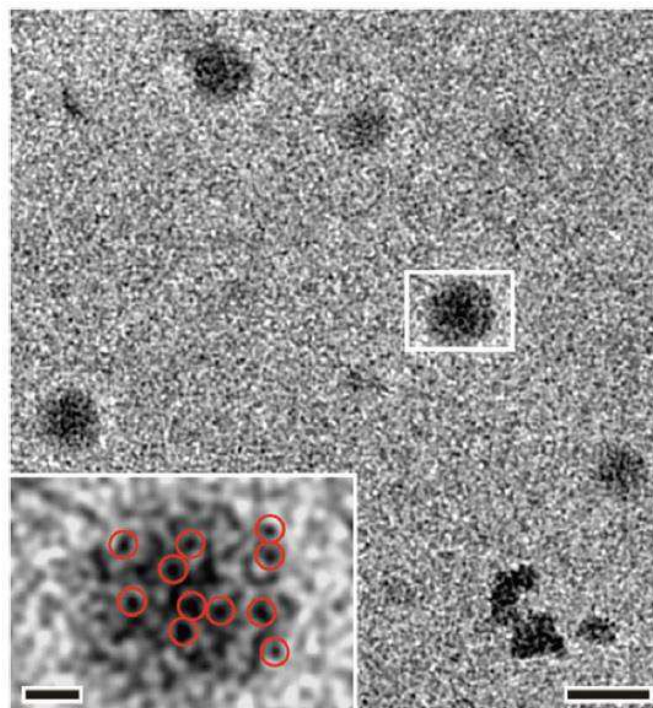


Figure I.6 Images cryo-TEM illustrant le processus d'agrégation pré-nucléation d'une solution de carbonate de calcium fortement sursaturée en présence de silice (la barre d'échelle est de 50 nm) (Kellermeier et al., 2012). De grands objets non cristallins (de taille 20-30 nm) se forment comme illustré dans l'insert, ce qui est en contradiction avec la CNT.

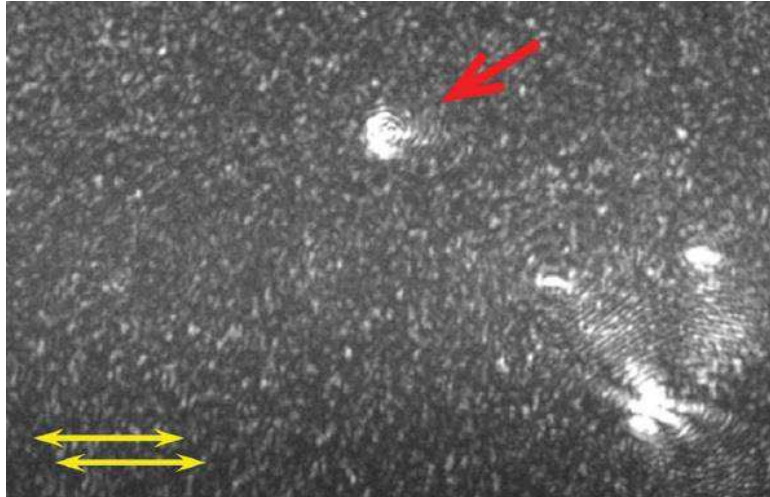


Figure I.7. Microscopie oblique en champ sombre d'une solution sursaturée de glucose isomérase (90mg/mL dans un tampon HEPEPS pH 7,0 avec 200 mM de $MgCl_2$ et 1 M de sulfate d'ammonium) (Maes et al., 2015). L'image est observée à l'aide de polariseurs parallèles et on observe des pics d'intensité comme souligné par la flèche rouge qui correspondent à des clusters de pré-nucléation non cristallins, en contradiction avec la cristallinité prédite par la CNT.

Une revue de nombreux systèmes où intervient la nucléation a été réalisée (Karthika et al., 2016) et compare des vitesses de nucléation théoriques calculées à l'aide de la CNT, à celles observées expérimentalement, et il apparaît que dans de nombreux cas, ces deux résultats sont bien différents. Un exemple est illustré sur la Figure I.8 qui compare des vitesses de nucléation du n-pentanol obtenues expérimentalement par plusieurs groupes à celles prédites par la CNT, et il est possible d'observer un facteur 2000 entre les résultats, illustrant l'incapacité de la CNT à décrire un tel système.

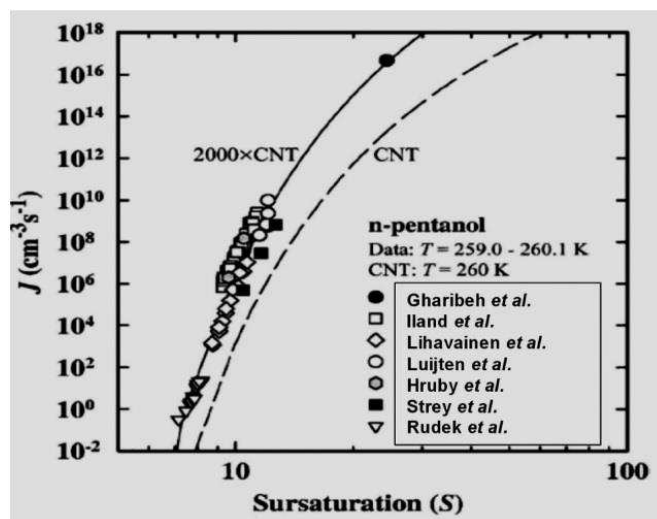


Figure I.8. Comparaisons de vitesses de nucléation du n-pentanol rapportés par plusieurs groupes de recherche. La ligne pointillée correspond à la prédiction de la CNT et la ligne continue à la prédiction de la CNT multipliée par un facteur 2000. (Karthika et al., 2016)

Devant la simplicité et le nombre de lacunes de la CNT, un nouveau modèle de nucléation a été proposé récemment, le mécanisme de nucléation en deux étapes.

I.2.2 Mécanisme de nucléation en deux étapes

I.2.2.1 Origine du mécanisme

Pour remonter à l'origine de ce mécanisme, il faut repartir du diagramme de phase d'une solution à pression constante, soit la représentation des différents états stables en fonction de la concentration en soluté et de la température. Un tel diagramme avait été présenté sur la Figure I.1 où l'on trouvait une zone de stabilité pour une solution diluée, et une zone de stabilité pour la phase solide. En réalité, il y a dans des diagrammes de phases de solution, une troisième zone qui correspond à une phase liquide dense. Dans la plupart des solutions contenant des petites molécules, le liquide dense n'est simplement pas observable car il serait sensé apparaître à une température supérieure à celle du point d'ébullition du solvant, et c'est pourquoi l'on se contente d'une simple courbe de solubilité, voire de plusieurs dans le cas où plusieurs polymorphes peuvent être observés. En revanche, pour certaines macromolécules, comme des protéines ou des colloïdes, il est possible d'observer ce liquide dense (Broide et al., 1991; Muschol and Rosenberger, 1997; Petsev et al., 2003). Dans de telles conditions, le diagramme de phase s'en retrouve modifié et peut prendre l'allure présentée sur la Figure I.9 proposé par Muschol et Rosenberger en 1997 comme étant un diagramme de phase générique pour des protéines globulaires. On y retrouve la courbe de solubilité précédemment évoquée qui sépare la zone 1 sous-saturée (où aucune cristallisation ne peut intervenir) des autres zones, sursaturées (et par conséquent où il est possible de cristalliser).

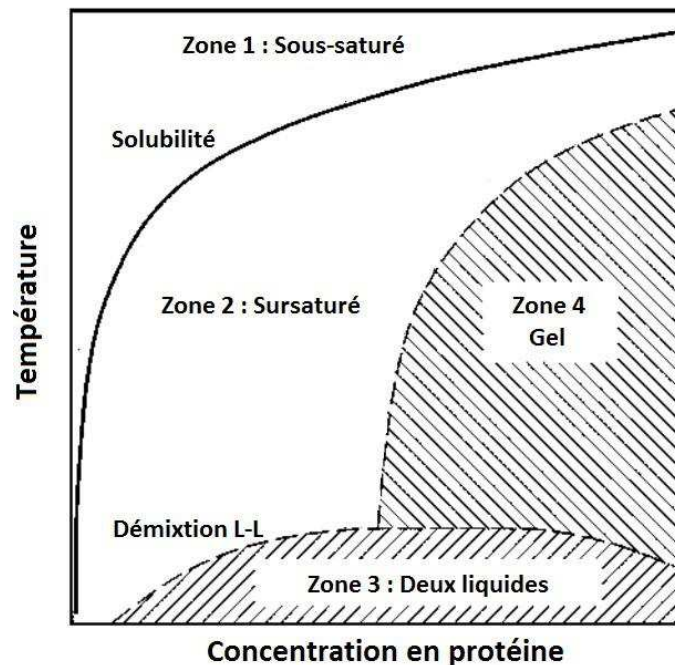


Figure I.9. Diagramme de phase générique d'une protéine globulaire en solution (Muschol and Rosenberger, 1997). En plus de la frontière classique de solubilité, ce diagramme présente deux autres frontières. Une ligne de démixtion liquide-liquide en dessous de laquelle intervient une décomposition spinodale et où la solution se sépare en deux phases, une phase de solution diluée et une phase liquide dense. Et une ligne de gélification au-delà de laquelle les protéines sont si concentrées qu'elles s'enchevêtrent et forment un gel.

On a en revanche cette fois, une nouvelle frontière dite de démixtion liquide-liquide. Dans la zone 2, l'état stable est un état homogène de concentration plus ou moins élevée. Néanmoins, certaines fluctuations de densité peuvent intervenir et former des zones métastables, plus ou moins importantes, de liquide dense. En abaissant d'avantage la température et/ou en augmentant la concentration, ces zones de liquide dense deviennent stables et on a une séparation macroscopique, appelée « décomposition spinodale » de notre solution qui devient désormais hétérogène, avec une phase de solution diluée, et une phase de liquide dense. Ces fluctuations de concentrations dépendent alors de l'écart entre la température observée et la température de la décomposition spinodale et il est possible de déterminer leur longueur de corrélation, comme cela est réalisé notamment dans les travaux de Manno (Manno et al., 2004). Dans ces travaux, réalisés avec du lysozyme en présence de NaCl à différentes concentrations, une relation est proposée pour exprimer la longueur de corrélation des fluctuations de concentration ξ en fonction de la température réduite ε qui comprend le rapport de la température observée T et de la température de décomposition spinodale T_S : $\varepsilon = T/T_S - 1$. Il est alors possible d'obtenir un tracé similaire à celui présenté sur la Figure I.10 pour observer les variations des tailles de fluctuations de concentration. Plus d'informations sur ces fluctuations de concentration seront données dans le chapitre 3.

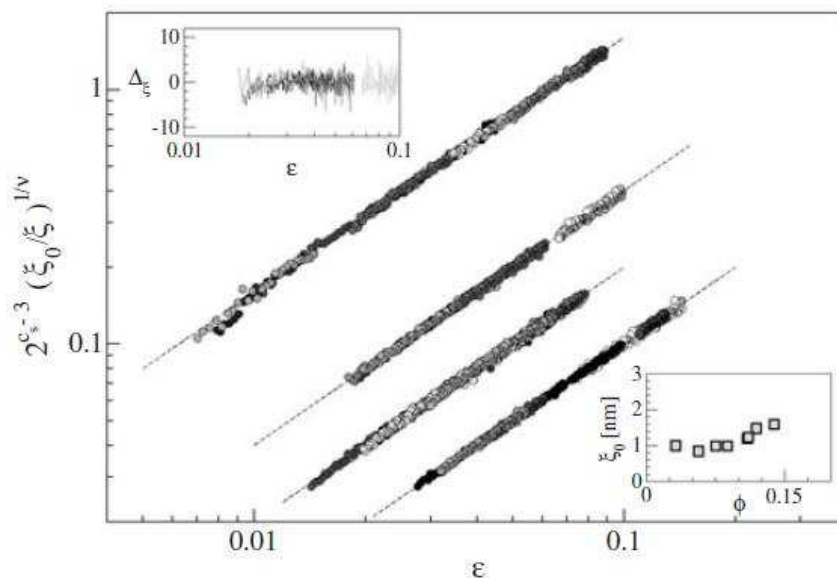


Figure I.10. Evolution des tailles de fluctuations de concentration ξ en fonction de la température réduite (Manno et al., 2004) pour un système contenant du lysozyme et du sel NaCl à différentes concentrations. Le facteur 2^{C_S-3} avec C_S la concentration en sel est utilisé pour plus de clarté. ξ_0 est un paramètre d'amplitude.

Une autre frontière apparaît également pour de telles macromolécules, la frontière de gélification. En effet, pour de telles macromolécules, si la concentration devient trop élevée, ces dernières sont capables de s'enchevêtrer, ce qui a pour conséquence la formation d'une solution très visqueuse, ou gel, et qui limite grandement la nucléation.

Ainsi, nous avons en solution, la coexistence potentielle de trois phases, qui diffèrent l'une de l'autre par deux paramètres importants, la concentration, et la structure. La solution diluée et le liquide dense diffèrent par la concentration en soluté, le liquide dense et le cristal diffèrent par la structure, et la solution diluée et le cristal diffèrent à la fois par la concentration et la structure. Alors, la cristallisation en solution peut être considérée comme une transition selon deux paramètres, la structure et la concentration. Une augmentation de la structure peut être considérée comme une augmentation du nombre de paires de molécules arrangées de la même manière que dans un cristal. Si l'on reprend les hypothèses de la CNT de la partie précédente, les premiers clusters ayant directement une structure cristalline, on peut affirmer dans ces conditions que la formation d'un nucleus cristallin correspond à une évolution simultanée des paramètres de concentration et de structure. Cela peut être un chemin envisageable pour des molécules incapables de former des zones de liquide dense comme évoqué précédemment. En revanche, dans le cas contraire, il n'est pas improbable de penser que la nucléation peut se dérouler de façon séquentielle, avec dans un premier temps une augmentation de la concentration (des zones de liquide dense se forment à partir de la solution diluée) et dans un second temps, une augmentation de la structure (un réarrangement intervient au sein des gouttes de liquide dense pour obtenir une structure cristalline). Ces différents chemins de cristallisation sont illustrés sur la Figure I.11.

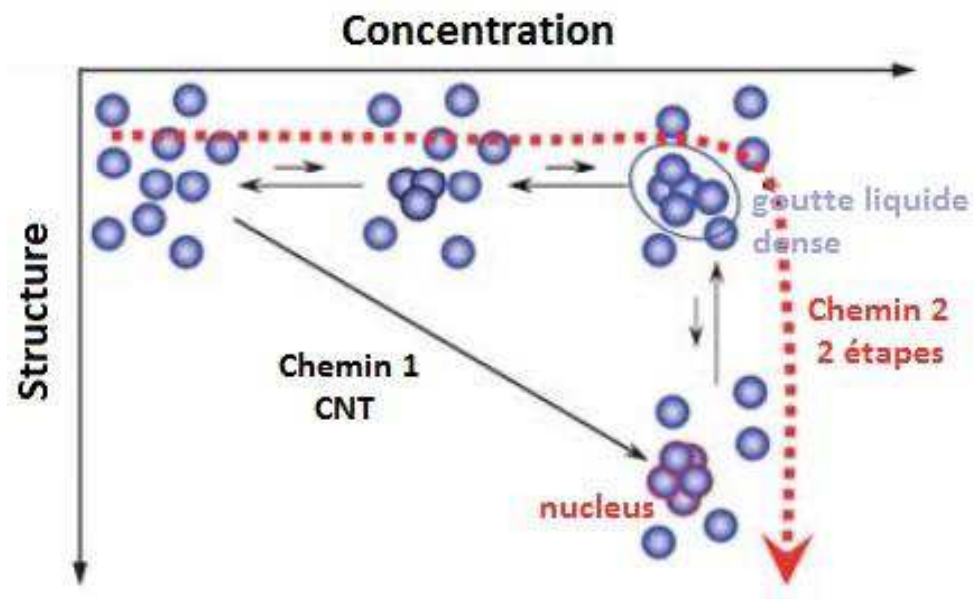


Figure I.11. Représentation des chemins possibles de nucléation en fonction des fluctuations de concentration et de structure (Vekilov, 2010). La CNT correspond à l'augmentation simultanée de la concentration et de la structure pour former immédiatement un nucleus cristallin qui grossit. Le mécanisme en deux étapes comprend une première étape d'augmentation seulement de la concentration pour former des gouttes de liquide dense, et une deuxième étape de structuration à l'intérieur de ces gouttes pour former un nucleus cristallin.

L'hypothèse d'un tel mécanisme en deux étapes a d'abord été émise à l'aide de simulations numériques (ten Wolde and Frenkel, 1997) en utilisant la technique de Monte Carlo dans un système de Lennard-Jones gouverné par des interactions de courte distance. Il a alors été montré

que pour des conditions lointaines de la démixtion liquide-liquide, les fluctuations selon la concentration et la structure intervenaient effectivement simultanément, en accord avec la théorie classique. En revanche, en s'approchant de cette frontière de démixtion, des grandes fluctuations de concentrations ont été observées et ont induit un changement du mécanisme de nucléation avec dans un premier temps la formation de zones de liquide dense, désordonnées, et dans un second temps, la formation d'un nucleus cristallin à proximité de ces zones, conformément au chemin 2 de la Figure I.11. De plus, l'augmentation de la sursaturation à l'intérieur des gouttes denses, engendre par conséquent, en accord avec les équations Eq. I-18 et Eq. I-26, une diminution de la barrière de nucléation, et une augmentation de la vitesse de nucléation, de plusieurs ordres de grandeurs, ce qui peut justifier les différences entre vitesses expérimentales et vitesses calculées par la CNT évoquées dans la partie I.2.1. A partir de là, il semble donc que la position des conditions expérimentales dans le diagramme de phase (et plus particulièrement la proximité avec la zone de démixtion liquide-liquide) puisse influencer le mécanisme de nucléation, et par conséquent les vitesses de nucléation et c'est pourquoi des travaux, expérimentaux cette fois, ont été réalisés par la suite, afin de valider ces différences de mécanisme, et quelques-uns de ces travaux sont évoqués dans la partie suivante.

I.2.2.2 Observations expérimentales du mécanisme en deux étapes

En raison de la taille des agrégats denses, ou pré-clusters de nucléation, qui selon les molécules et conditions utilisées peut varier de quelques dizaines de nanomètres, à plusieurs centaines de nanomètres, il apparaît dans la littérature que les techniques expérimentales qui permettent de les observer sont principalement la diffusion de la lumière (SLS ou DLS) et la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS).

Diffusion de la lumière

Des expériences de diffusion de lumière statique (SLS) et dynamique (DLS) ont été réalisées sur du lysozyme à 1,03 mM en présence de NaCl à 0,7 M (Georgalis et al., 1997) et ont montré que les monomères initialement présents en solution s'agrégeaient rapidement pour former des clusters fractals, qui par la suite se restructuraient progressivement en structures compactes. Ces résultats sont présentés sur la Figure I.12.

Des travaux plus récents, menés également grâce à la méthode de la DLS, mais cette fois sur une enzyme, la lumazine synthase (Gliko et al., 2005) ont montré que les zones de liquide dense pouvaient avoir une durée de vie très faible. En effet lors d'une expérience de 150 minutes, en réalisant une mesure DLS toute les 30 secondes, deux types de fonctions d'autocorrélation ont été obtenues : une correspondant à une taille d'environ 16,5 nm en accord avec la taille de l'enzyme dans 80 à 90% des cas, et une autre correspondant à deux populations distinctes, une population de monomères, et une de clusters de tailles variant de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Ces résultats sont illustrés sur la Figure I.13 où on aperçoit effectivement la forte fluctuation des agrégats, liée à leur faible durée de vie.

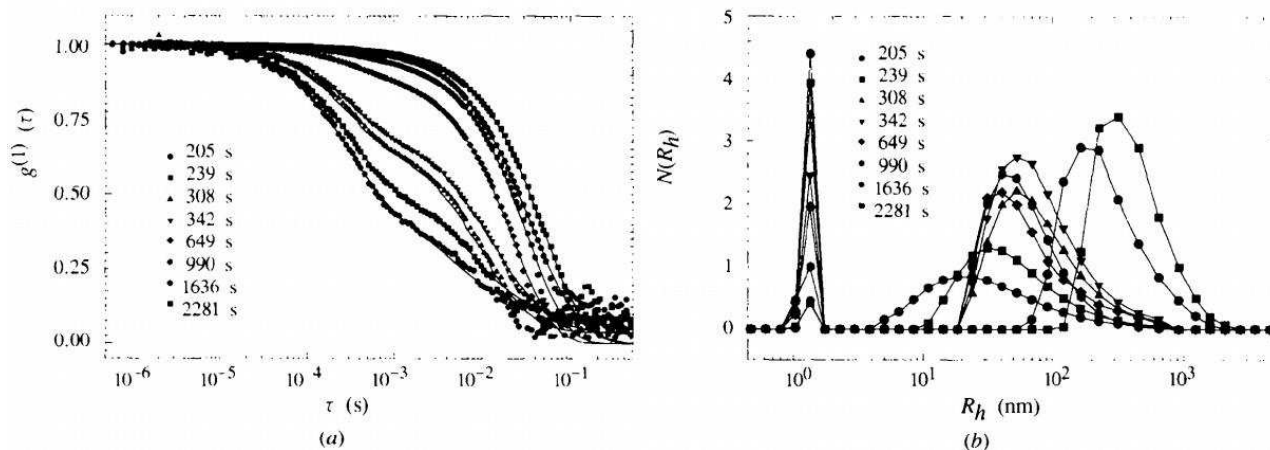


Figure I.12. Résultats d'expérience DLS avec 1,03 mM de lysozyme et 0,70 M de NaCl dans un buffer sodium acétate 0,1 M, pH 4,25 à 20°C et à un angle de diffusion de 20° (Georgalis et al., 1997). (a) Fonction d'autocorrélation en fonction du temps de délai. (b) Distribution de rayons hydrodynamiques correspondant obtenus par la méthode CONTIN. Le rayon le plus petit correspond à des monomères de lysozyme, son amplitude décroît avec le temps au profit de clusters plus gros dont les amplitudes et rayons évoluent avec le temps.

Enfin, comme dernier exemple de mesure par DLS, nous pouvons citer les travaux réalisés sur des cellules d'hémoglobine saines et drépanocytaires (Pan et al., 2007) où il a été illustré qu'il existe dans des solutions contenant ces protéines, des clusters à l'origine de la formation de cristaux. Les figures DLS correspondantes sont présentées sur la Figure I.14. Les travaux sur ces molécules ont notamment permis de conclure qu'il existe une fluctuation de densité avec une taille et une concentration optimale qui fournit la plus grande probabilité de voir apparaître une fluctuation de structure dans la goutte.

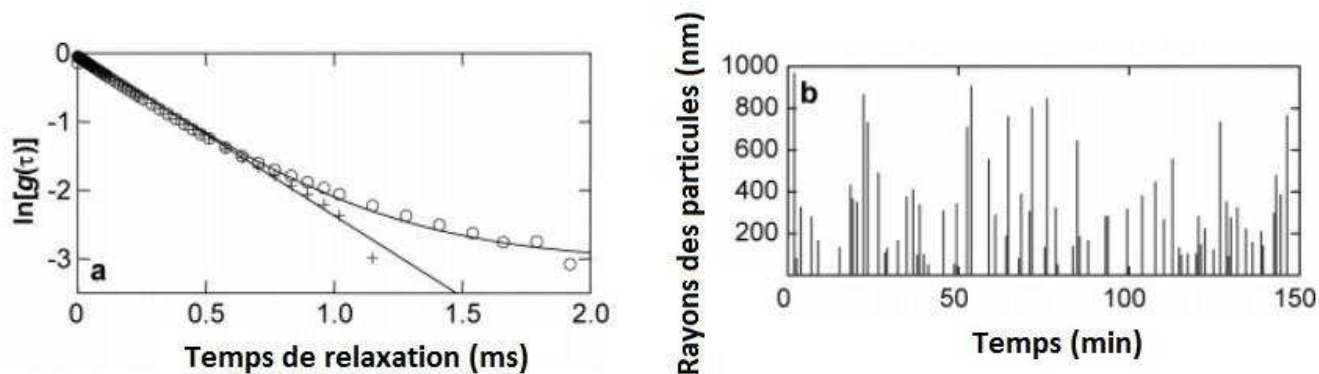


Figure I.13. Caractérisation par DLS de solutions sursaturées de lumazine synthase avec $c = 8,1$ mg/mL dans un buffer phosphate 1,3 M à pH 8,7 (Gliko et al., 2005). Les fonctions d'autocorrélations sont collectées toutes les 30s pendant 150min. (a) Fonctions d'autocorrélations: les croix représentent environ 90% des cas dans lesquels une seule population de monomère existe, les cercles environ 10% des cas dans lesquels deux populations existent, une de monomère, et une d'objets d'environ 220nm dans cet exemple. (b) Evolution temporelle des tailles moyennes des populations d'agrégats.

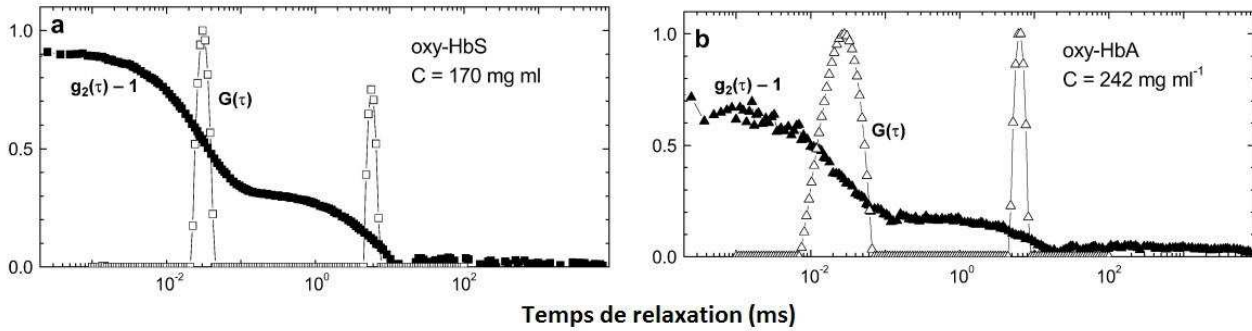


Figure I.14. Caractérisation par DLS de solutions d'hémoglobine à 35°C à l'état oxy drépanocytaires (oxy-HbS (a)) et à l'état oxy pour un adulte normal (oxy-HbA (b)) (Pan et al., 2007). Sur les graphes apparaissent les fonctions de corrélation (symboles pleins) et les distributions de temps de relaxation correspondants (symboles vides). On note la présence de deux populations, une de taille 3,03nm correspondant à une molécule d'hémoglobine, et une de taille plus grande correspondant aux clusters à l'origine de la cristallisation.

En d'autres termes, il semble qu'il n'est pas nécessaire d'avoir des grandes fluctuations de densité ou des gouttes de longue durée de vie (comme c'est le cas en dessous de la frontière de séparation liquide-liquide) afin d'avoir des fluctuations de structure conduisant à un nucleus cristallin.

Diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion de rayons X aux petits angles est une technique expérimentale permettant d'obtenir des informations sur des tailles, des formes, ou des structures d'objets allant du nanomètre au micromètre et c'est pourquoi l'on retrouve quelques études qui utilisent cette technique pour s'intéresser aux mécanismes de nucléation. Plus de détails seront donnés sur la théorie sur laquelle repose cette technique dans le chapitre 4.

La première étude répertoriée sur la mise en évidence d'un mécanisme en deux étapes à l'aide de la méthode d'analyse SAXS porte sur la nucléation de cristaux de glycine (Chattopadhyay et al., 2005). Une solution de glycine à la concentration 3,6 M est insérée dans un capillaire de 3,5 mm de diamètre à 55°C devant le faisceau de rayons X, puis refroidie à 10°C (pour créer la sursaturation) en 90 minutes. Les signaux SAXS sont obtenus tout au long du refroidissement et jusqu'à ce que la cristallisation soit observable à l'œil nu. Les courbes SAXS correspondantes, donnant l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion, ainsi qu'un exemple de modélisation sont présentées sur la Figure I.15.

En modélisant l'ensemble des courbes SAXS, il a été possible d'obtenir l'évolution du rayon de giration (à l'aide du tracé de Guinier) et l'évolution de l'exposant de puissance avec le temps. Cet exposant, que l'on peut noter x se retrouve dans l'expression de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion : $I(q) \propto q^{-x}$. Dans le domaine des vecteurs de diffusion moyen, cet exposant donne des informations sur la dimension fractale des objets observés. Si $x = 4$, les objets considérés ont des surfaces lisses (Loi de Porod). En revanche si cet exposant s'écarte de cette valeur, les objets ont des surfaces plus rugueuses avec des arrangements plus ou moins compacts. De ces observations il a été conclu que tant que la solution est sous-saturée, elle contient un mélange de monomères et de dimères, qui se transforme en objets composés de dimères avec une

formation similaire à un liquide dense, puis enfin, une restructuration à l'intérieur de ces zones de liquide dense conduit à la nucléation de cristaux de glycine. Tout cela laisse supposer d'un mécanisme de nucléation en deux étapes comme illustré sur la Figure I.16.

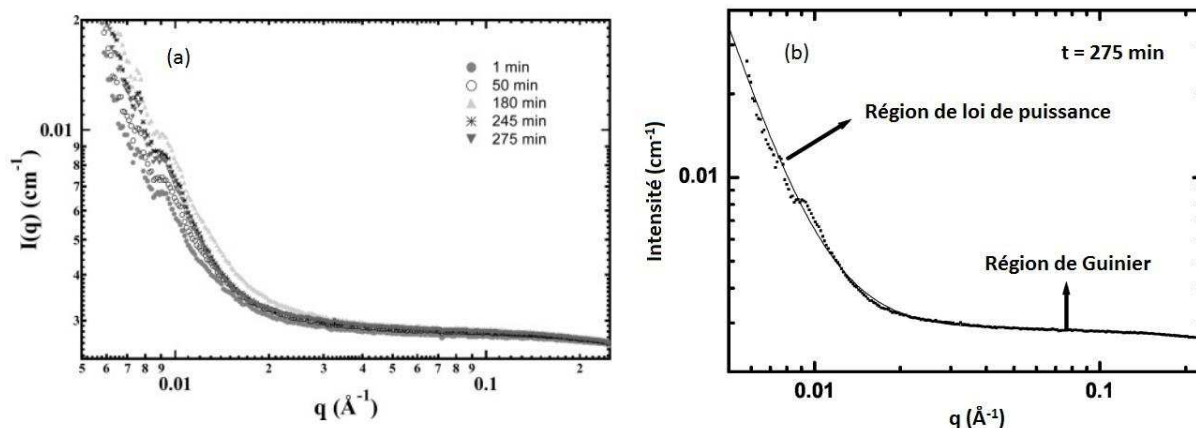


Figure I.15. Caractérisation par SAXS de l'évolution d'une solution de glycine à $c = 3,6$ M (Chattopadhyay et al., 2005). (a) Variation de l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde à différents temps. (b) Régression d'une courbe expérimentale à l'aide de la loi de Guinier qui permet d'obtenir le rayon de giration des molécules, et d'une loi de puissance, qui donne une idée du caractère fractal des objets en solution.

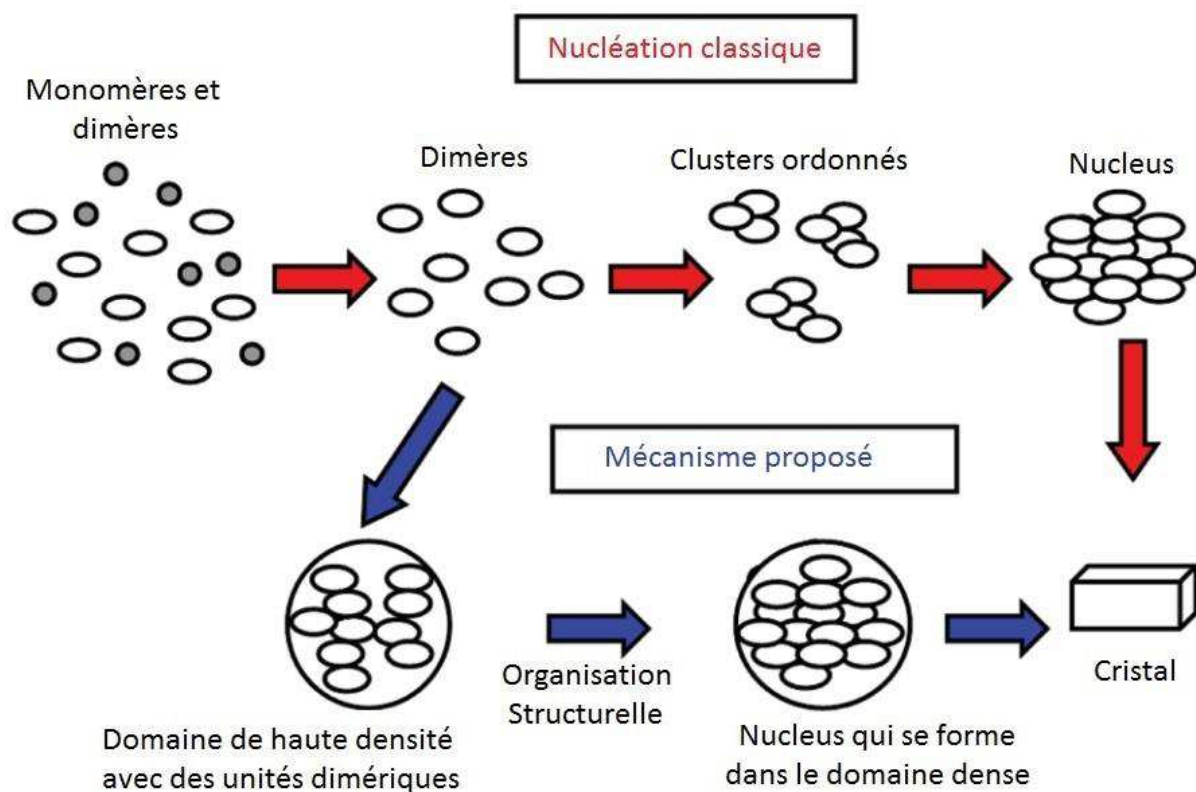


Figure I.16. Mécanisme de nucléation de la glycine proposé suite à une étude menée par SAXS (Chattopadhyay et al., 2005). Contrairement à la nucléation classique, il a ici été observé des objets de fractale de masse qui se réorganisent en fractale de surface avant de donner naissance au cristal, ce qui semble être en accord avec un mécanisme de nucléation en deux étapes.

Ensuite, une étude plus récente, qui tend à observer les mécanismes de nucléation à l'aide de SAXS a été réalisée avec la protéine β -lactoglobuline (BLG) en présence d'un sel divalent CdCl_2 (Sauter et al., 2015b). Deux conditions expérimentales ont été utilisées dans cette étude, une proche (BLG 33mg/mL et CdCl_2 4 mM) de la séparation liquide-liquide mentionnée précédemment, et une plus lointaine (BLG 20 mg/mL et CdCl_2 15 mM) en accord avec le diagramme de phase présenté sur la Figure I.17.

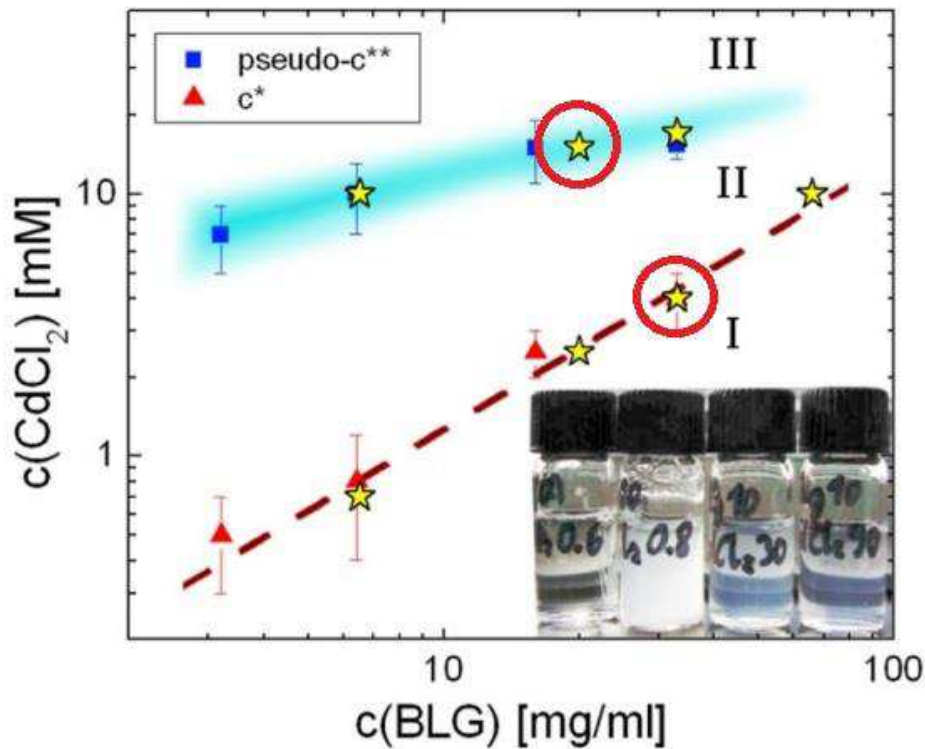


Figure I.17. Diagramme de phase expérimental de la BLG en présence de CdCl_2 à température ambiante (Sauter et al., 2015b). La ligne rouge pointillée correspond à la séparation liquide-liquide comme illustré par l'apparition de turbidité dans le deuxième échantillon en bas à droite. La zone bleutée est une zone de transition avec une disparition de la turbidité de la solution et une homogénéisation de la solution. Les points entourés en rouge sont les points expérimentaux étudiés.

Les deux solutions correspondantes sont insérées dans un capillaire en quartz placé devant le faisceau et les données SAXS sont collectées toutes les 2 à 5 minutes pour suivre l'évolution du signal en fonction du temps. Ces signaux sont présentés sur la Figure I.18.

Il est intéressant de normaliser l'intensité obtenue à un instant t par l'intensité à $t = 0$, car ainsi il est possible d'observer l'évolution relative de l'intensité, et d'avoir une idée des structures qui peuvent apparaître ou disparaître en fonction du temps, et c'est d'ailleurs ce qui est réalisé dans ces travaux. Dans le premier cas, pour une condition éloignée de la séparation liquide-liquide, des pics de Bragg apparaissent après un temps d'induction (environ 20 minutes) et grossissent avec le temps (Figure I.18a,c).

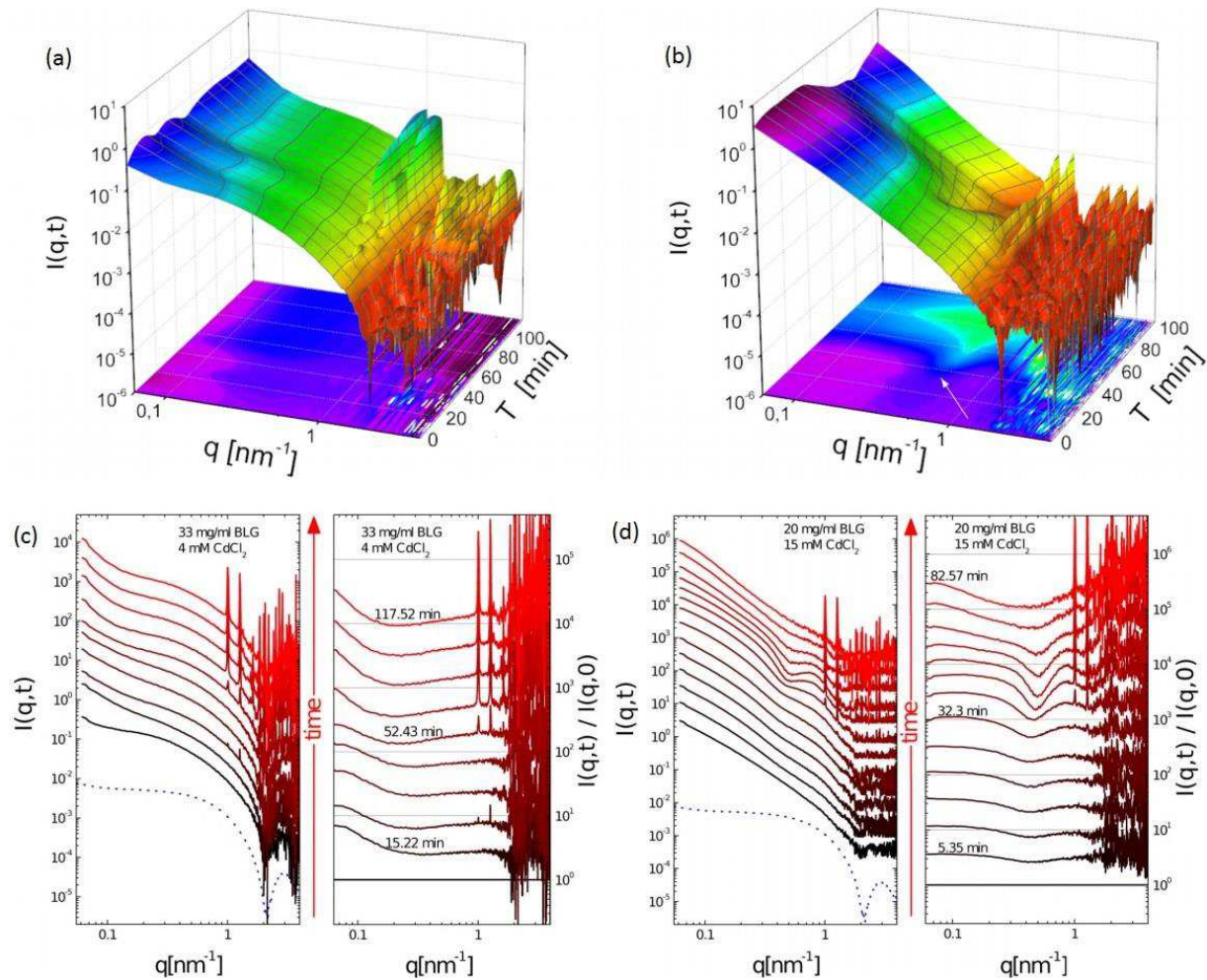


Figure I.18. Courbes SAXS en fonction du temps pour une solution de 33 mg/mL de BLG et 4 mM de CdCl_2 (a,b) soit « loin » de la séparation liquide-liquide et une solution de 20 mg/mL de BLG et 15 mM de CdCl_2 (c,d) soit « proche » de la séparation liquide-liquide. (Sauter et al., 2015b). (a,c) Illustration de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion et du temps en surface 3D. (b,d) Intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde pour différents temps et intensité diffusée normalisée par les valeurs d'intensité à $t = 0$. Les courbes sont décalées pour une meilleure visibilité, la ligne pointillée bleue représente le facteur de forme de la BLG.

Mis à part cette observation, l'allure des courbes n'évolue pas avec le temps, ce qui signifie qu'aucun état autre que la protéine en solution, et la forme cristalline n'est présent. Ces résultats peuvent être par conséquent le reflet de la théorie classique de la nucléation dans laquelle le nucleus est bâti par addition successive de monomère (cette évolution est tellement lente, que la structuration du cluster de nucléation est réalisée en même temps). Ce résultat pourrait également s'expliquer par la faible concentration et la faiblesse des fluctuations de concentrations proche de l'équilibre, qu'il serait en dessous du seuil de sensibilité de la diffusion de rayons X aux petits angles. En revanche, pour la condition proche de la séparation liquide-liquide, lorsque le temps avance, une bosse apparaît entre 0,7 et 1,4 nm^{-1} (Figure I.18b,d). Puisque la diffusion souligne l'existence de structures en solution, l'évolution de cette bosse avec le temps peut s'interpréter comme l'évolution d'un paramètre structural d'un ordre de grandeur d'environ 10 nm (voir la partie consacrée au SAXS, chapitre 4, pour le passage du vecteur d'onde à une

distance). L'intensité de cette bosse augmente avec le temps jusqu'à l'apparition de pics de Bragg. Les deux pics de plus grande intensité se trouve d'ailleurs sur la bosse (1,01 et 1,27 nm⁻¹). A partir de ce moment, l'intensité des pics de Bragg augmente, alors que celle de la bosse diminue jusqu'à une éventuelle disparition. Il semble donc que cette bosse soit représentative des clusters de nucléation qui apparaissent et dans lesquels la cristallisation intervient, consommant en quelque sorte ces agrégats. Pour aller plus loin, ce groupe de recherche a modélisé la bosse à l'aide d'une Gaussienne et les deux pics par deux Gaussiennes plus étroites et par analogie avec le concept de degré de cristallinité des polymères, ont utilisé les intégrales (ou surfaces sous la courbe) de chacune des courbes pour avoir une idée des proportions relatives de chaque phase. Cette modélisation est présentée sur la Figure I.19. Suite à cette analyse, un modèle cinétique basé sur des étapes plausibles physiquement est développé et les résultats en découlant sont également présentés sur la Figure I.19. Ce modèle n'est pas explicité ici mais on pourra se référer à la publication pour plus de détails.

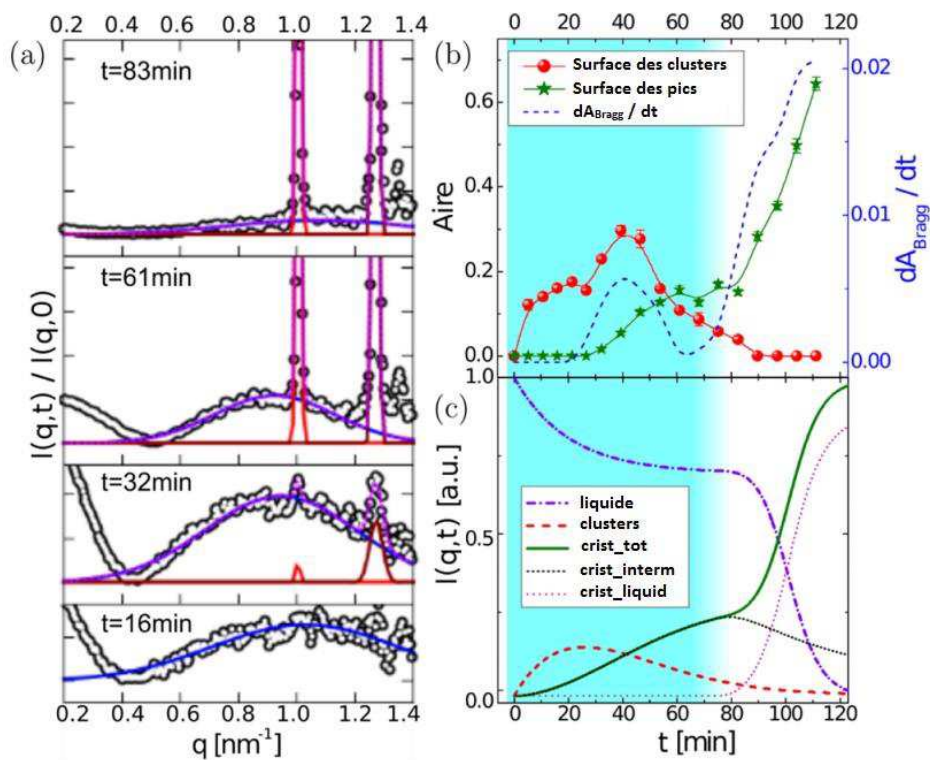


Figure I.19. Modélisation et analyse des données de diffusion (Sauter et al., 2015b). (a) Les surfaces de la bosse (clusters) et des pics (cristaux) ont été calculées en les modélisant à l'aide de Gaussiennes. (b) L'évolution de ces surfaces en fonction du temps est représentée avec des sphères rouges (clusters) et étoiles vertes (cristaux). La ligne pointillée bleu est la dérivée de la surface représentative des cristaux en fonction du temps, donc la vitesse de cristallisation, qui a un maximum local au niveau du maximum de la surface correspondant aux clusters. (c) Une modélisation des vitesses de nucléation.

Pour terminer, ce groupe de recherche (Sauter et al., 2016) a encore plus récemment effectué des travaux similaires, d'étude de structures et d'agrégats métastables de protéines à l'aide de SAXS mais aussi de SANS (diffusion de neutrons) à nouveau avec de la β -lactoglobuline (BLG) mais cette fois ci en présence d'un sel trivalent YCl_3 (Sauter et al., 2016) (Sauter et al., 2016). Dans ces travaux

ils se sont notamment intéressés à l'évolution des structures lorsqu'une rampe de température descendante est imposée. Ces résultats sont présentés sur la Figure I.20.

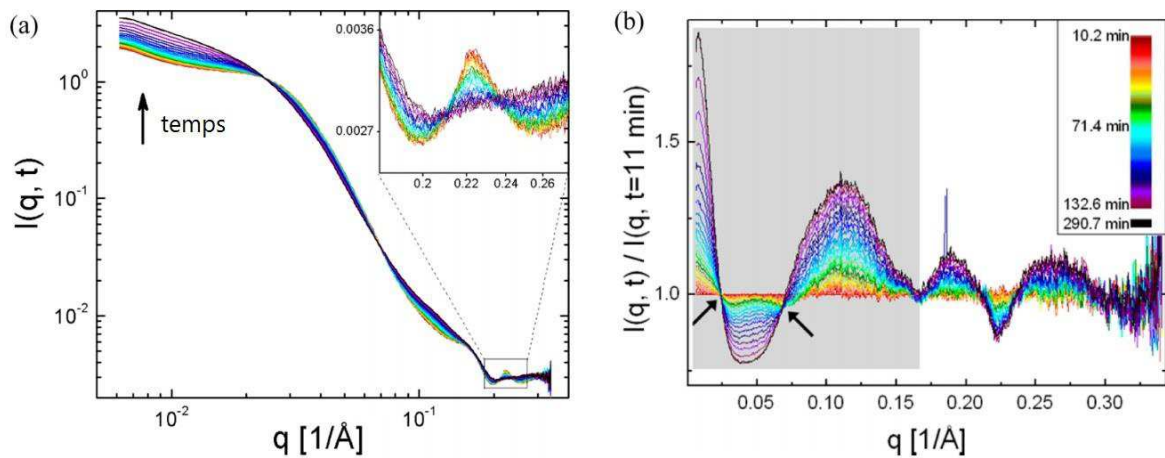


Figure I.20. Courbes SAXS en fonction du temps d'une solution avec 60 mg/mL de BLG et 15 mM de YCl3 lors d'une rampe de température de 37 à 10°C (Sauter et al., 2016). (a) Variation de l'intensité en fonction du vecteur d'onde pour différents temps. L'insert montre un zoom sur l'évolution du pic de corrélation monomère-monomère. (b) Courbes normalisées par l'intensité à $t = 0$ pour observer l'évolution relative des structures en fonction du temps.

Ces résultats illustrent qu'initialement, il existe des monomères en solution, qui disparaissent en refroidissant la solution, au profit de dimères qui se comportent comme des blocs de construction à la base de plus gros clusters. Il est surtout important de noter que cette méthodologie permet d'observer l'évolution de structures et d'interactions en solution, des simples interactions entre monomères, à celle plus complexes liée à l'existence de clusters.

Ainsi, nous avons montré à travers ces différents exemples, tout l'intérêt que l'on peut apporter à des méthodes analytiques comme la DLS et la diffusion de rayons X aux petits angles qui permettent d'observer des tailles, des structures ou encore des interactions d'objets en solution, ainsi que leur évolution en fonction du temps, et qui ont par conséquent fait leurs premières preuves lors d'études de mécanismes de nucléation. Cependant, il existe pour l'instant trop peu d'études et c'est pourquoi il semble intéressant de continuer dans cette direction pour approfondir la compréhension des mécanismes de nucléation.

1.2.3 Conclusion sur les mécanismes de nucléation

Nous avons donc illustré dans cette partie l'existence de deux mécanismes de nucléation qui se différencient par le nombre d'étapes nécessaires à la formation d'un nucleus cristallin. Nous avons d'une part, la théorie classique de la nucléation reposant sur des hypothèses simplificatrices, au cours de laquelle interviennent simultanément des fluctuations de concentrations et de structure, qui mène à la formation, molécule par molécule, d'un nucleus cristallin, qui pourra grossir en cristal si sa taille est suffisante, et qui le cas contraire aura tendance à se dissoudre. L'avantage d'une telle théorie est que dans les cas où elle est valable, elle permet de calculer des vitesses de nucléation à partir de paramètres connus. Et d'autre part, plus récemment, a été proposé le mécanisme de nucléation en deux étapes, où interviennent successivement une fluctuation de

densité qui mène à la formation de clusters amorphes, ou agrégats de liquide dense, suivie par une fluctuation de structure à l'intérieur de celles-ci afin de donner aux molécules, une structure cristalline. D'un point de vue thermodynamique, la théorie classique de la nucléation ne contient qu'une barrière énergétique à franchir, qui correspond à la formation d'un nucleus critique, alors que le mécanisme en deux étapes contient naturellement deux barrières énergétiques à franchir, une liée à la formation d'agrégats dense, et une liée à l'énergie requise pour une restructuration interne. Graphiquement cela peut se représenter comme sur la Figure I.21.

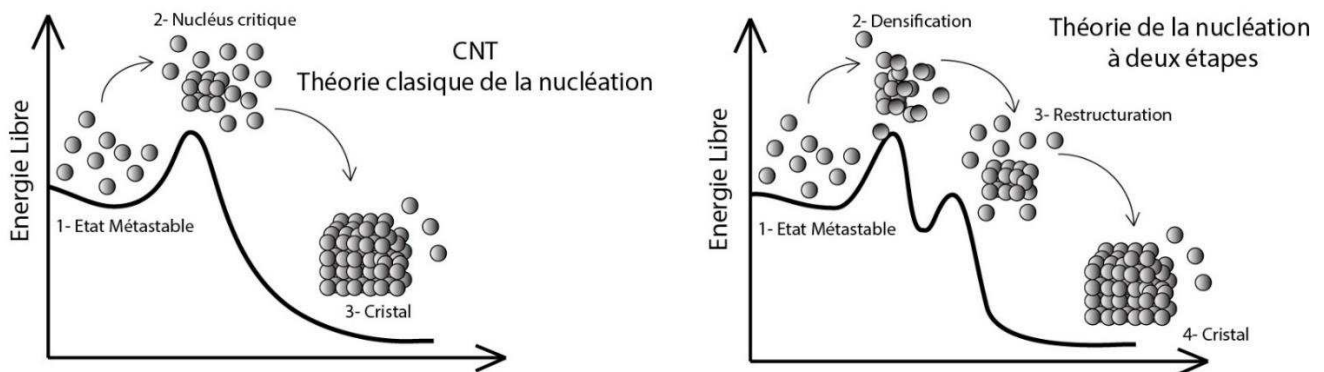


Figure I.21. Comparaison d'un point de vue thermodynamique des deux mécanismes de nucléation. La théorie classique ne comporte qu'une barrière énergétique à franchir correspondant à la formation d'un nucleus critique alors que le mécanisme en deux étapes contient une première barrière pour la formation de gouttes de liquide denses métastables, et une seconde pour la restructuration à l'intérieur de celles-ci.

Il a été montré, aussi bien à l'aide de simulations numériques, que de résultats expérimentaux issus de méthodes analytiques comme la DLS ou le SAXS que l'orientation du chemin de nucléation vers un mécanisme ou vers l'autre semble être gouverné par la position des conditions expérimentales dans le diagramme de phase. Plus précisément, dans des conditions proches de la zone de démixtion liquide-liquide, le mécanisme en deux étapes sera favorisé, à l'inverse, dans des conditions plus lointaines, le mécanisme correspondra à la théorie classique de la nucléation. Néanmoins, peu d'études expérimentales ont été réalisées jusqu'à présent, et c'est pourquoi il semble intéressant de s'y pencher afin de savoir dans quelles mesures ces résultats sont valables et de préciser la notion de proximité ou d'éloignement à la frontière de démixtion. Enfin, dans les années à venir, il peut sembler intéressant de développer un modèle universel, qui comble les lacunes de la théorie classique, mais qui serait également applicable loin de la séparation liquide-liquide.

La nucléation restant un phénomène aléatoire de par sa nature, il semble intéressant de travailler avec une méthode permettant de répéter un grand nombre de fois les mêmes conditions expérimentales afin de s'assurer d'obtenir des nuclei et éventuellement de procéder à des méthodes statistiques afin d'obtenir des informations sur la nucléation. C'est en accord avec cette réflexion et avec les récents développements techniques du domaine que nous nous sommes intéressés à la microfluidique.

I.3 La microfluidique

Dans cette partie nous allons évoquer la microfluidique, qui semble s'être démocratisée depuis une vingtaine d'années, mais qui reste néanmoins une technique en perpétuelle évolution, qui offre beaucoup de possibilités d'applications dans un grand nombre de domaines. Nous présenterons alors quelques généralités sur la microfluidique, en tentant de la définir et en présentant quelques applications possibles, puis nous nous intéresserons plus particulièrement aux études qui peuvent nous intéresser dans le cadre de cette thèse, à savoir la microfluidique pour des études de nucléation, et la microfluidique couplée à la diffusion de rayons X aux petits angles.

I.3.1 Origines et généralités de la microfluidique

I.3.1.1 Intérêts pour la microfluidique

La microfluidique peut se définir de manière générale comme étant la science et la technologie de systèmes permettant de manipuler des petits volumes de fluides (10^{-18} à 10^{-9} litres) à l'aide de canaux dont les dimensions sont comprises entre quelques dizaines et quelques centaines de micromètres. Les premiers intérêts notables pour la microfluidique sont liés à ses utilisations couplées à des méthodes analytiques. En effet, elle semble dans ce domaine présenter beaucoup d'avantages : elle permet de n'utiliser que de petites quantités de produits, de réaliser des séparations et détections avec une grande résolution et sensibilité, et de réaliser des analyses rapides tout en ayant une très faible empreinte du dispositif expérimental. Des dispositifs expérimentaux calqués sur ceux que l'on retrouve en industrie ont ainsi vu le jour et il n'est pas rare de retrouver de la microfluidique pour réaliser de l'électrophorèse capillaire (Manz et al., 1992), de la chromatographie liquide haute pression (HPLC) ou encore de la chromatographie en phase gazeuse (Zampolli et al., 2009) avec des dispositifs semblables à celui illustré sur la Figure I.22.

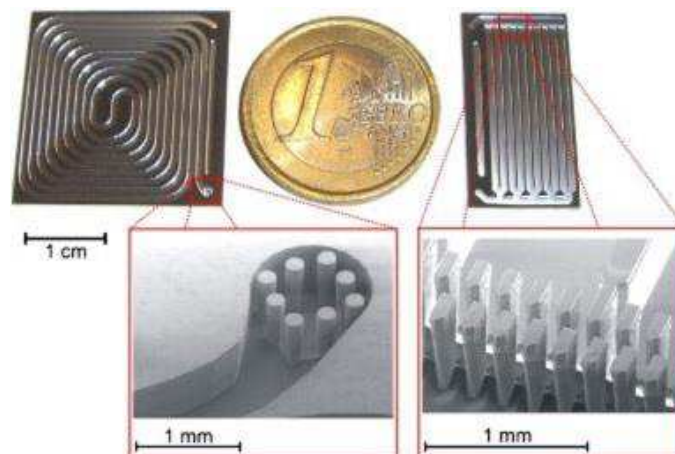


Figure I.22. Exemple de designs de puces microfluidiques utilisées en chromatographie en phase gazeuse (Zampolli et al., 2009). On a sur la partie de gauche l'équivalent de la colonne de séparation, et sur la partie de droite une colonne de pré-concentration. Les inserts illustrent les filtres de taille micrométrique dans les colonnes.

Un autre domaine d'application dans lequel la microfluidique est apparue comme un outil intéressant est la biologie moléculaire. En effet, l'intérêt grandissant pour la génomique dans les années 80, ainsi que d'autres domaines de microanalyse liés à la biologie moléculaire, comme le séquençage de l'ADN par exemple, ont engendré la nécessité de méthodes analytiques encore plus rapide et ayant plus de résolution et de sensibilité que ce qu'il se faisait en biologie jusqu'à présent. Désormais, beaucoup d'études en biologie moléculaire sont menées à l'aide d'outils microfluidiques (Bruijns et al., 2016).

I.3.1.2 Matériaux de fabrication

Initialement, la microfluidique a été développée par analogie avec la microélectronique en utilisant des méthodes de fabrication similaires comme la photolithographie et l'utilisation de silicium. Les premières puces microfluidiques apparues étaient donc constituées de verre et de silicium, mais de tels dispositifs étaient chers à réaliser et le silicium est en plus opaque à la lumière visible et ultra-violette, ce qui rend son utilisation impossible pour les méthodes habituelles de détection optique. Plus récemment, nous avons donc assisté à l'utilisation d'autres matériaux moins chers et mieux adaptés comme les matériaux élastomères. Le plus employé actuellement est sans doute un polymère, le polydiméthylsiloxane (PDMS) qui présente des propriétés complètement différentes de celles du silicium (Whitesides and Stroock, 2001) notamment celles d'être flexible et optiquement transparent. Cette flexibilité permet notamment de réaliser des structures originales dans les puces telles que des valves ou des pompes intégrées (Unger et al., 2000) ce qui permet de manipuler précisément des fluides et trouve ainsi des applications dans de nombreux domaines. D'autres matériaux sont également utilisés couramment pour la fabrication de puces microfluidiques tels que le polyméthylméthacrylate (PMMA) ou le polycarbonate (PC) qui présentent l'avantage d'être rigide mais perméables aux gaz ce qui est particulièrement adapté pour la culture cellulaire de longue durée. D'autres matériaux originaux comme le papier sont également utilisés (Yang et al., 2017). On retrouve également assez récemment dans la fabrication de dispositifs microfluidiques des matériaux peu coûteux, capables de réticuler à la lumière UV, et faciles à utiliser, tels que la colle optique NOA81 ou encore le copolymère OSTEMER. Un avantage majeur du matériau OSTEMER est qu'il est possible de modifier ses propriétés de surface pour le rendre soit hydrophobe, soit hydrophile (Carlborg et al., 2012), ce qui rend son utilisation possible avec tous types de solutions, aqueuse ou huileuse. Plus d'informations sur ce copolymère et le procédé de fabrication seront données dans la partie suivante. Pour terminer, il existe également des matériaux résistants aux rayons X qui sont utilisés pour la fabrication de puces justement destinées à subir des radiations pour des études de diffusion, ou de diffraction et on peut notamment citer le Kapton (Barrett et al., 2006a). Un protocole de fabrication de puce microfluidique en Kapton sera également présenté dans la prochaine partie. Ceci reste une liste non exhaustive des matériaux de fabrication, mais les principaux utilisés sont évoqués, d'autres informations pouvant être obtenues dans la littérature (Ren et al., 2013).

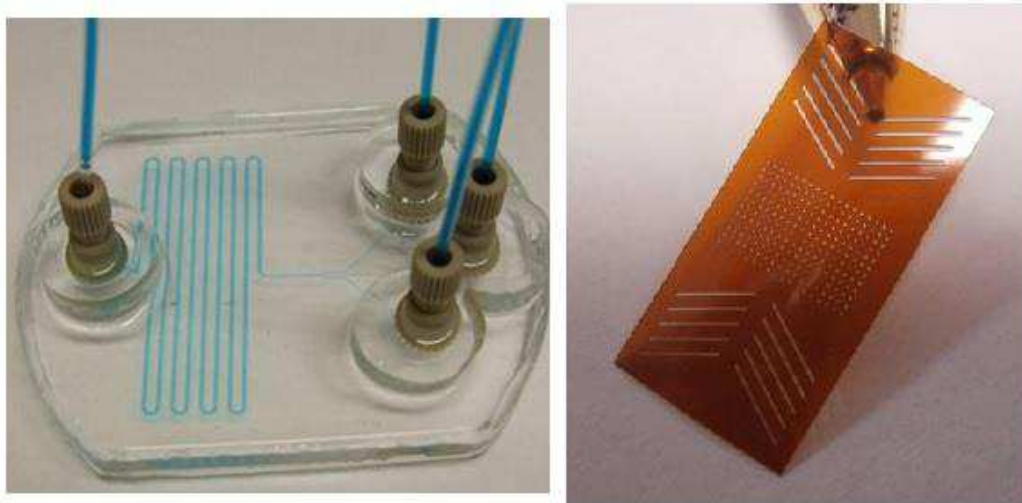


Figure I.23. Exemples de matériaux pour la fabrication de puces microfluidiques. (Gauche) PDMS (Droite) Kapton.

Après avoir évoqué différents matériaux utilisables pour la fabrication des puces microfluidiques, intéressons-nous désormais à quelques fonctionnalités possibles grâce à la microfluidique.

I.3.1.3 Propriétés des systèmes microfluidiques

Les nombreux avantages procurés par la microfluidique, proviennent de la taille des dispositifs utilisés. La miniaturisation impacte sur les temps caractéristiques des phénomènes se déroulant au cœur du procédé ainsi que sur les propriétés des écoulements.

Temps caractéristiques

Le temps caractéristique d'une opération est un indicateur de la rapidité ou de la facilité de réalisation de cette opération. Quelques expressions de temps caractéristiques usuels en génie des procédés ainsi que leur dépendance à la dimension caractéristique d du système sont répertoriées dans le Tableau I.1.

Il apparaît dans ce tableau que le temps caractéristique pour des réactions homogènes ne dépend pas de la dimension caractéristique d du système alors que les autres temps caractéristiques présentent une dépendance avec d . On note ainsi que les temps caractéristiques du transfert de matière et de chaleur sont proportionnels au carré de la dimension caractéristique. Ainsi, l'utilisation de microsystèmes, dans lesquels la dimension caractéristique est fortement réduite par rapport aux systèmes classiques, permet de réduire grandement les temps de transfert de matière et de chaleur tout en conservant les temps caractéristiques de réaction. Alors, les limitations réactionnelles liées au transfert de matière ou de chaleur se trouvent réduites en microsystème.

Tableau I.1. Expression de quelques temps caractéristiques en génie des procédés.

Phénomènes	Temps caractéristique	Dépendance à la dimension caractéristique d
Réaction en phase homogène de degré n	$t_{hom} = \frac{C_0}{R_0} = \frac{1}{kC_0^{n-1}}$	0
Réaction hétérogène d'ordre apparent égal à 1	$t_{hét} = \frac{d}{2k_S}$	1
Transfert de matière par diffusion	$t_{diff} = \frac{d^2}{D_{diff}}$	2
Transfert de masse par convection à Sherwood constant	$t_{mat} = \frac{d^2}{Sh \cdot D_{diff}}$	2
Conduction de chaleur	$t_{cond} = \frac{\rho \cdot C_p \cdot d^2}{\lambda}$	2
Transfert de chaleur par convection à Nusselt constant	$t_{conv} = \frac{\rho \cdot C_p \cdot d^2}{\lambda \cdot Nu}$	2

Rapport surface/volume élevé

La surface spécifique des canaux à l'intérieur de systèmes microfluidiques est très grande par rapport à des systèmes classiques. Elle peut prendre des valeurs comprises entre $10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ et $5 \cdot 10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ alors que pour cette valeur n'excède en général pas $10^3 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ en laboratoire et $100 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ dans les installations industrielles (Ehrfeld et al., 2004). Ces valeurs élevées s'expliquent par les faibles valeurs de diamètres hydrauliques dans des systèmes microfluidiques. En effet, cette dimension caractéristique est souvent de l'ordre de la centaine de micromètres. Si l'on considère un canal de section carrée de côté c , la surface spécifique s'exprime alors :

$$\frac{S}{V} = \frac{4}{c} \quad \text{Eq. I-27}$$

Pour une longueur c de $100 \text{ }\mu\text{m}$, on retrouve bien une surface spécifique élevée, de $4 \cdot 10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$.

On a alors une surface spécifique proportionnelle à l'inverse de la dimension caractéristique, ce qui signifie que plus cette dimension est faible, plus la surface spécifique est élevée. Ceci a notamment pour conséquence l'accélération des phénomènes de transfert. Il a été mesuré dans des microsystèmes des coefficients de transfert de chaleur proches de $50\,000 \text{ W/m}^2 \text{ K}$ (K. Schubert, 2001), soit un ordre de grandeur supérieur à celui des échangeurs thermiques conventionnels.

Aussi, cette grande surface spécifique est un atout lorsqu'il s'agit de mettre deux espèces d'un système multiphasique en contact. Les réactions en phase gaz catalysées par un solide fixé sur la paroi interne du canal, ou les contacteurs multiphasiques par exemple bénéficient d'une interface encore plus élevée.

Nombre adimensionnels caractéristiques

Des différences fondamentales existent entre les propriétés des fluides s'écoulant dans des grands tuyaux et ceux s'écoulant dans des microcanaux (H.A. Stone et al., 2004; Squires and Quake, 2005). Une des différences est le régime d'écoulement, relié au nombre adimensionnel de Reynolds Re . Pour un fluide en écoulement on a :

$$Re = \frac{\rho V L}{\mu} = \frac{\text{inertie}}{\text{viscosité}} \quad \text{Eq. I-28}$$

avec :

- ρ : la masse volumique du fluide [kg/m^3]
- V : la vitesse d'écoulement [m/s]
- L : la dimension caractéristique [m]
- μ : la viscosité dynamique [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]

Ce nombre représente le rapport entre les forces d'inertie (volumique) et les forces visqueuses (surfactive). Il est également représentatif du rapport du transfert par convection au transfert par diffusion de la quantité de mouvement. Un nombre de Reynolds élevé (> 1000) correspond à un écoulement turbulent, dominé par la convection avec l'apparition d'évènement chaotiques, désordonnés et imprévisibles. A l'inverse, un nombre de Reynolds faible (< 100) correspond à un écoulement laminaire, dominé par la diffusion, où tout est ordonné, ce qui rend facile la manipulation des fluides.

Lorsque l'on passe d'un tuyau de quelques dizaines de centimètres de diamètre à un canal d'une largeur de quelques micromètres, on a par conséquent une augmentation drastique de la surface spécifique, comme évoqué précédemment, donc une diminution des forces volumiques par rapport aux forces surfactives. En terme de nombre de Reynolds, on réduit drastiquement la dimension caractéristique ce qui se traduit par une diminution du nombre de Reynolds. Ainsi, dans la majorité des dispositifs microfluidiques, le nombre de Reynolds est tel que les écoulements sont laminaires. De ce fait, dans de tels dispositifs, il est facile de manipuler avec précision les fluides utilisés.

Pour caractériser des systèmes diphasiques, il est également courant d'utiliser un nombre adimensionnel, le nombre capillaire Ca qui représente le rapport entre les forces visqueuses et les forces de tension interfaciale :

$$Ca = \frac{\mu \cdot V}{\sigma} = \frac{\text{viscosité}}{\text{tension interfaciale}} \quad \text{Eq. I-29}$$

avec :

- μ : la viscosité dynamique du liquide [$\text{Pa}\cdot\text{s}$]
- V : la vitesse d'écoulement [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]
- σ : la tension interfaciale [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]

Dans des systèmes microfluidiques, les valeurs de ce nombre sont généralement faibles (inférieures à 10^{-2}) ce qui illustre l'importance des forces de tension interfaciale. Lors d'écoulement diphasique, de deux composés immiscibles, un composé formant des gouttes (ou des bulles) dans l'autre, il est d'ailleurs possible de relier la tension interfaciale entre les deux composés à la courbure de l'interface à l'aide de la loi de Laplace :

$$P_b - P_a = 2 \sigma H \quad \text{Eq. I-30}$$

avec :

- P_b et P_a : les pressions dans les deux milieux au niveau de l'interface [Pa]
- σ : la tension interfaciale [N.m^{-1}]
- H : la courbure moyenne de l'interface [m^{-1}]

Il est également possible d'introduire un nombre combinant le nombre de Reynolds et le nombre capillaire : le nombre de Weber We . Il représente le ratio entre les forces d'inerties et la tension interfaciale et peut être utilisé pour décrire la formation et la segmentation d'un courant dispersé en gouttes (ou bulles) :

$$We = Re \cdot Ca = \frac{\rho V^2 L}{\sigma} = \frac{\textit{inertie}}{\textit{tension interfaciale}} \quad \text{Eq. I-31}$$

Enfin, un dernier nombre adimensionnel intéressant à introduire est le nombre de Péclet Pe , qui permet d'établir la nature du transfert de matière. Il définit le rapport entre le transport par diffusion et le transport par convection, on alors :

$$Pe = \frac{V L}{D} = \frac{\textit{convection}}{\textit{diffusion}} \quad \text{Eq. I-32}$$

Avec :

- V : la vitesse d'écoulement [m.s^{-1}]
- L : la dimension caractéristique [m]
- D : le coefficient de diffusion [$\text{m}^2.\text{s}^{-1}$]

Ainsi, un nombre de Péclet supérieur à 1 représentera un écoulement convectif, dans lequel la matière est principalement transportée par l'écoulement, alors qu'un Péclet inférieur à 1 représentera un écoulement dans lequel la diffusion domine, permettant un mélange entre les fluides miscibles.

Ces nombres adimensionnels permettent donc de caractériser les écoulements fluidiques et de déterminer les phénomènes physiques prédominants. On retrouve dans les écoulements microfluidiques, deux types différents d'écoulements : les écoulements monophasiques, avec des composés miscibles qui peuvent se mélanger et s'écouler à l'intérieur des dispositifs, et les

écoulements diphasiques dans lesquels plusieurs composés immiscibles sont introduits et permettent de former des gouttes ou des bulles.

I.3.1.4 Ecoulements monophasiques

La manipulation la plus simple de fluides en microfluidique est la microfluidique en phase continue. Dans de tels systèmes, un ou plusieurs fluides miscibles entre eux sont insérés dans le dispositif microfluidique et évoluent le long du canal. Cette opération est adaptée pour des applications biochimiques simples et bien définies (Chen et al., 2007; Seong et al., 2003) ou pour effectuer des synthèses par diffusion des réactifs (Shalom et al., 2007).

Les écoulements microfluidiques étant de nature laminaire, le mélange de fluides miscibles lors d'écoulements monophasiques est contrôlé par la diffusion moléculaire. Comme illustré dans le Tableau I.1, le temps caractéristique d'une telle opération est proportionnel au carré de la dimension caractéristique, donc plus la taille du système est petite, plus le mélange sera lent. Ainsi, par exemple, pour une distance caractéristique de $200\mu\text{m}$ et un coefficient de diffusion de $10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$, on obtient un temps de mélange de quelques dizaines de secondes. Afin de réaliser un mélange de plusieurs composants il faut également s'assurer que le transfert de matière est contrôlé par la diffusion et non par la convection, donc que le nombre de Péclet soit inférieur à 1. Les deux régimes de transfert sont illustrés sur la Figure I.24.

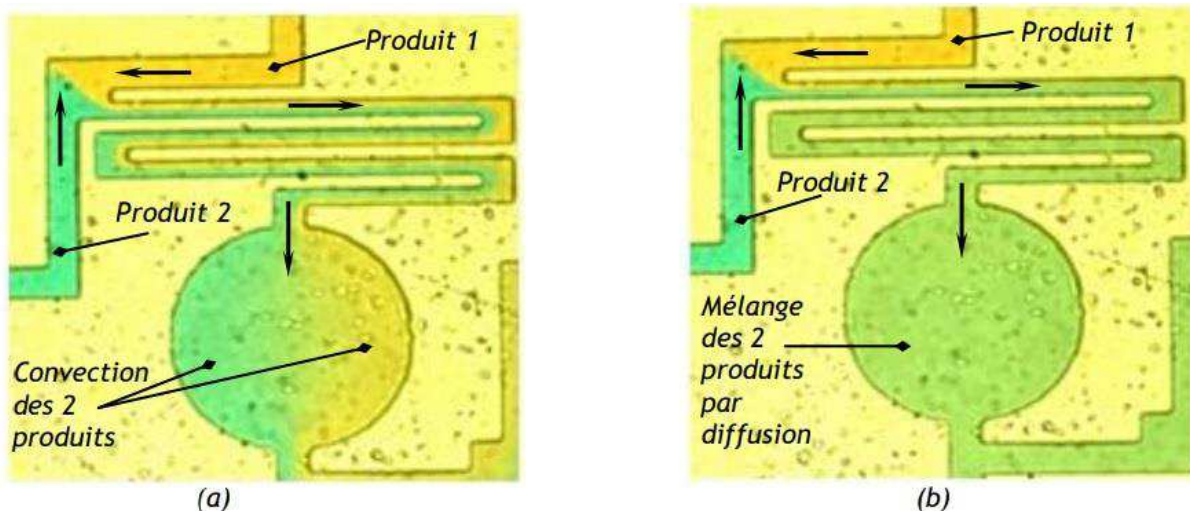


Figure I.24. Deux régimes d'écoulements monophasiques dans un système microfluidique. (a) $Pe > 1$: le transfert de matière est contrôlé par la convection, les produits sont donc entraînés par l'écoulement rendant compliqué le mélange. (b) $Pe < 1$: le transfert de matière est contrôlé par la diffusion, les produits pouvant ainsi se mélanger.

La vitesse de mélange étant relativement lente lors d'un transfert de matière dans un régime d'écoulement gouverné par la diffusion, il existe différentes manières de l'accélérer (Lee et al., 2011). Il est tout d'abord possible d'utiliser des mélangeurs microfluidiques actifs, dans lesquels on utilise par exemple des ondes acoustiques ou ultrasoniques pour accélérer le mélange. Il est également possible d'utiliser des champs magnétiques ou des perturbations de pression comme illustré sur la Figure I.25

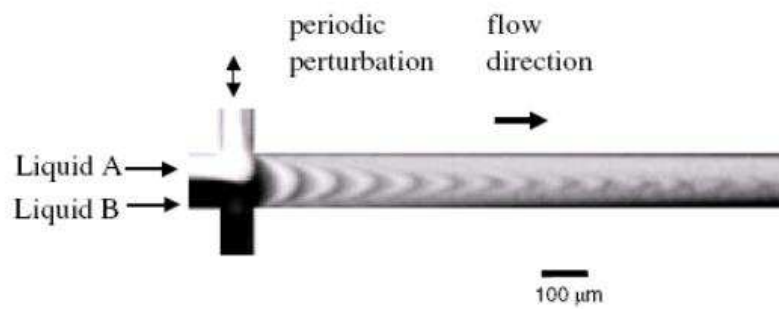


Figure I.25. Modèle d'un mélangeur chaotique actif avec des canaux latéraux permettant d'effectuer une perturbation de pression périodique induisant des distorsions de l'interface entre les deux liquides et accélérant ainsi le mélange (Niu and Lee, 2003).

D'autres systèmes de mélanges, appelés mélangeurs passifs, existent également. Ils reposent sur la modification de la géométrie des canaux microfluidiques dans le but d'accélérer le temps de mélange. Ils sont nombreux et variés et peuvent être par exemple composés de canaux en zigzag ou de canaux en serpentín en trois dimensions. Ces géométries augmentent les contraintes de cisaillement ce qui améliore la recirculation des fluides à l'interface et augmente ainsi la vitesse de mélange. Des exemples de ces géométries sont présentés sur la Figure I.26

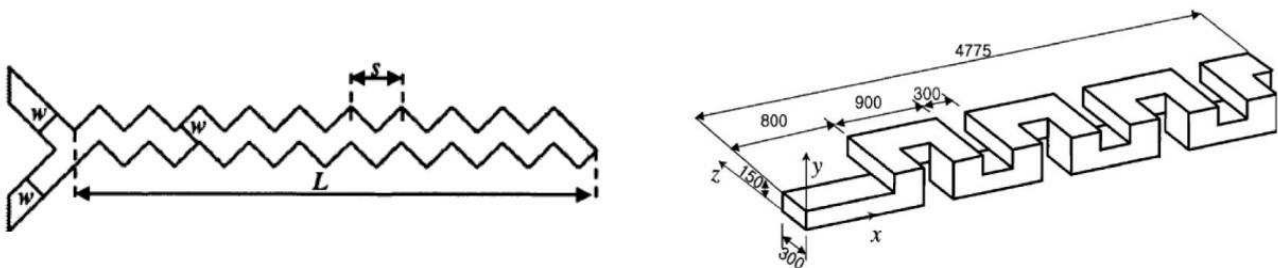


Figure I.26. Exemple de géométries de mélangeurs passifs. (Gauche) Canal en zigzag (Mengeaud et al., 2002) (Droite) Canal en serpentín tridimensionnel (Liu et al., 2004). Ces géométries augmentent les contraintes de cisaillement et augmentent ainsi la recirculation des fluides ce qui accélère le temps de mélange.

Ces approches d'écoulement monophasiques semblent donc intéressantes, mais comportent néanmoins un inconvénient significatif. En effet, elles semblent difficilement adaptables à des fluides qui voient leurs propriétés modifiées après le mélange, notamment si la viscosité augmente. De plus, dans de tels systèmes, les produits sont capables de diffuser le long du canal. Ainsi, dans le cas d'études de cristallisation, la nucléation d'une phase dans le canal, accompagnée de diffusion peut inhiber la nucléation et la croissance d'autres phases. L'impossibilité de compartimer les produits rend donc difficile l'utilisation de ces dispositifs dans certains cas d'études. C'est notamment pour palier ce problème qu'est apparue la microfluidique multiphasique.

I.3.1.5 Ecoulements diphasiques

Il est possible dans de tels systèmes de générer et manipuler des bulles de gaz (Gañán-Calvo and Gordillo, 2001; Garstecki et al., 2004) ou des gouttes de liquide monodisperses (Link et al., 2004; Tan et al., 2004) au sein d'une phase continue, liquide porteur. Nous pouvons citer comme exemple parmi les travaux réalisés en microfluidique gaz-liquide, des travaux effectués sur l'étude de cinétiques de réactions gaz-liquide (Li et al., 2012), sur l'étude de la réaction d'hydrogénation à l'aide d'un catalyseur solide présent dans le dispositif, donc avec une réaction tri-phasique (Kobayashi et al., 2004) ou encore l'étude d'écoulements à haute pression, dans des conditions proches du domaine supercritique, de bulles de CO₂ transportées par de l'éthanol (Martin, 2016) avec un dispositif semblable à celui représenté sur la Figure I.27.

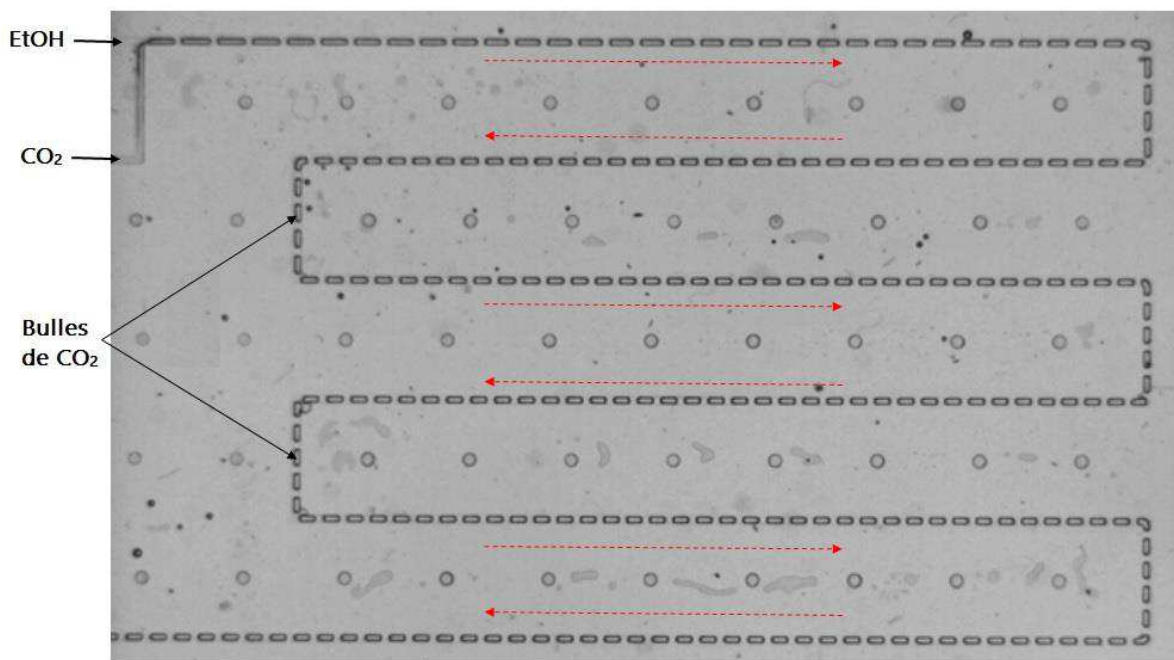


Figure I.27. Ecoulement diphasique de bulles de CO₂ dans un liquide porteur éthanol (Martin, 2016). Les débits massiques sont de 3,2 g/h pour le CO₂ et 4,63 g/h pour l'éthanol. La composition globale de CO₂ est $Z_{CO_2} = 0,41$ la pression 52 bars et la température 40°C. La largeur du canal est de 200 μm .

Mais les écoulements qui nous intéressent le plus dans le cadre de ces travaux, où l'on s'intéresse à la cristallisation en solution, sont les écoulements diphasiques liquide/liquide. En effet, dans de tels systèmes, il est possible de séparer continuellement une phase aqueuse, à l'aide d'une phase huile immiscible et ainsi former des gouttes de phase aqueuse transportées par l'huile. Il est également possible de réaliser l'inverse et de générer des gouttes d'huile transportées par une phase aqueuse. Ces dispersions permettent notamment de réaliser des particules, des émulsions ou encore des mousses (Xu et al., 2005).

On retrouve dans la littérature plusieurs méthodes de mise en contact des solutions pour générer des écoulements diphasiques. Dans une revue de 2013 (Nunes et al., 2013), trois principales manières de procéder sont présentées : les flux coaxiaux, les flux pincés et les jonctions en T, comme illustré sur la Figure I.28.

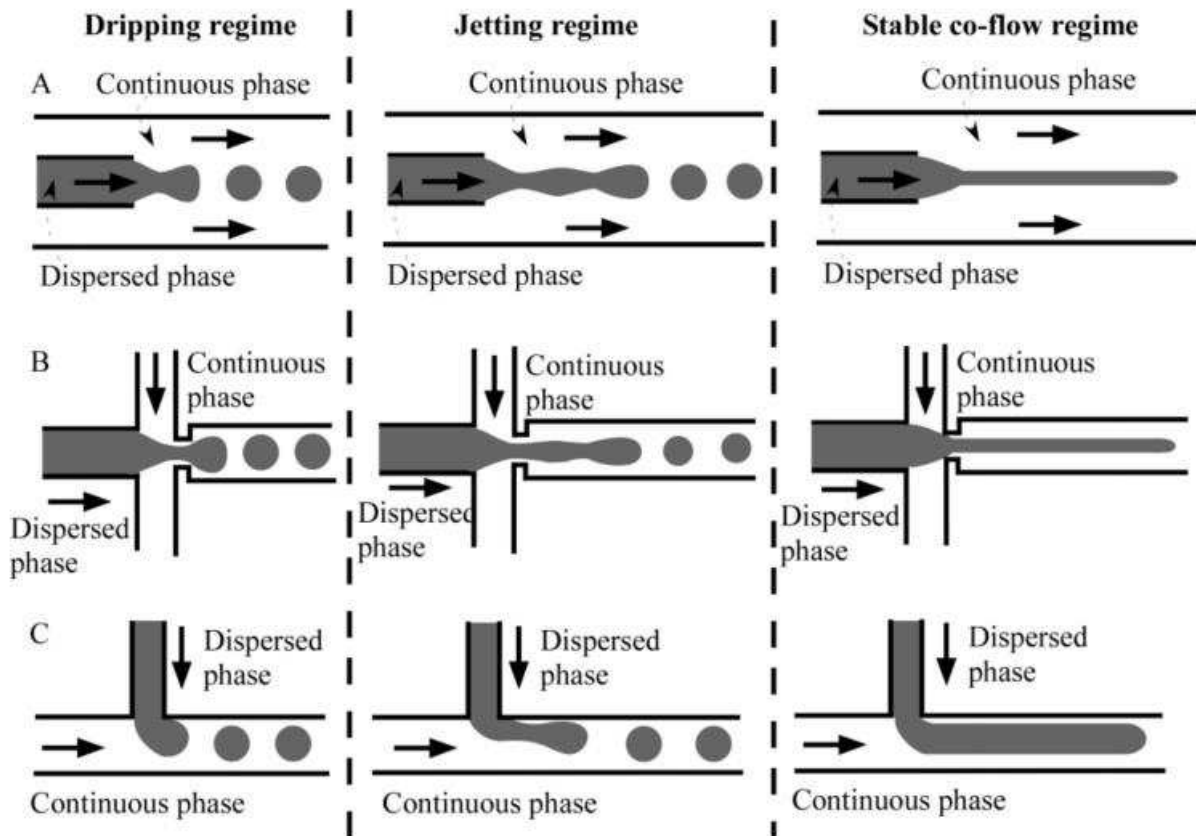


Figure I.28. 3 méthodes pour générer des gouttes dans un microcanal. (Nunes et al., 2013). (A) Flux coaxiaux, (B) flux pincés, (C) jonction en T. Le nombre de Weber (rapport de l'inertie sur la tension interfaciale) contrôle la génération des gouttes. Si ce nombre est trop élevé, la phase dispersée ne peut pas se séparer et aucune goutte ne se forme.

Dans la configuration coaxiale (Figure I.28. A), les deux fluides sont introduits dans le canal par deux tubes coaxiaux. Le fluide continu est inséré dans le tube de plus gros diamètre dans le but d'encercler la phase dispersée qui se découpe alors en gouttes. En général, le diamètre des gouttes de phase dispersée est comparable au diamètre du tube par lequel elle est introduite.

La configuration en flux pincés (Figure I.28. B), repose sur l'intersection de deux canaux dans le but de former une croix. Le canal dans lequel circule la phase dispersée rencontre la phase continue insérée dans deux canaux, de chaque côté du flux principal, provoquant la formation de gouttes engendrées par la contraction de volume au niveau de la croix.

Enfin dans la configuration en T (Figure I.28. C), la phase continue circule dans la branche principale du T et la phase dispersée est introduite par un canal latéral formant généralement un angle droit avec le canal principal (on peut aussi retrouver des angles différents avec par exemple des géométries en Y). Le mécanisme de formation est similaire à celui pour la configuration en flux pincés, avec une étape de remplissage du canal principal par la phase dispersée, puis une étape d'arrachage de la goutte à cause de la prédominance des forces de tension superficielle par rapport aux forces d'inertie dans cet état.

Il est justement important de maîtriser ce rapport des forces inertielles et de la tension de surface (indiqué par le nombre de Weber) car une valeur trop élevée de ce rapport conduira à un régime d'écoulement à co-courant des deux phases et non à la formation de gouttes. Pour réduire la valeur de ce nombre. De même, une valeur trop faible sera témoin d'une prédominance de l'énergie de surface, trop importante pour la formation de gouttes. Il est courant d'utiliser un tensioactif dans la phase continue qui agit de trois façon sur la stabilisation des gouttes :

- Ils facilitent la création des gouttes en diminuant la tension de surface donc l'énergie nécessaire à leur formation.
- Ils stabilisent les gouttes formées en diminuant le gradient de pression à l'interface (Eq. I-30).
- Il prévient les gouttes de la coalescence à l'aide de répulsions électrostatiques ou stériques entre les gouttes.

Réaliser ainsi des gouttes aqueuses dans de l'huile revient à compartimenter les échantillons. Et cela est précieux d'un point de vue de la cristallisation, car chaque goutte va se comporter comme un microréacteur de cristallisation, l'écoulement laminaire permettant de contrôler précisément les concentrations à l'intérieur des gouttes. Ainsi, dans le cadre de cristallisation de protéines à l'aide de sel, il est envisageable de mélanger trois solutions aqueuses de concentration définie, une de protéine, une de sel, et une de solution tampon, puis de les séparer à l'aide d'huile pour obtenir des microréacteurs de cristallisation avec des concentrations bien définies, comme illustré sur la Figure I.29. Les transferts de matière en régime laminaire étant gouvernés par la diffusion, il convient néanmoins de s'assurer que le mélange à l'intérieur des gouttes est assez rapide pour obtenir une solution homogène. A la manière des écoulements monophasiques de nombreuses géométries de canaux permettant d'augmenter les contraintes de cisaillement existent et sont répertoriées dans la littérature (Jeon and Shin, 2009; Lee et al., 2011; Suh and Kang, 2010; Wang et al., 2015). Ces contraintes de cisaillement permettent de contracter puis d'étirer les gouttes ce qui accélère le temps de mélange en accord avec la transformation du boulanger. La recirculation plus ou moins chaotique dans les gouttes permet d'obtenir à l'aide d'une géométrie en zigzag des temps de mélanges de quelques dizaines de millisecondes.

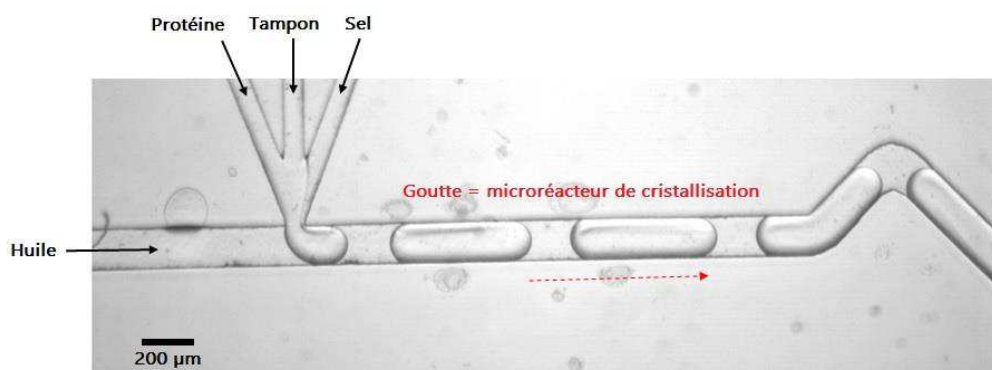


Figure I.29. Exemple de génération de gouttes se comportant comme des microréacteurs de cristallisation. Les composants de la phase aqueuse permettent d'obtenir une solution sursaturée en protéine qui est périodiquement séparée par une phase huile immiscible, formant ainsi des gouttes dont les paramètres (taille, volume, concentrations) sont parfaitement contrôlés grâce au régime laminaire de l'écoulement procuré par la microfluidique.

Un tel procédé de génération de gouttes est intéressant lorsque l'on souhaite passer au crible un grand nombre de conditions de cristallisation. En effet, il est possible de changer les concentrations à l'intérieur des gouttes, simplement en changeant les débits des solutions mères entrant dans la puce microfluidique. Il est ainsi possible de balayer un grand nombre de conditions expérimentales très rapidement et en utilisant peu de produit, ce qui est un avantage conséquent lorsque l'on souhaite trouver des conditions de cristallisation optimales. Une étude a d'ailleurs été réalisée en procédant de la sorte afin de trouver les conditions optimales de cristallisation du lysozyme en présence de sel NaCl et de polyéthylène glycol (PEG) en utilisant 4 nL de protéine pour chaque essai (Zheng et al., 2003), comme représenté sur la Figure I.30.

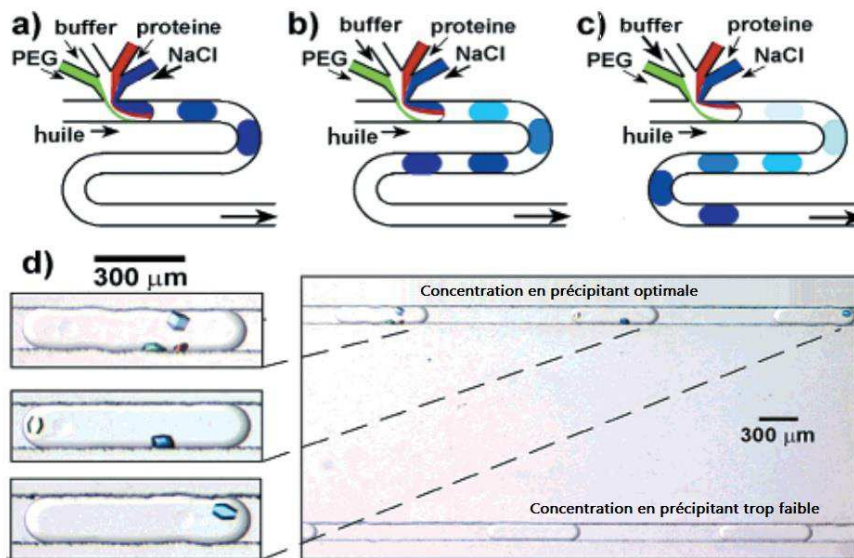


Figure I.30. Système de microfluidique de gouttes pour la cristallisation de protéines (Zheng et al., 2003). De (a) à (c) le débit de solution de NaCl diminue alors que celui de solution tampon augmente afin d'avoir la somme des deux identiques. Ainsi, le volume des gouttes reste le même mais la concentration en sel diminue. Chaque goutte correspond à un essai de cristallisation avec des concentrations différentes. (d) Ainsi, après avoir attendu assez longtemps, il est possible de voir dans quelles gouttes des cristaux sont apparus (bonnes conditions de cristallisation) et dans quelles gouttes rien ne s'est produit (mauvaises conditions de cristallisation).

Enfin, il est possible d'imaginer et de concevoir toute sorte de géométrie et de technique afin de manipuler les gouttes à l'intérieur d'un dispositif microfluidique (Pit et al., 2015), et par exemple de les faire coalescer (Xu et al., 2011), de les trier (Hatch et al., 2013), de les alterner (Chokkalingam et al., 2008) ou de les stocker puis de les relâcher au moment voulu (Huebner et al., 2009).

Il est également possible de réaliser des pièges capillaires pour stocker des gouttes, comme ceux présentés dans les travaux de Baroud (Dangla et al., 2011) et de Gallaire (Nagel et al., 2014). Ces pièges reposent sur la création de puits dans les systèmes microfluidiques. Ces puits correspondent à des petites zones de hauteur plus grande que le canal principal. Ainsi, des gouttes confinées entre la paroi supérieure et la paroi inférieure du canal principal voient leur surface augmenter lorsqu'elles pénètrent dans le puits. Ainsi elles diminuent leur énergie de surface, se trouvent dans une position plus stable, et sont donc piégées. Il est bien entendu nécessaire

d'optimiser les débits de stockage ainsi que les diamètre et profondeur des puits pour s'assurer d'un stockage efficace des gouttes. Nous utiliserons dans ces travaux un système de piège capillaire dans le chapitre 4. Un exemple de goutte gagnant en surface en pénétrant dans un puit est présenté sur la Figure I.31.

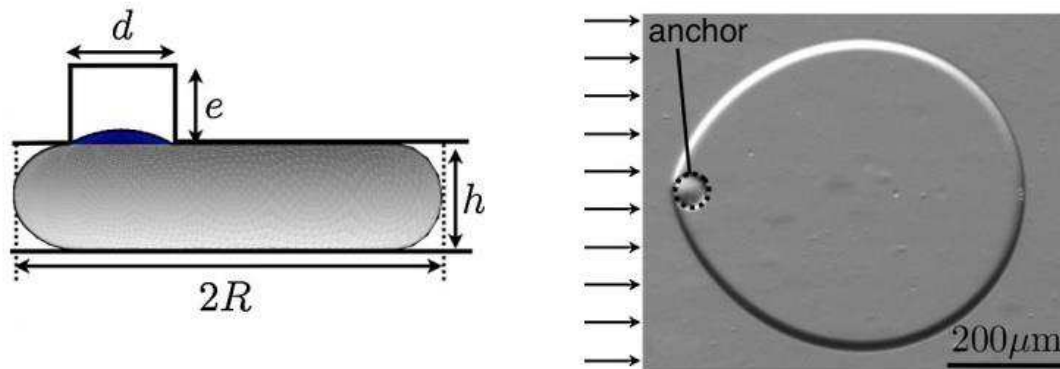


Figure I.31. Illustration du gain de surface d'une goutte entrant dans un puit (Dangla et al., 2011). En fonction des paramètres géométriques du puits, de la taille des gouttes, et des débits utilisés, la goutte peut se retrouver bloquée dans le puit.

Cette technique permet de stocker les gouttes dans des puits, mais également de la même manière sur des rails. Il est aussi possible de combiner ces rails avec un laser permettant d'orienter les gouttes (Abbyad et al., 2011; Fradet et al., 2011) comme illustré sur la Figure I.32 qui montre un bel exemple de l'éventail de possibilités conférées par la microfluidique de gouttes.

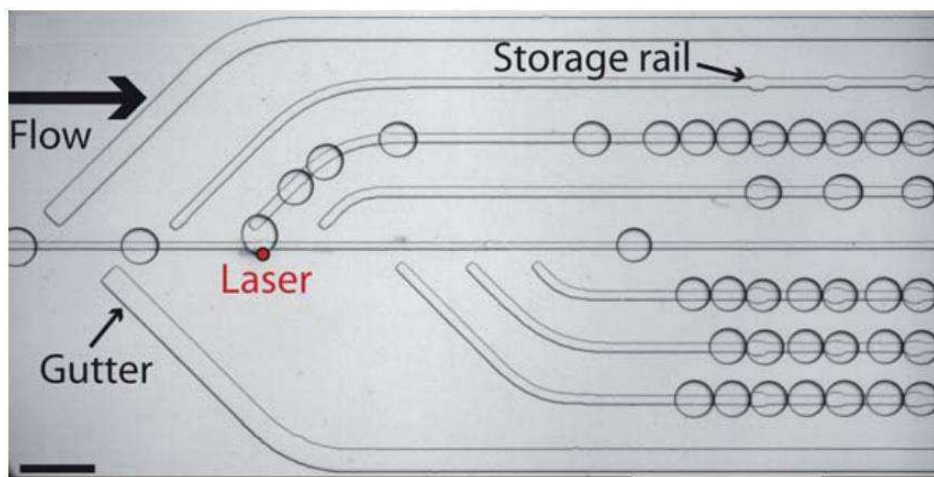


Figure I.32. Orientation de gouttes vers des rails de stockage à l'aide d'un laser (Fradet et al., 2011). Les gouttes gagnent en surface et donc sont plus stables en se déplaçant sur un rail de $50\mu\text{m}$ de profondeur. Le laser fournit de l'énergie à la goutte et permet ainsi de la faire dévier pour l'orienter vers un rail de stockage qui est sélectionné en fonction de la position du laser, permettant ainsi de créer des rails de gouttes avec éventuellement des compositions différentes.

La microfluidique de gouttes est donc une technique innovante et intéressante pour beaucoup d'applications précédemment évoquées, mais également pour une application plus particulièrement importante dans le cadre de cette thèse, à savoir la détermination de cinétiques de nucléation.

I.3.2 Détermination de cinétiques de nucléation

I.3.2.1 A partir de mesures de temps d'induction

La détermination expérimentale de vitesses de nucléation peut être une tâche complexe à cause de la nature stochastique de la nucléation et de l'impossibilité de détecter et de mesurer le nucleus critique. En génie chimique, la vitesse de nucléation est couramment obtenue à partir de mesures du temps d'induction qui se définit comme le temps écoulé entre l'instant de création de la sursaturation et le moment où apparaît le premier cristal détectable en solution. Ce temps représente la « capacité » d'une solution à rester dans un état d'équilibre métastable (Kashchiev, 2000). Les temps d'induction sont en général mesurés dans des réacteurs de cristallisation ou à l'aide de dispositifs de mélange rapides, avec des volumes variant de quelques millilitres à quelques litres, en orientant rapidement une solution vers un état métastable. Le grand nombre d'articles scientifiques de la littérature traitant de mesures de temps d'induction de molécules organiques et inorganiques en solution illustre le fait que cette approche est toujours la plus utilisée pour déterminer des vitesses de nucléation. C'est en effet une approche expérimentale facile à mettre en place et qui peut fournir des informations utiles sur le procédé de nucléation. Par exemple, dans le cas de la cristallisation de l'eflucimibe (Teychené and Biscans, 2008) il a été montré comment les cinétiques de nucléation, obtenues à partir de mesures de temps d'induction, peuvent expliquer l'apparition de différents polymorphes de cette molécule en solution.

Cependant, la détermination de vitesses de nucléation à partir de mesures de temps d'induction en solution est biaisée à cause des incertitudes expérimentales résultant de la nature stochastique de la nucléation (Jiang and ter Horst, 2011). De plus, le temps d'induction correspond souvent à de la nucléation hétérogène sur les parois du réacteur ou sur des impuretés dans la solution ou à sa surface. C'est pourquoi de nouvelles méthodes plus sophistiquées ont vu le jour pour éliminer les sites de nucléation hétérogène et s'affranchir du caractère stochastique de la nucléation.

I.3.2.2 Méthodes plus sophistiquées

Les techniques d'émulsion et de substrat (Turnbull, 1952; Turnbull and Cech, 1950) visent à compartimenter les particules hétérogènes dans des faibles volumes de l'échantillon. Dans la méthode d'émulsion, le liquide est dispersé en un grand nombre de petites gouttes dans un fluide porteur approprié. Si la dispersion est suffisamment fine (gouttes d'environ 100 μm), un nombre significatif de gouttes ne contient pas de site hétérogène. Alors, en faisant l'hypothèse que l'interface des gouttes ne catalyse pas la nucléation, la vitesse de nucléation homogène est obtenue à l'aide d'une méthode d'analyse statistique, en comptant le nombre de cristaux apparaissant dans chaque goutte et en utilisant une loi de Poisson (Pound and Mer, 1952). Plus de détails sur les modèles de nucléation probabilistes sont à retrouver dans le chapitre 3. Une méthode similaire consistant à remplir une plaque contrôlée en température, contenant un grand nombre de micro-puits avec la solution à cristalliser existe également et permet de déterminer des vitesses de nucléation à l'aide de méthodes statistiques (Galkin and Vekilov, 1999). Le dispositif expérimental utilisé dans cette étude ainsi que des exemples de gouttes sont présentés sur la Figure I.33.

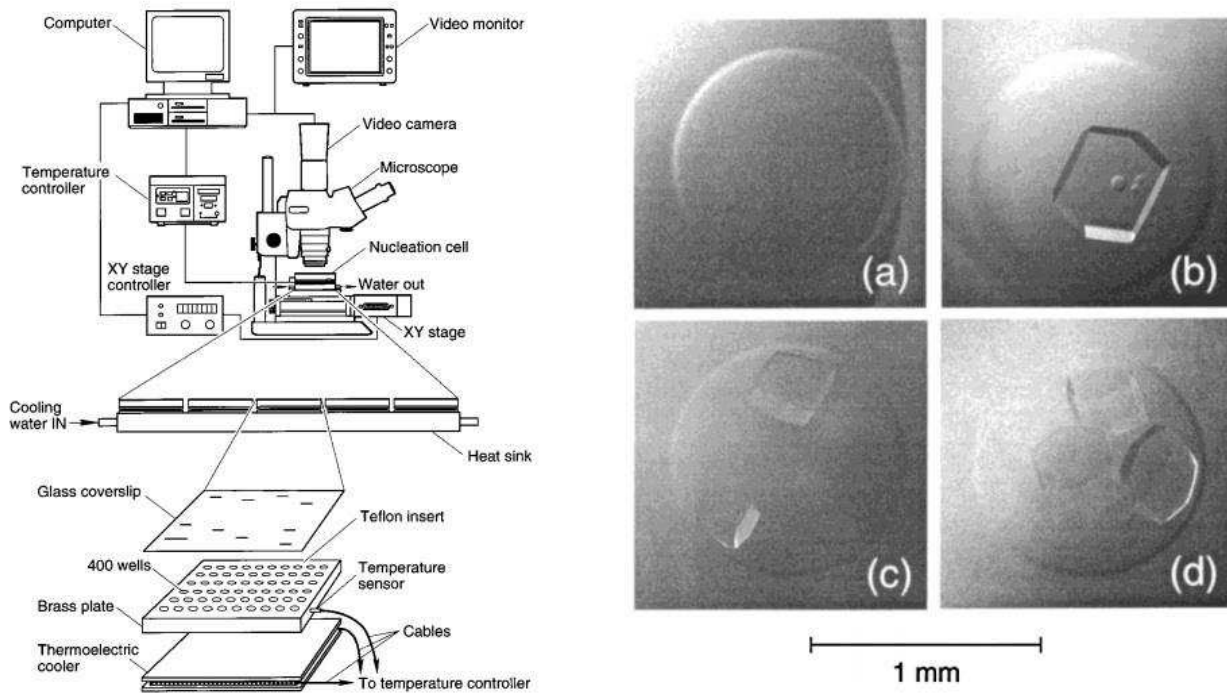


Figure I.33. Dispositif expérimental utilisé pour des études de cinétiques de nucléation (Galkin and Vekilov, 1999). Une plaque contenant 400 micro-puits est positionnée sur un contrôleur de température et observée au microscope. L'observation des gouttes dans les micro-puits au cours du temps, et le nombre de cristaux apparaissant permet à l'aide d'un modèle de nucléation probabiliste de déterminer les cinétiques de nucléation.

Des techniques de cristallisation par lévitation existent aussi, afin d'éviter les effets de cristallisation sur des parois. Ainsi, on retrouve des études sur des échantillons de plus grandes tailles allant du millimètre au centimètre mis en lévitation aérodynamique, acoustique, ou électrostatique, avec des dispositifs expérimentaux comme ceux présentés sur la Figure I.34.

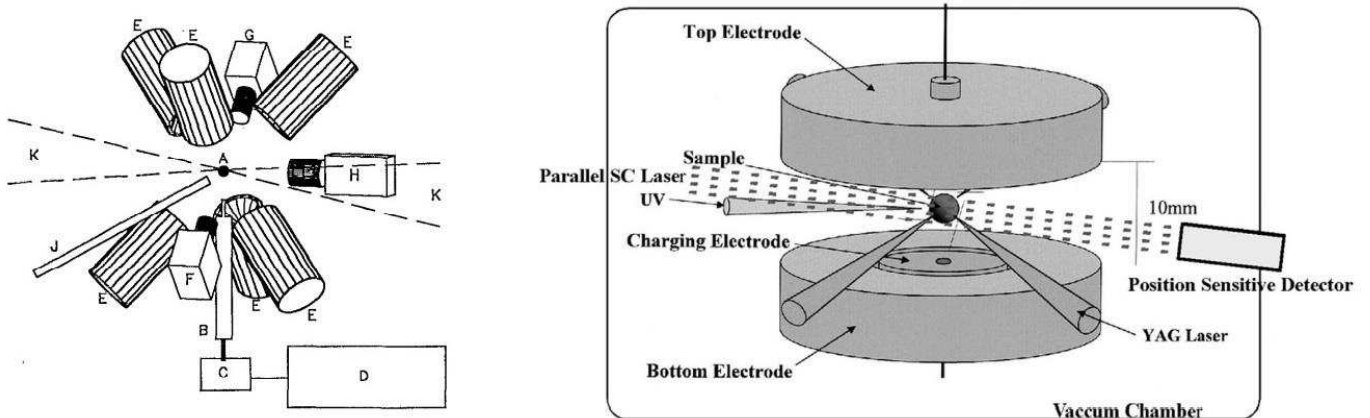


Figure I.34. Dispositifs expérimentaux de cristallisation par lévitation. (Gauche) Gouttes en lévitation acoustique (Weber et al., 1994) à l'aide de transducteurs acoustiques selon trois axes. (Droite) Goutte en lévitation électrostatique (Takeya et al., 2002) à l'aide d'électrodes positionnées en dessous et au-dessus.

Ces techniques sont très efficaces pour la solidification de métaux liquides (Herlach et al., 1993; Takeya et al., 2002; Weber et al., 1994). Cependant pour les études de nucléation en solution, il est possible d'observer de l'évaporation à l'interface liquide-air, ce qui peut engendrer des gradients de concentrations à l'intérieur de la goutte, et qui rend cette technique non adaptée à l'étude de nucléation homogène.

I.3.2.3 Méthodes microfluidiques

Récemment, des techniques expérimentales basées sur la microfluidique se sont développées pour déterminer des vitesses de nucléation, car elles présentent les avantages combinés des méthodes précédemment évoquées. Il n'y a en effet pas (ou peu) d'effets liés aux parois des canaux car la plupart du temps le fluide porteur contient un surfactant qui permet de lubrifier les parois empêchant ainsi la nucléation à cet endroit. Il n'est pas impossible cependant que ce surfactant interagisse avec le soluté présent dans les gouttes, c'est pourquoi il doit être choisi précisément afin de minimiser ces interactions. La petite taille des gouttes engendre un confinement des impuretés comme c'était le cas pour la méthode par émulsion, et enfin la possibilité de générer un grand nombre de gouttes, de conditions expérimentales identiques, rend possible l'utilisation de méthodes statistiques.

Ainsi, quelques groupes de recherche se sont penchés sur le sujet et ont développés des systèmes microfluidiques permettant de mesurer des vitesses de nucléation. Nous pouvons évoquer les travaux de Fraden (Akella et al., 2014), de Veessler (Ildefonso et al., 2011), de Salmon (Laval et al., 2009) ou encore de Teychené (Teychené and Biscans, 2012). L'ensemble de ces études repose sur le même principe, à savoir la génération d'un grand nombre de gouttes identiques, à une température assez élevée pour éviter la nucléation, puis le stockage de ces gouttes dans un long serpentin, ou dans une large zone, et enfin, une diminution rapide de la température pour induire une sursaturation et des conditions propices à la nucléation. Après un certain temps, dans les travaux de Veessler (2011), la température est augmentée à nouveau afin de s'assurer que le temps de croissance des cristaux à une taille observable n'est pas compté comme faisant partie du temps de nucléation, à la manière d'autres travaux (Galkin and Vekilov, 1999). Les différents dispositifs de ces groupes sont présentés brièvement sur les Figure I.35, Figure I.36, Figure I.37 et Figure I.38.

Il est alors possible à l'aide de ces dispositifs, de suivre l'apparition éventuelle de cristaux dans les nombreuses gouttes et grâce à des méthodes statistiques semblables à celles utilisées avec la technique d'émulsion ou de micro-puits (Galkin and Vekilov, 1999; Pound and Mer, 1952), de déterminer des vitesses de nucléation, qui sont à retrouver dans les articles correspondants. Les modèles de nucléation probabilistes et méthodes statistiques sont à retrouver dans le chapitre 3. Ces méthodes s'appuient sur l'observation de la fraction de gouttes du système ne présentant pas d'évènement de nucléation en fonction du temps $f_o(t) = N_o/N_T$ avec N_o le nombre de gouttes sans cristaux et N_T le nombre total de gouttes stockées. Ainsi, on retrouve dans ces articles de la littérature les tracés de cette proportion, comme illustré sur les Figure I.39, Figure I.40 et Figure I.41.

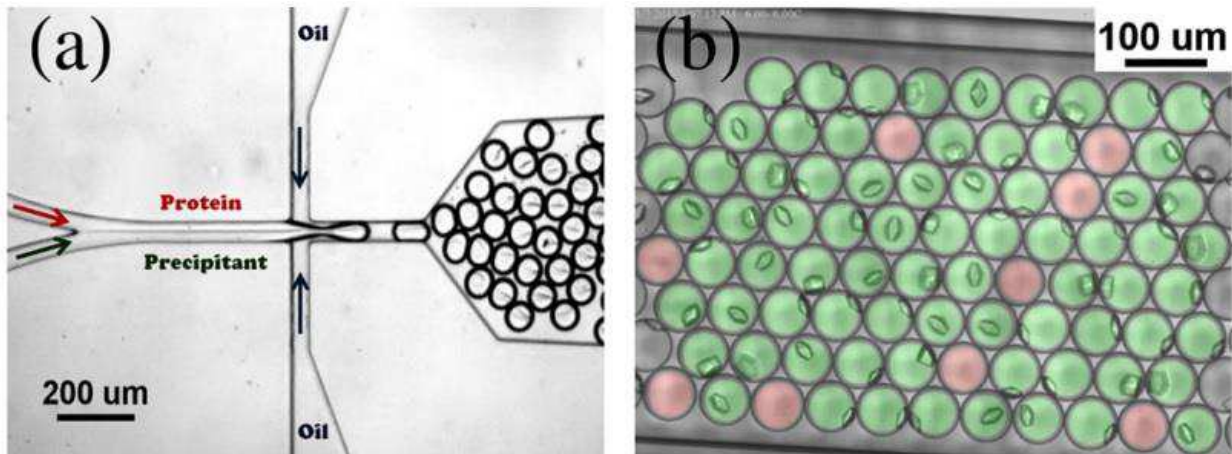


Figure I.35. Dispositif microfluidique expérimental des travaux de Fraden pour la détermination de cinétiques de nucléation (Akella et al., 2014). (a) La protéine et le précipitant sont mélangés puis séparés par de l'huile. La solution de protéine contient du lysozyme à 60 mg/mL, du PEG 8kD à 12,5 %w/v, et un tampon NaAc à PH 4,8. La solution de précipitant contient 10% w/v de NaCl, 12,5% w/v de PEG 8kD et un tampon NaAc à pH 4,8. (b) Les gouttes sont stockées dans une zone large jusqu'à la cristallisation, les gouttes en verte contiennent des cristaux, celles en rouge n'en contiennent pas.

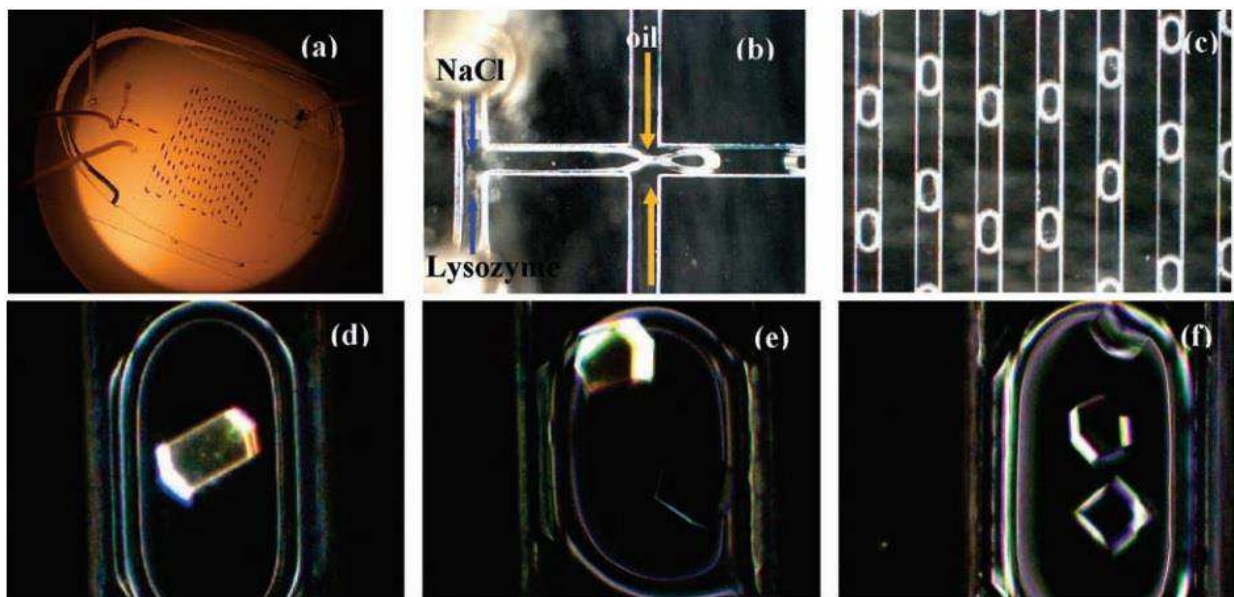


Figure I.36. Dispositif microfluidique expérimental des travaux de Veesler pour la détermination de cinétiques de nucléation (Ildefonso et al., 2011). (a) Image du dispositif. (b) Zoom sur les entrées des fluides illustrant la génération des gouttes contenant du lysozyme et du NaCl séparées par de l'huile. (c) Gouttes stockées dans un serpentins. (d-f) Exemples de cristaux de lysozyme obtenus dans des gouttes.

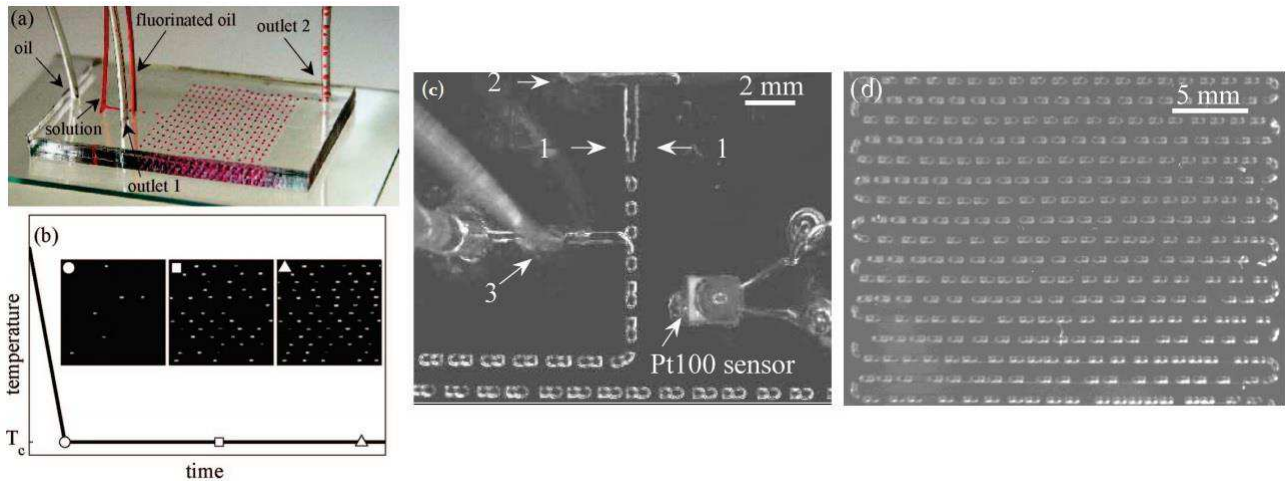


Figure I.37. Dispositif microfluidique expérimental du groupe de Salmon pour la détermination de cinétiques de nucléation (Laval et al., 2009). (a) Photographie de la puce collée à une lame de verre (largeur et hauteur des canaux : $500\mu\text{m}$) Les gouttes sont générées et envoyées dans le serpentin de stockage lorsque la sortie 2 est ouverte et la sortie 1 fermée. (b) Rampe de température pour induire la sursaturation et évolution du nombre de cristaux de nitrate de potassium KNO_3 en fonction du temps. (c) Formation de gouttes et injection d'huile fluorée pour les espacer. La solution est injectée dans l'entrée 2, l'huile fluorée dans l'entrée 3 et les gouttes se forment à l'intersection 1 avec deux flux d'huile siliconée. (d) Serpentin de stockage des gouttes, jusqu'à 300 gouttes peuvent y être stockées.

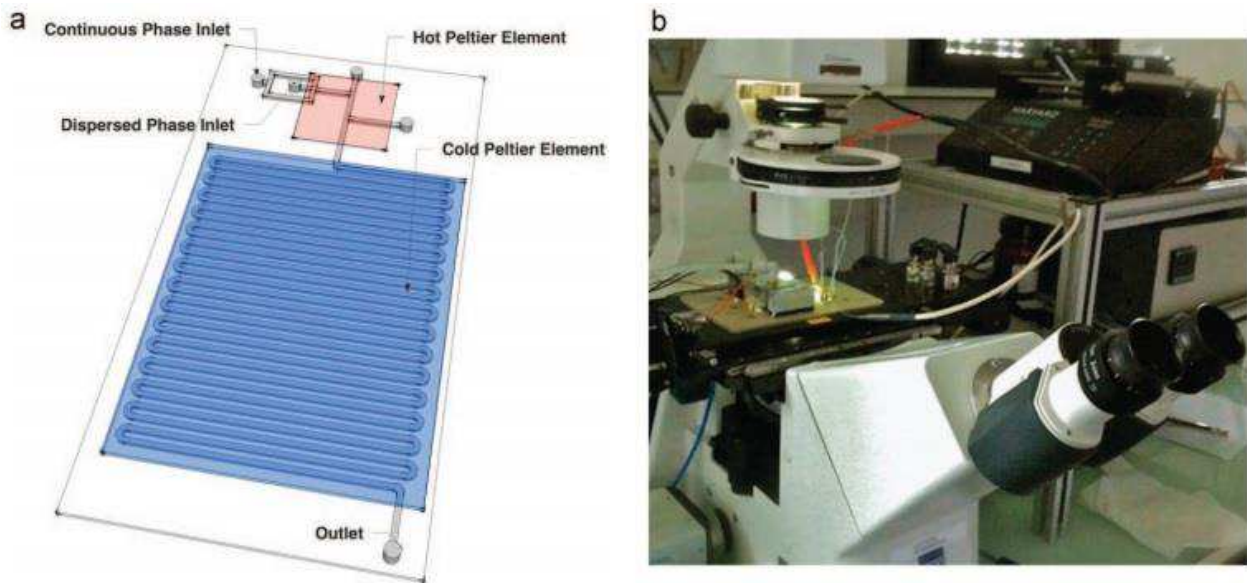


Figure I.38. Dispositif microfluidique expérimental du groupe de Teychené pour la détermination de cinétiques de nucléation (Teychené and Biscans, 2012). (a) Design de la puce microfluidique avec génération des gouttes à haute température, et stockage dans un serpentin à basse température. (b) L'ensemble du dispositif est monté sur un microscope pour observer l'apparition des cristaux.

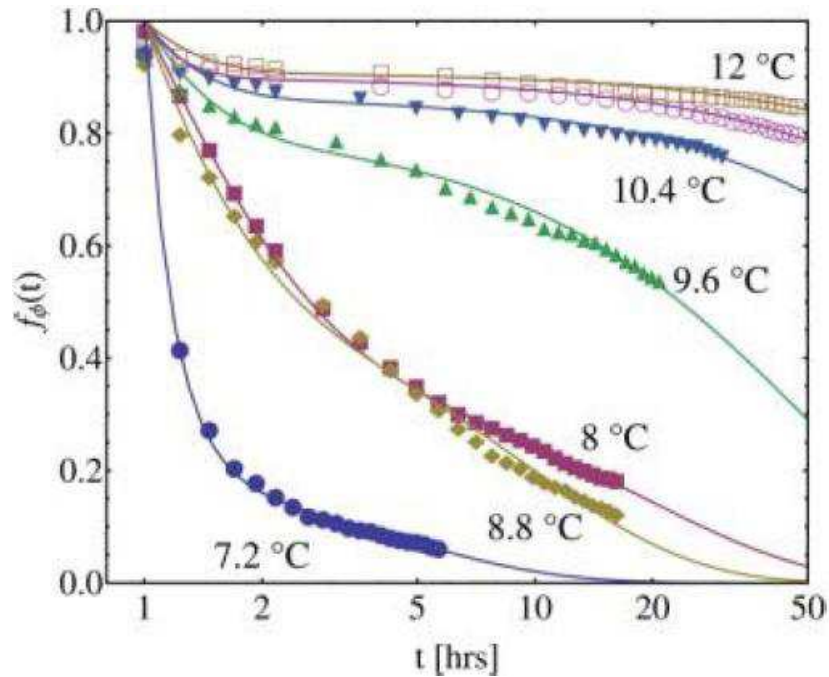


Figure I.39. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristaux en fonction du temps dans les travaux de Fraden et al. (Akella et al., 2014). Les gouttes contiennent 30 mg/mL de lysozyme, 12,5% massique de PEG 8000 et 5% massique de NaCl dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,8. Les études sont menées à plusieurs températures, les courbes continues sont des régressions effectuées à l'aide du modèle de Pound et La Mer.

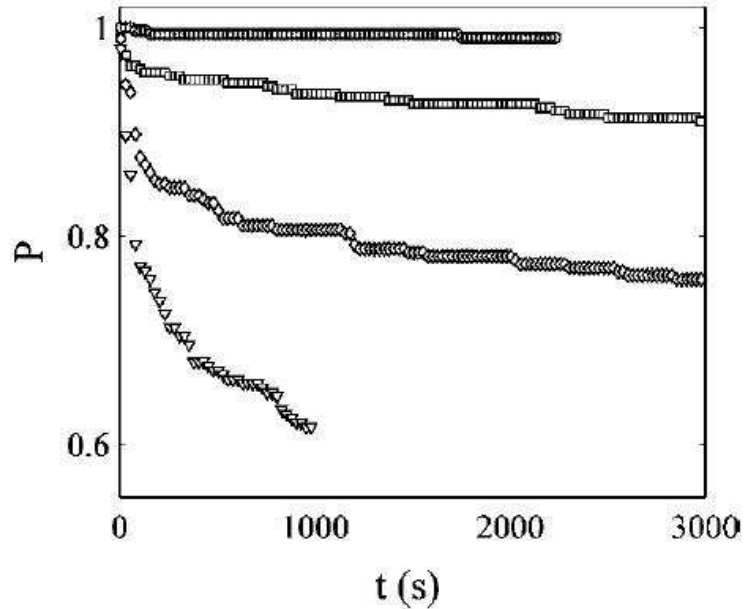


Figure I.40. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristaux en fonction du temps dans les travaux de Salmon et al. (Laval et al., 2009). Les gouttes contiennent du nitrate de potassium KNO₃ à une concentration de 40g/100g dans de l'eau. Les études sont menées à plusieurs températures, de bas en haut : 0,9°C, 1,9°C, 2,8°C et 3,8°C.

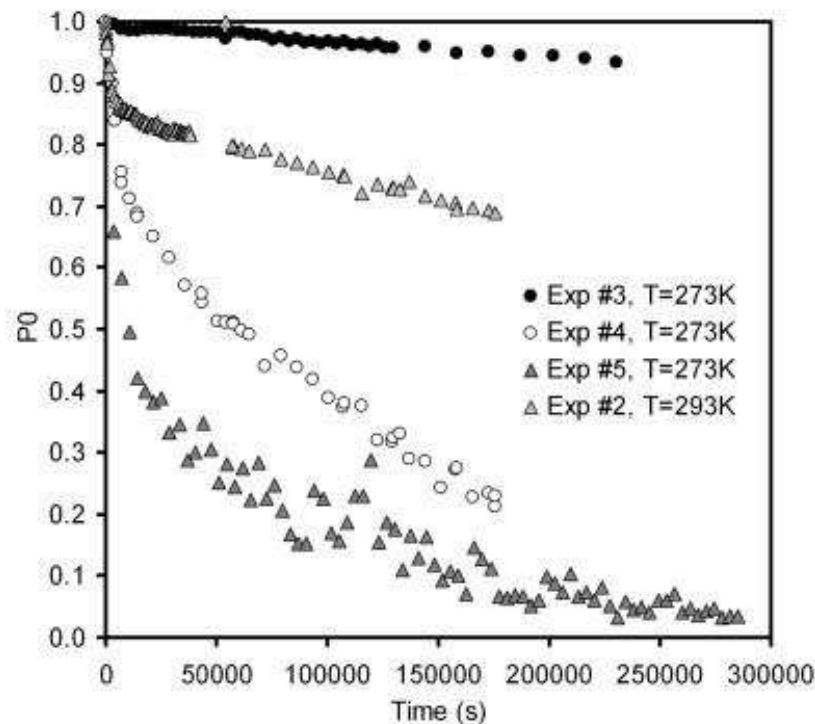


Figure I.41. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristaux en fonction du temps dans les travaux de Teychené et al. (Teychené and Biscans, 2012). Les gouttes contiennent de l'éflucimibe dans de l'octanol et sont stockées à différentes températures.

Ces résultats expérimentaux sont en général modélisés par l'équation proposée par Pound et La Mer (Pound and Mer, 1952) qui permet de déterminer des paramètres tels que la vitesse de nucléation homogène et la vitesse de nucléation hétérogène. L'analyse de ces paramètres dans ces études illustre que la nucléation est toujours hétérogène, qu'elle est catalysée par des impuretés en solution ou par des agrégats. Ces considérations seront discutées dans le chapitre 3.

Nous venons donc de voir un autre avantage procuré par la microfluidique qui permet de calculer des vitesses de nucléation, grâce à des dispositifs innovants qui semblent s'affranchir des limitations observables dans des dispositifs plus conventionnels. Il est ainsi possible d'obtenir des données macroscopiques, qui donnent une idée sur le mécanisme de nucléation, sans pour autant rentrer dans les détails microscopiques de nucléation.

Pour obtenir des détails à l'échelle de la structure moléculaire, nous avons vu précédemment que la méthode SAXS semble prometteuse. Ainsi, il semble intéressant de se pencher sur un éventuel couplage de dispositifs microfluidiques, qui procurent d'importants avantages comme illustré précédemment, avec la méthode d'analyse par diffusion de rayons X aux petits angles.

I.3.3 Couplage de la microfluidique avec des techniques d'analyse par rayons X

Nous avons vu précédemment, dans la partie I.2.2.2 que la méthode d'analyse par diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) est une méthode particulièrement adaptée pour l'observation de structures en solution, de tailles comprises entre le nanomètre et le micromètre, ce qui laisse

entrevoir la possibilité de mieux comprendre les mécanismes de nucléation en observant les clusters précédant la formation d'un nucleus cristallin. Néanmoins, l'approche classique pour cette méthode, consistant à remplir un capillaire avec la solution à étudier, comporte quelques inconvénients dans le cas d'études de nucléation. Le premier inconvénient est la possibilité des constituants de diffuser dans le capillaire. Ainsi, la nucléation d'une phase dans le capillaire, accompagnée de diffusion à l'intérieur de celui-ci, peut inhiber la formation d'une autre phase. De plus, dans la majorité des cas, la taille du faisceau de rayons X est bien inférieure à celle du volume de solution, si bien qu'un seul endroit de la solution est sondé, et si un événement de nucléation se produit ailleurs, aucune information sur d'éventuels clusters ne peut être obtenue. Enfin, en exposant continuellement le même volume de solution, il est possible d'observer des dégâts liés aux radiations.

Il semble alors intéressant de coupler cette méthode d'analyse avec des dispositifs de microfluidique de gouttes qui permettent de pallier les problèmes précédemment évoqués. En effet, en compartimentant nos produits dans des gouttes, il est possible de s'affranchir de la diffusion dans le volume d'étude. De plus, en ajustant correctement la structure du dispositif microfluidique ainsi que les débits utilisés, il est possible de générer des gouttes ayant une taille du même ordre de grandeur que le faisceau de rayons X. Ainsi, la résolution du signal se voit augmentée et surtout, il n'y a aucune « zone d'ombre » dans la goutte car la quasi-totalité du volume est exposée aux rayons X, ce qui permet d'observer tout phénomène de nucléation qui pourrait s'y produire. Enfin, il est possible d'exposer des gouttes en mouvement et d'exposer des gouttes différentes plutôt que tout le temps le même volume de solution, ce qui réduit les risques de dégâts aux radiations.

Il a donc été possible d'observer ces dernières années, l'apparition de systèmes couplant de la microfluidique et de la diffusion de rayons X avec notamment des premières études combinant un simple mélangeur microfluidique par diffusion avec des mesures SAXS afin de mesurer les dynamiques de repliement de protéines et d'ARN après un changement de pH (Pollack et al., 1999, 2001). Quelques autres études ont également été menées avec notamment la fabrication de dispositifs expérimentaux qui permettent d'exposer des gouttes aux rayons X (Stehle et al., 2013), soit en les générant à l'extérieur puis en les amenant dans un capillaire placé devant le faisceau (Figure I.42.A), soit en les générant dans une puce, elle-même placée directement devant le faisceau (Figure I.42.B). Ces systèmes ont été testés avec des solutions contenant des nanoparticules d'or et les résultats illustrent la possibilité de coupler ces deux approches afin d'obtenir des informations sur les structures en solution à l'aide de courbes SAXS similaires à celles présentées sur la Figure I.43. Sans rentrer dans les détails, disponibles dans les articles correspondants, des dispositifs microfluidiques couplés à du SAXS ont également permis l'étude d'assemblage de macromolécules biologiques (Brennich et al., 2011), de fibres de soie (Martel et al., 2008), mais aussi la nucléation et la croissance de nanoparticules d'or (Polte et al., 2010), la rhéologie de fluides complexes, comme les cristaux liquides (Otten et al., 2005) ou encore le repliement de protéines (Akiyama et al., 2002; Arai et al., 2007; Uzawa et al., 2004, 2006).

L'ensemble de ces résultats illustrent le fait que le couplage de techniques microfluidiques et de diffusion de rayons X aux petits angles est une technique adaptée et intéressante pour l'étude de protéines en solution, et rentre donc parfaitement dans le cadre des objectifs envisagés, à savoir avoir une idée plus précise des mécanismes de nucléation de protéines.

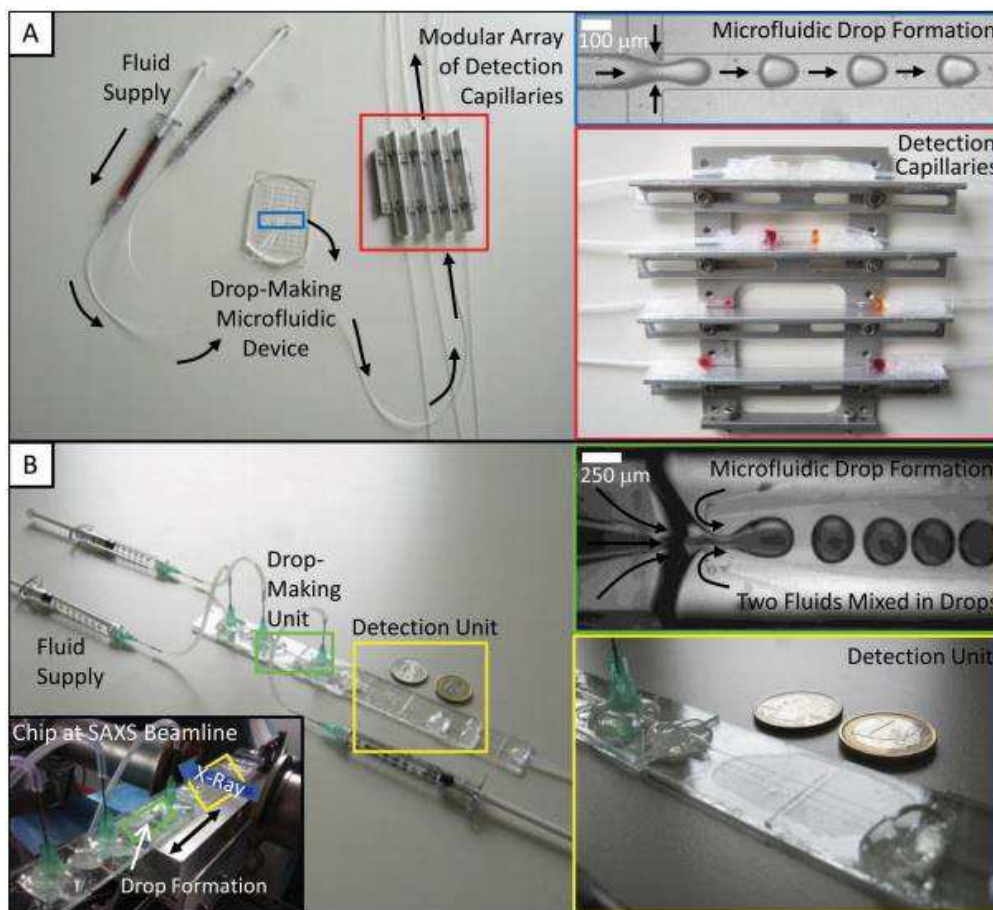


Figure I.42. Dispositifs microfluidiques pour réaliser des analyses SAXS sur des gouttes (Stehle et al., 2013). (A) Système permettant la génération de gouttes dans une puce en PDMS, puis leur envoi vers des capillaires en verre destinés à être placés devant le faisceau de rayons X. (B) Système permettant de générer des gouttes en mélangeant des composants dans une puce microfluidique, elle-même destinée à être placée devant le faisceau.

De nouveaux dispositifs contenant des fenêtres en Kapton (un polyimide fabriqué par Dupont) sur un système microfluidique ont par la suite été utilisés pour étudier l'auto-assemblage de collagène (Köster et al., 2008). Ce matériau est particulièrement intéressant car il est relativement résistant aux fortes intensités de radiations générées par une source synchrotron, et il est quasi transparent aux rayons X. C'est pourquoi il est intéressant pour la fabrication de dispositifs microfluidiques destinés à être directement positionnés devant le faisceau. Ainsi, il est possible de réaliser par ablation laser de fins systèmes microfluidiques en Kapton (Barrett et al., 2006a) comme celui illustrée sur la Figure I.44.

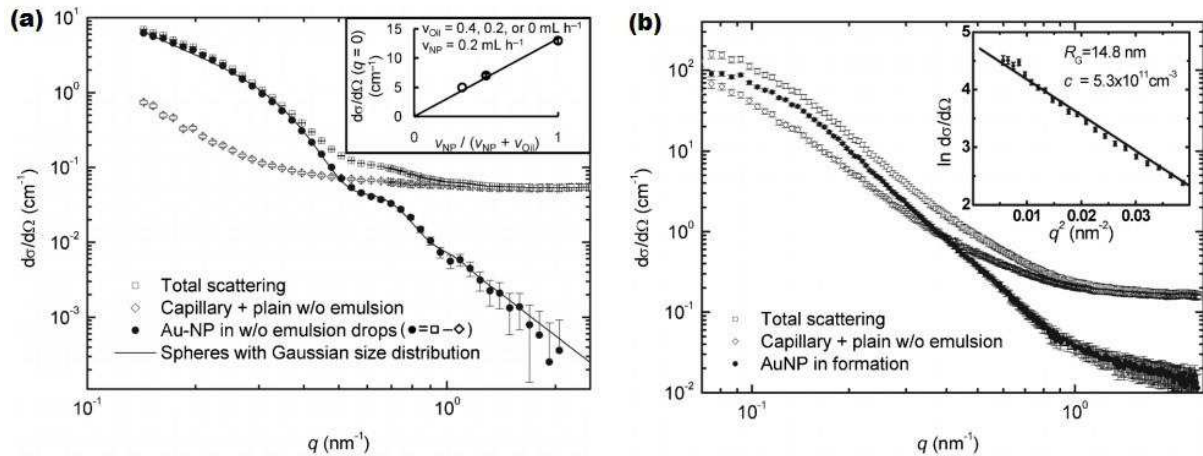


Figure I.43. Courbes SAXS de gouttes d'eau contenant des nanoparticules d'or (Stehle et al., 2013). (a) Les particules sont insérées au préalable dans la phase aqueuse, séparée par de l'huile avec le dispositif de la Figure I.42.A. Le signal des particules est obtenu en soustrayant au signal total, un signal correspondant à de simples gouttes d'eau dans le même capillaire. Ce signal est régressé à l'aide d'un modèle de particules sphériques et correspond à des particules de rayon $(8,1 \pm 0,1)$ nm. (b) Les particules sont créées in-situ, en mélangeant dans la puce de la Figure I.42.B une solution à 1 mM d'acide chloraurique avec une solution à 2 mM de borohydrure de sodium. La puce est montée devant le faisceau pour observer les particules en formation. La même soustraction que dans la première expérience est réalisée. Il est possible à l'aide d'un tracé de Guinier de déterminer le rayon de giration des particules qui est de 14,8 nm.

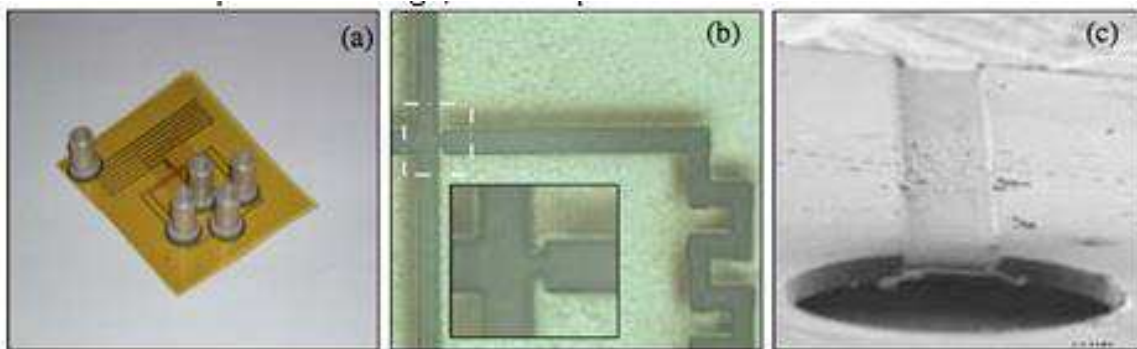


Figure I.44. Photographie de puce microfluidique en Kapton, compatible avec des radiations de source synchrotron (Barrett et al., 2006a)

Ces études couplant la technologie microfluidique avec l'analyse par diffusion de rayons X aux petits angles semble alors prometteuse dans le but d'obtenir des informations sur les structures à l'échelle moléculaire et ainsi éclaircir les zones d'ombre qui existent autour des mécanismes de nucléation des protéines. Ces dispositifs peuvent néanmoins être plus ou moins complexes à réaliser et c'est pourquoi, dans ces travaux, un effort important sera réalisé pour la conception et la réalisation de dispositifs microfluidiques. Les procédés de fabrication de tels dispositifs seront présentés dans le chapitre 2.

I.4 Conclusion sur les éléments bibliographiques

Nous avons vu dans cette revue d'éléments bibliographiques la notion de cristallisation en solution, avec l'existence de plusieurs étapes, notamment de nucléation et de croissance. L'étape de nucléation gouverne la formation du premier nucleus en solution et est donc primordiale pour obtenir des propriétés souhaitées (structure, morphologie, etc.) du cristal final. On distingue deux mécanismes de nucléation dans la littérature. Le premier, la théorie classique, repose sur des hypothèses simplificatrices, et ne contient qu'une barrière énergétique à franchir pour former un cristal, c'est la formation du nucleus critique à l'aide de fluctuations simultanées de concentrations et de structure. Le deuxième, mécanisme en deux étapes, considère ces fluctuations comme successives, avec dans un premier temps la formation d'un cluster liquide dense désordonné, et ensuite une restructuration à l'intérieur de celui-ci pour former un nucleus cristallin. Les questions qui se posent sont alors les suivantes : *Quels sont les mécanismes réels de nucléation de protéines en solution ? Ce mécanisme de nucléation en deux étapes n'est-il pas une conséquence du murissement d'Ostwald ? Y-a-t-il une rupture de mécanisme de nucléation en fonction de la position dans le diagramme de phase (ou en fonction du chemin thermodynamique) ?*

Des réponses partielles ont déjà été fournis dans la littérature, grâce à des méthodes d'analyse telles que la DLS ou le SAXS. Cependant la nature stochastique de la nucléation, rend ces travaux compliqués. C'est pourquoi l'utilisation d'une nouvelle technique comme la microfluidique de gouttes permettant de réaliser quelques centaines voire millier d'expériences dans des conditions similaires, semble être une approche intéressante pour tirer parti du caractère aléatoire de la nucléation.

Ainsi, pour tenter d'apporter quelques éléments de réponses, supplémentaires, aux questions présentées plus haut, les travaux de cette thèse ont été orientés autour de trois axes : la mise en place d'une plateforme microfluidique permettant la réalisation d'expériences de cristallisation dans des conditions parfaitement contrôlées (température, volume, concentrations), la détermination des fréquences de nucléation pour différentes positions dans le diagramme de phase, et, enfin, une étude phénoménologique des mécanismes de nucléation reposant sur le couplage d'un système microfluidique et de la diffusion de rayons X aux petits angles.

Dans la prochaine partie, nous présenterons l'ensemble des protéines étudiées ainsi que leurs propriétés respectives et nous aborderons un point technique avec les procédés de fabrication des systèmes microfluidiques.

Chapitre II

PROTEINES ET

DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES

Au cours de cette thèse, nous évoquerons des travaux de cristallisation réalisés sur des protéines, à l'aide d'outils microfluidiques. Cette partie de la thèse est ainsi consacrée à la présentation des propriétés des protéines utilisées dans ces travaux, et des procédés de fabrication des dispositifs microfluidiques.

II.1 Solutions de protéine

Les protéines sont de grandes molécules biologiques, ou macromolécules, que l'on retrouve dans tous les organismes vivants. Elles sont constituées d'une ou plusieurs longues chaînes de résidus d'acides aminés, liés entre eux par une liaison peptidique créant ainsi des chaînes polypeptidiques comme illustré sur la Figure II.1.

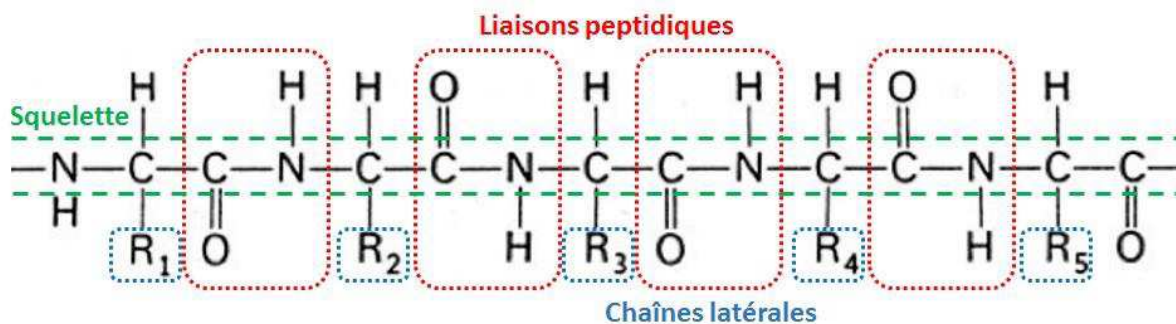


Figure II.1. Représentation de la structure primaire d'une protéine. On retrouve en rouge les liaisons peptidiques, en vert la chaîne principale, ou squelette de la protéine, et en bleu, les chaînes latérales des résidus d'acides aminés liées aux carbones α .

La séquence d'enchaînement des résidus ainsi que leurs propriétés physico-chimiques respectives leur permettent d'interagir entre eux (liaisons hydrogène, cohésion hydrophile, cohésion hydrophobe, π -stacking, etc.) conférant aux protéines des structures tridimensionnelles stables avec la possibilité d'adopter des configurations particulières, comme des replis, des hélices, ou encore des feuillets. C'est cette structure tridimensionnelle qui donne aux protéines leur fonctionnalité biologique et c'est pourquoi beaucoup de personnes cherchent à déterminer ces structures afin de comprendre leur fonctionnement.

Dans le cadre de ces travaux, trois protéines différentes ont été utilisées, la rasburicase (ou urate oxydase), la glucose isomérase, et le lysozyme. Nous allons par conséquent présenter ces différentes protéines, et leurs propriétés respectives.

II.1.1 Rasburicase

La rasburicase (commercialisée sous les noms Fasturtec en Europe et Elitek aux Etats-Unis) est la version recombinée de l'urate oxydase, un enzyme qui métabolise l'acide urique en allantoiné. C'est une protéine globulaire homo-tétramérique, donc composée de 4 monomères identiques. Il est en revanche possible de dissocier facilement le tétramère en dimères, ce qui rend son utilisation intéressante pour des tests de stabilité et de résistance à la dénaturation. Les structures tridimensionnelles des monomère, dimère et tétramère sont indiquées sur la Figure II.2. Chaque

monomère contient un enchaînement de 301 résidus d'acide aminés pour une masse molaire de 34109,5 Da pour la rasburicase et de 33438 Da pour l'urate oxydase.

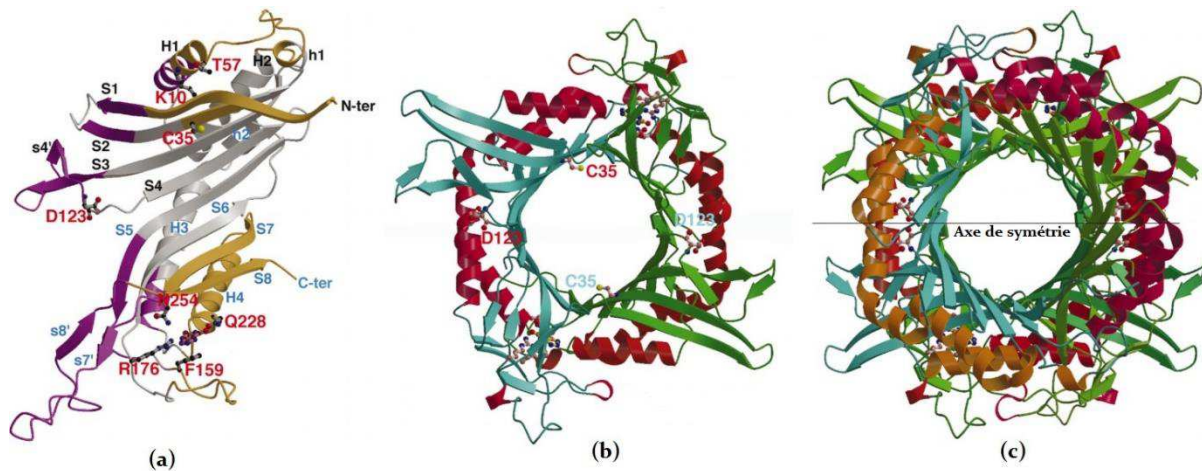


Figure II.2. Structures tridimensionnelles de l'urate oxydase (Retailleau et al., 2004). (a) Représentation du monomère, avec les résidus intervenant dans la formation du tétramère en magenta et ceux intervenant dans la formation du dimère en jaune. (b) Représentation du dimère et du tétramère (c)

Les paramètres de maille de l'urate oxydase ont été obtenus en la cristallisant à l'aide de polyéthylène glycol (PEG) et en l'analysant à l'aide de diffraction de rayons X. Ces paramètres sont présentés dans le Tableau II.1.

Tableau II.1. Paramètres de maille de la structure monoclinique de groupe d'espace P12₁1 de l'urate oxydase (1R56.pdb)

Longueur (Å)		Angle (°)	
a	82,59	α	90
b	141,84	β	92,69
c	134,96	γ	90

Cette protéine a été choisie pour sa grande sensibilité à la dénaturation. Il est possible qu'en étant exposée aux rayons X ou en interagissant avec des composés du dispositif microfluidique, le tétramère se dissocie en dimères, ce qui rend impossible les études de cristallisation. En revanche, si le tétramère n'est pas dissocié, nous pourrions conclure que la protéine reste dans sa forme stable, native, et que le dispositif pourra être utilisé avec de nombreuses autres protéines, moins sensibles à la dénaturation. Ces études, présentées dans la partie IV.3.2.1, ont été menées avec une solution obtenue en dissolvant de la rasburicase (origine : Sanofi) dans une solution tampon Tris (Sigma-Aldrich) à pH 8,0 afin d'obtenir une concentration finale de 20 mg/mL en rasburicase.

Il est commun de cristalliser cette protéine à l'aide de PEG 8000, et on retrouve ainsi dans la littérature (Vivarès and Bonneté, 2004), les données de solubilités ainsi que les diagrammes de phase de l'urate oxydase en fonction de la concentration en PEG 8000 comme illustrée sur la Figure II.3.

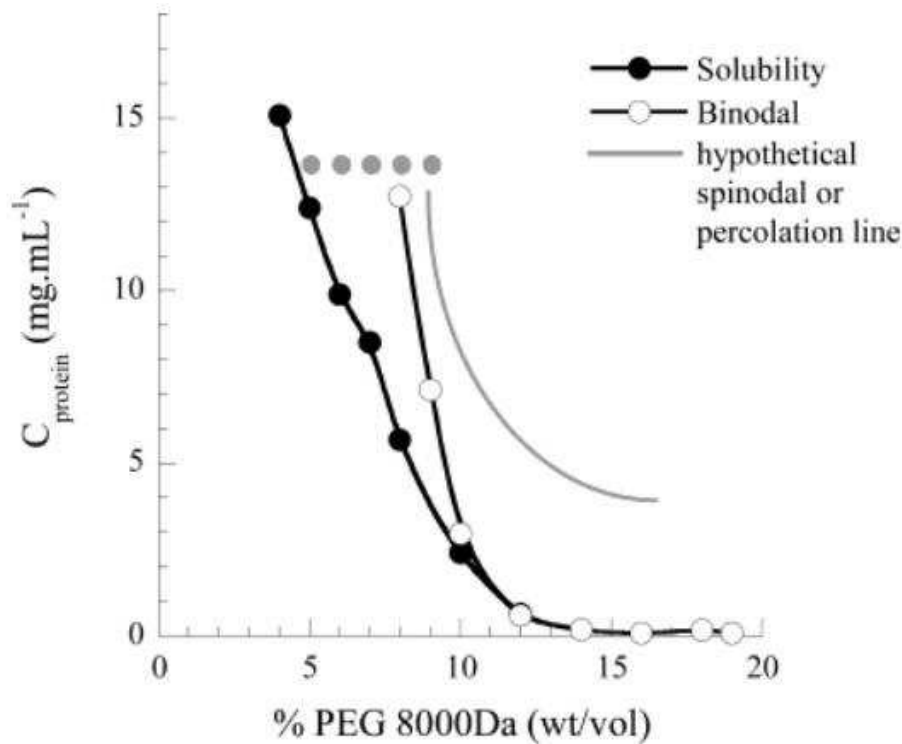


Figure II.3. Diagramme de phase de l'urate oxydase en présence de PEG 8000 dans une solution tampon Tris à pH 8,5 avec 100 mM de NaCl (Vivarès and Bonneté, 2004). Ce diagramme présente la courbe de solubilité, la binodale et l'hypothétique spinodale de décomposition.

En outre, l'étude du diagramme de phase de cette protéine en présence de PEG 8000 a montré qu'il existait également une zone de séparation de phase liquide-liquide. Des études de diffusion de rayons X aux petits angles (cf. Figure II.4) ont montré que la cristallisation de cette protéine était impossible à l'intérieur de cette zone malgré la forte concentration en protéine. Les auteurs ont attribué cette impossibilité à la modification des propriétés physico chimiques du milieu (forte augmentation de la viscosité et forte diminution du coefficient de diffusion). L'évolution de l'intensité diffusée en fonction du vecteur de diffusion présenté sur la Figure II.4 montre que dans ces gouttes, la distance d'interaction entre les molécules d'urate oxydase (pic de corrélation observé autour de $0,015 \text{ \AA}^{-1}$) est égale au diamètre de la molécule. Dans ces gouttes, les molécules sont donc au contact, sans que la structure tétramérique de la protéine soit perdue, ce qui leur confère une faible mobilité et donc une impossibilité à se restructurer. Des exemples de cristaux d'urate oxydase sont présentés sur la Figure II.5.

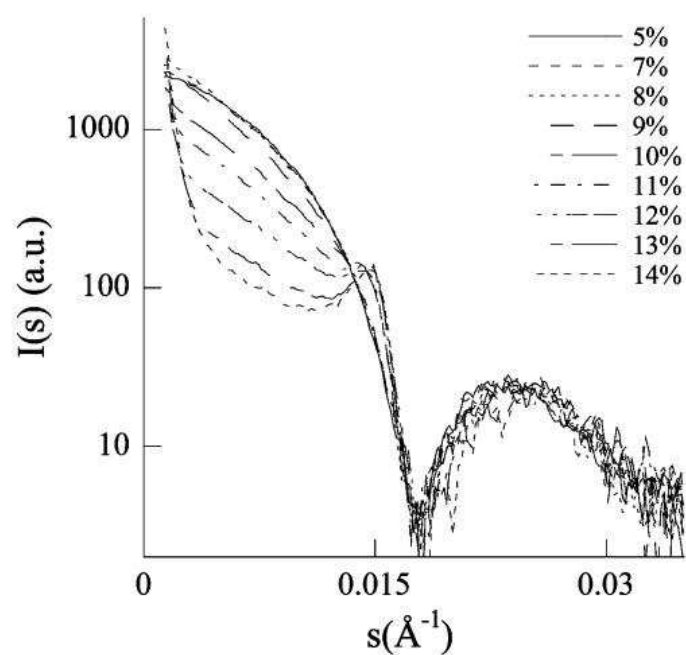


Figure II.4. Courbes SAXS, intensités diffusées en fonction du vecteur de diffusion pour l'urate oxydase à 13 mg/mL dans un tampon Tris 50 mM à pH 8,5 pour différentes concentrations en PEG 8000 (Vivarès and Bonneté, 2004).

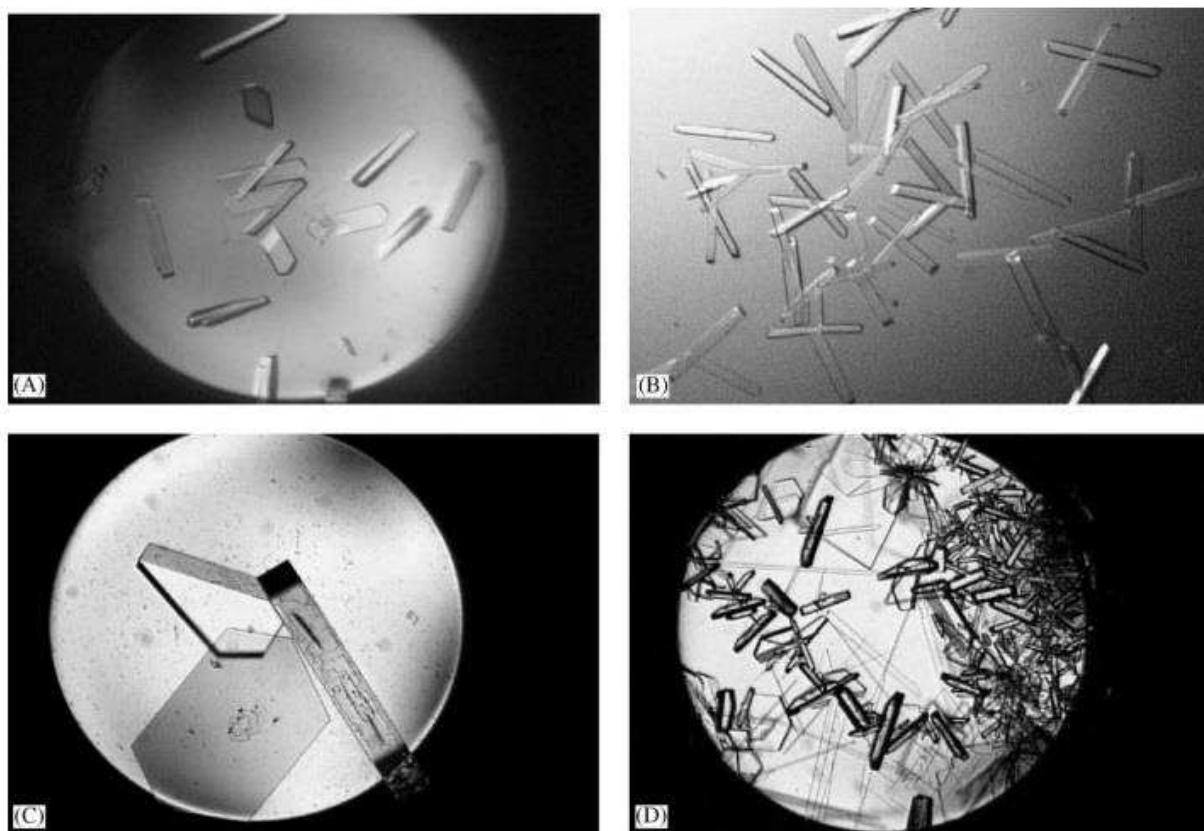


Figure II.5. Exemple de cristaux d'urate oxydase obtenue à partir d'une solution à 25 mg/mL en présence de PEG 8000 à différentes concentrations et à des pH différents (Bonneté et al., 2001). (A) 8% PEG pH 10,0 (B) 20% PEG pH 10,0 (C) 7% PEG pH 8,0 (D) 7% PEG pH 7,5.

II.1.2 Glucose isomérase

Une isomérase est une enzyme capable de catalyser des changements au sein d'une molécule, le plus fréquemment par réarrangement de groupements fonctionnels et donc par conversion de la molécule en l'un de ses isomères. La glucose isomérase permet de catalyser la réaction d'isomérisation du glucose en fructose. Cette réaction est réversible et atteint un équilibre avec des concentrations quasi égales en fructose et en glucose. Cet équilibre est illustré sur la Figure II.6. Cette enzyme permet également de catalyser l'interconversion de D-xylose en D-xylulose avec plus d'efficacité, c'est pourquoi on la retrouve également sous le nom de D-xylose kétol-isomérase EC 5.3.1.5. C'est également une protéine homo-tétramérique, qui a donc tendance à former des tétramères en assemblant 4 monomères identiques contenant 388 résidus d'acides aminés et de masse molaire de 43736 Da. Les structures tridimensionnelles de la protéine sont présentées sur la Figure II.7.

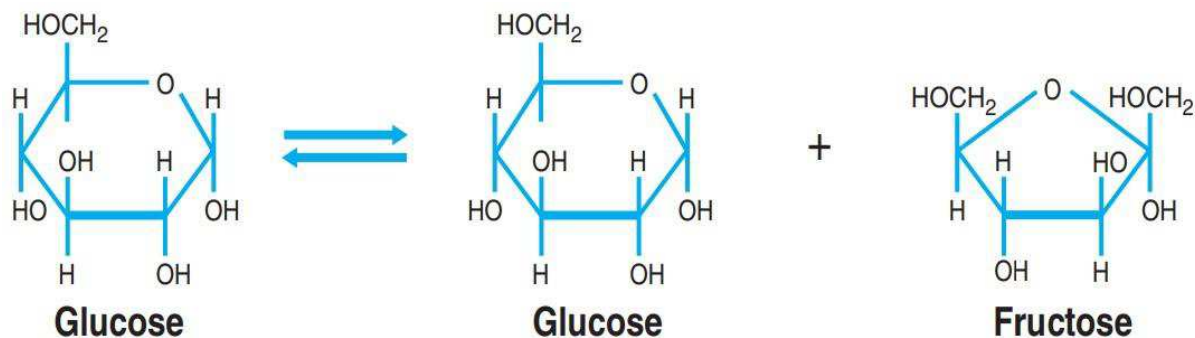


Figure II.6. Réaction d'isomérisation du glucose en fructose. La glucose isomérase permet de catalyser cette réaction.

Les paramètres de maille de la forme P2₁2₁2 de la glucose isomérase ont été déterminés par diffraction de rayons X (Ramagopal et al., 2003) et sont présentés dans le Tableau II.2. Cette molécule a été choisie dans le cadre de ces travaux pour sa taille importante et sa forme globulaire, qui lui confèrent notamment la possibilité de cristalliser par un mécanisme original de déplétion qui sera expliqué dans la partie IV.3.3.1.

La glucose isomérase est également capable de cristalliser en présence de sulfate d'ammonium ou de sels de calcium ou de magnésium. On peut ainsi retrouver dans la littérature (Chayen et al., 1988) des données de solubilités de la glucose isomérase en présence de sulfate d'ammonium comme indiqué sur la Figure II.8.

Il est également possible de cristalliser la glucose isomérase en présence de PEG 10000 dans des conditions telles qu'elle présente une transition de phase liquide-liquide (Vivares et al., 2005). Ainsi, on retrouve dans la littérature le diagramme de phase de la glucose isomérase dans ces conditions, représenté sur la Figure II.9.

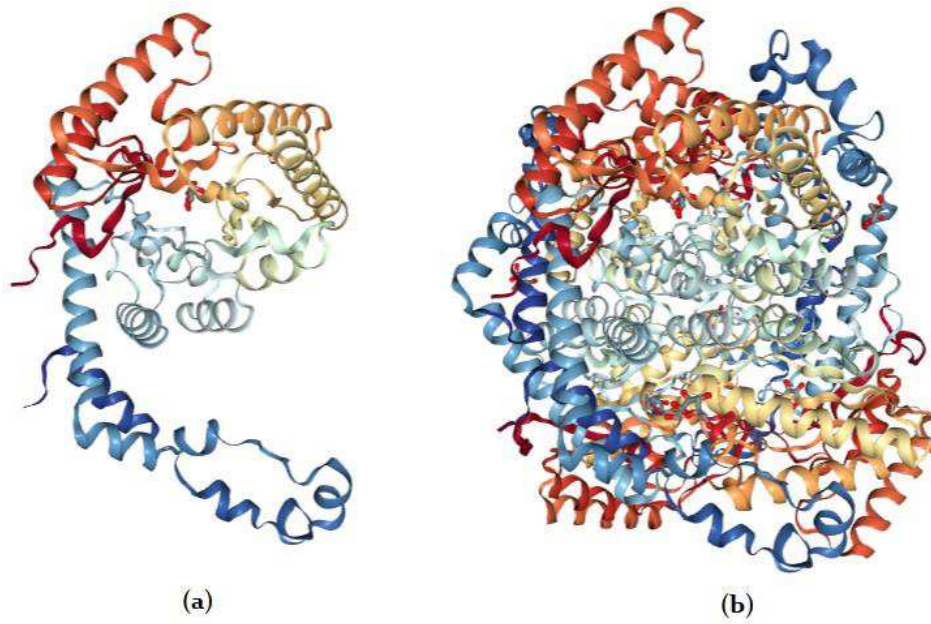


Figure II.7. Structures tridimensionnelles de la forme native de la glucose isomérase. (a) Représentation du monomère. (b) Représentation de l'homo-tétramère.

Tableau II.2. Paramètres de maille de la structure orthorhombique de groupe d'espace P2₁2₁2 de la glucose isomérase (10AD.pdb)

	Longueur (Å)		Angle (°)	
a	98,45	α	90	
b	129,59	β	90	
c	78,33	γ	90	

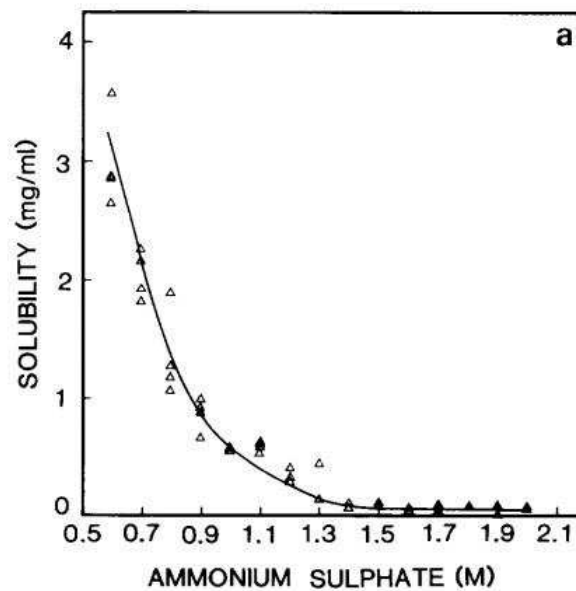


Figure II.8. Données de solubilités de la glucose isomérase en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium à température ambiante dans un tampon Tris acétate à pH 7,0 (Chayen et al., 1988).

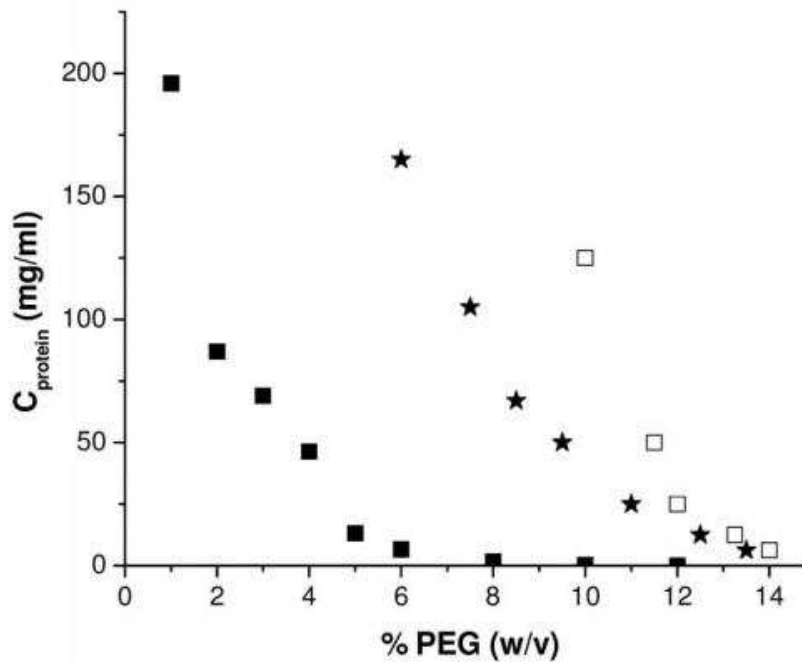


Figure II.9. Diagramme de phase de la glucose isomérase en fonction de la concentration en PEG 10k dans un tampon Tris à pH 7,0 avec 0,5 M de NaCl (Vivares et al., 2005). Les carrés pleins représentent la solubilité, les étoiles la frontière de séparation liquide-liquide et les carrés vides la courbe d'agrégation.

Il est possible d'observer la cristallisation de la glucose isomérase à partir de cette séparation liquide-liquide, comme illustré sur la Figure II.10.

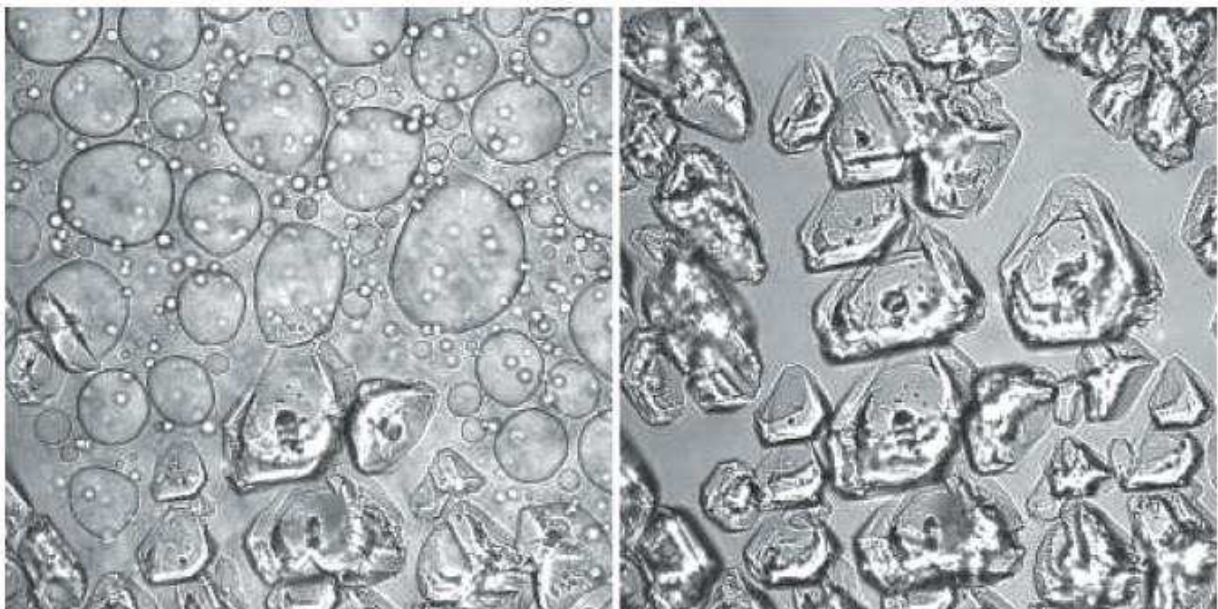


Figure II.10. Observation microscopique de la cristallisation de la glucose isomérase à 55 mg/mL avec 9,5% de PEG 10k, 0,5 M de NaCl dans un tampon Tris 10 mM à pH 7,0 (Vivares et al., 2005). L'image de gauche est obtenue 30 minutes après mélange et on observe la présence de gouttes illustrant la séparation liquide-liquide. 6 minutes après (image de droite), les gouttes ont donné naissance à des cristaux.

Dans nos travaux, la glucose isomérase a simplement été utilisée en la dissolvant dans un tampon MES (Sigma-Aldrich) à pH 6,5 afin d'obtenir une solution à 50 mg/mL. Cette protéine pourrait également être une bonne candidate pour l'étude des mécanismes de nucléation, cependant, pendant la durée de la thèse, la production de cette protéine purifiée a été arrêtée rendant son achat impossible.

II.1.3 Lysozyme

La dernière protéine utilisée dans ces travaux est une protéine plus classique et populaire, qu'on retrouve dans de nombreuses études. C'est une enzyme capable de lyser des bactéries et de faciliter la phagocytose, c'est pourquoi on la retrouve dans de nombreux organismes animaux où elle est impliquée dans la défense contre les infections bactériennes. On la retrouve particulièrement dans des sécrétions comme la salive ou les larmes et aussi dans le blanc d'œuf d'où elle est principalement extraite. Contrairement aux deux protéines précédemment évoquées, celle-ci est de petite taille, elle est constituée de 129 résidus d'acides aminés dans le blanc d'œuf et ne forme pas d'auto-assemblage particulier, se comportant simplement comme un monomère de masse molaire 14402 Da. C'est la première enzyme qui a vu sa structure déterminée (Blake et al., 1965) et est devenue une des enzymes la plus étudiée en biologie car il est facile de la cristalliser dans différentes formes. Un dessin illustrant cette structure tridimensionnelle est représenté sur la Figure II.11

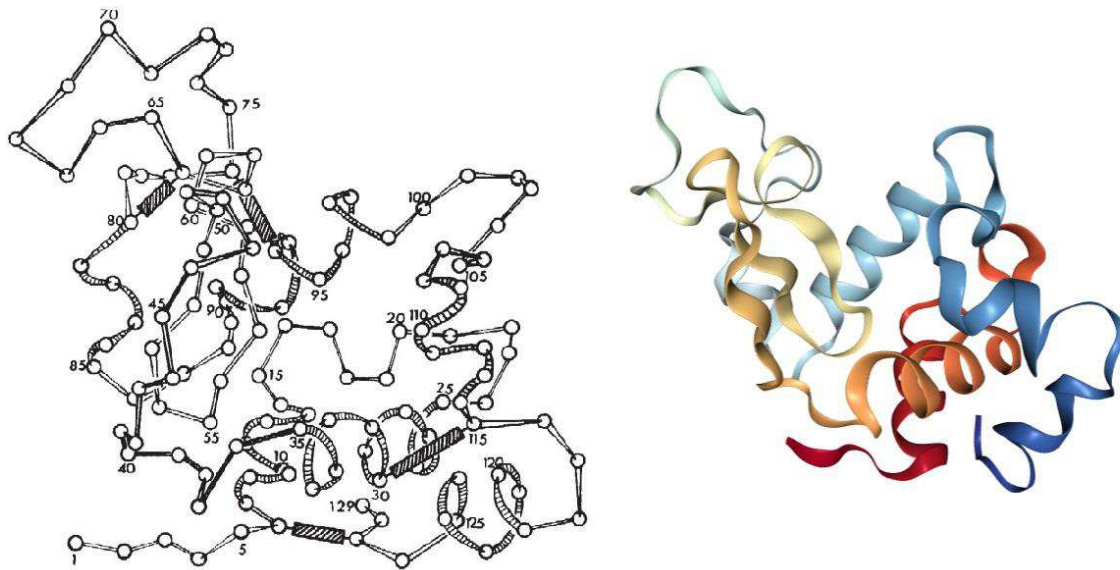


Figure II.11. Structure tridimensionnelle du lysozyme. Dessin manuel à gauche (Blake et al., 1965) et représentation plus contemporaine à droite (1DPB.pdb).

Il est facile et peu coûteux de s'en procurer, et de plus, un grand nombre de données (solubilités, structures cristallines, etc.) existent déjà dans la littérature (Guilloteau et al., 1992; Iwai et al., 2008; Lettieri, 2010; Liu et al., 2010) et facilite les études, faisant de cette molécule une protéine « modèle ». Il est ainsi possible de trouver les diagrammes de phase du lysozyme pour différentes concentrations en sel (Muschol and Rosenberger, 1997), comme illustré sur la Figure II.12. Sur ces diagrammes apparaissent la solubilité ainsi que la binodale.

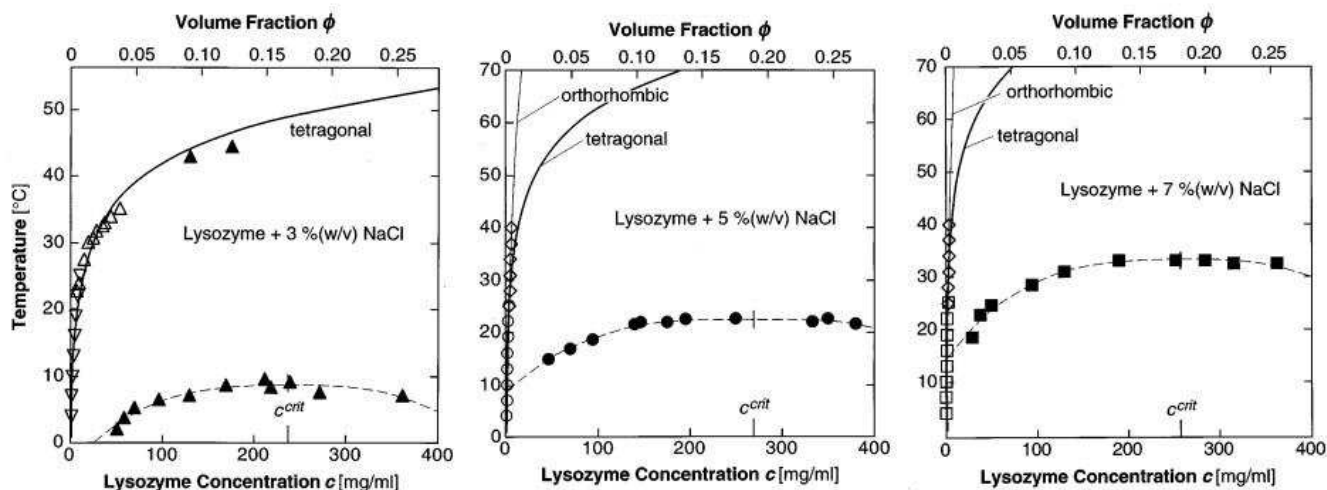


Figure II.12. Diagramme de phase du lysozyme dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5 pour différentes concentrations en sel (de 3% à 7% massique) (Muschol and Rosenberger, 1997). La courbe continue représente la solubilité pour les polymorphes tétragonal et orthorhombique, la courbe pointillée correspond à la binodale.

Il est également possible de trouver des données concernant la frontière de décomposition spinodale (Manno et al., 2004) une nouvelle fois en fonction de la concentration en NaCl comme représenté sur la Figure II.13.

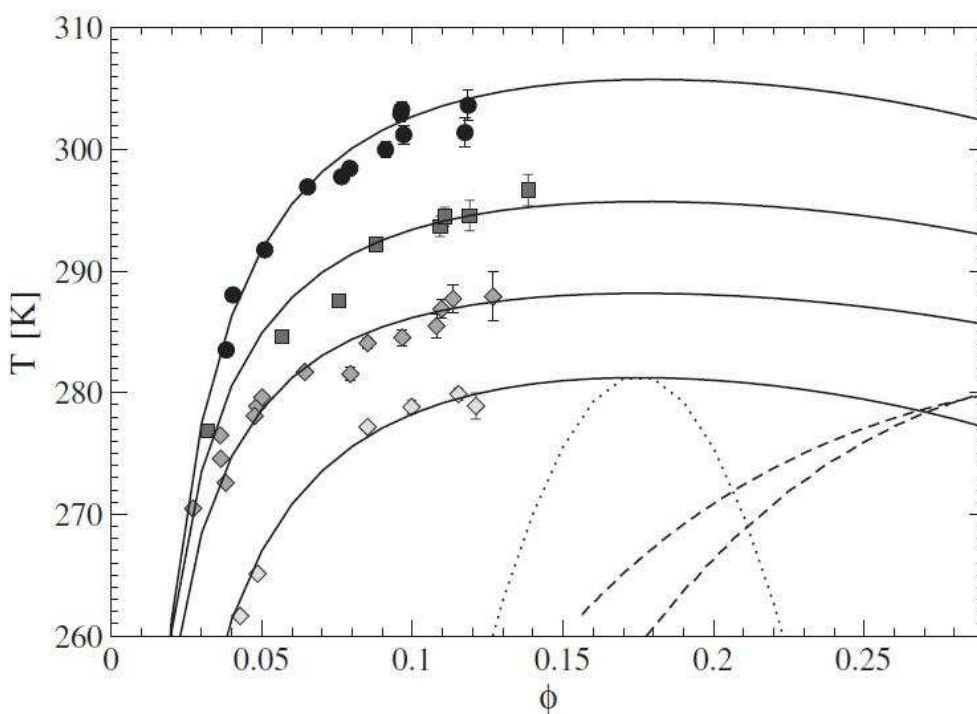


Figure II.13. Valeurs de la température de décomposition spinodale en fonction de la fraction volumique en lysozyme pour différentes concentrations en NaCl (Manno et al., 2004). Les courbes continues représentent les températures de la spinodale avec de bas en haut des concentrations en NaCl de 3, 4, 5 et 7% massique. Les courbes pointillées sont calculées à l'aide du potentiel de Yukawa SCOZA.

Cinq différents groupes d'espace de cristaux de lysozyme de blanc d'œuf avec sept combinaisons de paramètres de maille différentes sont présents dans la Protein Data Bank (PDB) (Bernstein et al., 1977) en 2000. Nous pouvons indiquer par exemple des paramètres de maille des structures tétragonale, monoclinique, ou orthorhombique comme dans le Tableau II.3.

Tableau II.3. Paramètres de maille des structures tétragonale, orthorhombique et monoclinique du lysozyme de blanc d'œuf (Datta et al., 2001).

Structure cristalline	Native tétragonale	Orthorhombique	Monoclinique
Groupe d'espace	P4 ₃ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁
Paramètres de maille			
a (Å)	79,20	30,56	27,42
b (Å)	79,20	58,99	62,80
c (Å)	37,94	68,26	60,94
α (°)	90	90	90
β (°)	90	90	92,7
γ (°)	90	90	90

Cette protéine est utilisée dans les expériences présentées dans les parties IV.3.2.2, IV.3.2.3, IV.3.3.2 et IV.4.2 en dissolvant du lysozyme en poudre (Sigma-Aldrich) dans une solution tampon acétate (Sigma-Aldrich). Cependant après dissolution, nous nous sommes rendu compte, comme d'ailleurs mentionné dans la littérature (Parmar et al., 2007), que des agrégats de lysozyme étaient présents en solution. Comme le montre la Figure II.14, issue des travaux de Pamar et al., la présence de ces agrégats influencent les mécanismes de nucléation et doivent par conséquent être enlevés de la solution grâce à une méthode de purification.

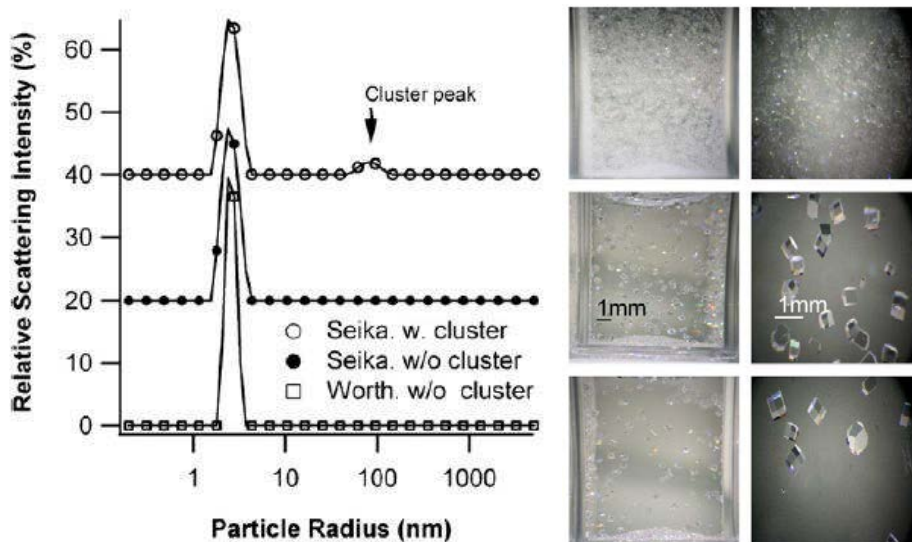


Figure II.14 A - Distribution de taille du lysozyme en solution B - Résultat des expériences de cristallisation (C = 40mg/ml, C NaCl = 4%, T=9°C). La deuxième colonne d'image correspond à un zoom sur les cristaux obtenus. La première ligne correspond au lysozyme de chez Seikagagu non purifié (courbe DLS et photographies), la deuxième ligne correspond au lysozyme de chez Seikagagu filtré (diamètre de pores :20nm) et la troisième ligne correspond au lysozyme de chez Worthington (Pamar et al 2007)

II.1.3.1 Purification

Comme évoqué précédemment, une solution de lysozyme obtenue à partir de poudre commerciale, ne présente pas uniquement des monomères en solution, mais également des agrégats. Toutes les solutions de lysozyme testées, issue de plusieurs fabricants et de différents lots (Sigma Aldrich, Seikagagu, Worthington, Hampton Research, INRA...) présentent des agrégats en solution similaires à ceux observé par Pamar et al. Ces agrégats sont très probablement issus de la dénaturation partielle du lysozyme lors du procédé de lyophilisation. Une analyse DLS sur une solution de lysozyme commercial a permis de déterminer une population de monomères d'une taille proche de 2nm et une autre population d'objets de tailles comprises entre 50 et 500 nm environ, comme illustré par les courbes rouges, sur la figure Figure II.15. Un procédé de purification a alors été établi pour enlever ces agrégats de la solution. Pour se faire, après dissolution du lysozyme dans une solution tampon acétate de sodium à 50 mM pH 4,5, la solution obtenue est centrifugée à travers des filtres membranaires de seuil de coupure 50kDa (Amicon, Merck Millipore, Allemagne) pendant 20 minutes à 20°C à l'aide d'un rotor à angle fixe, à la vitesse de 4000g. La masse molaire du lysozyme étant d'environ 14kDa, les monomères passent à travers la membrane et peuvent être récupérés dans la partie inférieure du filtre. A l'inverse, les agrégats, de masse molaire supérieure au seuil, sont retenus dans la partie supérieure. Les courbes de l'analyse DLS de la solution récupérée après filtration sont également présentées en vert sur la Figure II.15. Il est possible de noter que la population d'agrégats de taille supérieure à 50nm a complètement disparue de la solution finale, ce qui illustre la performance de ce procédé de séparation et dans notre cas, de purification. Une fois les solutions préparées, ces solutions sont stables dans le temps et aucun agrégat de lysozyme n'est apparu après une année de stockage.

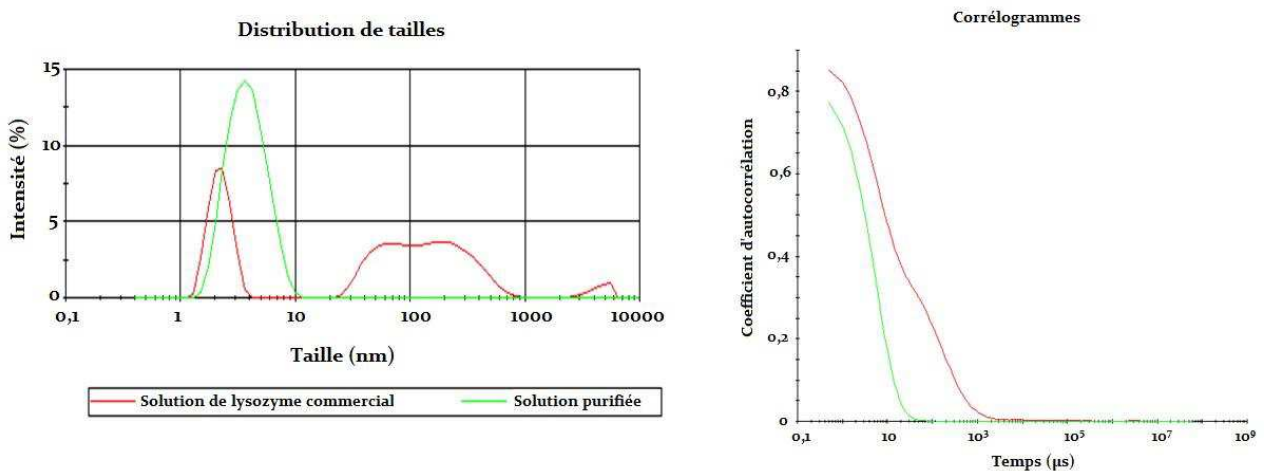


Figure II.15. Analyse DLS de solutions de lysozyme avant, et après purification. Les courbes rouges correspondent à une solution obtenue par simple dissolution de poudre commerciale dans une solution tampon. Les courbes vertes correspondent à une solution obtenue après le procédé de purification. (Gauche) Distribution de tailles des solutions, avant purification deux populations coexistent et après, la solution est monodisperse. (Droite) Corrélogrammes des deux solutions, une bosse sur la courbe rouge indique la présence d'une deuxième population qui disparaît après la purification.

II.1.3.2 Concentration

Néanmoins, au cours de ce procédé de purification, à cause de la suppression des agrégats, la concentration totale en protéine dans la solution purifiée est divisée par un facteur d'environ 3. Ainsi, en partant d'une solution de concentration 150 mg/mL initialement, on obtient après purification une solution d'environ 50 mg/mL. Dans le cadre de ces travaux qui visent à étudier les mécanismes de nucléation, nous avons vu dans la partie précédente que le mécanisme en deux étapes se produisait a priori proche de la limite de séparation liquide-liquide et qu'il faut par conséquent une concentration élevée en protéine dans les gouttes et donc d'autant plus dans les solutions stock. Nous pourrions alors nous dire qu'il suffit de partir d'une solution de 500 mg/mL après dissolution pour finalement obtenir une solution purifiée d'environ 170 mg/mL en protéine. Cependant, avec une concentration initiale si élevée, la solution aura tendance à former un gel visqueux et il sera impossible de la filtrer à travers la membrane. Afin de pallier ce problème, il est plus commode de commencer avec une solution moyennement concentrée et d'ajouter une étape de concentration après la purification. Pour cette concentration, nous avons à nouveau recouru à la filtration membranaire par centrifugation, mais cette fois à l'aide de membranes de seuil 3kDa (Amicon, Merck Millipore, Allemagne). Ainsi, les molécules de lysozyme étant plus grosses que le seuil, elles vont rester dans la partie supérieure du filtre, alors que le solvant (la solution tampon) va passer au travers de la membrane, augmentant ainsi la concentration en protéine dans la partie supérieure. En réalisant cette opération plusieurs fois, il est possible de concentrer la protéine purifiée. De plus, en rajoutant de la solution tampon plusieurs fois dans la partie supérieure du filtre, on procède également à une dialyse de la solution, la faible quantité de sel initialement présente dans la poudre de lysozyme passant également à travers la membrane. L'ensemble de ce procédé de purification/concentration est récapitulé à l'aide du schéma de la Figure II.16 sur lequel est également indiqué une valeur des concentrations de la solution à chaque étape pour finalement obtenir une solution purifiée, uniquement constituée de monomères à une concentration d'environ 150 mg/mL et qui permet donc d'étudier la nucléation, dans des conditions expérimentales proches de la frontière de séparation liquide-liquide. Il est à noter aussi que cette technique permet également d'éliminer les impuretés dont la taille est inférieure à la taille du monomère du lysozyme (qui peuvent être impossible à détecter par DLS). Cette étape de concentration ne modifie pas ni l'état d'agrégation, ni la structure interne de la protéine (comme le montreront ultérieurement les mesures réalisées en diffusion de rayon X aux petits angles).

Nous venons donc de voir les trois protéines étudiées dans ces travaux ainsi que leurs différentes propriétés. Le Tableau II.4 récapitule, ces différentes informations ainsi que les avantages principaux, qui justifient leur utilisation.

Comme mentionné dans la partie précédente, ces protéines vont être utilisées au sein de dispositifs microfluidiques. La partie suivante est donc consacrée à la présentation technique des procédés de fabrication de ces différents dispositifs.

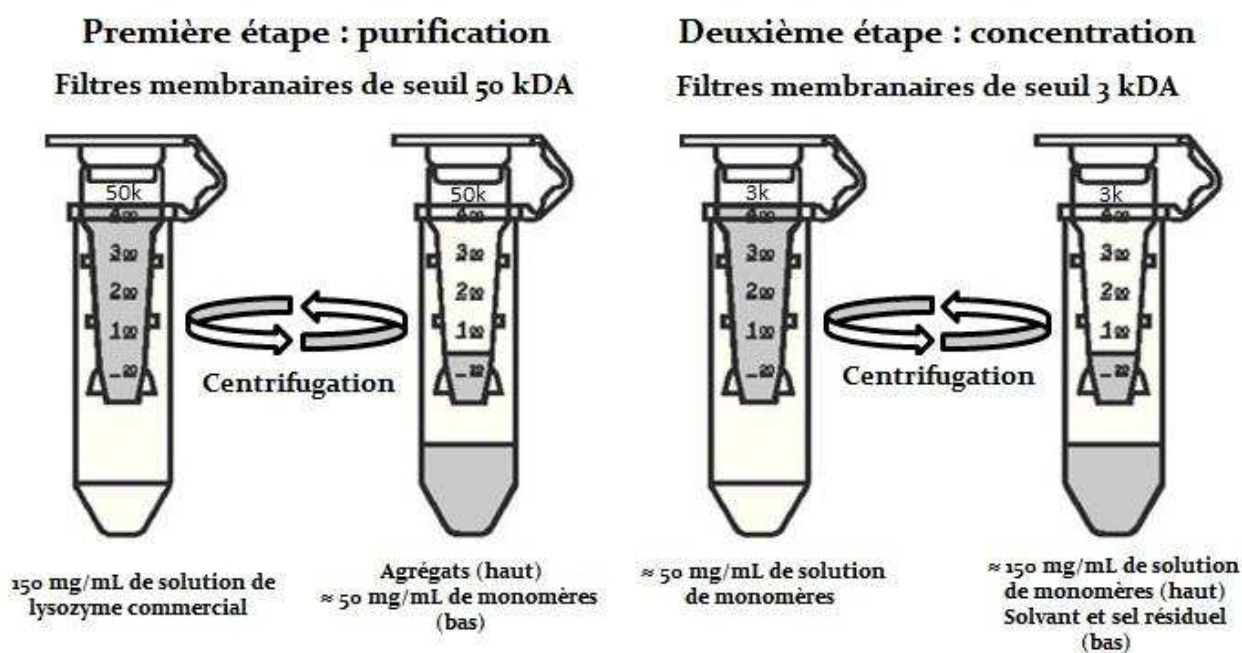


Figure II.16. Procédé de purification et de concentration d'une solution de lysozyme commercial. La première étape permet de séparer la population de monomères en solution de celles d'agrégats plus gros que le seuil du filtre. La seconde étape permet de concentrer la solution purifiée et de la dialyser.

Tableau II.4. Récapitulatif des données concernant les protéines utilisées dans cette thèse

	Urate Oxydase	Glucose Isomérase	Lysozyme
Nombre de résidus du monomère	301	388	129
Masse molaire du monomère (Da)	33438	43736	14402
Auto-assemblage	Homo-tétramère	Homo-tétramère	Non
Structure cristalline	Orthorhombique	Orthorhombique	Orthorhombique Monoclinique Tétraogonale
Avantages	Native sous la forme tétramérique mais très sensible à la dénaturation/dissociation donc adaptée à des tests de dénaturation	Très grande taille et capable de cristalliser très rapidement avec un mécanisme de déplétion intéressant à observer	Petite protéine modèle, beaucoup de données dans la littérature et plusieurs structures cristallines

II.2 Fabrication des dispositifs microfluidiques

Dans cette partie nous allons présenter les procédés de fabrication des dispositifs expérimentaux pensés et développés au laboratoire dans le cadre de cette thèse. Ces systèmes sont construits en suivant les étapes classiques de lithographie souple. La première étape est la fabrication d'un moule rigide à l'aide d'un matériau photosensible. Ce moule est ensuite utilisé pour réaliser un autre moule en matériau souple, qui est usuellement réalisé en PDMS. Enfin, ce moule en PDMS peut être utilisé tel quel pour réaliser un dispositif microfluidique en PDMS, ou bien servir à fabriquer des puces microfluidiques avec d'autres matériaux présentés par la suite.

III.2.1 Design et fabrication des moules rigides

III.2.1.1 Matériel utilisé

La première étape de la lithographie souple est la fabrication d'un moule rigide avec le design souhaité. Généralement, on utilise pour se faire des résines photosensibles avec une méthode classique de photolithographie. Dans la littérature, un grand nombre de groupes de recherche ont utilisé dans ce but, la résine photosensible négative SU-8 (Hwang et al., 2001; Lorenz et al., 1997; Zhang et al., 2001). De cette façon, les moules obtenus sont de grande qualité grâce à la haute résolution de la SU-8 et à ses importantes propriétés de résistance aux solvants. Néanmoins, ce matériau est cher et son utilisation demande des conditions drastiques de propreté, il est recommandé d'utiliser une salle blanche donc des équipements onéreux également. Finalement, le prix pour l'ensemble du procédé est très important et le temps de fabrication d'un moule est assez long car il peut être de plusieurs jours. Afin de réduire les coûts et les temps de fabrication, nous avons utilisé dans ces travaux, une autre résine photosensible, qui se présente sous la forme de films secs, qui est moins onéreuse, et plus facile à mettre en œuvre. Ces films secs photosensibles étaient initialement utilisés pour réaliser des circuits imprimés, mais on les utilise aujourd'hui pour beaucoup d'applications dans les systèmes microfluidiques également (Chuan et al., 2004; Stephan et al., 2007; Tsai et al., 2006). Un film sec classique est composé de trois couches, une fine couche de résine photosensible comprise entre une couche polyester et une couche polyéthylène. Ces couches externes servent de protection de la résine avant son utilisation. On retrouve la composition et l'aperçu visuel d'un film sec classique sur la Figure II.17. Dans ces travaux, deux types de films secs sont utilisés, les séries WBR2000 et MX5000 de Dupont.

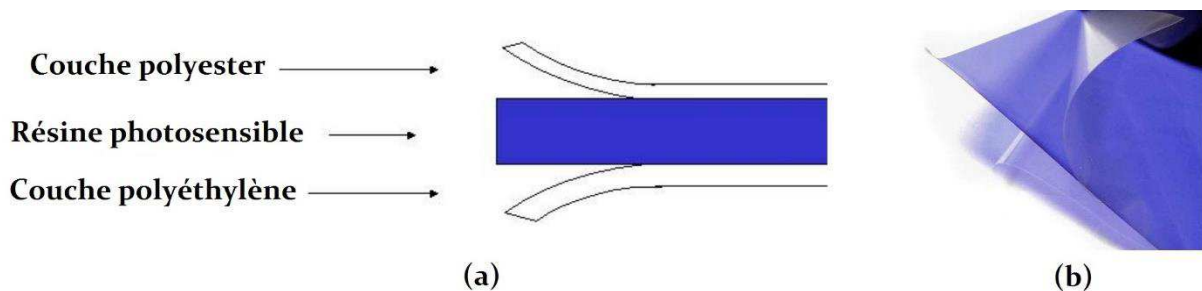


Figure II.17. (a) Composition usuelle d'un film sec avec deux couches protectrices polyester et polyéthylène et une fine couche de résine photosensible utilisée pour la fabrication de moule rigide.

(b) Aperçu visuel d'un film sec où l'on aperçoit la résine photosensible en bleu, et les deux films de protection transparents.

Les films de la série WBR2000 ont une bonne résolution et sont disponibles avec des épaisseurs de 50, 75, 100 et 120 microns. Les films de la série MX5000 ont une meilleure résolution et peuvent être utilisés pour des structures de plus petites échelles, avec des épaisseurs de 10, 15, 20, 30, 40 et 50 microns d'épaisseur.

Pour fabriquer un moule rigide en films secs, il suffit de les laminer sur un substrat, d'exposer les films aux UV à travers un masque et de les développer. Ces étapes sont précisées par la suite.

III.2.1.2 Préparation du substrat

Il est tout d'abord nécessaire de nettoyer le substrat s'apprêtant à recevoir les films secs. Dans ce procédé nous utilisons comme substrats des lames de verre de différentes tailles en fonction du design souhaité et d'épaisseur 1mm (Corning, Sigma-Aldrich, Etats-unis). Initialement, il est possible de trouver sur ces substrats des particules de poussières, des empreintes de doigts, ou autre contaminants qui vont altérer l'adhésion du film sec et la résolution du moule rigide. C'est pourquoi il convient de nettoyer le substrat dans une première étape. Pour se faire, nous utilisons une solution Piranha préparée en mélangeant de l'acide sulfurique (H_2SO_4) avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans un ratio 4:1. La réaction est exothermique et il est fréquent d'observer une ébullition de la solution, c'est pourquoi il faut réaliser le mélange avec précautions, sous hotte, en ajoutant lentement le peroxyde d'hydrogène à l'acide. En trempant le substrat dans la solution obtenue pendant une vingtaine de minutes, il est possible de nettoyer les résidus organiques et inorganiques. Il convient ensuite de rincer méticuleusement le substrat avec de l'eau déminéralisée et de le sécher avec de l'azote. Il est ensuite possible de chauffer le substrat à 100°C pour désorber l'eau résiduelle à la surface du substrat et ainsi obtenir un substrat propre de toute impureté, pour une adhésion optimale du film sec. Les différentes étapes de préparation du substrat sont récapitulées dans le Tableau II.5. Une fois le substrat propre obtenu, il est alors possible de passer à la seconde étape du procédé de fabrication du moule rigide, à savoir le laminage des films secs sur le substrat.

Tableau II.5. Etapes du protocole de préparation du substrat

Etape	Description	Temps	Commentaires
1	Préparation de la solution Piranha H_2SO_4 : H_2O_2 avec un ration 4:1	5 min	La solution va chauffer et bouillir donc manipuler avec précautions sous hotte
2	Nettoyer le substrat en le plongeant dans la solution Piranha	20 min	Agir avec précautions à l'aide de pinces en Téflon
3	Rincer à l'eau déminéralisée	3 min	

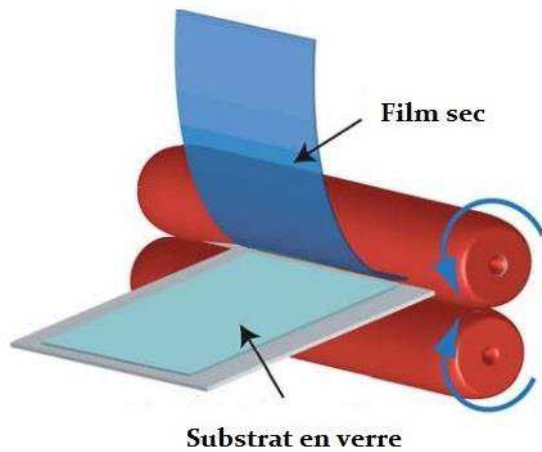
4	Sécher à l'azote N ₂	2 min	Souffler l'azote sur les deux surfaces du substrat, sous hotte
5	Evaporer l'eau résiduelle	5 min	Chauffer le substrat à 100°C

III.2.1.3 Laminage des films secs

Le film sec de résine photosensible est laminé sur le substrat à l'aide d'une lamineuse. Un avantage de ce procédé est qu'il peut être simplement réalisé à l'aide d'une lamineuse de bureau (Mega Electronics, Royaume-Uni). Il est possible d'ajuster la vitesse et la température de laminage, afin d'obtenir le meilleur résultat en fonction de l'épaisseur du film sec. Ces paramètres sont importants pour un bon laminage car une température trop élevée peut entraîner l'apparition de bulles d'air entre le substrat et le film, et une température trop basse réduira l'adhésion du film sur le substrat. Cette température est donc optimisée et il convient pour les films secs de Dupont de travailler avec une température comprise entre 95 et 100°C. Selon l'épaisseur souhaitée pour le moule, il est possible de laminier plusieurs films les uns sur les autres en s'assurant de bien enlever les couches de protection au préalable. Un dessin représentant cette étape du procédé est illustré sur la Figure II.18

III.2.1.4 Exposition à la lumière UV

Comme toute autre résine négative photosensible, la réticulation nécessaire à l'obtention d'un moule rigide est activée par exposition à la lumière UV. Afin d'obtenir le design de moule souhaité, il convient de positionner sur le dernier film de protection des films secs laminés, un masque au moment de l'exposition. Un exemple de masque est présenté sur la Figure II.19. Ces masques sont obtenus en les dessinant à l'aide d'un programme de conception sur ordinateur. Ils sont ensuite envoyés à une société professionnelle d'impression qui applique les dessins sur films transparents.



(a)



(b)

Figure II.18. Etape de laminage pour la préparation du moule rigide. (a) Le film sec est appliqué sur le substrat en verre à l'aide de la pression des rouleaux chauffés pour garantir une bonne adhésion du film sur le substrat. (b) Lamineuse de bureau utilisée pour réaliser cette étape.

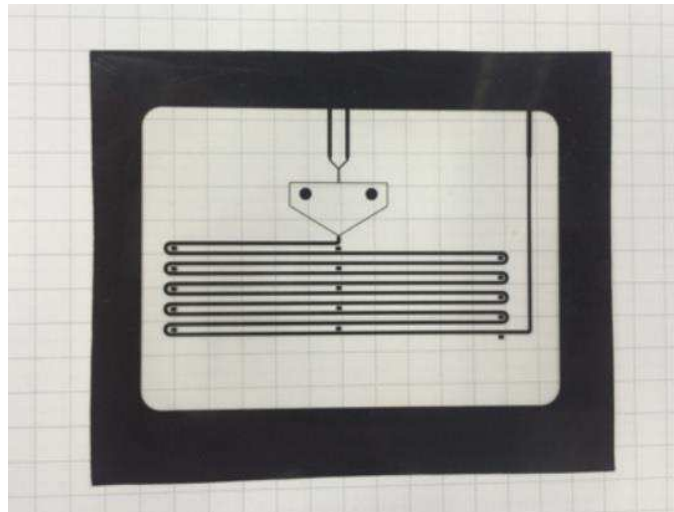


Figure II.19. Exemple de masque utilisé pour appliquer un design au moule. Il est positionné sur la (ou les) couche(s) de film sec lors de l'exposition à la lumière UV. Le film sous les zones noires ne sera pas exposé, la résine ne sera pas réticulée et il sera possible de l'enlever par la suite, formant ainsi des canaux. A l'inverse, la résine sous les zones transparentes sera réticulée et formera les parois du moule rigide.

Les paramètres importants pour l'exposition des films secs à la lumière UV sont l'intensité de la source et le temps d'exposition. Selon le fabricant des films, il est nécessaire d'avoir une intensité supérieure à 10 mW/cm^2 pour des dessins de basse résolution et supérieure à 20 mW/cm^2 pour des dessins de haute résolution. Ainsi, nous utilisons comme source de lumière UV équipé d'une tête optique collimatée l'UV-KUB 2 (Kloe, France) qui possède une intensité lumineuse de 25 mW/cm^2 et qui permet donc de réaliser tous types de dessins. L'énergie nécessaire à apporter aux films lors de l'exposition dépend du type de film et de son épaisseur. Les valeurs minimales et

maximales, ainsi que les temps d'exposition correspondant avec l'UV-KUB 2 sont présentées dans le Tableau II.6. Il est possible de procéder à une étape de « cuisson » après l'exposition, en positionnant le substrat sur une plaque chauffante à 100°C pour une durée d'une minute ce qui améliore la résolution du film et la rigidité des zones exposées en améliorant la réticulation de la résine.

Tableau II.6. Energies minimales et maximales d'exposition à la lumière UV en fonction du type et de l'épaisseur des films secs. Les temps d'exposition correspondants sont calculés pour l'UV-KUB 2 d'intensité 25 mW/cm².

Série	MX5000					WBR2000			
Epaisseur (µm)	15	20	30	40	50	50	75	100	120
Energie requise (mJ/cm ²)	20-65	35-105	40-115	45-125	50-140	220-460	240-480	250-500	260-520
Temps d'exposition (s)	0,8-2,6	1,4-4,2	1,6-4,6	1,8-5	2-5,6	8,8-18,4	9,6-19,2	10-20	10,4-20,8

A l'aide de cette étape il est alors possible d'obtenir une épaisseur de résine avec des zones rigides réticulées et des zones souples non réticulés qu'il conviendra d'enlever grâce à l'étape de développement afin de former des canaux.

III.2.1.5 Développement de la résine non réticulée

Afin d'enlever les zones non réticulées du film sec, ce dernier est positionné dans un récipient et il convient de pulvériser dessus une solution de carbonate de sodium, ou carbonate de potassium à 1% massique. La durée nécessaire pour un développement complet du moule dépend non seulement de l'épaisseur de film à développer, mais également de la température de la solution de développement. La vitesse de développement est accélérée en augmentant la température de la solution. La durée de développement, si elle est trop longue, entraîne le développement des parois des zones exposées, et si elle est trop courte, de la résine reste à l'endroit des canaux, ce qui dans les deux cas conduit à une baisse significative de la résolution et à des moules non utilisables dans les applications souhaitées. C'est pourquoi, il est important de déterminer une température et des durées de développement adéquates. Des temps de développement approximatifs recommandés pour une température de 30°C sont présentés dans le Tableau II.7.

Tableau II.7. Temps de développement nécessaires à l'aide d'une solution de développement à 30°C pour les différents types de films secs.

Série	MX5000					WBR2000			
Epaisseur (µm)	15	20	30	40	50	50	75	100	120
Temps nécessaire (s)	30	40	55	75	90	120	180	240	280

Suite au développement, le moule est rincé pendant environ 3 minutes avec de l'eau distillée dont on peut augmenter la dureté en réalisant une solution de sulfate de magnésium à 1% massique

afin d'arrêter les effets de la solution de développement et s'assurer que la résine n'est pas développée davantage. Finalement, un léger flux d'azote est utilisé pour sécher le moule. A ce point du procédé de fabrication, notre moule a le design souhaité, avec la présence de canaux identiques à ceux conçus par ordinateur, et d'épaisseur correspondant à celle des films secs laminés. Cependant, une ultime étape est nécessaire. En effet, l'étape suivante correspond à la fabrication de moules souples à l'aide des moules rigides. Il faut par conséquent s'assurer que le matériau utilisé pour le moule souple ne colle pas au moule rigide, et donc procéder à une modification de surface du moule rigide pour le rendre hydrophobe.

III.2.1.6 Modification des propriétés surfaciques du moule rigide

Dans la littérature, il existe un nombre important de procédés permettant de rendre hydrophobe une surface, la plupart d'entre eux utilisant des silanes, comme le perfluorodécyltrichlorosilane (PDTS) (Bass and Lichtenberger, 2004; Jones et al., 2011; Lee et al., 2007; Sandison et al., 2007) ou le triméthoxysilane (Labit et al., 2008). Néanmoins, ces procédés sont souvent fastidieux, et doivent être réalisés dans des conditions bien particulières avec notamment l'utilisation d'une boîte à gants remplie d'azote afin d'éviter d'exposer la solution de silane à l'humidité de l'air ambiant.

C'est pourquoi, deux autres procédés plus simples, rapides et permettant d'obtenir des résultats équivalents sont utilisés. Le premier utilise le produit NOVEC 1720 Electronic Grade Coating (3M, Etats-Unis) dans lequel le moule est trempé pendant une vingtaine de minutes afin d'y déposer une couche hydrophobe. Le moule est ensuite placé sur une plaque chauffante à 135°C pendant une dizaine de minutes pour évaporer le solvant contenu dans la solution NOVEC. Les tests ont montré que cette technique permet d'obtenir une couche hydrophobe stable et de longue durée de vie.

Une autre technique repose sur l'utilisation de toluène. En effet, en trempant le moule dans le toluène pendant quelques minutes, un revêtement hydrophobe se crée sur la surface du moule. Il convient de ne pas laisser le moule trop longtemps dans le toluène car celui-ci peut dissoudre le film sec rigide ce qui entraîne une diminution de l'adhésion du film sur le substrat et une diminution de la résolution. Il convient également de bien rincer le moule avec de l'isopropanol et de le laisser reposer sous une hotte pour éliminer le toluène résiduel.

Finalement, après toutes ces étapes, nous obtenons un moule rigide en films secs, de l'épaisseur souhaitée, avec des canaux correspondant à ceux conçus sur le dessin par ordinateur, et avec un revêtement de surface hydrophobe, ce qui nous permet de passer à la deuxième étape du protocole de fabrication de dispositifs microfluidiques, à savoir la réalisation de moules souples.

III.2.2 Fabrication des moules souples en PDMS

Le matériau utilisé pour la fabrication des moules souples est le polydiméthylsiloxane (PDMS), un polymère organominéral de la famille des siloxanes (nom dérivé du silicium, de l'oxygène et de l'alcane). Sa formule chimique est $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{O}[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ avec n le nombre de monomères $[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]$ répétés dans la chaîne polymérique comme illustré sur la Figure II.20.

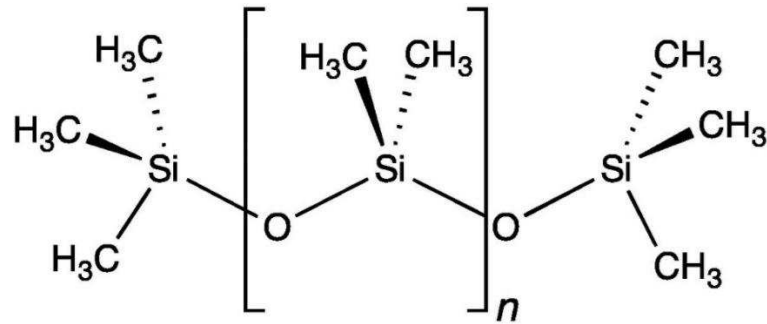


Figure II.20. Formule chimique du polydiméthylsiloxane (PDMS)

Dans le procédé de photolithographie souple, les matériaux élastomères sont utilisés pour leur capacité à former un contact parfait avec des surfaces aux géométries variables grâce à leur fluidité avant réticulation, puis ils peuvent être facilement enlevés de moules rigides ou de structures complexes une fois réticulés, permettant ainsi d'obtenir des moules souples avec la géométrie inverse du moule rigide.

Le PDMS possède une faible énergie surfacique, et une bonne stabilité thermique et chimique, ce qui signifie qu'il ne s'attache pas facilement à d'autres matériaux et qu'il peut être utilisé à basse comme à haute température, sans se contracter. De plus, grâce à sa transparence à la lumière UV, le PDMS peut être utilisé pour mouler d'autres polymères, qui réticulent à l'aide d'UV.

Afin de préparer le moule souple en PDMS, il faut au préalable mélanger la solution commerciale avec un agent de réticulation (Dow Corning, Etats-Unis) dans un ratio 10:1 pour obtenir du PDMS fluide. Ce mélange est ensuite dégazé pour enlever les bulles d'air incorporées lors du mélange. Ce mélange est ensuite versé directement sur le moule rigide en film sec et l'ensemble est dégazé à nouveau pour enlever les bulles d'air piégées lors du versage sur le moule rigide. Le PDMS est ensuite réticulé à 60°C pour une durée de deux heures ou à 100°C pour une durée de 30 minutes. Le moule souple une fois réticulé est ensuite méticuleusement détaché du moule rigide. Un schéma récapitulatif du procédé de fabrication de moule souple en PDMS est illustré sur la Figure II.21.

Une fois le moule souple en PDMS obtenu, il peut être utilisé pour directement fabriquer des puces en PDMS avec plusieurs couches de PDMS collées entre elles (Eddings et al., 2008) ou des puces en PDMS avec support en verre (Zheng et al., 2004). La transparence du PDMS aux UV lui permet également de mouler des structures dans un matériau réticulable aux UV disposé sur un substrat. Les puces microfluidiques conçues et développées dans cette thèse sont des puces en PDMS sur substrat verre, et des puces en OSTEMER sur support verre et sur support Kapton. Les procédés de fabrication de ces différentes puces sont présentés dans la partie suivante.

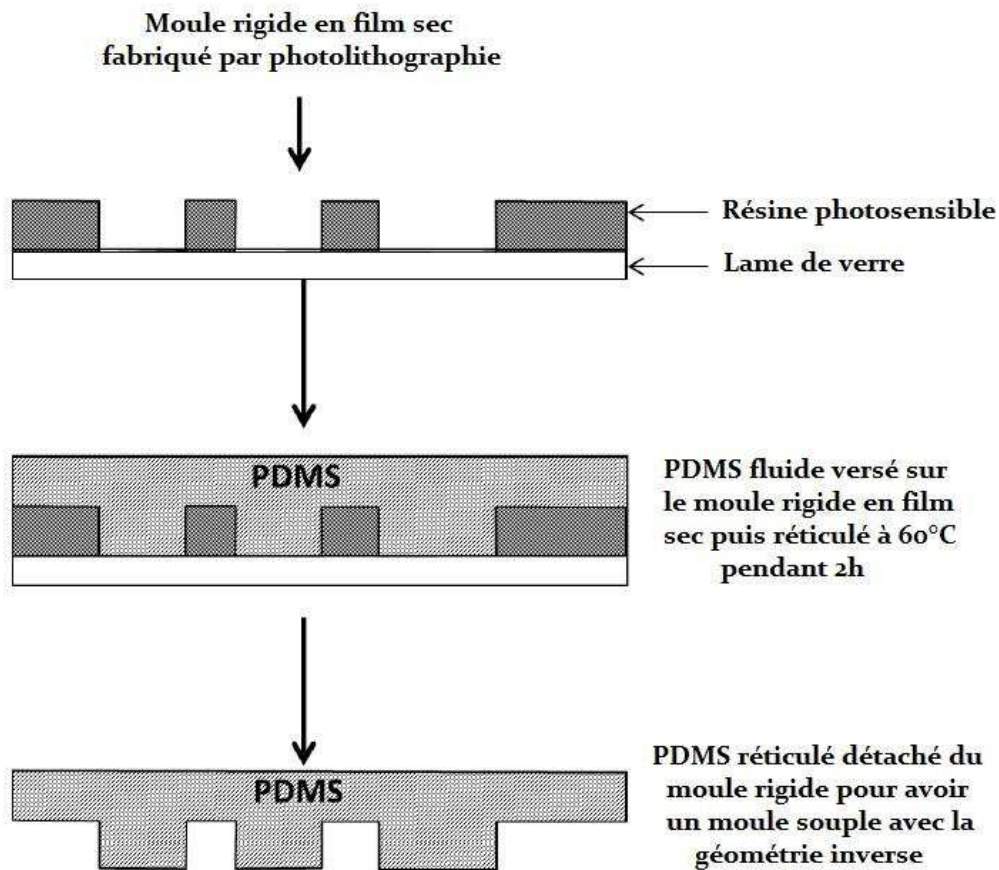


Figure II.21. Procédé de fabrication de moule souple en PDMS. Le PDMS liquide est versé sur le moule rigide en film sec, puis réticulé à 60°C pendant 2h. Le PDMS ainsi réticulé est détaché délicatement du moule en film sec pour obtenir le moule fluide en PDMS avec la géométrie inverse.

III.2.3 Fabrication des puces microfluidiques

III.2.3.1 Puce en PDMS support verre

Fabrication

Ces puces sont les plus rapides à obtenir car le procédé de fabrication contient peu d'étapes. La première étape est la réalisation d'un moule en film sec contenant des canaux en relief, de l'épaisseur souhaitée, en accord avec le protocole de fabrication présenté dans la partie Chapitre III. Une fois ces moules obtenus, la deuxième étape consiste à réaliser un moule en PDMS en suivant le protocole présenté dans la partie III.2.2. Ainsi, on obtient un moule souple en PDMS avec la géométrie inverse du moule rigide, donc plat, avec des canaux creusés correspondant aux canaux en relief du moule rigide. Il convient ensuite de fermer ces canaux creusés, et c'est le rôle du substrat en verre. On utilise simplement une lame de verre de taille adéquate pour la puce souhaitée qu'il convient au préalable de nettoyer à la solution piranha, de la même manière que pour préparer le substrat pour la fabrication des moules rigides (cf. Tableau II.5). Il convient ensuite d'activer la surface du moule en PDMS et de celle du substrat en verre à l'aide d'un plasma afin de permettre une adhésion irréversible entre le PDMS et le substrat en verre. Cela peut se faire simplement (Haubert et al., 2006) à l'aide de l'effet corona procuré par un dispositif portable

et low-cost (BD-20AC Laboratory Corona Treater, Electro-Technics Products Inc., Etats-Unis). Une fois le plasma appliqué pendant quelques dizaines de secondes sur la surface du moule en PDMS, celui-ci peut être délicatement déposé sur le substrat en verre pour fermer la puce. L'ensemble du procédé de fabrication d'une telle puce est présenté sur la Figure II.22.

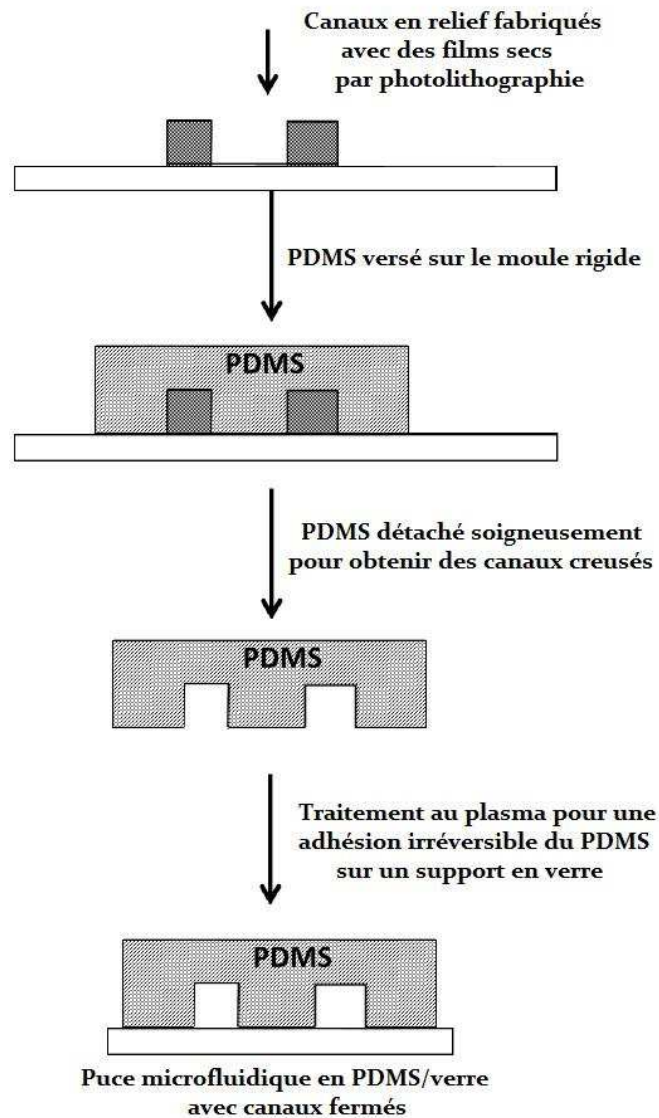


Figure II.22. Procédé de fabrication d'une puce en PDMS sur un support en verre. Le PDMS est coulé sur le moule rigide, puis détaché une fois réticulé. Il est ensuite collé sur un plaque de verre à l'aide d'un traitement au plasma.

Modification de surface

Comme expliqué au préalable, nous nous intéressons dans cette thèse aux phénomènes de cristallisation de gouttes de protéines. Nous utilisons donc dans nos dispositifs microfluidiques, une géométrie permettant de générer des gouttes de solutions aqueuses (protéine, agent de cristallisation, solution tampon) séparées par une huile immiscible. Afin de s'assurer que nos gouttes ne mouillent pas les parois des dispositifs microfluidiques, il convient de rendre ceux-ci assez hydrophobes. Pour ce dispositif, il est alors nécessaire de rendre le substrat en verre et le

PDMS hydrophobes. Le PDMS est par nature déjà hydrophobe, mais pas suffisamment pour éviter que les gouttes ne mouillent les parois. Le verre est lui initialement hydrophile.

Pour rendre ces deux matériaux assez hydrophobes afin d'éviter le mouillage des gouttes, nous utilisons à nouveau le NOVEC 1720 Electronic Grade Coating (3M, Etats-Unis). Il suffit d'insérer à l'aide d'une seringue cette solution à l'intérieur du dispositif, de la laisser quelques dizaines de secondes, puis de mettre la puce microfluidique sur une plaque chauffante à 120°C. Ceci va vaporiser la solution qui va se répandre sur les parois internes du dispositif et créer un très fin revêtement de surface hydrophobe. Ce revêtement empêche alors les gouttes de mouiller les parois et est stable dans le temps.

Avantages/Inconvénients

Un tel dispositif microfluidique réalisé en PDMS et en verre présente plusieurs avantages. Tout d'abord, comme nous venons de l'illustrer, il est relativement simple et rapide à réaliser, et repose sur des techniques plutôt low-cost pour finalement obtenir un dispositif peu cher. Ceci permet de faire un grand nombre d'essais concernant les différents designs de puce envisagés et permet de comparer plusieurs géométries aisément. Un autre avantage important d'un tel dispositif est sa transparence optique. En effet, le PDMS et le verre sont transparents dans le domaine de l'UV-visible. Cela permet d'observer aisément au microscope l'intérieur du dispositif en fonctionnement et de vérifier que la génération des gouttes se déroule bien, que les gouttes ne mouillent pas les parois, etc. De plus, il est également possible d'utiliser des fibres optiques directement insérées dans le dispositif afin d'obtenir un système optofluidique et de réaliser in situ des mesures de fluorescence dans les gouttes, ou de faire des mesures de concentrations par exemple.

Un dispositif microfluidique en PDMS présente néanmoins un inconvénient. Le PDMS est un matériau assez poreux, ce qui implique qu'une puce microfluidique réalisée en PDMS n'est pas complètement hermétique. Ceci n'est pas un problème si l'on s'en sert simplement pour générer et utiliser des gouttes en mouvement. En revanche, pour des mesures de cinétiques de nucléation par exemple, il est fréquent de stocker des gouttes et de les immobiliser pendant une durée assez grande afin d'observer l'apparition de cristaux. Avec un système en PDMS, l'eau contenue dans les gouttes va pouvoir diffuser dans les pores du PDMS et les gouttes vont voir leur taille diminuer avec le temps. C'est pourquoi un tel dispositif n'est pas adapté pour un temps d'observation long, ou bien alors il faudrait l'améliorer en contrôlant par exemple l'humidité extérieure, mais on perdrait dans ce cas la simplicité de fabrication.

Nous venons donc de voir le procédé de fabrication de puces microfluidiques en PDMS avec support en verre, ainsi que la façon de procéder pour réaliser un traitement de surface hydrophobe, et les différents avantages et inconvénients procurés par un tel dispositif. Intéressons-nous désormais aux autres dispositifs utilisés dans le cadre de cette thèse, à savoir ceux réalisés à l'aide d'un matériau réticulable en deux étapes aux UV, l'OSTEMER.

III.2.3.2 Puces en OSTEMER

Le matériau OSTEMER

L'OSTEMER 322 Crystal Clear (Mercene Labs, Suède), version commerciale de l'OSTE+, est un nouveau système polymérique fluide, capable de réticuler en deux fois, et constitué de monomères allyliques, époxy, et thiol en excès, ainsi que d'un initiateur anionique, une amine tertiaire. Il est possible de réaliser une première réticulation, activable aux UV, qui correspond à la réaction thiol-ène présentée sur la Figure II.23, formant ainsi un réseau thiol-ène dans le mélange de monomères initial, dans lequel il reste alors les monomères thiol en excès, et les monomères époxy. Le polymère ainsi obtenu dans cette première étape n'est plus fluide, mais demeure souple, ce qui permet de le manipuler facilement. Nous pouvons alors ainsi former deux couches de polymère réticulé et les assembler ensemble. Ces deux couches comportent toujours des monomères thiol et époxy qui vont pouvoir réticuler ensemble une nouvelle fois par photoactivation, selon la réaction thiol-époxy présentée sur la Figure II.24 pour finalement former un réseau entièrement réticulé thiol-ène-époxy. Le matériau ainsi obtenu est rigide et présente d'excellentes qualités en tant que plastique (Carlborg et al., 2011, 2014; Haraldsson et al., 2014). Plus d'informations sur ce polymère sont disponibles dans la littérature.

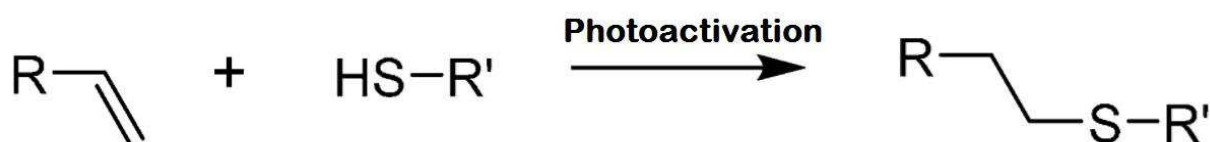


Figure II.23. Représentation de la réaction thiol-ène entre un monomère allylique et un monomère thiol pour former une nouvelle liaison. Cette réaction peut se répéter plusieurs fois en fonction des monomères présents initialement, afin d'obtenir un large réseau thiol-ène.

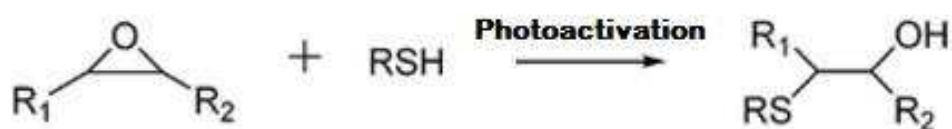


Figure II.24. Représentation de la réaction thiol-époxy entre un monomère époxy et un monomère thiol qui permet d'ouvrir le cycle du monomère époxy. Cette réaction peut se répéter plusieurs fois avec des étapes de propagation et ainsi former un large réseau thiol-époxy.

Une fois ce nouveau matériau rapidement présenté, intéressons-nous aux procédés de fabrication de deux nouveaux types de puces microfluidiques, les puces en OSTEMER avec support verre, et les puces en OSTEMER avec fenêtres en Kapton.

Puce en OSTEMER avec support en verre

La fabrication d'une puce microfluidique en OSTEMER avec support en verre repose sur l'utilisation d'un moule souple en PDMS dont la fabrication a été présentée dans la partie III.2.2. Il suffit alors simplement de verser une petite quantité d'OSTEMER fluide sur un substrat en verre de taille adaptée, et de venir presser délicatement le moule en PDMS sur le polymère fluide qui va se répandre entre le substrat et le moule. Il convient ensuite d'exposer l'ensemble du système aux

UV (rappelons ici que le PDMS est transparent aux UV ce qui rend possible cette application) afin de réaliser la première réticulation pour former le réseau thiol-ène. Il convient de réaliser cette étape deux fois : une fois avec un moule en PDMS destiné à mouler la forme des canaux, et une fois avec un moule en PDMS plat, permettant de mouler une couche de polymère qui servira de capot pour fermer les canaux. Une fois les deux parties partiellement réticulées, les moules en PDMS sont délicatement détachés. Les deux parties sont alors assemblées entre elles avant d'être exposées une seconde fois aux UV pour réaliser la seconde réticulation entre les groupes thiol en excès et les groupes époxy et ainsi obtenir un réseau thiol-ène-époxy formant une structure rigide. Cette structure est rigidifiée davantage en plaçant le dispositif ainsi réalisé une heure dans un four à 100°C. L'ensemble de ce procédé de fabrication à partir du moule souple en PDMS est présenté sur la Figure II.25.

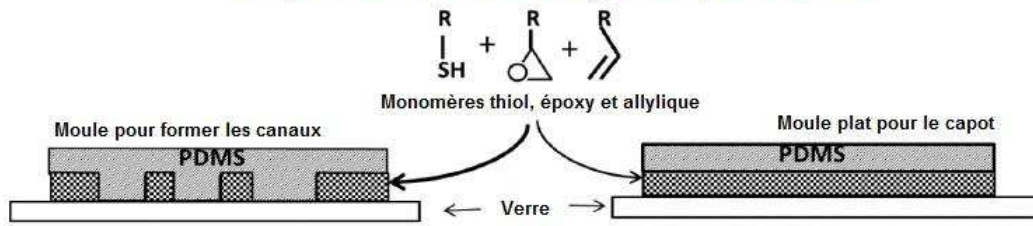
Il est possible de réaliser une étape intermédiaire de traitement de surface afin de donner au matériau OSTEMER des propriétés hydrophile ou hydrophobe selon l'application souhaitée. Cette étape est illustrée dans plusieurs études (Carlborg et al., 2012; Pardon et al., 2014).

Traitement de surface

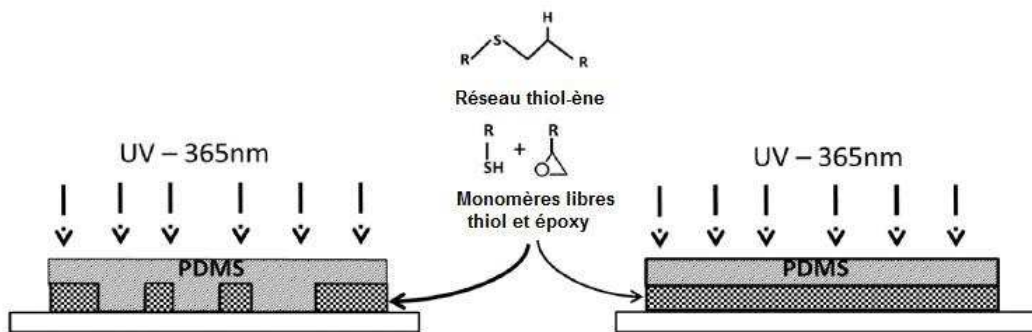
Ce procédé de traitement de surface repose sur l'utilisation d'une solution contenant des monomères méthacrylate fluorés (pour un traitement hydrophobe) ou avec des groupes hydroxyles (pour un traitement hydrophile) et deux photo-initiateurs, la benzophénone (BP) et de l'oxide de phényl-bis(triméthyl)benzoylphosphine (Irgacure R819) dans du toluène. Après la première réticulation de l'OSTEMER, la benzophénone favorise la conversion des groupes thiols en radicaux thiyls en capturant un atome d'hydrogène. Les monomères méthacrylate sont ensuite ajoutés au radicaux thiyls par une réaction en chaîne. La benzophénone n'enlevant que les atomes d'hydrogène des groupes thiols en surface, les molécules méthacrylates ne sont greffées qu'en surface des couches d'OSTEMER. Il a aussi été montré (Carlborg et al., 2012) que plus il y a de groupes thiols en excès, plus la densité de chaînes méthacrylates en surface est importante et plus le caractère hydrophile ou hydrophobe est prononcé. En choisissant l'endroit où sont appliquées les solutions, il est possible d'avoir certaines parties d'une puce hydrophobes, et d'autres hydrophiles. Il convient néanmoins de mettre uniquement de la solution dans les canaux, afin de garder les groupes thiols ailleurs, qui permettront d'effectuer la seconde réticulation. Des angles de contact lorsqu'une goutte d'eau est déposée sur une partie hydrophile ou hydrophobe sont indiqués sur la Figure II.26.

Pour rentrer plus dans les détails, la solution utilisée afin de réaliser un traitement de surface hydrophobe contient 2%*m* d'heptadécafluorodécyl méthacrylate dissous dans du toluène avec 2%*m* de benzophénone, 1%*m* d'éther allylique glycidyle et 0,5%*m* d'Irgacure R819. Elle est injectée sur la surface à traiter à l'aide d'une seringue et exposée pendant 2 minutes à une longueur d'onde de 365 nm avec une source d'intensité lumineuse de 25 mW/cm². La surface est ensuite rincée avec de l'isopropanol et séchée à l'azote pour éliminer les excès de méthacrylates fluorés. La puce est ensuite mise au four à 100°C pour au moins 1 heure.

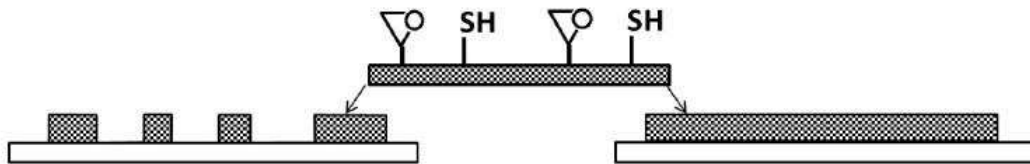
Etape 1 : L'OSTEMER fluide est déposé sur le substrat en verre, les moules en PDMS sont légèrement pressés dessus



Etape 2 : L'OSTEMER est exposé pour la première réticulation aux UV pour former un réseau thiol-ène. Il reste dans l'OSTEMER des monomères thiol en excès et les monomères époxy



Etape 3 : Les moules en PDMS sont détachés des couches d'OSTEMER. Les groupes thiol et époxy sont présents à la surface des couches d'OSTEMER



Etape 4 : Les couches des canaux et du capot sont alignées et assemblées avant la seconde exposition aux UV. La réaction entre les groupes thiol en excès et les groupes époxy a lieu pour former un réseau thiol-ène-époxy entièrement réticulé et ainsi réaliser une adhésion des deux couches d'OSTEMER pour obtenir une structure rigide

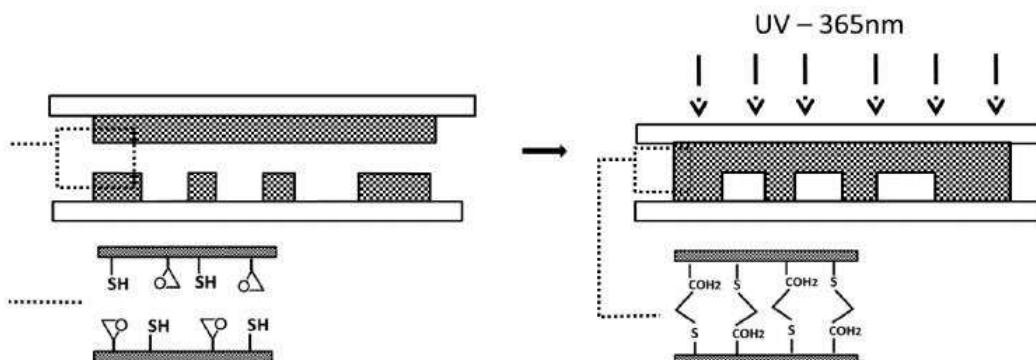


Figure II.25. Procédé de fabrication de puce microfluidique en OSTEMER. Le mélange de monomères subit une première réticulation pour former un réseau thiol-ène souple, puis deux couches souples sont assemblées entre elles et subissent une seconde réticulation pour former une structure rigide composée d'un réseau thiol-ène-époxy.

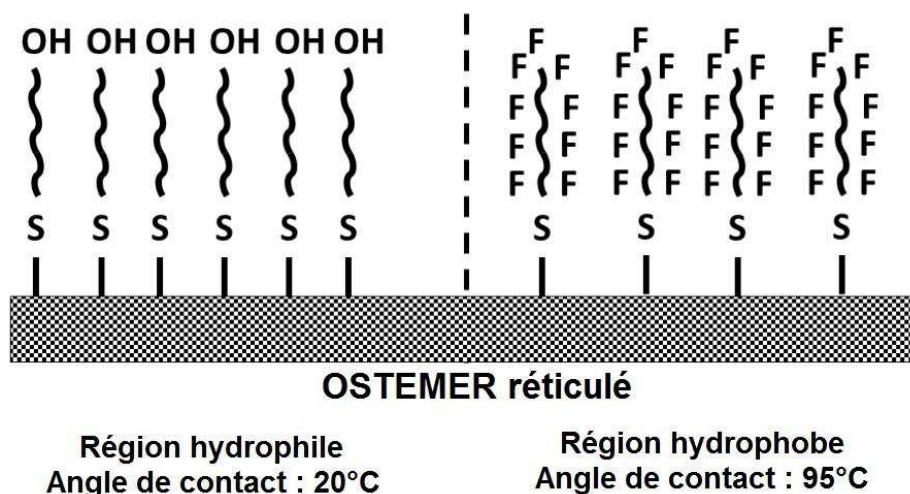


Figure II.26. Modification des propriétés de surface de l'OSTEMER en greffant des monomères méthacrylates. Pour un traitement hydrophile, on utilise des méthacrylates avec des groupes hydroxyles et pour un traitement hydrophobe, on utilise des méthacrylates fluorés.

Le protocole pour réaliser un traitement de surface hydrophile est identique, à la différence près qu'à la place de l'heptadécafluorodécyl méthacrylate, on utilise dans ce cas de l'hydroxyéthyl méthacrylate. Les pourcentages de mélange sont identiques à ceux évoqués précédemment pour les autres composés.

La fabrication d'une telle puce microfluidique possède plusieurs avantages. D'abord, nous venons de voir qu'il est relativement aisé de procéder à un traitement de surface afin de rendre le dispositif hydrophobe ou hydrophile, ce qui élargit considérablement la palette d'applications disponibles. Ensuite, le matériau OSTEMER entièrement réticulé n'est pas perméable comme peut l'être le PDMS. Ainsi, il peut être utilisé pour stocker des gouttes durant une longue période, sans pour autant que celles-ci voient leur volume diminuer par diffusion de l'eau dans le matériau des parois. Enfin, le matériau est un plastique relativement transparent dans le visible, et il est par conséquent possible d'observer le dispositif au microscope.

Cependant, et contrairement au PDMS, le matériau OSTEMER absorbe les longueurs d'onde du domaine UV. C'est pourquoi il n'est pas possible de l'utiliser pour réaliser des mesures de concentration en ligne à l'aide de fibres optiques couplées à un spectrophotomètre.

Après avoir présenté le procédé de fabrication d'une puce microfluidique en OSTEMER avec support en verre, regardons à présent celui permettant de réaliser le dernier type de puce utilisé, à savoir des puces en OSTEMER avec fenêtres en Kapton.

Puce en OSTEMER avec fenêtres en Kapton

Le Kapton est un film de polyimide développé par DuPont restant stable dans une gamme de température allant de -269 à 400°C. Sa structure chimique est représentée sur la Figure II.27.

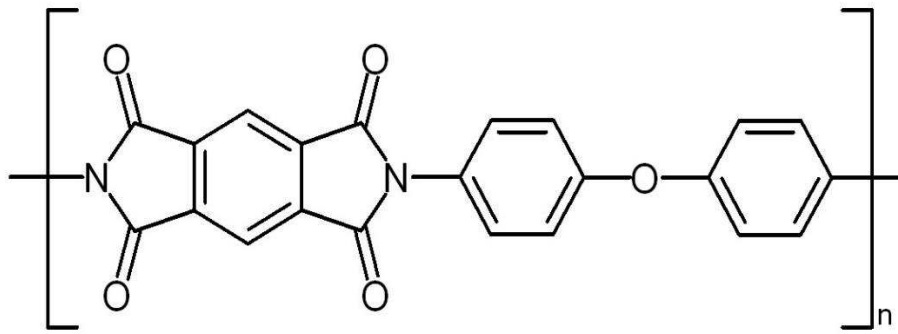
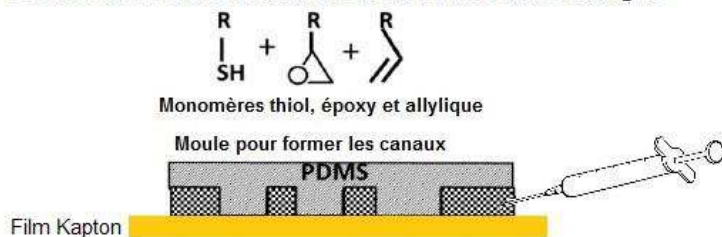


Figure II.27. Représentation de la structure chimique du polyimide constituant les films de Kapton développés par DuPont.

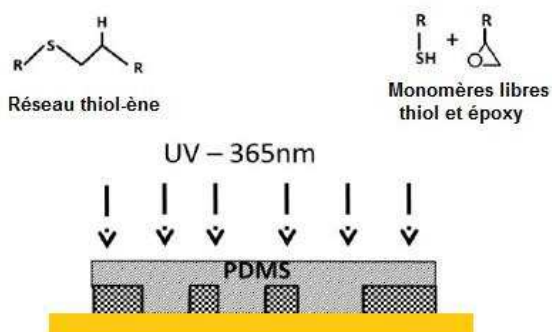
Ce matériau est bien adapté pour réaliser des expériences de diffusion de rayons X utilisant des faisceaux intenses car le Kapton est résistant aux hautes intensités générées par une source de rayonnement synchrotron et il est également quasi transparent aux rayons X. C'est ainsi qu'on le retrouve dans la fabrication de puces microfluidiques afin de réaliser des fenêtres permettant de laisser passer les rayons X et d'étudier les molécules contenues dans ces fenêtres (Barrett et al., 2006b; Otten et al., 2005).

La technique de fabrication de tels dispositifs expérimentaux est sensiblement similaire à celle utilisée pour former des puces en OSTEMER avec support en verre. Néanmoins cette fois, le support est un film de Kapton et plutôt que de déposer une goutte d'OSTEMER et ensuite de venir déposer le moule en PDMS, cette fois le moule en PDMS est au préalable déposé sur le film en Kapton et bien maintenu, puis l'OSTEMER est injecté à l'aide d'une seringue entre le moule en PDMS et le film en Kapton. Ceci a pour but d'éviter la formation d'une fine couche d'OSTEMER au niveau des fenêtres en Kapton qui absorberait les rayons X. Le procédé de traitement de surface hydrophobe sur l'OSTEMER présenté précédemment fonctionne également avec ce dispositif et est donc utilisé pour former des gouttes de phase aqueuse dispersée dans une phase huile. Les avantages d'un tel dispositif microfluidique sont donc sa transparence aux rayons X et sa facilité de traitement de surface. L'inconvénient reste toujours le fait que l'OSTEMER absorbe les UV et qu'il est par conséquent impossible de réaliser des mesures de concentration en ligne avec un tel dispositif.

Etape 1 : Le moule en PDMS est pressé contre le support en Kapton
 L'OSTEMER est inséré entre les deux à l'aide d'une seringue



Etape 2 : L'OSTEMER est exposé pour la première réticulation aux UV pour former un réseau thiol-ène
 Il reste dans l'OSTEMER des monomères thiol en excès et les monomères époxy



Etape 3 : Le moule en PDMS est détaché de la couche d'OSTEMER
 Les groupes thiol et époxy sont présents à la surface



Etape 4 : Le film en Kapton contenant l'OSTEMER est pressé contre un autre film en Kapton
 afin de fermer les canaux et de réaliser des fenêtres en Kapton transparentes aux rayons X.
 Une seconde exposition aux UV permet de rigidifier la structure

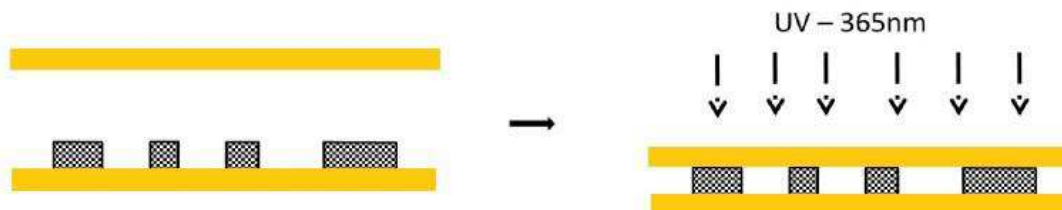


Figure II.28. Procédé de fabrication d'une puce microfluidique en OSTEMER avec fenêtres en Kapton, transparent aux rayons X.

III.2.3.3 Conclusions sur les dispositifs microfluidiques et leur utilisation

Nous venons donc de présenter l'ensemble des procédés de fabrication des dispositifs microfluidiques utilisés dans le cadre de cette thèse. Il est possible de réaliser des puces en PDMS avec un support en verre, ainsi que des puces en OSTEMER avec support en verre ou fenêtres en Kapton. Tous ces dispositifs peuvent subir des traitements de surface afin de les rendre hydrophobes, ce qui permet de générer des gouttes de phase aqueuse, dispersées dans une phase huile sans pour autant que les gouttes ne mouillent les parois. Ils présentent chacun des avantages et des inconvénients ce qui permet de les utiliser ou non pour certaines applications. Ces informations sont résumées dans le Tableau II.8.

Tableau II.8. Avantages et inconvénients des dispositifs microfluidiques développés

Dispositif microfluidique	Avantages	Inconvénients
PDMS/Verre	<ul style="list-style-type: none"> - Peu d'étapes de fabrication ce qui permet de réaliser beaucoup de tests de géométrie en peu de temps - Transparent aux UV ce qui permet d'implémenter des fibres optiques connectées à une source de lumière et un spectrophotomètre pour réaliser des mesures de concentration en ligne 	<ul style="list-style-type: none"> - Matériau poreux qui ne convient pas pour stocker des gouttes longtemps car l'eau des gouttes peut diffuser dans les pores ce qui réduit la taille des gouttes
OSTEMER/Verre	<ul style="list-style-type: none"> - Matériau rigide qui permet de stocker des gouttes sans que l'eau ne diffuse dans les parois - Possibilité de modifier facilement les propriétés de surface pour avoir un matériau hydrophile ou hydrophobe 	<ul style="list-style-type: none"> - Matériau non transparent aux UV ce qui empêche d'y implémenter des fibres optiques pour la mesure de concentration en ligne
OSTEMER/Kapton	<ul style="list-style-type: none"> - Dispositif avec fenêtres en Kapton transparentes aux rayons X et adapté pour réaliser des études de diffusion de rayons X en ligne - Possibilité de modifier facilement les propriétés de surface pour avoir un matériau hydrophile ou hydrophobe 	<ul style="list-style-type: none"> - Matériau non transparent aux UV ce qui empêche d'y implémenter des fibres optiques pour la mesure de concentration en ligne

Afin de répondre aux inconvénients de ces dispositifs, notamment l'impossibilité de réaliser des mesures de concentration en ligne avec les systèmes en OSTEMER, il est possible de réaliser des structures hybrides avec plusieurs parties connectées entre elles. Ainsi, il est possible de générer des gouttes et de mesurer des concentrations à l'aide d'une puce en PDMS/verre et d'envoyer ces gouttes dans une autre puce en OSTEMER/Kapton où elles pourront être exposées aux rayons X. Un exemple de système hybride est présenté dans la partie IV.

Connectiques

Les connectiques sont les éléments permettant aux fluides utilisés de rentrer dans les dispositifs microfluidiques. Pour l'ensemble des dispositifs présentés, la même technique de connectique est employée. C'est une technique simple, rapide, et peu chère qui repose sur l'utilisation d'aiguilles en acier. Nous utilisons pour se faire des aiguilles de 300 μm de diamètre (Sigma-Aldrich) comme celle présentée sur la Figure II.29. Il faut pour cela dissoudre la colle époxy en laissant tremper l'aiguille dans du chloroforme ce qui permet de séparer la partie en plastique et de ne récupérer que l'aiguille en acier.

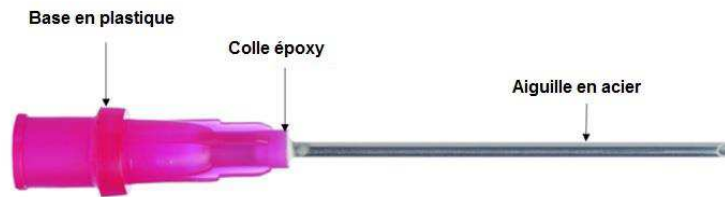


Figure II.29. Aiguille en acier utilisée pour réaliser les connectiques des dispositifs microfluidiques.

Dans les dispositifs microfluidiques, des canaux plus larges (350 μm) sont dessinés au niveau des entrées et des sorties. Les aiguilles sont alors simplement insérées dans ces canaux, puis collées à l'aide de colle époxy pour obtenir un dispositif hermétique avec un volume mort proche de zéro.

Alimentation des puces, contrôle en température et observation

Afin d'envoyer les fluides dans les dispositifs microfluidiques, nous utilisons des pousse-seringues (neMESYS, Cetoni, Allemagne) qui permettent d'ajuster précisément les débits souhaités. Des seringues en verre (SGE gastight et Hamilton gastight 250 μL , 500 μL et 1000 μL) contenant les solutions à injecter y sont positionnées et permettent d'introduire les solutions dans des capillaires en plastiques de diamètre 300 μm , dont on peut choisir la longueur et qui vont jusqu'aux aiguilles collées en entrée de la puce.

La température des puces est contrôlée à l'aide de modules Peltier hautes performances (TE Technology) reliés à un régulateur PID ATEC302 (Accuthermo Technology) et une sonde Pt 100. Les détails des dispositifs utilisés pour l'étude de la nucléation du lysozyme au laboratoire et sur grands instruments seront présentés dans les chapitres III et IV.

Pour caractériser l'écoulement dans les puces (efficacité de mélange, taille des gouttes...) les puces sont placées sous un microscope semi-automatique ZEISS Axioobserver équipé d'une caméra rapide (Phantom Miro 320) d'une résolution 1920x1200 capable d'une vitesse d'acquisition de 1400 images/s (plein capteur).

L'étude des cinétiques de nucléation (chapitre III) est réalisée en plaçant les puces sous un microscope automatique DMI 8 (Leica) équipé d'une caméra sCMOS sensible (PCO Edge 5.5) dotée d'une résolution de 2560x2160 pixel d'une taille de pixel de 6.5 μm et d'une vitesse d'acquisition

de 100 im/s. L'acquisition des images est réalisée à partir du logiciel LASX (Leica) permettant par exemple la réalisation, automatique d'images panoramiques de très haute résolution, de l'ensemble des puces microfluidiques.

Nous avons donc présenté dans cette partie l'ensemble des protéines étudiées, à savoir l'urate oxydase, la glucose isomérase ainsi que le lysozyme, et nous avons également détaillé les procédés de fabrication de trois dispositifs microfluidiques expérimentaux constitués de PDMS et verre, d'OSTERMER et verre, et d'OSTERMER et Kapton. Nous allons dans les parties suivantes nous intéresser aux différentes études qui ont été réalisées avec ces protéines, à l'aide de ces dispositifs expérimentaux.

Chapitre III
ECHELLE MACROSCOPIQUE
CINETIQUES DE NUCLEATION

L'approche cinétique de la nucléation est une approche macroscopique visant à déterminer la vitesse d'apparition de germes cristallins, qui correspond au nombre de germes formés par unité de temps et de volume. Étant donné que la cinétique d'un phénomène est fortement liée au mécanisme dont elle dépend, cette approche, bien que macroscopique, permet d'obtenir des indications sur les mécanismes de nucléation, et ainsi de vérifier si la cinétique est en accord avec celle proposée par la théorie classique de la nucléation ou bien si elle obéit plutôt à un autre mécanisme (Filobelo et al., 2005). En outre, cette approche cinétique permet d'avoir accès à la nature du mécanisme de nucléation, homogène ou hétérogène (Bourgeois et al., 2017).

Comme évoqué dans la revue bibliographique de la première partie de ce mémoire, il est possible de déterminer ces cinétiques à l'aide de mesures de temps d'induction (Teychené and Biscans, 2008), ou de méthodes plus sophistiquées comme la technique de l'émulsion (Turnbull and Cech, 1950) ou celle de cristallisation par lévitation (Herlach et al., 1993; Weber et al., 1994). Plus récemment, avec l'intérêt grandissant pour la microfluidique et notamment sa capacité à générer rapidement un grand nombre de gouttes de composition identique, permettant ainsi de compartimenter les échantillons, de localiser et de confiner les événements de nucléation, et d'obtenir un grand nombre de données, des méthodes reposant sur des modèles de nucléation probabilistes et sur des analyses statistiques ont également vu le jour.

Dans le cadre de cette thèse, déterminer des cinétiques de nucléation présente deux intérêts principaux. Grâce à ces cinétiques, il est possible de déterminer des temps d'induction moyen, où temps nécessaire pour l'apparition d'un cristal. Cette donnée est intéressante pour les expériences de diffusion de rayons X qui seront menées par la suite, dans lesquelles on s'intéresse aux mécanismes de nucléation avant cristallisation. Avoir une idée du temps d'induction nous donnera une gamme de temps à échantillonner pour avoir des informations avant la formation du cristal. Ensuite, la mesure quantitative des cinétiques de nucléation pour des conditions correspondant à différentes coordonnées dans le diagramme de phase pourra donner des informations sur les mécanismes mis en jeu, et vérifier ce qui apparaît dans la littérature, à savoir que la nucléation est en accord avec la théorie classique pour des conditions éloignées de la séparation liquide-liquide, et qu'elle est plutôt composée de deux étapes, lorsque les conditions s'approchent de la séparation liquide-liquide (Sauter et al., 2015b).

Pour déterminer ces cinétiques dans ces travaux, nous avons développé un dispositif expérimental microfluidique monté sur microscope couplé à de l'analyse d'images. Nous avons également utilisé un nouveau modèle de nucléation probabiliste. Dans cette partie, nous présenterons donc dans un premier temps la théorie et les modèles ayant permis de développer le nouveau modèle probabiliste, dans un deuxième temps nous présenterons le dispositif microfluidique pensé et développé pour ces expériences et dans une troisième partie, nous présenterons les expériences réalisées, les résultats obtenus et une discussion quant aux éventuels mécanismes de nucléation mis en relief.

III.1 Théorie et modèles de nucléation probabilistes

III.1.1 Origine du modèle : loi de Poisson et modèle de Pound et La Mer

Le phénomène de nucléation à l'intérieur de plusieurs gouttes indépendantes peut être analysé à l'aide d'un modèle de nucléation probabiliste, que l'on retrouve dans de nombreuses études avec des systèmes microfluidiques. Ce modèle considère l'ensemble des gouttes d'un système comme l'union de deux sous-ensembles : un sous-ensemble constitué de gouttes contenant des sites actifs de nucléation (impuretés), et un sous-ensemble constitué de gouttes dépourvues de telles impuretés. Dans les gouttes dépourvues d'impuretés, seuls des événements de nucléation homogène peuvent se produire alors que dans des gouttes contenant des impuretés, des phénomènes de nucléation homogène et hétérogène peuvent se produire. A partir de ces observations et de ces sous-ensembles, un premier modèle probabiliste de nucléation a été proposé par Pound et La Mer (Pound and Mer, 1952) et utilise seulement 3 paramètres macroscopiques issus de bases théoriques. Le premier paramètre, m , est le nombre moyen de sites actifs de nucléation par goutte dans le système constituant l'ensemble des gouttes. Avec l'hypothèse que les sites actifs de nucléation sont tous identiques et qu'ils peuvent nucléer indépendamment les uns des autres, le modèle probabiliste considère que la nucléation à partir d'un site actif possède une vitesse unique de nucléation k , le second paramètre du modèle, quel que soit le site considéré. Le troisième et dernier paramètre du modèle est la vitesse de nucléation homogène k_0 , qui s'applique à la nucléation d'un cristal non catalysée par un site actif.

Dans un système microfluidique générant un grand nombre de gouttes, comme ceux présentés dans la partie I.3.2.3, les gouttes sont indépendantes les unes des autres, si bien que pour décrire les événements de nucléation qui interviennent dans les gouttes, il est possible d'envisager une loi de Poisson (Poisson, 1837). Cette loi de probabilité discrète décrit le nombre d'événements se produisant dans un laps de temps fixé, si ces événements se produisent avec une fréquence moyenne connue et indépendamment du temps écoulé depuis l'événement précédent. Si le nombre moyen d'occurrences de l'événement est noté λ , alors la probabilité qu'il existe i occurrences de l'événement pendant la durée considérée s'exprime avec la densité de probabilité de la distribution de Poisson $dpois$:

$$dpois(i, \lambda) = \frac{\lambda^i}{i!} e^{-\lambda} \quad \text{Eq. III-1}$$

Les sites actifs de nucléation étant aléatoirement répartis dans l'ensemble des gouttes, Pound et La Mer ont proposé de modéliser le pourcentage de gouttes contenant p sites actifs de nucléation à l'aide de la loi de Poisson :

$$\frac{N_p}{N_T} = dpois(p, m) = \frac{m^p}{p!} e^{-m} \quad \text{Eq. III-2}$$

avec :

- N_T : le nombre total de gouttes du système
- N_p : le nombre de gouttes contenant p sites actifs de nucléation dans le système
- m : le nombre moyen de sites actifs par goutte dans le système

En prenant $p = 0$, il est possible d'obtenir la fraction f_0 de gouttes ne contenant pas de sites actifs de nucléation :

$$f_0 = \frac{N_0}{N_T} = dpois(0, m) = e^{-m} \quad \text{Eq. III-3}$$

Par conséquent, la fraction de gouttes contenant des sites actifs de nucléation est : $1 - e^{-m}$.

Au cours d'une période durant t , le nombre moyen d'évènements de nucléation intervenant dans des gouttes dépourvues de site actif de nucléation s'exprime à l'aide de la fréquence de nucléation homogène et est de $k_0 t$. Ainsi, dans une goutte dépourvue de site actif de nucléation, la probabilité que i évènements de nucléation interviennent peut s'exprimer également comme une densité de probabilité de la loi de Poisson :

$$dpois(i, k_0 t) = \frac{(k_0 t)^i}{i!} e^{-k_0 t} \quad \text{Eq. III-4}$$

Alors, en combinant la probabilité qu'une goutte ne contienne pas de site actif, et celle qu'une telle goutte contienne i évènements de nucléation, il est possible d'obtenir le nombre de gouttes $N_0(i, t)$ du système qui ne possèdent pas de site actif de nucléation et qui contiennent i nucléi à un temps t :

$$N_0(i, t) = N_T \times dpois(0, m) \times dpois(i, k_0 t) \quad \text{Eq. III-5}$$

Le nombre d'évènements de nucléation se produisant sur un site actif de nucléation s'exprime kt donc pour une goutte contenant p sites actifs de nucléation, le nombre total d'évènements de nucléation est pkt . En affirmant ceci, Pound et La Mer font l'hypothèse que pour une goutte présentant un ou plusieurs sites actifs de nucléation, la nucléation ne peut se produire que sur ces sites actifs et pas de façon homogène en solution (auquel cas la vitesse de nucléation serait $k_0 t$). Ainsi, de la même manière que pour une goutte ne contenant pas de site actif de nucléation, on peut exprimer le nombre de gouttes $N_p(i, t)$ possédant p sites actifs de nucléation et i nucléi à un temps t :

$$N_p(i, t) = N_T \times dpois(p, m) \times dpois(i, pkt) \quad \text{Eq. III-6}$$

Finalement, il est possible d'obtenir le nombre total de gouttes $N_+(i, t)$ contenant un nombre supérieur ou égal à 1 de sites actifs de nucléation et possédant i nucléi à un temps t en sommant l'équation **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** sur l'ensemble des possibilités pour le nombre de sites actifs de nucléation. Physiquement, les gouttes ne peuvent pas posséder un nombre infini de sites actifs de nucléation, mais mathématiquement, il n'est pas incohérent d'envisager une somme infinie, le terme $dpois(p, m)$ devenant nul lorsque la valeur de p s'éloigne trop de celle de m . On a alors :

$$N_+(i, t) = \sum_{p=1}^{+\infty} N_p(i, t) = \sum_{p=1}^{+\infty} (N_T \times dpois(p, m) \times dpois(i, pkt)) \quad \text{Eq. III-7}$$

Finalement, la fraction totale de gouttes $f_i(t)$ possédant i nucléi à un temps t peut s'exprimer :

$$f_i(t) = \frac{N_0(i, t) + N_+(i, t)}{N_T} \quad \text{Eq. III-8}$$

$$f_i(t) = dpois(0, m) \times dpois(i, k_0 t) + \sum_{p=1}^{+\infty} (dpois(p, m) \times dpois(i, pkt)) \quad \text{Eq. III-9}$$

En explicitant les fonctions de densité de probabilité de Poisson, on a alors :

$$f_i(t) = e^{-m} \times \frac{(k_0 t)^i}{i!} e^{-k_0 t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times \frac{(pkt)^i}{i!} e^{-pkt} \right] \quad \text{Eq. III-10}$$

Théoriquement, cette équation permet d'obtenir à l'aide des paramètres du modèle m , k_0 et k , l'ensemble des fractions de gouttes $f_i(t)$ possédant i nucléi en fonction du temps. Néanmoins, en effectuant cela, une hypothèse importante est réalisée. En effet, on considère pour cela que les vitesses de nucléation k_0 et k sont indépendantes du temps. Ces vitesses dépendent de la température et de la concentration. Dans une expérience où sont précisément contrôlées la température et les concentrations en protéine et en agent de cristallisation, il est possible d'avoir des vitesses de nucléation fixes, tant que les concentrations n'évoluent pas. Cependant, une fois un premier évènement de nucléation intervenu dans une goutte, des monomères se sont assemblés, si bien que la concentration de protéines en solution a diminué. Cela engendre une diminution de la vitesse de nucléation pour les gouttes ayant présenté un ou plusieurs évènements de nucléation, ainsi l'utilisation de la formule de l'équation Eq. III-11 n'est pas rigoureuse. En revanche, cette formule est applicable aux gouttes n'ayant pas encore subi d'évènement de nucléation ($i = 0$), car les concentrations sont fixes. C'est pourquoi, il est possible de calculer la fraction totale de gouttes n'ayant pas nucléées $f_0(t)$ à un temps t grâce à la formule suivante :

$$f_0(t) = dpois(0, m) \times dpois(0, k_0 t) + \sum_{p=1}^{+\infty} (dpois(p, m) \times dpois(0, p k t)) \quad \text{Eq. III-12}$$

En on obtient en explicitant les fonctions de densité de probabilité de Poisson :

$$f_0(t) = e^{-m} \times e^{-k_0 t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left(\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times e^{-p k t} \right) \quad \text{Eq. III-13}$$

En ajoutant le terme correspondant à $p = 0$ à la somme et en le soustrayant on a alors :

$$f_0(t) = e^{-m} \times e^{-k_0 t} + \sum_{p=0}^{+\infty} \left(\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times e^{-p k t} \right) - e^{-m} \quad \text{Eq. III-14}$$

En factorisant par e^{-m} :

$$f_0(t) = e^{-m} \times \left[e^{-k_0 t} + \sum_{p=0}^{+\infty} \frac{(m e^{-k t})^p}{p!} - 1 \right] \quad \text{Eq. III-15}$$

Or le développement en série de la fonction exponentielle donne, pour tout x nombre réel et n entier naturel :

$$\exp(x) = \sum_{n=0}^{+\infty} \frac{x^n}{n!} \quad \text{Eq. III-16}$$

Donc à l'aide de cette définition, nous pouvons exprimer l'équation Eq. III-15 pour finalement retrouver l'expression proposée par Pound et La Mer (Pound and Mer, 1952) :

$$f_0(t) = e^{-m} \times [e^{-k_0 t} + \exp(m e^{-k t}) - 1] \quad \text{Eq. III-17}$$

Pour un système microfluidique comme ceux présentés dans la partie I.3.2.3, contenant un grand nombre de gouttes indépendantes, de composition identique, il est possible d'observer le nombre de gouttes contenant des cristaux en fonction du temps, et celles n'en contenant pas, et donc de connaître la fraction de gouttes ne contenant pas de cristaux $f_0(t)$ à un temps donné. Il est ensuite possible d'effectuer une régression afin d'obtenir les différents paramètres du modèle cinétique, le nombre moyen de sites actifs de nucléation par goutte, m , la vitesse de nucléation sur un site actif de nucléation (impureté) k , et la vitesse de nucléation en l'absence de site actif de nucléation k_0 . Une fois ces paramètres obtenus, l'équation Eq. III-18 permet de calculer l'évolution en fonction du temps des fractions de gouttes contenant un ou plusieurs nucléi.

Ce modèle est donc intéressant pour obtenir les paramètres de cinétique de nucléation ainsi que des fractions de gouttes présentant un ou plusieurs nucléi, mais présente néanmoins l'hypothèse selon laquelle la nucléation dans une goutte présentant au moins un site actif de nucléation va forcément se faire sur un site actif de nucléation et non de façon homogène en solution. De plus, la détermination des fractions de gouttes présentant un ou plusieurs nucléi repose sur l'hypothèse que les vitesses de nucléation sont indépendantes du temps, donc qu'une goutte ayant connu un évènement de nucléation à un temps t peut connaître d'autres évènements de nucléation à des temps ultérieurs, avec les mêmes vitesses de nucléation. Cela revient à faire l'hypothèse que l'état de sursaturation reste constant dans les gouttes, ou que la vitesse de croissance du cristal est nulle. Un schéma descriptif du modèle de nucléation proposé par Pound et La Mer est proposé sur la Figure III.1.

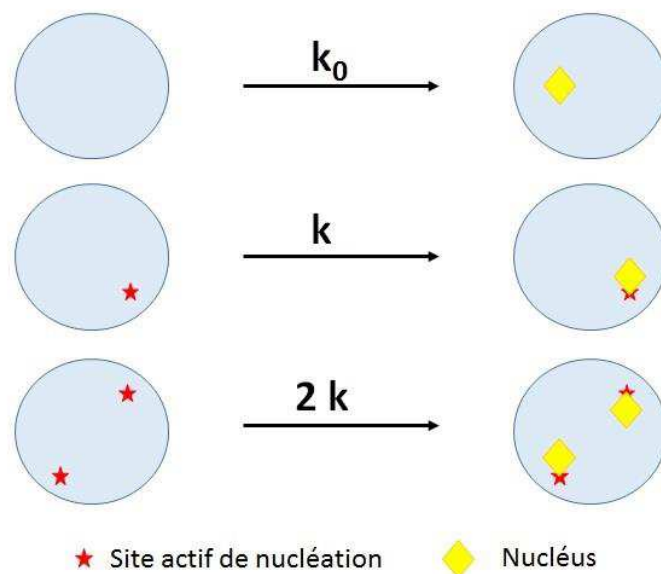


Figure III.1. Scénarii possibles de cristallisation et vitesses de nucléation respectives en accord avec le modèle de nucléation de Pound et La Mer. La vitesse de nucléation dans une goutte ne présentant pas de site actif de nucléation est k_0 . La vitesse de nucléation dans une goutte possédant un site actif de nucléation est k . Pour une goutte possédant plusieurs sites actifs, la vitesse est proportionnelle à k et aux nombres de sites actifs. Aucune nucléation homogène, de vitesse k_0 , n'est envisagée dans une goutte présentant au moins un site actif de nucléation.

Devant l'impossibilité pour un germe de nucléer de façon homogène en solution dans une goutte présentant une impureté, d'autres modèles ont vu le jour, comme celui proposé par Akella et Fraden (Akella et al., 2014).

III.1.2 Modèle d'Akella et Fraden

Le groupe de Seth Fraden a proposé un modèle (Akella et al., 2014) qui n'utilise pas l'hypothèse de Pound et La Mer selon laquelle une goutte présentant un site actif de nucléation ne peut nucléer que de façon hétérogène, sur ce site de nucléation, avec une vitesse k . Ainsi, ce groupe considère qu'une goutte présentant un site actif peut nucléer de façon hétérogène ou de façon homogène en solution. L'hypothèse émise est donc que, pouvant nucléer de deux façons différentes, le nombre

moyen d'évènements de nucléation qui intervient dans une goutte présentant p sites actifs de nucléation, pendant une période de temps t est la contribution de la nucléation homogène et hétérogène et peut donc s'exprimer $(k_0 + pk)t$ avec k_0 la vitesse de nucléation homogène et k la vitesse de nucléation sur un site actif de nucléation. En faisant l'analogie avec le développement du modèle de Pound et La Mer présenté dans la partie III.1.1, on peut exprimer la fraction totale de gouttes $f_i(t)$ possédant i nucléi à un temps t de manière similaire à l'équation Eq. III-12 et on a dans ce cas :

$$f_i(t) = dpois(0, m) \times dpois(i, k_0 t) + \sum_{p=1}^{+\infty} (dpois(p, m) \times dpois(i, (k_0 + pk)t)) \quad \text{Eq. III-19}$$

Ou en explicitant les fonctions de densité de probabilité de Poisson :

$$f_i(t) = e^{-m} \times \frac{(k_0 t)^i}{i!} e^{-k_0 t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times \frac{[(k_0 + pk)t]^i}{i!} e^{-(k_0 + pk)t} \right] \quad \text{Eq. III-20}$$

Avec toujours m le nombre moyen de sites actifs de nucléation par goutte. Une fois de plus, une telle expression repose sur l'hypothèse que les vitesses de nucléation sont indépendantes du nombre d'évènements de nucléation ayant pu se produire dans une goutte.

Une fois de plus, il est courant d'utiliser l'évolution de la fraction de gouttes $f_0(t)$ n'ayant pas encore nucléé en fonction du temps afin de déterminer les paramètres du modèle par régression :

$$f_0(t) = e^{-m} \times e^{-k_0 t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left(\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times e^{-(k_0 + pk)t} \right) \quad \text{Eq. III-21}$$

On obtient, en factorisant par $e^{-m} e^{-k_0 t}$:

$$f_0(t) = e^{-m} e^{-k_0 t} \left[1 + \sum_{p=1}^{+\infty} \left(\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times e^{-pkt} \right) \right] \quad \text{Eq. III-22}$$

En ajoutant le terme correspondant à $p = 0$ à la somme et en le soustrayant on a alors :

$$f_0(t) = e^{-m} e^{-k_0 t} \left[1 + \sum_{p=0}^{+\infty} \left(\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times e^{-pkt} \right) - 1 \right] \quad \text{Eq. III-23}$$

Et avec le développement en série de la fonction exponentielle rappelé avec l'équation Eq. III-16 on retombe sur l'expression proposé par Akella et Fraden :

$$f_0(t) = e^{-m} \times e^{-k_0 t} \times \exp(m e^{-kt}) \quad \text{Eq. III-24}$$

De manière similaire au modèle de Pound et La Mer, ce modèle permet de déterminer les paramètres cinétiques m , k_0 et k en observant l'évolution de la fraction de gouttes n'ayant pas nucléé en fonction du temps et de réaliser une régression de l'équation Eq. III-25. Une fois ces paramètres obtenus, il est à nouveau possible de calculer la fraction de gouttes ayant subi un nombre d'évènements de nucléation donné pendant un temps donné, à l'aide de l'équation Eq. III-26. Cette opération est de nouveau réalisable grâce à l'hypothèse selon laquelle les paramètres cinétiques déterminés ne dépendent pas du temps, et du nombre d'évènements de nucléation ayant eu lieu dans les gouttes.

Ce modèle, plus complet que celui de Pound et La Mer offre la possibilité aux gouttes possédant des sites actifs de nucléation de nucléer de façon homogène. Il est représenté de façon schématique sur la Figure III.2.

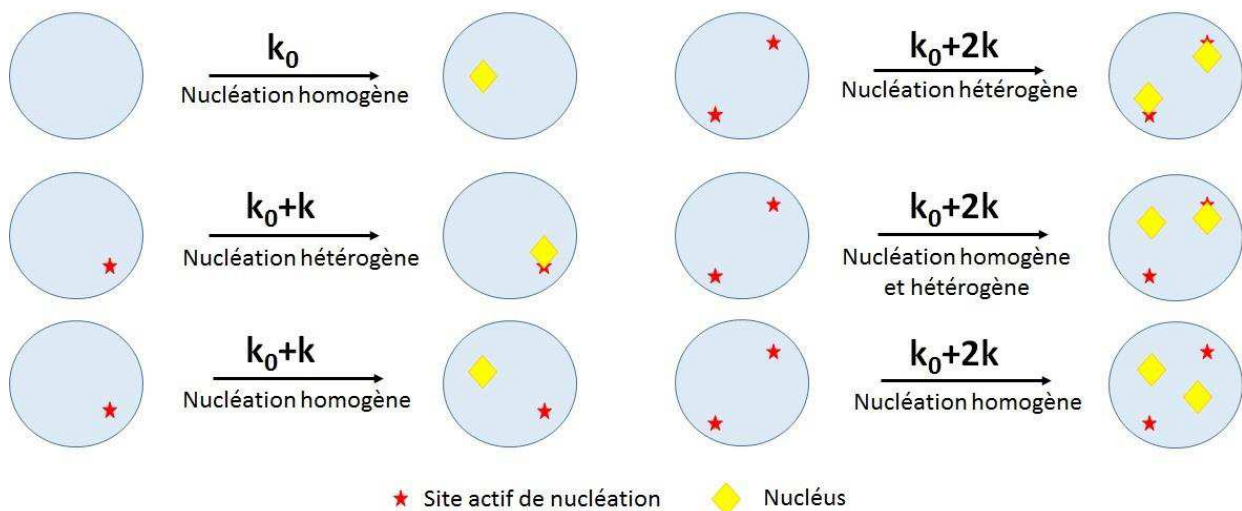


Figure III.2. Scénarii possible de cristallisation et vitesses de nucléation respectives en accord avec le modèle de Akella et Fraden (Akella et al., 2014). La vitesse de nucléation dans une goutte ne présentant pas de site actif de nucléation est k_0 . La vitesse de nucléation dans une goutte possédant un site actif de nucléation est k_0+k . Pour une goutte possédant plusieurs sites actifs, la vitesse est la somme de k_0 et du produit du nombre de sites actifs par k . Les vitesses de nucléation sont indépendantes du mécanisme de nucléation, que celle-ci soit homogène et/ou hétérogène.

Néanmoins, il présente une approximation. En assignant comme unique vitesse de nucléation ($k_0 + pk$) aux gouttes présentant des sites actifs de nucléation, ce modèle fait l'hypothèse que la vitesse de nucléation pour ces gouttes est identique que la nucléation se fasse de manière homogène, ou hétérogène. En réalité, il n'y a aucune raison que ces deux mécanismes possède la même vitesse. Cette approximation n'a pas de réelle importance pour prédire les variations de $f_r(t)$ dans le cas où $k \gg k_0$, car on retombe dans ce cas sur le modèle de Pound et La Mer, mais les différences peuvent devenir importantes lorsque l'écart entre les vitesses de nucléation homogène et hétérogène diminue, conduisant alors à des estimations incorrectes des paramètres de nucléation à partir des mesures de $f_0(t)$.

Pour pallier ce problème, dans l'éventualité où les vitesses de nucléation homogène et hétérogène seraient proches, un autre modèle a été plus récemment proposé (Bourgeois et al., 2017).

III.1.3 Modèle de Bourgeois et al.

Plus récemment, un modèle plus général que ceux évoqués précédemment, qui s'affranchit des hypothèses simplificatrices a été proposé (Bourgeois et al., 2017). En effet, contrairement au modèle de Pound et La Mer, il considère que des gouttes contenant des sites actifs de nucléation peuvent connaître des événements de nucléation homogène. Et contrairement au modèle de Akella et Fraden, pour des gouttes possédant des sites actifs de nucléation, les vitesses de nucléation dépendent du mécanisme considéré. La vitesse de nucléation homogène est toujours notée k_0 et la vitesse de nucléation sur un site hétérogène k .

Pour une goutte contenant p sites actifs de nucléation, ce modèle considère qu'un événement de nucléation à l'intérieur d'une telle goutte est une variable aléatoire de Bernoulli avec une probabilité $q = \frac{k_0}{k_0 + pk}$ pour la nucléation homogène et $1 - q = \frac{pk}{k_0 + pk}$ pour la nucléation hétérogène. Ainsi, la probabilité que r événements de nucléation se produisent dans une telle goutte est :

$$\frac{k_0}{k_0 + pk} \times dpois(r, k_0 t) + \frac{pk}{k_0 + pk} \times dpois(r, p k t) \quad \text{Eq. III-27}$$

Ainsi, par analogie avec le développement du modèle de Pound et La Mer présenté précédemment, il est possible une nouvelle fois d'exprimer la fraction totale de gouttes $f_i(t)$ présentant i nucléi à un temps t :

$$f_i(t) = dpois(0, m) dpois(i, k_0 t) + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[dpois(p, m) \times \left(\frac{k_0}{k_0 + pk} \times dpois(i, k_0 t) + \frac{pk}{k_0 + pk} \times dpois(i, p k t) \right) \right] \quad \text{Eq. III-28}$$

Cette équation est l'équation principale permettant de prédire l'état d'un système microfluidique à n'importe quel temps t à l'aide du modèle présenté ici. Il est possible d'avoir une expression analytique semblable à celles présentées précédemment en explicitant les fonctions de densité de probabilité de Poisson pour obtenir :

$$\begin{aligned}
 f_i(t) = & e^{-m} \frac{(k_0 t)^i}{i!} e^{-k_0 t} \\
 & + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[\frac{m^p}{p!} e^{-m} \right. \\
 & \left. \times \left[\left(\frac{k_0}{k_0 + pk} \right) \frac{(k_0 t)^i}{i!} e^{-k_0 t} + \left(\frac{pk}{k_0 + pk} \right) \frac{(pkt)^i}{i!} e^{-pkt} \right] \right]
 \end{aligned}
 \tag{Eq. III-29}$$

Cette expression permet donc de calculer la proportion totale de gouttes présentant i nucléi à un temps t donc décrit l'aspect macroscopique du système microfluidique à l'aide des trois paramètres $m, k_0,$ et k . Elle repose néanmoins également sur l'hypothèse que les vitesses de nucléation sont indépendantes du temps et des évènements de nucléation ayant déjà eu lieu dans des gouttes. Il est possible de déterminer ces paramètres une fois de plus à l'aide de l'évolution en fonction du temps de la fraction de gouttes n'ayant pas encore nucléé $f_0(t)$ qui s'obtient en prenant $i = 0$ dans l'équation Eq. III-30 :

$$f_0(t) = e^{-m} e^{-k_0 t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times \left[\left(\frac{k_0}{k_0 + pk} \right) e^{-k_0 t} + \left(\frac{pk}{k_0 + pk} \right) e^{-pkt} \right] \right]
 \tag{Eq. III-31}$$

Contrairement aux modèles précédents, l'utilisation ici d'une variable de Bernoulli rend impossible la simplification de cette équation. Néanmoins, cela reste une expression analytique et une régression de cette équation sur des données expérimentales permet alors de déterminer les paramètres de la cinétique de nucléation $m, k_0,$ et k . Une fois ces paramètres déterminés, il est à nouveau possible de décrire à tout temps t l'état du système microfluidique à l'aide de l'équation générale Eq. III-29.

Ce modèle est donc différent des deux autres précédemment évoqué car pour les gouttes possédant des sites actifs de nucléation, les vitesses de nucléation sont pondérées par un variable aléatoire de Bernoulli qui reflète la probabilité qu'une telle goutte nucléée de façon homogène, ou hétérogène. Ce modèle est représenté de façon schématique sur la Figure III.3

On note que lorsque $k \gg k_0$ ce modèle correspond également à celui proposé par Pound et La Mer, ce qui est compréhensible d'un point de vue physique dans le sens où il est très peu probable dans ce cas que dans une goutte présentant une impureté, la nucléation se passe de façon homogène, la vitesse de nucléation hétérogène étant bien plus rapide.

Nous venons donc de présenter les trois modèles de nucléation probabilistes, tous issus des premiers travaux réalisés dans le domaine par Pound et La Mer. Le plus récent, et celui recouvrant le plus de cas probables, comme la possibilité de nucléer de façon homogène dans une goutte présentant une impureté avec une vitesse différente de la nucléation hétérogène est celui proposé par Bourgeois et al.. C'est pourquoi c'est le modèle que nous retiendrons pour l'analyse des résultats expérimentaux présentés par la suite. Mais intéressons-nous tout d'abord, au système

microfluidique pensé et développé dans le but de réaliser ces expériences de mesures de cinétiques de nucléation et d'obtenir des informations sur les éventuels mécanismes mis en relief.

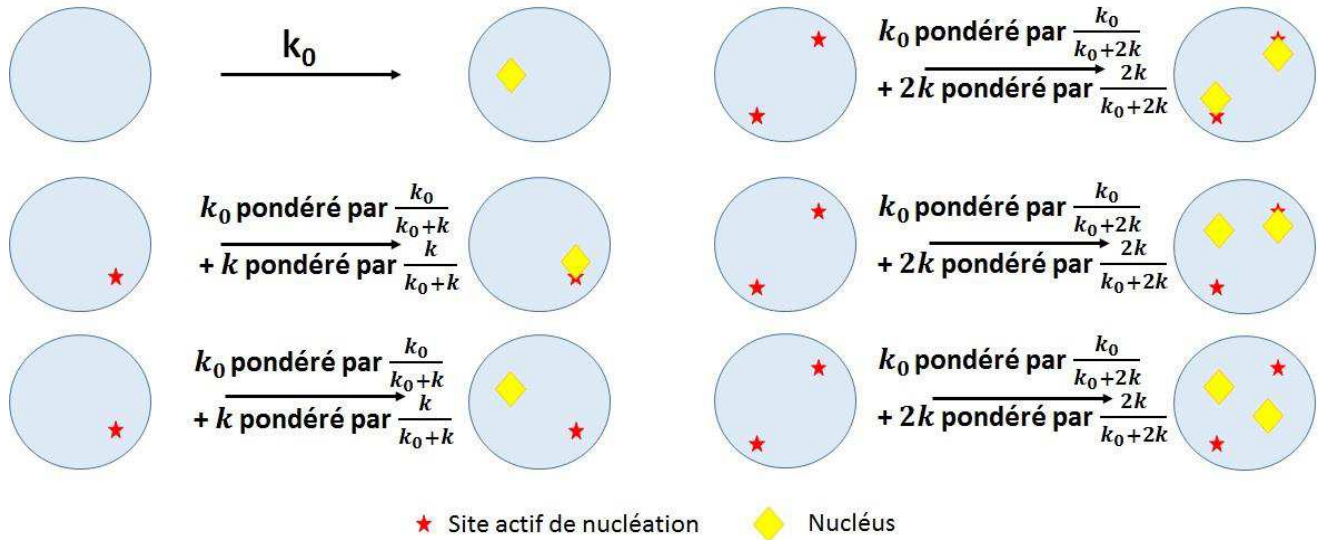


Figure III.3. Scénarii possible de cristallisation et vitesses de nucléation respectives en accord avec le modèle de Bourgeois (Bourgeois et al., 2017). La vitesse de nucléation dans une goutte ne présentant pas de site actif de nucléation est k_0 . La vitesse de nucléation dans une goutte possédant un site actif de nucléation est la somme d'une contribution de nucléation homogène et de nucléation hétérogène toutes deux pondérées de façon différente pour tenir compte des différences entre les mécanismes de nucléation.

III.2 Présentation du système microfluidique

Le système microfluidique pensé et construit au laboratoire a pour objectif de déterminer des cinétiques de nucléation pour un système constitué de lysozyme et de sel NaCl à différentes températures. Il doit pour cela répondre à plusieurs critères : il doit permettre de mélanger efficacement des flux de lysozyme et de sel afin d'avoir des concentrations stables et identiques pour toutes les gouttes du système, il doit permettre de stocker dans le temps une grande quantité de gouttes identiques et il doit pouvoir être régulé précisément en température. De plus, la zone de stockage doit être aussi petite que possible afin, d'une part d'être observée sous microscope, mais également que le temps de ballayage de la puce microfluidique à l'aide de la platine motorisée soit inférieur au temps caractéristique de la nucléation la plus rapide (par exemple inférieur à $1/k$). Pour ce faire, plusieurs étapes ont été nécessaires et sont présentées ici.

III.2.1 Choix des matériaux pour la puce microfluidique

La première partie du système microfluidique est la puce microfluidique en elle-même. C'est à l'intérieur de celle-ci que nous allons mélanger des fluides et stocker un grand nombre de gouttes que nous observerons au cours du temps. La première étape de conception a donc été le choix de matériaux utilisés pour la fabrication de la puce sachant qu'ils doivent répondre à plusieurs critères importants :

- Ils doivent être transparents afin de pouvoir observer les gouttes à l'intérieur de la puce.
- Ils ne doivent pas être poreux ou perméable, auquel cas l'eau des gouttes pourraient diffuser dans les pores des matériaux ce qui réduirait la taille des gouttes.
- Il faut pouvoir facilement modifier leurs propriétés de surface pour s'assurer d'une bonne stabilité des écoulements

Au vu des différents matériaux présentés dans la littérature et de leurs propriétés respectives, évoquées dans la partie II.2, il semble que la technologie de puce la plus appropriée soit celle constituée du polymère OSTEMER sur un support en verre. En effet, nous avons vu que l'OSTEMER (tout comme le verre) était transparent dans le visible rendant possible l'observation des écoulements et des gouttes au microscope, que contrairement au PDMS, il n'est pas perméable à l'eau, et qu'il est facile de modifier ses propriétés de surface pour le rendre hydrophobe ou hydrophile. C'est pourquoi nous avons choisi ces matériaux pour la fabrication de la puce microfluidique. Le procédé de fabrication d'une telle puce est à retrouver dans la partie II.2.3.2. Une fois les matériaux de fabrication choisis, il a fallu penser au design de la puce.

III.2.2 Design de la puce

Le design de la puce devait répondre à plusieurs critères également. Il devait permettre d'insérer deux solutions différentes : une solution contenant du sel NaCl et une solution de lysozyme. Il devait ensuite être capable de bien mélanger ces deux solutions afin d'obtenir des débits stables et des concentrations fixes en sel et en protéine. Enfin, il devait comprendre une grande zone de stockage afin de stocker plusieurs centaines de gouttes. Après plusieurs tentatives notamment

concernant la zone de stockage des gouttes (Laval et al., 2009; Teychené and Biscans, 2012), le design de vannes capillaires (Sun et al., 2011), ou encore de pièges capillaires (Dangla et al., 2011), le design final s'est finalement porté sur celui représenté sur la Figure III.4 qui représente le masque utilisé dans la première étape de fabrication de la puce, à savoir la fabrication du moule rigide en film sec par photolithographie. Les différentes parties de ce design permettant de réaliser les opérations évoquées précédemment (insertion et mélange de fluides, stockage de gouttes) sont explicitées dans les parties suivantes.

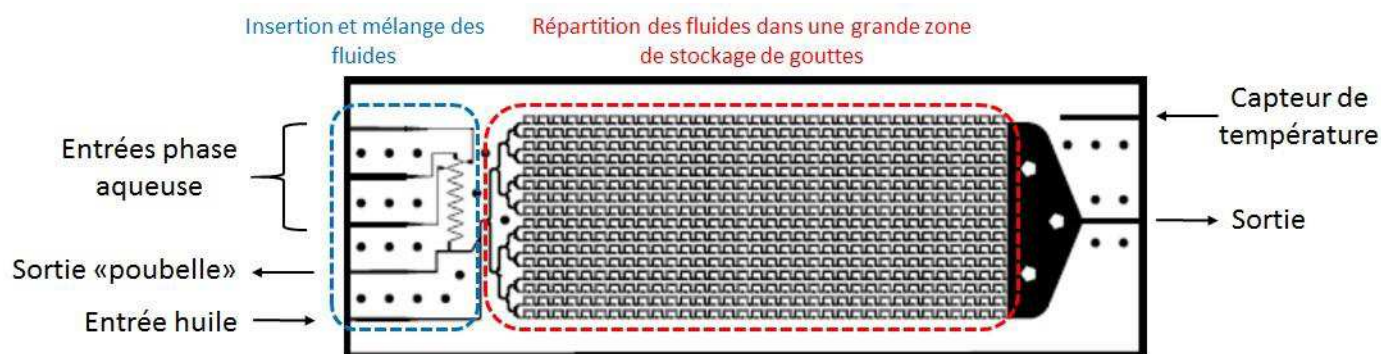


Figure III.4. Représentation schématique du design de la puce microfluidique. La partie en bleu correspond à la zone d'insertion et de mélange des fluides. La zone en rouge représente la zone de stockage des gouttes.

III.2.2.1 Insertion des fluides et zone de mélange

La zone d'insertion et de mélange des fluides sur la partie gauche de la puce microfluidique contient 4 entrées (3 entrées pour la phase aqueuse, 1 entrée pour l'huile) et une sortie. La puce est remplie à l'aide d'écoulements monophasiques, ce qui signifie que dans un premier temps, seules les entrées de phase aqueuse sont utilisées afin de générer un grand volume de solution contenant de la protéine et du sel, et après un certain temps, ces entrées sont fermées et de l'huile, immiscible avec la phase aqueuse, est injectée afin de faire avancer le grand volume de phase aqueuse. La sortie «poubelle» est utilisée pour éliminer les fluides lorsque les régimes d'écoulement ne sont pas stables. On l'ouvre alors au début, lorsque les débits en solutions aqueuses ne sont pas stables, puis une fois la stabilité d'écoulement obtenue, on la ferme pour envoyer la solution vers la zone de stockage. Une fois la solution aqueuse envoyée, on ouvre à nouveau la sortie poubelle puis on arrête les débits de phase aqueuse au profit d'un débit pour l'huile. Lorsque l'huile a chassé la solution aqueuse résiduelle vers la poubelle, on peut fermer cette sortie pour envoyer l'huile vers la zone de stockage et pousser la solution aqueuse. Le fait d'utiliser des écoulements monophasiques (et non de la microfluidique de gouttes) implique que le mélange des fluides de la phase aqueuse se fait uniquement par diffusion. Il convient donc de s'assurer que ce mélange est efficace et qu'il permet d'obtenir rapidement une solution homogène qui sera envoyée dans la zone de stockage. Pour améliorer la vitesse de mélange, nous utilisons dans cette puce microfluidique une géométrie en zigzag (Mengeaud et al., 2002). Nous utilisons deux entrées pour la solution de sel qui vont venir encadrer la solution de protéine insérée au milieu ce qui a pour effet d'améliorer la vitesse de mélange en créant deux interfaces de diffusion. Pour vérifier la vitesse du mélange dans une telle géométrie, des essais ont été réalisés en utilisant

de l'eau pour imiter la solution de sel et un colorant pour la solution de protéine. Des mesures colorimétriques ont alors permis de vérifier le moment où la solution devient homogène. Une image représentant une recombinaison de trois photographies au niveau du serpentin de mélange lors d'un de ces essais est présenté sur la Figure III.5. Ces essais reposent sur la détermination du niveau de gris dans les canaux du serpentin, et sur la comparaison avec le niveau de gris initial du colorant et le niveau de gris de référence, celui plus loin dans la puce, lorsqu'on est sûr que la solution est bien homogène. Pour avoir des données quantitatives, il est donc intéressant d'introduire plusieurs variables, que l'on peut retrouver également sur la Figure III.5 :

- x_0 : niveau de gris initial du colorant, pris avant le mélange
- $x_{réf}$: niveau de gris de référence, pour une solution homogène, plus loin dans la puce
- x_n : niveau de gris au milieu du n-ième canal du serpentin

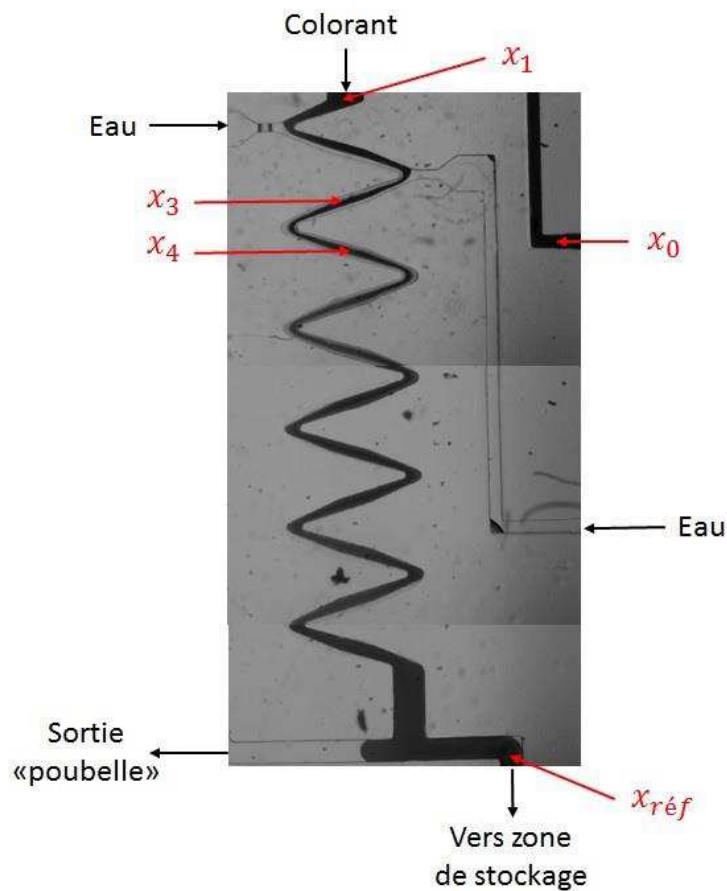


Figure III.5. Recombinaison de trois photographies au niveau de la zone de mélange lors d'un test de vitesse de mélange. Le colorant est inséré entre deux entrées d'eau pour créer deux interfaces de diffusion. Le serpentin (de largeur $50 \mu\text{m}$) a pour but d'augmenter la vitesse de mélange. On aperçoit ici des interfaces lors des trois premières sections de serpentin, qui disparaissent par la suite, laissant supposer une homogénéisation de la solution. On retrouve aussi les différentes variables de niveau de gris utilisées pour les mesures quantitatives.

Il est alors possible, à partir de ces variables, d'introduire le facteur permettant de mesurer la qualité du mélange, l'écart type du niveau de gris normalisé χ (Sarrazin et al., 2007) :

$$\chi = \frac{x_n - x_{réf}}{x_0 - x_{réf}} \quad \text{Eq. III-32}$$

La valeur de ce paramètre, comprise entre 1 et 0, est alors représentative de la qualité du mélange : une valeur de 1 indique que la solution au milieu du canal n est identique au colorant pur, donc qu'aucun mélange n'est réalisé, à l'inverse, une valeur de 0 indique que la solution au milieu du canal n est identique à la solution de référence obtenue lorsque la solution est homogène.

Nous avons donc mesuré l'évolution de ce paramètre en fonction du numéro de canal dans le serpentin avec différents débits pour les solutions de la phase aqueuse afin de s'assurer d'un mélange assez rapide. Pour avoir une stabilité du mélange et des débits nous avons utilisé des débits identiques pour l'ensemble des entrées de la phase aqueuse. La gamme de débits étudiée s'étend de $8\mu\text{l}/\text{min}$ à $0.5\mu\text{l}/\text{min}$ pour chaque fluide, une gamme de débits totaux variant de 24 à $1,5\mu\text{l}/\text{min}$.

L'évolution du paramètre de mélange en fonction du numéro de canal du serpentin est présenté sur la Figure III.6 pour trois conditions de mélange.

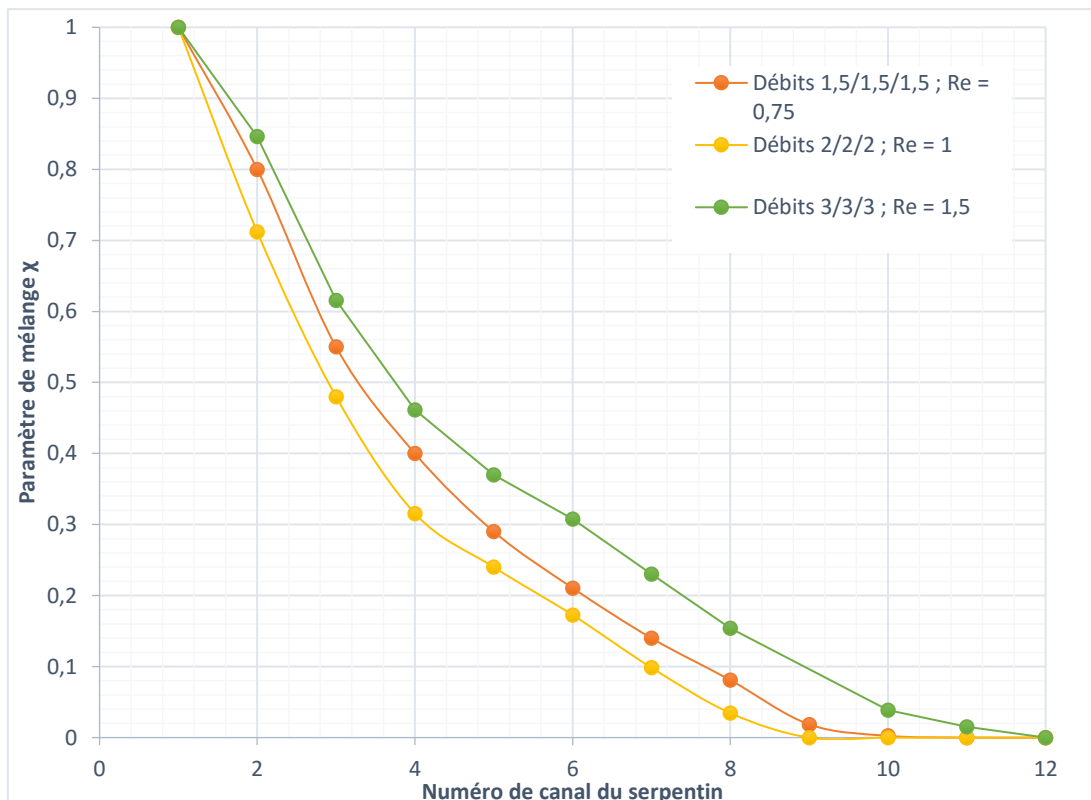


Figure III.6. Evolution du paramètre de mélange en fonction du numéro de canal pour différents débits de phase aqueuse. Pour un débit total de $9\mu\text{L}/\text{min}$, le mélange est optimal au niveau du 12^{ème} canal. Pour un débit total de $6\mu\text{L}/\text{min}$, le mélange est optimal au niveau du 9^{ème} canal et pour un débit total de $4,5\mu\text{L}/\text{min}$, il est optimal au niveau du 10^{ème} canal.

Il apparaît sur ce graphique que quelques soient les conditions opératoires, en terme de débits, utilisées dans ces essais, le mélange est homogène à la fin du serpentin. Cependant, nous avons un mélange plus ou moins complet selon les débits, et il apparaît que les débits assurant un mélange optimal sont de $2\mu\text{L}/\text{min}$ pour chaque entrée de phase aqueuse. C'est pourquoi, afin d'assurer une homogénéisation complète de la solution, avant de l'envoyer vers la zone de stockage, nous utiliserons ces débits pour les expériences à suivre. En outre, étant donné que la vitesse de diffusion de la protéine est bien inférieure à celle du colorant, l'homogénéisation de la puce en terme de température et de concentration a été vérifiée en refroidissant brutalement le système en dessous de la séparation de phase liquide-liquide. Entant donné la rapidité du phénomène, il a été observé que toutes les gouttes dans l'ensemble de la puce ont subi cette transition de phase en simultanément.

III.2.2.2 Formation des gouttes dans la zone de stockage

Comme évoqué précédemment, nous travaillons à l'aide de ce dispositif microfluidique avec des écoulements monophasiques : un grand volume de solution aqueuse est inséré et mélangé dans la puce microfluidique. Néanmoins, afin de déterminer des cinétiques de nucléation à l'aide du modèle de nucléation probabiliste, il est nécessaire d'observer l'évolution d'un grand nombre de gouttes indépendantes les unes des autres en fonction du temps. La question qui se pose est donc de savoir comment obtenir un grand nombre de gouttes à l'aide d'écoulements monophasiques. Pour se faire nous nous sommes inspirés d'une géométrie microfluidique indiquée dans la littérature (Sun et al., 2011). Cette géométrie consiste en un canal avec des vannes capillaires semblable à celui de la Figure III.7.

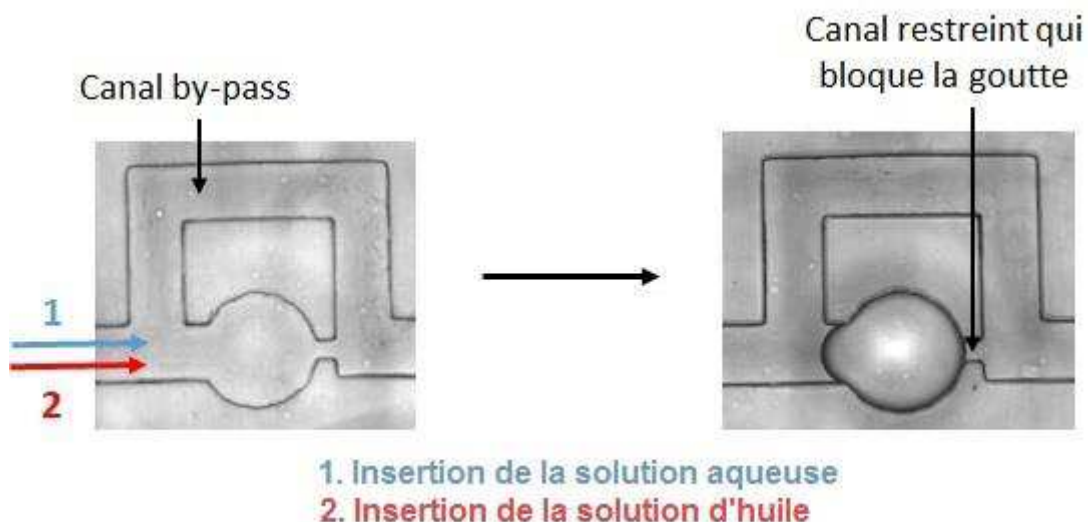


Figure III.7. Piège microfluidique permettant de stocker des gouttes de solution aqueuse à partir d'écoulements monophasiques. Le piège est entièrement rempli de solution aqueuse dans un premier temps. Dans un deuxième temps, de l'huile immiscible est envoyée et chasse la solution aqueuse du canal principal. La solution aqueuse présente dans le piège ne peut s'échapper à cause de la restriction du canal derrière elle, elle se retrouve bloquée et bouche la sortie, l'huile passe alors par le by-pass.

Ce piège fonctionne en envoyant dans un premier temps la solution aqueuse dans l'ensemble de la puce. Elle va alors remplir l'ensemble des canaux et des motifs du piège. Une fois cette opération effectuée, les débits de la phase aqueuse sont arrêtés et de l'huile immiscible est alors envoyée dans la puce microfluidique. L'huile va par conséquent « chasser » la solution aqueuse des canaux principaux de la puce. Cependant, une grande restriction de la taille du canal se trouve en aval du piège, ce qui empêche le volume de solution aqueuse présent dans le piège d'en sortir au moment où il se retrouve poussé par l'huile. On a alors une séparation de la solution aqueuse et la formation d'une interface, avec la majeure partie du volume qui est poussée dans le canal principal, et un volume de solution qui reste dans le piège formant ainsi une goutte. La goutte va alors bloquer la restriction de canal et l'huile envoyée par la suite passera par le canal by-pass. Il est bien entendu nécessaire d'optimiser les débits utilisés ainsi que la taille des canaux et de la restriction. Un débit trop important d'huile ou une taille de restriction pas assez petite aura pour effet de pousser la solution aqueuse hors du piège et de remplir la puce exclusivement d'huile. Une restriction de taille trop petite entraînera des problèmes de fabrication des moules, limités en résolution et un débit d'huile trop petit conduira à un temps de remplissage de la puce trop long. Il est également important de noter que la taille du piège conditionnera la taille de la goutte piégée. Après plusieurs essais, nous avons finalement choisi d'utiliser des pièges de 450 µm de diamètre, des canaux principaux de 200 µm de largeur, et un canal de restriction de 60 µm. La hauteur de tous les canaux est de 200 µm. Cette géométrie présente le meilleur ratio des résistances hydrodynamiques entre le canal by-pass et le piège. En effet, la résistance hydraulique R_H pour un canal de section rectangulaire peut s'approximer avec la formule suivante :

$$R_H = \frac{12\eta L}{1 - 0,63 \frac{w}{h}} \times \frac{1}{w^3 h} \quad \text{Eq. III-33}$$

avec :

- η : la viscosité dynamique du fluide [Pa.s]
- L : la longueur du canal [m]
- w : la largeur du canal [m]
- h : la hauteur du canal [m]

Il est alors possible de faire le rapport des deux résistances hydrauliques dans notre cas, à savoir celle de la petite restriction notée R_r et celle du grand canal by-pass notée R_{bp} . On a alors :

$$\frac{R_r}{R_{bp}} = \frac{L_r}{L_{bp}} \left(\frac{w_{bp}}{w_r} \right)^3 \frac{1 - 0,63(w_{bp}/h)}{1 - 0,63(w_r/h)} \quad \text{Eq. III-34}$$

Avec les valeurs évoquées précédemment pour les largeurs et hauteurs de canal, ainsi qu'avec des longueurs de canal valant 1cm pour le grand canal et 100µm pour la petite restriction, on trouve une valeur pour le rapport de 1,7. Cela illustre que la résistance hydraulique de la restriction est plus importante que celle du canal ce qui empêche la goutte de s'échapper une fois stockée.

Avec ces dimensions, il est finalement possible d'utiliser un débit de 6µL/min pour l'huile ce qui conduit à un taux de remplissage effectif moyen de la puce de 95% (5% des puits ne contiennent

pas de goutte ou des bulles d'air ou plusieurs petites gouttes) et un temps de remplissage rapide de 12 minutes. La puce contient 16 rangées dans lesquelles les solutions sont également réparties et chacune de ces rangées contient 34 pièges microfluidiques pour un total de 544 pièges dans l'ensemble de la puce. Un exemple de puce entièrement remplie de gouttes est présenté sur la Figure III.8. Après avoir présenté les matériaux utilisés pour réaliser le dispositif microfluidique ainsi que le design retenu, intéressons-nous à la troisième partie, le dispositif permettant de contrôler le système en température.

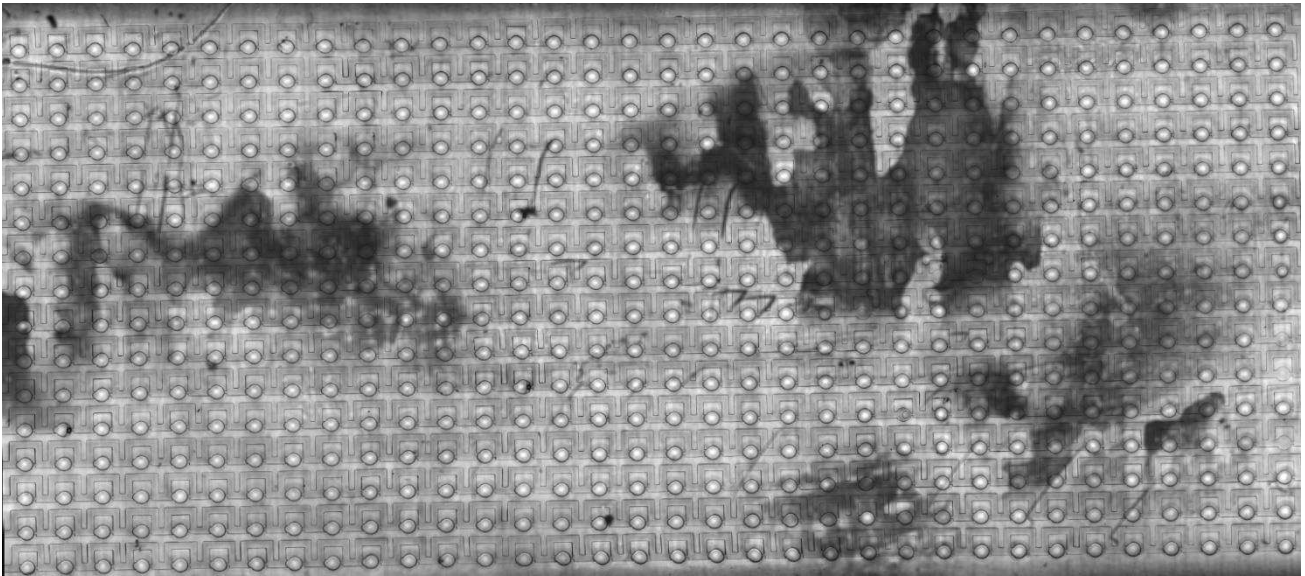


Figure III.8. Photographie de l'ensemble de la zone de stockage d'une puce microfluidique. La zone contient 16 rangées avec chacune 34 pièges microfluidiques pour un ensemble de 550 gouttes stockées (les taches sont dues à l'oxydation de la plaque polie miroir en aluminium).

III.2.3 Contrôle de la température du système

Le contrôle de la température du dispositif microfluidique repose sur l'utilisation de modules Peltier. Ces éléments de petite taille, adaptés à des systèmes mesurant quelques centimètres imposent une différence de température lorsqu'une tension électrique leur est délivrée. Ils sont alors composés de deux faces, une dite chaude et l'autre dite froide. Une image de module Peltier est présenté sur la Figure III.9.

L'objet à contrôler en température doit se positionner contre la face froide du module, et il faut positionner contre la face chaude un système permettant d'évacuer efficacement la chaleur. On peut utiliser dans notre cas un ventilateur ou un échangeur de chaleur à eau. Afin d'assurer un bon transfert thermique, les différents éléments sont vissés entre eux, afin de compenser les irrégularités du support une fine couche de pâte thermique, permettant d'améliorer significativement le transfert thermique, est appliqué sur les différentes parties de l'assemblage. En outre afin d'avoir une température homogène dans la puce, les modules Peltier choisis ont une taille supérieure à la puce microfluidique.

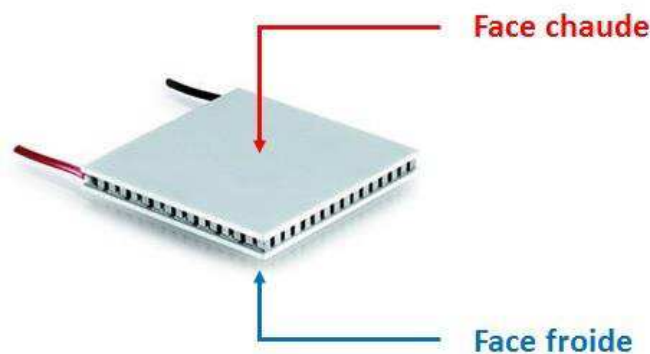


Figure III.9. Photographie d'un module Peltier utilisé dans le système de contrôle de température

La température est régulée en insérant dans la puce une sonde de température, elle-même reliée à un contrôleur PID qui régule la tension à envoyer aux éléments Peltier. La température de la puce microfluidique peut alors être amenée jusqu'à une valeur élevée de 38°C pendant le remplissage afin d'éviter la cristallisation à ce moment-là (nous avons constaté aucun événement de cristallisation dans les 544 gouttes stockées à 38°C pendant 7 jours). Une fois les gouttes stockées, il est alors possible de descendre brutalement la température du dispositif à la température de l'expérience. La gamme de température explorée dans ces expériences varie de 7 à 30°C, le temps requis pour atteindre cette température à partir de la température de remplissage n'excède pas 2 minutes.

L'observation de l'évolution des gouttes en fonction du temps se faisant au microscope, il a fallu trouver une solution, les modules Peltier n'étant pas transparents. Nous avons alors décidé d'observer la puce par réflexion, en positionnant entre les modules Peltier et la puce microfluidique un miroir réfléchissant en aluminium qui permet de renvoyer la lumière vers l'objectif tout en conduisant la chaleur. Finalement l'ensemble du dispositif est représenté schématiquement sur la Figure III.10.

Nous venons donc de présenter l'ensemble du dispositif expérimental utilisé dans ces expériences de mesures de cinétiques de nucléation. Nous avons présenté la puce microfluidique en elle-même, avec la justification du choix des matériaux utilisés ainsi que la présentation et le fonctionnement des deux zones principales de la puce : la zone d'insertion/mélange et la zone de stockage de gouttes. Enfin, nous avons présenté le système complet permettant de contrôler la température du dispositif. Intéressons-nous désormais aux expériences réalisées sur les mesures de cinétiques, aux résultats obtenus, ainsi qu'aux différentes interprétations pouvant être effectuées.

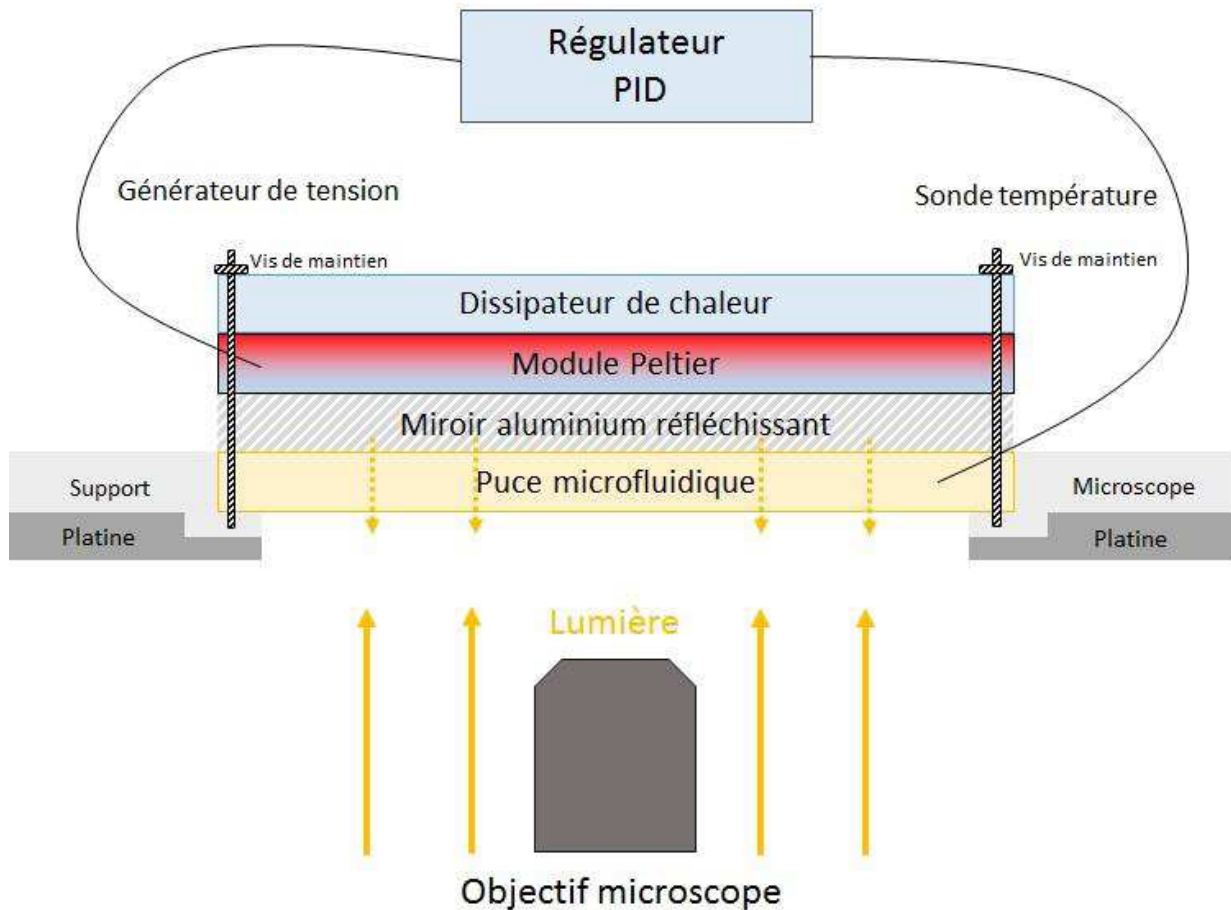


Figure III.10. Représentation schématique de l'ensemble du dispositif expérimental monté sur microscope. La puce microfluidique est montée sur un support adapté spécialement construit au laboratoire. Un miroir en aluminium est positionné au-dessus pour réfléchir la lumière en direction de l'objectif du microscope. Au-dessus se trouvent les modules Peltier permettant de modifier la température et enfin encore au-dessus se trouve le dissipateur de chaleur. La tension envoyée au module Peltier est calculée à l'aide d'un régulateur PID qui mesure l'écart entre une valeur consigne et la température mesurée à l'aide d'une sonde dans la puce. L'ensemble du dispositif est maintenu à l'aide de vis et positionné sur la platine du microscope.

III.3 Expériences réalisées

Les expériences réalisées dans cette partie ont pour but d'étudier des cinétiques de nucléation du lysozyme en présence de sel NaCl à concentrations fixes, mais à différentes températures. Pour cela on insère dans l'entrée correspondant à la solution de protéine une solution de lysozyme à 122 mg/mL dans un buffer acétate de sodium à pH 4,5 préparée en suivant le protocole présenté dans la partie II. On insère dans chacune des deux entrées de sel une solution de NaCl à 4,5% massique. En utilisant comme présenté dans la partie III.2.2.1 des débits de 2/2/2 $\mu\text{L}/\text{min}$, on obtient alors une solution de concentration 40,66 mg/mL en lysozyme et 3% massique en NaCl. L'huile utilisée par la suite pour former les gouttes en séparant la phase aqueuse au niveau des pièges microfluidiques est du Krytox® GPL100 (DuPont, Etats-Unis) dans lequel est dissous un tensioactif, un copolymère tri-bloc PFPE-PEG-PFPE (RainDance Technologies, Etats-Unis). Cette huile est au préalable saturée en eau en la mettant sous agitation 72h avec de l'eau, ce qui empêche par la suite l'éventuelle diffusion de l'eau des gouttes vers l'huile.

L'idée de ces expériences est d'étudier différentes températures de stockage, plus ou moins éloignées de la température de démixtion liquide-liquide, et ainsi observer une éventuelle différence pouvant souligner les différences de mécanismes de nucléation évoqués dans la partie I, à savoir un mécanisme de nucléation classique pour des conditions éloignées de la séparation liquide-liquide, et un mécanisme en deux étapes pour des conditions proches de cette frontière. Ainsi, la puce microfluidique est préalablement chauffée à 38°C lors du remplissage pour éviter les phénomènes de nucléation avant le début de l'expérience, puis une fois l'ensemble des gouttes stockées, la température est diminuée jusqu'aux températures de travail qui sont pour ces expériences 20 ; 15,5 ; 14,5 ; 13,5 ; 12,5 ; 10,5 ; 9 et 7°C. Ces différentes conditions expérimentales sont illustrées sur la Figure III.11 représentant le diagramme de phase du lysozyme avec 3% de NaCl (Manno et al., 2004; Muschol and Rosenberger, 1997).

Pour chaque expérience, environ 550 gouttes sont stockées et observées en fonction du temps afin de détecter l'apparition de cristaux. Il est alors possible d'évaluer en fonction du temps, la proportion de gouttes ne présentant pas de cristaux $f_0(t) = N_0(t)/N_T$ avec N_0 le nombre de gouttes dans lesquelles il n'y a pas de cristaux à l'instant t et N_T le nombre total de gouttes stockées.

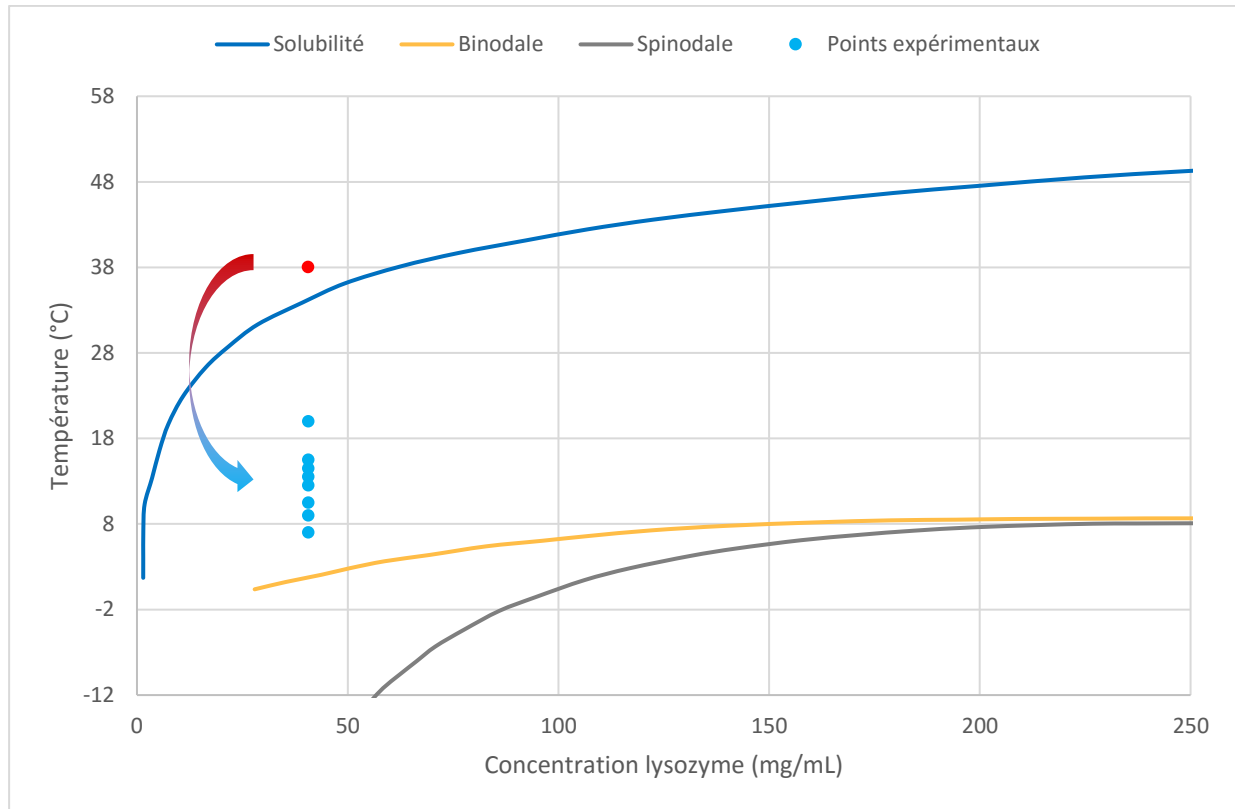


Figure III.11. Diagramme de phase du lysozyme avec 3% NaCl. La courbe bleue et la courbe orange représente respectivement la solubilité et la binodale (Muschol and Rosenberger, 1997), la courbe grise correspond à la décomposition spinodale (Manno et al., 2004). Les points sont les différentes conditions expérimentales utilisées dans les expériences de cette partie, chacune avec une distance différente par rapport à la séparation liquide-liquide.

III.3.1 Présentation des résultats expérimentaux

Nous allons présenter ici les paramètres expérimentaux utilisés pour chaque expérience, correspondant à une température de stockage (et donc à une position dans le diagramme de phase) différente. Nous présenterons également l'évolution de la valeur de $f_0(t)$, soit la proportion de gouttes ne contenant pas de cristaux en fonction du temps ainsi que les observations expérimentales importantes. Il est à noter que ces analyses quantitatives ne sont pas possibles pour les expériences réalisées à 7 et 9°C car le temps caractéristique du mécanisme de nucléation le plus rapide (en $1/k$ en règle générale) n'est pas compatible avec la résolution temporelle de l'acquisition d'image. En effet, pour l'expérience réalisée à 9°C par exemple, le temps de cristallisation de l'ensemble de la puce est d'environ 20 – 25 minutes, or le temps de « mapping » est de 1 minute et 30 secondes. En conséquence, le nombre d'échantillonnages serait d'au maximum de 17 images, ce nombre est clairement insuffisant pour capturer avec suffisamment de précision les évènements caractéristiques associés à l'apparition des cristaux. A l'inverse, toutes les expériences réalisées pour des températures supérieures à 20°C, le temps d'apparition des cristaux était trop faible pour avoir un nombre de cristaux dans la puce suffisant permettant l'analyse des données (par exemple les expériences réalisées à 25°C n'ont donné

qu'une dizaine de cristaux pendant 7 jours d'expérience). Ces données ne sont pas analysables quantitativement mais elles permettront d'enrichir l'analyse et l'interprétation des données.

III.3.1.1 Expérience réalisée à 20°C

Cette expérience est celle à la température la plus élevée donc la plus lente en terme de cinétique. C'est pourquoi des photographies de la puce microfluidiques ont été prises toutes les heures, puis toutes les cinq heures pour une durée totale de 507600 secondes, soit 141 heures. Un total de 501 gouttes a été analysé et nous avons observé au maximum d'un seul cristal par goutte. Les résultats expérimentaux représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps sont présentés sur la Figure III.12. Il apparaît qu'effectivement la cinétique de nucléation est lente comme l'illustre la lente décroissance de la fraction de gouttes sans cristaux.

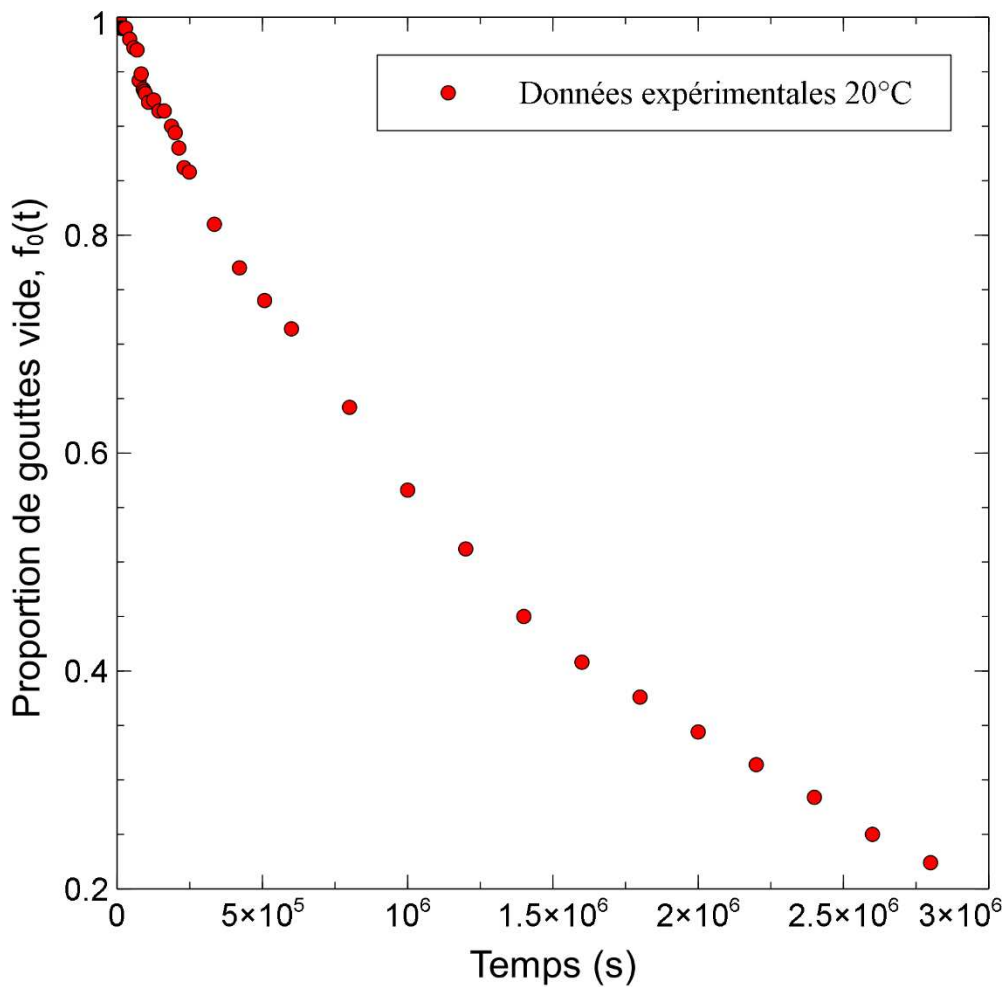


Figure III.12. Expérience à 20°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Cette expérience est lente.

III.3.1.2 Expérience réalisée à 15,5°C

Pour cette expérience plus rapide, des photographies de la puce ont été prises toutes les 15 minutes pour une durée totale de 42024 secondes, soit 12h. Un total de 498 gouttes a été analysé et une nouvelle fois, un seul cristal par goutte est apparu. Les résultats expérimentaux sont représentés sur la Figure III.13. On y observe une cinétique de nucléation plus rapide que pour l'expérience à 20°C, mais qui demeure néanmoins relativement lente.

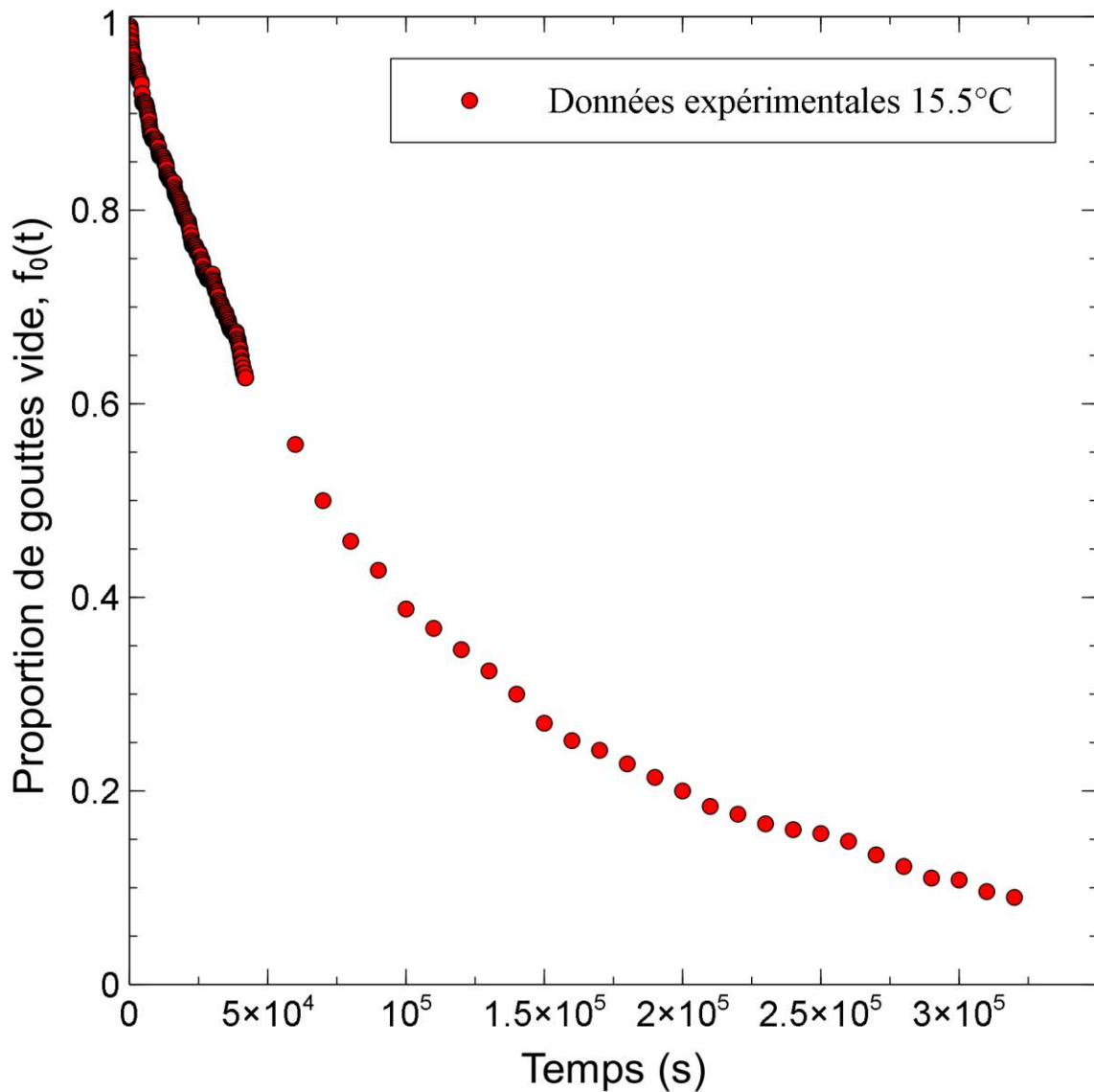


Figure III.13. Expérience à 15,5°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Cette expérience est également lente.

III.3.1.3 Expérience à 14,5°C

Pour cette expérience, des photographies de la puce ont été prises toutes les 93 secondes pour une durée totale de 58401 secondes, soit 16h. Un total de 510 gouttes a été analysé et une nouvelle fois, un seul cristal par goutte est apparu. L'exemple de l'évolution d'une goutte de la puce en fonction du temps est présenté sur la Figure III.14. Les résultats expérimentaux sont représentés sur la Figure III.15. Les mêmes observations que précédemment peuvent être réalisées à savoir que la cinétique est légèrement plus rapide pour cette expérience mais qu'elle demeure assez lente.

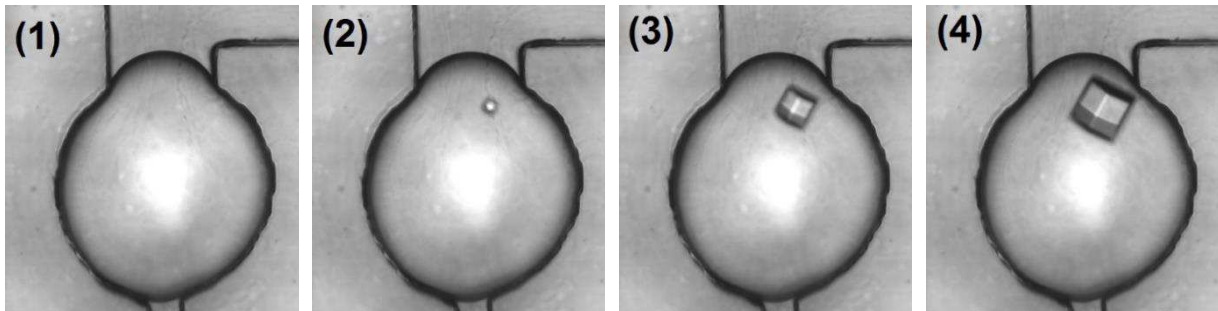


Figure III.14. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 14,5°C pendant (1) 0min (2) 90min (3) 120min (4) 160min. On y aperçoit un cristal qui apparaît et qui grossit avec le temps.

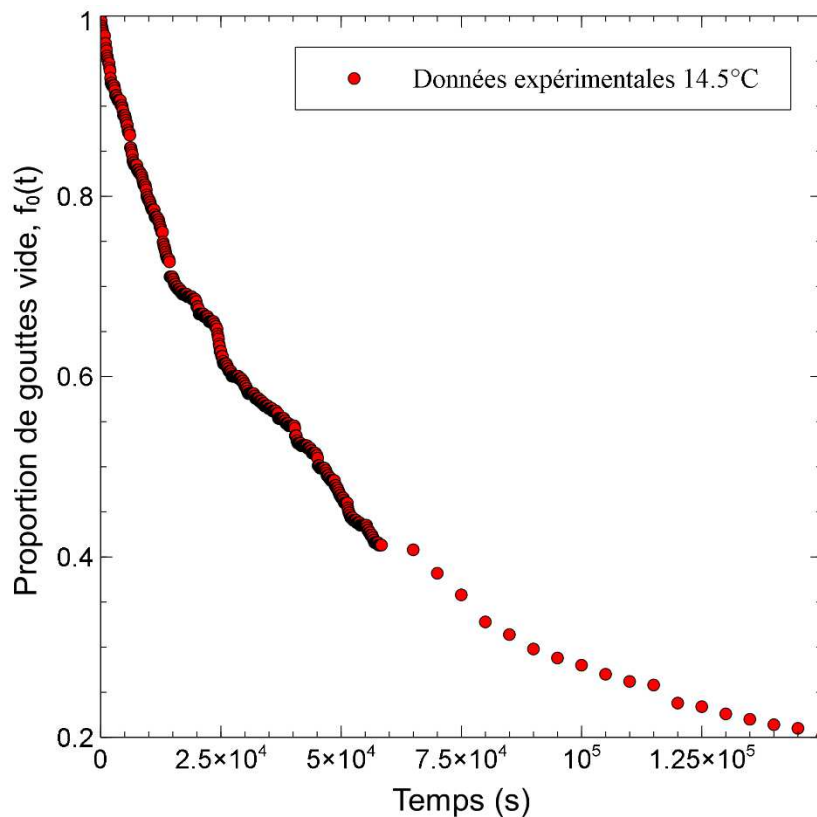


Figure III.15. Expérience à 14,5°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. De manière similaire aux expériences à 20 et 15,5°C, cette expérience est également lente.

III.3.1.4 Expérience réalisée à 13,5°C

Pour cette expérience, des photographies de la puce ont été prises toutes les 15min pour une durée totale de 106200 secondes, soit 30h. Un total de 489 gouttes a été analysé et une nouvelle fois, un seul cristal par goutte est apparu. Un exemple d'évolution de goutte au cours du temps dans cette expérience est donné sur la Figure III.16 et les résultats expérimentaux sont représentés sur la Figure III.17. Cette fois, il apparaît que la nucléation est plus rapide, et que l'on a au bout de 18h une valeur de f_0 inférieure à 0,1 illustrant que la majeure partie des gouttes ont connu un évènement de nucléation.

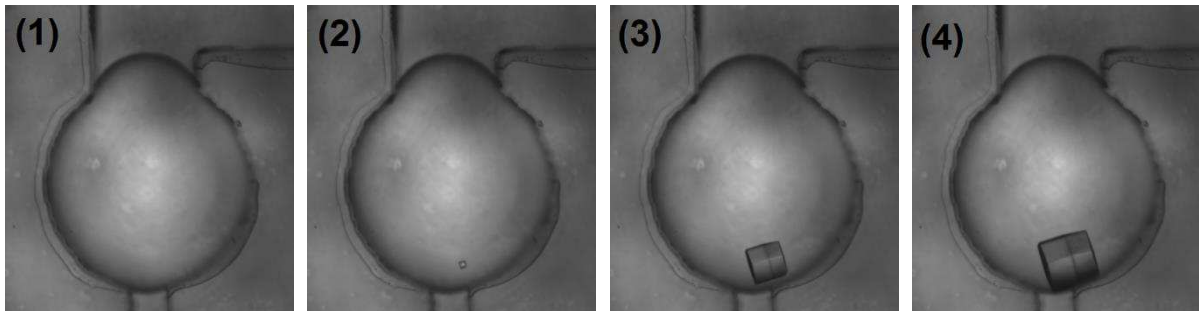


Figure III.16. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 13,5°C pendant (1) 0h (2) 8h (3) 16h (4) 24h. On y aperçoit un cristal qui apparaît et qui grossit avec le temps.

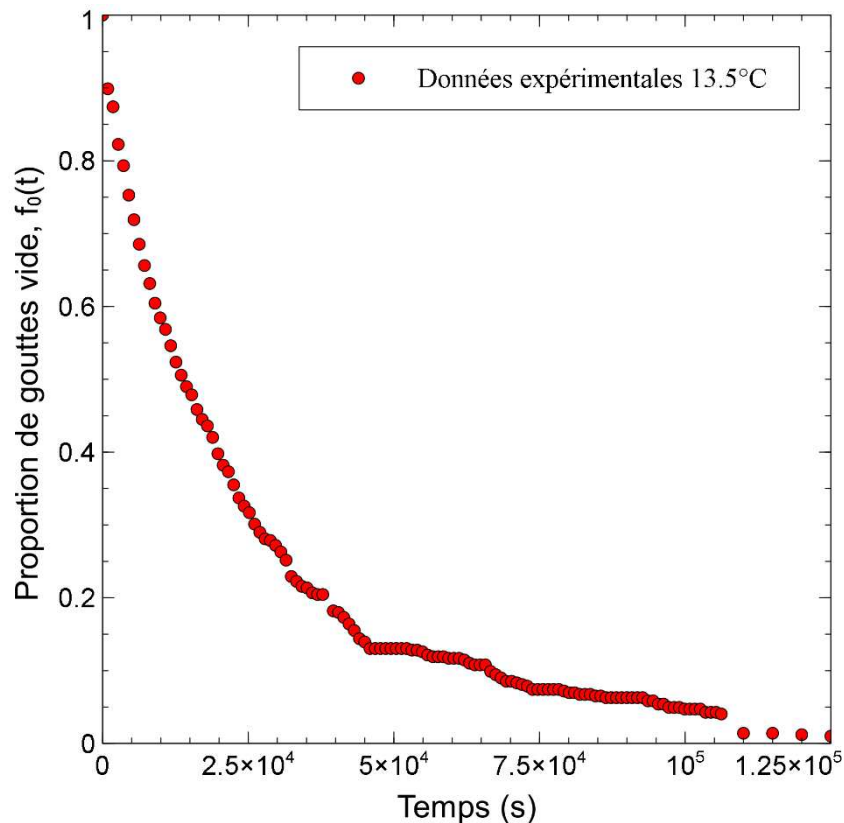


Figure III.17. Expérience à 13,5°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Il apparaît ici que la nucléation est plus rapide et qu'il est possible d'obtenir, dans le temps de l'expérience, une valeur finale de la fraction de gouttes n'ayant pas nucléé faible illustrant que la majeure partie des gouttes a connu un évènement de nucléation.

III.3.1.5 Expérience à 12,5°C

Pour cette expérience, des photographies de la puce ont été prises toutes les 103 secondes pour une durée totale de 31518 secondes, soit 9h. Un total de 505 gouttes a été analysé mais cette fois-ci, il apparaît dans quelques gouttes jusqu'à trois cristaux. Des exemples d'évolution temporelle de gouttes dans lesquelles apparaissent un cristal et deux cristaux sont représentés respectivement sur les Figure III.18 et Figure III.19. Les résultats expérimentaux sont représentés sur la Figure III.20. Etant donné que les cristaux n'apparaissent pas simultanément, ce changement dans le nombre de cristaux observable dans les gouttes est lié à un niveau de sursaturation relativement élevé et à une croissance relativement lente limitée par la diffusion (milieu stagnant).

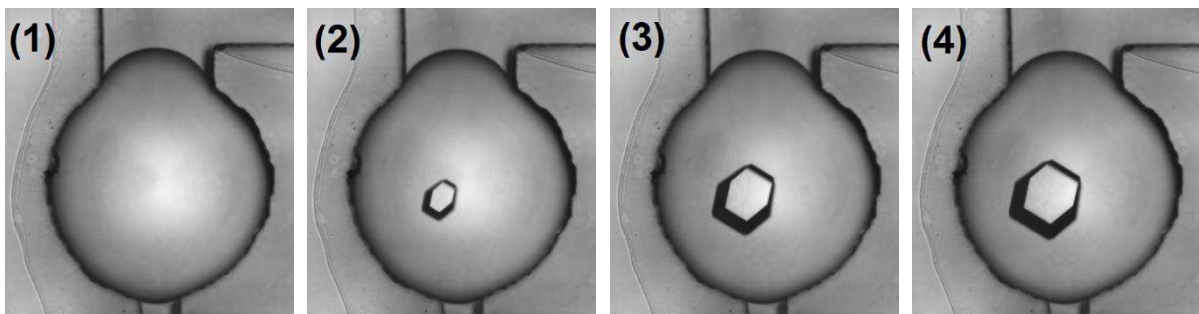


Figure III.18. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 12,5°C pendant (1) 0h (2) 1h (3) 2h (4) 3h. On y aperçoit un unique cristal qui apparaît et qui grossit avec le temps.

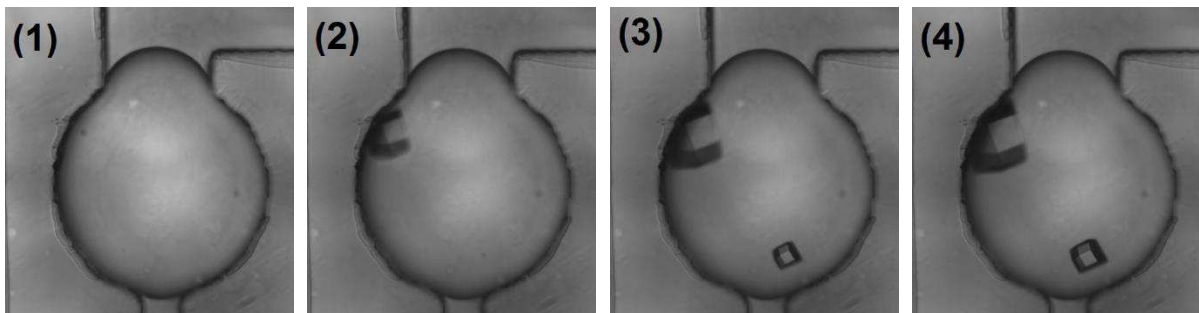


Figure III.19. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 12,5°C pendant (1) 0h (2) 1h30min (3) 3h (4) 4h30min. On y aperçoit cette fois les nucléations successives de deux cristaux qui grossissent avec le temps.

III.3.1.6 Expérience à 10,5°C

Pour cette expérience, la plus rapide en terme de cinétique, des photographies de la puce ont été prises toutes les 103 secondes pour une durée totale de 3502 secondes, soit environ 1h. Un total de 520 gouttes a été analysé et cette fois, on constate une rupture dans le mécanisme de nucléation avec l'apparition simultanée, ou progressive, d'un grand nombre de cristaux, pouvant dépasser la valeur de 10. Des exemples d'évolution temporelle de goutte lors de cette expérience sont présentés sur les Figure III.21 et Figure III.22. Les résultats expérimentaux sont présentés sur la Figure III.23. Il apparaît que la nucléation est dans cette expérience très rapide ($f_0 < 0,1$ au bout de 20 minutes) et que le nombre de cristaux apparaissant est élevé. Ces observations sont

bien différentes de celles effectuées pour les autres expériences et peuvent être le reflet d'un changement de mécanisme de nucléation.

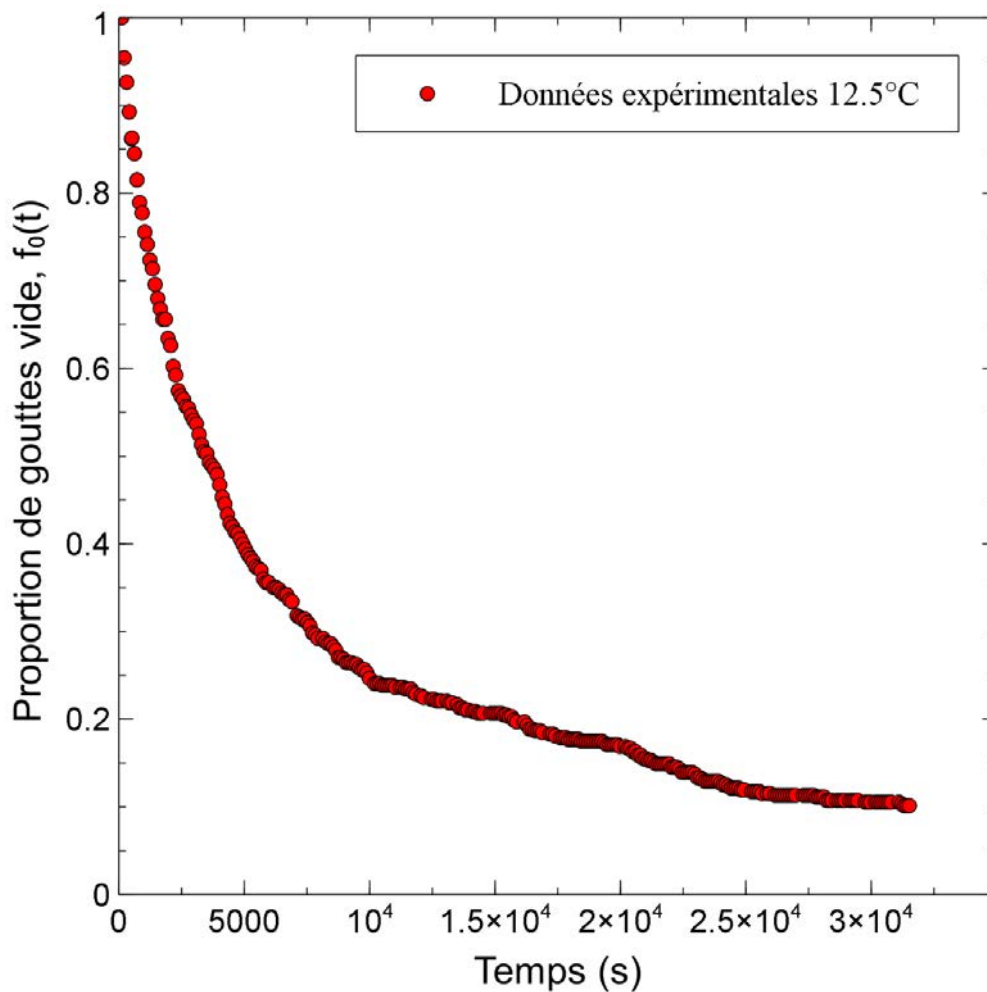


Figure III.20. Expérience à 12,5°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Il apparaît ici que la nucléation est plus rapide et qu'il est possible d'obtenir, dans le temps de l'expérience, une valeur finale de la fraction de gouttes n'ayant pas nucléé faible illustrant que la majeure partie des gouttes a connu un événement de nucléation.

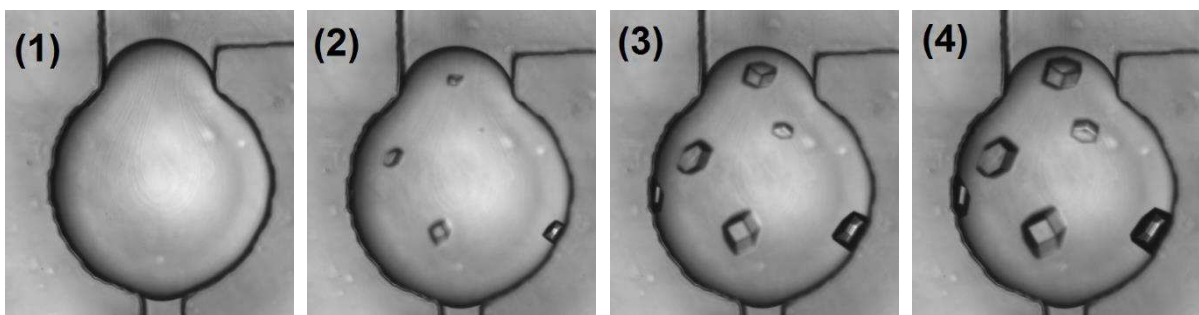


Figure III.21. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 10,5°C pendant (1) 0min (2) 15min (3) 30min (4) 45min. On y aperçoit cette fois un nombre important de cristaux (6) qui grossissent avec le temps. Il semble que 4 d'entre eux nucléent simultanément, suivi par la nucléation de 2 autres.

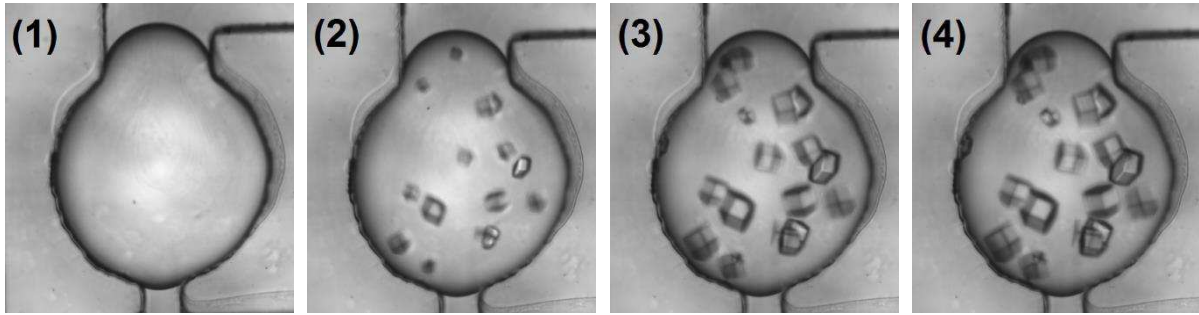


Figure III.22. Evolution temporelle d'une goutte stockée à 10,5°C pendant (1) 0min (2) 15min (3) 30min (4) 45min. On y aperçoit cette fois un nombre très important de cristaux (>10) qui nucléent et grossissent avec le temps.

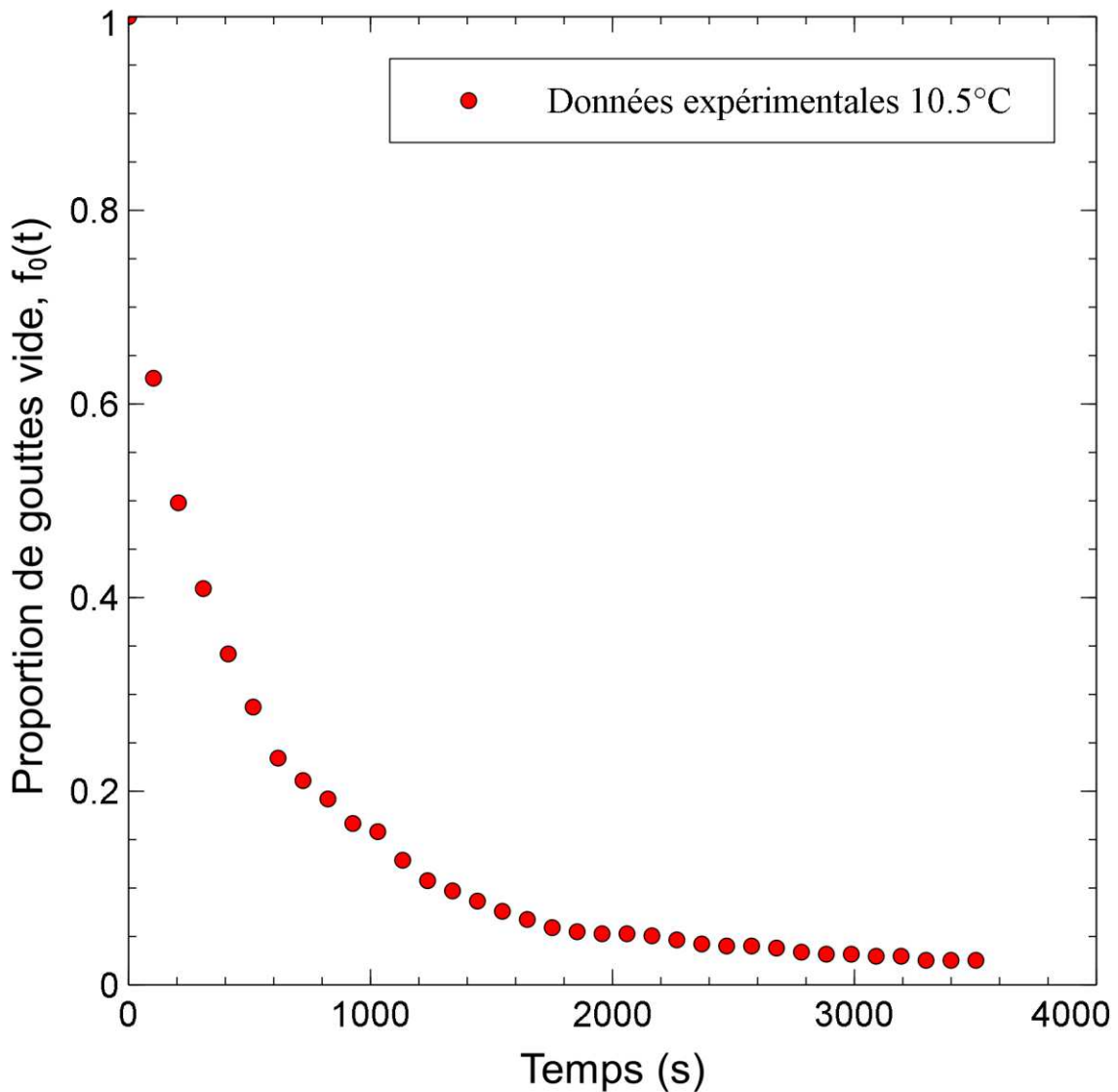


Figure III.23. Expérience à 10,5°C. Evolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Il apparaît ici que la nucléation est très rapide et qu'il est possible d'obtenir, dans le temps de l'expérience, une valeur finale de la fraction de gouttes n'ayant pas nucléé faible illustrant que la majeure partie des gouttes a connu un évènement de nucléation.

Les résultats obtenus pour les températures plus basses (9°C et 7°C) ne pouvaient pas être analysées en terme fréquence de nucléation, mais le nombre de cristaux apparaissant simultanément dans ces expériences est bien supérieur à ceux obtenus pour l'expérience réalisée à 10,5°C. Cette observation semblerait montrer une rupture dans le mécanisme d'apparition des cristaux.

III.3.1.7 Récapitulatif des expériences

La Figure III.24 représente l'évolution de la proportion de gouttes sans cristaux en fonction du temps pour toutes les expériences évoquées précédemment. D'un point de vue macroscopique, il est apparu dans ces expériences une rupture dans le mécanisme de nucléation lorsque la température était réduite. En effet, pour des températures supérieures à 12,5°C, seul un cristal apparaît par goutte, assez lentement. En revanche pour une température de 12,5°C, la cinétique était plus rapide et plusieurs cristaux pouvaient apparaître par goutte. Ce phénomène était encore plus accentué lors de l'expérience à 10,5°C, la nucléation était bien plus rapide, et il était possible d'observer plus d'une dizaine de cristaux par goutte.

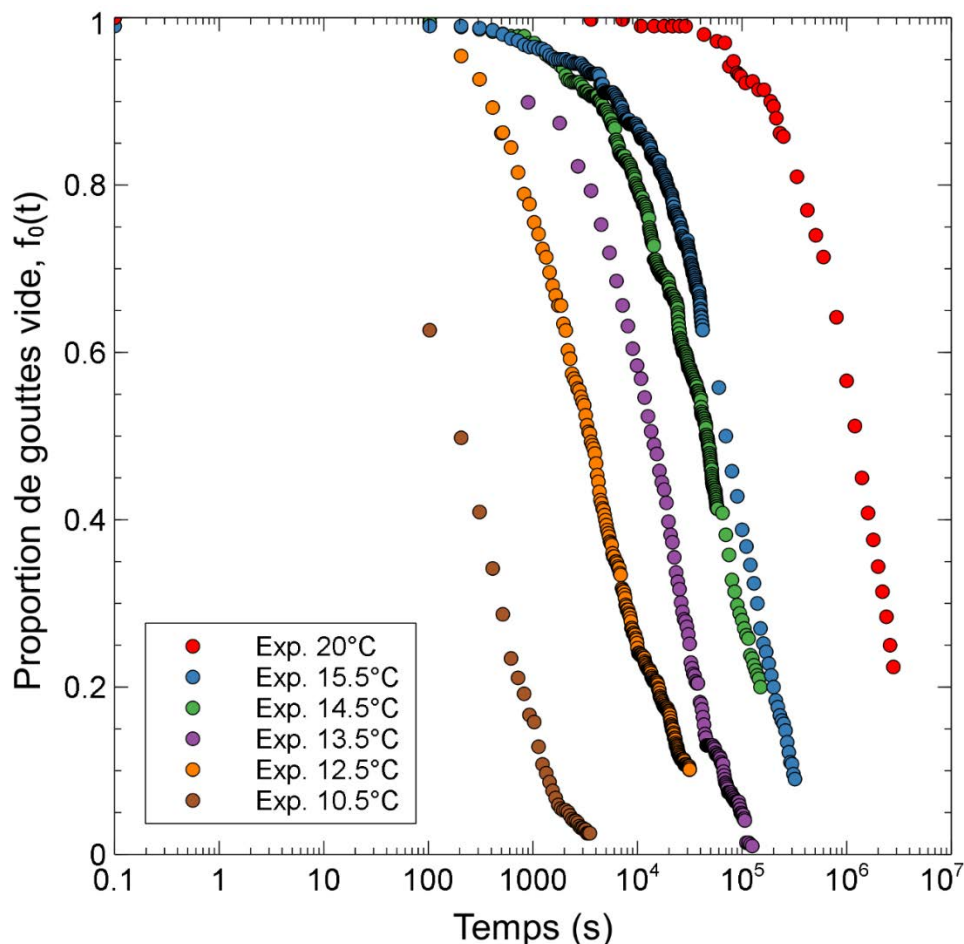


Figure III.24. Evolution de la proportion de gouttes sans cristaux en fonction du temps pour les 6 différentes températures de stockage. L'abscisse temporelle est en échelle logarithmique pour plus de clarté. Plus la température est faible, plus la proportion de gouttes sans cristaux diminue rapidement, car les cristaux sont formés plus rapidement.

III.3.2 Régressions avec les trois paramètres m , k_0 et k variables

D'après le modèle de nucléation proposé par Bourgeois (Bourgeois et al., 2017), la proportion de gouttes ne présentant pas d'évènement de nucléation à un temps t peut s'exprimer à l'aide de trois paramètres de nucléation comme présenté dans la partie III.1.3 :

$$f_0(t) = e^{-m}e^{-k_0t} + \sum_{p=1}^{+\infty} \left[\frac{m^p}{p!} e^{-m} \times \left[\left(\frac{k_0}{k_0 + pk} \right) e^{-k_0t} + \left(\frac{pk}{k_0 + pk} \right) e^{-pkt} \right] \right] \quad \text{Eq. III-35}$$

avec :

- m : le nombre d'impuretés moyen par goutte
- k_0 : la vitesse de nucléation homogène
- k : la vitesse de nucléation sur une impureté

Avec l'évolution du nombre de gouttes sans cristaux en fonction du temps, il est alors possible d'obtenir les paramètres cinétiques m , k_0 et k en régressant les données expérimentales à l'aide de l'algorithme de Levenberg-Marquardt (Levenberg, 1944; Marquardt, 1963). Etant donné que le nombre de données expérimentales est important dans ces expériences, il est possible de réaliser un bootstrap avec de nombreuses itérations en déterminant à chaque itération des valeurs pour les paramètres m , k_0 et k et de calculer finalement un intervalle de confiance des données expérimentales à 95%. Après la régression par l'algorithme de Levenberg-Marquardt, nous réalisons un bootstrap à 500 itérations pour obtenir l'intervalle de confiance à 95% des paramètres.

On observe sur la Figure III.24, pour chaque température, la décroissance de la proportion de gouttes sans cristaux en fonction du temps. Il est alors possible de régresser ces décroissances à l'aide du modèle de l'équation Eq. III-35 avec l'algorithme classique de Levenberg-Marquardt en laissant libres les trois paramètres du modèle m , k_0 et k . Les valeurs des paramètres obtenues sont présentées dans le Tableau III.1.

Tableau III.1. Valeurs des paramètres du modèle de nucléation régressées par l'algorithme de Levenberg-Marquardt à partir des données expérimentales de l'évolution temporelle de la proportion de gouttes sans cristaux (Figure III.24) en accord avec le modèle de Bourgeois et al.

Température (°C)	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	mk (s ⁻¹)
20	0,82	5,82.10 ⁻⁷	4,91.10 ⁻⁷	4,03.10 ⁻⁷
15,5	1,69	6,09.10 ⁻⁶	9,44.10 ⁻⁵	1,60.10 ⁻⁴
14,5	1,69	1,04.10 ⁻⁵	2,68.10 ⁻⁵	4,53.10 ⁻⁵
13,5	1,89	2,52.10 ⁻⁵	3,66.10 ⁻⁵	6,92.10 ⁻⁵
12,5	1,41	3,75.10 ⁻⁵	2,13.10 ⁻⁴	3,00.10 ⁻⁴
10,5	0,33	2,10.10 ⁻³	7,00.10 ⁻³	2,33.10 ⁻³

Plusieurs éléments sont à noter dans ce tableau. Tout d'abord il apparaît dans la majeure partie des cas, que la vitesse globale de nucléation hétérogène (mk le produit du nombre d'impuretés moyen par goutte par la vitesse de nucléation pour une impureté) est supérieure à la vitesse de nucléation homogène k_0 . Ceci est un constat classique car les impuretés sont des catalyseurs de nucléation et dans la majorité des cas il est normal d'avoir une vitesse de nucléation hétérogène supérieure à celle homogène.

Pour une même expérience, les vitesses de nucléation hétérogène et homogène ont néanmoins le même ordre de grandeur. Ce constat illustre alors la nécessité d'utiliser un modèle de nucléation qui peut s'appliquer lorsque ces deux vitesses sont proches, ce qui, en accord avec la présentation des modèles de la partie Chapitre I peut justifier l'utilisation du modèle de Bourgeois et al..

Enfin, on note dans ces résultats des valeurs variables selon la température du paramètre m . Ce paramètre représente le nombre moyen d'impuretés par goutte et dépend normalement des solutions injectées dans le système microfluidique, ainsi que des concentrations et du volume des gouttes. Les solutions injectées dans la puce sont identiques d'une expérience à une autre, les concentrations dans les gouttes sont identiques et le volume des gouttes est également le même. Par conséquent, ce paramètre n'est pas sensé varier d'une expérience à une autre, la seule variation de température ne peut pas expliquer ce changement. Par conséquent, afin de pouvoir analyser plus précisément ces expériences, nous avons décidé de refaire des régressions des données en fixant cette fois la valeur du paramètre m à une valeur moyenne de 1,4 et en faisant varier les deux autres paramètres k_0 et k . Les résultats expérimentaux de chaque expérience ainsi que les régressions et intervalles de confiance sont présentés par la suite.

III.3.3 Régressions avec le paramètre m fixé

Nous avons déjà présenté dans la partie Chapitre I les paramètres expérimentaux utilisés pour chacune des expériences ainsi que les graphes correspondant à l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps. Dans cette partie nous présentons les régressions réalisées à l'aide de l'Eq. III-35 en fixant la valeur du paramètre m à 1,4 et en laissant libre les paramètres k_0 et k .

III.3.3.1 Expérience réalisée à 20°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 20°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.25.

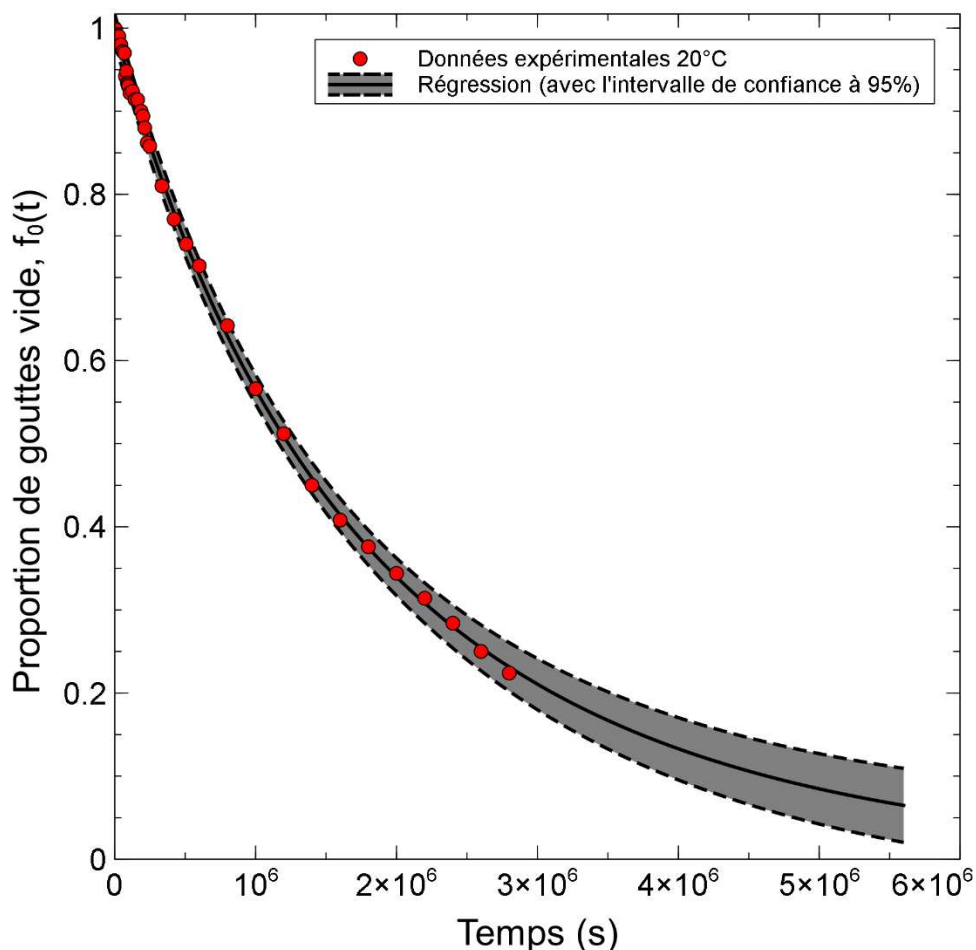


Figure III.25. Expérience à 20°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Expérience à 20°C. Paramètres expérimentaux et paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
507600 s	1h puis 5h	501	1	1,4	$3,81 \cdot 10^{-7}$	$4,02 \cdot 10^{-7}$

III.3.3.2 Expérience réalisée à 15,5°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 15,5°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.26.

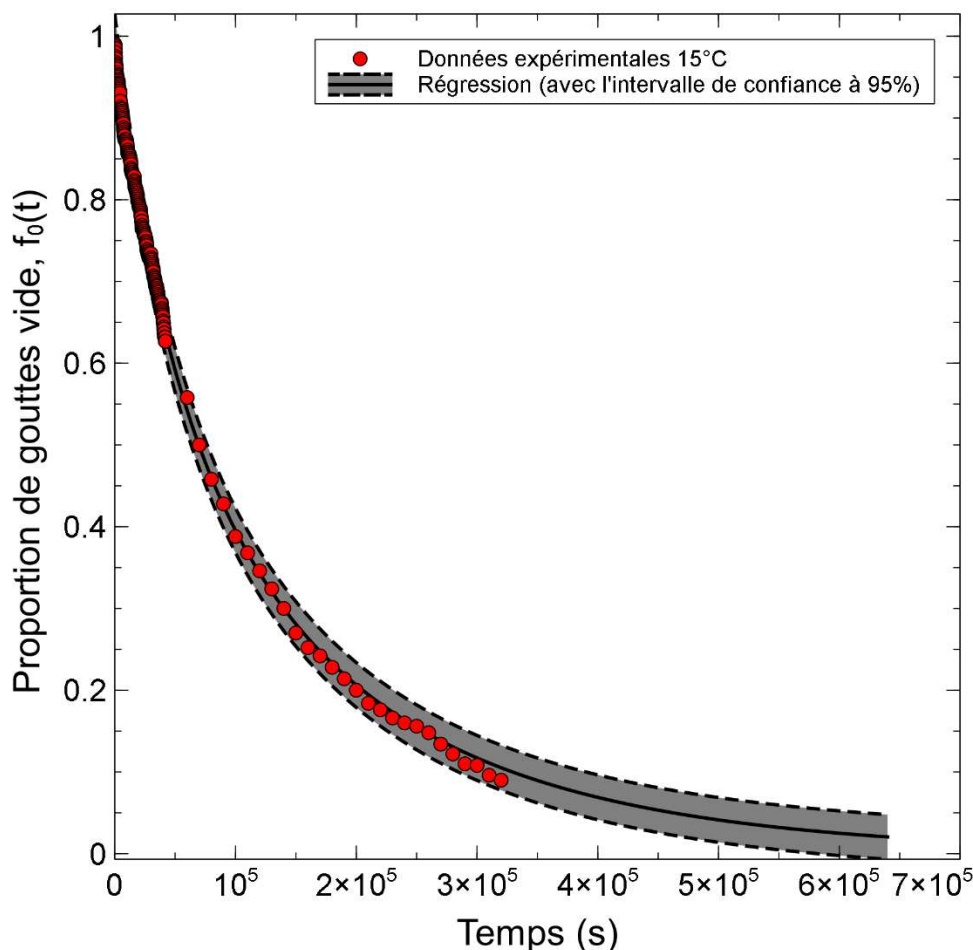


Figure III.26. Expérience à 15,5°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.3.

Tableau III.3. Expérience à 15,5°C. Paramètres expérimentaux et paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
42024 s	15 min	498	1	1,4	$5,19 \cdot 10^{-6}$	$6,70 \cdot 10^{-6}$

III.3.3.3 Expérience réalisée à 14,5°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 14,5°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.27.

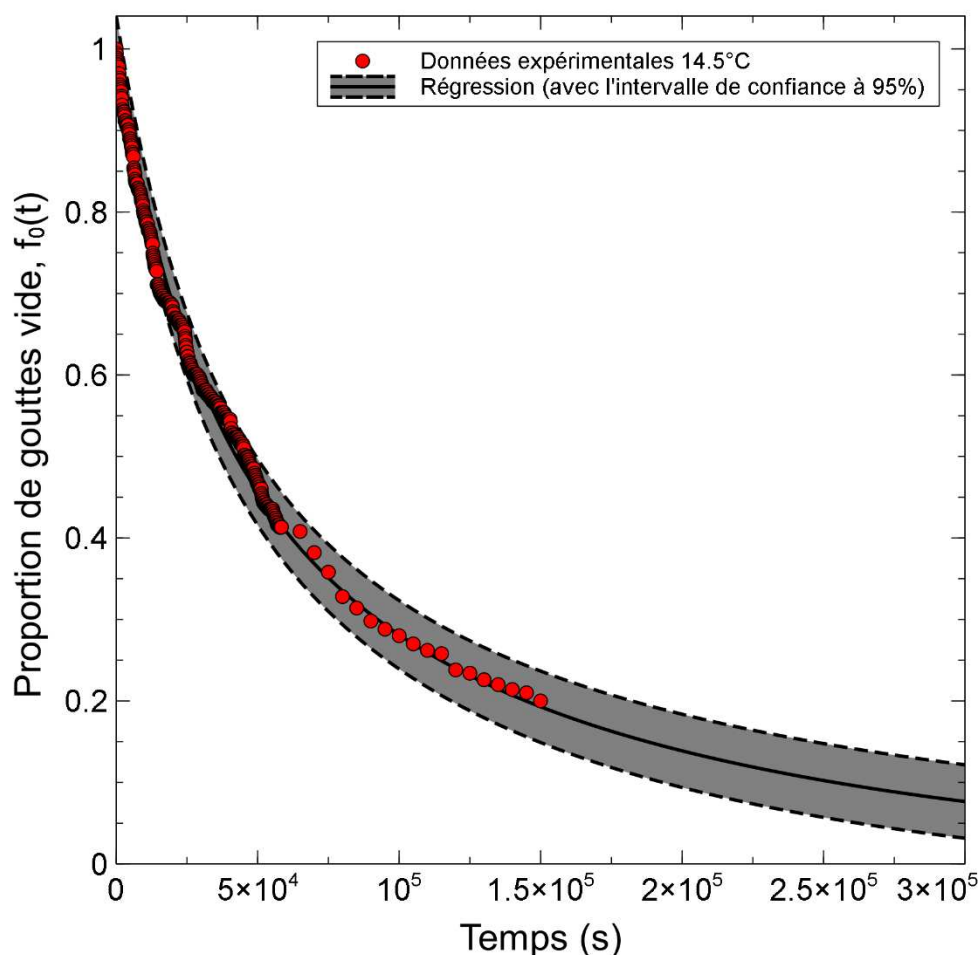


Figure III.27. Expérience à 14,5°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.4.

Tableau III.4. Expérience à 14,5°C. Paramètres expérimentaux et paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
58401 s	1 min 43 sec	510	1	1,4	$8,95 \cdot 10^{-6}$	$1,04 \cdot 10^{-5}$

III.3.3.4 Expérience réalisée à 13,5°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 13,5°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.28.

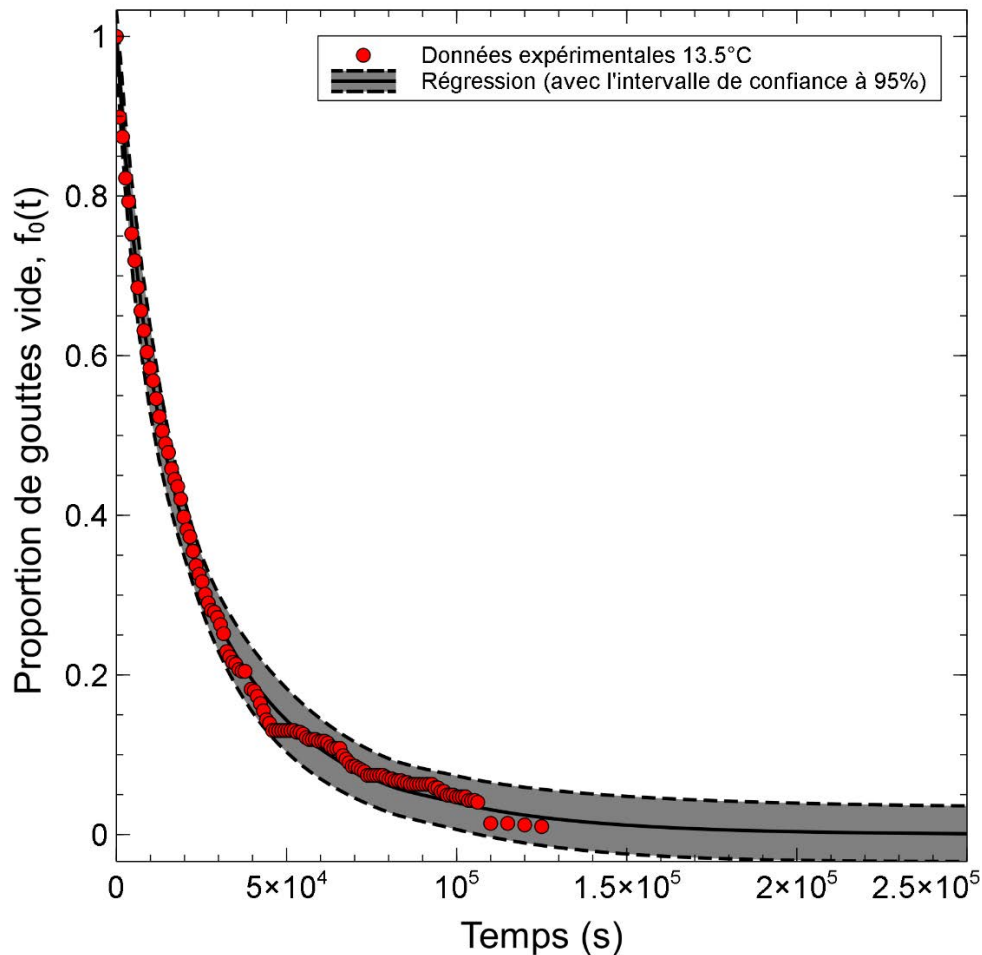


Figure III.28. Expérience à 13,5°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représenté l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.5.

Tableau III.5. Expérience à 13,5°C. Paramètres expérimentaux et paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s^{-1})	k (s^{-1})
106200 s	15 min	489	1	1,4	$2,49 \cdot 10^{-5}$	$4,94 \cdot 10^{-5}$

III.3.3.5 Expérience réalisée à 12,5°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 12,5°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.29.

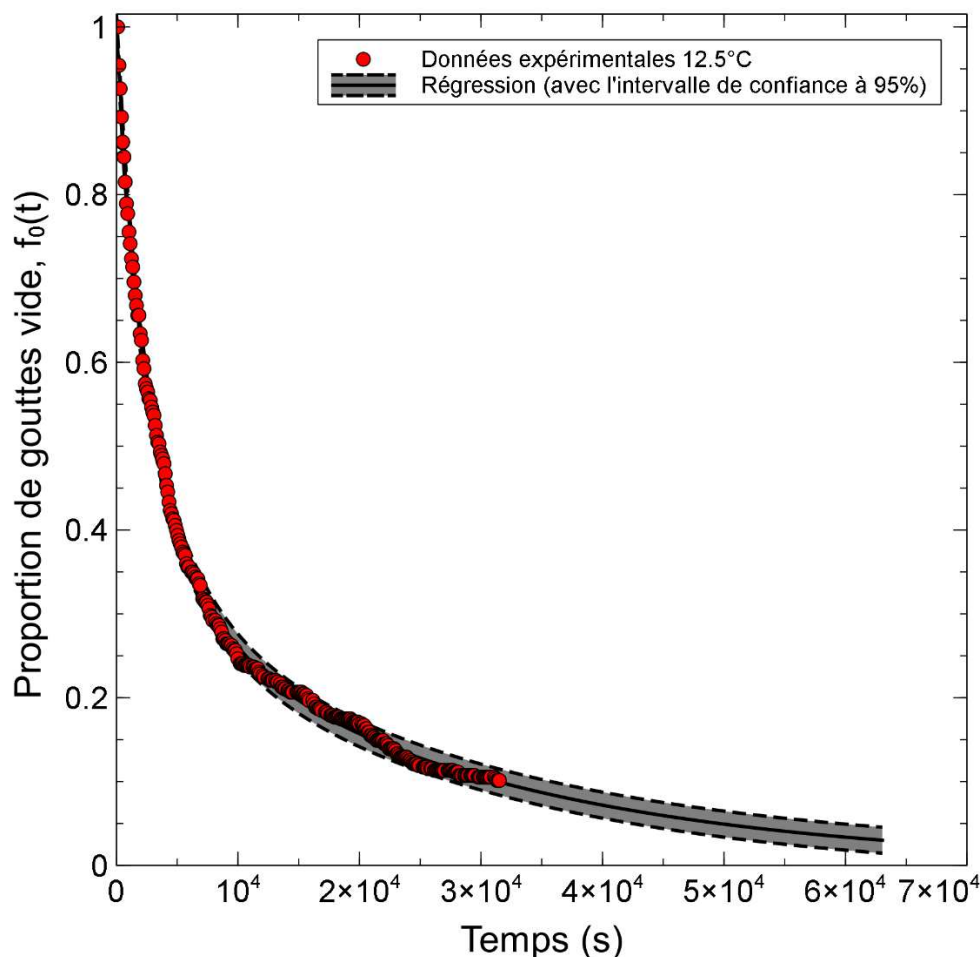


Figure III.29. Expérience à 12,5°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.6.

Tableau III.6. Expérience à 12,5°C. Paramètres expérimentaux, paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
31518 s	103 sec	505	2	1,4	$3,78 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-4}$

III.3.3.6 Expérience réalisée à 10,5°C

Les résultats expérimentaux de l'expérience à 10,5°C, représentant l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps ainsi que la régression correspondante du modèle de Bourgeois et al. et l'intervalle de confiance à 95% par le bootstrap à 500 itérations sont présentés sur la Figure III.30

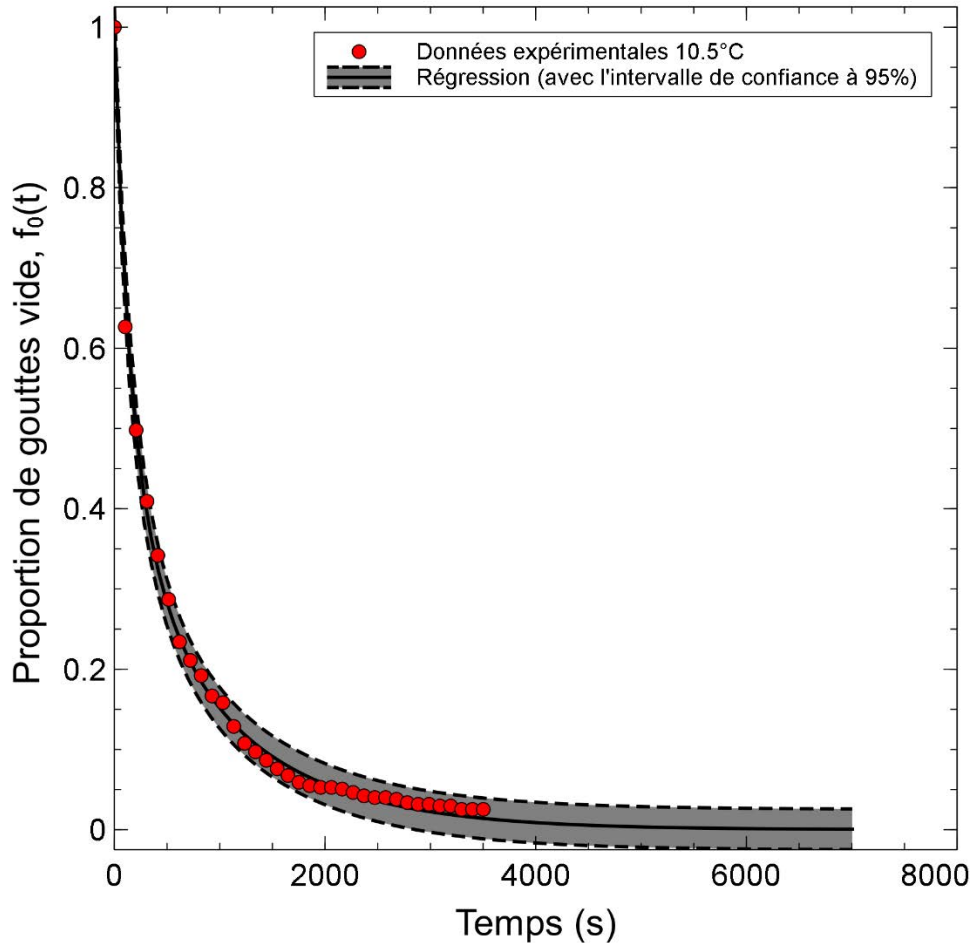


Figure III.30. Expérience à 10,5°C. Evolution de la fraction de gouttes sans cristal en fonction du temps. Les points jaunes sont les données expérimentales obtenues dans le système microfluidique. La courbe continue correspond au modèle de Bourgeois avec les paramètres régressés sur les données expérimentales. Les courbes pointillées représentent l'intervalle de confiance à 95% obtenu par bootstrap à 500 itérations.

Les paramètres expérimentaux, ainsi que les paramètres de nucléation obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales sont indiqués dans le Tableau III.7.

Tableau III.7. Expérience à 10,5°C. Paramètres expérimentaux, paramètres de nucléation moyens obtenus à l'aide de la régression du modèle de Bourgeois et al. sur les données expérimentales.

Durée	Intervalles de mesures	Gouttes	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
3502 s	103 sec	520	<10	1,4	$9,23 \cdot 10^{-4}$	$3,49 \cdot 10^{-3}$

III.3.3.7 Récapitulatif et discussion sur les résultats

L'ensemble des résultats importants pour la discussion concernant les expériences et régressions avec le paramètre m fixé présentées précédemment est résumé dans le Tableau III.8.

Tableau III.8. Ensemble des paramètres expérimentaux et paramètres cinétiques obtenus par régression lors des expériences microfluidiques dédiées aux mesures de cinétiques de nucléation.

Température	Durée	Cristaux max	m	k_0 (s ⁻¹)	k (s ⁻¹)
20°C	507600 s	1	1,4	$3,81 \cdot 10^{-7}$	$4,02 \cdot 10^{-7}$
15,5°C	42024 s	1	1,4	$5,19 \cdot 10^{-6}$	$6,70 \cdot 10^{-6}$
14,5°C	58401 s	1	1,4	$8,95 \cdot 10^{-6}$	$1,04 \cdot 10^{-5}$
13,5°C	106200 s	1	1,4	$2,49 \cdot 10^{-5}$	$4,94 \cdot 10^{-5}$
12,5°C	31518 s	2	1,4	$3,78 \cdot 10^{-5}$	$2,15 \cdot 10^{-4}$
10,5°C	3502 s	10	1,4	$9,23 \cdot 10^{-4}$	$3,49 \cdot 10^{-3}$

Plusieurs remarques importantes constituant un regard critique peuvent être réalisées en observant ces résultats.

Tout d'abord le fait de fixer le paramètre m représentant le nombre moyen de sites actifs de nucléation (impuretés) par goutte à une valeur correspondant à la valeur moyenne des résultats obtenus lors des régressions en laissant ce paramètre libre. Cela peut se justifier par le fait que ce paramètre n'est censé dépendre que du volume des gouttes et des concentrations en protéine et en sel, tous ces paramètres restant fixes dans l'ensemble de nos expériences. Néanmoins, lors des régressions classiques à trois paramètres libres, il est apparu que ce paramètre variait beaucoup, d'une valeur de 0,33, jusqu'à 1,89. De plus, il apparaît dans la littérature (P. Sear, 2014) que ce paramètre est de l'ordre du dixième ou de l'unité et peut donc prendre un grand nombre de valeurs. C'est donc un choix de type arbitraire qui nous a poussé à fixer la valeur de ce paramètre à une valeur moyenne, mais peut-être qu'une autre valeur aurait été tout aussi judicieuse.

Ensuite, une observation concernant le nombre de cristaux apparaissant dans les gouttes. Pour l'expérience à 13,5°C, au cours de laquelle la nucléation est assez rapide et pour laquelle on atteint une valeur finale de f_0 très faible, signifiant que la majeure partie des gouttes ont nucléé, seul un cristal est apparu par goutte. Pour l'expérience à 12,5°C avec une cinétique également assez rapide, seul un, deux voire trois cristaux dans certains cas, sont apparus par goutte. En revanche, dans l'expérience à 10,5°C, bien plus rapide, dans la majorité des gouttes, un grand nombre de cristaux sont apparus pouvant atteindre un nombre de 10 à la fin de l'expérience. Ces apparitions de cristaux étaient soit successives, avec la nucléation d'un cristal, puis d'un second, etc... soit simultanées, avec l'apparition en même temps d'un grand nombre de cristaux. En outre, des expériences réalisées à 9 et 7,5°C étaient tellement rapides que l'utilisation de cette puce microfluidique n'était pas adaptée (la résolution temporelle liée au mouvement de la platine ne

permettait pas de capturer les cinétiques de nucléation). Cependant, une analyse visuelle après nucléation montre qu'un très grand nombre (>10) de cristaux sont apparus dans toutes les gouttes après 15 minutes. Quoi qu'il en soit, cette observation diffère drastiquement de celles à des températures plus élevées, et il se pourrait que cela soit le reflet d'un changement de mécanisme de nucléation. Comme évoqué précédemment, pour des températures éloignées de la séparation liquide-liquide, les fluctuations de concentrations sont faibles et le mécanisme de nucléation favorisé est a priori celui de la théorie classique. En revanche, au fur et à mesure que la température diminue et s'approche de celle correspondant à la séparation liquide-liquide, les fluctuations de concentrations s'intensifient entraînant l'apparition du mécanisme de nucléation en deux étapes avec la formation de zones de forte concentration. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'expérience à 10,5°C ainsi que celles à 9 et 7,5°C, ont vu une nucléation en deux étapes influencée par des fluctuations de concentrations, alors que les autres expériences ont plutôt vu le mécanisme classique de la nucléation. Il est également possible de relier cette hypothèse à l'observation macroscopique du nombre de cristaux observé. En effet, loin de la séparation liquide-liquide, les fluctuations de concentrations étant faibles, la concentration est moyenne et homogène dans la solution, entraînant une probabilité moyenne de nucléation conduisant à peu de cristaux. En revanche, pour une température plus faible, les concentrations de fluctuations sont importantes, donnant naissance à des zones de fortes concentrations, dans lesquelles il est beaucoup plus simple de nucléer et on observe ainsi l'apparition d'un plus grand nombre de cristaux.

Pour approfondir ces observations, il semble intéressant de relier l'évolution des paramètres cinétiques de nucléation, aussi bien homogène k_0 , qu'hétérogène k à différents modèles, comme la théorie classique de la nucléation, ou un modèle permettant d'évaluer les fluctuations de concentration.

III.3.4 Analyse des paramètres cinétiques à l'aide de la théorie classique

Nous avons déjà présenté cette théorie dans la partie comprenant les éléments bibliographiques et avons notamment mis en relief l'expression de la vitesse de nucléation selon la théorie classique :

$$J = 4\pi\rho_N\rho D r^* Z \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \left[\frac{v_1}{\ln S}\right]^2 \left[\frac{\sigma_\infty}{k_B T}\right]^3\right) \quad \text{Eq. III-36}$$

avec :

- J : la vitesse de nucléation
- ρ_N : la densité de sites de nucléation
- ρ : la densité des monomères
- D : la constante de diffusion des monomères
- r^* : le rayon du cluster critique
- Z : le facteur de Zeldovich
- ΔF : l'énergie d'activation pour l'addition d'un monomère à un cluster

- v_1 : le volume moléculaire dans le cristal
- S : la sursaturation
- σ_∞ : la tension interfaciale entre la phase initiale et la phase nucléante
- k_B : la constante de Boltzmann
- T : la température

Cette formule s'applique bien à la vitesse de nucléation homogène k_0 si bien que dans le cadre de la nucléation classique, on peut considérer que $\ln(k_0)$ est proportionnel à $1/(\ln S)^2/T^3$.

Pour appliquer cette formule à la vitesse de nucléation hétérogène, il faut néanmoins prendre quelques précautions. En effet, certains paramètres, volumiques, et surfaciques, dépendent du site de nucléation. Pour la nucléation homogène, ce site est la protéine elle-même donc ces paramètres sont constants. Pour la nucléation hétérogène, la nucléation a lieu sur un site actif de nucléation. Donc ces paramètres dépendent du site actif, notamment de sa forme et de sa rugosité. Ainsi des paramètres tels que le facteur pré-exponentiel ou σ_∞ la tension interfaciale entre la solution et le cluster apparaissant sur un site actif vont dépendre du site actif en question, si bien qu'il est plus judicieux d'écrire :

$$J = \sum_{i=1}^N J_{0,i} \exp \left[-\frac{16\pi}{3} \left(\frac{v_1}{\ln S} \right)^2 \left(\frac{\sigma_{\infty,i}}{k_B T} \right)^3 \right]$$

avec :

- N : le nombre total de sites actifs de nucléation
- $J_{0,i}$: le facteur pré-exponentiel correspondant au i -ième site actif
- $\sigma_{\infty,i}$: la tension interfaciale entre la solution et le cluster nucléant sur le i -ième site actif

Il est néanmoins très compliqué d'estimer le nombre de sites actifs différents ainsi que les propriétés qui leur sont propres, si bien que dans le cadre de ces travaux, afin de simplifier les analyses qui suivent, nous effectuons l'hypothèse selon laquelle les sites actifs de nucléation sont tous identiques, tout en gardant à l'esprit qu'en pratique, ce n'est pas toujours le cas. Nous avons alors dans le cadre de cette hypothèse et de la théorie classique de la nucléation une relation de proportionnalité entre $\ln(k)$ et $1/(\ln S)^2/T^3$.

Nous avons alors tracé les logarithmes népériens des vitesses de nucléation homogène et hétérogène en fonction de $1/(\ln S)^2/T^3$. Les valeurs de sursaturation S ont été calculées avec $C = 40,66$ mg/mL et des données de la littérature (Forsythe et al., 1999) pour la solubilité $C_{\acute{e}q}$ avec :

$$S(T) = \frac{C}{C_{\acute{e}q}(T)} \quad \text{Eq. III-37}$$

Les tracés pour l'ensemble des expériences sont présentés sur les Figure III.31, Figure III.32 et Figure III.33.

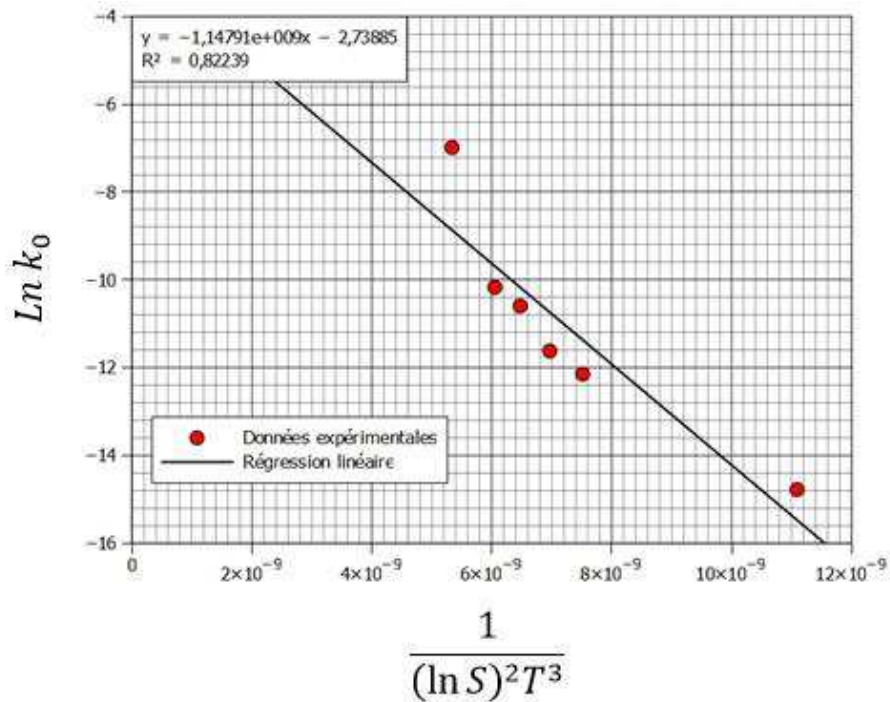


Figure III.31. Tracé des données expérimentales du logarithme de la vitesse de nucléation homogène obtenue à l'aide des régressions de la partie III.3.3 en fonction de $1/(\ln S)^2/T^3$. La CNT prédit une relation linéaire. Le point correspondant à l'expérience à 10,5°C semble s'éloigner de la linéarité.

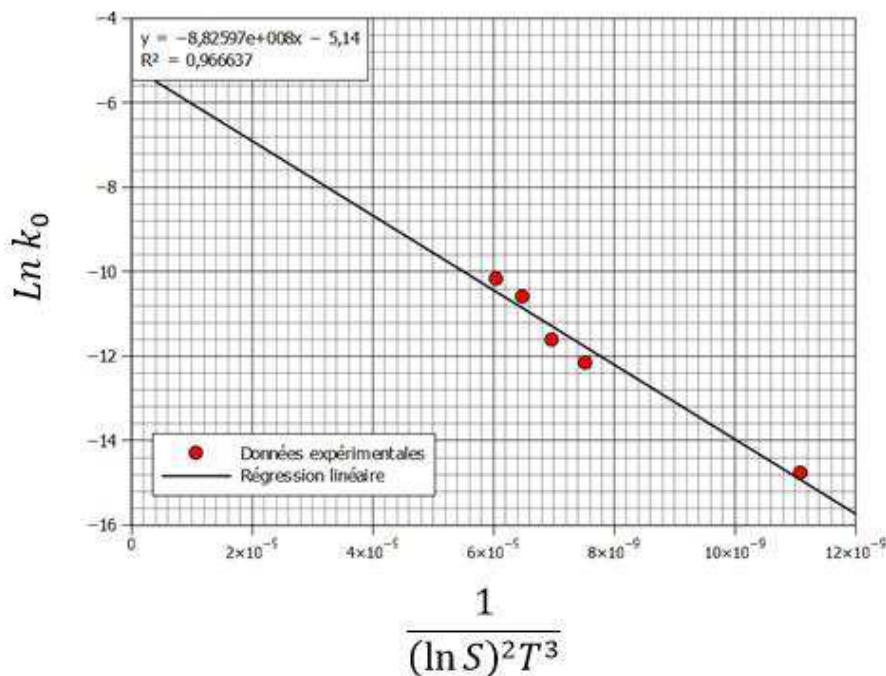


Figure III.32. Tracé des données expérimentales du logarithme de la vitesse de nucléation homogène obtenue à l'aide des régressions de la partie III.3.3 en fonction de $1/(\ln S)^2/T^3$. La CNT prédit une relation linéaire. Le point correspondant à l'expérience à 10,5°C a été enlevé et le coefficient de régression est désormais satisfaisant.

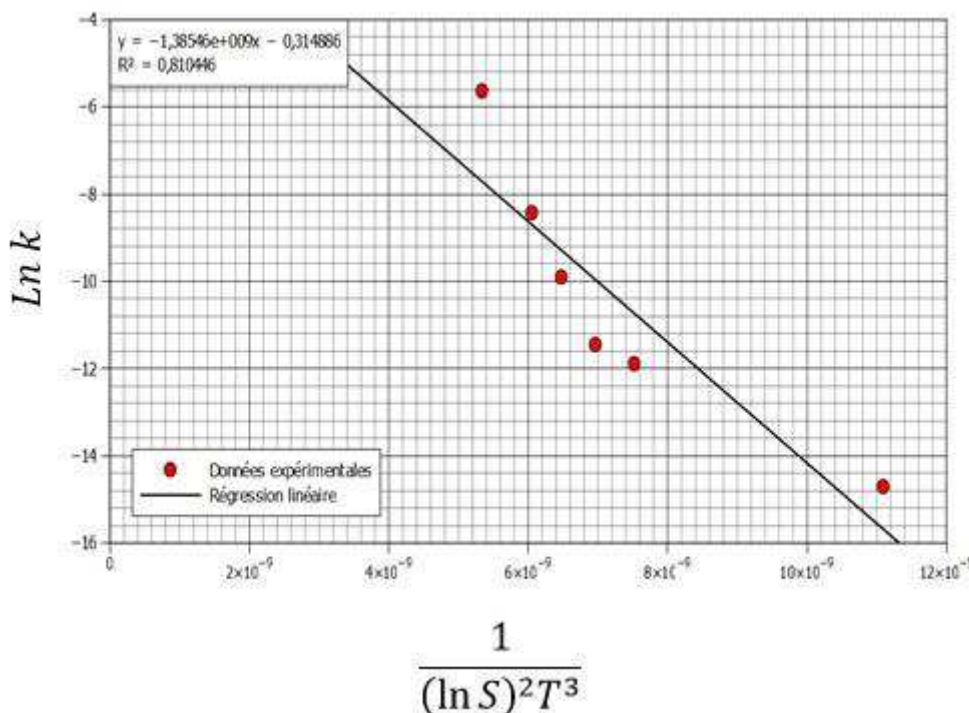


Figure III.33. Tracé des données expérimentales du logarithme de la vitesse de nucléation hétérogène obtenue à l'aide des régressions de la partie III.3.3 en fonction de $1/(\ln S)^2/T^3$. La CNT prédit une relation linéaire. Aucune linéarité n'est constatée peu importe les points expérimentaux considérés.

Il est possible de réaliser quelques remarques au regard de ces graphes. Tout d'abord concernant la vitesse de nucléation homogène, la régression linéaire est plutôt bonne ($R^2 = 0,967$) lorsque l'on ne considère que les températures supérieures ou égales à $12,5^\circ\text{C}$. En revanche, la régression devient mauvaise si l'on considère en plus, le point correspondant à l'expérience à $10,5^\circ\text{C}$. Ceci est en adéquation avec les observations réalisées au préalable décrivant une rupture des tendances expérimentales entre le point à $10,5^\circ\text{C}$ et les autres. Il se pourrait donc que la linéarité de la régression pour les expériences à des températures supérieures à $12,5^\circ\text{C}$ traduisent effectivement un mécanisme de nucléation relevant de la théorie classique et que la rupture pour le point à $10,5^\circ\text{C}$ reflète un changement de mécanisme.

Concernant la vitesse de nucléation hétérogène, la régression linéaire est cette fois-ci mauvaise quels que soient les points expérimentaux considérés ce qui laisse supposer que la nucléation hétérogène ne répond pas à la théorie classique. Ce constat est à relativiser suite à l'hypothèse effectuée selon laquelle tous les sites actifs de nucléation sont identiques.

De plus, nous avons vu précédemment que pour les trois températures les plus élevées, les expériences étaient très longues et qu'il était hasardeux de distinguer deux types de nucléation pour ces expériences au cours desquelles peu de gouttes avaient nucléé. Finalement il faut rester prudent ici à l'observation de ces résultats, mais néanmoins il est envisageable de présenter ici une démarche générale applicable avec des données plus nombreuses et plus précises.

III.3.4.1 Régression des paramètres de nucléation

A l'aide des tracés des Figure III.31 et Figure III.33, il est possible de déterminer des paramètres de la théorie classique de la nucléation. En effet, l'équation Eq. III-36 peut se réécrire :

$$\ln J = \ln A - B \times \frac{1}{(\ln S)^2 T^3} \quad \text{Eq. III-38}$$

Avec A et B les paramètres du modèle. A correspond au facteur pré-exponentiel et se calcule avec :

$$A = 4\pi\rho_N\rho D r^* Z \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. III-39}$$

Le paramètre B est lui relié à l'amplitude de la barrière énergétique à franchir et vaut :

$$B = \frac{16\pi}{3} v_1^2 \left(\frac{\sigma_\infty}{k_B}\right)^3 \quad \text{Eq. III-40}$$

Ces données étant applicables dans le cadre de la théorie classique de la nucléation, nous décidons d'écarter l'expérience à 10,5°C dans cette étude, car nous avons montré qu'elle semblait s'éloigner de la CNT et qu'elle était a priori influencée par des fluctuations de concentrations. De plus, la Figure III.33 illustre que la nucléation hétérogène ne se comporte pas comme le prédit la CNT donc nous étudierons ici uniquement la nucléation homogène. Les paramètres A et B sont alors obtenus avec respectivement l'ordonnée à l'origine et le coefficient directeur de la droites orange de la Figure III.31. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau III.9.

Tableau III.9. Valeurs des paramètres A et B du modèle issu de la théorie classique de la nucléation (Eq. III-38) obtenus par régression à l'aide du tracé de la Figure III.31 sur l'ensemble des expériences mise à part celle à 10,5°C qui ne semble pas répondre à la théorie classique.

A (mL⁻¹.s⁻¹)	B (K³)
1,97.10 ⁸	8,83.10 ⁸

III.3.4.2 Estimation de la tension interfaciale cristal/solution

Il est possible à l'aide de la valeur du paramètre B et de l'équation Eq. III-41, de déterminer une valeur moyenne de la tension interfaciale cristal/solution pour l'ensemble des expériences considérées dans l'obtention du paramètre B . On a en effet :

$$\sigma_\infty = k_B \left(\frac{3B}{16\pi v_1^2}\right)^{1/3} \quad \text{Eq. III-42}$$

Ainsi, à l'aide de la valeur du volume moléculaire du lysozyme en phase cristalline disponible dans la littérature, on trouve une valeur de la tension interfaciale cristal/solution : $\sigma_\infty = 0,15$ mJ/m². Cette valeur est en accord avec les valeurs classiques de tension interfaciale cristal/solution pour

du lysozyme cristallisant en présence de NaCl (Akella et al. 2014) et particulièrement avec les travaux de Akella et al. (Akella et al., 2014) qui reporte une valeur de 0,18 mJ/m² pour une température de 12°C.

III.3.4.3 Estimation de la barrière énergétique à franchir

Il est également possible d'exprimer l'amplitude de la barrière énergétique à franchir lors de la nucléation ΔG^* en fonction du paramètre B et ainsi de la calculer. En effet, on a :

$$\frac{\Delta G^*}{k_B T} = B \times \frac{1}{(\ln S)^2 T^3} \quad \text{Eq. III-43}$$

Ainsi, il est possible de représenter la valeur de cette barrière énergétique en fonction du paramètre moteur d'après la CNT, à savoir la sursaturation. Cette représentation est donnée sur la Figure III.34.

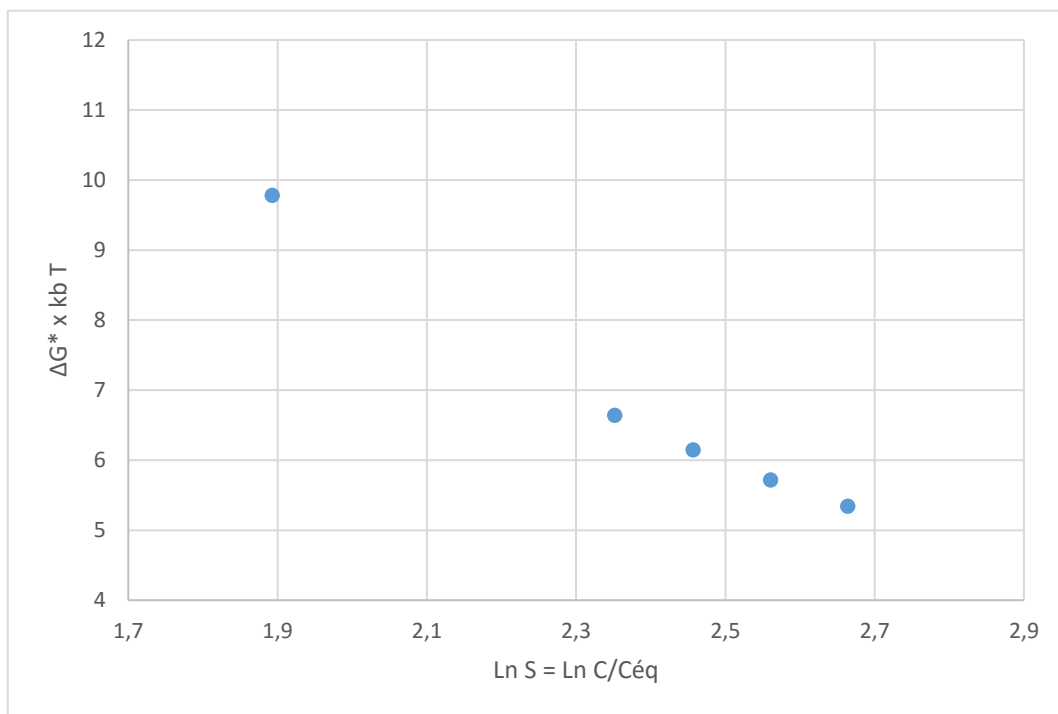


Figure III.34. Représentation de l'amplitude de la barrière énergétique à franchir d'après la CNT en fonction de la sursaturation. L'écart à l'équilibre étant la force motrice de la nucléation selon la CNT, il est normal de voir cette barrière énergétique s'amoinrir au fur et à mesure que la sursaturation augmente.

Il apparaît que l'amplitude de la barrière énergétique diminue lorsque la sursaturation augmente. Ceci est en accord avec le modèle de la théorie classique de la nucléation qui considère que la force motrice de la nucléation d'un point de vue thermodynamique est l'écart à la solubilité. Il est également intéressant de noter que les valeurs présentées ici sont en accord avec les travaux de Akella et al.

III.3.4.4 Estimation de la taille du nucleus critique

Il est désormais possible de calculer la taille du nucleus critique n^* à l'aide de la relation de la CNT reliant n^* et ΔG^* : $\Delta G^* = n^* k_B T \ln S / 2$ (Debenedetti, 1996). En effet, à l'aide de l'équation Eq. III-44, on a :

$$n^* = \frac{2B}{(T \ln S)^3} \quad \text{Eq. III-45}$$

Il est alors de nouveau possible de représenter ce paramètre en fonction de la sursaturation, ce qui est réalisé sur la Figure III.35. Il est à noter que le nombre de molécules d'un nucleus critique diminue lorsque la sursaturation augmente. Il est ainsi plus simple de former un nucleus critique et donc d'observer la formation d'un cristal capable de grossir lorsque la sursaturation est élevée, ce qui est une fois de plus en accord avec la CNT dont la force motrice d'un point de vue thermodynamique est la sursaturation. Les valeurs obtenues sont également en accord avec celles proposées par Akella et al.

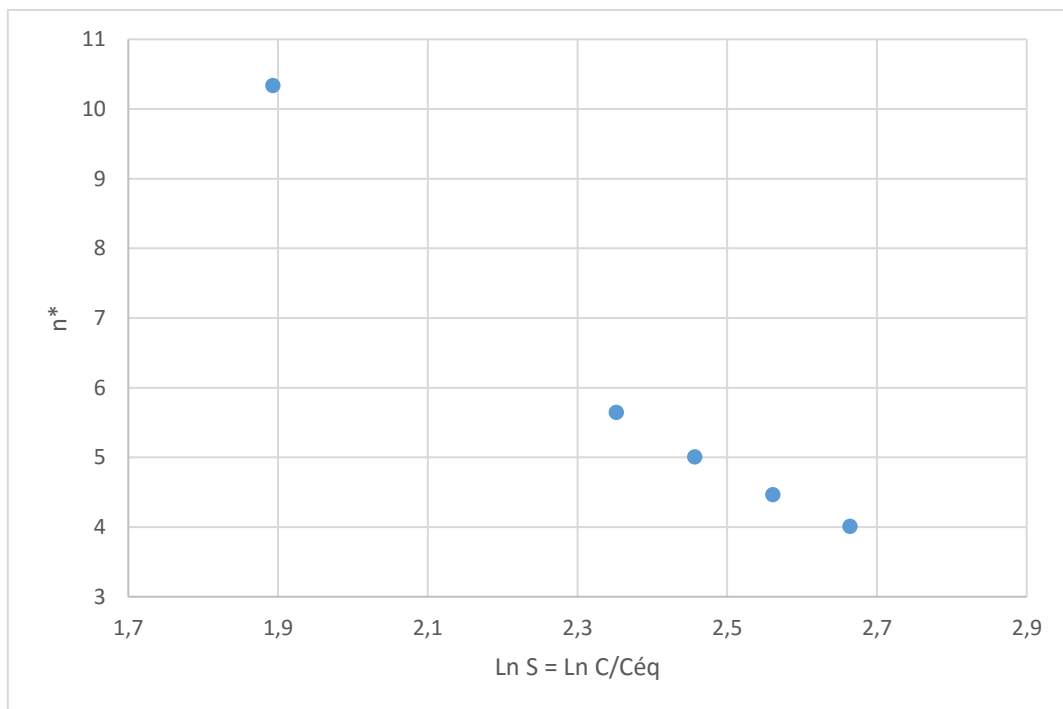


Figure III.35. Evolution du nombre de molécules dans un nucleus critique lors de la nucléation homogène en fonction de la sursaturation. Ce nombre diminue lorsque la sursaturation augmente. Il est ainsi plus facile de former un nucleus critique lorsque la sursaturation est élevée et donc d'observer la formation d'un cristal capable de grossir. Ceci est une fois de plus en accord avec la CNT dont la force motrice d'un point de vue thermodynamique est la sursaturation.

III.3.4.5 Estimation de la densité de sites de nucléation

Les précédents calculs étaient basés sur l'analyse du paramètre B lié à la barrière énergétique à franchir dans le modèle de la théorie classique de la nucléation. Il est également possible d'analyser le paramètre A correspondant au facteur pré-exponentiel afin de calculer la densité de sites de nucléation ρ_N . En effet, d'après l'équation Eq. III-46, on a :

$$\rho_N = \frac{A}{4\pi\rho D r^* Z \exp\left(-\frac{\Delta F}{k_B T}\right)} \quad \text{Eq. III-47}$$

Il est possible de calculer ρ la densité numériques de monomères en solution à l'aide de la concentration C . On a en effet :

$$\rho = \frac{C \cdot N_A}{M_W} \quad \text{Eq. III-48}$$

avec :

- C : la concentration en monomères [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]
- N_A : le nombre d'Avogadro [mol^{-1}]
- M_W : la masse molaire d'un monomère [$\text{mg}\cdot\text{mol}^{-1}$]

Ainsi, pour une concentration en monomères de 40,66 mg/mL, on trouve une valeur pour la densité numérique de monomères : $\rho = 1,70 \cdot 10^{18}$ monomères/mL.

D est la constante de diffusion des monomères. Il est possible de prendre une valeur identique à celle utilisée dans les travaux de Akella et al., soit $D = 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

r^* est le rayon d'un nucleus critique et peut être déterminé à l'aide du nombre de molécules n^* d'un nucleus critique à l'aide de la formule suivante :

$$r^* = \left(\frac{3v_1}{4\pi}\right)^{1/3} n^{*1/3} \quad \text{Eq. III-49}$$

Z est la constante de Zeldovich qui vaut 0,2 d'après les travaux de Akella et al.

Enfin ΔF est l'énergie d'activation nécessaire à l'addition d'un monomère à un cluster. Akella et al. ont montré que cette énergie était d'environ $19k_B T$.

Il est alors possible de calculer la densité numérique de sites de nucléation, et de la représenter en fonction de la sursaturation. Cette représentation est à retrouver sur la Figure III.36.

Si la nucléation était, comme on le suppose depuis le début de l'analyse du paramètre k_0 , homogène, cela signifierait qu'elle interviendrait à partir des molécules en solution. Il serait alors normal de constater que la densité de sites de nucléation ρ_N soit égale à la densité de monomères

en solution, à savoir $\rho = 1,70 \cdot 10^{18}$ monomères/mL. Néanmoins, on constate sur la Figure III.36 que la densité de sites de nucléation est de l'ordre de 10^{10} sites/mL. Il y a par conséquent moins de sites de nucléation que de monomères en solution. Cela souligne, que plutôt que de nucléer dans l'ensemble du volume et sur l'ensemble des monomères disponibles, la nucléation va s'effectuer sur des sites préférentiels, moins nombreux. Ainsi, la nucléation apparaît plutôt comme étant hétérogène, les sites de nucléation pouvant être des impuretés, ou des monomères agrégés ou en interactions formant des zones de sur-concentrations.

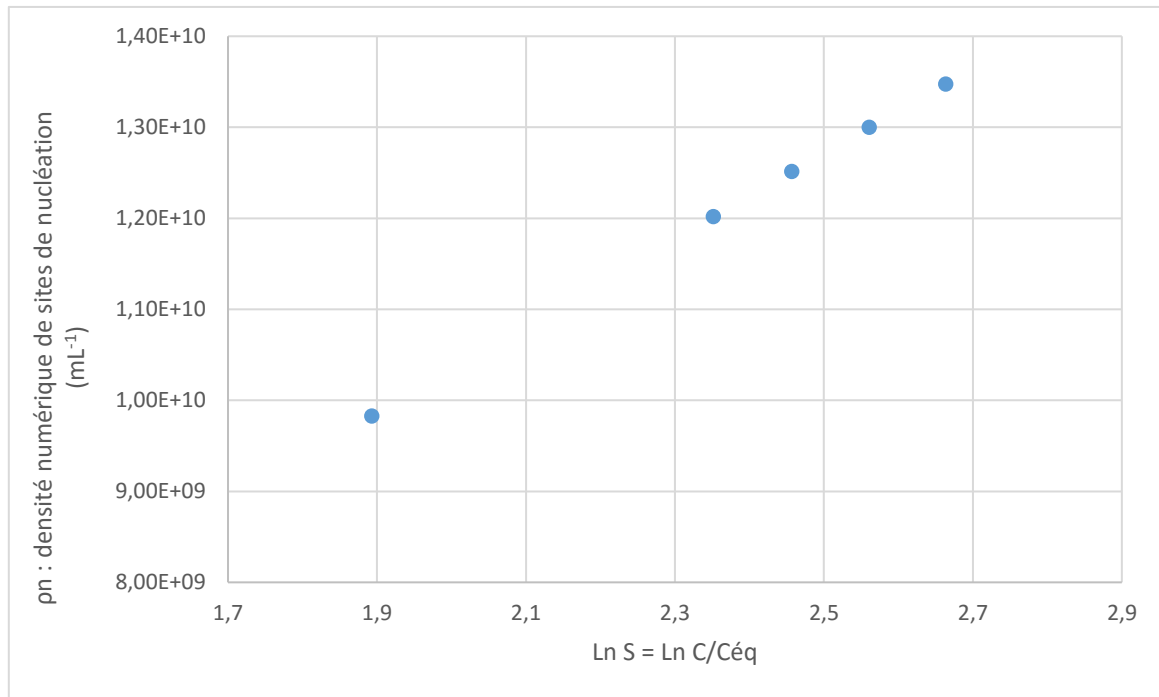


Figure III.36. Densité numérique de sites de nucléation en fonction de la sursaturation. Le nombre de sites de nucléation augmente en fonction de la sursaturation. Si la nucléation était effectivement homogène, elle devrait avoir lieu sur les molécules en solution. Par conséquent, la densité de sites de nucléation devrait correspondre à la densité de molécules en solution $\rho = 1,70 \cdot 10^{18}$ molécules/mL

Nous venons donc de voir grâce à cette analyse des vitesses de nucléation, qu'il est possible, à condition que nos données soient en accord avec la théorie classique de la nucléation, de calculer d'importants paramètres du modèle, tels que la tension interfaciale cristal/solution, la taille du nucleus critique, ou encore la densité numérique de sites de nucléation. Les valeurs de paramètres que nous avons obtenues dans cette étude sont en accord avec des résultats publiés dans la littérature (Akella et al., 2014) ce qui souligne l'efficacité du dispositif expérimental développé pour ces travaux. Au vu des résultats obtenus, qu'il convient néanmoins de prendre avec précaution compte tenu du nombre relativement faible de conditions expérimentales étudiées, il semble que la nucléation ait lieu de manière hétérogène, le nombre de sites actifs de nucléation étant bien inférieur à celui dans le cas de la nucléation homogène. Il se peut que des impuretés catalysent la nucléation, mais aussi que des agrégats non cristallins de monomères se forment en solution, servant alors de site de nucléation. Cette dernière hypothèse est à mettre en parallèle avec la notion de fluctuations de concentration évoquée précédemment, qui semble induire une

rupture du mécanisme de nucléation pour des faibles valeurs de température. L'approche reposant sur la théorie classique n'est donc pas satisfaisante dans ces conditions et c'est pourquoi, il semble intéressant d'étudier ces cinétiques de nucléation en parallèle avec les fluctuations de concentration en solution.

III.3.5 Analyse des paramètres cinétiques à l'aide des fluctuations de concentration

III.3.5.1 Compressibilité isotherme et décomposition spinodale

La frontière de démixtion liquide-liquide, ou limite de stabilité d'une solution homogène, au-delà de laquelle une séparation macroscopique de phase apparaît donnant naissance à une phase liquide dense et une phase liquide diluée est appelée courbe spinodale, ou plus simplement spinodale. Cette limite est difficilement mesurable dans le sens où elle se trouve, dans un diagramme de phase représentant la température en fonction de la concentration, en dessous d'une autre courbe appelée binodale qui correspond à la frontière à laquelle ces deux phases peuvent coexister. Néanmoins, un groupe de recherche (Manno et al., 2004) a développé une méthode basée sur des mesures de DLS et SLS qui permet d'obtenir des valeurs de température pour la spinodale par extrapolation. Les mesures SLS permettent en effet de mesurer la compressibilité isotherme κ_T . En réalisant différentes mesures pour des températures descendantes, il a été montré que cette compressibilité suivait une loi de puissance et divergeait pour une température T_S correspondant à la température de la décomposition spinodale. Il est alors possible d'introduire la notion de température réduite ϵ avec la formule suivante :

$$\epsilon = \frac{T}{T_S} - 1 \quad \text{Eq. III-50}$$

Et d'exprimer la variation de compressibilité isotherme en fonction de la température :

$$\kappa_T = \kappa_0 \epsilon^{-\gamma} \quad \text{Eq. III-51}$$

avec :

- κ_T : la compressibilité isotherme
- κ_0 : un paramètre d'amplitude
- ϵ : la température réduite
- γ : l'exposant de puissance valant 1 dans ce cas

Cette relation procure une méthode expérimentale pour extrapoler la compressibilité dans des domaines où elle n'est normalement pas mesurable à cause de la turbidité de la solution et pour identifier pour différentes concentrations la température spinodale T_S . En effet, la frontière de stabilité thermodynamique (spinodale) se définit par la nullité d'une dérivée seconde de l'enthalpie libre, ce qui peut également s'exprimer par la divergence de la compressibilité isotherme (Kirkwood and Oppenheim, 1961) : $\kappa_T^{-1} = 0$. Dans une mesure SLS, la compressibilité isotherme est reliée à l'intensité diffusée à angle nul $I(0)$ par la formule $\kappa_T = I(0)/(k_B T I_0 H)$ avec k_B la constante de Boltzmann, I_0 une constante dépendant des conditions expérimentales et H

une constante dépendant des propriétés de l'échantillon. Cette dernière relation utilisée avec l'équation Eq. III-51 donne finalement :

$$\frac{\text{cste}}{I(0)} = \frac{1}{T_S} - \frac{1}{T} \quad \text{Eq. III-52}$$

Il est donc possible de tracer $1/I(0)$ en fonction de $1/T$ afin d'obtenir pour une concentration donnée, la valeur de la température spinodale T_S par extrapolation. Ces travaux ont été réalisés avec du lysozyme à pH 4,5 pour différentes concentrations en sel, notamment 3% massique, ce qui correspond à notre cas d'étude et qui nous fournit donc la température spinodale correspondante à une concentration en lysozyme de 40,66 mg/mL ($T_S = -12^\circ\text{C}$).

III.3.5.2 Décomposition spinodale et fluctuations de concentration

D'après le théorème de fluctuation-dissipation, il peut être montré que la compressibilité est proportionnelle à l'amplitude des fluctuations de concentration (Debenedetti, 1996). C'est pourquoi la longueur de corrélation et le temps de relaxation des fluctuations de concentrations sont également censés diverger en approchant la spinodale. Cette relation de divergence pour la longueur de corrélation ξ peut alors s'exprimer de la même façon que pour l'équation Eq. III-51 :

$$\xi = \xi_0 \epsilon^{-\nu} \quad \text{Eq. III-53}$$

avec ν un exposant critique relié à la l'exposant de la compressibilité γ par l'égalité $\gamma = 2\nu - \eta$ (η valant 0 avec l'approximation champ moyen).

S'il est possible comme montré précédemment d'obtenir la compressibilité à partir de mesures SLS, il est possible également de déterminer des valeurs de la longueur de corrélation des fluctuations de concentration ξ à l'aide de mesures DLS, par le biais de mesures de vitesses de relaxation des fluctuations de concentration Γ . Il est possible de retrouver ce développement dans les publications du groupe de Manno (Manno et al., 2004). Ce groupe a ainsi montré la validité de l'équation Eq. III-53 et a également montré que cette équation permettait d'obtenir une bonne régression des données expérimentales avec un exposant différent de l'exposant classique de champ moyen ($\gamma = 2\nu$ donc $\nu = 0,5$ en champ moyen), soit un exposant $\nu = 0,63$. Ainsi, nous avons dans notre cas d'étude, une relation de proportionnalité entre la longueur de corrélation des fluctuations de concentrations ξ , et la température de décomposition spinodale T_S :

$$\xi \propto \left(\frac{T}{T_S} - 1 \right)^{-0,63} \quad \text{Eq. III-54}$$

Nous avons vu précédemment que le paramètre cinétique de nucléation homogène que nous avons déterminé, k_0 , présentait une déviation à la linéarité proposée par la CNT lorsque la température diminuait. Cette déviation pouvant être le reflet de fluctuations de concentrations plus importantes, il semble alors intéressant d'observer l'évolution de ces paramètres cinétiques

avec la longueur de corrélation des fluctuations de concentrations et donc de tracer le logarithme de ces paramètres, en fonction de $(T/T_s - 1)^{-0,63}$. Ce tracé est présenté sur la **Erreur ! Source du r envoi introuvable.**

Nous avons vu qu'en descendant en température, et notamment avec l'expérience à 10,5°C, la vitesse de nucléation s'éloignait de la linéarité prédite par la CNT (cf. Figure III.31), si bien que nous avons dû enlever ce point pour obtenir une régression convenable. Avec le modèle de proportionnalité aux fluctuations de concentration, la régression est de bonne qualité ($R^2 = 0,97$) même en gardant cette donnée expérimentale. Ceci illustre alors de façon explicite les observations de la littérature, qui stipulent que pour des températures bien supérieures à la température spinodale, le mécanisme de nucléation suit la théorie classique car les fluctuations de concentrations ne sont pas assez importantes pour induire de la nucléation. En revanche, lorsque la température est suffisamment réduite et qu'elle s'approche de la température de la décomposition spinodale, ces fluctuations de concentrations deviennent plus importantes et peuvent induire un mécanisme de nucléation rapide, en deux étapes, impossible à prédire par la théorie classique. La nucléation semble donc être induite par deux aspects thermodynamiques, non seulement par l'écart à la solubilité comme cela est usuellement présenté, mais également par l'écart à la décomposition spinodale qui peut induire des fluctuations de concentrations importantes et donner naissance à des zones de forte concentration nucléant plus rapidement.

Enfin, même si ces résultats semblent très intéressants et en accord avec ce qui peut être évoqué dans la littérature, il est toujours intéressant d'avoir un regard critique et se rappeler les remarques effectuées dans la partie III.3.3.7 concernant la justesse des mesures expérimentales. Pour affirmer avec certitude les propos tenus ci-dessus, il conviendrait d'effectuer un nombre d'expériences beaucoup plus important, et de quadriller beaucoup plus finement l'ensemble du diagramme de phase. Ces travaux présentent néanmoins une démarche expérimentale innovante et intéressante.

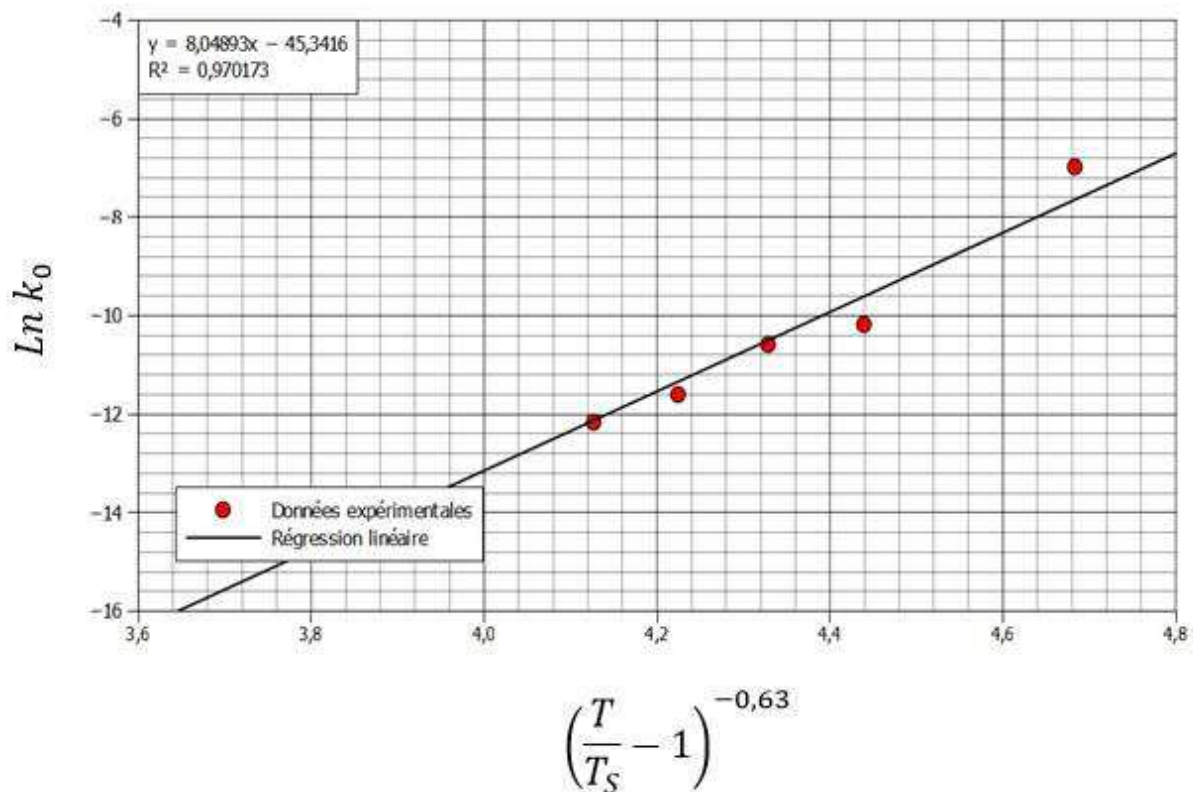


Figure III.37. Tracé des données expérimentales du logarithme de la vitesse de nucléation homogène obtenue à l'aide des régressions de la partie III.3.3 en fonction de $(T/T_s - 1)^{-0,63}$. D'après Manno et al. ce terme est proportionnel aux fluctuations de concentrations de lysozyme. Deux régressions linéaires sont effectuées, une en prenant en compte l'ensemble des points expérimentaux (bleue), l'autre en prenant l'ensemble des points sauf celui correspondant à l'expérience à 10,5°C (orange).

III.3.6 Conclusion des expériences

Nous venons donc de voir dans cette partie consacrée à l'analyse des paramètres cinétiques de nucléation qu'il était possible de calculer des paramètres importants du modèle de la théorie classique à l'aide de régressions des paramètres expérimentaux. Nous avons montré qu'il est possible de calculer les paramètres A et B du modèle qui sont respectivement le coefficient pré-exponentiel relié à la cinétique d'attachement d'un monomère à un cluster existant et le paramètre tenant compte de la barrière énergétique à franchir pour former un nucleus. Ces paramètres permettent eux-mêmes de calculer des termes plus précis du modèle tels que l'amplitude de la barrière énergétique, le nombre de molécules dans le nucleus critique, la tension interfaciale cristal-solution ou encore la densité de sites de nucléation. Il est alors possible de comparer la densité de sites de nucléation à la densité de monomères en solution pour vérifier le caractère homogène ou hétérogène de la nucléation. Nous avons alors pu conclure en affirmant que la nucléation était dans notre cas d'étude toujours hétérogène, probablement catalysée par des impuretés, ou des agrégats de monomères.

Les cinétiques de nucléation ont été obtenues à l'aide d'un dispositif microfluidique innovant, contrôlé en température, dans lequel il est possible de stocker un grand nombre de gouttes identiques. La mesure du nombre de gouttes n'ayant pas nucléé en fonction du temps permet à l'aide du modèle proposé par Bourgeois, un modèle de nucléation découlant de celui de Pound et La Mer, de calculer pour une température donnée ces vitesses de nucléation. Nous avons alors pu étudier l'évolution de ces vitesses en fonction d'un paramètre proposé par la théorie classique de la nucléation et avons constaté que cette théorie ne décrivait pas avec exactitude le comportement de gouttes dont la température se rapproche de la température de décomposition spinodale. Aussi, cela nous a permis d'effectuer une autre approche en s'intéressant à l'évolution de ces paramètres en fonction de la longueur de corrélation des fluctuations de concentration. Nous nous sommes alors aperçus que cette dernière approche semblait très intéressante car elle permettait de décrire avec plus de précision le comportement de la nucléation en présence d'importantes fluctuations de concentration (à l'approche de la décomposition spinodale). Il est possible d'émettre l'hypothèse que ces fluctuations de concentration forment des agrégats catalysant la nucléation et la rendant alors hétérogène comme cela a été constaté en analysant les densités de sites de nucléation. Ainsi, si la nucléation est bien influencée par l'écart à la solubilité, elle semble également influencée par l'écart à la spinodale. Cette observation en terme de cinétiques de nucléation a été confirmée d'un point de vue macroscopique. En effet pour des températures éloignées de la spinodale, seul un cristal apparaît par goutte avec une vitesse faible, alors que pour une température plus basse, une dizaine de cristaux apparaissent rapidement illustrant cette différence de comportement. Pour confirmer ces propos il conviendrait donc de réaliser un plus grand nombre d'expériences, à différentes températures et différentes concentrations. Néanmoins, nous pouvons affirmer que le dispositif expérimental microfluidique développé est original et innovant pour l'étude des cinétiques de nucléation.

Les observations de nucléation réalisées à l'aide de ce dispositif restent néanmoins macroscopiques car elles reposent sur l'observation de l'apparition de cristaux et l'utilisation de modèles statistiques sans réellement observer ce qu'il se passe à l'échelle moléculaire. Nous avons malgré tout obtenus des résultats intéressants et observés des cinétiques et des comportements différents selon la position dans le diagramme de phase. C'est pourquoi il est intéressant dans le but de différencier des mécanismes de nucléation d'utiliser une méthode complémentaire permettant d'avoir des informations à l'échelle microscopique, sur l'arrangement moléculaire au cours de la nucléation et de voir s'il est possible de mesurer des structures associées aux différentes cinétiques observées, et c'est le but de la prochaine partie consacrée au couplage d'un dispositif microfluidique et d'une technique d'analyse puissante, la diffusion de rayons X aux petits angles.

Chapitre IV
ECHELLE MICROSCOPIQUE
DIFFUSION DE RAYONS X
AUX PETITS ANGLES

La diffusion de rayons X aux petits angles, ou SAXS pour Small-Angle X-ray Scattering est une technique largement utilisée afin d'obtenir des informations dans une échelle allant de quelques nanomètres à quelques centaines de nanomètres pour étudier la structure de la matière molle et des macromolécules biologiques (Feigin and Svergun, 1987; Glatter and Kratky, 1982). Son potentiel a été démontré pour diverses applications telles que des études sur la nucléation de cristaux de glycine (Chattopadhyay et al., 2005), sur la nucléation de silice colloïdale (Pontoni et al., 2004), pour la détermination de masses moléculaire de protéines (Fischer et al., 2010) ou encore pour étudier des interactions entre protéines en solution avant la cristallisation (Ducruix et al., 1996), des structures de protéines (Mertens and Svergun, 2010) ou même des changements de conformations (Durchschlag et al., 1991). Des mesures SAXS ont également été utilisées pour déterminer le second coefficient du viriel A_2 , un paramètre thermodynamique pouvant caractériser des interactions entre protéines et permettant de prédire des conditions de cristallisation grâce à des calculs de solubilité.

Cependant, le volume nécessaire pour chacune de ces mesures, ainsi que le nombre important d'expériences nécessaires afin d'obtenir des informations statistiquement fiables, rend cette technique analytique moins évidente lorsqu'il faut travailler avec des composés onéreux. Ainsi, afin de répondre à ce problème en utilisant une quantité moindre de produit, il est possible de trouver dans la littérature des études qui visent à coupler le SAXS avec de la microfluidique en phase continue pour analyser des comportements de phase (Khvostichenko et al., 2013), des auto-assemblages de surfactants (Martin et al., 2010) ou de macromolécules biologiques (Brennich et al., 2011), ou encore observer la nucléation et la croissance de nanoparticules d'or (Polte et al., 2010). Néanmoins, la microfluidique en phase continue présente quelques inconvénients, notamment lorsque les fluides utilisés voient leurs propriétés modifiées après le mélange. De plus, dans le cas d'étude de cristallisation en microfluidique en phase continue, la présence d'une phase qui nucléée et la possibilité de diffuser le long d'un canal peut inhiber la nucléation et la croissance d'autres phases. Enfin, dans le cas d'évènements rares de nucléation, il est fort possible que ces évènements se passent en dehors du faisceau de rayons X si le volume de l'échantillon est trop important.

Ainsi, il semble intéressant dans le but d'étudier des phénomènes de nucléation et plus largement de cristallisation, d'utiliser la technologie de microfluidique de gouttes. Dans de tels dispositifs, des centaines de gouttes identiques peuvent être générées et se comportent comme des microréacteurs de cristallisation. Il est possible d'ajuster finement leur taille pour obtenir sensiblement une taille identique à celle du faisceau de rayons X et donc, ne rater aucun évènement de nucléation. De plus, le fait d'exposer des gouttes en mouvement et de travailler avec des cinétiques de nucléation qui peuvent être rapides, nous oblige à avoir des temps d'acquisition très rapides, et c'est pourquoi une très grande intensité du faisceau de rayons X est nécessaire, ce qui implique de travailler avec un rayonnement synchrotron.

Il a donc été choisi dans le cadre de ces travaux, d'étudier des phénomènes de cristallisation en développant et utilisant des dispositifs expérimentaux couplant de la microfluidique de gouttes avec de la diffusion de rayon X aux petits angles issues d'une source synchrotron. Dans cette

partie, dans un premier temps, le principe général ainsi que la théorie sur laquelle repose le SAXS seront exposés. Nous poursuivrons avec une présentation des lignes synchrotron BM29 à l'ESRF et SWING à SOLEIL sur lesquelles le travail a été effectué. Enfin, les études menées et les résultats obtenus sur chacune de ces lignes seront présentés.

IV.1 Principe et théorie de la technique SAXS

Dans le cadre de ces travaux, nous utilisons une source de rayonnement synchrotron de l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) à Grenoble et de SOLEIL à Saclay. Dans ces grands instruments, des électrons sont accélérés circulairement dans un premier anneau puis injectés dans un second anneau plus grand dit de stockage. Dans ce second anneau, ils sont de nouveau accélérés à l'aide d'électro-aimants ce qui engendre alors une onde électromagnétique appelée rayonnement synchrotron qui peut être récupéré à différents endroits de l'anneau dans ce qui s'appellent des lignes de lumière. Celles-ci sont généralement composées de trois parties, une première partie « optique » où se trouve diverses lentilles, miroirs et monochromateurs qui permettent de traiter le faisceau incident et de lui donner les caractéristiques voulues (longueur d'onde, taille, divergence, énergie), une deuxième partie expérimentale où est récupéré le faisceau traité et où est positionné l'échantillon à analyser et une troisième partie de contrôle à l'abri du rayonnement dans laquelle peuvent être lancées les acquisitions de données. Le nombre de lignes de lumière sur une installation dépend bien entendu de la taille de celle-ci, si bien qu'on en dénombre 43 à l'ESRF et 28 à SOLEIL.

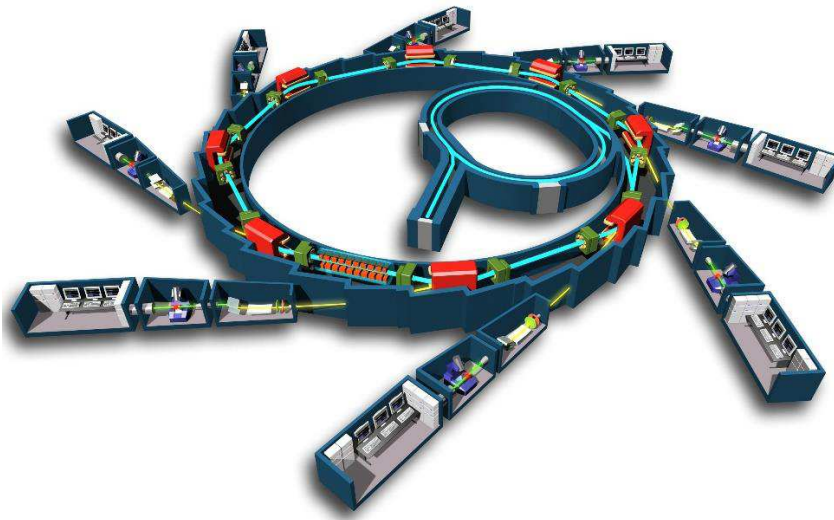


Figure IV.1. Schéma d'une installation à rayonnement synchrotron sur lequel apparaissent les deux anneaux d'accélération, les électro-aimants et les trois parties des lignes de lumière

Comme précisé précédemment, la méthode d'analyse retenue dans ces travaux est la diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS). C'est une technique d'analyse non destructive permettant d'étudier des structures à l'échelle du nanomètre. Son utilisation repose sur l'envoi d'un faisceau de rayons X à travers un échantillon contenant la matière à étudier, comme par exemple des protéines. Les photons présents dans le faisceau incident vont interagir sur le nuage électronique de l'échantillon

et être diffusés dans toutes les directions de l'espace en gardant la même énergie et la même longueur d'onde, on parle de diffusion élastique. Ceci peut être décrit en considérant que les ondes électromagnétiques mettent en mouvement le nuage électronique par rapport au noyau de l'atome créant alors un dipôle vibrant rayonnant lui-même des ondes de même fréquence.

Les photons diffusés sont alors récupérés sur un détecteur à deux dimensions et les figures de diffusion ainsi obtenues seront caractéristiques de l'échantillon étudié. La distance entre l'échantillon et le détecteur déterminera la gamme d'angles de diffusion accessibles et sera par conséquent importante dans le cas de lignes SAXS où l'on souhaite s'intéresser aux petits angles.

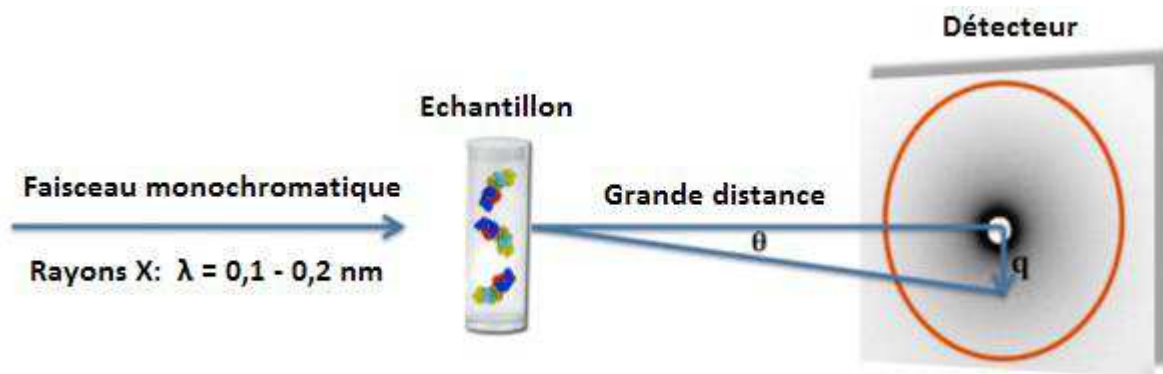


Figure IV.2. Schéma de principe de la diffusion de rayons X aux petits angles. Le faisceau traverse l'échantillon et se retrouve diffusé avec différents angles. Les intensités diffusées en fonction de l'angle de diffusion sont mesurées à l'aide d'un détecteur placé à grande distance

IV.1.1 Considérations mathématiques en milieu dilué

Lors d'une expérience SAXS classique, un faisceau monochromatique de rayons X est envoyé sur l'échantillon avec un vecteur incident \vec{s}_0 .

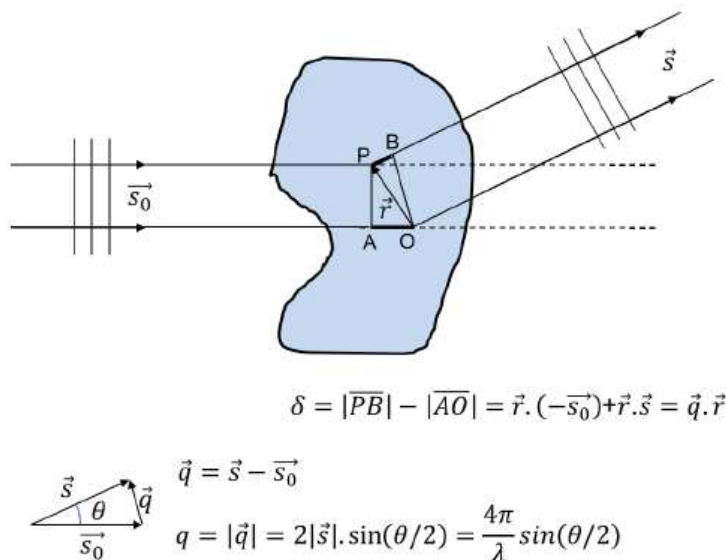


Figure IV.3. Considérations géométriques lors de la diffusion d'une onde par une particule. Le faisceau incident frappe la particule et se retrouve diffusé, produisant un faisceau sortant.

L'intensité diffusée est alors récupérée en fonction de l'angle de diffusion θ . Comme il s'agit de diffusion élastique, l'énergie de l'onde est conservée, si bien que le module du vecteur d'onde diffusé $|\vec{s}|$ est égal à celui du vecteur d'onde incident $|\vec{s}_0|$. Ainsi, le paramètre approprié pour étudier l'interaction est le vecteur de diffusion $\vec{q} = \vec{s} - \vec{s}_0$ qui peut être relié à l'angle de diffusion avec l'équation suivante :

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad \text{Eq. IV-1}$$

La variation de l'amplitude de diffusion avec l'angle de diffusion peut être reliée à la distribution de densité électronique $\rho(\vec{r})$ du diffuseur par une transformée de Fourier. $\rho(\vec{r})$ est le nombre d'électrons par unité de volume à la position \vec{r} . Un élément de volume dV à la position \vec{r} contient $\rho(\vec{r})dV$ électrons. Alors l'amplitude de diffusion de l'ensemble du volume irradié V est donnée par :

$$A(\vec{q}) = A_e \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad \text{Eq. IV-2}$$

Avec A_e l'amplitude diffusée par un électron.

L'intensité diffusée d'une particule en fonction du vecteur de diffusion $I_0(\vec{q})$ est le produit de l'amplitude $A(\vec{q})$ et de son complexe conjugué $A^*(\vec{q})$:

$$I_0(\vec{q}) = A(\vec{q}) \cdot A^*(\vec{q}) = I_e \int_V \int_V \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}') e^{-i\vec{q}(\vec{r}-\vec{r}')} d\vec{r} d\vec{r}' \quad \text{Eq. IV-3}$$

Avec I_e l'intensité diffusée par un électron (Laue, 1960).

Dans la plupart des cas, lors d'études SAXS sur des protéines, il est possible d'émettre les hypothèses suivantes :

1. Les particules sont statistiquement isotropes et aucun ordre à longue distance existe.
2. Les particules sont intégrées dans une matrice (buffer, solvant...) qui est considérée comme un milieu homogène de densité électronique constante ρ_0 . Ainsi la densité électronique des équations (Eq. IV-2) et (Eq. IV-3) doit être remplacée par la différence de densité électronique $\Delta\rho = \rho - \rho_0$.

Dans ce cas, la moyenne selon toutes les directions conduit à la formule fondamentale de Debye :

$$\langle e^{-i\vec{q}\vec{r}} \rangle_{\Omega} = \frac{\sin(qr)}{qr} \quad \text{Eq. IV-4}$$

Et par conséquent l'équation (Eq. IV-3) se réduit à :

$$I_0(\vec{q}) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) \frac{\sin(qr)}{qr} r^2 dr \quad \text{Eq. IV-5}$$

L'équation (Eq. IV-5) est la formule la plus commune pour les figures de diffusion de quelconque système qui obéit aux deux hypothèses mentionnées. $\gamma(r)$ est la fonction de corrélation (Debye and Bueche, 1949), ou fonction caractéristique (Porod, 1951). Elle peut être obtenue par une transformée de Fourier inverse avec :

$$\gamma(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I_0(\vec{q}) q^2 \frac{\sin(qr)}{qr} dq \quad \text{Eq. IV-6}$$

Pour $q = 0$ et $r = 0$, comme le facteur de Debye vaut 1, les équations (Eq. IV-5) et (Eq. IV-6) peuvent se simplifier en :

$$I_0(0) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) r^2 dr \quad \text{Eq. IV-7}$$

$$\gamma(0) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty I_0(\vec{q}) q^2 dq = V_p \Delta\rho^2 \quad \text{Eq. IV-8}$$

En réalité, à cause du faisceau incident, il est impossible expérimentalement d'accéder aux intensités diffusées à $q = 0$. C'est pourquoi, il est courant d'utiliser plutôt l'approximation de Guinier aux petits angles.

IV.1.2 Loi de Guinier et rayon de giration

Dans le domaine des faibles q , soit lorsque $qr \ll 1$, un développement limité du facteur de Debye donne :

$$\frac{\sin(qr)}{qr} = 1 - \frac{(qr)^2}{3!} + \frac{(qr)^4}{5!} - \dots \quad \text{Eq. IV-9}$$

Ainsi, l'équation (Eq. IV-5) se réduit à :

$$I_0(\vec{q}) = 4\pi \int_0^\infty \gamma(r) \left(1 - \frac{(qr)^2}{6} + \dots\right) r^2 dr \cong I_0 \left(1 - \frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad \text{Eq. IV-10}$$

Et comme lorsque $x \ll 1$ on a $e^{-x} \cong 1 - x$, finalement, l'équation (Eq. IV-10) peut s'écrire :

$$I_0(\vec{q}) \cong I_0 \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad \text{Eq. IV-11}$$

Cette formule est la loi de Guinier qui est communément utilisée en analyse SAXS puisqu'elle permet d'obtenir le rayon de giration de la particule R_g ainsi que l'intensité diffusée à angle nul I_0 sans aucune hypothèse sur la taille et la structure interne des particules étudiées. Le rayon de giration est la moyenne quadratique des distances au centre de masse de la particule. Ainsi, pour une particule sphérique de densité uniforme et de rayon R , on a :

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R$$

IV.1.3 Particules en interaction

Dans les parties précédentes, nous nous sommes intéressés à la diffusion d'une unique particule ou de particules en milieu dilué, sans organisation à longue distance. Dans de telles solutions, la figure de diffusion totale est simplement obtenue en additionnant les contributions individuelles des particules. Ce n'est pas le cas lorsque l'on considère des solutions plus concentrées dans lesquelles vont apparaître des effets liés aux potentiels d'interaction entre particules.

Dans le cas d'un système de volume V contenant N particules identiques quasi-sphériques, l'intensité totale diffusée est le produit d'un terme propre à une particule $I_0(q)$ (l'interférence intra-particule), et d'un terme inter-particules qui doit considérer tous les arrangements possibles des particules en solution. Ce dernier est représenté par le facteur de structure $S(q)$. Ainsi, pour des solutions non diluées, l'intensité diffusée s'exprime :

$$I(q) = \frac{N}{V} \cdot I_0(q) \cdot S(q) = \frac{N}{V} \cdot \Delta n_e^2 \cdot P(q) \cdot S(q) \quad \text{Eq. IV-12}$$

Avec $P(q)$ le facteur de forme des particules, correspondant à l'intensité diffusée par une seule particule, normalisée par le nombre d'électrons d'excès d'une particule, ou contraste entre le solvant et la particule :

$$P(q) = \frac{I_0(q)}{I_0(0)} = \frac{I_0(q)}{\Delta n_e^2} \quad \text{Eq. IV-13}$$

Pour un système contenant des particules identiques, quasi-sphériques de rayon R , le facteur de structure $S(q)$ a été donné par Guinier et Fournet (Guinier and Fournet, 1955):

$$S(q) = 1 + \sum_k \sum_{j \neq k} \cos(\vec{q} \cdot \vec{r}_{jk}) \quad \text{Eq. IV-14}$$

Avec j et k qui représentent des centres de diffusions dans différentes particules.

Afin de calculer le facteur de structure, il est nécessaire d'introduire une fonction de distribution radiale (ou fonction de corrélation de paires) $g(r)$. Dans un système de particules identiques,

cette fonction décrit la façon dont la densité varie en fonction de la distance à une particule de référence. C'est une mesure de la probabilité de trouver une particule à une distance r d'une particule prise comme référence. Cette fonction a les propriétés suivantes :

- Pour $r < 2R$, $g(r) = 0$.
- Pour $r \gg 2R$, $g(r) = 1$

Guinier et Fournet ont utilisé cette fonction de corrélation de paires afin d'exprimer la double somme de l'équation (Eq. IV-14), pour obtenir finalement la forme usuelle du facteur de forme :

$$S(c, q) = 1 + \frac{N}{V} \int 4\pi r^2 (g(r) - 1) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad \text{Eq. IV-15}$$

IV.1.4 Interactions entre protéines

Des macromolécules en solution interagissent entre elles par le biais d'interactions faibles, électrostatiques et Van der Waals, mais aussi par d'autres forces plus complexes comme les liaisons hydrogène ou les interactions hydrophobe ou d'hydratation. Ce sont des interactions de moyenne distance, de quelques angströms à quelques dizaines d'angströms et chacune dépend des conditions physico-chimiques du système. Le potentiel d'interaction $u(r)$ pour une paire de protéines dans une solution saline éloignées d'une distance r peut s'exprimer (Curtis et al., 1998) par la somme des potentiels suivants :

$$u(r) = u_{hs}(r) + u_c(r) + u_{vdW}(r) + u_{os}(r) + u_{SA}(r) \quad \text{Eq. IV-16}$$

Avec :

- $u_{hs}(r)$, le potentiel de sphère dure lié à l'effet de volume exclu. Il reflète l'impossibilité pour deux molécules de s'interpénétrer.
- $u_c(r)$, le potentiel de Coulomb d'écrantage. Pour des solutions monodisperses, les charges sont identiques pour toutes les particules et le potentiel résultant est alors négatif.
- $u_{vdW}(r)$, le potentiel d'attraction de Van der Waals.
- $u_{os}(r)$, le potentiel de déplétion lié à l'effet de volume exclu causé par les ions de sel.
- $u_{SA}(r)$, le potentiel prenant en compte l'auto-assemblage des protéines.

Un facteur de structure général doit prendre en considération l'ensemble des potentiels d'interaction décrits ici. Cependant, des études sur le potentiel d'interaction total de protéines en solutions salines ont montré qu'en fonction de la concentration en sel, les interactions ne sont dominées par seulement qu'un ou deux de ces potentiels, et il est par conséquent possible de simplifier le potentiel total (Tardieu et al., 1999). $u_{hs}(r)$, $u_c(r)$ et $u_{vdW}(r)$ comme un potentiel de sphères dures de Yukawa $u_Y(r)$ caractérisé par trois paramètres : le diamètre de la sphère d , la largeur σ et la profondeur J du puit de potentiel.

$$u_Y(r) = \begin{cases} +\infty, & r < d \\ J \left(\frac{d}{r}\right) \exp\left(-\frac{r-d}{\sigma}\right), & r > d \end{cases} \quad \text{Eq. IV-17}$$

Pour des interactions coulombiennes répulsives (Verwey and Overbeek, 1999):

$$J = \frac{\left(\frac{Z_p^2}{d}\right) L_B}{(1 + 0,5\kappa d)^2} \quad \text{Eq. IV-18}$$

Avec $L_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 k_B T}$ la longueur de Bjerrum, $\kappa = \sqrt{4\pi L_B I}$ l'inverse de la longueur d'écrantage de Debye-Hückel, I étant la force ionique et Z_p la charge d'une particule.

Pour des grandes particules sphériques dans un solvant aqueux, le potentiel de Van der Waals peut s'écrire (Israelachvili, 2011):

$$u_{vdw}(r) = -\frac{A}{12} \left[\frac{1}{x^2 - 1} + \frac{1}{x^2} + 2 \ln \left(1 + \frac{1}{x^2} \right) \right] \quad \text{Eq. IV-19}$$

Avec $x = r/d$ et A la constante de Hamaker. Ce potentiel diverge lorsque r est égal au diamètre, par conséquent, une condition de protection stérique doit être ajoutée pour éviter cette divergence. Pour une protéine comme le lysozyme, la constante de Hamaker est calculée et vaut $2,86k_B T$.

Il est possible de relier la fonction de corrélation totale $h(r_{12}) = 1 - g(r_{12})$ et la fonction de corrélation directe $c(r_{12})$ à l'aide de l'équation de Ornstein-Zernike :

$$h(r_{12}) = c(r_{12}) + N/V \int h(r_{23})c(r_{13})d r_3 \quad \text{Eq. IV-20}$$

La fonction de corrélation totale $h(r_{12})$ est une mesure de l'influence d'une particule 1 sur une particule 2 à une distance r_{12} et peut être vue comme une somme de deux contributions. Une contribution directe donnée par la fonction de corrélation directe $c(r_{12})$ et une contribution indirecte due à l'influence de la particule 1 sur une particule 3, qui va elle-même influencer en retour la particule 2. Ainsi, cette contribution indirecte est moyennée sur toutes les positions probables de la particule 3.

Enfin, en utilisant l'approximation de Percus-Yevick qui fait le lien entre les fonctions de corrélation et le potentiel d'interaction de paires, il est possible d'obtenir une expression du facteur de structure :

$$S(q) = \frac{1}{1 - \frac{N}{V} FTc(q)} \quad \text{Eq. IV-21}$$

Avec $FTc(q)$ la transformée de Fourier de la fonction de corrélation directe $c(q)$.

Dans le cas de solutions diluées, où lorsque seules les interactions binaires sont importantes, la fonction de corrélation de paires $g(r)$ est reliée directement au potentiel d'interaction $u(r)$:

$$g(r) \cong \exp\left(\frac{-u(r)}{k_B T}\right) \quad \text{Eq. IV-22}$$

Ainsi, en utilisant le développement limité du facteur de Debye, lorsque $qr \ll 1$, et l'équation ci-dessus, l'équation (Eq. IV-15) peut alors s'exprimer :

$$\begin{aligned} S(c, q \rightarrow 0) &= 1 + 4\pi \frac{N}{V} \int \left(\exp\left(\frac{-u(r)}{k_B T}\right) - 1 \right) \left[1 - \frac{(qr)^2}{6} \right] r^2 dr \\ &= 1 - 2\phi A_2 \left(1 - \frac{1}{6} q^2 d_{eff}^2 \right) \end{aligned} \quad \text{Eq. IV-23}$$

Avec :

$$A_2 = \left(\frac{2\pi}{V_p} \right) \int \left(\exp\left(\frac{-u(r)}{k_B T}\right) - 1 \right) r^2 dr \quad \text{Eq. IV-24}$$

Et :

$$d_{eff}^2 = \frac{\int \left(\exp\left(\frac{-u(r)}{k_B T}\right) - 1 \right) r^4 dr}{\int \left(\exp\left(\frac{-u(r)}{k_B T}\right) - 1 \right) r^2 dr} \quad \text{Eq. IV-25}$$

De plus, le facteur de structure pour des angles de diffusion tendant vers 0, $S(c, q \rightarrow 0)$ peut aussi être relié à la pression osmotique Π d'une solution (Fournet et Guinier 1955) :

$$S(c, q \rightarrow 0) = \frac{RT}{M} \left(\frac{\partial \Pi}{\partial c} \right)^{-1} \quad \text{Eq. IV-26}$$

Avec R la constante des gaz parfaits et Π la pression osmotique pouvant également être reliée au second coefficient du viriel A_2 avec :

$$\Pi = c \frac{RT}{M} (1 + A_2 c + A_3 c^2 + \dots) \quad \text{Eq. IV-27}$$

Ainsi, il est possible de déterminer expérimentalement le second coefficient du viriel à l'aide d'une extrapolation du facteur de structure lorsque l'angle de diffusion q tend vers 0 :

$$\frac{1}{S(c, q \rightarrow 0)} = 1 + 2MA_2c + o(c^2) \quad \text{Eq. IV-28}$$

Des travaux récents (Finet et al., 2004) ont utilisé le calcul du second coefficient du viriel dans le but de déterminer des diagrammes de phase et des interactions entre protéines en solution en fonction de concentrations en sel. Un travail similaire avec une explicitation du calcul sera présenté dans le paragraphe IV.3.2.

IV.2 Présentation des lignes synchrotron

Dans le cadre de ce projet, les études SAXS ont eu lieu soit sur des gouttes en mouvement, soit sur des gouttes statiques mais à des intervalles de temps courts. Par conséquent, il était nécessaire d'avoir une intensité de faisceau élevée pour avoir assez de signal sur un temps d'exposition court. Ainsi, les équipements SAXS de laboratoire ne sont pas appropriés et il a fallu se diriger sur des lignes SAXS de source synchrotron. Deux lignes ont été retenues afin d'y mener des expériences qui seront présentées par la suite. Il s'agit de la ligne BM29 à l'ESRF et de la ligne SWING à SOLEIL.

IV.2.1 Ligne BM29 à l'ESRF

La ligne BM29 de l'ESRF à Grenoble, sous la responsabilité de Petra Pernot, est une ligne dédiée aux expériences SAXS de macromolécules biologiques dans le but de déterminer leur structure tridimensionnelle dans un état naturel. Les molécules communément étudiées sont des protéines, des acides nucléiques (ADN, ARN, peptides...), des complexes macromoléculaires, des lipides, des protéines membranaires (et surfactants), des polymères synthétiques, des virus, etc. La cabine expérimentale comporte deux environnements échantillons, un mode robot grâce auquel les solutions à étudier sont automatiquement prélevées et injectées dans un capillaire en quartz de 1,8mm de diamètre et de quelques dizaines de microns d'épaisseur, et un mode avec HPLC en ligne pour obtenir des données SAXS directement en sortie de colonne, après purification. Le capillaire se trouve dans une cellule dans laquelle le vide est établi afin d'obtenir un signal le moins bruité possible. Les solutions peuvent être étudiées à différentes conditions physico-chimiques (température, buffer, pH).

Cette ligne a par exemple été utilisée récemment pour étudier des micelles de β -caséine bovine (Cragnell et al., 2017), des changements de conformation structurale de phytochromes (Björling et al., 2016) ou encore des structures quaternaires de protéines tétraédriques (Pérard et al., 2016).

Dans le cadre du projet ANR CNOC (projet JC Teychené), une collaboration a été établie avec les spécialistes de la ligne BM29 afin de développer un dispositif microfluidique pouvant être utilisé sur la ligne. Il a ainsi fallu réduire drastiquement la taille du faisceau initialement de 2,0 x 1,0 mm²

à l'aide de fentes optiques, pour obtenir un faisceau plus petit que la taille des gouttes et développer l'environnement échantillon. Les paramètres principaux de la ligne sont reportés dans le Tableau IV.1 et une photographie est présentée sur la Figure IV.4.

Tableau IV.1. Paramètres utilisés sur la ligne BM29

Gamme d'énergie	7,0 – 15,0 keV
Distance échantillon-détecteur	2,867 m
Gamme de q	0,025 – 5 nm ⁻¹
Taille du faisceau	Min : 50,0 x 50,0 μm ² Max : 2,0 x 1,0 mm ²
Détecteur	Pilatus 1M

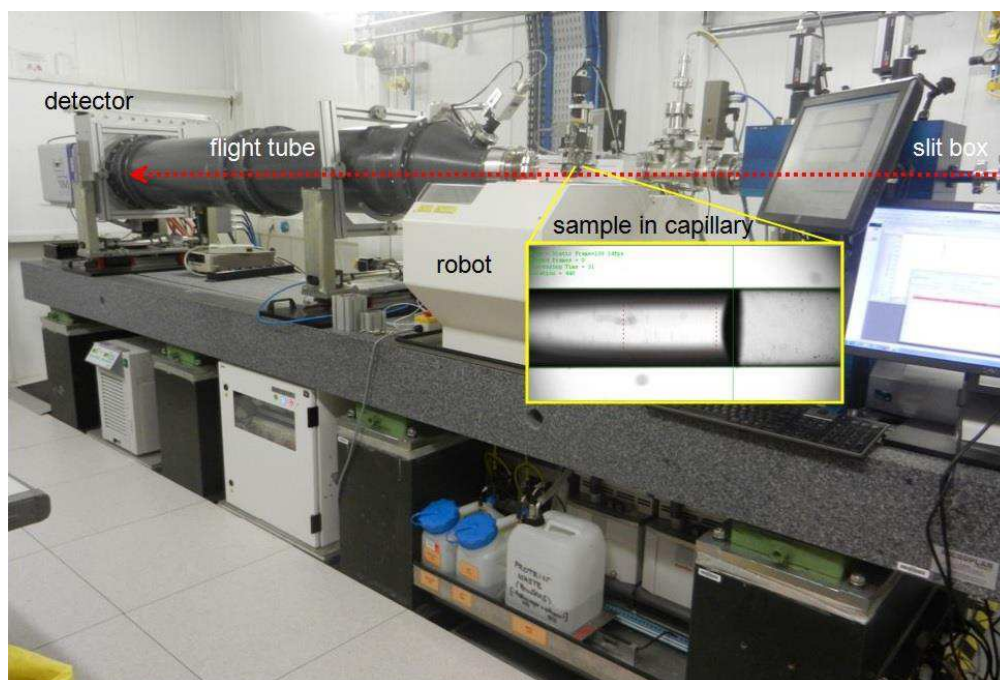


Figure IV.4. Photographie de la cabine expérimentale de la ligne BM29

IV.2.2 Ligne SWING à SOLEIL

La ligne SWING (**S**mall and **W**ide angle X-ray scattering) de SOLEIL à Gif-sur-Yvette, sous la direction de Javier Perez, est également une ligne dédiée aux expériences de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) mais également aux grands angles (WAXS). Ainsi, elle permet d'obtenir des informations sur la structure de la matière à des échelles de taille allant du nanomètre au micromètre. Elle permet ainsi de répondre à de nombreuses questions liées à la matière molle, à la conformation des macromolécules en solution et aux matières composites en sciences des matériaux. La priorité est mise sur le développement de l'environnement échantillon, si bien qu'il est possible actuellement de travailler avec une platine de précision pour déplacer l'échantillon, un système de stopped-flow, une HPLC en ligne pour la purification de protéines, un changeur d'échantillon automatisé ou encore une cellule de Couette. Il est ainsi possible d'étudier une grande variété d'échantillons, des solutions, gels, solides amorphes ou solides cristallisés. Le développement d'un système microfluidique couplé à cette ligne semble par conséquent s'inscrire

assez logiquement dans cette démarche. La possibilité de déplacer le détecteur par rapport à l'échantillon permet une plus grande gamme de tailles accessibles. Les paramètres utilisés sur cette ligne sont reportés dans le Tableau IV.2 et une photo est donnée en Figure IV.5.

Récemment, cette ligne a par exemple été utilisée dans le but d'étudier l'auto-assemblage de particules Janus en solution (Castro et al., 2016), la structure et les propriétés de gélification de micelles de caséine (Khanji et al., 2015) ou encore les propriétés et la cinétique d'agrégation de boehmite (Kirchner, 2015).

Tableau IV.2. Paramètres de la ligne SWING

Gamme d'énergie	5,0 – 17,0 keV
Distance échantillon-détecteur	Min : 0,5 m Max : 8 m
Gamme de q	0,004 – 20 nm^{-1}
Taille du faisceau	400 x 100 μm^2
Détecteur	PCCD170 Aviex



Figure IV.5. Photographie de la cabine expérimentale de la ligne SWING

Après avoir exposé le principe et la théorie sur lesquels reposent les analyses SAXS, ainsi que les différentes lignes sur lesquelles des travaux ont été menés, intéressons-nous à ces différentes études.

IV.3 Etudes sur la ligne BM29 à l'ESRF

Les premières études ont été réalisées sur la ligne BM29 à l'ESRF. Comme précisé précédemment, il a été nécessaire d'installer des fentes optiques sur le trajet du faisceau de la ligne afin de réduire sa taille pour correspondre avec celles des gouttes envoyées ($\sim 400\mu\text{m}$). Il a ensuite été nécessaire de concevoir et de développer des systèmes microfluidiques pouvant être montés sur la ligne. Ainsi, dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps ces différents systèmes et leur protocole d'utilisation, et dans un second temps nous expliciterons les études menées à l'aide de ces derniers.

IV.3.1 Présentation des montages sur la ligne BM29

L'environnement « échantillon de base » sur la ligne BM29 se compose d'un porte-échantillon hermétique dans lequel est inséré un capillaire en quartz de 1,8mm de diamètre, autour duquel il est possible de faire le vide pour améliorer la précision des mesures. Les solutions sont insérées dans le capillaire à l'aide d'un robot automatisé ou dès la sortie de colonne HPLC. Pour nos études, il a fallu adapter cet environnement en réduisant la taille du capillaire à l'intérieur du porte-échantillon pour avoir des gouttes de taille convenable. C'est pourquoi, des porte-échantillons identiques ont été construits à l'atelier du laboratoire et nous avons ensuite collé de façon hermétique des capillaires en kapton, en silice fondue ou en quartz de taille bien plus petite, à l'intérieur de ces derniers. Afin de s'assurer que les gouttes envoyées ne collent pas sur la paroi des capillaires, une silanisation de ces derniers, à l'aide de Sigmacote® (Sigma) est nécessaire. Une représentation du porte-échantillon est présentée sur la figure IV.6. Une fois l'environnement échantillon ainsi adapté à nos études, il a fallu concevoir les puces microfluidiques qui permettant d'envoyer des gouttes à l'intérieur du porte-échantillon en faisant varier certains paramètres, comme la composition à l'intérieur des gouttes, le temps à partir duquel les gouttes sont exposées ou encore la température de travail. Ces différents dispositifs sont présentés dans la partie suivante.

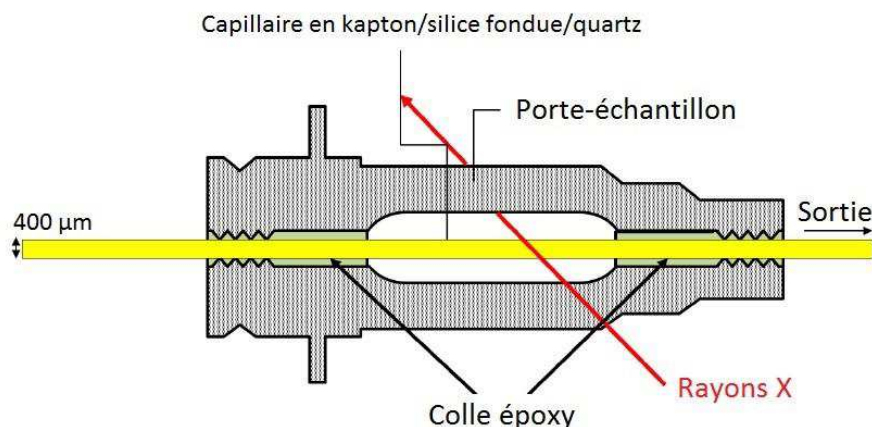


Figure IV.6. Représentation du porte-échantillon modifié. Un capillaire de diamètre $400\mu\text{m}$ en quartz, silice fondue ou kapton est inséré dans le porte-échantillon. De la colle époxy est utilisée pour fixer le capillaire et rendre le dispositif hermétique afin de faire un vide efficace.

IV.3.1.1 Dispositif 1 : mélange et envoi direct à température ambiante

Le dispositif 1 utilisé pour les premières études est le plus simple. Il est composé d'une puce de mélange à 4 entrées. 3 entrées sont consacrées à des composés de la phase aqueuse qui vont se mélanger dans une jonction en Y et la dernière entrée est une phase huile qui va permettre grâce à son immiscibilité à séparer la phase aqueuse, créant ainsi des gouttes. Il est possible de mettre une géométrie en forme de zigzag juste après la génération des gouttes pour accélérer le mélange à l'intérieur de celles-ci. Cependant, la recirculation interne liée au mouvement des gouttes et aux effets de paroi est suffisante pour s'assurer un mélange assez rapide de quelques centaines de millisecondes. Les gouttes seront alors acheminées jusqu'au porte-échantillon de la ligne grâce au capillaire en silice fondue inséré dans celui-ci, lui-même collé à la sortie de la puce. Aucune mesure de concentration en ligne n'est effectuée dans ce dispositif, et les gouttes ne sont pas stockées, c'est pourquoi, au vu des remarques de la partie II.2 le choix de matériel pour la construction de la puce s'est naturellement porté sur l'OSTE. Les procédures de fabrication de la puce sont d'ailleurs à retrouver dans cette partie II.2. La puce peut être positionnée sur un microscope pour suivre la génération des gouttes en ligne. Une représentation schématique de ce dispositif est proposé sur la Figure IV.7 et une photographie du dispositif sur la ligne synchrotron est donné en Figure IV.8

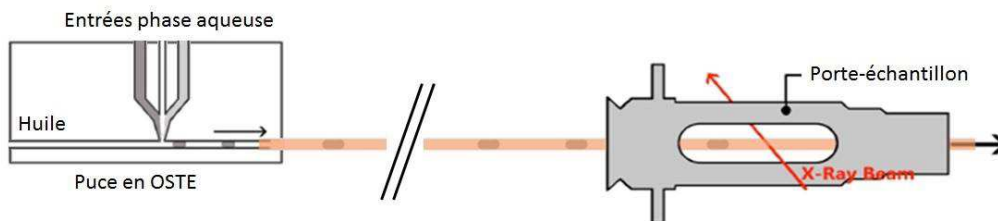


Figure IV.7. Représentation schématique du premier couplage microfluidique/SAXS. Les phases aqueuses et huile sont insérées dans une puce microfluidique en OSTE qui permet de générer des gouttes. Un capillaire en silice fondue est collé à la sortie de la puce et permet de transporter les gouttes jusque dans le porte-échantillon.

IV.3.1.2 Dispositif 2 : mélange, mesure de concentration en ligne et envoi à température ambiante

Le deuxième dispositif pensé et développé, bien que reposant sur les mêmes idées que le précédent, est plus complexe. Il intègre en effet, une mesure de concentration en ligne, grâce à des fibres optiques (Thorlabs, Etats-Unis, NA = 0,22), insérées dans la puce microfluidique et reliées à une source de lumière 5W deutérium AvaLight-D(H)-S et à un spectromètre Avaspec 2048-USB2 (Avantes, Pays-Bas). Le matériel OSTE absorbant la lumière aux longueurs d'onde de travail, ne peut être utilisé comme dans le premier dispositif. C'est pourquoi, le matériel retenu pour la puce de ce deuxième dispositif est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Les procédures de fabrication d'une telle puce sont à retrouver dans la partie II.2. Les gouttes sont générées grâce à la même géométrie que dans le premier dispositif.

L'autre différence importante dans ce dispositif est la nature du capillaire à l'intérieur du porte-échantillon. Afin d'améliorer la qualité des données, du quartz a cette fois été utilisé. Cependant, la fragilité et la non-flexibilité des capillaires en quartz rend leur utilisation délicate, et il est impossible de procéder comme dans le premier dispositif en collant le capillaire en sortie de puce et dans le porte-échantillon. C'est pourquoi, le capillaire en quartz est uniquement collé à l'intérieur du porte-échantillon, et un capillaire en silice fondue est collé à la sortie de la puce. La connexion entre les deux capillaires se fait à l'aide d'un adaptateur (Upchurch). Les capillaires sont insérés dans un tube de diamètre plus large, lui-même serré à l'aide de vis pour assurer l'étanchéité du dispositif. Un schéma explicatif du dispositif est présenté sur la Figure IV.9.

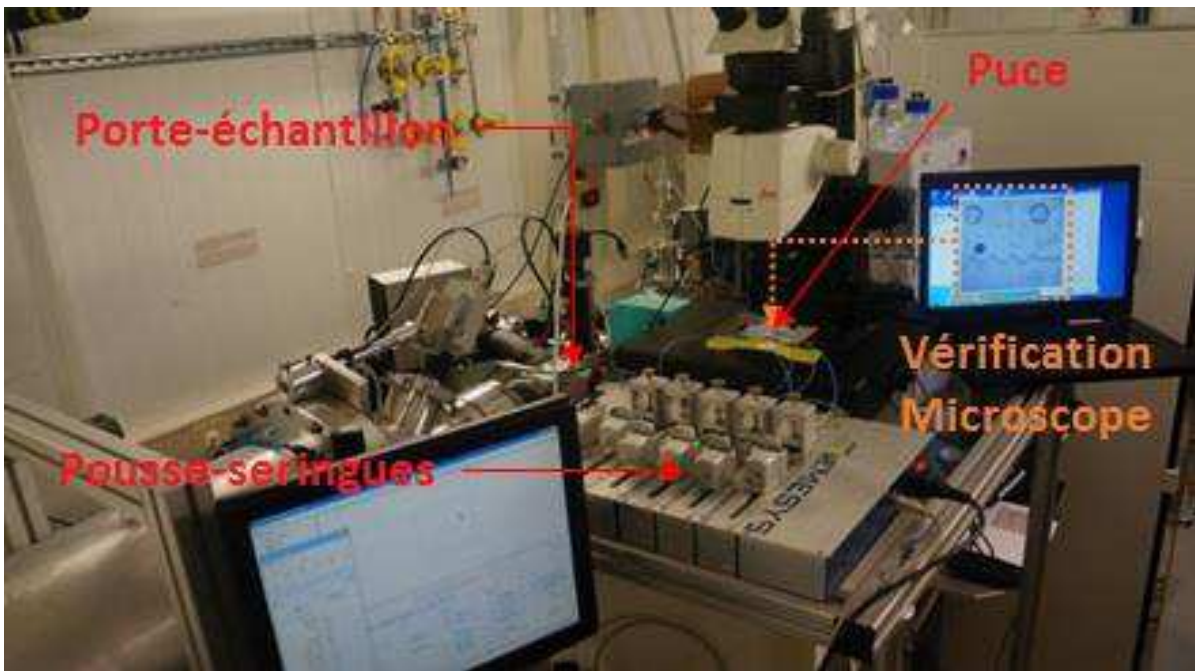


Figure IV.8. Photographie du dispositif 1 sur la ligne synchrotron. Les pousse-seringues permettent d'envoyer les solutions à l'intérieur de la puce microfluidique qui est installée sous un microscope relié à un ordinateur pour observer la génération des gouttes. Ces gouttes sont alors envoyées au porte-échantillon.

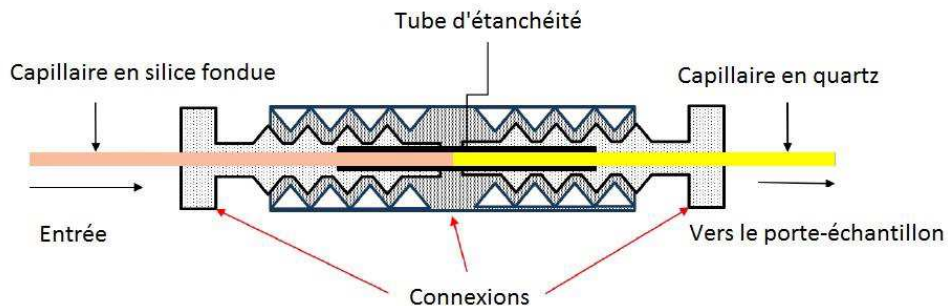


Figure IV.9. Système de connexion entre deux capillaires. Les deux capillaires sont insérés dans un tube d'étanchéité puis dans un adaptateur où ils sont positionnés bout à bout.

La Figure IV.10 présente l'ensemble du dispositif 2. La puce peut une fois de plus être positionnée sous un microscope afin de suivre la génération des gouttes en ligne.

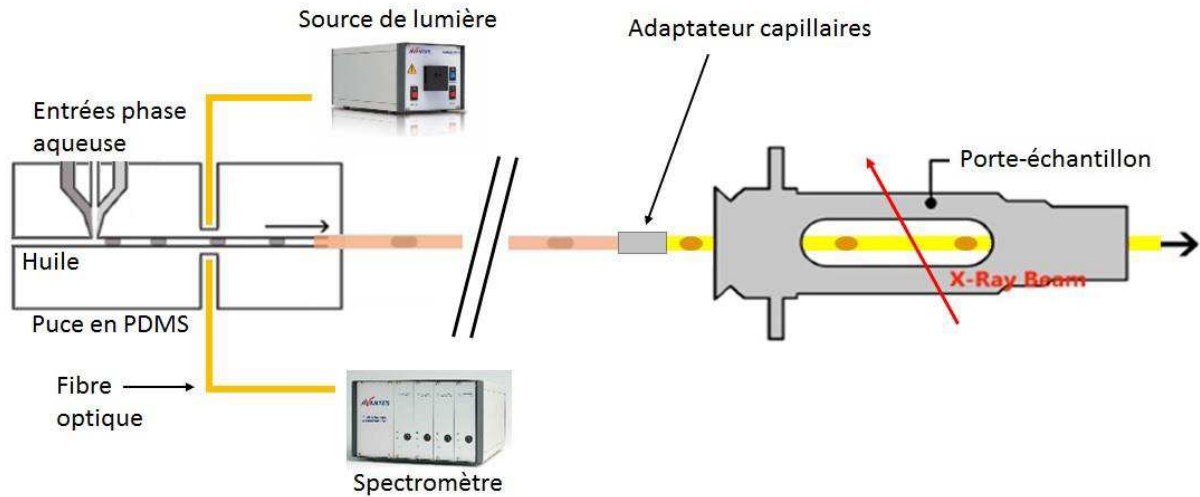


Figure IV.10. Représentation schématique du deuxième couplage microfluidique/SAXS. Les solutions sont injectées dans une puce en PDMS permettant de générer des gouttes. Des fibres optiques sont insérées dans la puce et reliées à une source de lumière et un spectromètre afin de mesurer la concentration en protéine dans les gouttes. Les gouttes sont envoyées au porte-échantillon à l'aide d'un capillaire en silice fondue. Le porte-échantillon contient un capillaire en quartz, connecté au capillaire en silice fondue à l'aide d'un adaptateur.

IV.3.1.3 Dispositif 3 : mélange, mesure de concentration en ligne, stockage et envoi avec un capillaire thermostaté

Ce troisième et dernier dispositif utilisé dans les études sur le ligne BM29 est le plus complexe. Il intègre une fois de plus une mesure de concentration en ligne donc est réalisée en PDMS, mais permet aussi de stocker des gouttes pour une durée déterminée afin d'étudier différents temps de cristallisation. Il comporte également un contrôle en température. Enfin, la puce microfluidique possède un bypass qui permet d'éliminer les gouttes formées au début lorsque les débits ne sont pas établis et de ne pas les envoyer dans la zone de stockage.

By-pass et stockage des gouttes

La puce microfluidique est plus grande que les précédentes car elle contient une zone permettant de stocker des gouttes à l'aide d'un long canal en serpentin. Cette zone permet de stocker environ 300 gouttes qui pourront être envoyées après un temps de latence permettant d'étudier différents temps de cristallisation. La puce microfluidique est schématisé sur la Figure IV.11. Au début des expériences, il n'est pas impossible d'avoir quelques bulles d'air dans les capillaires amenant les solutions stock à la puce et les débits ne sont pas immédiatement à la valeur fixée, si bien que les premières gouttes ne contiennent pas les concentrations souhaitées en produit. Ainsi, afin d'éviter d'envoyer ces mauvaises gouttes et ces bulles d'air dans le serpentin de stockage, une sortie « poubelle » est disposée entre la mesure de concentration et le serpentin de stockage. Cette sortie

est initialement ouverte, et toutes les gouttes générées ainsi que les bulles d'air sortent ainsi de la puce sans entrer dans le serpentin, à cause de la grande perte de charge engendrée par celui-ci. Une fois les bulles d'air éliminées et les concentrations voulues obtenues dans les gouttes (vérifiable grâce à la mesure de concentration en ligne), la sortie « poubelle » est alors bouchée et les gouttes se dirigent dans le serpentin de stockage.

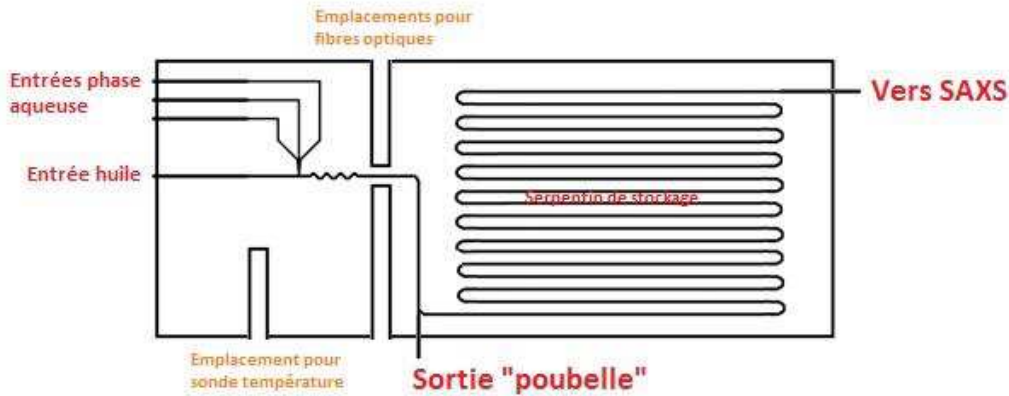


Figure IV.11. Design de la puce du troisième dispositif. Les gouttes sont générées dans la puce et la concentration en protéine est mesurée à l'aide de fibres optiques. Tant que les débits ne sont pas stables et que la concentration n'est pas constante, les gouttes sont envoyées vers une sortie « poubelle ». Une fois le régime stationnaire établi, les gouttes peuvent être envoyées vers un serpentin de stockage.

Contrôle en température

Le contrôle de température au niveau du capillaire permettant le transport des gouttes de la puce au porte-échantillon, est effectué en faisant circuler de l'eau provenant d'un bain thermostaté à l'intérieur d'un tube en plastique placé autour du capillaire, à la manière d'un réacteur ou d'une colonne de distillation double-enveloppe.

Le contrôle de la température se fait au niveau de la puce microfluidique à l'aide d'éléments Peltier placés en dessous de celle-ci et d'un régulateur PID relié à une sonde de température insérée directement dans la puce. Une plaque d'aluminium poli miroir est placée entre les éléments Peltier et la puce afin de voir la génération des gouttes au microscope par réflexion. Enfin, un dissipateur de chaleur dans lequel circule l'eau en sortie du tube contrôlant la température du capillaire est placé en dessous des éléments Peltier.

Le porte-échantillon est maintenu en température à l'aide du système propre à la ligne BM29. Ainsi, tous les éléments du dispositif, de la génération des gouttes, jusqu'à leur exposition aux rayons-X peuvent être contrôlés en température.

On retrouve dans les Figure IV.12 et Figure IV.13, une représentation schématique, ainsi qu'une photographie (sans les fibres optiques) respectivement, où il est possible d'apercevoir la complexité du dispositif.

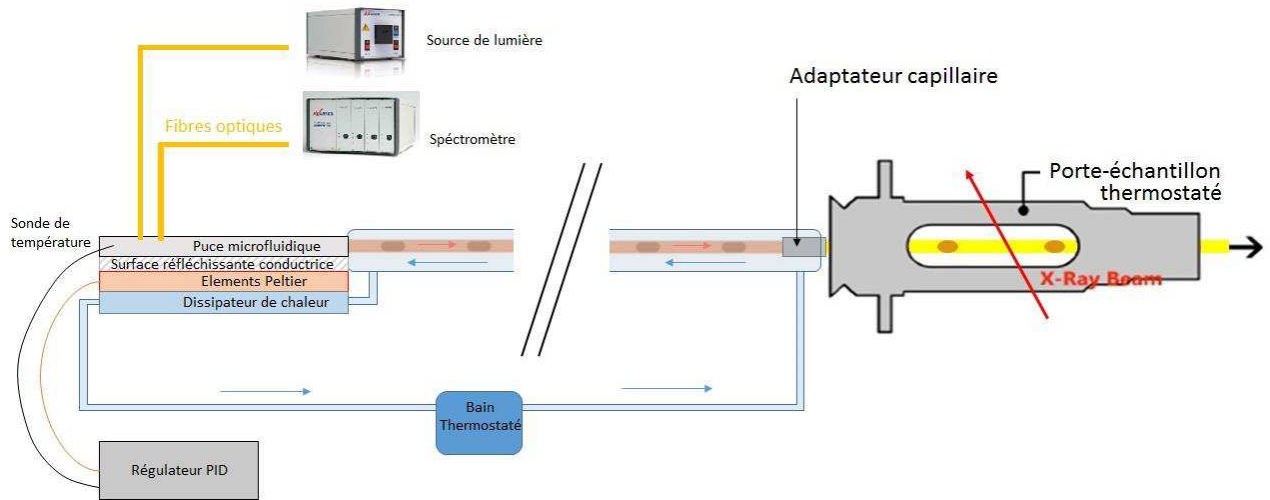


Figure IV.12. Représentation schématique de l'ensemble du troisième dispositif. L'ensemble du dispositif est contrôlé en température. Le capillaire est placé dans un tube plus grand dans lequel circule de l'eau provenant d'un bain thermostaté. La puce est positionnée sur des modules Peltier contrôlés par un régulateur PID.

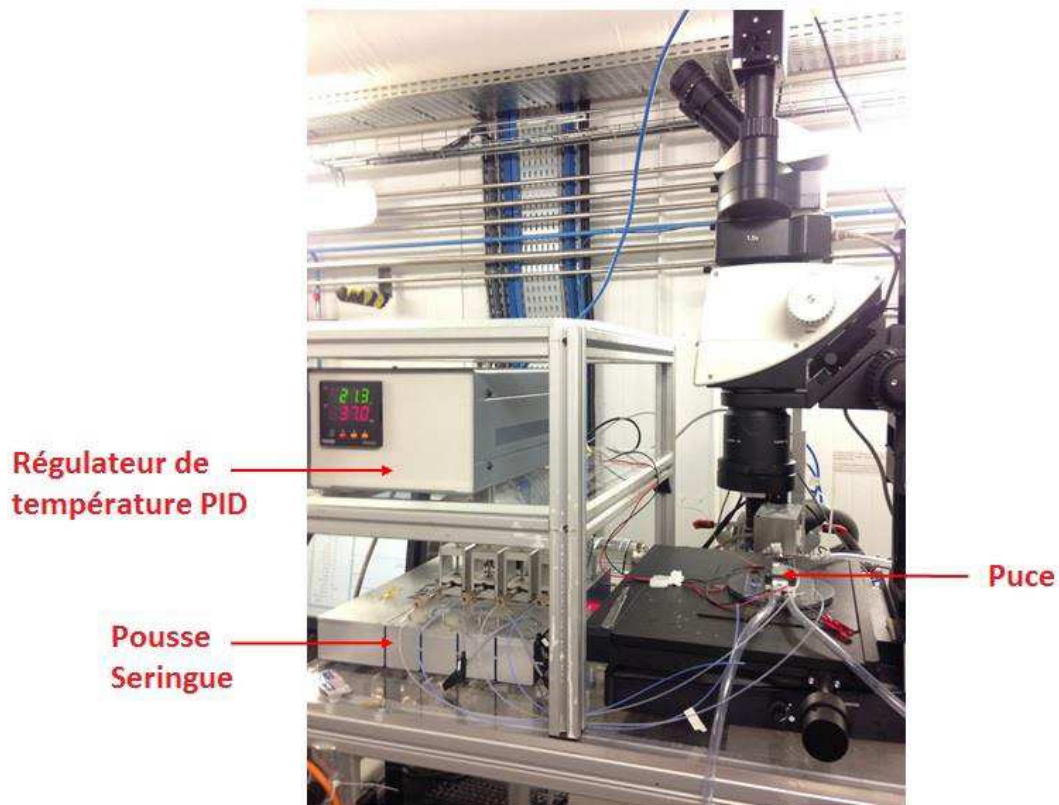


Figure IV.13. Photographie du dispositif 3 (sans fibres optiques) en place sur la ligne. On y observe les tubes dans lesquels circule l'eau à destination du dissipateur de chaleur positionné sous les modules Peltier. On observe aussi les pousse-seringues ainsi que le régulateur de température PID.

Après avoir présenté les différents dispositifs pensés et développés afin d'envoyer des gouttes dans le porte-échantillon de la ligne BM29, intéressons-nous désormais à la méthode d'acquisition de données par analyse d'images.

IV.3.1.4 Acquisition/traitement des données

Avec les dispositifs présentés précédemment, les gouttes sont envoyées dans le porte-échantillon et par conséquent, les images SAXS sont collectées en continu sur des gouttes en mouvement. Afin de réduire les dégâts aux radiations et de s'assurer que les expositions concernent l'intérieur de la goutte, le temps d'expositions est réduit à l'ordre de la centaine de millisecondes. Pour obtenir des données comparables avec celles pouvant être obtenues dans un capillaire de 1,5mm, il est nécessaire d'éliminer le bruit présent sur les courbes, dû à la petite taille du capillaire dans nos dispositifs. Ainsi, une moyenne est réalisée sur quelques dizaines de gouttes exposées dans les mêmes conditions. Par conséquent, l'exposition doit se faire en continu sur l'ensemble de ces gouttes passant devant le faisceau et il est ainsi commun d'obtenir une centaine d'images pour une mesure. Cependant, les courbes SAXS résultant de ces expositions peuvent être attribuées à plusieurs contributions : la phase continue, l'interface entre la goutte et la phase continue, et l'intérieur de la goutte. Or, seules les images correspondant à l'intérieur de la goutte nous intéressent. C'est pourquoi, il est nécessaire de traiter les données en ne gardant uniquement que les images correspondant à l'intérieur des gouttes et en éliminant les autres. Cette approche demande beaucoup de temps de traitement, et de plus, en effectuant des expositions continues, le capillaire et l'huile de la phase continue sont exposés à d'intenses rayons-X ce qui peut induire des dégâts aux radiations et endommager le traitement de surface du capillaire.

Afin de pallier ces problèmes, un système basé sur de l'analyse d'images en temps réel a été développé, reposant sur un programme, écrit en Python, reposant sur l'utilisation de la librairie d'OPENCV, permettant de synchroniser l'acquisition d'images par le détecteur, l'ouverture et la fermeture de l'obturateur laissant passer le faisceau de rayons X et les gouttes en mouvement. Dans le capillaire du porte-échantillon, toutes les gouttes générées possèdent la même interface avec la phase continue et il est ainsi possible à l'aide d'une fonction d'autocorrélation et d'une image référence de cette interface, de détecter toutes les gouttes passant à une position définie du capillaire. En sélectionnant plusieurs positions dans le capillaire et connaissant la distance les séparant, il est possible de déterminer la vitesse des gouttes, qui peut également être calculée, connaissant les débits et le diamètre interne du capillaire. Enfin, en déterminant la position du faisceau de rayons-X et connaissant la vitesse des gouttes, il est possible de déterminer le délai, ou le temps nécessaire pour qu'une goutte passe de la zone de détection à la zone d'exposition. Ainsi, lorsque la goutte atteint la zone de détection, le programme attend la durée du délai, avant d'envoyer un signal TTL à l'obturateur et au détecteur qui peut alors lancer l'acquisition. Le signal TTL est généré à l'aide d'un convertisseur USB capable d'envoyer un signal de 3V compatible avec le détecteur et l'obturateur. La latence mesurée entre la détection de la goutte et la génération du signal est d'environ 10ms ce qui permet de s'assurer que les expositions et acquisitions se font uniquement à l'intérieur des gouttes. Un schéma explicatif est présenté sur la Figure IV.14.

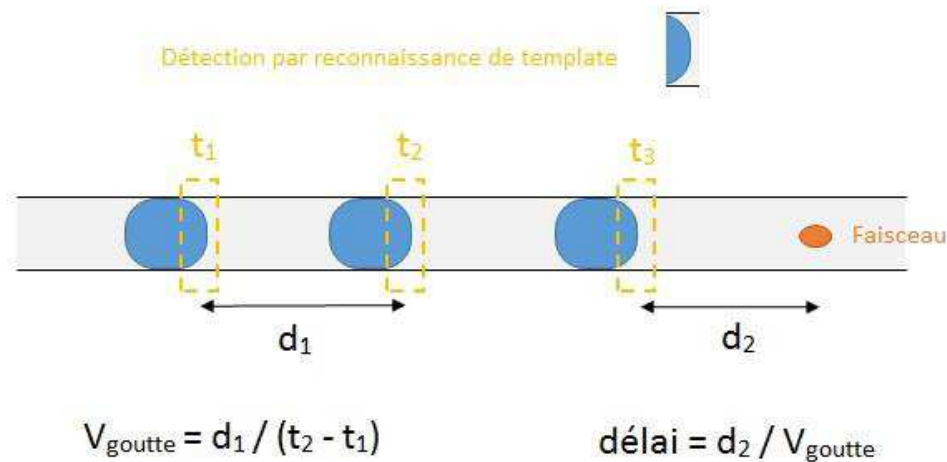


Figure IV.14. Représentation schématique du système de synchronisation. L'interface des gouttes est détectée par comparaison avec un template. En la repérant à différents endroits du capillaire il est possible de calculer la vitesse de la goutte. Connaissant cette vitesse, il est possible de calculer un temps de délai qui permet de s'assurer que l'exposition a bien lieu à l'intérieur de la goutte. t_1 , t_2 et t_3 sont les temps respectifs où la goutte passe dans les zones de détection.

Enfin, nos gouttes contenant généralement une solution constituée d'une protéine, d'un agent de cristallisation et une solution tampon, il est nécessaire afin d'obtenir le signal de la molécule d'intérêt, à savoir la protéine, de traiter les données. En effet, dans un premier temps, seules des gouttes contenant la solution tampon et l'agent de cristallisation à la même concentration que dans les expériences d'intérêt sont générées et exposées aux rayons-X afin d'avoir un signal de référence. Après les expériences avec la protéine, il faut alors soustraire au signal obtenu, le signal de référence afin d'obtenir uniquement la signature de la protéine.

Après avoir présenté les différents dispositifs pensés et développés pour les travaux réalisés sur la ligne BM29, intéressons-nous désormais aux différentes études réalisées avec, dans un premier temps, des études sans cristallisation, et dans un second temps des études avec cristallisation.

IV.3.2 Premières études sans cristallisation

IV.3.2.1 Validation des composants du dispositif

Huile

Dans nos dispositifs microfluidiques, les gouttes sont générées en séparant des composés miscibles en phase aqueuse (choisis en fonction de l'expérience à réaliser), à l'aide d'un composé immiscible en phase huile. Cette huile pouvant être exposée à d'intenses rayonnements X, il est nécessaire au préalable de vérifier qu'elle peut y résister et qu'elle n'est pas détruite par les radiations. Après plusieurs essais infructueux, nous avons finalement trouvé une huile qui permet une bonne génération de gouttes et qui résiste aux rayons X, le Krytox® GPL100 qui est un perfluoropolyéther (PFPE) et c'est par conséquent cette dernière que nous utiliserons dans toutes les expériences SAXS.

Tensioactif

Les molécules d'intérêt dans ce projet sont des protéines, qui sont des macromolécules le plus souvent amphiphiles, avec des résidus d'acides aminés hydrophobes et d'autres hydrophiles, ce qui induit la double affinité de la molécule. Ainsi, il n'est pas rare d'observer deux phénomènes non désirables lorsqu'elles sont utilisées dans des dispositifs de microfluidique de gouttes. Elles peuvent premièrement « coller » aux parois de la puce ce qui empêche la formation de gouttes adéquates. Et elles peuvent également se placer majoritairement aux interfaces entre la phase aqueuse et l'huile, ce qui engendre des gradients de concentrations à l'intérieur des gouttes qui ne sont alors plus adaptées pour étudier des phénomènes de nucléation non localisés. Ainsi, pour pallier ces problèmes, l'emploi d'un surfactant dans l'huile est nécessaire. En saturant les interfaces avec ce dernier, la protéine ne peut plus se mettre aux interfaces et ainsi, les gouttes ne collent pas et aucun gradient de concentration n'est observé à l'intérieur des gouttes. Cependant, le surfactant présent à l'interface peut interagir avec la protéine et la dénaturer ce qui complique les études de cristallisation. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver un surfactant qui n'interagit pas avec les protéines.

Dans ces premières expériences, nous avons généré des gouttes contenant 20 mg/mL de protéine rasburicase dans une solution tampon trishydroxyméthylaminométhane (Tris) à pH 8,0 à l'aide du dispositif 1 présenté dans la précédente partie. Dans ces conditions expérimentales, la protéine est en conformation tétramérique mais est particulièrement sensible à la dénaturation/dissociation.

Le premier choix de surfactant s'est porté sur un surfactant classiquement utilisé, le perfluorooctanol (PFO) dissous à 2% massique dans l'huile Krytox GPL100. Les gouttes ainsi formées sont envoyées au porte-échantillon et exposées aux rayons-X. Le signal SAXS obtenu est présenté sur la Figure IV.15.

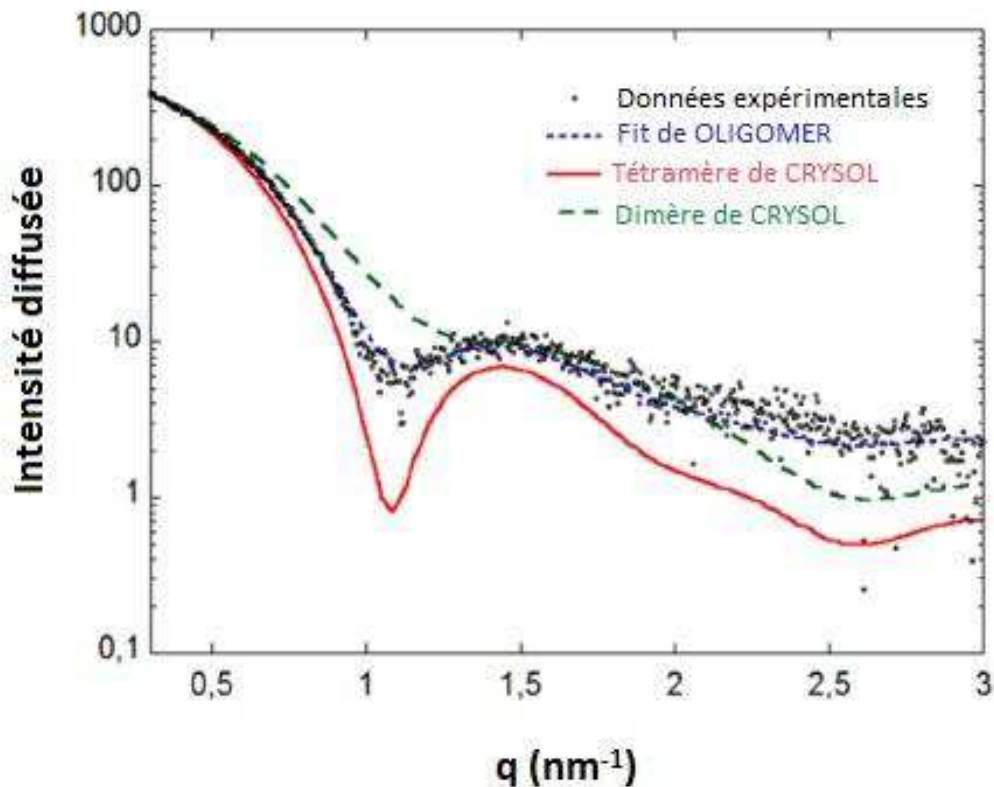


Figure IV.15. Signal SAXS de la rasburicase à 20 mg/mL dans une solution tampon Tris à pH 8,0 et à température ambiante, en présence de PFO et courbes théoriques du dimère et du tétramère obtenue à partir des coordonnées atomiques et du programme CRY SOL. Le programme OLIGOMER permet d'estimer les pourcentages relatifs de dimère et de tétramère dans les gouttes.

Sur cette figure, les données expérimentales sont représentées par les points noirs. Les courbes verte et rouge sont des intensités simulées à l'aide du logiciel CRY SOL (Svergun et al., 1995) à partir des coordonnées atomiques respectivement du dimère et du tétramère de rasburicase. Il apparaît alors que les données expérimentales ne correspondent pas à celles théoriques du tétramère qui est possiblement dissocié. Pour valider cette hypothèse, le logiciel OLIGOMER (Konarev et al., 2003) a été utilisé. Il permet d'obtenir une courbe théorique pour un mélange de plusieurs oligomères à partir des coordonnées atomiques des oligomères en question. Ainsi, il est possible d'obtenir la courbe théorique d'un mélange de dimère et de tétramère, et de régresser nos données expérimentales en faisant varier les proportions de chaque oligomère. Finalement, la meilleure régression indiquée par la courbe bleue de la Figure IV.15 indique que nos données expérimentales correspondent à un mélange de 52% de tétramère et de 48% de dimère. Cela souligne que la rasburicase en solution se comporte comme un mélange de la forme native tétramérique et de la forme dissociée dimérique ce qui suggère que le surfactant présent à l'interface, en particulier les têtes polaires hydroxyles à l'intérieur des gouttes, peut interagir avec la protéine et n'est par conséquent pas adapté pour nos études.

Un autre surfactant a alors été testé. Il s'agit d'un copolymère à trois blocs PFPE-PEG-PFPE (Ranbiotechnologies Technologies, Etats-Unis) qui présente deux différences majeures par

rapport au PFO. D'abord, la partie hydrophile PEG est « bloquée » entre les deux chaînes fluorées, ce qui lui laisse moins de mobilité à l'intérieur de la goutte. De plus, cette partie hydrophile contient cette fois des groupements éther et non hydroxyle qui sont possiblement moins gênant pour nos protéines. La même expérience que précédemment a été réalisée en dissolvant ce surfactant à 1% massique dans l'huile Krytox et en générant les gouttes de la même façon. La figure de diffusion SAXS obtenue est présentée sur la Figure IV.16.

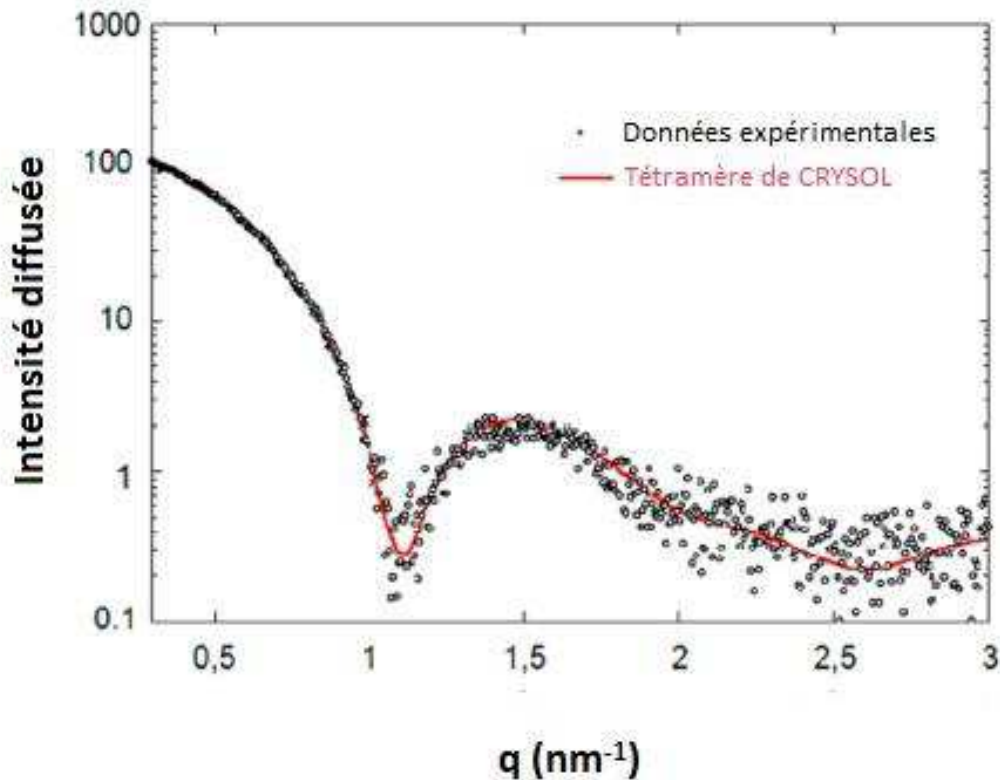


Figure IV.16. Signal SAXS de la rasburicase à 20 mg/mL dans une solution tampon Tris à pH 8,0 et à température ambiante en présence de PPF-PEG-PFPE. Les données expérimentales correspondent à la courbe théorique d'un tétramère de rasburicase obtenue avec CRY SOL à partir des coordonnées atomiques.

Cette fois-ci, il apparaît clairement, au-delà du bruit non significatif aux grands angles de diffusion (pour les grandes valeurs de q), que nos données expérimentales correspondent au signal théorique du tétramère de rasburicase et que par conséquent, le surfactant est inerte vis-à-vis de la protéine, comme pouvait le laisser présumer les groupes éther peu mobiles à l'interface. Ainsi, il est important de noter que la combinaison de l'huile Krytox et de ce surfactant permet une bonne génération des gouttes, empêche les gouttes de coller aux parois de la puce et empêche les gradients de concentrations à l'intérieur des gouttes pour la protéine, qui n'est pas dénaturée et qui a par conséquent la même structure dans nos gouttes que lors d'études SAXS plus classiques dans des plus gros capillaires. Ces composants sont alors adaptés à des études d'interactions et de cristallisation de protéines et seront alors utilisés par la suite.

IV.3.2.2 Mesure de concentration en ligne et études SAXS correspondantes

Dans cette deuxième étude, nous avons utilisé le deuxième dispositif présenté dans la partie IV.3.1.2 et nous nous sommes intéressés à la mesure de concentration en ligne ainsi qu'aux signaux SAXS correspondants.

Partie optique et mesures de concentrations

Dans un premier temps nous avons simplement généré des gouttes contenant un tampon acétate 50mM à pH 4,5 (qui correspond au signal de référence pour les études SAXS à venir) séparées par la phase immiscible huile. Le spectre temporel d'intensité obtenu à la longueur d'onde $\lambda=280\text{nm}$ par le spectromètre est présenté sur la Figure IV.17.

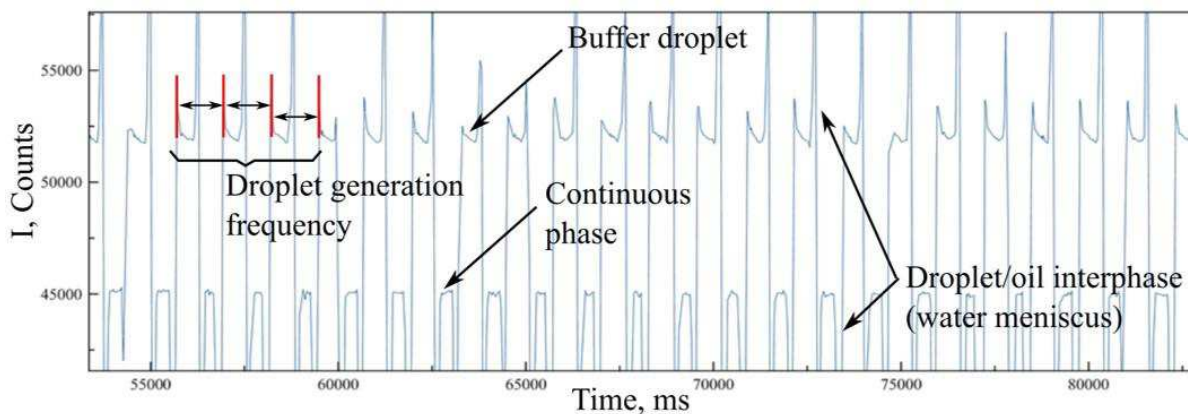


Figure IV.17. Spectre d'intensité collecté à $\lambda= 280\text{nm}$ lors du passage de gouttes de solution tampon d'acétate de sodium à 50 mM pH 4,5. Il permet de compter le nombre de gouttes s'écoulant ainsi que leur fréquence. Il est alors possible de déterminer leur vitesse et leur taille, et d'observer si la génération des gouttes est stable.

Dans ce spectre on peut constater que la phase huile et la phase aqueuse donnent toutes deux des valeurs d'intensité constantes (mesurées au centre des gouttes) ainsi que des pics d'intensité maximale et minimale liés aux interactions du faisceau lumineux avec les ménisques des interfaces des gouttes. Il est également possible d'observer les gouttes en fonction du temps, ce qui donne une bonne mesure de la taille des gouttes (connaissant les débits) ainsi que la fréquence de génération des gouttes. De plus, la stabilité de cette répétition de signal permet de savoir si la génération de gouttes est instable, ce qui est toujours le cas en début d'expérience lorsque les débits ne sont pas stabilisés, ou bien si elle est stable, conduisant ainsi à des gouttes homogènes dont on peut déterminer la concentration. Cette notion de génération stable/instable est présentée sur la Figure IV.18.

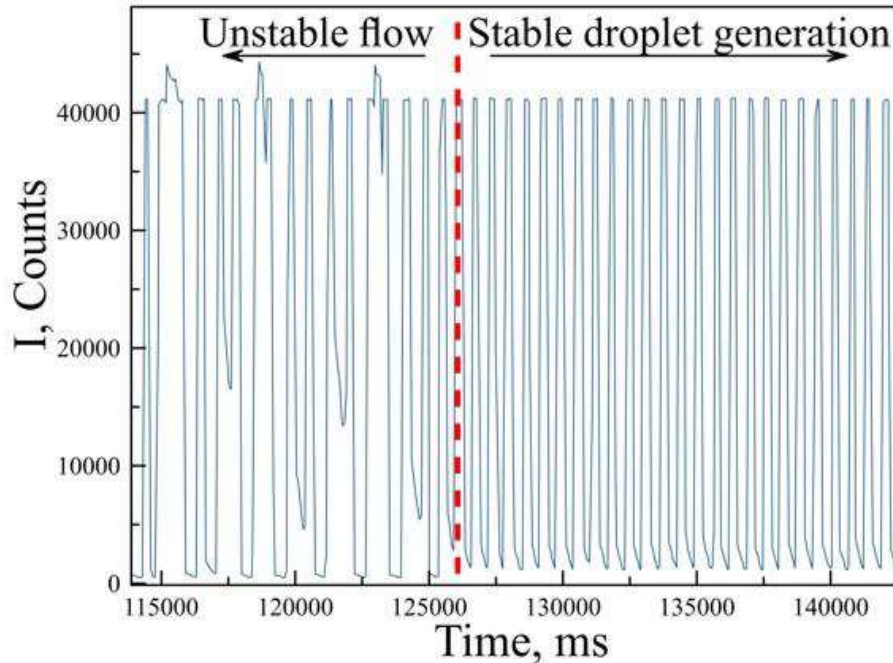


Figure IV.18. Différences entre une génération de gouttes stable et instable. Pour des temps faibles, le régime stationnaire n'est pas encore établi et le signal des gouttes n'est pas stable. Pour un temps plus long, le régime stationnaire est établi et les gouttes sont générées de façon périodique avec une concentration identique.

Une fois ces premiers spectres explicités, nous nous sommes intéressés à l'étude à proprement parler, et la protéine retenue pour ces mesures de concentrations est le lysozyme. Selon la gamme de concentrations en protéine à mesurer (de la dizaine à la centaine de mg/mL), il est nécessaire d'avoir un chemin optique correspondant à la distance entre les deux fibres optiques de longueur minimale afin d'avoir assez de sensibilité. De plus, en accord avec la loi de Beer-Lambert, en diminuant la longueur optique, le signal d'absorbance est également diminué et il est par conséquent possible d'étendre le domaine linéaire d'absorbance à de plus grandes concentrations (Rodríguez-Ruiz et al., 2015). Dans cette étude, nous avons exploré une gamme de concentrations pour le lysozyme de moyennes à élevées et avons par conséquent envisagé des puces avec deux longueurs optiques différentes (ce qui se traduit par un rétrécissement plus ou moins important du canal des gouttes au niveau des fibres optiques). La première puce possède un canal de 280 μm et la seconde de 150 μm . La Figure IV.19 représente le tracé de calibration qui permet de faire le lien entre l'absorbance et la concentration en lysozyme des gouttes pour les deux chemins optiques différents.

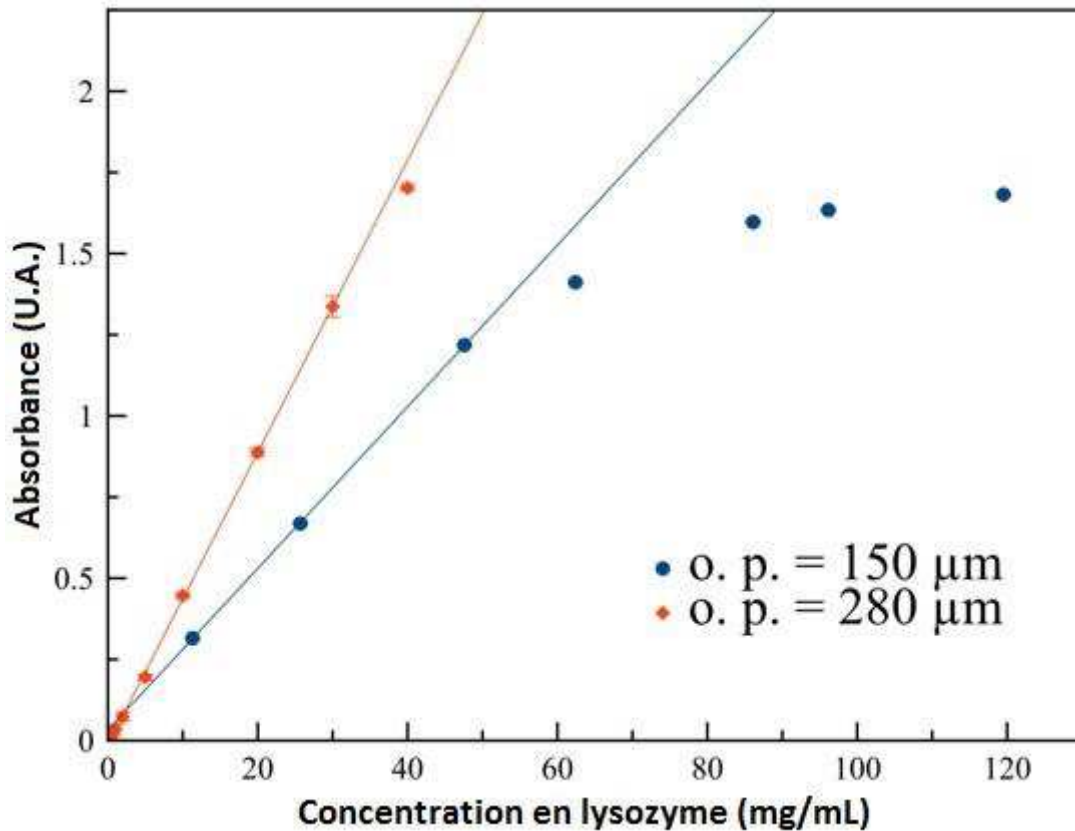


Figure IV.19. Tracés de calibration d'absorbance pour le lysozyme à $\lambda = 280\text{nm}$. L'absorbance est tracée en fonction de la concentration en lysozyme pour deux systèmes microfluidiques différents avec des largeurs de canal au niveau des fibres optiques de 150 et 280 μm . Les barres d'erreur sont comprises dans les points.

Chaque point de cette figure représente une moyenne sur 20 gouttes et souligne dans chaque cas une très grande reproductibilité avec une déviation standard d'environ 0,001 unité d'absorbance. On observe à l'aide de ces tracés qu'une diminution du chemin optique engendre une diminution du signal d'absorbance pour les mêmes concentrations mesurées avec par conséquent une augmentation du domaine linéaire. Il est intéressant de noter que cette méthodologie, basée sur des mesures d'extinction de lumière (absorbance dans ce cas) peut s'appliquer, non seulement pour mesurer des concentrations en protéine, mais aussi pour contrôler tout système qui présente de l'absorption et/ou des propriétés de diffusion dans le spectre UV-Visible.

Partie SAXS et mesures d'interactions macromoléculaires

Afin de valider la méthodologie présentée dans cette partie, des données SAXS obtenues à différentes concentrations en lysozyme ont été analysées pour obtenir le rayon de giration R_g de la protéine, qui est un indicateur numérique de la compacité de la structure de la protéine. Cette valeur a déjà été mentionnée (Svergun and Koch, 2003) pour le lysozyme ($1,43 \pm 0,04\text{ nm}$) et a été déterminée en utilisant des volumes d'échantillon de trois ordres de grandeur supérieurs à ceux utilisés à l'aide d'outils microfluidiques, comme c'est le cas dans cette étude. Les différentes concentrations en lysozyme sont obtenues en faisant varier les débits de solution de protéine et de solution tampon et les signaux SAXS obtenus sont présentés sur la Figure IV.20.

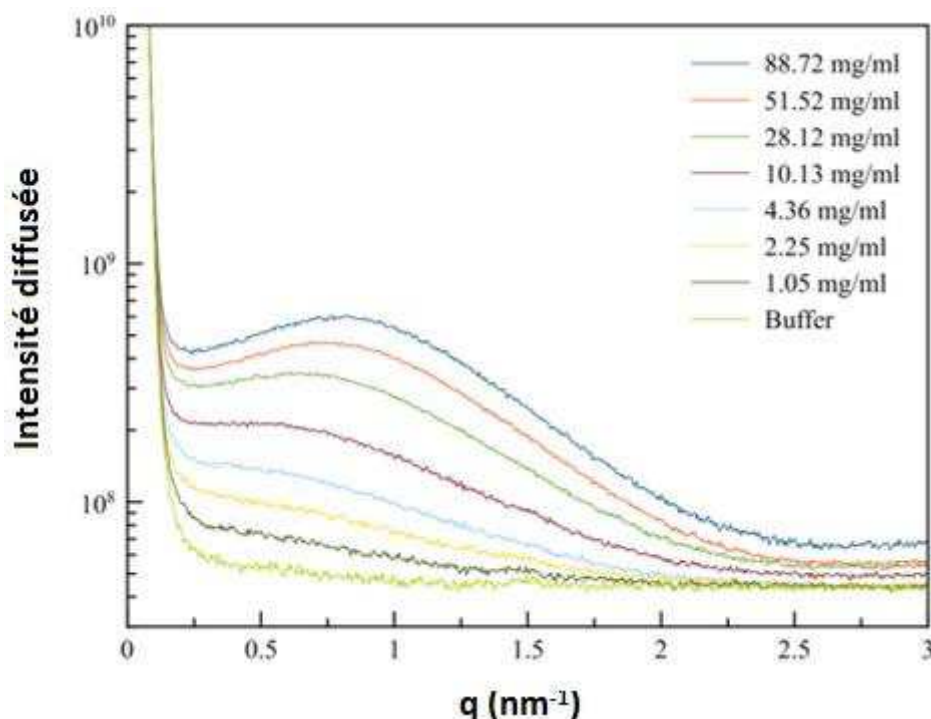


Figure IV.20. Courbes SAXS du lysozyme à différentes concentrations dans un buffer acétate de sodium 50 mM à pH 4,5 et à température ambiante. La bosse de répulsion électrostatique est d'autant plus marquée que la concentration en lysozyme est importante.

Chacune de ces courbes est obtenue en réalisant une moyenne sur au moins 100 gouttes de volumes reproductibles et présentant exactement les mêmes concentrations en lysozyme ce qui est mis en évidence et vérifié grâce au contrôle de spectrophotométrie en ligne, présenté précédemment, et réalisé en amont du faisceau de rayons-X.

Comme présenté dans la partie IV.1.4, l'intensité totale diffusée par une solution de macromolécules en solution peut s'exprimer comme le produit de deux facteurs, un facteur de forme I_{FF} ne dépendant que des macromolécules considérées (taille, structure, etc.) et un facteur de structure S qui représente les interactions entre molécules lorsque l'on s'éloigne d'un milieu dilué.

$$I(c, q) \cong I_{FF}(c = 0, q) \times S(c, q) \quad \text{Eq. IV-29}$$

Il est possible de relier cette intensité diffusée au rayon de giration de la protéine R_g à l'aide de la loi de Guinier présentée dans la partie IV.1.2.

$$I(c, q) \cong I(c, q = 0) \times \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \quad \text{Eq. IV-30}$$

Il est alors possible d'obtenir la valeur du rayon de giration du lysozyme R_g en traçant $\ln I(c, q)$ en fonction du carré du vecteur de diffusion q^2 (tracé de Guinier). De plus ce tracé donne accès aux valeurs de $I_0 = I(c, q = 0)$ en fonction de la concentration en protéine, représenté sur la

Figure IV.21 et permet ainsi de déterminer une gamme de concentrations où l'intensité diffusée est proportionnelle à la concentration et où par conséquent les molécules n'interagissent pas entre elles.

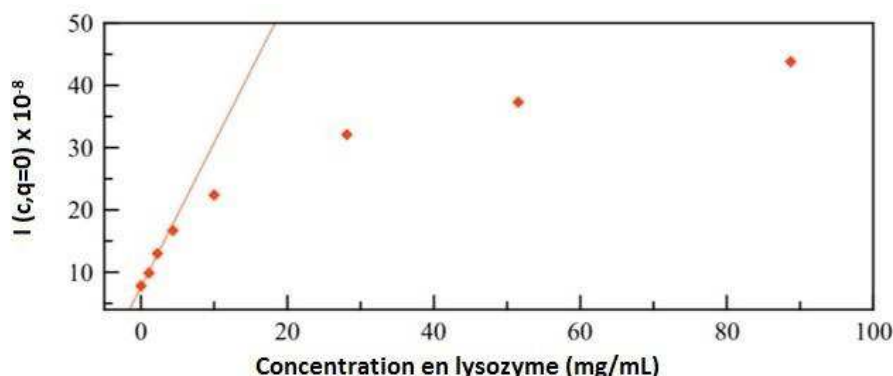


Figure IV.21. Tracé de I_0 en fonction de la concentration en protéine. Pour des concentrations faibles en lysozyme (< 15 mg/mL) la relation entre l'intensité diffusée à angle nul et la concentration en lysozyme est linéaire, signifiant que les molécules n'interagissent pas entre elles.

En augmentant la concentration, on s'éloigne du milieu dilué et les distances entre molécules diminuent, devenant du même ordre de grandeur que les distances intramoléculaires et contribuant alors au signal de diffusion (notable par l'apparition d'une bosse sur la Figure IV.20) ce qui engendre une perte de la linéarité. Ainsi, dans le cadre de cette étude, la détermination du rayon de giration a été réalisée pour chaque concentration dans le domaine linéaire en effectuant une régression du tracé de Guinier. Ces régressions sont présentées sur la Figure IV.22.

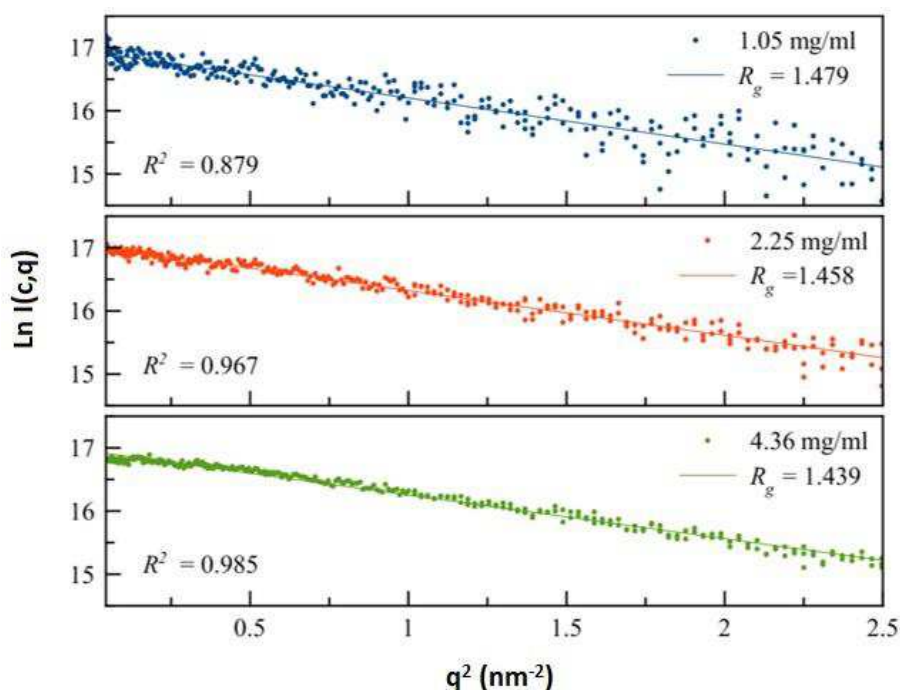


Figure IV.22. Régression des tracés de Guinier pour 3 concentrations en lysozyme dans le domaine linéaire de la courbe intensité/concentration de la Figure IV.21. Les valeurs de rayon de giration obtenues sont autour de 1,4 nm donc en accord avec les données de la littérature.

Il est à noter que la dispersion des données augmente lorsque l'on s'approche de la concentration minimale en protéine à cause de l'augmentation du rapport bruit sur signal pour ces données. Cependant, toutes les valeurs de rayon de giration calculées sont en très bon accord avec les données de la littérature (Mylonas and Svergun, 2007) validant ainsi notre méthodologie.

Pour aller plus loin dans cette étude, il est intéressant de vérifier que les données obtenues en utilisant des quantités réduites de produits permettent également de calculer des structures basses résolutions de protéines (ou enveloppes moléculaires) qui peuvent donner des informations intéressantes sur les conformations des protéines. Ainsi, les intensités diffusées obtenues pour des concentrations allant de 1,05 à 10,13 mg/mL ont été simulées en utilisant une nouvelle fois CRY SOL (Svergun et al., 1995) à partir des coordonnées atomiques du lysozyme (obtenues avec le fichier de structure 1dpx.pdb dans la Protein Data Bank). Les courbes ainsi simulées sont comparées avec les données expérimentales sur la Figure IV.23. Il est alors possible d'observer que les données ne concordent pas pour la concentration la plus faible et pour la plus élevée. Pour la plus faible, le rapport signal sur bruit est trop faible et ne permet pas d'obtenir une bonne régression ($\chi^2 = 2,87$). Pour la concentration la plus élevée, dans la région des faibles q (i.e. $q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$) le facteur de forme du lysozyme est plus élevé que les intensités expérimentales. Cela suggère que pour cette concentration, la solution de lysozyme ne peut pas être considérée comme diluée et qu'il existe des interactions intermoléculaires, comme illustré par la Figure IV.21. Les données expérimentales étant inférieures au facteur de forme, les interactions entre molécules de lysozyme sont répulsives.

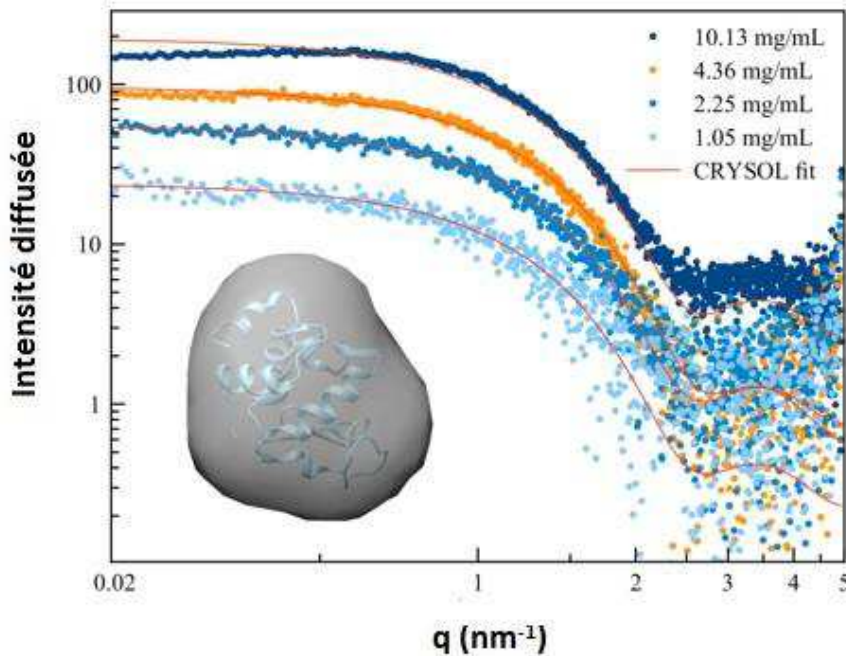


Figure IV.23. Courbes SAXS expérimentales du lysozyme à différentes concentrations et courbes simulées à l'aide de CRY SOL. Pour la concentration la plus faible en protéine, la simulation et les données expérimentales sont différentes à cause du fort bruit des données expérimentales. Pour la concentration la plus élevée, des interactions répulsives ont lieu et le facteur de forme n'est pas suffisant pour représenter les données expérimentales. En insert, l'enveloppe moléculaire du lysozyme calculée avec les logiciels DAMMIF et DAMAVER.

La meilleure valeur de χ^2 est obtenue pour la concentration de 4,36 mg/mL ($\chi^2 = 0,91$). Pour cette concentration, les intensités diffusées ont été utilisées pour calculer l'enveloppe moléculaire en utilisant les logiciels DAMMIF (Franke and Svergun, 2009) et DAMAVER (Volkov and Svergun, 2003). L'enveloppe correspondante, qui semble être en bon accord avec la structure du lysozyme est également présentée, avec la structure de la protéine, dans la Figure IV.23.

L'ensemble de cette seconde étude a donc montré qu'il est possible de déterminer la concentration en protéine dans nos gouttes grâce à la spectrophotométrie et qu'il est surtout possible de déterminer le moment où un régime de génération stable est obtenu, ce qui assure une homogénéité des gouttes. De plus, à l'aide des données SAXS, des considérations plus avancées sur ces concentrations permettent d'identifier un domaine où les molécules n'interagissent pas entre elles et où il est par conséquent possible d'identifier un facteur de forme qui permet de calculer le rayon de giration de la protéine, ainsi que son enveloppe moléculaire.

IV.3.2.3 Etudes d'interactions inter-protéines

Les interactions existantes entre plusieurs protéines sont nombreuses et ont par ailleurs été évoquées dans la partie IV.1.4. Nous nous sommes intéressés une nouvelle fois pour cette étude à la protéine lysozyme. A cause des charges réparties autour de cette dernière, il est commun d'observer des interactions répulsives entre deux molécules de lysozyme en solution, comme illustré dans la partie précédente. Pour induire des interactions attractives, il est possible d'ajouter du sel en solution qui va alors écranter les charges de la protéine. En l'occurrence, pour le lysozyme, il est possible d'ajouter du chlorure de sodium (Ducruix et al., 1996). Dans cette étude, nous avons donc généré des gouttes contenant diverses concentrations en protéine et en chlorure de sodium dans un buffer acétate à pH 4,4 et observé les figures de diffusion. Ces différentes données nous ont permis de remonter aux variations du second coefficient du viriel A_2 représentatif des interactions entre protéines, comme présenté dans la partie IV.1.4.

L'expérience est réalisée à température ambiante et les gouttes sont directement envoyées au porte-échantillon, c'est pourquoi le premier dispositif expérimental est suffisant dans cette étude. Une photographie de la génération des gouttes est présentée sur la Figure IV.24. Un gros avantage d'un tel dispositif est qu'il permet d'analyser rapidement un grand nombre de conditions opératoires, car il est possible de changer les concentrations en protéine et en sel dans les gouttes simplement en changeant les débits des solutions stock entrant dans la puce. Les débits de solution tampon sont alors ajustés afin de garder un volume de gouttes constant. Dans ces expériences, les solutions stock avaient pour concentration 130 mg/mL pour la protéine et 2 mol/L pour NaCl. Ainsi, les différentes conditions opératoires utilisées sont résumées dans le Tableau IV.3.

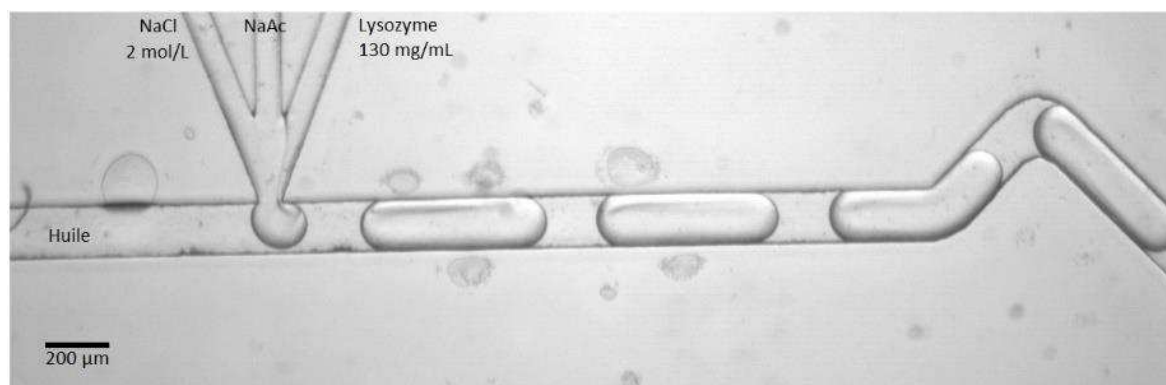


Figure IV.24. Génération de gouttes contenant lysozyme et NaCl dans une solution tampon acétate de sodium à 50 mM pH 4,5 et à température ambiante. Les gouttes de phase aqueuse sont périodiquement séparées par une phase huile immiscible et envoyées dans un serpentin afin d'accélérer l'homogénéisation des gouttes.

Tableau IV.3. Conditions opératoires utilisées pour l'étude d'interactions inter-protéines, sur du lysozyme en présence de sel NaCl dans un tampon acétate de sodium à 50mM pH 4,5 et à température ambiante.

Débits de solutions stock ($\mu\text{L}/\text{min}$)				Concentrations dans les gouttes	
Huile	Lysozyme	NaCl	Buffer NaAc	Lysozyme (mg/mL)	NaCl (mmol/L)
4	0,5	0	2,5	21,7	0
4	0,5	0,15	2,35	21,7	100
4	0,5	0,3	2,20	21,7	200
4	0,5	0,45	2,05	21,7	300
4	0,5	0,6	1,9	21,7	400
4	0,5	0	1,8	52	0
4	0,5	0,15	1,65	52	100
4	0,5	0,3	1,5	52	200
4	0,5	0,45	1,35	52	300
4	0,5	0,6	1,2	52	400
4	0,5	0	1,0	86,7	0
4	0,5	0,15	0,85	86,7	100
4	0,5	0,3	0,7	86,7	200
4	0,5	0,45	0,55	86,7	300
4	0,5	0,6	0,4	86,7	400

Les différentes courbes SAXS correspondant à ces expériences sont présentées dans les Figure IV.25, Figure IV.26 et Figure IV.27.

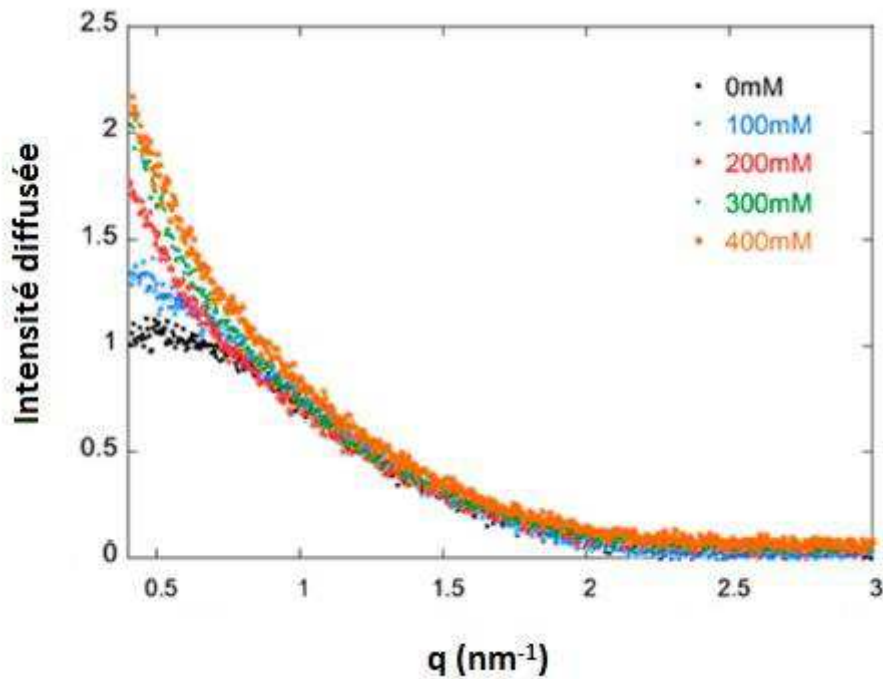


Figure IV.25. Courbes SAXS du lysozyme à 21,7 mg/mL et diverses concentrations en sel (0 à 400mM) dans un tampon acétate de sodium à 50 mM pH 4,5 et à température ambiante. La bosse de répulsion électrostatiques présente en l'absence de sel, tend à disparaître lorsque la concentration en sel augmente, ce qui témoigne d'un écrantage des charges et d'une diminution de la répulsion.

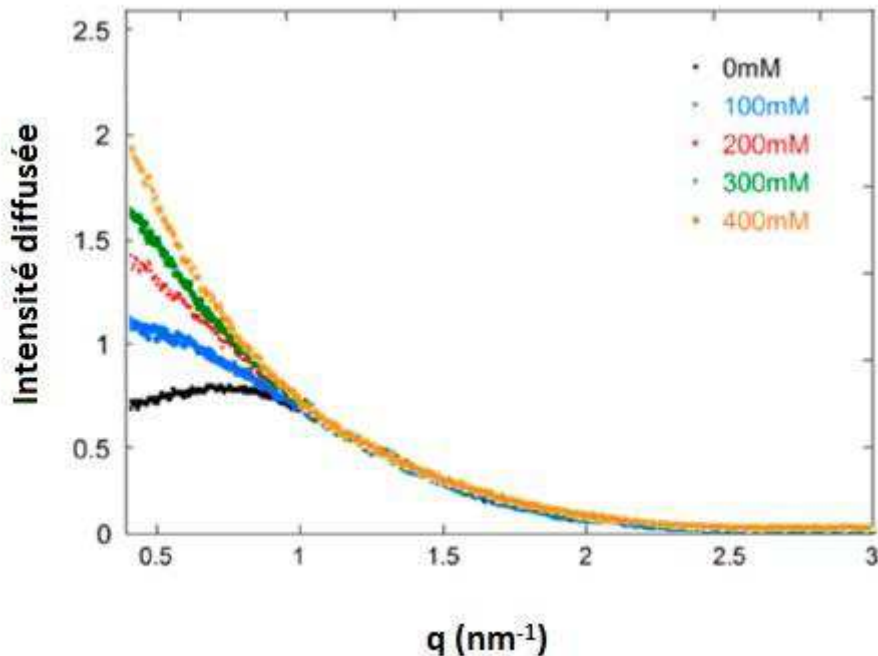


Figure IV.26. Courbes SAXS du lysozyme à 52 mg/mL et diverses concentrations en sel (0 à 400mM) dans un tampon acétate de sodium à 50 mM pH 4,5 et à température ambiante. La bosse de répulsion électrostatiques présente en l'absence de sel, tend à disparaître lorsque la concentration en sel augmente, ce qui témoigne d'un écrantage des charges et d'une diminution de la répulsion.

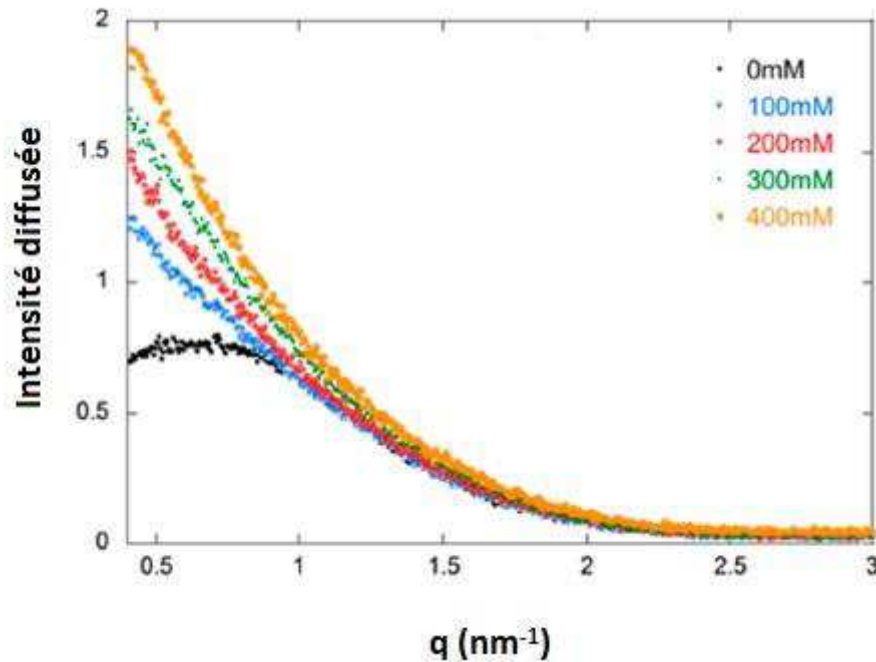


Figure IV.27. Courbes SAXS du lysozyme à 86,7 mg/mL et diverses concentrations en sel (0 à 400mM) dans un tampon acétate de sodium à 50 mM pH 4,5 et à température ambiante. La bosse de répulsion électrostatiques présente en l'absence de sel, tend à disparaître lorsque la concentration en sel augmente, ce qui témoigne d'un écrantage des charges et d'une diminution de la répulsion.

Il semble clair sur ces graphes, que la concentration en sel a une importance sur les images de diffusion et donc, sur le comportement des molécules en solution.

Une fois de plus, comme expliqué dans la partie IV.1.4, l'intensité totale diffusée par une solution de macromolécules en solution peut s'écrire comme le produit de deux facteurs :

$$I(c, q) = I_{FF}(c = 0, q) \times S(c, q) \tag{Eq. IV-31}$$

Avec I_{FF} le facteur de forme représentant le caractère idéal de la solution et ne dépendant que des macromolécules considérées (taille, forme...) et S le facteur de structure qui prend en compte le caractère non-idéal des solutions lorsque l'on s'éloigne d'une dilution infinie et qui dépend par conséquent des interactions entre molécules. Ces interactions peuvent être caractérisées par le second coefficient du viriel A_2 , qui peut être relié au facteur de structure avec :

$$S(c, q = 0) = \frac{1}{1 + 2MA_2c} \tag{Eq. IV-32}$$

Avec M la masse molaire des macromolécules, et c leur concentration. Une valeur de $S(c, q = 0) < 1$ ($A_2 > 0$) décrit des interactions répulsives entre molécules. A l'inverse, une valeur de $S(c, q = 0) > 1$ ($A_2 < 0$) décrit des interactions attractives.

Ainsi, en se plaçant à un angle de diffusion qui tend vers 0, la combinaison des équations Eq. IV-31 et Eq. IV-32 donne :

$$1 + 2MA_2c = \frac{I_0}{I(c, q = 0)} \quad \text{Eq. IV-33}$$

Les valeurs de l'intensité à angle de diffusion nul en fonction de la concentration en protéine $I(c, q = 0)$ sont obtenues de la même manière que dans la partie précédente, en effectuant une régression du tracé de Guinier, et cela pour chaque concentration en sel, les valeurs sont présentées sur la Figure IV.28.

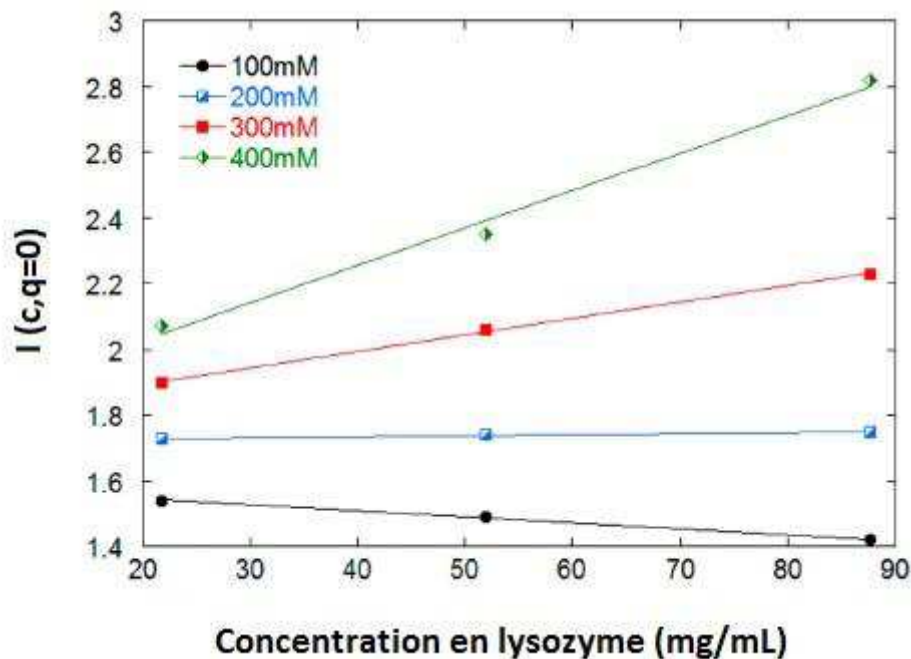


Figure IV.28. Valeurs de l'intensité à angle de diffusion nul pour différentes concentrations en lysozyme et en sel. Ces valeurs sont obtenues à l'aide de l'ordonnée à l'origine du tracé de Guinier présenté sur l'équation Eq. IV-34.

La valeur de I_0 est obtenue en faisant de même mais avec une concentration minimale en protéine et ainsi, pour chaque concentration en sel et en protéine, la valeur du rapport $\frac{I_0}{I(c, q=0)}$ figurant dans l'équation Eq. IV-33 est connue.

Enfin, pour chaque concentration en sel, le tracé de $\frac{I_0}{I(c, q=0)}$ en fonction de la concentration en protéine donne, en accord avec l'équation Eq. IV-33, une droite dont le coefficient directeur correspond à $2MA_2$. Ainsi, connaissant la masse molaire du lysozyme, $M=14,3\text{kDa}$, il est possible d'obtenir les valeurs du second coefficient du viriel pour chaque concentration en sel. Ces valeurs sont indiquées dans la Figure IV.29 et comparées avec des données de la littérature obtenues à l'aide de la même méthodologie.

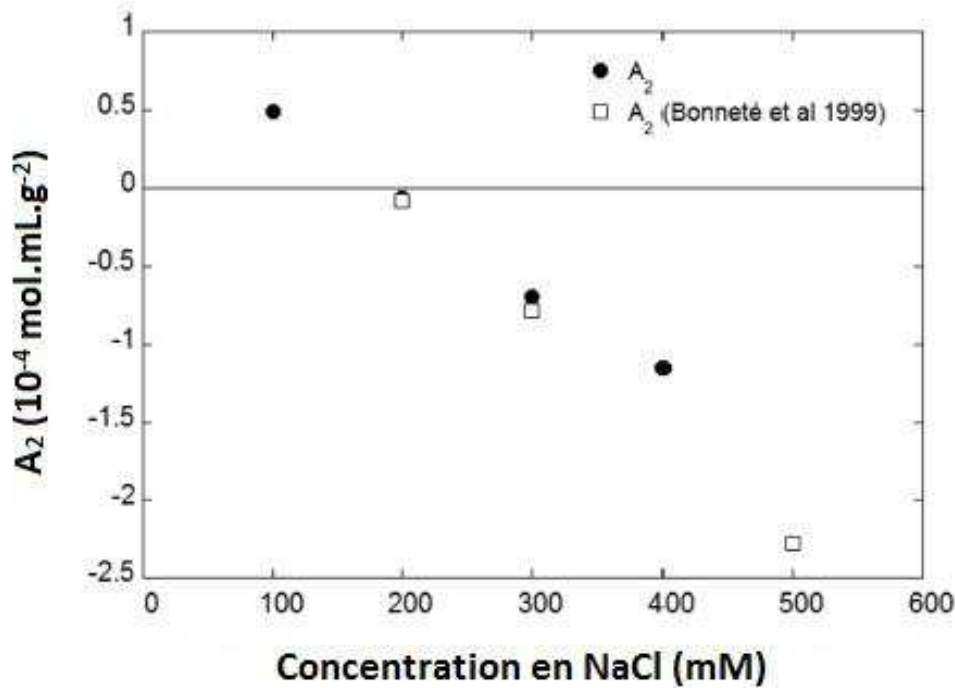


Figure IV.29. Variations du second coefficient du viriel du lysozyme en fonction de la concentration en sel. Ce coefficient est positif pour des concentrations en sel inférieures à 180mM ce qui illustre un régime d'interactions répulsif entre les protéines. Lorsque la concentration en sel dépasse 180mM, il y a assez de sel pour écranter les charges des protéines, qui bascule alors dans un régime d'interactions attractif. Ces résultats sont en accord avec des données de la littérature (Bonneté et al., 1999).

Il est alors intéressant de noter qu'en l'absence de sel, la protéine est dans un état d'interactions répulsives à cause de la répulsion électrostatique comme évoqué précédemment. Lorsqu'une petite quantité de sel est ajoutée dans les gouttes, les charges du lysozyme sont alors partiellement écranées et la répulsion est diminuée comme l'illustre la diminution du second coefficient du viriel. Lorsqu'il y a assez de sel pour écranter l'ensemble des charges, la répulsion inter-protéines disparaît et il est par conséquent possible de basculer dans un état d'interactions attractives. Cela peut être observé pour des concentrations en sel supérieures à 180 mM où le second coefficient du viriel devient négatif, soulignant un point d'intérêt avec un comportement macromoléculaire qui peut désormais conduire à de l'agrégation et éventuellement à de la cristallisation. Il est également bon d'observer que ces résultats sont en accord avec des précédents obtenus en micro-volumes (Bonneté et al., 1999), validant ainsi l'approche microfluidique pour l'obtention de données sur les interactions intermoléculaires en utilisant qu'une très faible quantité de protéine (12 mg dans cette étude).

IV.3.3 Etudes avec cristallisation

Dans les études menées précédemment, nous nous sommes intéressés aux interactions moléculaires intervenant en régime sous-saturé ou bien avant que les phénomènes de nucléation n'apparaissent. Ici, nous allons regarder plus attentivement des phénomènes de cristallisation à l'aide de deux études, une cristallisation quasi-instantanée, et une plus longue avec différents mécanismes selon les conditions expérimentales.

IV.3.3.1 Cristallisation de la glucose isomérase

Pour cette première étude de cristallisation, nous nous sommes intéressés à une nouvelle protéine : la glucose isomérase, présentée dans le chapitre 2. Il apparaît en effet dans la littérature (Bhosale et al., 1996; Gillespie et al., 2014) que cette protéine est capable de cristalliser rapidement à l'aide d'un mécanisme de déplétion, et c'est pourquoi il nous a semblé intéressant de l'étudier.

Mécanisme de déplétion

La théorie des interactions entre protéines a été expliquée dans la partie IV.1.4 dans laquelle ont été évoquées les liaisons hydrogène et les forces de van der Waals. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, une autre interaction, l'attraction par déplétion, peut jouer un rôle important (Asakura and Oosawa, 1958). Cette force apparaît dans des solutions densément peuplées par des objets de taille importante (macromolécules, micelles, etc.), l'encombrement conduisant à l'augmentation des concentrations effectives à certains endroits. Pour expliquer ce phénomène, on peut représenter schématiquement un système constitué de nombreuses petites sphères et quelques grosses sphères comme sur la Figure IV.30. Considérons ces objets comme des sphères dures, sans interactions. Dans notre cas d'étude, les grosses sphères rouges sont les molécules à cristalliser, donc les molécules de glucose isomérase, et les petites sphères violettes sont des micelles formées par un surfactant spécialement choisi.

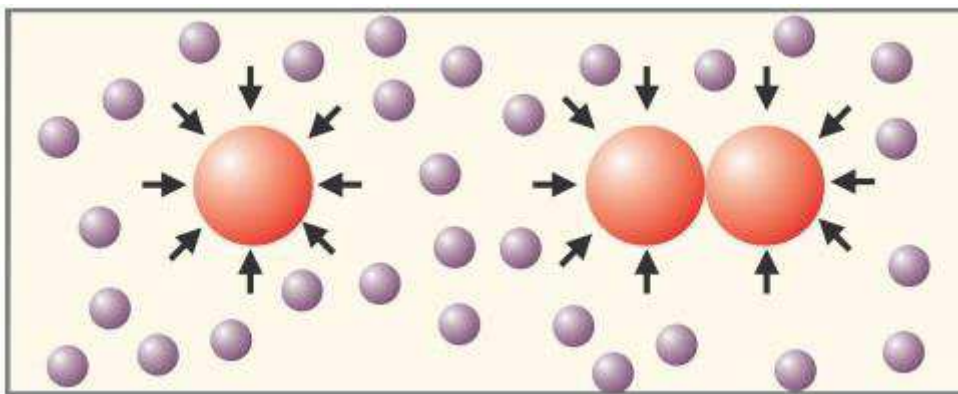


Figure IV.30. Représentation d'un système avec attraction par déplétion. Les micelles entourent les protéines de tous les côtés, mais ne peuvent accéder à la zone de contact lorsque deux protéines se rapprochent. Un gradient de concentration de micelles se crée entre l'extérieur des protéines et la zone de contact entraînant une pression osmotique maintenant les protéines en contact.

Dans un système comme celui-ci, les micelles entourent les protéines de tous les côtés. Cependant lorsque deux protéines se rapprochent, les micelles ne peuvent accéder à la zone de contact des protéines. Il se crée alors un gradient de concentrations entre l'extérieur des protéine et la zone de contact, si bien que les micelles vont exercer une force correspondante à leur pression osmotique sur l'extérieur des protéines, permettant de les maintenir en contact.

Il est possible d'expliquer ce mécanisme d'interaction avec une vue alternative, comme illustré sur la Figure IV.. Dans le système présenté ici, les centres de masse des micelles n'ont pas accès aux volumes en gris proches des parois, ou autour des protéines (partie gauche de la Figure IV..

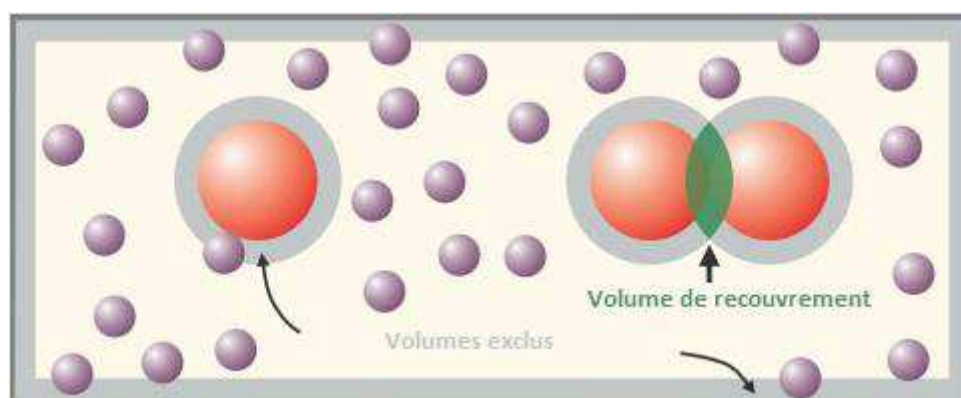


Figure IV.31. Vue alternative du mécanisme de déplétion

Cependant, lorsque deux protéines s'approchent l'une de l'autre, ces volumes exclus se recouvrent, ce qui entraîne un plus grand volume accessible pour les micelles (partie droite de la Figure IV.). En considérant l'ensemble du système, à cause du nombre important de micelles, une telle augmentation du volume accessible entraîne une augmentation de l'entropie du système, qui est par conséquent plus stable dans une configuration où les grosses sphères sont en contact les unes avec les autres.

Cristallisation de la glucose isomérase

Pour induire le mécanisme de déplétion présenté précédemment nous avons utilisé un surfactant fluoré, synthétisé par un groupe de recherche de l'université d'Avignon (Desgranges et al., 2016), protégé par un brevet sous la référence WO 2016185425 A1, et connu pour former de larges micelles en solution, au-dessus de sa concentration micellaire critique. Ce sont ces micelles qui sont alors capables d'induire un mécanisme de déplétion comme illustré sur les Figure IV.30 et Figure IV..

Pour mener les expériences, nous avons utilisé le premier dispositif expérimental, avec une puce en OSTEMER, une génération des gouttes, et un envoi direct au porte-échantillon à température ambiante. Les trois entrées pour les phases aqueuses étaient alors, une solution de glucose isomérase à 50mg/mL dans un buffer MES à pH 6,5, une solution de surfactant à 4 % massique dans le même buffer MES et enfin, une solution de buffer MES permettant de diluer plus ou moins les autres solutions pour varier les concentrations dans les gouttes. L'huile est toujours le Krytox GPL100 avec le tensioactif copolymère à trois blocs PFPE-PEG-PFPE. L'avantage d'un tel dispositif

est qu'il permet, une fois de plus, d'étudier différentes concentrations rapidement, en changeant uniquement les débits des solutions stocks. Les débits et concentrations correspondantes utilisés dans cette série d'expérience sont présentés dans le Tableau IV.4. Une photographie de la génération des gouttes est présentée sur la Figure IV.31.

Tableau IV.4. Conditions opératoires de la série d'expériences réalisées dans le but de cristalliser la glucose isomérase par un mécanisme de déplétion induit par des micelles de surfactant.

Débits de solution stock ($\mu\text{L}/\text{min}$)				Concentrations dans les gouttes	
Huile	Glucose Isomérase	Surfactant	Buffer MES	Glucose Isomérase (mg/mL)	Surfactant (%m)
2	0,7	0,4	1,5	13,5	0,6
2	0,7	0,6	1,3	13,5	0,9
2	0,7	1	0,9	13,5	1,5
2	0,7	1,2	0,7	13,5	1,8
2	0,7	1,4	0,5	13,5	2,2

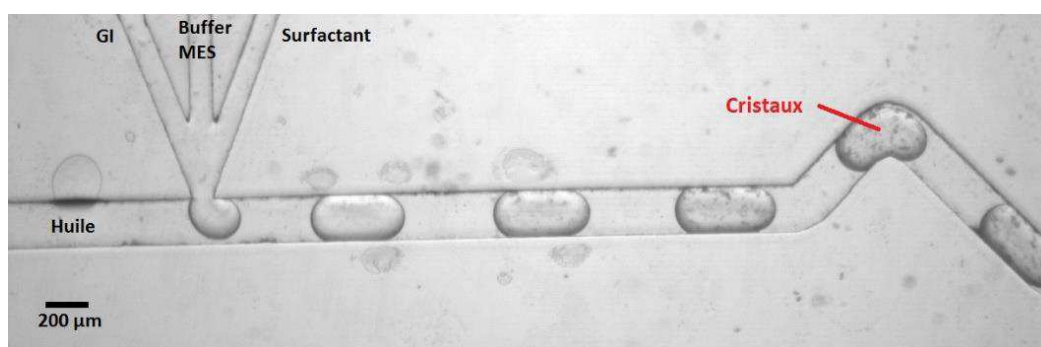


Figure IV.31. Photographie de la génération de gouttes de glucose isomérase et surfactant. Les micelles de surfactant induisent un mécanisme de déplétion permettant une cristallisation rapide de la glucose isomérase comme illustré par la présence de cristaux quelques millisecondes après la génération des gouttes.

Contrairement à la photographie de la Figure IV.24 dans laquelle était présentée la génération des gouttes de lysozyme et NaCl et où celles-ci restaient limpides dans le canal, il apparaît cette fois que les gouttes sont limpides au début, et quelques millisecondes après leur génération, des cristaux apparaissent dans les gouttes. Cette cristallisation très rapide est représentative du mécanisme d'attraction par déplétion évoqué précédemment. Ces gouttes sont alors envoyées au porte-échantillon et exposées aux rayons X. Pour une condition expérimentale donnée, les signaux SAXS d'une centaine de gouttes sont moyennés pour réduire le bruit et avoir des données statistiquement satisfaisantes. Ces résultats sont présentés sur la Figure IV.32.

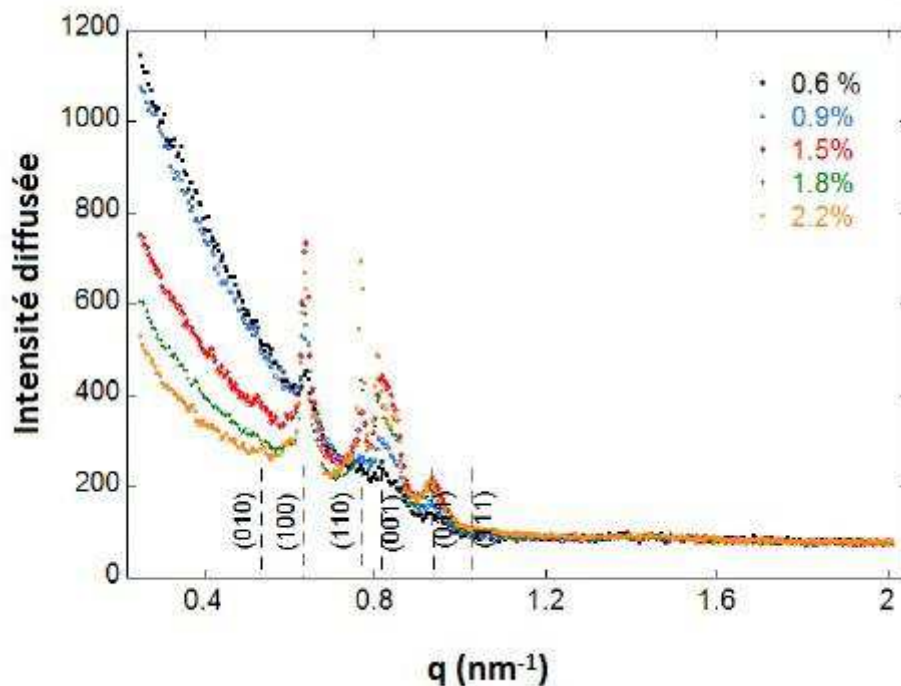


Figure IV.32. Courbes SAXS des gouttes de glucose isomérase avec différentes concentrations en surfactant. Des pics de Bragg apparaissent sur les courbes témoignant de la présence de cristaux dans les gouttes. Plus la concentration en surfactant est importante, plus ces pics sont grands et étroits. A l'inverse le signal aux petits angles diminue soulignant la consommation de la protéine en solution.

Pour des angles de diffusion faibles ($q < 0,5 \text{ nm}^{-1}$) le signal de l'intensité diffusée diminue lorsque la concentration en surfactant augmente. Ceci illustre qu'il y a moins de protéine en solution. A l'inverse, pour des angles de diffusion plus grands ($q > 0,5 \text{ nm}^{-1}$) des pics de Bragg apparaissent et deviennent de plus en plus grands et étroits en augmentant la concentration en surfactant. Cela illustre la présence de cristaux, qui grossissent avec la concentration en surfactant. En augmentant la concentration en surfactant, nous avons donc une consommation du lysozyme en solution, au profit de la formation de cristaux.

A l'aide des paramètres de la structure cristalline de la glucose isomérase présentés dans le Tableau IV.5 il est possible d'indexer les pics de diffraction, et il apparaît, comme illustré sur la Figure IV.32, que les indices trouvés correspondent parfaitement aux vecteurs de diffusion des pics expérimentaux, démontrant que les cristaux dans les gouttes sont bien des cristaux de glucose isomérase.

Cette expérience de mise en œuvre du mécanisme de déplétion illustre ainsi la possibilité d'étudier une transition de phase liquide-solide à l'aide de notre dispositif expérimental, permettant d'obtenir des résultats rapidement et en utilisant toujours une faible quantité de produits.

Tableau IV.5. Paramètres de maille de la glucose isomérase (10AD.pdb)

Longueur (Å)		Angle (°)	
a	98,45	α	90
b	129,59	β	90
c	78,33	γ	90

IV.3.3.2 Cristallisation du lysozyme à différents endroits du diagramme de phase

Dans cette dernière série d'expériences sur la ligne BM29 de l'ESRF, nous nous sommes à nouveau intéressés au lysozyme avec du chlorure de sodium, précédemment étudié dans la partie IV.3.2.3. Mais cette fois-ci, plutôt que de simplement s'intéresser aux interactions inter-protéines avant cristallisation, nous avons porté l'intérêt de l'expérience sur la nucléation et cela, dans différentes conditions expérimentales à la manière des travaux réalisés sur les mesures de cinétiques de nucléation dans le chapitre 3. En effet, comme évoqué dans l'étude bibliographique de cette thèse, il semblerait que les mécanismes de nucléation soient influencés par la position dans le diagramme de phase, et plus précisément par la proximité avec la séparation liquide-liquide (Galkin and Vekilov, 2000; Muschol and Rosenberger, 1997; Sauter et al., 2015b). Ainsi, nous avons décidé d'étudier à deux différents temps d'attente, une condition proche de la séparation liquide-liquide et une condition plus éloignée. Pour se faire, nous avons donc utilisé le dispositif expérimental le plus complexe, à savoir le dispositif numéro 3 présenté dans la partie IV.3.1.3. Ce dernier permet de générer des gouttes, puis de les stocker à une température élevée pour empêcher la cristallisation, et ensuite de refroidir le dispositif pour induire une sursaturation, et enfin d'envoyer les gouttes au porte-échantillon à la même température, après un temps d'attente choisi.

Les gouttes ont été générées en mélangeant une solution de lysozyme, une solution tampon acétate de sodium à pH 4,5 et une solution de NaCl afin d'obtenir des concentrations en sel de 3%w/v et en protéine de 60mg/mL pour la première expérience et de 100mg/mL pour la deuxième. Elles ont été générées puis stockées à la température de 40°C puis refroidies à la température de 8,2°C comme illustré dans le diagramme de phase de la Figure IV.33 où apparaît en ligne continue la solubilité et en pointillés la binodale de séparation liquide-liquide.

Une fois refroidies, les gouttes ont été stockées 6 minutes ou 20 minutes avant d'être envoyées au porte-échantillon et exposées aux rayons X. Après de tels temps de latence, dans ces conditions expérimentales, des événements de nucléation se sont déjà produits. Ces événements étant cependant aléatoires, il n'est pas correct de procéder comme précédemment et de réaliser une moyenne sur une centaine de gouttes, car il ne se passe pas la même chose dans toutes les gouttes. Une centaine des gouttes est néanmoins envoyée au porte-échantillon pour chaque expérience, mais l'ensemble de la centaine de signaux SAXS est conservé tel quel et permet de réaliser une étude qualitative plus que quantitative afin d'observer certains comportements.

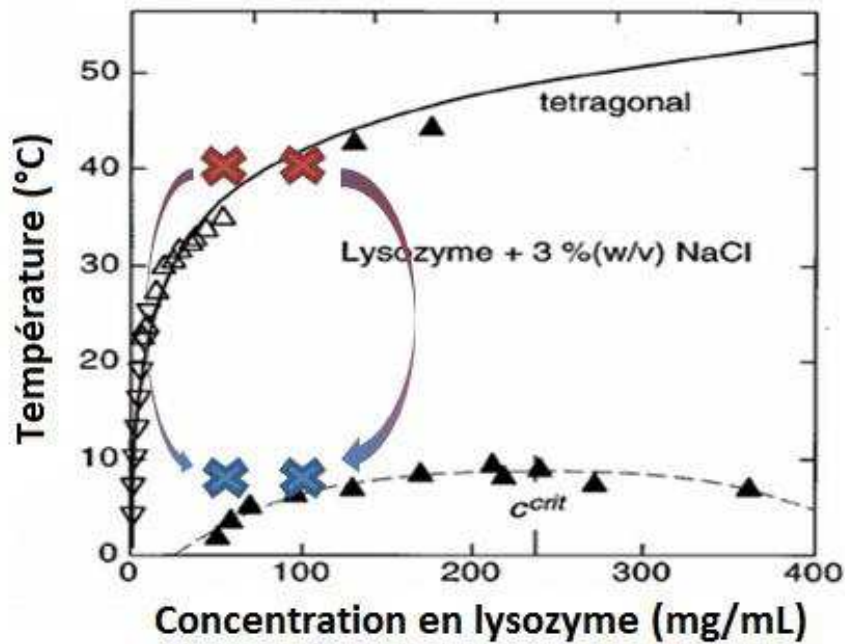


Figure IV.33. Diagramme de phase du lysozyme avec 3%w/v de NaCl et conditions expérimentales. La température de remplissage de la puce est de 40°C afin d'éviter la cristallisation durant le remplissage. La température est ensuite descendue rapidement à 8,2°C pour induire les événements de nucléation. Deux concentrations différentes sont étudiées, une proche de la séparation liquide-liquide et une plus lointaine.

Lysozyme à 60 mg/mL (loin de la séparation liquide-liquide)

Dans cette première expérience, nous avons donc généré des gouttes contenant 60mg/mL de lysozyme et 3%w/v de NaCl et les avons stockées pendant 6 ou 20 minutes à 8,2°C (condition « lointaine » de la séparation liquide-liquide en accord avec la Figure IV.33). Les centaines de signaux SAXS pour ces deux expériences sont regroupés sur la Figure IV.34 pour les deux temps d'attente fixés.

Les gouttes étant en mouvement au moment de l'exposition, il est nécessaire de minimiser le temps d'exposition aux rayons X (100ms), de plus comme évoqué précédemment, aucune moyenne n'est réalisée sur les données, ce qui engendre par conséquent un bruit important aux grands angles de diffusion, mais qui n'est pas spécialement gênant pour l'analyse qualitative des données.

Il apparaît pour un temps de stockage court, 6 minutes, que l'ensemble de la centaine de gouttes se comporte de la même manière. On retrouve le signal caractéristique du lysozyme en solution, avec des interactions attractives (engendrées par la présence de sel) illustrées par la remontée du signal aux petits angles, comme c'était le cas dans les expériences de la partie IV.3.2.3. Quelques pics de diffraction sont déjà présents ce qui souligne la présence de cristaux dans quelques gouttes.

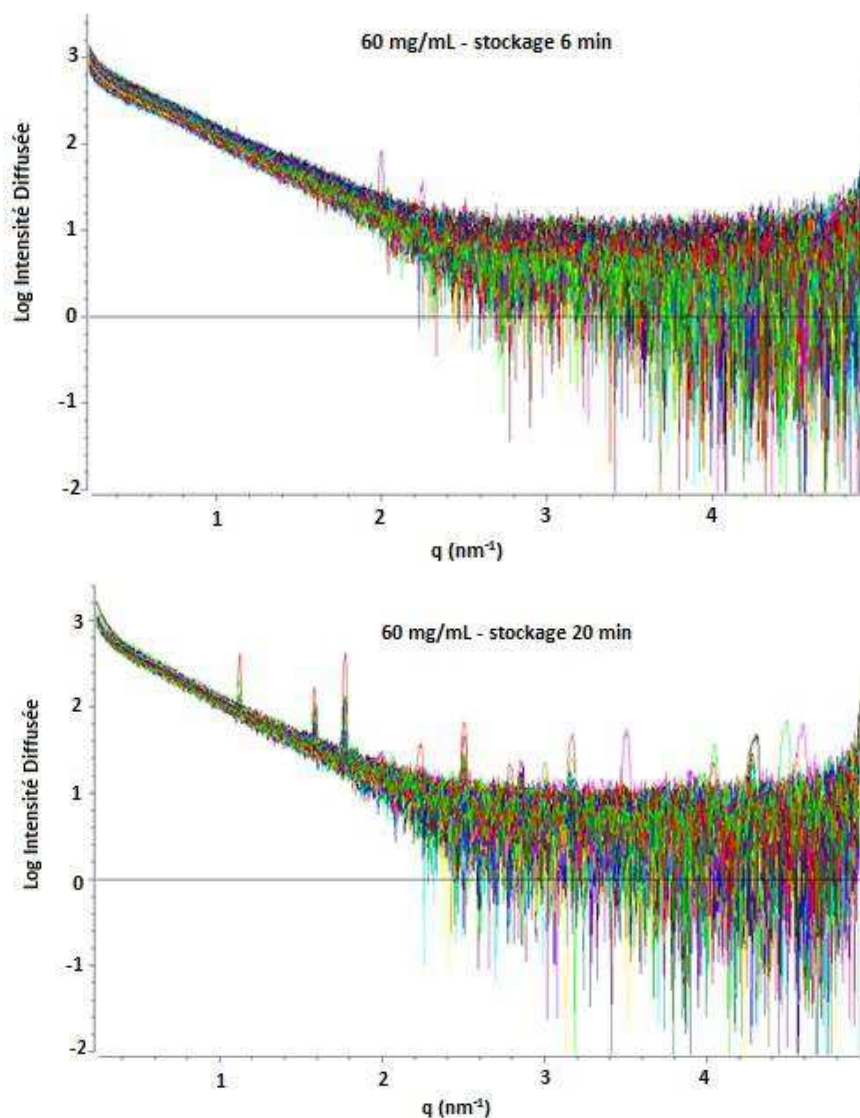


Figure IV.34. Courbes SAXS de centaines de gouttes de lysozyme à 60 mg/mL 3%w/v NaCl stockées à 8,2°C pendant 6 et 20 minutes. La décroissance du signal est caractéristique des monomères de lysozyme en interactions attractives. Des pics de Bragg apparaissent illustrant la formation de cristaux, plus nombreux à 20 minutes qu'à 6 minutes.

Pour un temps de stockage plus long, 20 minutes, on retrouve cette pente décroissante caractéristique du lysozyme en solution en interactions attractives mais cette fois, il y a beaucoup plus de pics de diffraction et ils sont beaucoup plus grands et étroits, ce qui souligne l'existence de gros cristaux dans beaucoup de gouttes.

Finalement il est possible de faire une hypothèse sur le mécanisme de nucléation en observant ces deux figures. Aucun évènement particulier n'intervient avant la nucléation, on a dans toutes les gouttes, du lysozyme en interactions attractives mais pas d'agrégats particuliers. Au bout d'un certain temps d'attente, plus ou moins long selon la goutte, un nucleus apparaît et grossit pour former un cristal. Plus le temps avance, plus il y a de gouttes peuplées par des cristaux, qui grossissent avec le temps. Cette hypothèse de mécanisme est en accord avec un modèle de nucléation en une étape, la théorie de la nucléation classique présentée dans le chapitre 1.

Lysozyme à 100 mg/mL (proche de la séparation liquide-liquide)

Nous avons répété la même expérience que précédemment mais en générant cette fois des gouttes contenant 100 mg/mL de lysozyme et toujours 3%w/v de NaCl (condition « proche » de la séparation liquide-liquide en accord avec la Figure IV.33). Les résultats sont présentés sur la Figure IV.35.

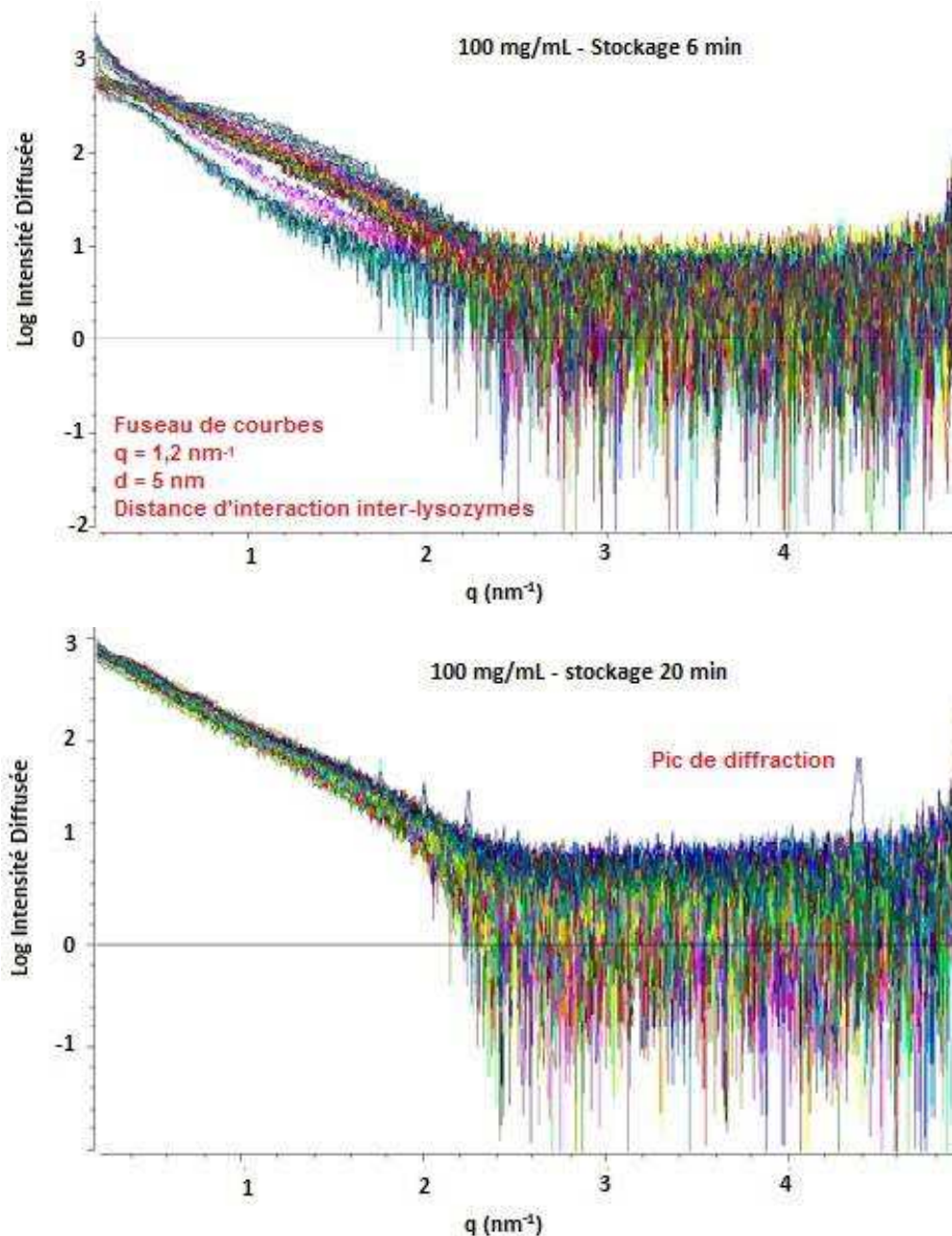


Figure IV.35. Courbes SAXS de centaines de gouttes de lysozyme à 100 mg/mL 3%w/v NaCl stockées à 8,2°C pendant 6 et 20 minutes. Pour un temps de stockage court, les signaux ne sont pas identiques dans toutes les gouttes. Des bosses apparaissent et peuvent être le reflet d'interactions courtes entre molécules de lysozyme dans des zones de fortes concentrations. Ces zones disparaissent avec le temps et semblent être consommées au profit de cristaux indiqués par la présence de pics de Bragg.

Les remarques concernant le bruit sont identiques à celles des expériences précédentes.

Cette fois, il apparaît pour un temps court de stockage des gouttes, 6 minutes, que parmi la centaine de gouttes, les comportements ne sont pas identiques, comme c'était le cas auparavant. Il est difficile d'obtenir des données quantitatives à partir de ces courbes, mais qualitativement, on peut affirmer qu'il n'y a désormais pas uniquement des monomères de lysozyme en interaction attractive, mais également d'autres objets en solution. Entre 0,2 et 2 nm⁻¹, il apparaît comme un fuseau de courbes. Là où il n'y avait avant qu'un signal décroissant identique, ici nous avons une bosse plus ou moins marquée qui se dessine aux alentours de 1,2 nm⁻¹, voire même à 0,2 nm⁻¹ pour certaines courbes. En raisonnant en terme de distances à l'aide de la formule $d = \frac{2\pi}{q}$, cette bosse souligne une distance d'environ 5 nm. Le diamètre d'une molécule de lysozyme est de 2,8 nm. Par conséquent, nous pouvons faire l'hypothèse que cette distance de 5 nm reflète la distance d'interaction entre deux molécules de lysozyme, qui sont par conséquent très proches, donc probablement dans un milieu fortement concentré. La variation des courbes selon la goutte considérée est alors le reflet des fluctuations de concentrations. Ainsi, on peut penser que cette fois, les molécules de lysozyme ne se comportent pas uniquement comme des molécules diluées en interactions attractives à moyenne distance, mais forment également des clusters de nucléation, denses, dans lesquels les molécules sont concentrées et interagissent à courte distance (par rapport à leur taille). Cette bosse caractéristique d'interactions courtes intra-cluster dense a déjà été observée dans d'autres conditions (Sauter et al., 2015b), et si une nouvelle fois, aucune donnée quantitative ne peut être obtenue, cela conforte l'hypothèse d'un mécanisme de nucléation en deux étapes, avec la formation de pré-clusters de nucléation.

Aucune information sur la taille globale de ces clusters ne peut être obtenue à cause de la gamme d'angles de diffusion accessible sur la ligne BM29. En effet, il apparaît dans la littérature que ces clusters ont usuellement une taille de l'ordre de la centaine de nanomètres ce qui donne en terme de vecteur de diffusion, en utilisant à nouveau la formule $d = \frac{2\pi}{q}$ une région d'intérêt se situant aux alentours de 0,06 nm⁻¹ et qui sort par conséquent de la gamme accessible dans de telles expériences.

Lorsque l'on regarde maintenant les courbes pour un temps de stockage long, 20 minutes, on constate que ces bosses ont quasiment disparues et que des pics de diffraction sont apparus. On note également une nouvelle fois la pente caractéristique du lysozyme dilué en solution avec des interactions attractives. Cela illustre alors qu'il n'existe presque plus de zones denses, mais uniquement du lysozyme dilué et des cristaux qui sont apparus. Il est donc possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle le lysozyme présent dans les zones denses a été utilisé pour former des cristaux, faisant ainsi de ces zones des clusters de nucléation. Nous avons ainsi, dans ces conditions proches de la séparation liquide-liquide, un mécanisme de nucléation en deux étapes, avec dans un premier temps, la formation de clusters de nucléation, zones de concentrations élevées en solution, où les molécules sont proches les unes des autres, et dans un second temps, une nucléation au sein de ces clusters, qui sont alors consommés pour former des cristaux.

Il est également intéressant de comparer les pics de diffraction à 20 minutes pour les deux concentrations en lysozyme différentes. Les pics sont petits à 100 mg/mL et se confondent parfois avec le bruit du signal, alors qu'ils sont grands à 60 mg/mL. Cela peut sembler paradoxal dans le sens où avec une concentration plus élevée, nous pourrions nous attendre à de plus nombreux et gros cristaux.

Il est en fait probable, qu'avec le mécanisme en deux étapes, la présence de clusters de fortes concentrations, engendre un nombre important de centres de nucléation. Cependant, le lysozyme autour de ces centres étant plus dilué, une fois ces zones denses ayant nucléées, les cristaux grossissent lentement. Ainsi, on observe dans ce cas un nombre important de petits cristaux qui se traduit par de petits pics sur les signaux SAXS, comme illustré par la Figure IV.35.

A l'inverse, dans le mécanisme en une étape, la solution est homogène avec une concentration moyenne, ce qui engendre moins de cristaux, mais qui grossissent plus rapidement. Cela se traduit par des pics bien plus grands et étroits sur les signaux SAXS, comme illustré par la Figure IV.34.

Il est intéressant de noter que ces remarques sur l'aspect macroscopique des cristaux selon la position dans le diagramme de phase sont en accord avec les observations réalisées dans le chapitre 3.

Ainsi, il semble que les résultats obtenus dans cette partie, illustre bien l'existence de deux mécanismes de nucléation différents, selon la position des conditions opérations dans le diagramme de phase.

IV.3.4 Conclusion sur les expériences sur la ligne BM29

Nous avons illustré dans cette partie les différents dispositifs expérimentaux pensés et développés dans ce travail, et leur couplage avec de la diffusion de rayons X sur la ligne BM29 de l'ESRF pour différentes études.

Un premier dispositif, assez simple, permettant de générer des gouttes contenant trois composants différents, de les mélanger et de les envoyer directement au porte-échantillon à température ambiante a été utilisé pour valider les produits utilisés pour générer les gouttes en s'assurant de la stabilité des protéines à l'intérieur de ces dernières. Il a également été utilisé pour étudier les interactions entre des molécules de lysozyme, en remontant jusqu'aux variations du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en sel. Enfin, il a aussi été utilisé dans l'étude d'une transition de phase, et a permis d'illustrer le mécanisme original de cristallisation, engendré par des attractions par déplétion, à l'aide de micelles de surfactants.

Un second dispositif, plus abouti, permettant de mesurer en ligne la concentration en protéine à l'intérieur des gouttes, a permis de faire le lien entre les courbes SAXS et la concentration en protéine d'une goutte. Plus précisément, il est possible de déterminer un domaine de concentration dans lequel les molécules peuvent être considérées comme « diluées », elles n'interagissent pas entre elles, et le facteur de structure a par conséquent peu d'importance.

Dans de tels domaines, il est possible de déterminer le rayon de giration des protéines, et à l'aide de certains programmes de modélisation, de remonter à l'enveloppe moléculaire.

Enfin, un dernier dispositif, permettant de stocker des gouttes et de contrôler leur température, de leur génération, jusqu'à leur exposition aux rayons X, nous a permis d'illustrer des comportements différents de nucléation en fonction du positionnement dans le diagramme de phase, et de faire des hypothèses sur les mécanismes de nucléation correspondant, en une étape, avec formation de cristaux en accord avec la théorie de nucléation classique, ou en deux étapes, avec la formation préalable de clusters de nucléation.

IV.4 Etude sur la ligne SWING à SOLEIL

Dans le but de poursuivre les études sur la nucléation et de mettre en évidence l'existence des clusters de nucléation, nous avons obtenu du temps de faisceau sur la ligne SWING à SOLEIL. Pour réaliser les expériences, un nouveau dispositif expérimental original a été pensé et conçu dans ce travail. Nous présenterons ainsi dans cette partie, dans un premier temps, le montage expérimental et son protocole d'utilisation, et dans un second temps, les résultats des expériences.

IV.3.5 Présentation du montage expérimental

Dans cette nouvelle expérience, plutôt que d'envoyer les gouttes au faisceau à l'aide d'un capillaire en sortie de puce microfluidique, nous avons voulu directement mettre la puce devant le faisceau. Notre dispositif contient alors deux parties interconnectées. Une première puce dans laquelle il est possible de générer des gouttes, de mesurer leur concentration et de les envoyer ou pas vers une sortie « poubelle » lorsque les concentrations ne sont pas jugées correctes. Cette première partie est connectée à l'aide d'un capillaire en Kapton à une deuxième puce dans laquelle il est possible de stocker des gouttes à des endroits spécifiques à l'aide de pièges capillaires (Dangla et al., 2011), des puits légèrement plus profonds que le canal dans lequel circulent les gouttes et dans lesquels les gouttes vont gagner en surface et vont donc rester bloquées. Afin de mesurer les concentrations dans la première partie du dispositif, il est nécessaire de réaliser la puce en PDMS comme évoqué précédemment. En revanche pour la seconde partie qui doit se placer devant le faisceau, il est nécessaire d'avoir un matériau résistant aux rayons X et c'est pourquoi cette deuxième puce est réalisée en OSTEMER, avec des fenêtres en Kapton, conformément à la technique présentée dans le chapitre 2. Nous avons ainsi un dispositif hybride original comme présenté sur la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

Concernant le protocole d'utilisation, des débits sont choisis pour les solutions aqueuses et pour l'huile ce qui permet de générer des gouttes avec des concentrations précises. Au début des expériences, les débits n'étant pas stables et de l'air pouvant se trouver dans les connectiques, les gouttes n'ont pas les bonnes concentrations et c'est pourquoi il ne faut pas les envoyer dans la seconde puce où elles se retrouveraient stockées. Ainsi, la sortie de la seconde puce est bouchée, et la sortie poubelle de la première puce ouverte, ce qui permet d'éliminer les mauvaises gouttes et les bulles d'air et cela, tant que le signal du spectromètre n'est pas stable. Une fois que les gouttes ont la bonne concentration, la sortie poubelle est bouchée, et la sortie de la seconde puce ouverte, ce qui permet d'envoyer les gouttes dans la deuxième partie du dispositif, où elles seront stockées dans des puits.

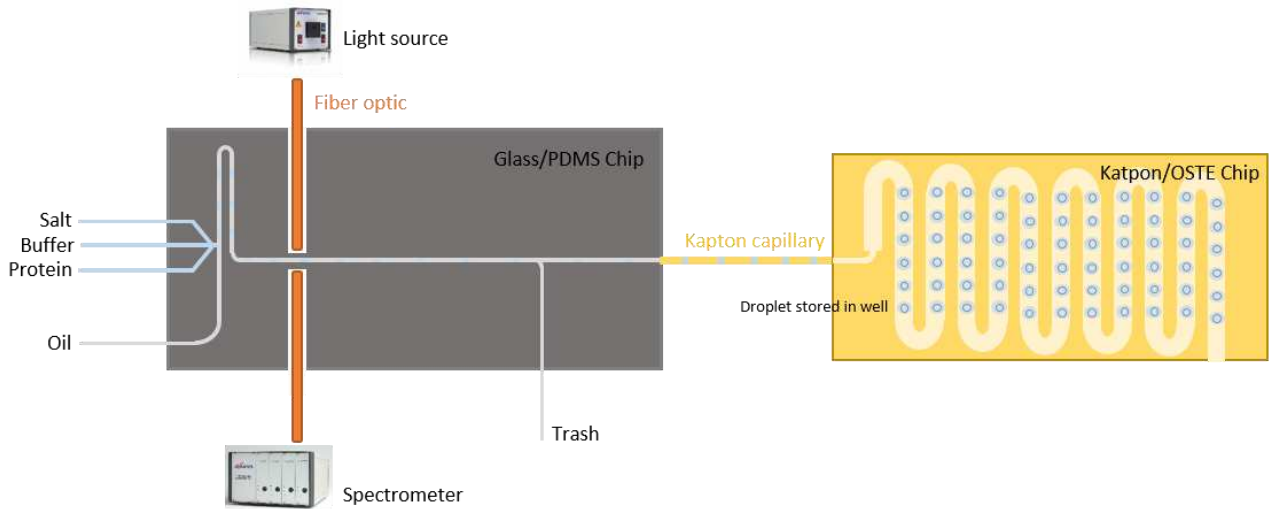


Figure IV.36. Dispositif microfluidique hybride permettant de mettre des gouttes devant le faisceau de rayons X. Une première puce en PDMS permet de générer des gouttes contenant de la protéine et du sel et de mesurer la concentration en protéine à l'aide de fibres optiques connectées à une source de lumière et un spectromètre. Tant que les gouttes n'ont pas la bonne concentration elles sont évacuées par une sortie latérale. Quand elles ont la bonne concentration elles sont envoyées dans une seconde puce où elles sont piégées dans des puits arrangés sous la forme d'un tableau. Au niveau des puits, se trouvent des fenêtres en Kapton permettant de laisser passer les rayons X et ainsi d'exposer les gouttes stockées.

L'ensemble du dispositif peut être contrôlé en température. En effet, les deux parties de la puce sont positionnées sur une plaque en cuivre sur laquelle se trouve des éléments Peltier et des ventilateurs qui permettent de dissiper la chaleur. Des fentes ont été réalisées sur la plaque en cuivre au niveau des puits de la seconde puce afin de permettre au faisceau de rayons X de passer. Ainsi, il est possible de générer les gouttes à une température relativement élevée pour éviter la cristallisation, de stocker les gouttes dans les puits, et de descendre la température pour induire une sursaturation conduisant à la cristallisation. L'idée est similaire aux expériences réalisées dans la partie IV.3.3.2 mais cette fois, il est possible d'exposer plusieurs fois la même goutte, à des temps différents, et ainsi suivre la cristallisation au sein d'une même goutte. Les Figure IV.37 Figure IV.38 et Figure IV.39 sont des photographies qui illustrent l'ensemble du dispositif expérimental. On y aperçoit la complexité du dispositif avec les nombreuses connexions, fluidiques et optiques, les deux puces fixées sur la plaque en cuivre ainsi que les ventilateurs permettant d'évacuer la chaleur des modules Peltier.

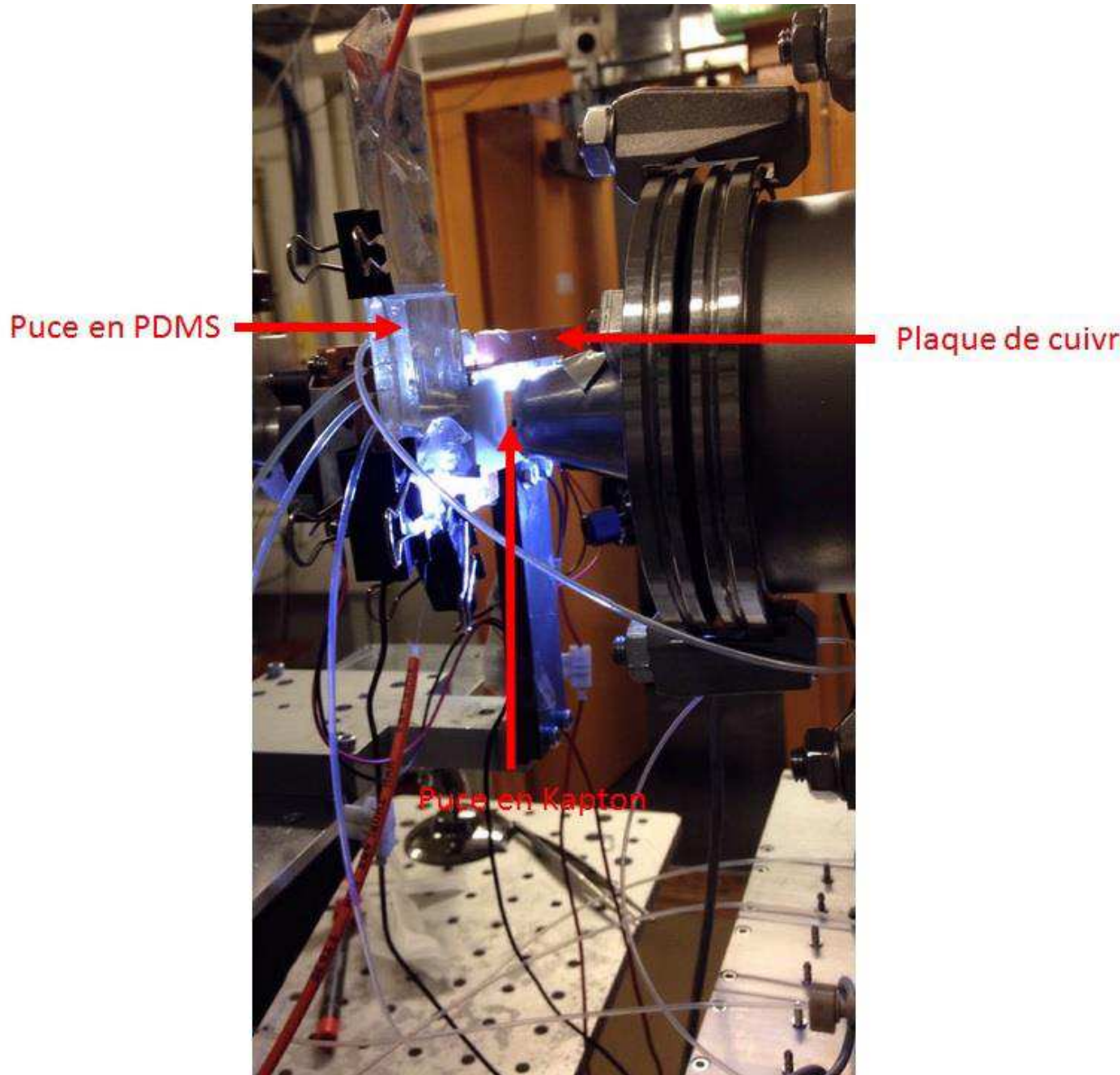


Figure IV.37. Photographie du dispositif expérimental sur la ligne

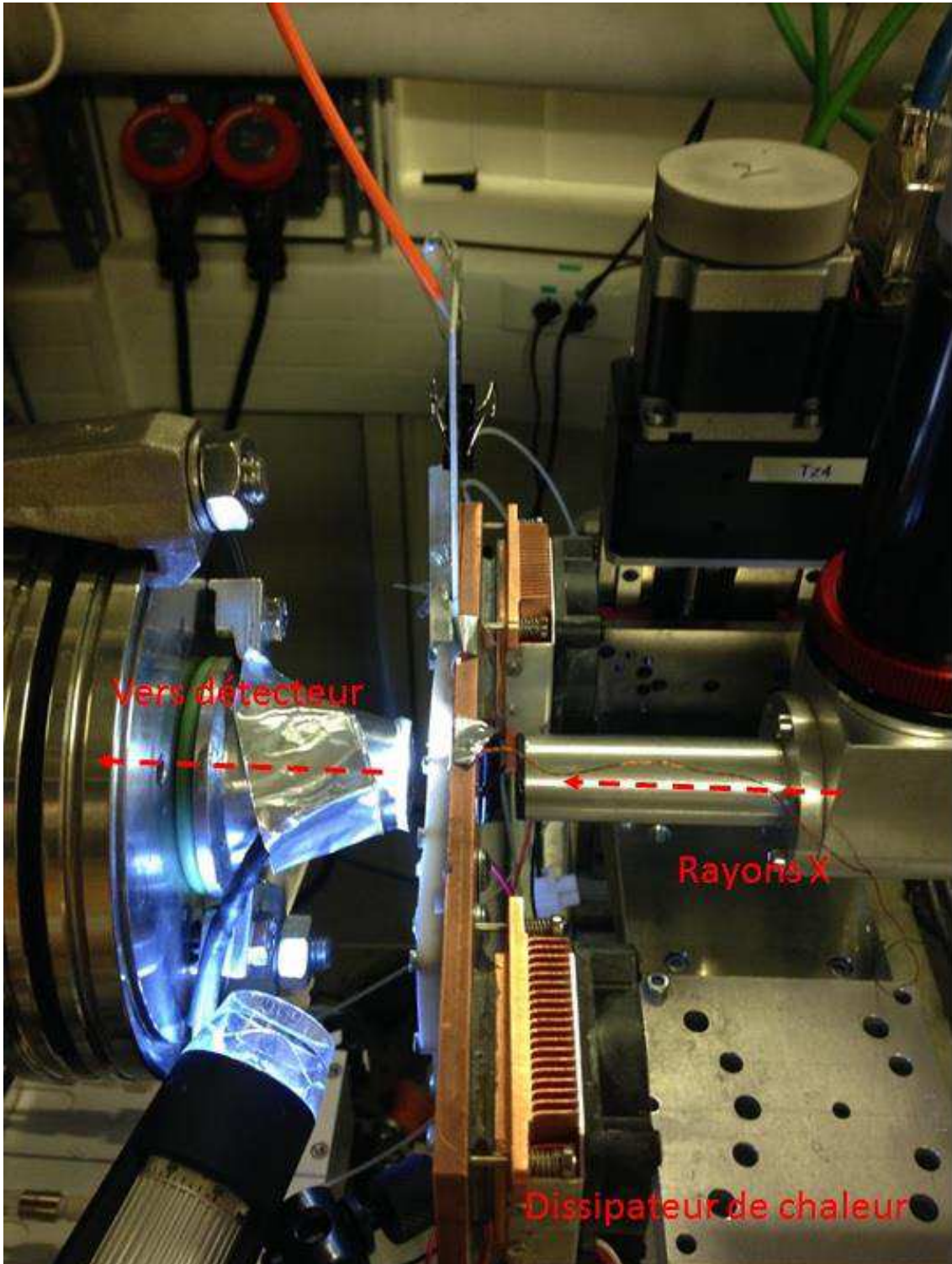


Figure IV.38. Photographie du dessus du dispositif

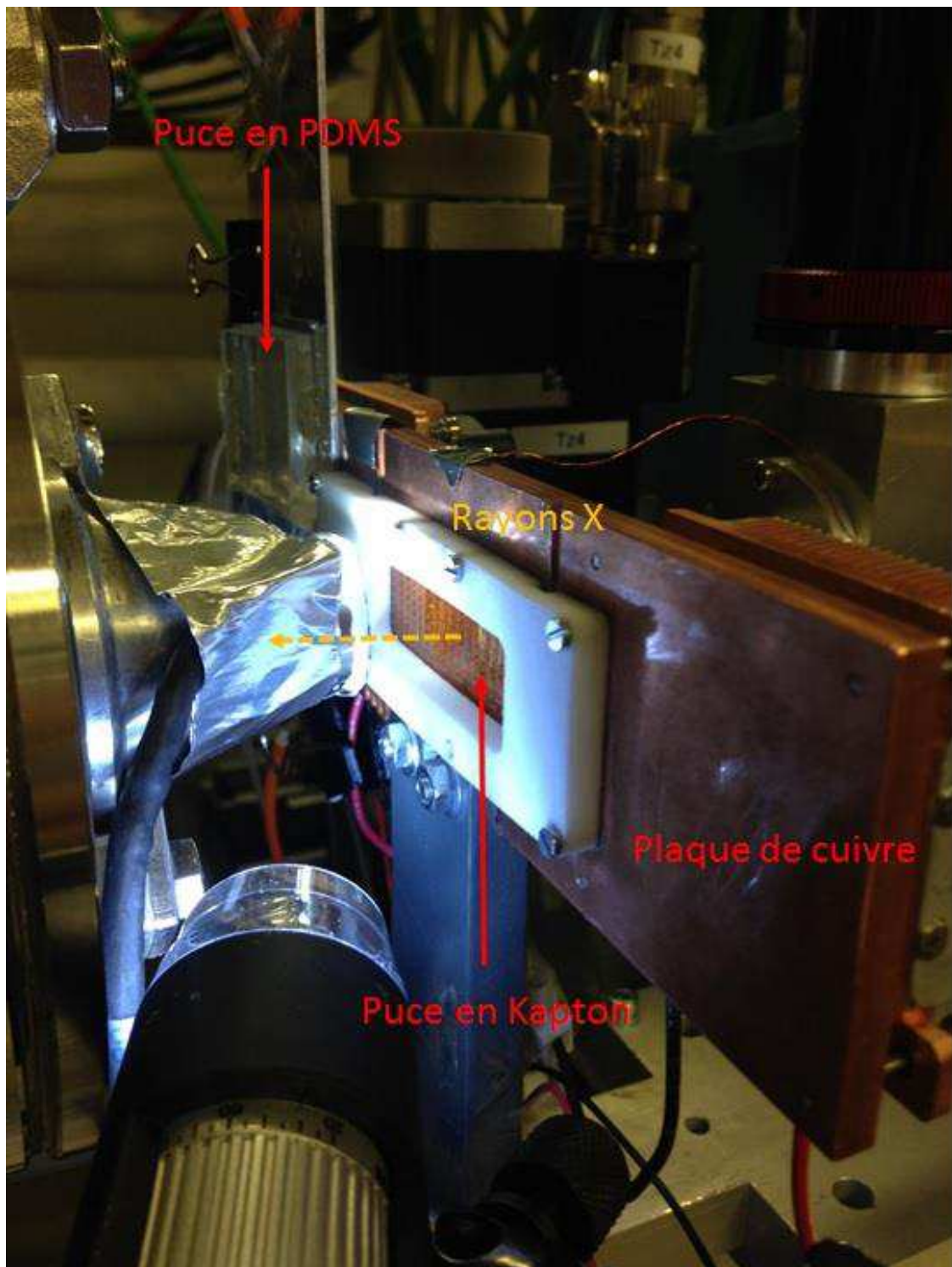


Figure IV.39. Photographie du dispositif avec un zoom sur la puce en kapton

IV.3.6 Expériences et résultats

Nous avons vu dans la dernière expérience sur BM29, les prémices de clusters de nucléation et nous voulions confirmer leur existence en réalisant une expérience sur SWING où la distance échantillon-détecteur est bien plus grande et permet d'observer de plus gros objets en s'intéressant à des angles de diffusion bien plus petits. Ainsi, nous avons réalisé une expérience similaire à celle de la partie IV.3.3.2 en générant des gouttes contenant des concentrations en lysozyme de 100 mg/mL et en NaCl de 4%w/v à une température assez élevée de 37°C pour éviter la cristallisation. Une fois les gouttes stockées dans la deuxième puce positionnée devant le faisceau, la température de l'ensemble du dispositif a été réduite à 12°C et les acquisitions ont été lancées. Les acquisitions se font automatiquement sur toute une colonne de la puce, soit sur un ensemble de 9 puits, à l'aide de la platine qui permet de déplacer le dispositif selon un axe vertical. La première goutte subit une exposition de 100 ms puis la platine positionne la seconde goutte devant le faisceau, qui subit également une exposition aux rayons X de 100 ms, et ainsi de suite jusqu'à la 9^{ème} goutte. Une fois la neuvième exposition réalisée, la platine repositionne la première goutte devant le faisceau pour une nouvelle série de mesure. Dans cette expérience, une série de mesure dure environ 1 minute à cause du temps de déplacement de la platine. Un temps d'attente de 2 minutes est observé entre chaque série de mesure. Ainsi, dans une telle expérience, nous obtenons pour chacune des 9 gouttes de la colonne, un suivi de l'évolution du signal SAXS toutes les 3 minutes.

L'ensemble de l'expérience a duré 1h30min soit un total de 30 courbes SAXS pour chacune des 9 gouttes. Pour 7 des 9 gouttes, le signal n'a pas évolué durant l'ensemble de l'expérience et on retrouve le signal caractéristique du lysozyme représentatif des interactions attractives grâce à la présence du sel. On peut trouver cela étrange dans le sens où dans des conditions a priori similaires dans la partie IV.3.3.2 des cristaux étaient observés au bout de 20 minutes. En réalité, la taille des gouttes générées dans les deux expériences n'est pas la même. Dans la partie précédente, les gouttes devaient être assez longues pour pouvoir réaliser deux expositions par gouttes en mouvement dans le porte-échantillon. En revanche ici, les gouttes doivent être assez petites pour s'assurer qu'elles soient bien stockées dans les puits et qu'elles ne puissent en sortir une fois entrées. On a par conséquent un volume différent pour les gouttes des deux expériences, qui peut justifier la différence en terme de cinétique de nucléation.

En revanche, pour deux des neuf gouttes, des comportements différents ont été observés avec une évolution au cours du temps. Les données brutes des courbes SAXS pour ces gouttes sont présentés sur les Figure IV.40 et Figure IV.41. Ces données brutes ont été épurées afin de pouvoir réaliser une analyse. Les courbes obtenues sont ainsi représentées sur la Figure IV.42.

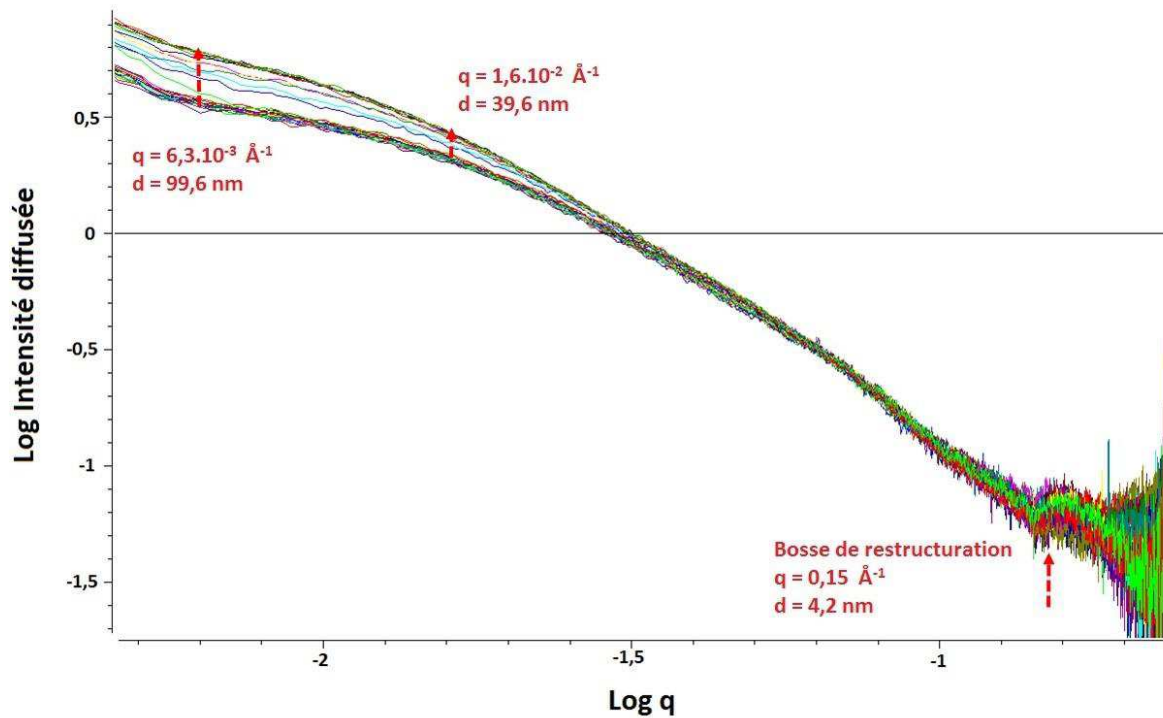


Figure IV.40. Données brutes, sur l'ensemble du temps d'acquisition des données, représentant l'évolution du signal SAXS pendant 1h30 pour la 4ème goutte de la colonne, lors d'étude de nucléation de lysozyme en présence de NaCl.

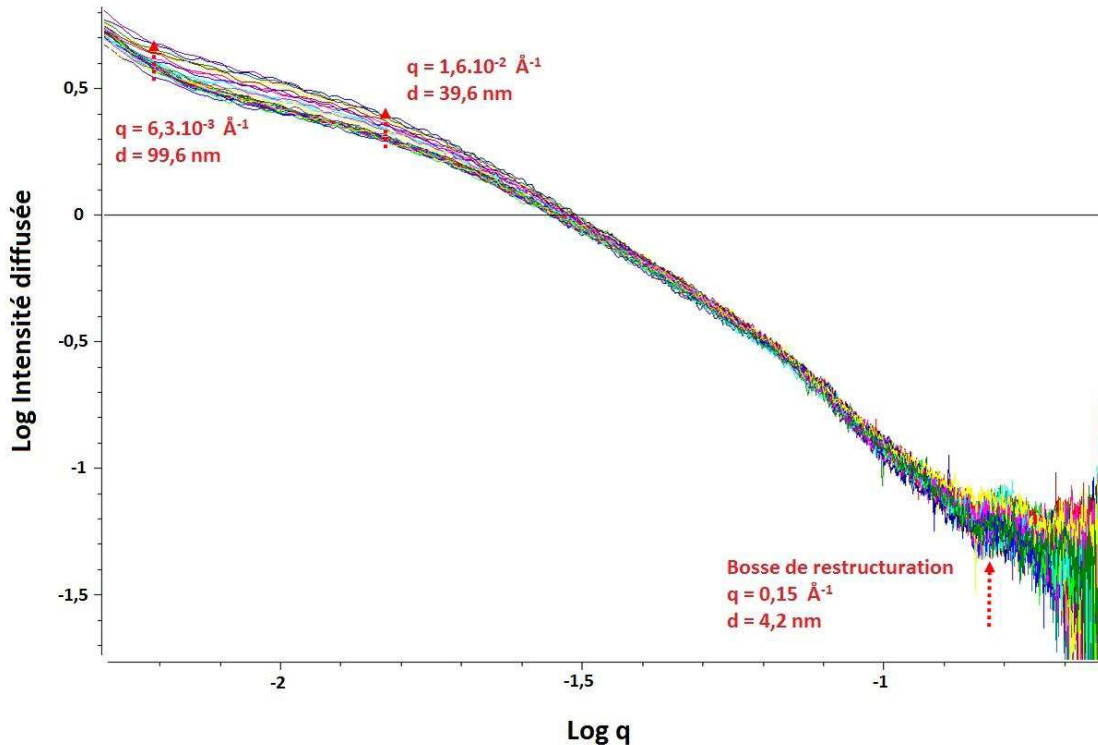


Figure IV.41. Données brutes, sur l'ensemble du temps d'acquisition des données, représentant l'évolution du signal SAXS pendant 1h30 pour la 6ème goutte de la colonne, lors d'étude de nucléation de lysozyme en présence de NaCl.

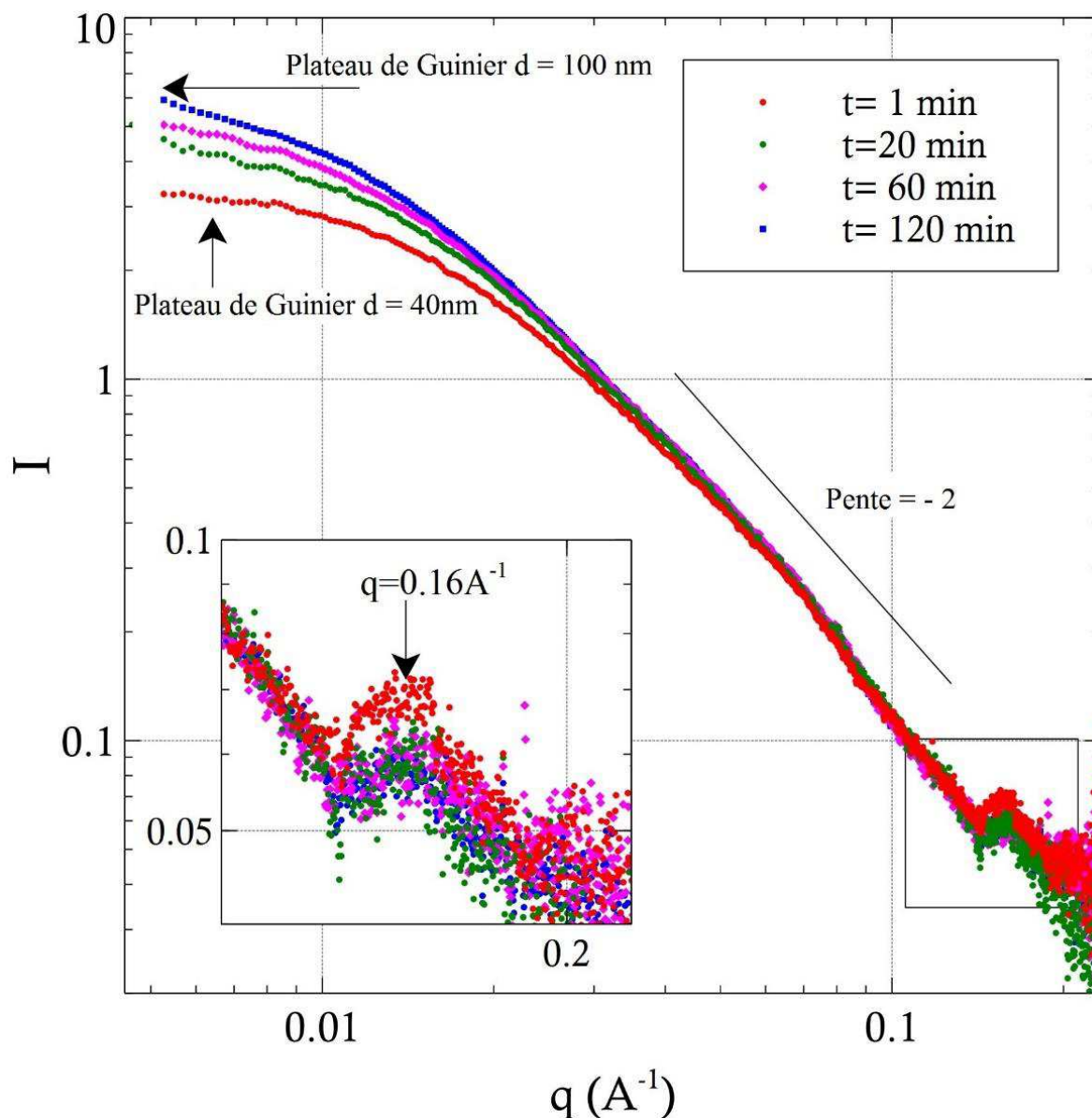


Figure IV.42. Analyse des données brutes obtenues lors de l'expérience de nucléation du lysozyme dans une goutte positionnée devant le faisceau. Le plateau de Guinier instantanément établi témoigne de l'existence d'objets de taille moyenne de 40nm. Ces objets grossissent après un certain temps pour atteindre une taille de 100nm.

On observe un plateau de Guinier. L'obtention de ce plateau est quasiment instantanée après le refroidissement. Aucun état intermédiaire n'a été observé entre le signal de la protéine à 35°C et la formation de ce plateau. En revanche la position de ce plateau est sensiblement constante pour les 45 premières minutes de l'expérience, puis on observe une augmentation lente de la taille de ces clusters. En outre, il semblerait que les courbes se croisent aux alentours de $q = 0,06 \text{\AA}^{-1}$ ce qui montrerait une évolution interne de la structure des agrégats. Malheureusement, en raison de la petite taille de l'échantillon sondé et de la faible sensibilité du détecteur, il apparaît difficile de mettre en évidence un point isobestique sur ces courbes, ni de calculer un invariant.

Pour une gamme de q intermédiaire, comprise entre $0,03$ et $0,1 \text{ \AA}^{-1}$, la pente de la courbe obtenue pour toutes les expériences est de l'ordre de $1,8$. Cette valeur montre tout d'abord que ces grosses structures n'ont pas une surface lisse et bien définie et ne sont donc en aucun cas des gouttes ni un solide amorphe (la pente dans ces deux cas serait de -3 ou -4). La signature SAXS est caractéristique d'agrégats fractals avec une dimension fractale de l'ordre de 2 et un rayon de gyration compris entre 40 et 100 nm . Ceci semble en accord avec la taille des clusters de nucléation observés dans la littérature (Sauter et al., 2015b; Vekilov, 2004).

L'apparition de ces agrégats et leur évolution avec le temps semble alors correspondre à la première partie d'un mécanisme de nucléation en deux étapes. Comme évoqué précédemment, en s'approchant de la spinodale de décomposition, des importantes fluctuations de concentration donnent naissance à des zones de forte concentration. Il aurait été intéressant d'attendre plus longtemps que deux heures pour éventuellement observer l'apparition de pics de diffraction soulignant alors la deuxième phase de la nucléation en deux étapes, la formation de cristaux au sein de ces agrégats qui sont consommés en faveur du cristal. Malheureusement le manque de temps et l'interruption de faisceau a rendu impossible l'observation de cette deuxième étape. En revanche, tous les puits sondés lors de cette expérience ont donné naissance à des cristaux de lysozyme. Cette observation permet d'écarter toute hypothèse de dénaturation de la protéine lors de ces expériences.

IV.3.7 Conclusion de l'expérience sur SWING

Pour conclure cette partie consacrée à l'expérience réalisée sur la ligne SWING de SOLEIL, nous avons à nouveau réussi à développer un dispositif expérimental innovant qui couple un système microfluidique hybride, contrôlé en température, avec de la diffusion de rayons X aux petits angles. Des gouttes peuvent être stockées précisément dans une puce microfluidique directement insérée devant le faisceau. Ce système est adapté aux études de cristallisation et permet de suivre l'évolution des signaux SAXS de plusieurs gouttes en fonction du temps. Ce dispositif a permis de mettre en avant dans le cadre d'une expérience réalisée dans des conditions proches de la décomposition spinodale, l'existence d'un pic de corrélation à $1,6 \text{ nm}^{-1}$. Ce pic correspond à une longueur de corrélation de $3,9 \text{ nm}$. Le rayon de gyration d'une molécule de lysozyme étant d'environ $1,4 \text{ nm}$, cela illustre que la distance entre deux molécules de lysozyme dans ces conditions est d'environ 1 nm , ce qui est en accord avec les distances typiques entre lysozyme en interaction d'après la théorie DLVO. De plus, la maille cristalline du lysozyme tétragonal a pour paramètres $a = b = 7,92 \text{ nm}$ et $c = 3,79 \text{ nm}$, ce qui est compatible avec la longueur de corrélation obtenue. Cela souligne que le lysozyme présent dans les agrégats n'a pas une structure cristalline initialement, mais a une concentration telle, que les longueurs entre deux molécules sont semblables à celles que l'on retrouve dans un cristal. Enfin, nous avons également souligné l'existence d'une pente de -2 dans les régions des angles intermédiaire qui justifie que les agrégats ne sont pas sphériques (par conséquent que nous n'assistons pas à une transition liquide-liquide).

Finalement, les résultats obtenus dans cette étude permettent d'envisager un scénario à deux étapes pour la nucléation du lysozyme dans des domaines proches de la décomposition spinodale.

Premièrement, après la descente rapide en température, de larges clusters sont formés, grâce aux grandes fluctuations de concentration à proximité de la spinodale. Dans ces clusters, les molécules de lysozyme sont dans un état désordonné mais dense, avec des distances compatibles à celle que l'on retrouve dans la structure cristalline (étape de concentration). Ensuite, même si nous ne l'avons pas observé dans cette expérience, nous pouvons faire l'hypothèse d'une réorganisation des molécules à l'intérieur de ces clusters pour former un cristal (étape de structuration).

IV.4 Conclusion

Nous avons explicité dans cette partie les nombreux dispositifs expérimentaux, pensés et développés dans le cadre de cette thèse. Ces dispositifs innovants permettent de coupler des systèmes microfluidiques plus ou moins complexes avec des lignes de diffusion de rayons X aux petits angles. Ils ont été utilisés sur la courte ligne BM29 qui ne permet d'avoir des informations que sur des objets ou des interactions de courte taille. Sur cette ligne, les gouttes sont générées à l'extérieur du porte-échantillon puis transportées jusqu'à celui-ci où elles sont alors exposées en mouvement. Il a été possible d'étudier des interactions entre protéines avant cristallisation ainsi qu'un mécanisme de cristallisation par déplétion. Il a aussi été possible d'observer une signature d'un mécanisme de cristallisation en deux étapes, en illustrant une courte distance d'interaction entre molécules, témoignant de l'existence de clusters denses. Cette même observation a été confirmée sur la ligne SWING, bien plus longue. Sur cette ligne, la puce microfluidique est directement insérée devant le faisceau et se comporte par conséquent comme un porte-échantillon. Ayant accès à des angles de diffusion plus faibles, il a aussi été possible de mettre en relief des objets ayant une taille aux alentours de la centaine de nanomètres.

Les lignes de diffusion longues, permettant d'avoir accès à la fois à des objets de grosse taille et de petite taille (ID02, SWING) seront donc à privilégier afin d'obtenir plus d'informations sur ces clusters et ainsi d'éclaircir les mécanismes de nucléation engagés en fonction de la position dans le diagramme de phase. Les dispositifs microfluidiques développés peuvent toujours être utilisés sur des lignes courtes comme BM29 car ils permettent d'obtenir des facteurs de forme ainsi que des informations sur les interactions entre molécules, et cela très rapidement, en utilisant très peu de produits.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le contrôle des procédés de cristallisation est un enjeu crucial dans de nombreux domaines tels que l'industrie pharmaceutique, cosmétique, ou encore la biologie structurale. Obtenir des bonnes conditions de cristallisation afin d'avoir des cristaux possédant les propriétés souhaitées est souvent le résultat d'une longue série d'essais et d'erreurs, coûtant alors beaucoup de temps et d'argent. Afin de réduire ces dépenses et dans une volonté d'y voir plus clair, il semble alors intéressant d'observer avec attention les mécanismes de cristallisation et plus particulièrement de nucléation mis en jeu pour déterminer a priori des conditions de cristallisation idéales. En abordant ce travail de thèse plusieurs questions se posaient :

- Quels sont les mécanismes de la nucléation à l'origine de la formation d'un cristal ?
- Avec quels moyens expérimentaux peut-on observer ces mécanismes ?
- Quels sont les paramètres influençant l'orientation vers un mécanisme préférentiel ?

Dans ce travail, nous avons mis en place des méthodologies permettant d'apporter une contribution à l'élucidation de ces questions.

Dans un premier temps, la revue des éléments bibliographiques nous a permis de mettre en relief les connaissances apportées par la littérature sur la nucléation et ses mécanismes. Il est alors apparu qu'une théorie dite « classique » avait été proposée au début des années 1900. Cette théorie semble pouvoir décrire avec assez de précision la nucléation de petites molécules. En revanche, des études plus récentes, datant d'une vingtaine d'années, ont montré que dans certaines conditions, notamment concernant les protéines, cette théorie n'est pas acceptable et que la nucléation suit plutôt un mécanisme en deux étapes. Les premières observations d'un tel mécanisme ont été réalisées à l'aide de simulations numériques, qui ont mis en relief l'existence de fluctuations de concentrations, d'autant plus importantes que les conditions expérimentales s'approchent de la zone de décomposition spinodale. Ces fluctuations seraient alors à l'origine du mécanisme en deux étapes avec une première étape de concentration (formation d'agrégats denses désordonnés) et une seconde étape de structuration (réorganisation à l'intérieur des agrégats pour former un cristal). Ces observations ont été suivies de quelques travaux expérimentaux confirmant l'hypothèse que pour des conditions éloignées de la spinodale, les fluctuations de concentrations ne sont pas assez importantes pour former des zones denses et la nucléation suit la théorie classique, alors qu'à proximité de la spinodale, le mécanisme est bien en deux étapes. La petite taille et le caractère aléatoire des objets à étudier rend néanmoins ces observations difficiles, si bien que peu de travaux existent dans la littérature. Afin de répondre à cette problématique, l'utilisation de la microfluidique semble alors intéressante. Nous avons ainsi réalisé une analyse bibliographique des techniques expérimentales basées sur l'utilisation de la microfluidique. Cette revue de la littérature a permis d'explicitier les avantages d'une telle technique et d'évoquer quelques études réalisées sur l'étude de la nucléation. Ces études portent sur la détermination de cinétiques de nucléation, et sur l'utilisation de diffusion de rayons X aux petits angles pour obtenir des informations sur les structures mises en jeu lors de la nucléation. Ces approches nous ont alors paru intéressantes pour répondre aux questions que nous avons en abordant ce travail de thèse.

La deuxième partie de ce manuscrit a donc été consacrée à la présentation des différentes protéines étudiées et de leurs propriétés respectives ainsi qu'aux techniques de fabrication de dispositifs microfluidiques adaptés à l'étude de la nucléation. Les protéines faisant l'objet de cette étude sont l'urate oxydase, le lysozyme et la glucose isomérase. En outre, nous avons développé un protocole de fabrication de systèmes microfluidiques robuste, peu coûteux, et rapide. Ce protocole permet d'obtenir rapidement des structures de grande résolution, à l'aide de matériaux bon marché et dans des conditions standards de laboratoire (sans utiliser de salle blanche). L'ensemble du procédé de fabrication dure moins de 24h et le prix d'une puce microfluidique est inférieur à 5 euros. Nous avons également montré qu'il était possible de modifier aisément les propriétés de surface des systèmes microfluidiques, afin de les rendre hydrophiles, ou hydrophobes et ainsi de s'adapter aux écoulements désirés. Enfin, nous avons conçu des puces microfluidiques résistantes aux radiations et donc compatibles avec l'utilisation de rayons X intenses. Ces aspects techniques ouvrent un large éventail de possibilités pour les applications éventuelles et pour les études réalisables.

La troisième partie a été consacrée à la mesure des fréquences de nucléation. Ce type d'étude repose sur l'utilisation d'un dispositif microfluidique contrôlé en température et permettant de stocker un grand nombre de gouttes (>500). Il est alors possible d'induire des conditions de sursaturation dans les gouttes en abaissant la température et observer ainsi l'apparition de cristaux en fonction du temps. Ces observations, couplées à des modèles de nucléation probabilistes, tel que celui de Pound et La Mer, ont déjà été présentées dans la littérature. Dans cette étude, nous utilisons un modèle plus récent, issu du LGC, celui de Bourgeois et al. Il permet, à l'aide de l'évolution de la fraction de gouttes ne présentant pas de cristal en fonction du temps, de déterminer trois paramètres de nucléation : le nombre de sites actifs de nucléation moyen par goutte, la vitesse de nucléation homogène, et la vitesse de nucléation sur un site actif. Nous avons alors réalisé ces expériences pour différentes conditions expérimentales, à concentrations fixes en protéine et en sel, mais à différentes températures, plus ou moins proches de la température de décomposition spinodale. D'un point de vue macroscopique, nous avons mis en évidence une rupture dans le mécanisme de nucléation. Pour des températures élevées, seul un cristal apparaissait par goutte, et assez lentement. Pour des températures plus faibles, une grande quantité de cristaux apparaissait rapidement. L'hypothèse avancée est alors que, conformément à l'analyse bibliographique, les expériences aux températures élevées suivent un mécanisme en accord avec la théorie classique, alors que les autres expériences suivent un mécanisme en deux étapes. L'analyse des paramètres cinétiques a montré que pour des températures élevées, la vitesse de nucléation homogène évoluait bien de façon linéaire avec les paramètres proposés par la théorie classique, alors que pour des températures faibles, elle s'éloignait de la linéarité. Ces résultats nous ont permis de déterminer quelques paramètres de la théorie classique, tels que la tension interfaciale cristal/solution, le nombre de molécules dans le nucleus critique ou encore la densité de sites actifs de nucléation, et les résultats obtenus sont en accord avec ceux proposés dans la littérature. De plus, l'analyse de cette densité de sites actifs de nucléation laisse penser que la nucléation est en réalité hétérogène dans tous les cas, certainement catalysée par des impuretés, ou des monomères agrégés ou en interactions en solution. Nous avons finalement

étudié les paramètres cinétiques de nucléation à l'aide de la théorie des fluctuations de concentrations et cette fois, l'ensemble des expériences étaient en accord avec cette théorie, ce qui confirme alors l'hypothèse que pour des températures faibles, les forces motrices de la nucléation sont bien ces fluctuations de concentration, capables d'induire un mécanisme de nucléation en deux étapes.

Dans la quatrième et dernière partie, nous nous sommes intéressés de plus près aux structures moléculaires évoluant lors de la nucléation en couplant des systèmes microfluidiques à de la diffusion de rayons X aux petits angles. Le principe et la théorie sur laquelle s'appuie cette technique analytique a été présenté, de même que les lignes synchrotron BM29 à l'ESRF et SWING à SOLEIL sur lesquelles nous avons travaillé. Les premières études sur BM29 ont été réalisées avec des solutions de protéines sous-saturées et ont permis de valider le choix des composants du dispositif qui se devaient de résister aux radiations et de ne pas dénaturer la protéine. Il a également été possible d'étudier des interactions inter-protéines en observant l'évolution du second coefficient du viriel en fonction de la concentration en sel. Les études suivantes ont été réalisées avec des solutions sursaturées. Nous avons mis en évidence la cristallisation très rapide de la glucose isomérase par un mécanisme de déplétion induit par des micelles de surfactant. Nous avons également étudié la cristallisation du lysozyme à différentes coordonnées du diagramme de phase. Cette étude est venue confirmer les observations réalisées dans la troisième partie, à savoir que pour une température éloignée de la température de décomposition spinodale, on observe uniquement des monomères dilués en solution qui s'assemblent directement pour former une structure cristalline. En revanche, pour une température se rapprochant de la température spinodale, l'observation d'un pic de corrélation pré-nucléation nous a laissé penser que les monomères étaient en interaction de courte distance (comparable à leur taille) et qu'ils se trouvaient alors dans des agrégats très denses, qui disparaissaient pour des temps plus longs, au profit de la formation de cristaux. Enfin, pour l'étude réalisée sur SWING nous avons directement positionné la puce microfluidique devant le faisceau de rayons X et avons suivi l'évolution du signal pour plusieurs gouttes contenant du lysozyme dans des conditions proches de la décomposition spinodale. Nous avons alors retrouvé le pic de corrélation observé sur BM29, mais nous avons également eu accès à des angles de diffusion plus petits qui ont illustré la présence d'agrégats fractals dont la dimension évolue en fonction du temps de 40 à 100 nm, des tailles comparables à celles des clusters de nucléation que l'on retrouve dans la littérature.

Finalement, dans l'ensemble de ce travail, nous avons pu à l'aide de quelques exemples répondre aux questions que l'on se posait. Il semble alors qu'en accord avec les informations de la littérature, la nucléation puisse suivre deux mécanismes. Le premier mécanisme correspond à la théorie classique, dans des conditions lointaines de la décomposition spinodale. Dans ces conditions, la force motrice de la nucléation est la sursaturation. Le second mécanisme, en deux étapes, intervient dans des conditions proches de la décomposition spinodale. Dans ces conditions, la force motrice est liée aux fluctuations de concentrations, capables de créer des zones denses (étape de concentration) et dans lesquelles les molécules peuvent se réorganiser (étape de structuration) afin de former une entité cristalline. Ces résultats ont été obtenus à l'aide de

deux méthodes complémentaires, une étude macroscopique basée sur la détermination de cinétiques de nucléation, et une étude microscopique basée sur l'observation des structures en solution à l'aide de la diffusion de rayons X aux petits angles

A l'issue de ce travail plusieurs perspectives peuvent être dégagées.

Dans un premier temps, afin de confirmer les hypothèses et de fournir d'avantages d'informations concernant les mécanismes de nucléation, il semblerait intéressant d'exploiter la plateforme expérimentale mise au point avec d'autres types de protéines. Il conviendrait alors de « quadriller » finement les diagrammes de phases afin de déterminer précisément quels sont les domaines dans lesquels apparaissent la théorie classique et ceux où l'on observe le mécanisme en deux étapes. Ces observations précises pourraient conduire dans les années à venir à un modèle de nucléation universel, adapté à toute sorte de condition expérimentale.

Une deuxième série d'étude pourrait être consacrée à l'influence du chemin parcouru pour atteindre un point précis du diagramme de phase, et son influence sur les mécanismes de nucléation. En effet, tout au long de ce travail, la seule méthode employée pour atteindre un point du diagramme de phase à partir d'une solution sous-saturée a été une baisse rapide de température, ou « quench ». De nombreuses autres solutions et chemins existent pour induire une condition de sursaturation. Il est possible de changer non pas la température, mais la concentration, en procédant par exemple par évaporation du solvant. Il est également possible de modifier la température de différentes manières. En procédant à un refroidissement lent, en passant par la zone de séparation liquide-liquide, ou en passant par le point critique, point de coïncidence des binodale et spinodale. Toutes ces possibilités sont intéressantes à observer afin de savoir si la nucléation est influencée par le chemin suivi dans le diagramme de phase, ou bien si elle ne dépend que de la condition finale.

Ensuite, afin d'approfondir cette étude réalisée sur la nucléation, il conviendrait également de s'intéresser au second mécanisme de la cristallisation, à savoir la croissance cristalline. S'il est possible de développer des modèles de cinétiques de nucléation comme cela a été illustré dans ces travaux, il est également possible d'obtenir des modèles de cinétiques de croissance. L'utilisation d'un dispositif microfluidique semblable à ceux développés le long de cette thèse pourrait certainement contribuer au développement de tels modèles. A plus long terme, il serait intéressant d'établir des modèles cinétiques couplant à la fois la nucléation et la croissance, afin par exemple, de prédire des temps d'induction de nucléation, et de croissance cristalline simultanément.

Nous avons illustré dans ces travaux, la polyvalence des dispositifs microfluidiques développés. Ils permettent de mener des études rapidement et en utilisant peu de produits. De tels systèmes peuvent ainsi trouver bon nombre d'applications, et il serait particulièrement intéressant de les utiliser pour des études concernant le polymorphisme et les cocristaux. En effet, des systèmes similaires à ceux utilisés pour déterminer des cinétiques de nucléation, pourraient être adaptés pour étudier les probabilités d'apparition de chaque phase dans le cas de molécules présentant du polymorphisme. Il serait alors possible de déterminer simultanément les cinétiques de

nucléation (voir de croissance) de chacune des phases. L'utilisation de ces systèmes en SAXS permettrait d'observer les structures de chacune des formes cristallines dans le cas de polymorphisme et la structure ainsi que les interactions conduisant à l'apparition de cocristaux.

Cette liste, non exhaustive, de pistes potentielles d'applications futures, laisse donc présager de nombreuses études intéressantes à venir, et vient également, conclure ce mémoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbyad, P., Dangla, R., Alexandrou, A., and Baroud, C. N. (2011). Rails and anchors: guiding and trapping droplet microreactors in two dimensions. *Lab. Chip* 11, 813–821. doi:10.1039/C0LC00104J.
- Akella, S. V., Mowitz, A., Heymann, M., and Fraden, S. (2014). Emulsion-Based Technique To Measure Protein Crystal Nucleation Rates of Lysozyme. *Cryst. Growth Des.* 14, 4487–4509. doi:10.1021/cg500562r.
- Akiyama, S., Takahashi, S., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Nishikawa, Y., et al. (2002). Conformational landscape of cytochrome c folding studied by microsecond-resolved small-angle x-ray scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1329–1334. doi:10.1073/pnas.012458999.
- Arai, M., Kondrashkina, E., Kayatekin, C., Matthews, C. R., Iwakura, M., and Bilsel, O. (2007). Microsecond hydrophobic collapse in the folding of Escherichia coli dihydrofolate reductase, an alpha/beta-type protein. *J. Mol. Biol.* 368, 219–229. doi:10.1016/j.jmb.2007.01.085.
- Asakura, S., and Oosawa, F. (1958). Interaction between particles suspended in solutions of macromolecules. *J. Polym. Sci.* 33, 183–192. doi:10.1002/pol.1958.1203312618.
- Barrett, R., Faucon, M., Lopez, J., Cristobal, G., Destremaut, F., Dodge, A., et al. (2006a). X-ray microfocussing combined with microfluidics for on-chip X-ray scattering measurements. *Lab. Chip* 6, 494–499. doi:10.1039/b517055a.
- Barrett, R., Faucon, M., Lopez, J., Cristobal, G., Destremaut, F., Dodge, A., et al. (2006b). X-ray microfocussing combined with microfluidics for on-chip X-ray scattering measurements. *Lab. Chip* 6, 494–499. doi:10.1039/B517055A.
- Bass, R. B., and Lichtenberger, A. W. (2004). Microcontact printing with octadecanethiol. *Appl. Surf. Sci.* 226, 335–340. doi:10.1016/j.apsusc.2003.10.042.
- Becker, R., and Döring, W. (1935). Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen. *Ann. Phys.* 416, 719–752. doi:10.1002/andp.19354160806.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., et al. (1977). The Protein Data Bank. A computer-based archival file for macromolecular structures. *Eur. J. Biochem.* 80, 319–324.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B., and Deshpande, V. V. (1996). Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* 60, 280–300.
- Björling, A., Berntsson, O., Lehtivuori, H., Takala, H., Hughes, A. J., Panman, M., et al. (2016). Structural photoactivation of a full-length bacterial phytochrome. *Sci. Adv.* 2, e1600920. doi:10.1126/sciadv.1600920.
- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C., and Sarma, V. R. (1965). Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 [Å] Resolution. *Nature* 206, 757–761. doi:10.1038/206757a0.
- Bonneté, F., Finet, S., and Tardieu, A. (1999). Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions. *J. Cryst. Growth* 196, 403–414. doi:10.1016/S0022-0248(98)00826-4.

- Bonneté, F., Vivarès, D., Robert, C., and Colloc'h, N. (2001). Interactions in solution and crystallization of *Aspergillus flavus* urate oxidase. *J. Cryst. Growth* 232, 330–339. doi:10.1016/S0022-0248(01)01054-5.
- Bourgeois, F., Teychené, S., and Biscans, B. (2017). Applicability of probabilistic nucleation modelling for analysis of microfluidics data. *KONA Powder Part. J.* 35.
- Brennich, M. E., Nolting, J.-F., Dammann, C., Nöding, B., Bauch, S., Herrmann, H., et al. (2011). Dynamics of intermediate filament assembly followed in micro-flow by small angle X-ray scattering. *Lab. Chip* 11, 708–716. doi:10.1039/c0lc00319k.
- Broide, M. L., Berland, C. R., Pande, J., Ogun, O. O., and Benedek, G. B. (1991). Binary-liquid phase separation of lens protein solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5660–5664.
- Bruijns, B., van Asten, A., Tiggelaar, R., and Gardeniers, H. (2016). Microfluidic Devices for Forensic DNA Analysis: A Review. *Biosensors* 6. doi:10.3390/bios6030041.
- Carlborg, C. F., Haraldsson, T., Öberg, K., Malkoch, M., and Wijngaart, W. van der (2011). Beyond PDMS: off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) based soft lithography for rapid prototyping of microfluidic devices. *Lab. Chip* 11, 3136–3147. doi:10.1039/C1LC20388F.
- Carlborg, C. F., Vastesson, A., Liu, Y., van der Wijngaart, W., Johansson, M., and Haraldsson, T. (2014). Functional off-stoichiometry thiol-ene-epoxy thermosets featuring temporally controlled curing stages via an UV/UV dual cure process. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* 52, 2604–2615. doi:10.1002/pola.27276.
- Carlborg, F., Moraga, F., Saharil, F., van der Wijngaart, W., and Haraldsson, T. (2012). Rapid permanent hydrophilic and hydrophobic patterning of polymer surfaces via off-stoichiometry thiol-ene (OSTE) photografting. in *Micro Total Analysis Systems (muTAS) 2012, The 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences October 28-November 1, 2012, Ginowan City Okinawa, Japan*, 677–679. Available at: <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2:570338> [Accessed July 11, 2017].
- Castro, N., Constantin, D., Davidson, P., and Abécassis, B. (2016). Solution self-assembly of plasmonic Janus nanoparticles. *Soft Matter* 12, 9666–9673. doi:10.1039/C6SM01632D.
- Chattopadhyay, S., Erdemir, D., Evans, J. M. B., Ilavsky, J., Amenitsch, H., Segre, C. U., et al. (2005). SAXS Study of the Nucleation of Glycine Crystals from a Supersaturated Solution. *Cryst. Growth Des.* 5, 523–527. doi:10.1021/cg0497344.
- Chayen, N., Akins, J., Campbell-Smith, S., and Blow, D. M. (1988). Solubility of glucose isomerase in ammonium sulphate solutions. *J. Cryst. Growth* 90, 112–116. doi:10.1016/0022-0248(88)90305-3.
- Chen, X., Cui, D., Liu, C., Li, H., and Chen, J. (2007). Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification. *Anal. Chim. Acta* 584, 237–243. doi:10.1016/j.aca.2006.11.057.
- Chokkalingam, V., Herminghaus, S., and Seemann, R. (2008). Self-synchronizing pairwise production of monodisperse droplets by microfluidic step emulsification. *Appl. Phys. Lett.* 93, 254101. doi:10.1063/1.3050461.

- Chuan, S. X., Yufeng, J., Haijing, L., and Khuen, W. C. (2004). Process development of negative tone dry film photoresist for MEMS applications. in *Proceedings. 7th International Conference on Solid-State and Integrated Circuits Technology, 2004.*, 575–578 vol.1. doi:10.1109/ICSICT.2004.1435072.
- Cragnell, C., Choi, J., Segad, M., Lee, S., Nilsson, L., and Skepö, M. (2017). Bovine β -casein has a polydisperse distribution of equilibrium micelles. *Food Hydrocoll.* 70, 65–68. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.03.021.
- Curtis, R. A., Prausnitz, J. M., and Blanch, H. W. (1998). Protein-protein and protein-salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 11–21. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19980105)57:1<11::AID-BIT2>3.0.CO;2-Y.
- Dangla, R., Lee, S., and Baroud, C. N. (2011). Trapping Microfluidic Drops in Wells of Surface Energy. *Phys. Rev. Lett.* 107. doi:10.1103/PhysRevLett.107.124501.
- Datta, S., Biswal, B. K., and Vijayan, M. (2001). The effect of stabilizing additives on the structure and hydration of proteins: a study involving tetragonal lysozyme. *Acta Crystallogr. Sect. D* 57, 1614–1620. doi:10.1107/S090744490101280X.
- Debenedetti, P. G. (1996). *Metastable Liquids: Concepts and Principles*. Princeton University Press.
- Debye, P., and Bueche, A. M. (1949). Scattering by an Inhomogeneous Solid. *J. Appl. Phys.* 20, 518–525. doi:10.1063/1.1698419.
- Desgranges, S., Urbach, W., Somaglino, L., Taulier, N., and Pepin, C. (2016). *Dendri-tac and their use as theranostics*. Available at: <https://www.google.com/patents/WO2016185425A1?cl=en> [Accessed August 30, 2017].
- Ducruix, A., Guilloteau, J. P., Riès-Kautt, M., and Tardieu, A. (1996). Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. *J. Cryst. Growth* 168, 28–39. doi:10.1016/0022-0248(96)00359-4.
- Durchschlag, H., Zipper, P., Wilfing, R., and Purr, G. (1991). Detection of small conformational changes of proteins by small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 822–831. doi:10.1107/S0021889891004831.
- Eddings, M. A., Johnson, M. A., and Gale, B. K. (2008). Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices. *J. Micromechanics Microengineering* 18, 067001. doi:10.1088/0960-1317/18/6/067001.
- Ehrfeld, W., Hessel, V., and Lowe, H. (2004). *Microreactors new technology for modern chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/3527601953> [Accessed August 26, 2017].
- Erdemir, D., Lee, A. Y., and Myerson, A. S. (2009). Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. *Acc. Chem. Res.* 42, 621–629. doi:10.1021/ar800217x.
- Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987). *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. , ed. G. W. Taylor Boston, MA: Springer US doi:10.1007/978-1-4757-6624-0.

- Filobelo, L. F., Galkin, O., and Vekilov, P. G. (2005). Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation. *J. Chem. Phys.* 123, 014904. doi:10.1063/1.1943413.
- Finet, S., Skouri-Panet, F., Casselyn, M., Bonneté, F., and Tardieu, A. (2004). The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9, 112–116. doi:10.1016/j.cocis.2004.05.014.
- Fischer, H., Neto, O., De, M., Napolitano, H. B., Polikarpov, I., and Craievich, A. F. (2010). Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *J. Appl. Crystallogr.* 43, 101–109. doi:10.1107/S0021889809043076.
- Forsythe, E. L., Judge, R. A., and Pusey, M. L. (1999). Tetragonal Chicken Egg White Lysozyme Solubility in Sodium Chloride Solutions. *J. Chem. Eng. Data* 44, 637–640. doi:10.1021/je980316a.
- Fradet, E., McDougall, C., Abbyad, P., Dangla, R., McGloin, D., and Baroud, C. N. (2011). Combining rails and anchors with laser forcing for selective manipulation within 2D droplet arrays. *Lab. Chip* 11, 4228–4234. doi:10.1039/C1LC20541B.
- Franke, D., and Svergun, D. I. (2009). DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 42, 342–346. doi:10.1107/S0021889809000338.
- Frenkel, J. (1939). A General Theory of Heterophase Fluctuations and Pretransition Phenomena. *J. Chem. Phys.* 7, 538–547. doi:10.1063/1.1750484.
- Galkin, O., and Vekilov, P. G. (1999). Direct Determination of the Nucleation Rates of Protein Crystals. *J. Phys. Chem. B* 103, 10965–10971. doi:10.1021/jp992786x.
- Galkin, O., and Vekilov, P. G. (2000). Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid–liquid phase boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6277–6281. doi:10.1073/pnas.110000497.
- Gañán-Calvo, A. M., and Gordillo, J. M. (2001). Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. *Phys. Rev. Lett.* 87, 274501. doi:10.1103/PhysRevLett.87.274501.
- Garstecki, P., Gitlin, I., DiLuzio, W., Whitesides, G. M., Kumacheva, E., and Stone, H. A. (2004). Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device. *Appl. Phys. Lett.* 85, 2649–2651. doi:10.1063/1.1796526.
- Gebauer, D., Kellermeier, M., Gale, J. D., Bergström, L., and Cölfen, H. (2014). Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation. *Chem. Soc. Rev.* 43, 2348–2371. doi:10.1039/C3CS60451A.
- Georgalis, Y., Umbach, P., Raptis, J., and Saenger, W. (1997). Lysozyme Aggregation Studied by Light Scattering. I. Influence of Concentration and Nature of Electrolytes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 691–702. doi:10.1107/S09074444997006847.
- Gibbs, J. W. (1876). *Trans. Connect. Acad. Sci.* 3, 108–248.
- Gibbs, J. W. (1878). *Trans. Connect. Acad. Sci.* 16, 343–524.

- Gillespie, C. M., Asthagiri, D., and Lenhoff, A. M. (2014). Polymorphic Protein Crystal Growth: Influence of Hydration and Ions in Glucose Isomerase. *Cryst. Growth Des.* 14, 46–57. doi:10.1021/cg401063b.
- Glatter, O., and Kratky, O. (1982). *Small angle x-ray scattering*. London: Academic Press.
- Gliko, O., Neumaier, N., Pan, W., Haase, I., Fischer, M., Bacher, A., et al. (2005). A Metastable Prerequisite for the Growth of Lumazine Synthase Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3433–3438. doi:10.1021/ja043218k.
- Guilloteau, J.-P., Rie`s-Kautt, M. M., and Ducruix, A. F. (1992). Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. *J. Cryst. Growth* 122, 223–230. doi:10.1016/0022-0248(92)90249-I.
- Guinier, A., and Fournet, G. (1955). *Small-angle scattering of X-rays*. New-York: Wiley.
- H.A. Stone, A.D. Stroock, and Ajdari, and A. (2004). Engineering Flows in Small Devices. *Annu. Rev. Fluid Mech.* 36, 381–411. doi:10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124.
- Haraldsson, T., Carlborg, C. F., and van der Wijngaart, W. (2014). OSTE: a novel polymer system developed for Lab-on-Chip. in, 897608-897608–6. doi:10.1117/12.2041918.
- Hatch, A. C., Patel, A., Beer, N. R., and Lee, A. P. (2013). Passive droplet sorting using viscoelastic flow focusing. *Lab. Chip* 13, 1308–1315. doi:10.1039/C2LC41160A.
- Haubert, K., Drier, T., and Beebe, D. (2006). PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system. *Lab. Chip* 6, 1548–1549. doi:10.1039/B610567J.
- Herlach, D. M., Cochrane, R. F., Egry, I., Fecht, H. J., and Greer, A. L. (1993). Containerless processing in the study of metallic melts and their solidification. *Int. Mater. Rev.* 38, 273–347. doi:10.1179/095066093790326267.
- Huebner, A., Bratton, D., Whyte, G., Yang, M., deMello, A. J., Abell, C., et al. (2009). Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays. *Lab. Chip* 9, 692–698. doi:10.1039/B813709A.
- Hwang, D.-H., Lo, Y.-C., and Chin, K. (2001). Development of a systematic recipe set for processing SU8-5 photoresist. in, 131–139. doi:10.1117/12.448958.
- Ildefonso, M., Candoni, N., and Veessler, S. (2011). Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics. *Cryst. Growth Des.* 11, 1527–1530. doi:10.1021/cg101431g.
- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and Surface Forces*. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press.
- Iwai, W., Yagi, D., Ishikawa, T., Ohnishi, Y., Tanaka, I., and Niimura, N. (2008). Crystallization and evaluation of hen egg-white lysozyme crystals for protein pH titration in the crystalline state. *J. Synchrotron Radiat.* 15, 312–315. doi:10.1107/S0909049507059559.
- Jeon, W., and Shin, C. B. (2009). Design and simulation of passive mixing in microfluidic systems with geometric variations. *Chem. Eng. J.* 152, 575–582. doi:10.1016/j.cej.2009.05.035.

- Jiang, S., and ter Horst, J. H. (2011). Crystal Nucleation Rates from Probability Distributions of Induction Times. *Cryst. Growth Des.* 11, 256–261. doi:10.1021/cg101213q.
- Jones, G., Lovell, C., Morgan, H., and Zauner, K.-P. (2011). Organising Chemical Reaction Networks in Space and Time with Microfluidics. *Int. J. Nanotechnol. Mol. Comput. IJNMC* 3, 35–56.
- K. Schubert, A. W., J.Brandner, M.Fichtner, G.Linder, U.Schygulla (2001). Microstructure Devices for Applications in Thermal and Chemical Process Engineering. *Microscale Thermophys. Eng.* 5, 17–39. doi:10.1080/108939501300005358.
- Kalikmanov, V. I. (2013). *Nucleation theory*. Dordrecht ; London: Springer.
- Karthika, S., Radhakrishnan, T. K., and Kalaichelvi, P. (2016). A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories. *Cryst. Growth Des.* 16, 6663–6681. doi:10.1021/acs.cgd.6b00794.
- Kashchiev, D. (2000). *Nucleation*. Butterworth-Heinemann.
- Kellermeier, M., Gebauer, D., Melero-García, E., Drechsler, M., Talmon, Y., Kienle, L., et al. (2012). Colloidal Stabilization of Calcium Carbonate Prenucleation Clusters with Silica. *Adv. Funct. Mater.* 22, 4301–4311. doi:10.1002/adfm.201200953.
- Khanji, A. N., Michaux, F., Jasniewski, J., Petit, J., Lahimer, E., Cherif, M., et al. (2015). Structure and gelation properties of casein micelles doped with curcumin under acidic conditions. *Food Funct.* 6, 3624–3633. doi:10.1039/C5FO00829H.
- Khvostichenko, D. S., Kondrashkina, E., Perry, S. L., Pawate, A. S., Brister, K., and Kenis, P. J. A. (2013). An X-ray transparent microfluidic platform for screening of the phase behavior of lipidic mesophases. *The Analyst* 138, 5384–5395. doi:10.1039/c3an01174g.
- Kirchner, S. (2015). Approche multi-échelle de l'agrégation dans le procédé de précipitation de boehmite. Available at: <http://oatao.univ-toulouse.fr/15134/> [Accessed June 18, 2017].
- Kirkwood, J. G., and Oppenheim, I. (1961). *Chemical thermodynamics*. McGraw-Hill.
- Kobayashi, J., Mori, Y., Okamoto, K., Akiyama, R., Ueno, M., Kitamori, T., et al. (2004). A microfluidic device for conducting gas-liquid-solid hydrogenation reactions. *Science* 304, 1305–1308. doi:10.1126/science.1096956.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003). PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1277–1282. doi:10.1107/S0021889803012779.
- Köster, S., Evans, H. M., Wong, J. Y., and Pfohl, T. (2008). An in-situ Study of Collagen Self-Assembly Processes. *Biomacromolecules* 9, 199–207. doi:10.1021/bm700973t.
- Laaksonen, A., and Napari, I. (2001). Breakdown of the Capillarity Approximation in Binary Nucleation: A Density Functional Study. *J. Phys. Chem. B* 105, 11678–11682. doi:10.1021/jp0116454.
- Labit, H., Goldar, A., Guilbaud, G., Douarche, C., Hyrien, O., and Marheineke, K. (2008). A simple and optimized method of producing silanized surfaces for FISH and replication mapping on combed DNA fibers. *BioTechniques* 45, 649–652, 654, 656–658.

- Laue, M. von (1960). *Röntgenstrahl- interferenzen*. Frankfurt: Akademische verlagsgesellschaft.
- Laval, P., Crombez, A., and Salmon, J.-B. (2009). Microfluidic Droplet Method for Nucleation Kinetics Measurements. *Langmuir* 25, 1836–1841. doi:10.1021/la802695r.
- Lee, B. S., Chi, Y. S., Lee, K.-B., Kim, Y.-G., and Choi, I. S. (2007). Functionalization of poly(oligo(ethylene glycol) methacrylate) films on gold and Si/SiO₂ for immobilization of proteins and cells: SPR and QCM studies. *Biomacromolecules* 8, 3922–3929. doi:10.1021/bm7009043.
- Lee, C.-Y., Chang, C.-L., Wang, Y.-N., and Fu, L.-M. (2011). Microfluidic Mixing: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3263–3287. doi:10.3390/ijms12053263.
- Lettieri, S. (2010). Specific ion effects and the phase diagram of lysozyme. *Phys. Procedia* 6, 46–51. doi:10.1016/j.phpro.2010.09.027.
- Levenberg, K. (1944). A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Q. Appl. Math.* 2, 164–168. doi:10.2307/43633451.
- Li, W., Liu, K., Simms, R., Greener, J., Jagadeesan, D., Pinto, S., et al. (2012). Microfluidic Study of Fast Gas–Liquid Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 3127–3132. doi:10.1021/ja2101278.
- Link, D. R., Anna, S. L., Weitz, D. A., and Stone, H. A. (2004). Geometrically mediated breakup of drops in microfluidic devices. *Phys. Rev. Lett.* 92, 054503. doi:10.1103/PhysRevLett.92.054503.
- Liu, J., Svärd, M., and Rasmuson, Å. C. (2015). Influence of Agitation on Primary Nucleation in Stirred Tank Crystallizers. *Cryst. Growth Des.* 15, 4177–4184. doi:10.1021/cg501791q.
- Liu, Y., Wang, X., and Ching, C. B. (2010). Toward Further Understanding of Lysozyme Crystallization: Phase Diagram, Protein–Protein Interaction, Nucleation Kinetics, and Growth Kinetics. *Cryst. Growth Des.* 10, 548–558. doi:10.1021/cg900919w.
- Liu, Y. Z., Kim, B. J., and Sung, H. J. (2004). Two-fluid mixing in a microchannel. *Int. J. Heat Fluid Flow* 25, 986–995. doi:10.1016/j.ijheatfluidflow.2004.03.006.
- Lorenz, H., Despont, M., Fahrni, N., LaBianca, N., Renaud, P., and Vettiger, P. (1997). SU-8: a low-cost negative resist for MEMS. *J. Micromechanics Microengineering* 7, 121. doi:10.1088/0960-1317/7/3/010.
- Maes, D., Vorontsova, M. A., Potenza, M. A. C., Sanvito, T., Sleutel, M., Giglio, M., et al. (2015). Do protein crystals nucleate within dense liquid clusters? *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 71, 815–822. doi:10.1107/S2053230X15008997.
- Manno, M., Bulone, D., Martorana, V., and Biagio, P. L. S. (2004). Thermodynamic instability and off-critical slowing down in supersaturated lysozyme solutions. *J. Phys. Condens. Matter* 16, S5023. doi:10.1088/0953-8984/16/42/017.
- Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettingner, J. C., Paulus, A., Lüdi, H., et al. (1992). Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. *J. Chromatogr. A* 593, 253–258. doi:10.1016/0021-9673(92)80293-4.

- Marquardt, D. (1963). An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431–441. doi:10.1137/0111030.
- Martel, A., Burghammer, M., Davies, R. J., Di Cola, E., Vendrely, C., and Riekkel, C. (2008). Silk Fiber Assembly Studied by Synchrotron Radiation SAXS/WAXS and Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 17070–17074. doi:10.1021/ja806654t.
- Martin, A. (2016). Conception d'un dispositif microfluidique résistant à la pression pour la caractérisation de l'hydrodynamique de mélanges en conditions proches du domaine supercritique: étude du binaire partiellement miscible CO₂-Ethanol. Available at: <http://oatao.univ-toulouse.fr/17411/> [Accessed July 12, 2017].
- Martin, H. P., Brooks, N. J., Seddon, J. M., Terrill, N. J., Luckham, P. F., Kowalski, A. J., et al. (2010). Complex fluids under microflow probed by SAXS: rapid microfabrication and analysis. *J. Phys. Conf. Ser.* 247, 012050. doi:10.1088/1742-6596/247/1/012050.
- Mengeaud, V., Josserand, J., and Girault, H. H. (2002). Mixing Processes in a Zigzag Microchannel: Finite Element Simulations and Optical Study. *Anal. Chem.* 74, 4279–4286. doi:10.1021/ac025642e.
- Mertens, H. D. T., and Svergun, D. I. (2010). Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. *J. Struct. Biol.* 172, 128–141. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.012.
- Mokross, B. J. (2003). Nucleation theory and small system thermodynamics. *Mater Phys Mech* 6, 13–20.
- Mullin, J. W. (1961). *Crystallization*. Londres: Butterworths.
- Muschol, M., and Rosenberger, F. (1997). Liquid–liquid phase separation in supersaturated lysozyme solutions and associated precipitate formation/crystallization. *J. Chem. Phys.* 107, 1953–1962. doi:10.1063/1.474547.
- Mylonas, E., and Svergun, D. I. (2007). Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 40, s245–s249. doi:10.1107/S002188980700252X.
- Nagel, M., Brun, P.-T., and Gallaire, F. (2014). A numerical study of droplet trapping in microfluidic devices. *Phys. Fluids* 26, 032002. doi:10.1063/1.4867251.
- Niu, X., and Lee, Y.-K. (2003). Efficient spatial-temporal chaotic mixing in microchannels. *J. Micromechanics Microengineering* 13, 454. doi:10.1088/0960-1317/13/3/316.
- Nunes, J. K., Tsai, S. S. H., Wan, J., and Stone, H. A. (2013). Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis. *J. Phys. Appl. Phys.* 46. doi:10.1088/0022-3727/46/11/114002.
- Nývlt, J. (1985). *The Kinetics of industrial crystallization*. Elsevier.
- Otten, A., Köster, S., Struth, B., Snigirev, A., and Pfohl, T. (2005). Microfluidics of soft matter investigated by small-angle X-ray scattering. *J. Synchrotron Radiat.* 12, 745–750. doi:10.1107/S0909049505013580.

- Pan, W., Galkin, O., Filobelo, L., Nagel, R. L., and Vekilov, P. G. (2007). Metastable Mesoscopic Clusters in Solutions of Sickle-Cell Hemoglobin. *Biophys. J.* 92, 267–277. doi:10.1529/biophysj.106.094854.
- Pardon, G., Saharil, F., Karlsson, J. M., Supekar, O., Carlborg, C. F., Wijngaart, W. van der, et al. (2014). Rapid mold-free manufacturing of microfluidic devices with robust and spatially directed surface modifications. *Microfluid. Nanofluidics* 17, 773–779. doi:10.1007/s10404-014-1351-9.
- Parmar, A. S., Gottschall, P. E., and Muschol, M. (2007). Pre-assembled clusters distort crystal nucleation kinetics in supersaturated lysozyme solutions. *Biophys. Chem.* 129, 224–234. doi:10.1016/j.bpc.2007.06.002.
- Pérard, J., Covès, J., Castellan, M., Solard, C., Savard, M., Miras, R., et al. (2016). Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 55, 1503–1515. doi:10.1021/acs.biochem.5b01061.
- Petsev, D. N., Wu, X., Galkin, O., and Vekilov, P. G. (2003). Thermodynamic Functions of Concentrated Protein Solutions from Phase Equilibria. *J. Phys. Chem. B* 107, 3921–3926. doi:10.1021/jp0278317.
- Pit, A. M., Duits, M. H. G., and Mugele, F. (2015). Droplet Manipulations in Two Phase Flow Microfluidics. *Micromachines* 6, 1768–1793. doi:10.3390/mi6111455.
- Poisson, S.-D. (1837). *Recherches sur la probabilité des jugements en matière criminelle et en matière civile*. Paris: Bachelier Available at: <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k110193z> [Accessed August 4, 2017].
- Pollack, L., Tate, M. W., Darnton, N. C., Knight, J. B., Gruner, S. M., Eaton, W. A., et al. (1999). Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small-angle x-ray scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 10115–10117. doi:10.1073/pnas.96.18.10115.
- Pollack, L., Tate, M. W., Finnefrock, A. C., Kalidas, C., Trotter, S., Darnton, N. C., et al. (2001). Time resolved collapse of a folding protein observed with small angle x-ray scattering. *Phys. Rev. Lett.* 86, 4962–4965. doi:10.1103/PhysRevLett.86.4962.
- Polte, J., Erler, R., Thünemann, A. F., Sokolov, S., Ahner, T. T., Rademann, K., et al. (2010). Nucleation and growth of gold nanoparticles studied via in situ small angle X-ray scattering at millisecond time resolution. *ACS Nano* 4, 1076–1082. doi:10.1021/nn901499c.
- Pontoni, D., Narayanan, T., and Rennie, A. R. (2004). “Nucleation and growth kinetics of colloidal silica,” in *Trends in Colloid and Interface Science XVI*, eds. M. Miguel and H. D. Burrows (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 227–230. doi:10.1007/978-3-540-36462-7_49.
- Prod, G. (1951). Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *Kolloid-Z.* 124, 83–114. doi:10.1007/BF01512792.
- Pound, G. M., and Mer, V. K. L. (1952). Kinetics of Crystalline Nucleus Formation in Supercooled Liquid Tin_{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2323–2332. doi:10.1021/ja01129a044.

- P. Sear, R. (2014). Quantitative studies of crystal nucleation at constant supersaturation: experimental data and models. *CrystEngComm* 16, 6506–6522. doi:10.1039/C4CE00344F.
- Ramagopal, U. A., Dauter, M., and Dauter, Z. (2003). SAD manganese in two crystal forms of glucose isomerase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 868–875.
- Ren, K., Zhou, J., and Wu, H. (2013). Materials for microfluidic chip fabrication. *Acc. Chem. Res.* 46, 2396–2406. doi:10.1021/ar300314s.
- Retailleau, P., Colloc'h, N., Vivarès, D., Bonneté, F., Castro, B., El Hajji, M., et al. (2004). Complexed and ligand-free high-resolution structures of urate oxidase (Uox) from *Aspergillus flavus*: a reassignment of the active-site binding mode. *Acta Crystallogr. Sect. D* 60, 453–462. doi:10.1107/S0907444903029718.
- Rodríguez-Ruiz, I., Conejero-Muriel, M., Ackermann, T. N., Gavira, J. A., and Llobera, A. (2015). A multiple path photonic lab on a chip for parallel protein concentration measurements. *Lab. Chip* 15, 1133–1139. doi:10.1039/C4LC01332H.
- Sandison, M. E., Zagnoni, M., Abu-Hantash, M., and Morgan, H. (2007). Micromachined glass apertures for artificial lipid bilayer formation in a microfluidic system. *J. Micromechanics Microengineering* 17, S189. doi:10.1088/0960-1317/17/7/S17.
- Sarrazin, F., Prat, L., Di Miceli, N., Cristobal, G., Link, D. R., and Weitz, D. A. (2007). Mixing characterization inside microdroplets engineered on a microcoalescer. *Chem. Eng. Sci.* 62, 1042–1048. doi:10.1016/j.ces.2006.10.013.
- Sauter, A., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Lotze, G., Feoktystov, A., J. Jacobs, R. M., et al. (2015a). On the question of two-step nucleation in protein crystallization. *Faraday Discuss.* 179, 41–58. doi:10.1039/C4FD00225C.
- Sauter, A., Roosen-Runge, F., Zhang, F., Lotze, G., Jacobs, R. M. J., and Schreiber, F. (2015b). Real-Time Observation of Nonclassical Protein Crystallization Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 1485–1491. doi:10.1021/ja510533x.
- Sauter, A., Zhang, F., Szekely, N. K., Pipich, V., Sztucki, M., and Schreiber, F. (2016). Structural Evolution of Metastable Protein Aggregates in the Presence of Trivalent Salt Studied by (V)SANS and SAXS. *J. Phys. Chem. B* 120, 5564–5571. doi:10.1021/acs.jpcc.6b03559.
- Seong, G. H., Heo, J., and Crooks, R. M. (2003). Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System. *Anal. Chem.* 75, 3161–3167. doi:10.1021/ac034155b.
- Shalom, D., Wootton, R. C. R., Winkle, R. F., Cottam, B. F., Vilar, R., deMello, A. J., et al. (2007). Synthesis of thiol functionalized gold nanoparticles using a continuous flow microfluidic reactor. *Mater. Lett.* 61, 1146–1150. doi:10.1016/j.matlet.2006.06.072.
- Squires, T. M., and Quake, S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* 77, 977–1026. doi:10.1103/RevModPhys.77.977.
- Stehle, R., Goerigk, G., Wallacher, D., Ballauff, M., and Seiffert, S. (2013). Small-angle X-ray scattering in droplet-based microfluidics. *Lab. Chip* 13, 1529–1537. doi:10.1039/C3LC41291A.

- Stephan, K., Pittet, P., Renaud, L., Kleimann, P., Morin, P., Ouaini, N., et al. (2007). Fast prototyping using a dry film photoresist: microfabrication of soft-lithography masters for microfluidic structures. *J. Micromechanics Microengineering* 17, N69. doi:10.1088/0960-1317/17/10/N01.
- Suh, Y. K., and Kang, S. (2010). A Review on Mixing in Microfluidics. *Micromachines* 1, 82–111. doi:10.3390/mi1030082.
- Sun, M., Bithi, S. S., and Vanapalli, S. A. (2011). Microfluidic static droplet arrays with tuneable gradients in material composition. *Lab. Chip* 11, 3949–3952. doi:10.1039/C1LC20709A.
- Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995). CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28, 768–773. doi:10.1107/S0021889895007047.
- Svergun, D. I., and Koch, M. H. J. (2003). Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* 66, 1735–1782. doi:10.1088/0034-4885/66/10/R05.
- Takeya, H., Sung, Y. S., Hirata, K., and Togano, K. (2002). Containerless Solidification of Refractory Metals by Electrostatic Levitation. *Mater. Manuf. Process.* 17, 493–500. doi:10.1081/AMP-120014232.
- Tan, Y.-C., Fisher, J. S., Lee, A. I., Cristini, V., and Lee, A. P. (2004). Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab. Chip* 4, 292–298. doi:10.1039/b403280m.
- Tardieu, A., Le Verge, A., Malfois, M., Bonneté, F., Finet, S., Riès-Kautt, M., et al. (1999). Proteins in solution: from X-ray scattering intensities to interaction potentials. *J. Cryst. Growth* 196, 193–203. doi:10.1016/S0022-0248(98)00828-8.
- Tavare, N. S. (2013). *Industrial Crystallization: Process Simulation Analysis and Design*. Springer Science & Business Media.
- ten Wolde, P. R., and Frenkel, D. (1997). Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations. *Science* 277, 1975–1978.
- Teychené, S., and Biscans, B. (2008). Nucleation Kinetics of Polymorphs: Induction Period and Interfacial Energy Measurements. *Cryst. Growth Des.* 8, 1133–1139. doi:10.1021/cg0609320.
- Teychené, S., and Biscans, B. (2012). Crystal nucleation in a droplet based microfluidic crystallizer. *Chem. Eng. Sci.* 77, 242–248. doi:10.1016/j.ces.2012.01.036.
- Tsai, Y.-C., Jen, H.-P., Lin, K.-W., and Hsieh, Y.-Z. (2006). Fabrication of microfluidic devices using dry film photoresist for microchip capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1111, 267–271. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.003.
- Turnbull, D. (1952). Kinetics of Solidification of Supercooled Liquid Mercury Droplets. *J. Chem. Phys.* 20, 411–424. doi:10.1063/1.1700435.
- Turnbull, D., and Cech, R. E. (1950). Microscopic Observation of the Solidification of Small Metal Droplets. *J. Appl. Phys.* 21, 804–810. doi:10.1063/1.1699763.

- Unger, M. A., Chou, H. P., Thorsen, T., Scherer, A., and Quake, S. R. (2000). Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science* 288, 113–116.
- Uzawa, T., Akiyama, S., Kimura, T., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I., et al. (2004). Collapse and search dynamics of apomyoglobin folding revealed by submillisecond observations of alpha-helical content and compactness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1171–1176. doi:10.1073/pnas.0305376101.
- Uzawa, T., Kimura, T., Ishimori, K., Morishima, I., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., et al. (2006). Time-resolved small-angle X-ray scattering investigation of the folding dynamics of heme oxygenase: implication of the scaling relationship for the submillisecond intermediates of protein folding. *J. Mol. Biol.* 357, 997–1008. doi:10.1016/j.jmb.2005.12.089.
- Vekilov, P. G. (2004). Dense Liquid Precursor for the Nucleation of Ordered Solid Phases from Solution. *Cryst. Growth Des.* 4, 671–685. doi:10.1021/cg049977w.
- Vekilov, P. G. (2010). The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution. *Nanoscale* 2, 2346–2357. doi:10.1039/c0nr00628a.
- Verwey, E. J. W., and Overbeek, J. T. G. (1999). *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Courier Corporation.
- Vivarès, D., and Bonneté, F. (2004). Liquid-Liquid Phase Separations in Urate Oxidase/PEG Mixtures: Characterization and Implications for Protein Crystallization. *J. Phys. Chem. B* 108, 6498–6507. doi:10.1021/jp037502u.
- Vivares, D., Kaler, E. W., and Lenhoff, A. M. (2005). Quantitative imaging by confocal scanning fluorescence microscopy of protein crystallization via liquid–liquid phase separation. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, 819–825. doi:10.1107/S090744490402949X.
- Volkov, V. V., and Svergun, D. I. (2003). Uniqueness of its ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 860–864. doi:10.1107/S0021889803000268.
- Volmer, M. (1939). *Kinetik der Phasenbildung*. Dresden: Steinkopff.
- Volmer, M., and Weber, A. (1925). *Z. Physikal. Chemie* 119, 277.
- Wang, J., Wang, J., Feng, L., and Lin, T. (2015). Fluid mixing in droplet-based microfluidics with a serpentine microchannel. *RSC Adv.* 5, 104138–104144. doi:10.1039/C5RA21181F.
- Ward, M. R., Rae, A., and Alexander, A. J. (2015). Nonphotochemical Laser-Induced Crystal Nucleation by an Evanescent Wave. *Cryst. Growth Des.* 15, 4600–4605. doi:10.1021/acs.cgd.5b00854.
- Weber, J. K. R., Hampton, D. S., Merkley, D. R., Rey, C. A., Zatarski, M. M., and Nordine, P. C. (1994). Aero-acoustic levitation: A method for containerless liquid-phase processing at high temperatures. *Rev. Sci. Instrum.* 65, 456–465. doi:10.1063/1.1145157.
- Whitesides, G. M., and Stroock, A. D. (2001). Flexible Methods for Microfluidics. *Phys. Today* 54, 42–48. doi:10.1063/1.1387591.

- Xu, B., Nguyen, N.-T., and Neng Wong, T. (2011). Droplet Coalescence in Microfluidic Systems. *Micro Nanosyst.* 3, 131–136. doi:10.2174/1876402911103020131.
- Xu, S., Nie, Z., Seo, M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H. A., et al. (2005). Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 724–728. doi:10.1002/anie.200462226.
- Yang, Y., Noviana, E., Nguyen, M. P., Geiss, B. J., Dandy, D. S., and Henry, C. S. (2017). Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. *Anal. Chem.* 89, 71–91. doi:10.1021/acs.analchem.6b04581.
- Yau, S.-T., and Vekilov, P. G. (2001). Direct Observation of Nucleus Structure and Nucleation Pathways in Apoferritin Crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1080–1089. doi:10.1021/ja003039c.
- Zampolli, S., Elmi, I., Mancarella, F., Betti, P., Dalcanale, E., Cardinali, G. C., et al. (2009). Real-time monitoring of sub-ppb concentrations of aromatic volatiles with a MEMS-enabled miniaturized gas-chromatograph. *Sens. Actuators B Chem.* 141, 322–328. doi:10.1016/j.snb.2009.06.021.
- Zhang, J., Tan, K. L., Hong, G. D., Yang, L. J., and Gong, H. Q. (2001). Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS. *J. Micromechanics Microengineering* 11, 20. doi:10.1088/0960-1317/11/1/304.
- Zheng, B., Roach, L. S., and Ismagilov, R. F. (2003). Screening of Protein Crystallization Conditions on a Microfluidic Chip Using Nanoliter-Size Droplets. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11170–11171. doi:10.1021/ja037166v.
- Zheng, B., Tice, J. D., Roach, L. S., and Ismagilov, R. F. (2004). 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. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 43, 2508–2511. doi:10.1002/anie.200453974.

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.1. ILLUSTRATION D'UN DIAGRAMME DE PHASE DE CRISTALLISATION	26
FIGURE I.2. DIFFERENTS TYPES DE NUCLEATION (MULLIN 1961).....	27
FIGURE I.3. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE DU FILM EN CROISSANCE CRISTALLINE (MULLIN 1961)	28
FIGURE I.4. REPRESENTATION GRAPHIQUE DE L'EVOLUTION DE L'ENTHALPIE LIBRE DE FORMATION D'UN CLUSTER, EN FONCTION DU NOMBRE DE MOLECULES	31
FIGURE I.5. IMAGE DE MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE DE CLUSTERS D'APOFERRITINE	34
FIGURE I..6 IMAGES CRYO-TEM ILLUSTRANT LE PROCESSUS D'AGREGATION PRE-NUCLEATION	34
FIGURE .7. MICROSCOPIE OBLIQUE EN CHAMP SOMBRE D'UNE SOLUTION SURSATUREE DE GLUCOSE ISOMERASE.....	35
FIGURE I.8. COMPARAISONS DE VITESSES DE NUCLEATION DU N-PENTANOL RAPPORTEES PAR PLUSIEURS GROUPES	35
FIGURE I.9. DIAGRAMME DE PHASE GENERIQUE D'UNE PROTEINE GLOBULAIRE EN SOLUTION	36
FIGURE I.10. EVOLUTION DES TAILLES DE FLUCTUATIONS DE CONCENTRATION ξ EN FONCTION DE LA TEMPERATURE.....	37
FIGURE I.11. REPRESENTATION DES CHEMINS POSSIBLES DE NUCLEATION EN FONCTION DES FLUCTUATIONS DE CONCENTRATION ET DE STRUCTURE	38
FIGURE I.12. RESULTATS D'EXPERIENCE DLS AVEC 1,03 MM DE LYSOZYME ET 0,70 M DE NaCl.....	40
FIGURE I.13. CARACTERISATION PAR DLS DE SOLUTIONS SURSATUREES DE LUMAZINE SYNTHASE	40
FIGURE I.14. CARACTERISATION PAR DLS DE SOLUTIONS D'HEMOGLOBINE A 35°C.....	41
FIGURE I.15. CARACTERISATION PAR SAXS DE L'EVOLUTION D'UNE SOLUTION DE GLYCINE.....	42
FIGURE I.16. MECANISME DE NUCLEATION DE LA GLYCINE PROPOSEE SUITE A UNE ETUDE MENEES PAR SAXS	42
FIGURE I.17. DIAGRAMME DE PHASE EXPERIMENTAL DE LA BLG EN PRESENCE DE CdCl ₂	43
FIGURE I.18. COURBES SAXS EN FONCTION DU TEMPS POUR UNE SOLUTION DE BLG.	44
FIGURE I.19. MODELISATION ET ANALYSE DES DONNEES DE DIFFUSION.....	45
FIGURE I.20. COURBES SAXS EN FONCTION DU TEMPS D'UNE SOLUTION DE BLG.....	46
FIGURE I.21. COMPARAISON D'UN POINT DE VUE THERMODYNAMIQUE DES DEUX MECANISMES DE NUCLEATION.....	47
FIGURE I.22. EXEMPLE DE DESIGNS DE PUCES MICROFLUIDIQUES UTILISEES EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	48
FIGURE I.23. EXEMPLES DE MATERIAUX POUR LA FABRICATION DE PUCES MICROFLUIDIQUES. 50	
FIGURE I.24. DEUX REGIMES D'ECOULEMENTS MONOPHASIQUES DANS UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE	54
FIGURE I.25. MODELE D'UN MELANGEUR CHAOTIQUE ACTIF AVEC DES CANAUX LATERAUX	55
FIGURE I.26. EXEMPLE DE GEOMETRIES DE MELANGEURS PASSIFS.....	55
FIGURE I.27. ECOULEMENT DIPHASIQUE DE BULLES DE CO ₂ DANS UN LIQUIDE PORTEUR ETHANOL.....	56
FIGURE I.28. 3 METHODES POUR GENERER DES GOUTTES DANS UN MICROCANAL.	57
FIGURE I.29. EXEMPLE DE GENERATION DE GOUTTES SE COMPORTANT COMME DES MICROREACTEURS DE CRISTALLISATION.....	58
FIGURE I.30. SYSTEME DE MICROFLUIDIQUE DE GOUTTES POUR LA CRISTALLISATION DE PROTEINES	59
FIGURE I.31. ILLUSTRATION DU GAIN DE SURFACE D'UNE GOUTTE ENTRANT DANS UN PUIT	60
FIGURE I.32. ORIENTATION DE GOUTTES VERS DES RAILS DE STOCKAGE A L'AIDE D'UN LASER.....	60
FIGURE I.33. DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE POUR DES ETUDES DE CINETIQUES DE NUCLEATION	62
FIGURE I.34. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX DE CRISTALLISATION PAR LEVITATION.....	62
FIGURE I.35. DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE EXPERIMENTAL DES TRAVAUX DE FRADEN	64
FIGURE I.36. DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE EXPERIMENTAL DES TRAVAUX DE VEESLER	64
FIGURE I.37. DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE EXPERIMENTAL DU GROUPE DE SALMON.....	65
FIGURE I.38. DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE EXPERIMENTAL DU GROUPE DE TEYCHENE.....	65
FIGURE I.39. EVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRESENTANT PAS DE CRISTAUX EN FONCTION DU TEMPS DANS LES TRAVAUX DE FRADEN.....	66
FIGURE I.40. EVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRESENTANT PAS DE CRISTAUX EN FONCTION DU TEMPS DANS LES TRAVAUX DE SALMON.....	66

FIGURE I.41. EVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRESENTANT PAS DE CRISTAUX EN FONCTION DU TEMPS DANS LES TRAVAUX DE TEYCHENE.....	67
FIGURE I.42. DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES POUR REALISER DES ANALYSES SAXS SUR DES GOUTTES.....	69
FIGURE I.43. COURBES SAXS DE GOUTTES D'EAU CONTENANT DES NANOPARTICULES D'OR.....	70
FIGURE I.44. PHOTOGRAPHIE DE PUCE MICROFLUIDIQUE EN KAPTON.....	70
FIGURE II.1. REPRESENTATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE D'UNE PROTEINE.....	75
FIGURE II.2. STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DE L'URATE OXYDASE.....	76
FIGURE II.3. DIAGRAMME DE PHASE DE L'URATE OXYDASE EN PRESENCE DE PEG 8000.....	77
FIGURE II.4. COURBES SAXS, INTENSITES DIFFUSEES EN FONCTION DU VECTEUR DE DIFFUSION POUR L'URATE OXYDASE.....	78
FIGURE II.5. EXEMPLE DE CRISTAUX D'URATE OXYDASE.....	78
FIGURE II.6. REACTION D'ISOMERISATION DU GLUCOSE EN FRUCTOSE.....	79
FIGURE II.7. STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DE LA FORME NATIVE DE LA GLUCOSE ISOMERASE.....	80
FIGURE II.8. DONNEES DE SOLUBILITES DE LA GLUCOSE ISOMERASE.....	80
FIGURE II.9. DIAGRAMME DE PHASE DE LA GLUCOSE ISOMERASE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PEG 10K.....	81
FIGURE II.10. OBSERVATION MICROSCOPIQUE DE LA CRISTALLISATION DE LA GLUCOSE ISOMERASE.....	81
FIGURE II.11. STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU LYSOZYME.....	82
FIGURE II.12. DIAGRAMME DE PHASE DU LYSOZYME.....	83
FIGURE II.13. VALEURS DE LA TEMPERATURE DE DECOMPOSITION SPINODALE DU LYSOZYME.....	83
FIGURE II.14 A - DISTRIBUTION DE TAILLE DU LYSOZYME EN SOLUTION.....	84
FIGURE II.15. ANALYSE DLS DE SOLUTIONS DE LYSOZYME AVANT, ET APRES PURIFICATION.....	85
FIGURE II.16. PROCEDE DE PURIFICATION ET DE CONCENTRATION D'UNE SOLUTION DE LYSOZYME COMMERCIAL.....	87
FIGURE II.17. COMPOSITION USUELLE D'UN FILM SEC.....	88
FIGURE II.18. ETAPE DE LAMINAGE POUR LA PREPARATION DU MOULE RIGIDE.....	91
FIGURE II.19. EXEMPLE DE MASQUE UTILISE POUR APPLIQUER UN DESIGN AU MOULE.....	91
FIGURE II.20. FORMULE CHIMIQUE DU POLYDIMETHYLSILOXANE (PDMS).....	94
FIGURE II.21. PROCEDE DE FABRICATION DE MOULE SOUPLE EN PDMS.....	95
FIGURE II.22. PROCEDE DE FABRICATION D'UNE PUCE EN PDMS SUR UN SUPPORT EN VERRE.....	96
FIGURE II.23. REPRESENTATION DE LA REACTION THIOL-ENE ENTRE UN MONOMERE ALLYLIQUE ET UN MONOMERE THIOL.....	98
FIGURE II.24. REPRESENTATION DE LA REACTION THIOL-EPOXY ENTRE UN MONOMERE EPOXY ET UN MONOMERE THIOL.....	98
FIGURE II.25. PROCEDE DE FABRICATION DE PUCE MICROFLUIDIQUE EN OSTEMER.....	100
FIGURE II.26. MODIFICATION DES PROPRIETES DE SURFACE DE L'OSTEMER.....	101
FIGURE II.27. REPRESENTATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DU POLYIMIDE CONSTITUANT LES FILMS DE KAPTON.....	102
FIGURE II.28. PROCEDE DE FABRICATION D'UNE PUCE MICROFLUIDIQUE EN OSTEMER AVEC FENETRES EN KAPTON.....	103
FIGURE II.29. AIGUILLE EN ACIER UTILISEE POUR REALISER LES CONNECTIQUES DES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES.....	105
FIGURE III.1. SCENARII POSSIBLES DE CRISTALLISATION ET VITESSES DE NUCLEATION RESPECTIVES EN ACCORD AVEC LE MODELE DE NUCLEATION DE POUND ET LA MER.....	116
FIGURE III.2. SCENARII POSSIBLE DE CRISTALLISATION ET VITESSES DE NUCLEATION RESPECTIVES EN ACCORD AVEC LE MODELE DE AKELLA ET FRADEN.....	118
FIGURE III.3. SCENARII POSSIBLE DE CRISTALLISATION ET VITESSES DE NUCLEATION RESPECTIVES EN ACCORD AVEC LE MODELE DE BOURGEOIS.....	121
FIGURE III.4. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DESIGN DE LA PUCE MICROFLUIDIQUE.....	123
FIGURE III.5. RECOMBINAISON DE TROIS PHOTOGRAPHIES AU NIVEAU DE LA ZONE DE MELANGE LORS D'UN TEST DE VITESSE DE MELANGE.....	124
FIGURE III.6. EVOLUTION DU PARAMETRE DE MELANGE EN FONCTION DU NUMERO DE CANAL.....	125

FIGURE III.7. PIEGE MICROFLUIDIQUE PERMETTANT DE STOCKER DES GOUTTES DE SOLUTION AQUEUSE A PARTIR D'ÉCOULEMENTS MONOPHASIQUES.....	126
FIGURE III.8. PHOTOGRAPHIE DE L'ENSEMBLE DE LA ZONE DE STOCKAGE D'UNE PUCE MICROFLUIDIQUE.....	128
FIGURE III.9. PHOTOGRAPHIE D'UN MODULE PELTIER UTILISÉ DANS LE SYSTÈME DE CONTRÔLE DE TEMPÉRATURE.....	129
FIGURE III.10. REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENSEMBLE DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL MONTÉ SUR MICROSCOPE	130
FIGURE III.11. DIAGRAMME DE PHASE DU LYSOZYME AVEC 3% NaCl	132
FIGURE III.12. EXPÉRIENCE À 20°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	133
FIGURE III.13. EXPÉRIENCE À 15,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	134
FIGURE III.14. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 14,5°C.....	135
FIGURE III.15. EXPÉRIENCE À 14,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	135
FIGURE III.16. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 13,5°C.....	136
FIGURE III.17. EXPÉRIENCE À 13,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	136
FIGURE III.18. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 12,5°C.....	137
FIGURE III.19. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 12,5°C.....	137
FIGURE III.20. EXPÉRIENCE À 12,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	138
FIGURE III.21. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 10,5°C.....	138
FIGURE III.22. ÉVOLUTION TEMPORELLE D'UNE GOUTTE STOCKÉE À 10,5°C	139
FIGURE III.23. EXPÉRIENCE À 10,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES NE PRÉSENTANT PAS DE CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	139
FIGURE III.24. ÉVOLUTION DE LA PROPORTION DE GOUTTES SANS CRISTAUX EN FONCTION DU TEMPS POUR LES 6 DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES DE STOCKAGE.	140
FIGURE III.25. EXPÉRIENCE À 20°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	143
FIGURE III.26. EXPÉRIENCE À 15,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	144
FIGURE III.27. EXPÉRIENCE À 14,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	145
FIGURE III.28. EXPÉRIENCE À 13,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	146
FIGURE III.29. EXPÉRIENCE À 12,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	147
FIGURE III.30. EXPÉRIENCE À 10,5°C. ÉVOLUTION DE LA FRACTION DE GOUTTES SANS CRISTAL EN FONCTION DU TEMPS.....	148
FIGURE III.31. TRACE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DU LOGARITHME DE LA VITESSE DE NUCLEATION HOMOGENE OBTENUE À L'AIDE DES REGRESSIONS DE LA PARTIE III.3.3 EN FONCTION DE $1/(\ln S)^2/T^3$	152
FIGURE III.32. TRACE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DU LOGARITHME DE LA VITESSE DE NUCLEATION HOMOGENE OBTENUE À L'AIDE DES REGRESSIONS DE LA PARTIE III.3.3 EN FONCTION DE $1/(\ln S)^2/T^3$	152
FIGURE III.33. TRACE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DU LOGARITHME DE LA VITESSE DE NUCLEATION HETEROGENE OBTENUE À L'AIDE DES REGRESSIONS DE LA PARTIE III.3.3 EN FONCTION DE $1/(\ln S)^2/T^3$	153
FIGURE III.34. REPRÉSENTATION DE L'AMPLITUDE DE LA BARRIÈRE ÉNERGÉTIQUE À FRANCHIR D'APRÈS LA CNT	155
FIGURE III.35. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE MOLECULES DANS UN NUCLEUS CRITIQUE.....	156
FIGURE III.36. DENSITÉ NUMÉRIQUE DE SITES DE NUCLEATION EN FONCTION DE LA SURSATURATION.....	158
FIGURE III.37. TRACE DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES DU LOGARITHME DE LA VITESSE DE NUCLEATION HOMOGENE OBTENUE À L'AIDE DES REGRESSIONS DE LA PARTIE III.3.3 EN FONCTION DE $T/T_s - 1 - 0,63$	162
FIGURE IV.1. SCHEMA D'UNE INSTALLATION À RAYONNEMENT SYNCHROTRON.....	168

FIGURE IV.2. SCHEMA DE PRINCIPE DE LA DIFFUSION DE RAYONS X AUX PETITS ANGLES	169
FIGURE IV.3. CONSIDERATIONS GEOMETRIQUES LORS DE LA DIFFUSION D'UNE ONDE PAR UNE PARTICULE	169
FIGURE IV.4. PHOTOGRAPHIE DE LA CABINE EXPERIMENTALE DE LA LIGNE BM29	177
FIGURE IV.5. PHOTOGRAPHIE DE LA CABINE EXPERIMENTALE DE LA LIGNE SWING	178
FIGURE IV.6. REPRESENTATION DU PORTE-ECHANTILLON MODIFIE.....	179
FIGURE IV.7. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PREMIER COUPLAGE MICROFLUIDIQUE/SAXS.....	180
FIGURE IV.8. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF 1 SUR LA LIGNE SYNCHROTRON.	181
FIGURE IV.9. SYSTEME DE CONNEXION ENTRE DEUX CAPILLAIRES.....	181
FIGURE IV.10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEUXIEME COUPLAGE MICROFLUIDIQUE/SAXS.....	182
FIGURE IV.11. DESIGN DE LA PUCE DU TROISIEME DISPOSITIF	183
FIGURE IV.12. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENSEMBLE DU TROISIEME DISPOSITIF.....	184
FIGURE IV.13. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF 3 (SANS FIBRES OPTIQUES) EN PLACE SUR LA LIGNE.....	184
FIGURE IV.14. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME DE SYNCHRONISATION.....	186
FIGURE IV.15. SIGNAL SAXS DE LA RASBURICASE A 20 MG/ML.....	188
FIGURE IV.16. SIGNAL SAXS DE LA RASBURICASE A 20 MG/ML.....	189
FIGURE IV.17. SPECTRE D'INTENSITE COLLECTE A $\lambda = 280\text{NM}$ LORS DU PASSAGE DE GOUTTES.	190
FIGURE IV.18. DIFFERENCES ENTRE UNE GENERATION DE GOUTTES STABLE ET INSTABLE.	191
FIGURE IV.19. TRACES DE CALIBRATION D'ABSORBANCE POUR LE LYSOZYME A $\lambda = 280\text{NM}$	192
FIGURE IV.20. COURBES SAXS DU LYSOZYME A DIFFERENTES CONCENTRATIONS.....	193
FIGURE IV.21. TRACE DE I_0 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN PROTEINE	194
FIGURE IV.22. REGRESSION DES TRACES DE GUINIER POUR 3 CONCENTRATIONS EN LYSOZYME.....	194
FIGURE IV.23. COURBES SAXS EXPERIMENTALES DU LYSOZYME A DIFFERENTES CONCENTRATIONS ET COURBES SIMULEES A L'AIDE DE CRY SOL	195
FIGURE IV.24. GENERATION DE GOUTTES CONTENANT LYSOZYME ET NaCl.....	197
FIGURE IV.25. COURBES SAXS DU LYSOZYME A 21,7 MG/ML ET DIVERSES CONCENTRATIONS EN SEL	198
FIGURE IV.26. COURBES SAXS DU LYSOZYME A 52 MG/ML ET DIVERSES CONCENTRATIONS EN SEL	198
FIGURE IV.27. COURBES SAXS DU LYSOZYME A 86,7 MG/ML ET DIVERSES CONCENTRATIONS EN SEL	199
FIGURE IV.28. VALEURS DE L'INTENSITE A ANGLE DE DIFFUSION NUL POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN LYSOZYME ET EN SEL.....	200
FIGURE IV.29. VARIATIONS DU SECOND COEFFICIENT DU VIRIEL DU LYSOZYME EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SEL	201
FIGURE IV.30. REPRESENTATION D'UN SYSTEME AVEC ATTRACTION PAR DEPLETION.....	202
FIGURE IV.31. PHOTOGRAPHIE DE LA GENERATION DE GOUTTES DE GLUCOSE ISOMERASE ET SURFACTANT.	204
FIGURE IV.32. COURBES SAXS DES GOUTTES DE GLUCOSE ISOMERASE AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN SURFACTANT.	205
FIGURE IV.33. DIAGRAMME DE PHASE DU LYSOZYME AVEC 3%w/v DE NaCl ET CONDITIONS EXPERIMENTALES.....	207
FIGURE IV.34. COURBES SAXS DE CENTAINES DE GOUTTES DE LYSOZYME A 60 MG/ML 3%w/v NaCl STOCKEES A 8,2°C PENDANT 6 ET 20 MINUTES.....	208
FIGURE IV.35. COURBES SAXS DE CENTAINES DE GOUTTES DE LYSOZYME A 100 MG/ML 3%w/v NaCl STOCKEES A 8,2°C PENDANT 6 ET 20 MINUTES.....	209
FIGURE IV.36. DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE HYBRIDE PERMETTANT DE METTRE DES GOUTTES DEVANT LE FAISCEAU DE RAYONS X..	214
FIGURE IV.37. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL SUR LA LIGNE	215
FIGURE IV.38. PHOTOGRAPHIE DU DESSUS DU DISPOSITIF.....	216
FIGURE IV.39. PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF AVEC UN ZOOM SUR LA PUCE EN KAPTON	217
FIGURE IV.40. DONNEES BRUTES, SUR L'ENSEMBLE DU TEMPS D'ACQUISITION DES DONNEES, REPRESENTANT L'EVOLUTION DU SIGNAL SAXS PENDANT 1H30 POUR LA 4EME GOUTTE DE LA COLONNE.....	219

FIGURE IV.41. DONNEES BRUTES, SUR L'ENSEMBLE DU TEMPS D'ACQUISITION DES DONNEES, REPRESENTANT L'EVOLUTION DU SIGNAL SAXS PENDANT 1H30 POUR LA 6EME GOUTTE DE LA COLONNE..... 219

FIGURE IV.42. ANALYSE DES DONNEES BRUTES OBTENUES LORS DE L'EXPERIENCE DE NUCLEATION DU LYSOZYME..... 220

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.1. EXPRESSION DE QUELQUES TEMPS CARACTERISTIQUES EN GENIE DES PROCÉDES.	51
TABLEAU II.1. PARAMETRES DE MAILLE DE LA STRUCTURE MONOCLINIQUE DE GROUPE D'ESPACE P12 ₁ 1 DE L'URATE OXYDASE (1R56.PDB).....	76
TABLEAU II.2. PARAMETRES DE MAILLE DE LA STRUCTURE ORTHORHOMBIQUE DE GROUPE D'ESPACE P2 ₁ 2 ₁ 2 DE LA GLUCOSE ISOMERASE (1OAD.PDB).....	80
TABLEAU II.3. PARAMETRES DE MAILLE DES STRUCTURES TETRAGONALE, ORTHORHOMBIQUE ET MONOCLINIQUE DU LYSOZYME DE BLANC D'ŒUF (DATTA ET AL., 2001).	84
TABLEAU II.4. RECAPITULATIF DES DONNEES CONCERNANT LES PROTEINES UTILISEES DANS CETTE THESE	87
TABLEAU II.5. ÉTAPES DU PROTOCOLE DE PREPARATION DU SUBSTRAT	89
TABLEAU II.6. ENERGIES MINIMALES ET MAXIMALES D'EXPOSITION A LA LUMIERE UV EN FONCTION DU TYPE ET DE L'ÉPAISSEUR DES FILMS SECS. LES TEMPS D'EXPOSITION CORRESPONDANTS SONT CALCULES POUR L'UV-KUB 2 D'INTENSITE 25 MW/CM ²	92
TABLEAU II.7. TEMPS DE DEVELOPPEMENT NECESSAIRES A L'AIDE D'UNE SOLUTION DE DEVELOPPEMENT A 30°C POUR LES DIFFERENTS TYPES DE FILMS SECS.	92
TABLEAU II.8. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES DEVELOPPES.....	104
TABLEAU III.1. VALEURS DES PARAMETRES DU MODELE DE NUCLEATION REGRESSEES PAR L'ALGORITHME DE LEVENBERG-MARQUARDT A PARTIR DES DONNEES EXPERIMENTALES DE L'ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA PROPORTION DE GOUTTES SANS CRISTAUX (FIGURE III.24) EN ACCORD AVEC LE MODELE DE BOURGEOIS ET AL.....	141
TABLEAU III.2. EXPERIENCE A 20°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX ET PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS ET AL. SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	143
TABLEAU III.3. EXPERIENCE A 15,5°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX ET PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS ET AL. SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	144
TABLEAU III.4. EXPERIENCE A 14,5°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX ET PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	145
TABLEAU III.5. EXPERIENCE A 13,5°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX ET PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	146
TABLEAU III.6. EXPERIENCE A 12,5°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX, PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	147
TABLEAU III.7. EXPERIENCE A 10,5°C. PARAMETRES EXPERIMENTAUX, PARAMETRES DE NUCLEATION MOYENS OBTENUS A L'AIDE DE LA REGRESSION DU MODELE DE BOURGEOIS ET AL. SUR LES DONNEES EXPERIMENTALES.	148
TABLEAU III.8. ENSEMBLE DES PARAMETRES EXPERIMENTAUX ET PARAMETRES CINETIQUES OBTENUS PAR REGRESSION LORS DES EXPERIENCES MICROFLUIDIQUES DEDIEES AUX MESURES DE CINETIQUES DE NUCLEATION.....	149
TABLEAU III.9. VALEURS DES PARAMETRES A ET B DU MODELE ISSU DE LA THEORIE CLASSIQUE DE LA NUCLEATION (Éq. III-39) OBTENUS PAR REGRESSION A L'AIDE DU TRACE DE LA FIGURE III.31 SUR L'ENSEMBLE DES EXPERIENCES MISE A PART CELLE A 10,5°C QUI NE SEMBLE PAS REPENDRE A LA THEORIE CLASSIQUE.	154
TABLEAU IV.1. PARAMETRES UTILISES SUR LA LIGNE BM29	177
TABLEAU IV.2. PARAMETRES DE LA LIGNE SWING.....	178
TABLEAU IV.3. CONDITIONS OPERATOIRES UTILISEES POUR L'ÉTUDE D'INTERACTIONS INTER-PROTEINES, SUR DU LYSOZYME EN PRESENCE DE SEL NaCl DANS UN TAMPON ACETATE DE SODIUM A 50MM PH 4,5 ET A TEMPERATURE AMBIANTE.....	197
TABLEAU IV.4. CONDITIONS OPERATOIRES DE LA SERIE D'EXPERIENCES REALISEES DANS LE BUT DE CRISTALLISER LA GLUCOSE ISOMERASE PAR UN MECANISME DE DEPLETION INDUIT PAR DES MICELLES DE SURFACTANT.	204
TABLEAU IV.5. PARAMETRES DE MAILLE DE LA GLUCOSE ISOMERASE (1OAD.PDB)	206