

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS .....	4
RESUME.....	6
ABSTRACT.....	7
SOMMAIRE.....	8
INTRODUCTION .....	13
<b>CHAPITRE 1. CRISTALLISATION EN SOLUTION.....</b>	<b>18</b>
1.1 NOTIONS GENERALES DE LA CRISTALLISATION EN SOLUTION .....	19
1.1.1 Solution, solubilité .....	19
1.1.2 Sursaturation, diagramme de phase .....	20
1.2 NUCLEATION .....	21
1.2.1 Théorie classique de la nucléation .....	22
1.2.1.1 TCN pour la nucléation primaire homogène .....	22
1.2.1.2 TCN pour la nucléation primaire hétérogène .....	24
1.2.1.3 Cinétique de nucléation.....	27
1.2.1.3.1 Fréquence de nucléation J .....	27
1.2.1.3.2 Temps d'induction de la nucléation $t_N$ .....	29
1.2.1.4 Stochasticité de la nucléation et analyse des données expérimentales.....	31
1.2.1.5 « Défauts » de la TCN .....	32
1.2.2 Nucléation en deux étapes .....	33
1.3 POLYMORPHISME, TRANSITIONS DE PHASE .....	36
1.4 CROISSANCE CRISTALLINE .....	37
1.5 MURISSEMENT, ARRET DE LA CRISTALLISATION .....	38
1.5.1 Mûrissement d'Ostwald .....	38
1.5.2 Mûrissement cinétique.....	40
<b>CHAPITRE 2. CRISTALLISATION EN MICROFLUIDIQUE.....</b>	<b>42</b>
2.1 SYSTEMES MICROFLUIDIQUES POUR LA CRISTALLISATION.....	43
2.1.1 Systèmes microfluidiques à base de gouttes.....	44
2.1.1.1 Emulsion .....	45
2.1.1.2 Cristallisation par diffusion de vapeur avec les plugs .....	45
2.1.1.3 « Seeding » (Ensemencement) dans les plugs .....	47
2.1.2 Système microfluidique en diffusion libre à l'interface .....	48

2.1.3	<i>Systèmes microfluidique en contre-diffusion</i> .....	50
2.1.4	<i>Systèmes « high-throughput »</i> .....	53
2.2	ETUDES PHYSICOCHIMIQUES DE LA CRISTALLISATION EN UTILISANT LES SYSTEMES MICROFLUIDIQUES .....	55
2.2.1	<i>Etude de solubilité</i> .....	55
2.2.2	<i>Etudes du Polymorphisme</i> .....	56
2.2.3	<i>Cinétiques de nucléation</i> .....	58
2.2.3.1	Fréquence de nucléation primaire: méthode du « double pulse » .....	58
2.2.3.2	Effet des impuretés .....	60
2.2.3.3	Effet de l'interface solution-huile .....	61
2.2.3.4	Milieux confinés (nL → fL): effet du confinement .....	63
	<b>CHAPITRE 3. HYDRODYNAMIQUE</b> .....	<b>66</b>
3.1	NOTIONS D'HYDRODYNAMIQUES .....	67
3.1.1	<i>Viscosité, contrainte de cisaillement et fluide newtonien</i> .....	68
3.1.2	<i>Ecoulement entraîné par la pression</i> .....	69
3.1.3	<i>Nombre de Reynolds et écoulement laminaire</i> .....	69
3.1.4	<i>Tension interfaciale</i> .....	70
3.1.5	<i>Longueur capillaire</i> .....	71
3.1.6	<i>Nombre de Weber</i> .....	71
3.1.7	<i>Nombre capillaire</i> .....	72
3.1.8	<i>Nombre de Bond</i> .....	72
3.1.9	<i>Nombre de Pécelet</i> .....	72
3.2	GENERATION DES GOUTTES.....	75
3.2.1	<i>Géométries des systèmes microfluidiques</i> .....	75
3.2.1.1	Méthode du « coflowing » .....	75
3.2.1.2	Méthode du « flow-focusing » .....	76
3.2.1.3	Méthode du « cross-flowing » .....	76
3.2.2	<i>Régimes de génération des gouttes</i> .....	76
3.2.3	<i>Caractérisation des gouttes</i> .....	77
	<b>CHAPITRE 4. MATERIELS ET METHODES</b> .....	<b>78</b>
4.1	MATERIAUX : SOLUTIONS ET HUILES PERTINENTES .....	79
4.1.1	<i>Molécules étudiées</i> .....	79
4.1.1.1	Urate oxydase recombinante ou Rasburicase .....	79
4.1.1.1.1	Solubilité de la rasburicase .....	81
4.1.1.1.2	Effets de l'ajout de polymère.....	82

4.1.1.1.3	Faciès cristallins et polymorphes .....	82
4.1.1.1.4	La rasburicase utilisée dans cette thèse .....	84
4.1.2	<i>Le Lysozyme</i> .....	84
4.1.3	<i>Phases en microfluidique : solvant et huiles</i> .....	85
4.2	SYSTEME MICROFLUIDIQUE .....	87
4.2.1	<i>Génération des gouttes</i> .....	88
4.2.1.1	Jonctions et capillaires.....	88
4.2.1.2	Système des pousses-seringue : débits et gradient.....	89
4.2.2	<i>Incubation et observation des gouttes</i> .....	90
4.2.3	<i>Caractérisation en ligne des gouttes</i> .....	91
4.2.3.1	Partie optique .....	91
4.2.3.2	Cellule d'échantillonnage .....	92
4.3	METHODES .....	93
4.3.1	<i>Caractérisation des expériences</i> .....	93
4.3.1.1	Tension interfaciale par la méthode de la goutte pesée .....	93
4.3.1.2	Détermination du mouillage par la mesure de l'angle de contact .....	96
4.3.1.3	Taille, volume et forme des gouttes .....	97
4.3.1.3.1	Taille des gouttes .....	97
4.3.1.3.2	Volume des gouttes .....	98
4.3.1.3.3	Forme des gouttes .....	98
4.3.1.3.4	Fréquence des gouttes .....	98
4.3.1.4	Simulations numériques en 2D.....	99
4.3.2	<i>Méthodes pour l'étude de la cristallisation</i> .....	100
4.3.2.1	Cristallisation en Microbatch®.....	100
4.3.2.2	Cristallisation en microfluidique.....	101
<b>CHAPITRE 5.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>102</b>
5.1	ETUDE HYDRODYNAMIQUE.....	103
5.1.1	<i>Caractéristiques des gouttes : <math>L/W</math> et <math>f_D</math></i> .....	104
5.1.2	<i>Propriétés des écoulements</i> .....	106
5.1.3	<i>Régimes de gouttes</i> .....	108
5.1.4	<i>Etude de <math>L/W</math></i> .....	111
5.1.4.1	Influence de $v_D/v_C$ sur $L/W$ .....	111
5.1.4.2	Influence de $v_{TOT}$ sur $L/W$ en tenant compte de $v_D/v_C$ .....	113
5.1.4.3	Influence de $Ca$ sur $L/W$ en tenant compte de $v_D/v_C$ .....	115

5.1.4.4	Influence de Ca sur L/W sans tenir compte de $v_D/v_C$ .....	116
5.1.5	<i>Etude de <math>f_D</math></i> .....	118
5.1.6	<i>Article 1:</i> .....	122
5.2	CARACTERISATION DES GOUTTES.....	135
5.2.1	<i>Caractérisation préliminaire des gouttes: « off-line »</i> .....	135
5.2.2	<i>Caractérisation « on-line » des gouttes : Taille et composition chimique</i> .....	138
5.2.2.1	Développement du spectromètre d'UV in situ.....	139
5.2.2.2	Calibration de l'intensité de la source lumière.....	141
5.2.2.3	Mesure d'absorbance avec un flux continu de solution.....	141
5.2.2.4	Optimisation des mesures : Signal / Bruit.....	143
5.2.2.4.1	Limite de linéarité de la concentration avec l'absorbance.....	144
5.2.2.4.2	Effet de la lumière parasite.....	145
5.2.2.4.3	Choix du temps d'intégration.....	145
5.2.2.5	Mesure d'absorbance avec les gouttes.....	146
5.2.2.5.1	Passage d'une goutte à travers le faisceau d'UV.....	146
5.2.2.5.2	Traitement des données : composition chimique, paramètre des gouttes.....	149
5.2.2.5.3	Caractérisation en ligne du gradient.....	153
5.3	CRISTALLISATION.....	156
5.3.1	<i>Criblage rapide en microbatch</i> .....	156
5.3.2	<i>Expériences en microfluidique</i> .....	157
5.3.3	<i>Résultats de la cristallisation en microfluidique</i> .....	159
5.3.4	<i>Article 2:</i> .....	163
	<b>CONCLUSIONS GENERALES</b> .....	<b>169</b>
	<b>ANNEXE</b> .....	<b>174</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>176</b>

# Introduction

Le terme *crystal* est dérivé du grec *krystallos* qui signifie la glace transparente. Depuis très longtemps, les cristaux sont connus pour leur transparence et leur belle forme géométrique avec des faces régulières et des arêtes vives. Nous sommes familiers avec les cristaux ou les applications de la cristallisation dans la vie quotidienne : la glace, les minéraux tels que le quartz, la calcite et le diamant, le sucre, le sel ou le beurre de cacao dans l'industrie alimentaire, etc. Il est même probable que dès le sixième millénaire avant Jésus-Christ, les Egyptiens qui exploitaient des mines de turquoise dans la péninsule du Sinaï étaient conscients de la beauté et de la géométrie parfaite de nombreux minéraux naturels.

Du point de vue chimique et physique, les cristaux sont des solides dans lesquels les atomes, les ions, ou les molécules sont disposés dans un motif de répétition périodique dans les trois directions de l'espace. On parle d'un état parfait d'ordre à longue distance ou de périodicité. La périodicité de la structure cristalline confère au cristal des propriétés physiques macroscopiques telles que la densité, la capacité thermique, la température de fusion, la conductivité thermique, les propriétés optiques, etc. Enfin la périodicité se traduit par le pouvoir des cristaux à diffracter les rayons X, les neutrons, et les électrons.

La cristallisation peut être définie comme un processus de changement de phase dans lequel un produit cristallin est obtenu à partir d'une solution, d'un solide ou d'un gaz. Dans cette thèse, nous nous intéressons à des solutions composées d'un solvant (liquide) et d'un soluté (solide). Lorsque la solution est sursaturée en soluté, elle est hors équilibre et tend vers l'équilibre grâce au phénomène de cristallisation. La force motrice de la cristallisation est alors la sursaturation. Lors de la cristallisation, la vie du cristal présente deux périodes : dans un premier temps le cristal « naît » à partir de l'agrégation et de l'organisation d'atomes, d'ions, ou de molécules, c'est la nucléation ou la germination ; puis, le cristal « pousse » parfois jusqu'à des grandes tailles, c'est la croissance cristalline. Enfin, le cristal peut « disparaître » par dissolution comme dans le cas du mûrissement.

La cristallisation est un processus à la fois thermodynamique et cinétique. Les propriétés thermodynamiques se retrouvent dans le diagramme de phase comportant la courbe de solubilité, les domaines de prédominance des différents polymorphes et de séparation liquide-liquide. Les paramètres cinétiques caractérisant la cristallisation sont la limite de zone métastable, la fréquence de nucléation, le temps de nucléation et la vitesse de croissance. Les propriétés thermodynamiques et cinétiques sont influencées par de nombreux facteurs. Par exemple, la solubilité dépend de facteurs internes (énergie libre de surface, liaisons, défauts, etc.), mais aussi de facteurs externes tels que la température, le solvant, le pH, l'ajout de sel et/ou d'agents de cristallisation, etc. Ces

facteurs vont alors agir sur les propriétés des cristaux : polymorphisme, morphologie, faciès cristallin, taille des cristaux, distribution de tailles des cristaux.

La cristallisation en solution est largement utilisée dans des domaines tels que la pharmacie, la biologie, la minéralogie ou l'optique :

- La cristallisation pharmaceutique est un moyen simple et efficace d'obtenir à la fois la purification et la mise en forme d'un principe actif pharmaceutique, en général une molécule organique ou une protéine, à partir d'un mélange. En industrie pharmaceutique, on cherche des liens entre les propriétés du produit final (biodisponibilité, processabilité, sécurité du patient, etc.) et les propriétés des cristaux (phase cristalline, faciès, taille des cristaux, etc.). Etant donné que les différents polymorphes n'ont pas les mêmes solubilités et les mêmes vitesses de dissolution, le polymorphisme est particulièrement étudié en cristallisation pharmaceutique pour assurer la biodisponibilité du principe actif. Pour atteindre la stabilité des médicaments et des temps de dissolution courts et uniformes, des cristaux de taille micrométrique avec une distribution de taille étroite sont souvent demandés. Par ailleurs, pour l'étape de granulation ou de mise en tablette, la dureté du cristal peut-être contrôlée à travers le polymorphisme. De même la manipulation, le transport et le stockage des poudres sont facilités par les propriétés de coulabilité des poudres, qui dépendent du faciès cristallin.
- La biologie structurale s'intéresse à la cristallisation de macromolécules biologiques comme les protéines pour déterminer la structure atomique des cristaux par diffraction des rayons X à haute résolution. Pour cela, les *crystallographers* cherchent les conditions expérimentales pour obtenir un monocristal relativement grand (au moins 0,1 mm dans toutes les dimensions) et de bonne qualité, ce qui est difficile dû à la complexité des structures des macromolécules. Des techniques de criblage des conditions de cristallisation sont alors utilisées pour tester différents facteurs tels que le milieu, le sel, le pH et la température, etc. Cependant la méthode est celle de « l'essai-erreur », ce qui demande des temps d'essais importants et une grande quantité de matière. Alors que les quantités de matière disponibles sont faibles, de l'ordre de quelques milligrammes pour les protéines.

Ainsi il existe une vraie nécessité de contrôler les propriétés d'un cristal pour des applications pharmaceutiques et/ou d'obtenir des monocristaux de bonne qualité pour la biologie structurale. Cependant, la nucléation est un processus stochastique qu'il est

d'une part difficile de reproduire et d'autre part difficile de prédire (lieu et moment de l'occurrence). Par conséquent il est indispensable de répéter les conditions expérimentales jusqu'à obtenir une statistique suffisante et de réduire les volumes pour limiter la zone à observer et consommer peu de matière. Pour cela le criblage des conditions de cristallisation est réalisé avec des systèmes robotiques « *High-throughput* » (HT) sur des volumes aussi faibles que 100nL qui testent de nombreux facteurs de cristallisation (Stevens, 2000). Cependant, les conditions expérimentales ne sont répétées que cinq à dix fois et les essais ne visent pas à comprendre les phénomènes stochastiques de nucléation d'un point de vue fondamental.

Par conséquent, il manque un outil de criblage qui consomme très peu de matière et soit facile à utiliser. Pour cela, nous avons choisi de remplacer les cristallisoirs par des gouttes de volume nanométrique qui sont produites par centaines/milliers grâce à une méthode microfluidique. A la suite du travail de Manuel Ildefonso sur la faisabilité de cette méthode pour étudier les paramètres de cristallisation (Ildefonso *et al.*, 2013), ma thèse s'est focalisée sur le développement d'une plateforme microfluidique polyvalente, qui soit compatible à tous les solvants et toutes les molécules pharmaceutiques. Cette plateforme comprend quatre modules de fonctions différentes que nous avons développés au cours de cette thèse :

- la jonction pour générer les nano-gouttes qui sont autant de nano-cristallisoirs
- le système de stockage et d'incubation des gouttes qui permet d'agir sur le paramètre température
- le système d'observation de la nucléation et de la croissance des cristaux
- la caractérisation des gouttes en ligne (taille et composition chimique des gouttes).

Ces modules sont individuels et l'objectif est de rendre l'ensemble du système flexible et modulable selon les besoins de l'expérimentateur. Pour cela, nous avons cherché à comprendre l'hydrodynamique dans la jonction et le système de stockage afin de contrôler la taille et la composition des gouttes. Enfin, pour valider ce montage microfluidique nous avons étudié la cristallisation d'une protéine dans un milieu visqueux.

Ce mémoire est organisé en 5 chapitres.

- Les chapitres I, II et III sont consacrés à l'étude bibliographique. Le premier chapitre est consacré aux notions générales reliées à la cristallisation en solution, en regroupant les connaissances théoriques sur les aspects cinétiques et thermodynamiques. Dans le deuxième chapitre, on présentera dans un premier temps différents outils



microfluidiques appliqués à la cristallisation. Ensuite, on présentera les études de la cristallisation réalisées par la génération des gouttes en microfluidique. Dans le troisième chapitre, nous aborderons également les aspects théoriques de l'hydrodynamique dans les systèmes microfluidiques et les aspects pratiques de la génération de gouttes.

- Le chapitre IV est consacré aux matériels et aux méthodes utilisées pendant ces 3 années de thèse.
- Dans le dernier chapitre, on présente les résultats obtenus au cours de cette thèse en ce qui concerne l'étude hydrodynamique de la génération des gouttes en microfluidique et l'étude de la cristallisation dans ces gouttes.

# **Chapitre 1.**

## **Cristallisation en solution**

Ce chapitre est consacré à une étude bibliographique sur des notions théoriques reliées à la cristallisation en solution (solubilité, sursaturation, nucléation, croissance, transition de phase), en traitant les aspects cinétiques et thermodynamiques.

## **1.1 Notions générales de la cristallisation en solution**

La cristallisation est l'une des opérations les plus anciennes dans l'industrie chimique. En effet elle a notamment pour but la séparation et la purification mais aussi la mise en forme des particules produites. Il existe trois types de cristallisation selon les phases à partir desquelles les cristaux sont produits : la cristallisation en phase gazeuse, en bain fondu ou en solution. Dans cette thèse, nous nous intéressons à la cristallisation en solution qui est largement utilisée dans de nombreux domaines tels que la pharmacie, la biologie, la minéralogie, l'optique, etc. Par exemple en cristallisation pharmaceutique, on s'intéresse aux liens entre les propriétés du produit (biodisponibilité, processabilité, sécurité du patient, etc.) et les propriétés des cristaux (phase cristalline, faciès, taille des cristaux, etc.). Ainsi, des connaissances fondamentales sont exigées à la fois sur la nucléation et sur la croissance.

L'objectif de ce chapitre est d'introduire les notions théoriques reliées à la solution (solubilité, sursaturation), aux mécanismes des deux étapes de cristallisation (nucléation et croissance) et aux propriétés des cristaux (polymorphisme, transition de phase, faciès, taille, distribution des tailles, etc.). Une attention particulière sera portée sur l'étape de nucléation.

### **1.1.1 Solution, solubilité**

Une solution de cristallisation est un mélange de deux ou plusieurs substances qui forment une seule phase homogène. Dans cette thèse, on s'intéressera à des solutions de cristallisation composées d'un solvant (liquide) et d'un soluté (solide). Le solvant dissout le soluté selon le principe « qui se ressemble s'assemble et se dissout » de Boistelle ou le «like dissolves like» des Anglo-Saxons (Boistelle, 1985).

À une température ou une condition donnée, la quantité maximale de soluté qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant s'appelle la solubilité  $C_s$ . La solubilité  $C_s$  est donc la concentration en soluté au moment où la saturation est atteinte et la solution est dite saturée. La solubilité d'un soluté dans un solvant donné dépend de paramètres de cristallisation, par exemple, la température. Pour la majorité des

molécules,  $C_s$  augmente avec la température, même si le taux de croissance de  $C_s$  avec la température est très variable d'un composé à l'autre. Cependant, la solubilité peut également diminuer avec la température, on parle de solubilité inverse. La relation entre la solubilité et les paramètres de cristallisation est décrite graphiquement par une courbe de solubilité.

### 1.1.2 Sursaturation, diagramme de phase

La notion de saturation implique un état d'équilibre. Lorsque la concentration réelle en soluté dissout ( $C$ ) dépasse la concentration d'équilibre à saturation ( $C_s$ ), la solution est hors équilibre et dite sursaturée. Le rapport  $C/C_s$  est appelé la sursaturation  $\beta$ .

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

*Équation 1*

La nucléation et la croissance cristalline sont entraînées par une force motrice de la cristallisation. Cette force motrice est la différence des potentiels chimiques  $\Delta\mu$  entre l'état sursaturé  $\mu$  et l'état saturé  $\mu_s$  à l'équilibre cristal-solution. Cette différence est décrite ci-dessous avec  $k$ , la constante de Boltzmann et  $T$ , la température.

$$\Delta\mu = \mu - \mu_s = kT \ln \beta = kT \ln \frac{C}{C_s}$$

*Équation 2*

A une température donnée,  $\Delta\mu$  est déterminée uniquement par la sursaturation  $\beta$ . Lorsque la solution est sousaturée ( $\beta < 1$ ),  $\Delta\mu < 0$ , la cristallisation ne peut pas se produire toute seule et les cristaux présents dans la solution vont se dissoudre. Lorsque  $\beta > 1$ , la solution est sursaturée et la solution tend vers l'équilibre cristal/solution ( $\beta = 1$ ,  $\Delta\mu = 0$ ) en cristallisant. En outre, plus  $\beta$  est grand, plus le système est loin de l'équilibre, plus le processus de cristallisation est accéléré. Pour sursaturer une solution à une concentration donnée, soit le solvant est ôté par évaporation, soit un mauvais solvant est ajouté, soit la solubilité est diminuée par d'autres paramètres physico-chimiques (Boistelle, 1985). Dans le cas de la cristallisation de molécules organiques ou de protéines, ces paramètres sont la température, le solvant, le pH, etc.

D'après le diagramme de phases (Figure 1), on peut distinguer trois domaines:

- La zone sousaturée, au-dessous de la courbe de solubilité, zone dans laquelle le soluté est dissout.
- La zone sursaturée métastable, zone dans laquelle la nucléation est cinétiquement moins favorable que la croissance.
- La zone sursaturée labile, zone dans laquelle la nucléation est spontanée et elle est cinétiquement plus favorable que la croissance.
- La limite entre la zone sursaturée métastable et la zone sursaturée labile est appelée limite de zone métastable (cf. pointillés sur la figure 1).

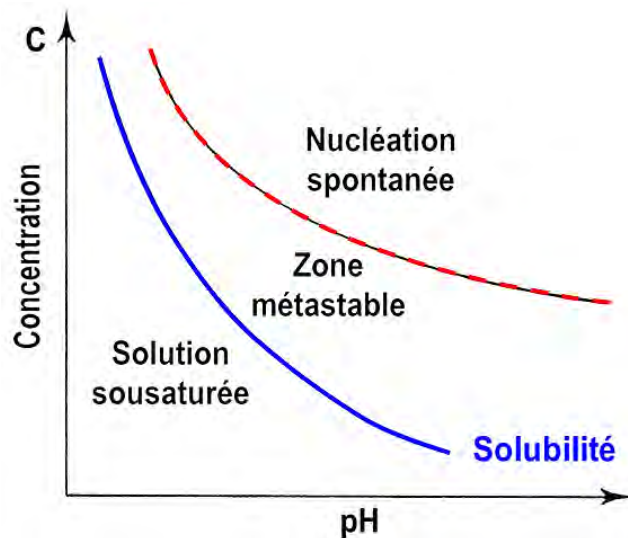


Figure 1 : Diagramme de phase représentant la concentration de soluté en fonction du pH. (Boistelle, 1985)

## 1.2 Nucléation

Comme nous l'avons vu, lorsque la solution est sursaturée, elle est dans un état instable et tend vers l'équilibre en produisant un premier germe ou nucleus. La nucléation apparaît dans un délai plus ou moins grand en fonction des conditions du milieu de croissance: sursaturation, nature et concentration des impuretés ... On rappelle ici quelques définitions des divers mécanismes de nucléation. La nucléation « primaire » survient sans présence des cristaux de la phase à apparaître tandis que la nucléation « secondaire » implique la présence des cristaux de la phase à apparaître dans la solution. La nucléation primaire peut elle-même être homogène (HON, « *Homogeneous Nucleation* ») ou hétérogène (HEN, « *Heterogeneous Nucleation* »). La nucléation primaire homogène implique seulement le solvant et le soluté. Les cristaux germent et poussent en absence d'un substrat. La nucléation primaire hétérogène est induite par la

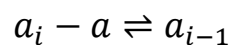
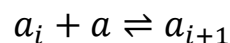
présence d'un substrat étranger, par exemple une impureté ou la paroi du cristalliseur. Ce substrat étranger permet notamment de nucléer à une sursaturation plus faible. Pour éviter l'effet de nucléation hétérogène, on purifie le milieu de cristallisation en filtrant la solution afin de s'affranchir des particules en suspension et on réduit les interactions entre le soluté et les parois du cristalliseur. Dans les deux cas, nucléation primaire homogène ou hétérogène, la première théorie avancée pour décrire la nucléation est la théorie classique de la nucléation. Dans cette thèse, nous nous sommes focalisés sur la nucléation primaire, la nucléation secondaire ne sera pas étudiée.

## 1.2.1 Théorie classique de la nucléation

La théorie classique de la nucléation (TCN) s'apparente au phénomène de condensation d'une goutte liquide à partir d'une phase vapeur. La description thermodynamique de ce processus a été développée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle par Gibbs (Gibbs, 1876, 1878). Cette théorie a été utilisée ensuite pour expliquer la nucléation de cristaux. Dans le cas de la nucléation de cristaux, les molécules de soluté passent de l'état liquide (solution) à l'état solide (cristal).

### 1.2.1.1 TCN pour la nucléation primaire homogène

Dans la solution sursaturée, des fluctuations locales de concentration peuvent donner naissance à des clusters ou embryons de quelques molécules (Boistelle, 1985). Ces clusters sont formés par un mécanisme d'agrégation par addition d'une molécule à la fois, d'après l'hypothèse de base de la TCN. Un embryon contenant  $i$  molécules peut capturer une molécule et arriver à l'embryon  $i+1$ . A l'inverse, cet embryon peut également perdre une molécule et arriver à l'embryon  $i-1$  :



*Équation 3*

Lorsque l'embryon atteint une taille suffisante, il est considéré comme un germe cristallin. Sachant que la naissance d'un germe conduit à la création d'une nouvelle surface et à l'addition de molécules en volume, nous devons considérer la variation d'énergie libre d'une part pour former l'interface solide/liquide ( $\Delta G_s$ ), d'autre part pour la transition de phase liquide/solide ( $\Delta G_v$ ). Ce terme volumique  $\Delta G_v$  est toujours négatif dû à l'énergie qui doit être fournie au système via  $\Delta\mu$ . A l'inverse, la croissance de l'interface solide/liquide implique un terme surfacique  $\Delta G_s$  toujours positif. Ainsi

l'énergie libre d'activation de la nucléation homogène ( $\Delta G_{HON}$ ) est égale à la somme de  $\Delta G_s$  et  $\Delta G_v$ . Ici on écrit  $\Delta G$  nécessaire pour former un germe contenant  $n$  molécules et ayant une surface  $S$  ( $m^2$ ) :

$$\Delta G_{HON} = \Delta G_s + \Delta G_v = S\gamma_{SL} - n(\mu - \mu_s)$$

Équation 4

- $\gamma_{SL}$  : Tension interfaciale de l'interface solide/liquide ( $J/m^2$ )

En considérant un germe sphérique de rayon  $r$ ,  $\Delta G$  devient :

$$\Delta G_{HON} = (4\pi r^2 \times \gamma_{SL}) - \left( \frac{4\pi r^3}{3} \times \frac{kT}{\Omega} \ln\beta \right)$$

Équation 5

- $\Omega$  : volume d'une molécule ( $m^3$ )

A partir de cette équation, nous pouvons tracer l'énergie libre d'activation de la nucléation ou germination  $\Delta G$  en fonction du rayon du germe  $r$  (Figure 2).

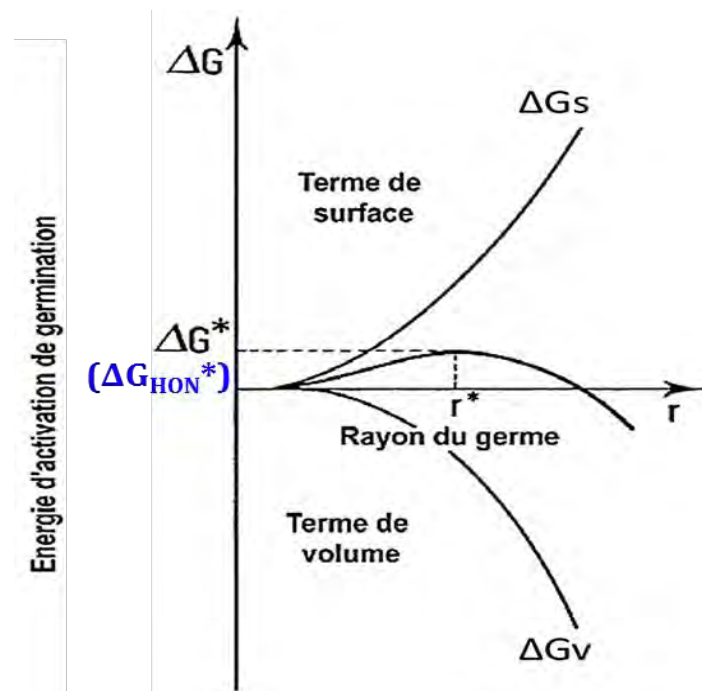


Figure 2. Diagramme de l'énergie libre d'activation de la nucléation en fonction du rayon du germe (Boistelle, 1985).

L'énergie d'activation passe par un maximum ( $\Delta G_{HON}^*$ ) correspondant à un rayon critique ( $r^*$ ). Lorsque  $r < r^*$  le terme surfacique ( $\Delta G_s$ ) domine, ainsi le germe se dissout. Lorsque  $r > r^*$ , en ajoutant une molécule au cristal, l'énergie d'activation est abaissée. Ainsi le germe peut exister et croître jusqu'au cristal. Ce rayon critique correspond à  $d\Delta G_{HON}/dr=0$  et ainsi  $r^*$  et  $\Delta G_{HON}^*$  s'écrivent :

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

Équation 6

$$\Delta G_{HON}^* = \frac{16\pi\Omega^2\gamma_{SL}^3}{3(kT\ln\beta)^2}$$

Équation 7

On voit alors que  $r^*$  diminue avec la température et la sursaturation (Équation 6). Ici on considère le volume d'une molécule  $\Omega$  comme une constante car il est imposé par la matière cristallisée. De plus, la nucléation sera d'autant plus facile que  $r^*$  est faible, car la quantité de matière nécessaire est plus petite. De même, on voit que  $\Delta G_{HON}^*$  (Équation 7) diminue également avec la température et la sursaturation et croît avec la tension interfaciale  $\gamma_{SL}$ .  $\gamma_{SL}$  est donc un paramètre important. En effet, il dépend avant tout de l'affinité du solvant avec le cristal, et est ainsi en liaison avec la solubilité. Plus l'affinité du solvant est grande, plus forte est l'absorption des molécules de solvant sur le cristal et plus  $\gamma_{SL}$  est faible. Le terme  $16\pi/3$  vient de la forme sphérique que nous avons supposée pour le germe. Cependant, les germes ne sont pas toujours parfaitement sphériques.

### 1.2.1.2 TCN pour la nucléation primaire hétérogène

En pratique, on observe dans la plupart des cas une nucléation primaire hétérogène. Puisque le germe se forme sur un substrat, il sera réduit à une calotte sphérique (Figure 3). Et la taille de cette calotte diminue avec l'affinité du germe avec le support.



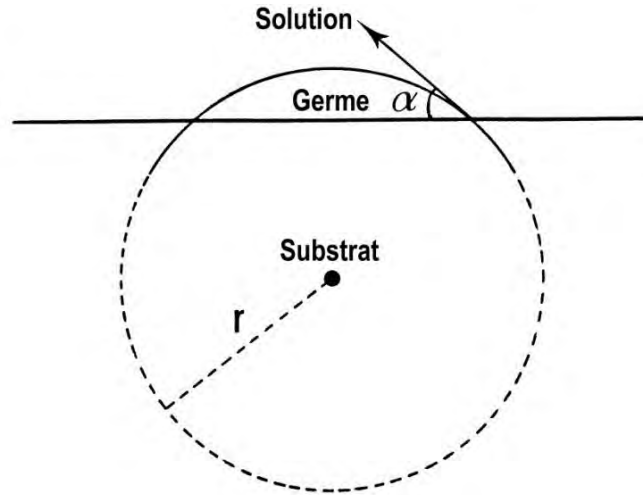


Figure 3. Cas de la nucléation primaire hétérogène d'un germe réalisant un angle de contact  $\alpha$  avec le substrat (Boistelle, 1985).

On voit que le rayon de courbure critique de la calotte sphérique en nucléation hétérogène  $r_{HEN}^*$  est identique au rayon critique en nucléation homogène  $r_{HON}^*$  :

$$r_{HEN}^* = r_{HON}^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT\ln\beta}$$

Équation 8

La différence essentielle entre les deux types de nucléation vient alors du fait que moins de molécules sont nécessaires pour former la calotte sphérique en nucléation hétérogène, par rapport à la sphère complète en nucléation homogène. La présence du substrat ne réduit donc pas le rayon critique mais le nombre critique de molécules. Par conséquent, le seuil d'énergie d'activation en nucléation hétérogène  $\Delta G_{HEN}^*$  est réduit comparé au cas de la nucléation homogène  $\Delta G_{HON}^*$ . En fait,  $\Delta G_{HEN}^*$  est fonction de l'angle de contact  $\alpha$  entre la calotte sphérique et le substrat (Boistelle, 1985). Ainsi on introduit un facteur  $f(\alpha)$ :

$$\Delta G_{HEN}^* = f(\alpha) \times \Delta G_{HON}^* = -f(\alpha) \frac{16\pi\Omega^2\gamma_{SL}^3}{3(kT\ln\beta)^2}$$

$$f(\alpha) = \frac{1}{2} - \frac{3}{4}\alpha + \frac{1}{4}\cos^3 \alpha$$

Équation 9

Le facteur  $f(\alpha)$  peut être généralisé aux différentes formes du germe dues à la forme du substrat (Fletcher, 1958), (Kashchiev, 2000a, Liu, 2000) . Ainsi  $\alpha=180^\circ$  correspond à la nucléation homogène (Figure 4a), d'où  $f(\alpha)=1$  et  $\Delta G_{HEN}^* = \Delta G_{HON}^*$ .  $\alpha=90^\circ$  correspond à une calotte demi-sphérique (Figure 4b) avec  $f(\alpha)=1/2$  et  $\Delta G_{HEN}^* = \Delta G_{HON}^*/2$ . Lorsque  $\alpha$  tend vers 0 (Figure 4c), l'affinité germe/substrat est « parfaite » (mouillage complet). Le facteur  $f(\alpha)$  tend alors vers 0 et la nucléation est appelée entartrage (Figure 5). Pour conclure,  $f(\alpha)$  représente la partie thermodynamique de l'effet catalytique du substrat sur la nucléation. En diminuant  $f(\alpha)$ , "le support catalyse de plus en plus la nucléation en abaissant la barrière énergétique mise en jeu" (Veesler, 2005).

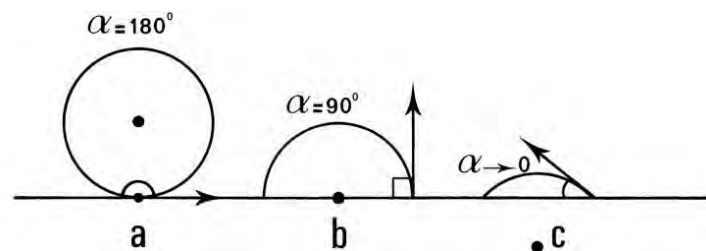


Figure 4. Trois cas de l'angle de contact  $\alpha$  entre le germe et le substrat. (a)  $180^\circ$ , (b)  $90^\circ$ , (c)  $\alpha$  tend vers  $0^\circ$ .

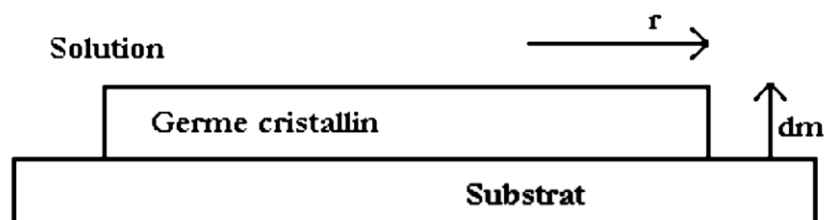


Figure 5. Nucléation d'un germe d'entartrage sur un substrat. (Kashchiev & van Rosmalen, 2003)

En pratique, une tension interfaciale effective  $\gamma_{eff}$  dépendant de  $f(\alpha)$  est introduite (Kashchiev, 2000b) :

$$\gamma_{eff} = f(\alpha)^{1/3} \times \gamma_{SL}$$

Équation 10

L'énergie libre d'activation de la nucléation primaire s'écrit alors,

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

Équation 11

En fait,  $\gamma_{\text{eff}}$  tient compte des deux types de nucléation primaire, homogène et hétérogène. Elle tient également compte de tous les types d'hétérogénéité pouvant exister : poussières, bulles, paroi du cristalliseur, interfaces liquide-liquide ou liquide-air, ... (Ildefonso *et al.*, 2013). Ainsi pour réduire les hétérogénéités, la purification du milieu ainsi que le choix du matériel (solvants, cristalliseur) sont importants.

### 1.2.1.3 Cinétique de nucléation

La cinétique de nucléation joue un rôle prédominant sur le nombre, la taille et la phase des cristaux, donc sur le contrôle de la qualité des cristaux. Cette cinétique est caractérisée par la fréquence de nucléation  $J$ .

#### 1.2.1.3.1 Fréquence de nucléation $J$

La fréquence de nucléation  $J$  représente le nombre de cristaux qui se forment dans la solution sursaturée par unité de volume et par unité de temps :

$$J = \frac{n}{V \times \Delta t}$$

Équation 12

- $J$  : fréquence de nucléation (nombre de cristaux.mL<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)
- $n$  : nombre de cristaux nucléés dans la solution
- $V$  : volume de la solution (mL)
- $\Delta t$  : temps de nucléation (s)

Cette fréquence de nucléation peut être exprimée thermodynamiquement sous la forme de la loi d'Arrhenius :

$$J = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right)$$

Équation 13

Cependant un système de nucléation parfaitement homogène existe rarement en solution, même si le milieu et les molécules sont bien purifiés (Laval *et al.*, 2009, Ildefonso *et al.*, 2013). En réalité, on est généralement en présence d'une nucléation hétérogène liée aux différentes hétérogénéités dans la solution. Cette diversité complique ainsi les études de cinétique de nucléation (Kashchiev *et al.*, 1998). Ainsi pour

caractériser la fréquence de nucléation expérimentale, on peut utiliser l'expression de  $\Delta G_{HEN}^*$  utilisée dans l'équation 9,

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

Équation 14

On peut également écrire la fréquence de nucléation expérimentale  $J_{exp}$  autrement en invoquant la tension interfaciale effective  $\gamma_{eff}$  (Équation 10), pour tenir compte de toutes les hétérogénéités :

$$J_{exp} = K_0 \exp\left(-\frac{16\pi\Omega^2\gamma_{eff}^3}{3(kT)^3(\ln\beta)^2}\right) = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta G_{eff}^*}{kT}\right)$$

Équation 15

$K_0$  est un facteur cinétique qui est relié au taux d'attachement des molécules sur le germe critique. Ainsi il dépend de la mobilité moléculaire dans le système cristal/solution. Plus la matière est soluble, plus  $K_0$  est faible. La valeur théorique de  $K_0$  est généralement entre  $10^5$  et  $10^{25} \text{ cm}^{-3}\text{s}^{-1}$  (Boistelle, 1985). De plus, la fréquence de nucléation augmente avec la température car les molécules sont plus mobiles et donc plus susceptibles de se rencontrer. De même, la fréquence de nucléation augmente avec la sursaturation  $\beta$  car la probabilité que les molécules se rencontrent croît avec leur nombre.

D'après l'équation 12, une bonne méthode expérimentale pour mesurer  $J$  est de compter le nombre de germes apparus pendant un temps donné en fonction de la sursaturation. C'est la méthode dite du « double pulse ». Le principe de cette méthode est de compter le nombre de cristaux ayant nucléé dans la zone sursaturée labile (à une température donnée) durant un temps donné. Pour cela on prépare une solution de soluté à cristalliser, on débute l'expérience à une température supérieure à la température de solubilité (Figure 6a, point 0). Puis on abaisse la température jusqu'à une température qu'on appelle température de nucléation  $T_N$  (Figure 6a, point 1), qui se situe autour de la limite de la zone métastable. On laisse la solution à cette température pendant un temps précis déterminé  $\Delta t$ , puis on augmente la température, jusqu'à une température qu'on appelle température de croissance  $T_C$  (Figure 6a, point 2) qui se situe au sein de la zone métastable, proche de la courbe de solubilité. A cette température, il n'y a plus de nucléation, mais par contre les cristaux qui ont nucléé à la température de nucléation croissent. On maintient la solution à cette température jusqu'à ce que les

cristaux aient suffisamment cru pour qu'on puisse les observer. Finalement,  $J$  est mesurée en comptant le nombre de cristaux en fonction de  $\Delta t$ . Et le report de  $\ln J$  en fonction de  $1/\ln^2 \beta$  doit donner une droite. De cette représentation, on peut déduire  $K_0$  et  $\gamma_{eff}$  (Équation 15).

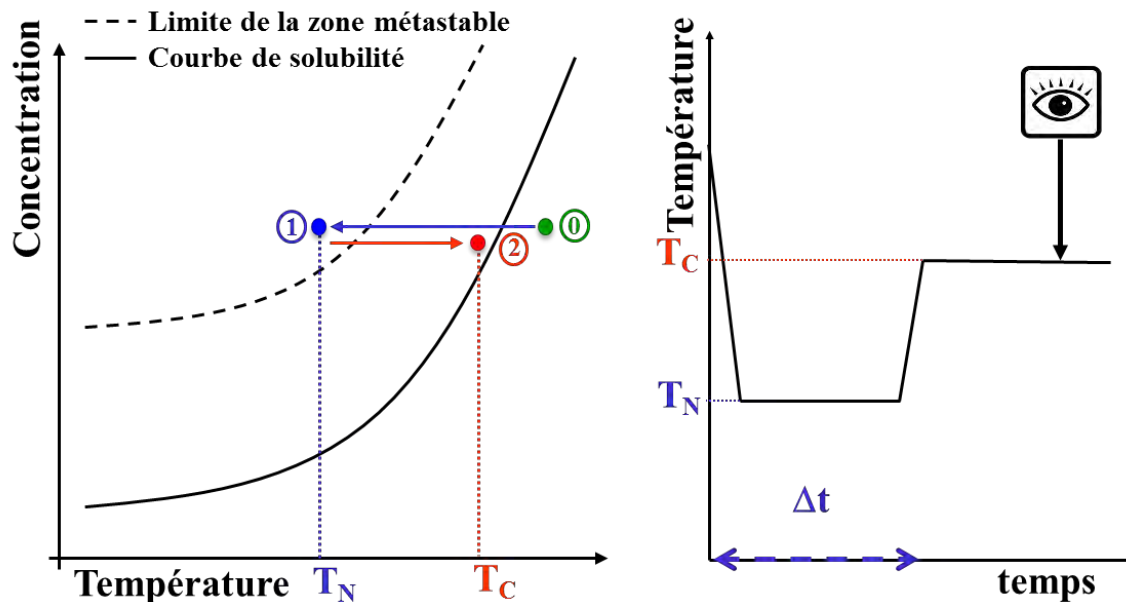


Figure 6. Principe de la méthode de « double pulse ». (a) chemin expérimental dans le diagramme de phase, (b) profil de température pendant l'expérience de nucléation.

### 1.2.1.3.2 Temps d'induction de la nucléation $t_N$

Une autre approche est de mesurer le temps entre l'établissement de la sursaturation et la formation du premier germe, i.e. le temps d'induction de la nucléation  $t_N$ . Généralement, ce temps d'induction de la nucléation est la somme du temps transitoire nécessaire pour atteindre un état stable de la nucléation, du temps de nucléation et du temps requis pour que le germe critique atteigne une taille détectable.  $t_N$  est mesuré par l'observation du premier cristal ou par le changement des propriétés physiques de la solution (diffusion de la lumière, diffusion des rayons X aux petits angles, mesure de la turbidité de solution, mesure de l'indice de réfraction, etc...).

Pour exprimer  $t_N$ , l'équation 16 permet d'abord de déduire  $\Delta t$ , le temps de nucléation de  $n$  cristaux:

$$\Delta t = \frac{n}{J \times V}$$

Équation 16

Ainsi  $t_N$  s'écrit pour 1 cristal:

$$t_N = \frac{1}{J \times V}$$

Équation 17

Conformément au comportement de  $J$ ,  $t_N$  dépend des variables dominant la fréquence de nucléation  $J$  ( $\beta$ ,  $T$ ,  $\gamma_{eff}...$ ) ainsi que du volume du cristalliseur. Pour mieux comprendre le rôle de la sursaturation sur  $J$  et  $t_N$ , Boistelle a calculé  $J$  et  $t_N$  en utilisant des valeurs moyennes des paramètres dans l'équation 14 :  $K_0 = 10^{20} \text{ cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $\Omega = 2,5 \cdot 10^{-22} \text{ cm}^3$ ,  $T = 295\text{K}$  ( $20^\circ\text{C}$ ),  $\gamma_{eff} = 62,14 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $k = 1,38 \cdot 10^{-16} \text{ erg} \cdot \text{K}^{-1}$  (Boistelle, 1985)<sup>1</sup>. Il obtient alors une expression de  $J$  qui ne dépend que de  $\beta$ :  $J = 10^{20} \times \exp(-222/\ln^2\beta)$ . Les résultats de  $J$  et  $t_N$  en fonction de différents  $\beta$  sont représentés dans le *tableau 1*. Lorsque  $\beta = 4$ ,  $t_N$  est extrêmement long ( $4,7 \cdot 10^{22}$  années) tandis qu'à  $\beta = 8$ ,  $t_N$  n'est que de 3,3 minutes. Ainsi il est nécessaire d'avoir une sursaturation assez grande pour obtenir une nucléation spontanée. Par contre, des valeurs faibles de  $\beta$  correspondent à la zone métastable, qui peut être « réduite » en ajoutant une agitation, un ensemencement, des agents de cristallisation ou un champ externe.

$\beta$	4,0	6,0	7,0	8,0	9,0	12
$J(\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1})$	$6,8 \cdot 10^{-31}$	$9,3 \cdot 10^{-11}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	1,1	$2,4 \cdot 10^4$
$t_N$	$4,7 \cdot 10^{22}$ années	348,8 années	3,4 jours	3,3 mins	0,9 s	$4,1 \cdot 10^{-5}$ s

*Tableau 1. Calcul des  $J$  et des  $t_N$  par  $\text{cm}^3$  de solution utilisant des valeurs typiques pour les paramètres de l'équation 15. (Boistelle, 1985)*

Par ailleurs, pour une valeur de  $\beta$  et donc de  $J$  donnée, plus le volume du cristalliseur est réduit, plus le temps à attendre pour voir les premiers germes apparaître est long d'après l'équation 17. Ainsi, étudier la nucléation dans un système microfluidique (volumes de l'ordre du nanolitre) nécessite de générer des sursaturations élevées pour obtenir des  $t_N$  raisonnables.

---

<sup>1</sup>  $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2} = \text{mJ} \cdot \text{m}^{-2}$

### 1.2.1.4 Stochasticité de la nucléation et analyse des données expérimentales

Le nombre de cristaux dans un cristalliseur de volume donné est une variable aléatoire du fait de la stochasticité de la nucléation. Cette stochasticité est due au fait de la diversité des hétérogénéités et des fluctuations locales de concentration. Ainsi, une expérience de nucléation donnée que l'on répète plusieurs fois dans les mêmes conditions (composition chimique, volume de cristalliseur) peut aboutir à zéro, un ou plusieurs cristaux. Par conséquent quel est le nombre représentatif d'expériences à mener pour étudier la nucléation ?

Dans cette thèse, les gouttes générées par le système microfluidique sont autant de cristalliseurs (60nL-1μL) monodispersés dans lesquels nous pouvons réaliser un grand nombre d'expériences statistiquement indépendantes. Nous pouvons alors comparer la distribution des résultats expérimentaux avec la loi de Poisson (Galkin & Vekilov, 1999),

$$P(n) = \frac{m^n}{n!} \exp(-m)$$

*Équation 18*

- $n$  : Nombre de cristaux apparaissant dans un volume  $V$  pour un temps de nucléation  $\Delta t$  ;
- $P(n)$  : Possibilité de l'observation de  $n$  cristaux ;
- $m$  : Valeur moyenne de distribution c'est-à-dire le nombre moyen des cristaux observés lors de l'expérience.

Pour évaluer la correspondance entre les données expérimentales et la loi de Poisson nous calculons le paramètre  $\chi^2$  (Young, 1962) :

$$\chi^2 = \sum_N \frac{[F_n - P(n)N_{exp}]^2}{P(n)N_{exp}}$$

*Équation 19*

- $F_n$  : Fréquences mesurées ;
- $P(n)$  : Valeurs de Poisson les mieux adaptées ;
- $N_{exp}$  : Nombre d'expériences.

Pour une distribution de Poisson, la déviation des données mesurées avec les vraies valeurs est caractérisée par le ratio  $\sqrt{n/N_{exp}}$ . Ainsi pour obtenir un cristal par goutte en moyenne, la déviation sera 14%, 10% et 5% pour relativement 50, 100 et 400 expériences (gouttes). Dans notre cas de cristallisation en microfluidique, une déviation

de 10% avec 100 expériences est acceptable. Dans nos expériences, nous avons choisi un compromis avec 50-100 gouttes par condition.

Le terme de “*fraction of drops not frozen at time  $\Delta t$* ” est utilisé pour décrire la proportion des gouttes non-cristallisées parmi toutes les gouttes au bout du temps  $\Delta t$  (Knezic *et al.*, 2004). Cette fraction peut aussi décrire la probabilité qu’un volume ne contienne pas de cristaux au temps  $\Delta t$ . Elle se déduit de  $J$  par :

$$\frac{Q}{Q_0} = \exp(-JV\Delta t)$$

*Équation 20*

- $Q$ : nombre de gouttes non-cristallisées
- $Q_0$ : nombre de gouttes total.

### 1.2.1.5 « Défauts » de la TCN

La théorie classique de nucléation (TCN) est basée sur quelques hypothèses principales qui ont pour but de simplifier la description du processus mais qui en même temps en limitent les applications (Erdemir *et al.*, 2009). Ces hypothèses sont:

- 1) La TCN suppose que l’orientation des molécules dans un agrégat est identique avec celle présente dans un cristal macroscopique.
- 2) La TCN néglige le fait que la tension interfaciale  $\gamma$  dépende de la taille du cluster. En effet, la TCN considère que  $\gamma$  à la surface d’un nano-germe est identique à celle d’un macro-cristal même si  $\gamma$  n’a pas beaucoup de sens pour des nano-germes par rapport aux macro-cristaux (Mullin, 2001).
- 3) Dans le cas de la nucléation en solution, deux paramètres interviennent lors de la transition de phase solution-germe, la densité et l’ordre de la structure. Cependant la TCN considère que la transition n’est conduite que par la densité, l’ordre de la structure intervenant simultanément avec la densité: les agrégats se condensent et s’arrangent en même temps dans un réseau ordonné.
- 4) La TCN suppose que la croissance des agrégats a lieu par addition d’une seule molécule à la fois. Mais en réalité, il peut exister des agrégations successives des unités de croissance préassemblées (*Équation 21*): deux agrégats contenant plus qu’une molécule peuvent fusionner dû aux collisions entre eux. De même, un agrégat peut être divisé en deux ou plusieurs plus petits agrégats.



$$a_{c-m} + a_m \rightleftharpoons a_c$$

Équation 21

L'application de la TCN est donc limitée dans l'étude de cas réel. Par exemple, la TCN décrit une fréquence de nucléation stationnaire sous la condition que la distribution de la taille des germes ne change pas au cours du temps. Ainsi le nombre de germes augmente de façon linéaire (Drenth & Haas, 1998). Cette hypothèse n'est pas valide au début de la nucléation car un certain temps est nécessaire pour établir la distribution stable des agrégats sous-critiques, appelé le temps de transition (Knezic *et al.*, 2004). Récemment, une série de théories, de simulations et d'études expérimentales ont suggéré un mécanisme alternatif de la nucléation, où les fluctuations de structure suivent les fluctuations de densité. Cette théorie est appelée la nucléation en deux étapes (« *two-step nucleation* », 2SN), qui est discutée en détail dans la partie suivante.

## 1.2.2 Nucléation en deux étapes

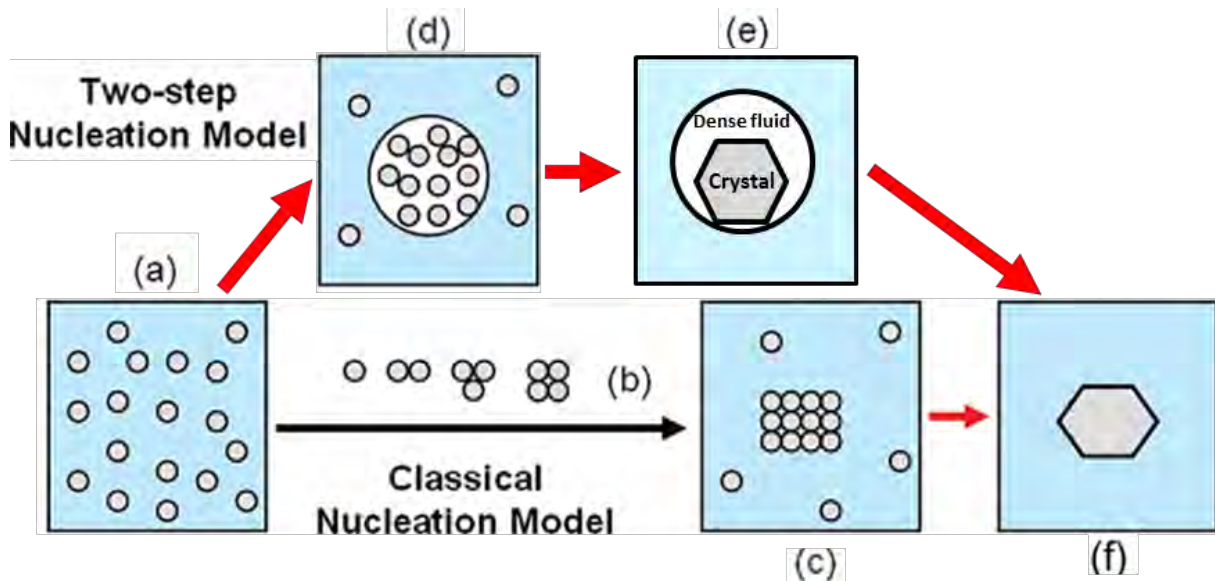
Dans le cas de l'étude de la nucléation des macromolécules biologiques (e.g. les protéines), les interactions moléculaires sont complexes dues à la distance effective d'interaction plus courte que la taille des molécules (Asherie *et al.*, 1996) et à l'anisotropie des interactions intermoléculaires. Du fait de cette complexité, les concepts classiques de cinétique de nucléation sont difficiles à vérifier expérimentalement lors de l'étude de la nucléation des protéines (Knezic *et al.*, 2004). Récemment, des travaux théoriques et de simulation ont proposé un mécanisme alternatif pour la nucléation : la nucléation en deux étapes (« 2-Step Nucleation », 2SN), dont une étape cruciale est la formation d'une phase dense liquide dans la solution (analogie avec la séparation de phase liquide-liquide, dans la littérature le terme « liquid-like » est employé).

L'un des soutiens importants pour le mécanisme de 2SN vient des études théoriques de Ten Wolde et Frenkel (Wolde & Frenkel, 1997). En utilisant la méthode Monte Carlo, ils ont étudié la nucléation homogène avec un modèle Lennard-Jones d'interactions à courtes portées (e.g. le système des protéines) et ils ont observé qu'autour du point critique<sup>2</sup> de la séparation de phase liquide-liquide ( $T > T_c$  ou  $T < T_c$ ), les fluctuations de concentration sont importantes ce qui conduit à un changement de

---

<sup>2</sup> Dans un diagramme de phases d'un système binaire, le point critique (à la concentration critique  $C_c$  et la température critique  $T_c$ ) est atteint lorsque la courbe de décomposition spinodale rencontre la courbe binodale de coexistence.

trajectoire de la nucléation. La nucléation n'est alors plus un changement d'état réalisé en une seule étape, comme décrite dans la théorie classique de la nucléation, mais en deux étapes (*Figure 7*).

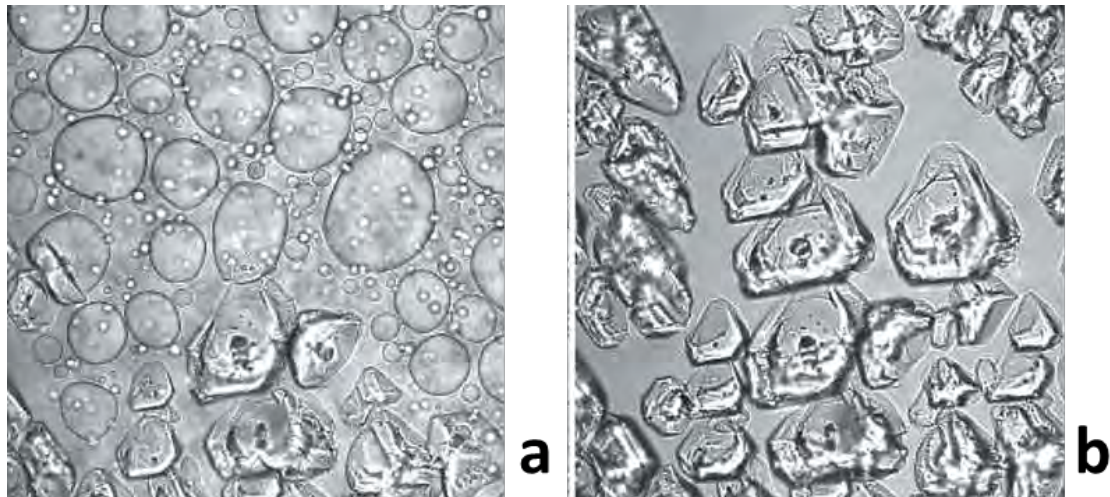


*Figure 7. Deux mécanismes de nucléation, la TCN et la 2SN. (a) → (b) → (c) → (f): chemin de la TCN, (a) → (d) → (e) → (f): chemin de la 2SN. (a) solution sursaturée; (b) agrégat ordonné des molécules de soluté; (c) germe cristallin dans la solution; (d) goutte liquide riche en soluté; (e) germe cristallin né à l'intérieur de la goutte et dont la surface est mouillée par le liquide dense; (f) cristal. Cette figure est développée à partir du travail d'Erdemir et al. (Erdemir et al., 2009)*

La première étape consiste en la formation d'une goutte liquide ou d'un domaine riche en soluté à cause des fluctuations de densité et des agrégations rapides des molécules (*Figure 7d*). Ces gouttes de liquide denses sont un état métastable par rapport à la phase cristalline. Dans cette étape, l'arrangement des molécules dans la goutte dense est désordonné. Ensuite, dans la deuxième étape un germe cristallin est formé à l'intérieur de la goutte dense et la surface du cristal est mouillée par ce liquide dense (*Figure 7e*).

Les simulations de Frenkel *et al.* (Wolde & Frenkel, 1997) montrent que  $\gamma_{SL}$  entre le cristal et la solution dense est beaucoup plus faible que  $\gamma_{SL}$  dans le cas d'un germe cristallin né dans la solution de cristallisation (sans liquide dense). Ainsi, l'énergie libre d'activation de la nucléation est plus petite que celle qui serait estimée par la TCN, et par conséquent la fréquence de nucléation est augmentée de plusieurs ordres de grandeur.

La théorie de la nucléation en deux étapes a été étudiée en utilisant de nombreuses techniques de caractérisation en solution comme la diffusion dynamique ou statique de la lumière (« *Dynamic light scattering* », DLS ou « *Static light scattering* », SLS) (Georgalis *et al.*, 1997), la diffusion de RX aux petits angles (« *Small-angle X-ray scattering* », SAXS) (Pontoni *et al.*, 2004), et la calorimétrie différentielle à balayage (« *Differential scanning calorimetry* », DSC) (Igarashi *et al.*, 2006). Parmi ces études expérimentales, Vivarès *et al.* ont observé une séparation de phase liquide-liquide métastable (« *liquid-liquid phase separation* », LLPS) au cours de la cristallisation de l'isomérase de glucose dans une solution aqueuse de PEG 10000 (Vivares *et al.*, 2005). Au-delà du point critique liquide-liquide ( $T > T_c$ ), 30 minutes après avoir mélangé l'isomérase de glucose et le PEG 10000, la solution devient trouble et ressemble à une émulsion avec des gouttes riches en soluté visible sous microscope optique (*Figure 8a*). Ensuite, la nucléation et la croissance des cristaux sont observées à l'intérieur de ces gouttes denses (*Figure 8b*). La nucléation est favorisée dans ces gouttes denses due à la limite de diffusion négligeable, au mouillage de la surface cristalline par la solution et à la richesse en protéine.



*Figure 8. (a) Séparation de phase liquide-liquide, observée au cours de la cristallisation de l'isomérase de glucose dans une solution de PEG 10000, donnant des gouttes liquides riches en protéine. (b) Cristaux nés à l'intérieur des gouttes denses. (Vivares *et al.*, 2005)*

Cependant, d'autres études ont montré le contraire. Dans le cas du lysozyme et du BPTI (Grouazel *et al.*, 2006), la nucléation est entravée par la phase métastable de liquide riche en soluté. Cela est aussi observé pour quelques molécules organiques (Lafferrère *et al.*, 2004, Veesler *et al.*, 2003). En fait, la nucléation est favorisée au-dessus de la température de transition liquide-liquide  $T_{L-L}$  tandis qu'elle est ralentie dans la phase liquide riche en protéine (Vekilov, 2004). En phase liquide riche en protéine, les protéines ne sont pas agrégées mais la solution ressemble à un gel dont la viscosité serait importante et la diffusivité serait faible comme dans la phase solide. La nucléation

du lysozyme est ainsi réduite par la diminution considérable de la diffusion de matière (Evans *et al.*, 1997).

La cinétique de la 2SN peut être limitée soit par la première étape de génération des gouttes denses soit par la deuxième étape de nucléation à l'intérieur des gouttes denses. Récemment, il a été prouvé que la fréquence de nucléation en deux étapes était limitée par la deuxième étape car la fréquence de nucléation est 8-10 fois plus faible que la fréquence de formation des gouttes denses (Filobelo *et al.*, 2005).

Pour conclure, les deux théories TCN et 2SN coexistent pour expliquer la formation de germes au sein de la solution et font actuellement l'objet d'intenses débats dans la communauté scientifique (Cf. Faraday Discussion : Nucleation - A Transition State to the Directed Assembly of Materials, 30 mars, 2015). Cependant, la TCN est majoritairement utilisée pour interpréter les résultats d'expériences dans la littérature.

La nucléation est une étape clé dans le contrôle des propriétés des cristaux dont l'une des plus importantes est le polymorphisme. Ci-après, on va introduire la notion du polymorphisme ainsi que le rôle de polymorphisme dans les propriétés des cristaux.

## 1.3 Polymorphisme, Transitions de phase

Quand on parle d'une structure cristalline ou d'une phase cristalline, il s'agit de l'arrangement interne des atomes, des ions ou des molécules dans un réseau cristallin. Une espèce chimique peut présenter plusieurs phases cristallines dont les compositions chimiques sont strictement les mêmes. Ces diverses phases cristallines sont appelées des polymorphes et cette diversité de structure cristalline est appelée le polymorphisme. Le phénomène de polymorphisme a été découvert en 1788 par Klaproth, par la mise en évidence de l'existence des formes calcite et aragonite du carbonate de calcium. La découverte de nouveaux polymorphes ne s'arrête jamais sachant que plus on cherche des polymorphes, plus on risque d'en trouver car comme dit McCrone: « *every compound has different polymorphic forms and that, in general, the number of forms known for a given compound is proportional to the time and money spent in research on that compound* » (McCrone, 1965).

D'un point de vue thermodynamique, à une pression et une température donnée, il n'existe qu'une phase stable correspondant à l'énergie libre minimale du système. Les autres phases sont donc métastables, comme par exemple le diamant qui est une phase métastable du carbone. Il est possible que la phase métastable cristallise avant la phase stable, mais, théoriquement, la phase métastable se transformera en une phase stable à

la fin de la cristallisation. Cette transition peut être infiniment lente ou relativement rapide suivant les systèmes. Cependant, il est difficile de prédire quelle phase sera produite dans un procédé donné. De plus une petite variation de température peut entraîner la transition de phase.

Les propriétés physiques des cristaux varient d'un polymorphe à l'autre, telles que la solubilité, la densité, la capacité thermique, le point de fusion, la conductivité thermique, l'activité optique, etc. Le polymorphisme présente alors un enjeu important dans les applications pharmaceutiques. En effet les différents polymorphes n'ont pas les mêmes solubilités et les mêmes vitesses de dissolution: certains polymorphes se dissolvent trop lentement perdant tout intérêt, alors que d'autres formes se transforment en poison car elles se dissolvent trop vite. Ainsi le polymorphisme est étudié particulièrement pour assurer la biodisponibilité du principe actif. Le contrôle du polymorphisme commence par un protocole rationnel pour cribler les conditions de cristallisation et obtenir le polymorphe souhaité. Une fois ce polymorphe obtenu, il est nécessaire d'empêcher toute transition de phase.

## 1.4 Croissance Cristalline

Une fois que le germe a atteint la taille critique, il peut grandir par intégration des molécules de soluté jusqu'à atteindre un macro-cristal. Cette étape est appelée la croissance cristalline. La croissance cristalline peut être décrite par le changement de taille du cristal dans une dimension au cours du temps, donné par la vitesse de croissance linéaire. Les applications en cristallisation s'intéressent en général plutôt à la cinétique de la croissance des cristaux car elle est reliée à leurs propriétés (e.g. faciès, taille des cristaux, distribution de taille).

Un cristal est limité par l'ensemble de ses faces cristallines. L'ensemble des faces qui se déduisent les unes des autres grâce aux éléments de symétrie du cristal constitue une forme. Une autre notion importante est la morphologie des cristaux qui est représentée par l'ensemble des faces cristallines. Normalement, la notion de morphologie ne contient pas tout à fait la notion de forme extérieure du cristal. Celle-ci est donnée par le faciès. Le faciès cristallin est l'aspect extérieur (ou la forme extérieure) des cristaux qui est déterminé par les vitesses relatives de croissance des faces entre elles. La *figure 9* représente trois exemples de cristaux qui présentent les mêmes faces cristallines mais des faciès différents, dus aux vitesses de croissance différentes. Au cours de la cristallisation, les faces qui ont une vitesse de croissance importante poussent rapidement et disparaissent, alors que la forme de croissance du cristal ne comporte que les faces dont la cinétique de croissance est la plus lente. Les faciès cristallins peuvent être fortement influencés par le milieu de croissance, la présence

d'impuretés, et particulièrement la sursaturation au cours de la cristallisation. De plus, les faciès cristallins obtenus ont un grand effet sur les propriétés de la suspension et du produit sec, comme sur les propriétés rhéologiques de la suspension, l'efficacité de la filtration ou de la centrifugation, la masse volumique apparente du solide et les propriétés des fluides.

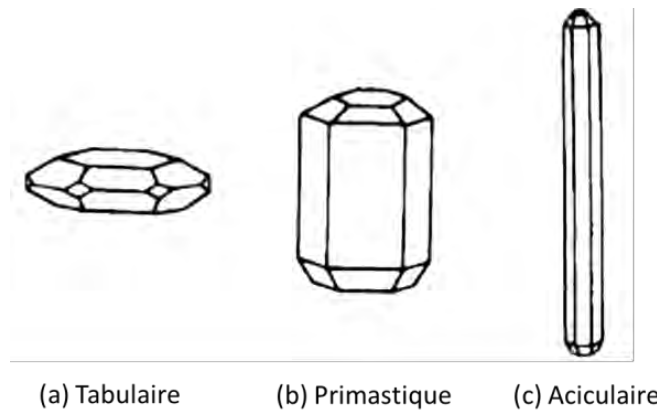


Figure 9. Différents faciès cristallins dus aux différentes vitesses de croissance des faces.

## 1.5 Mûrissement, Arrêt de la cristallisation

Dans un système fermé, lorsque la nucléation et la croissance ont lieu, la sursaturation de la solution diminue progressivement en entraînant une diminution de la cinétique de cristallisation. Le système se déplace vers un équilibre cristal/solution en conservant les cristaux stables, c'est-à-dire qu'il ne s'y passe ni nucléation, ni croissance ni dissolution. Dans les sections précédentes, nous avons vu comment un cristal naissait (nucléation), grandissait (croissance) et éventuellement se transformait en une autre forme (transitions de phase). Dans la partie suivante, nous décrivons la disparition ou la mort des cristaux.

### 1.5.1 Mûrissement d'Ostwald

Dans un système fermé, la sursaturation de la solution diminue progressivement au cours de la nucléation et de la croissance. Par conséquent, les cristaux, qui ne sont pas nés en même temps, ont grandi sous différentes sursaturations. La solution contient alors un grand nombre de cristaux de tailles différentes. Le système n'est pas à l'équilibre car chaque cristal ne répond pas à la condition d'une valeur minimale de l'énergie interfaciale. Cet écart à l'équilibre thermodynamique conduit à la recristallisation. Ainsi, les petits cristaux disparaissent et les grands cristaux croissent

(Figure 10). Ce mécanisme est appelé le mûrissement d'Ostwald et il a pour effet de diminuer le nombre des cristaux et augmenter la taille des cristaux.

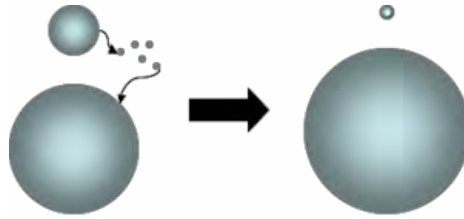


Figure 10. Schéma du mécanisme de Mûrissement d'Ostwald

Pour un germe de rayon  $r$  petit (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ), on peut réécrire l'équation 6 sous la forme :

$$C_r = C_s \left( 1 + \frac{2\Omega\gamma}{kTr} \right)$$

Équation 22

$C_r$  et  $C_s$  sont les concentrations d'équilibre en présence d'un cristal de taille  $r$  et d'un cristal de taille infinie, respectivement.  $C_r$  et  $C_s$  sont donc les solubilités de ces cristaux en solution. D'après cette équation, plus le germe est petit, plus sa solubilité est grande par rapport à  $C_s$ , on parle de sursolubilité des petits cristaux. Par conséquent, un cristal de petite taille demandera une solution très sursaturée par rapport à un cristal de taille plus grande pour être stable sans se dissoudre. Boistelle a suggéré l'exemple d'une solution qui est globalement à la concentration d'équilibre  $C_s$  et dans laquelle se trouvent deux cristaux de rayons  $r_1$  et  $r$  tels que  $r_1 < r$  (Figure 11) (Boistelle, 1985). Chacun de ces deux cristaux est couvert par un halo de solution, respectivement à la concentration  $C_r$  et  $C_{r_1}$ . D'après l'équation 22,  $C_{r_1}$  est obligatoirement supérieur à  $C_r$ .

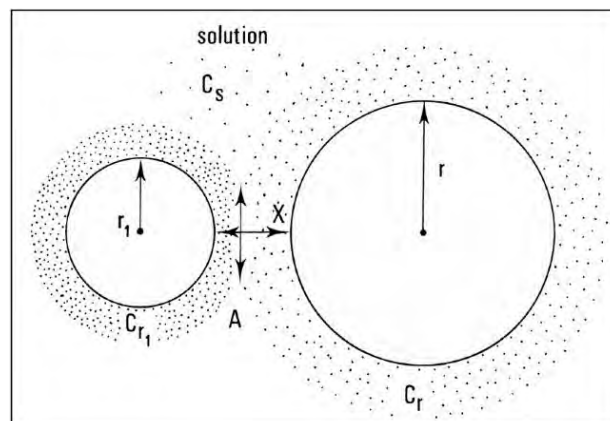


Figure 11. Schéma représentatif du gradient de concentration entre deux cristaux de taille  $r_1$  et  $r$  ( $r_1 < r$ ), dans une solution de concentration  $C_s$ . (Boistelle, 1985)

On écrit le gradient de concentration entre les deux cristaux par:

$$C_{r_1} - C_r = \frac{2\Omega\gamma}{kT} \left( \frac{1}{r_1} - \frac{1}{r} \right)$$

Équation 23

Ainsi, le mécanisme du mûrissement d'Ostwald, dans cet exemple, est dû à la seule diffusion volumique des molécules de soluté du cristal  $r_1$  vers le cristal  $r$  (Boistelle, 1985). On dit que les molécules de soluté libérées par la dissolution d'un petit cristal seront immédiatement récupérées par un cristal voisin mais plus gros qui en profitera pour croître (*Figure 10*). Finalement, les gros cristaux auront « mangé » les petits.

## 1.5.2 Mûrissement cinétique

Vu que les cinétiques de dissolution et de croissance sont faibles au voisinage de la solubilité dans le cas de la cristallisation de protéine, le mûrissement d'Ostwald n'est pas souvent observé, ou alors il faut attendre plusieurs heures. Le mûrissement peut être activé par la température : c'est la méthode du mûrissement cinétique (Boistelle *et al.*, 1992). Les fluctuations de température autour de la température d'équilibre vont accélérer la dissolution des cristaux, les plus petits se dissolvant plus rapidement que les gros. Cette méthode est aussi applicable pour les précipités. La *figure 12* représente le processus de mûrissement cinétique des cristaux d' $\alpha$ -amylase dans les expériences avec une distribution large de tailles des cristaux (*Figure 12a*), observé par Astier et Veessler. Dans la première étape, la température est augmentée de quelques degrés pour se placer en sousaturation. Les petits cristaux ainsi que les grands commencent à se dissoudre (*Figure 12b*). Cependant, ayant très peu de matière à transférer, les petits cristaux vont se dissoudre plus vite et le processus est arrêté avant la dissolution complète des plus grands cristaux par diminution de température dans la deuxième étape. A la fin, les grands cristaux croissent et sont facettés (*Figure 12c*). Cette procédure peut également être appliquée pour éliminer un macro-défaut dans les cristaux maclés (*Figure 12d-f*).



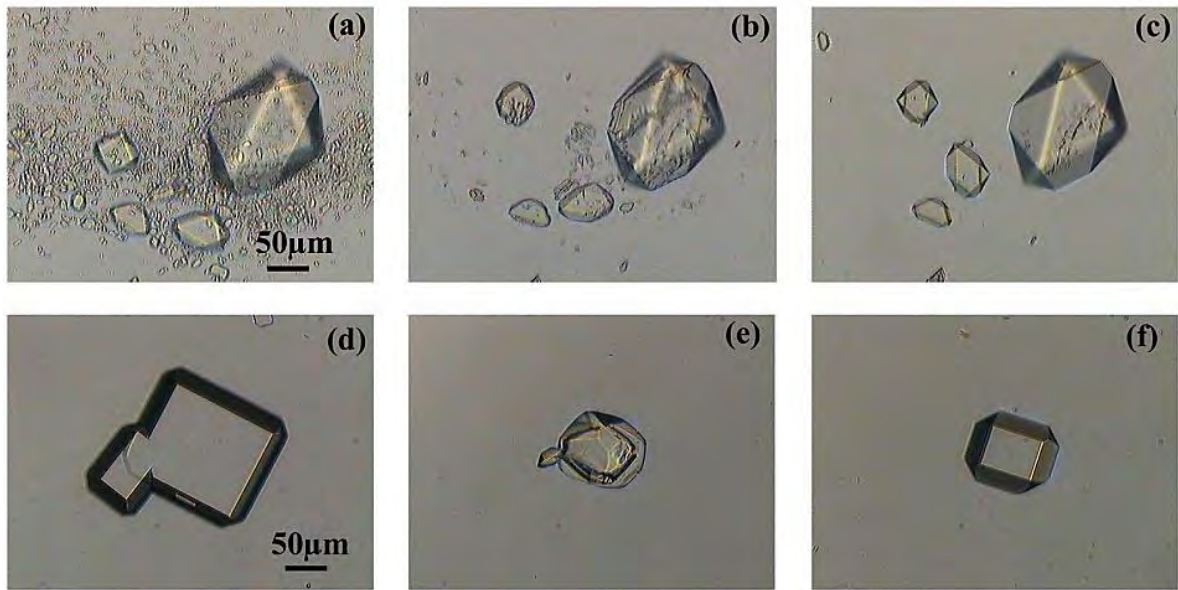


Figure 12. Mûrissement cinétique du polymorphe B des cristaux de l' $\alpha$ -amylase. (a)  $\rightarrow$  (b) Dissolution partielle, (c) ré-croissance. Elimination d'un macro-défaut dans les cristaux maclés par dissolution (d)  $\rightarrow$  (e) et croissance (e)  $\rightarrow$  (f). (Astier & Veessler, 2008)

# **Chapitre 2. Cristallisation en Microfluidique**

La microfluidique fait référence à l'ensemble des technologies qui permettent de contrôler et de manipuler des écoulements à une échelle submillimétrique. La microfluidique permet ainsi de réaliser des réactions dans des gouttes de volume de l'ordre du nanolitre. Aujourd'hui, les systèmes microfluidiques sont largement appliqués dans de nombreux domaines en réalisant de multiples opérations : mélange, analyse, séparation, etc. (Guillot, 2011) Les techniques microfluidiques nous permettent:

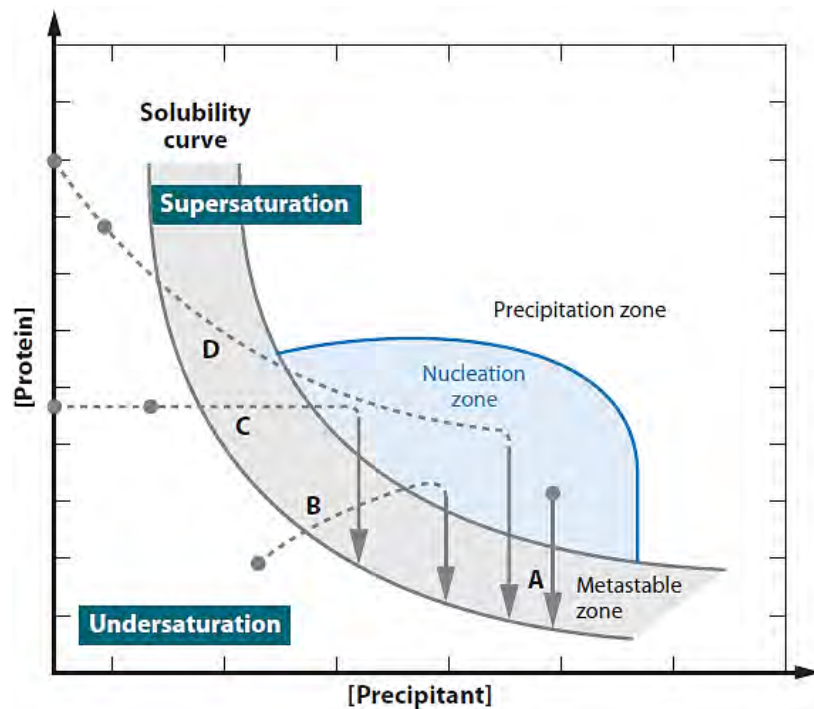
- D'effectuer l'acquisition de données à haut débit.
- De consommer très peu de réactif par la miniaturisation des expériences.
- De déterminer des itinéraires cinétiques grâce au contrôle précis du transfert de matière (concentration, diffusion) et de la chaleur. (Leng & Salmon, 2009)
- De faire croître des cristaux de haute qualité pour la détermination de structure en évitant l'effet de gravité et les instabilités convectives dues à la turbulence. (Leng & Salmon, 2009)

Dans cette partie bibliographique de la cristallisation en microfluidique, on présentera dans un premier temps les systèmes microfluidiques émergents qui sont couplés à des méthodes traditionnelles de cristallisation. Ensuite, on présentera les études physicochimiques de la cristallisation réalisées par la génération des gouttes en microfluidique.

## **2.1 Systèmes microfluidiques pour la cristallisation**

Les systèmes microfluidiques pour la cristallisation sont mis en œuvre par l'intégration des méthodes traditionnelles de cristallisation de protéine comme le microbatch®, la diffusion libre à l'interface (Salemme, 1972), la contre-diffusion (García-Ruiz, 2003, Ng *et al.*, 2003), la diffusion de vapeur (Hampel *et al.*, 1968, Kim *et al.*, 1973, McPherson, 1976), etc. Chacune de ces méthodes de cristallisation correspond à une trajectoire cinétique idéale qui traverse les différentes zones dans le diagramme de phase. Ainsi la trajectoire cinétique doit être bien définie pour optimiser les expériences et contrôler les propriétés des cristaux synthétisés. Par exemple, le système produit des structures désordonnées (agrégats et précipités) dans la zone de précipitation ; la croissance cristalline est optimale dans la zone métastable tandis que la nucléation est favorisée dans la zone labile. Dans le cas réel, le diagramme de phase peut avoir des dizaines de dimensions et des zones discontinues du fait de nombreux paramètres externes (pH, température, force ionique, précipitant...) (McPherson, 1999, Chayen &

Saridakis, 2008). Cependant, on profite d'un diagramme de phase simple de la protéine avec son précipitant pour décrire la trajectoire cinétique de chaque méthode de cristallisation en microfluidique (*Figure 13*).



*Figure 13. Diagramme de phase pour une protéine et son précipitant. Les lignes pointillées présentent les trajectoires cinétiques des différentes méthodes de cristallisation et les flèches présentent les processus de cristallisation. A, B, C, D sont respectivement la méthode de microbatch®, diffusion de vapeur, dialyse et diffusion libre à l'interface. (Chayen, 1998)*

## 2.1.1 Systèmes microfluidiques à base de gouttes

Généralement, la méthode microfluidique à base de gouttes générées dans une huile est sur le même principe que la méthode microbatch® : il s'agit de mélanger simplement la protéine avec les précipitants, les tampons, etc. (Chayen *et al.*, 1990, Chayen *et al.*, 1992, Li & Ismagilov, 2010) Ainsi la sursaturation est fixée par un point de départ dans la zone de nucléation (*Figure 13*, chemin A) et il n'y a pas de trajectoire cinétique en traversant le diagramme de phase. Néanmoins, il est possible de coupler d'autres méthodes de cristallisation telles que la diffusion de vapeur, l'ensemencement (« *seeding* »), etc.

### 2.1.1.1 Emulsion

La groupe de Fraden a récemment développé un système d'émulsion qui permet d'étudier la structure biologique de protéines par diffraction des rayons X (DRX) *on-chip* (Akella *et al.*, 2014, Heymann *et al.*, 2014). En fait, le principe de cette méthode d'émulsion est identique à la méthode des gouttes. Une puce microfluidique en PDMS est utilisée pour générer les gouttes d'une émulsion (Figure 14a). La protéine et le précipitant sont mélangés avant la formation des gouttes. Les gouttes de la solution de protéine (Erlandsen *et al.*) sont encapsulées dans de l'huile et stabilisées par un tensioactif. Une fois que le premier cristal est nucléé dans une goutte, le petit volume (Erlandsen *et al.*) génère un mécanisme de rétroaction négative qui réduit la sursaturation. Ce mécanisme, appelé mononucléaire, est exploité pour produire un seul cristal par goutte. L'étude *in-situ* de DRX est réalisée avec un chip transparent aux rayons X (Figure 14c et d).

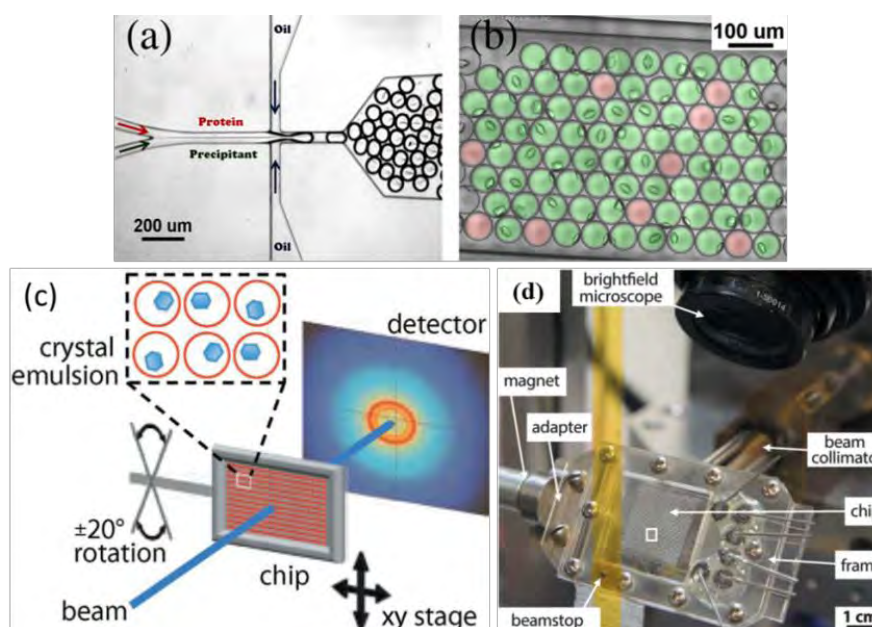


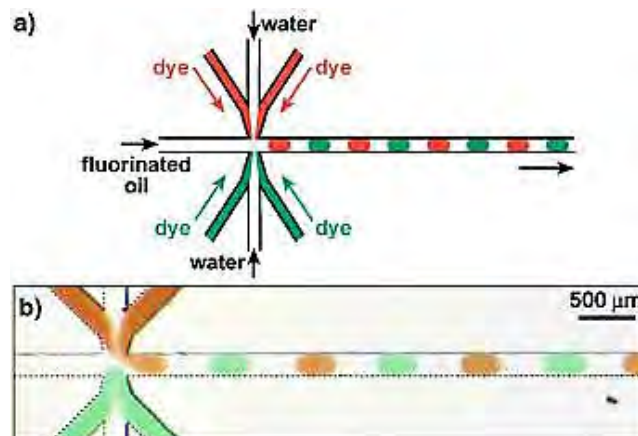
Figure 14. (a) Puce microfluidique en PDMS de type « flow-focusing ». (b) Gouttes générées. En rouge : sans cristal. En vert, avec cristal.(Akella *et al.*, 2014) (c) et (d) Schéma et photo de la mesure *on-chip* par RX.(Heymann *et al.*, 2014)

### 2.1.1.2 Cristallisation par diffusion de vapeur avec les plugs

Pour la méthode classique de diffusion de vapeur (« vapor diffusion », VD) (Hampel *et al.*, 1968, Kim *et al.*, 1973, McPherson, 1976), le procédé expérimental est la méthode de la « goutte pendante ». Une goutte (1-5 $\mu$ L) contenant la protéine, le tampon, et le précipitant est placée sur la face inférieure d'une lamelle au-dessus d'un réservoir

(environ 1 ml) contenant le tampon et le précipitant. La concentration de précipitant dans le réservoir est supérieure à celle dans la goutte. Au début, la condition dans la goutte est fixée dans la zone de sousaturation. C'est le point de départ de la trajectoire cinétique (*Figure 13*). Ensuite, la vapeur d'eau diffuse dans le réservoir à partir de la goutte jusqu'à ce que l'équilibre entre la goutte et le réservoir soit atteint. Ainsi la sursaturation augmente au cours de l'expérience en suivant le chemin B dans la *figure 13* (Penkova *et al.*, 2002, Rupp, 2003).

Zheng *et al.* ont réalisé une étude de cristallisation par VD en utilisant des gouttes longues en microfluidique, appelées « plugs », qui sont générées dans une huile (Zheng *et al.*, 2004). Les auteurs remplacent alors la diffusion de vapeur par la diffusion de l'eau dans l'huile. L'huile qui sépare les plugs est perméable à l'eau. Le dispositif microfluidique est en PDMS couplé avec des capillaires en verre (*Figure 15*). Une série de plugs alternants (type **ABABAB...**) sont formées spontanément lorsque l'eau (transparente) et les solutions aqueuses (colorées) sont injectées face-à-face dans un flux continu de l'huile fluorée (*Figure 15a*). L'huile est utilisée comme barrière entre les plugs A et B, les empêchant d'entrer en contact. Un marqueur fluorescent est utilisé pour confirmer qu'il n'y a pas de contamination croisée entre les deux séries de plugs.



*Figure 15. Schéma (a) et Photo (b) de la génération des plugs alternants dans le dispositif microfluidique en PDMS/verre. (Zheng et al., 2004)*

Dans un premier temps, les plugs alternants sont formées avec les solutions de NaCl en 0.5M (**A**) et en 1.5M (**B**) pour observer la diffusion de l'eau dans l'huile du plug le moins concentré (**A**) vers le plug le plus concentré en NaCl (**B**) (*Figure 16a*). Les taux de diffusion dans les différents types d'huile sont mesurés en fonction des tailles de gouttes (*Figure 16b*). Ainsi, une expérience de cristallisation du lysozyme est testée avec ce système (*Figure 16c*). Les plugs **A** contiennent un mélange de lysozyme et de sel et les plugs **B** une solution de sel à une concentration plus élevée. Ainsi, l'eau diffuse du plug **A** (à faible concentration en sel) au plug **B** (à forte concentration en sel) au cours du temps



jusqu'à ce que les pressions osmotiques soient égalisées. Ainsi la sursaturation va augmenter dans les plugs **A** (Figure 16a et b). La cristallisation se produit lorsque la sursaturation dépasse la limite de zone métastable (Figure 16d). Pour vérifier que la cristallisation est due à la diffusion de l'eau, une expérience témoin a été effectuée. Le capillaire est rempli avec les gouttes de la solution de lysozyme avec les concentrations identiques et aucune des gouttes n'est cristallisée après un mois de période d'incubation.

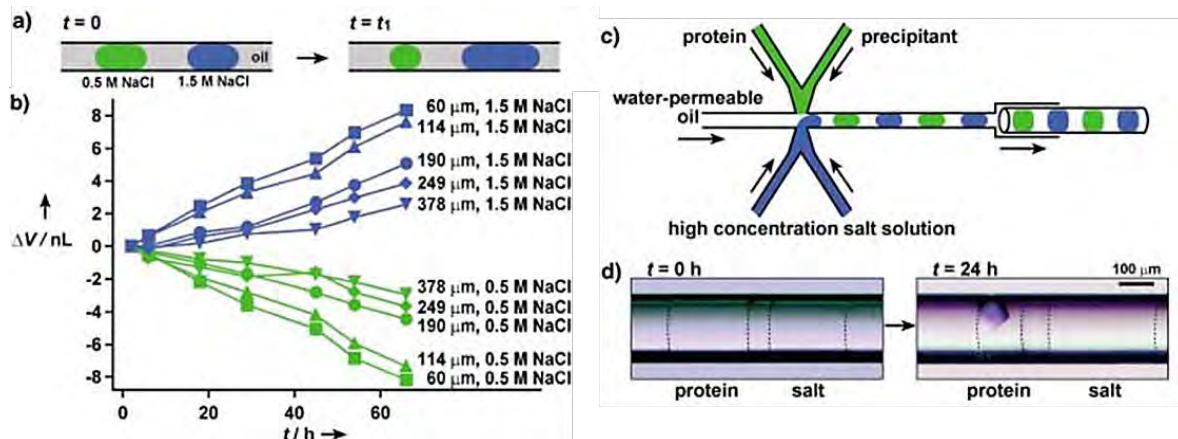
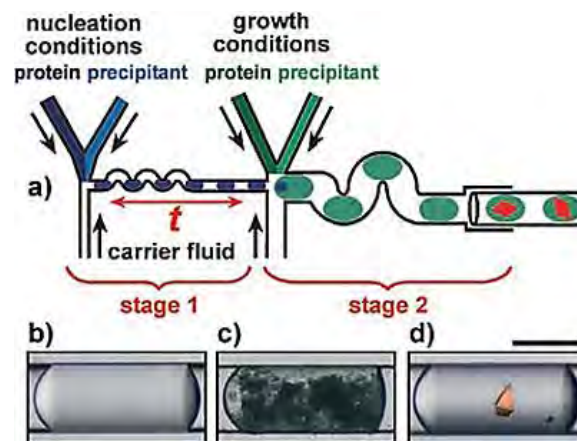


Figure 16. (a) Diffusion de vapeur entre les plugs de NaCl en 0.5M et en 1.5M. (b) Evolution temporelle des longueurs des plugs (25 nL au début). (c) Génération des gouttes pour la cristallisation de protéine. (Zheng et al., 2004)

### 2.1.1.3 « Seeding » (Ensemencement) dans les plugs

La plus grande préoccupation dans le cas de la cristallisation des protéines est d'étudier la structure biologique des molécules. Les *crystallographers* cherchent à obtenir un monocristal relativement grand et de bonne qualité pour la détermination de la structure atomique par DRX à haute résolution. La compétition entre la nucléation et la croissance est toujours un problème crucial: on veut peu de nucléation mais on veut de gros cristaux, c'est à dire une forte croissance! Pour cela, on utilise souvent la méthode de *seeding* qui permet d'éliminer l'étape de nucléation dans la solution et ainsi de produire des cristaux de haute qualité de diffraction (McPherson & Shlichta, 1988). Le principe du *Seeding* consiste à préparer dans un premier temps une solution de cristallisation en condition de croissance, c'est-à-dire dans la zone métastable. Ensuite, des germes cristallins précédemment nucléés sont introduits dans la solution comme *seeds*. Ces germes cristallins peuvent alors directement grossir dans la solution. Néanmoins, le *seeding* en petit volume (Erlandsen et al., 1974) peut être difficile ou impossible car les *seeds* sont trop petits, donc difficiles à observer (Saridakis et al., 2002) et délicats à manipuler (Chayen, 2005). Malgré ces problèmes, Gerdts et al. (Gerdts et al., 2006) ont développé un système *microfluidique en seeding* en utilisant une puce en PDMS/verre (Figure 17). La cristallisation de la thaumatococine a été testée avec ce système.

La première étape (*Figure 17a, stage 1*) consiste à préparer des plugs en condition favorable pour la nucléation (dans la zone labile) en mélangeant la solution de protéine et de précipitant. Après un délai court ( $t=3-15s$ ), les germes (*seeds*) sont formés et puis envoyés dans la deuxième partie du montage (*Figure 17a, stage 2*). Dans la deuxième étape, les plugs formés précédemment (contenant les *seeds*) sont dilués afin de retourner dans la zone de croissance. Ainsi la condition de nucléation est combinée avec celle de croissance et les *seeds* vont pouvoir croître (*Figure 17d*). Ce système microfluidique en *seeds* est efficace pour réaliser et contrôler des réactions multiples successives dans le temps.



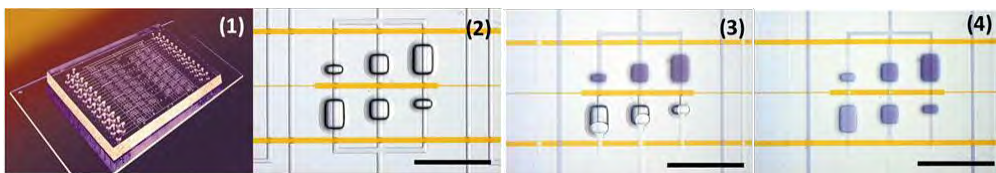
*Figure 17. (a) Processus du seeding en microfluidique. (b-d) comparaison des plugs aux différentes sursaturations de la thaumatine avec un plug réalisé en seeding : (b) aucune nucléation à basse sursaturation; (c) précipitation à haute sursaturation; (d) un monocristal de la thaumatine nucléé en première étape et grandi en seconde étape. (Barre d'échelle = 200µm) (Gerds et al., 2006)*

## 2.1.2 Système microfluidique en diffusion libre à l'interface

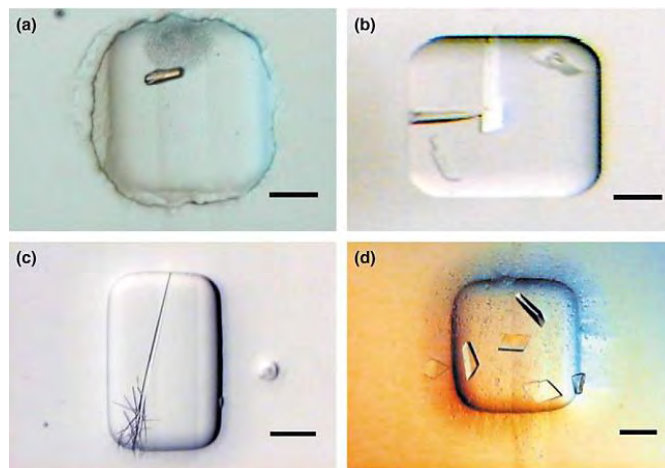
Dans un système classique en diffusion libre à l'interface (« *Free Interface Diffusion* », FID), la solution de protéine et le précipitant sont superposées directement en couches l'un sur l'autre dans un réservoir de cristallisation ou un petit tube et on les laisse diffuser jusqu'à l'équilibre. Dû aux gradients de concentration à cette interface, la protéine commence à diffuser dans la solution de précipitation, et vice-versa. Ainsi, la sursaturation de protéine requise pour la nucléation et la croissance est atteinte par la diffusion libre entre les deux solutions. Du côté du réservoir de la protéine, la concentration en protéine diminue et celle en précipitant augmente, en suivant une trajectoire sur le diagramme de phase (*Figure 13, chemin D*). Lorsque la trajectoire entre dans la zone de nucléation les germes naissent puis croissent.



Hansen *et al.* ont développé un système microfluidique en FID (Hansen *et al.*, 2002, Hansen & Quake, 2003). En fait, ce système est une version miniaturisée et parallélisée de la méthode classique de FID. Le dispositif est composé d'une puce en élastomère de silicone scellée sur un substrat en verre gravé, et intègre des pompes et des vannes (*Figure 18, (1)*). L'ensemble du dispositif contient jusqu'à 48 unités de réaction et chaque unité se compose de trois paires de chambres de réaction (*Figure 18, (2)*). Chaque chambre de réaction contient deux micropuits qui sont connectés par une interface fluide contrôlée par une micro-vanne (*Figure 18, (2)*). La protéine et le précipitant sont chargés séparément dans les 2 chambres de réaction avec des volumes bien définis (*Figure 18, (3)*). Les réactifs diffusent l'un dans l'autre en ouvrant la vanne à l'interface (*Figure 18, (4)*). Du côté du réservoir de la protéine, l'évolution de la sursaturation suit le chemin D dans la *figure 13* jusqu'à la zone de nucléation. Trois expériences à différentes sursaturations peuvent être réalisées par unité grâce aux différents volumes des micropuits, en utilisant 10nL de l'échantillon de protéine. Jusqu'à des centaines d'expériences peuvent être effectuées en parallèle. Les exemples de cristallisation en utilisant ce système microfluidique en FID sont représentés dans la *figure 19*.



*Figure 18. Photos du système microfluidique en FID. (1) ensemble du dispositif, (2) unité vide du dispositif, (3) chargement des protéines et des précipitants dans l'unité, (4) processus « on-chip » de la FID. (Hansen & Quake, 2003)*



*Figure 19. Photos des cristaux obtenus avec le système microfluidique en FID développé par Hansen et al. (a) ribosome 70S bactérien. (b) protéine membranaire intégrale, l'aquaporine (c) cœur du domaine catalytique d'une primase bactérienne (d) Domaine ATPase de la topoisomérase de type II lié à l'ADP. (Hansen & Quake, 2003)*

Un autre système microfluidique a été récemment développé par Du et al. pour réaliser les expériences en FID, appelé le « *SlipChip®* » (Du et al., 2009). Dans ce système, toutes les protéines et tous les précipitants sont chargés par pipetage (*Figure 20abcd*). La connexion des puits de protéine et de précipitant se fait en faisant glisser les canaux pour former un pont (*Figure 20*). Ainsi, les solutions de protéine et de précipitant sont connectées et les deux solutions diffusent l'une vers l'autre à l'interface (*Figure 20ef*).

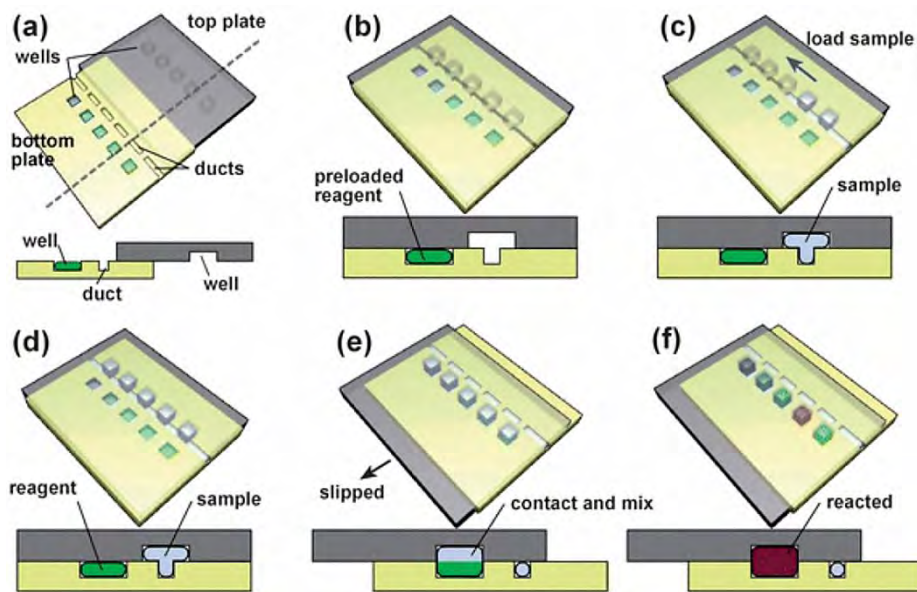
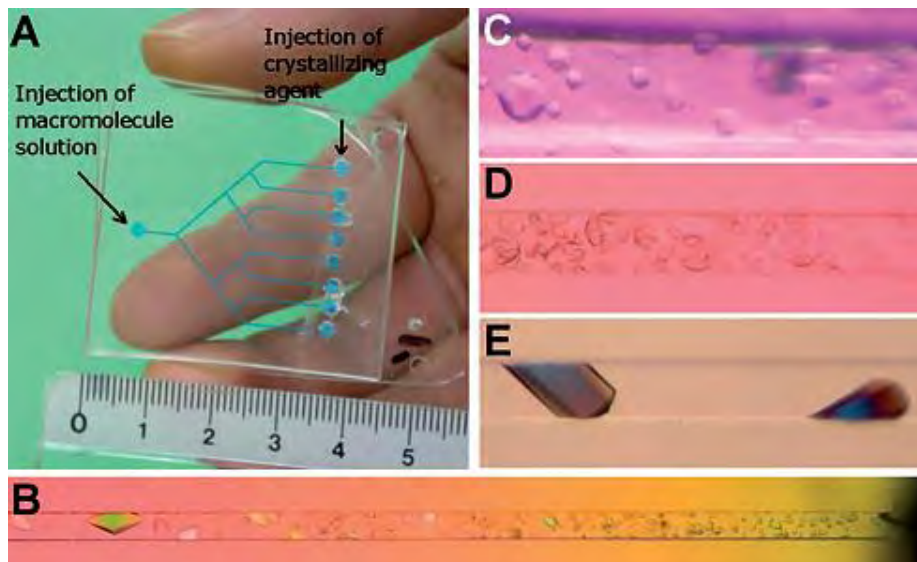


Figure 20. Schéma de la section transversale du SlipChip®. (a) puits pré-remplis sur la plaque de fond, (b) les plaques de dessus et du fond sont alignés, (c) et (d) les puits de dessus remplis par les « ducts » (canaux) (e) création de l'interface et mélange des deux solutions en faisant glisser la plaque de dessus, (f) réaction par la FID. (Du et al., 2009)

### 2.1.3 Systèmes microfluidique en contre-diffusion

La contre-diffusion (« *counter-diffusion* », CD) suit quasiment le même principe que la méthode FID susmentionnée. La méthode de contre-diffusion a été initialement mise en œuvre avec des capillaires en verre (Garcia-Ruiz & Moreno, 1994, García-Ruiz, 2003, Ng et al., 2003). Dans un premier temps, le capillaire en verre est rempli avec l'échantillon de protéine. Ensuite, la solution de précipitant est ajoutée sur un côté du capillaire et la protéine et le précipitant sont mélangés doucement par diffusion à l'interface. Grâce au diamètre faible du canal (de 0,1mm à 1,5mm), un milieu sans présence de convection est assuré. Ainsi la méthode de CD présente un avantage pour la croissance de cristaux de haute qualité pour la détermination de structure biologique (Gavira et al., 2002).

La groupe de Sauter a développé un système microfluidique basée sur la CD pour la cristallisation de biomolécules (Dhouib *et al.*, 2009). L'ensemble du dispositif se compose de 8 canaux microfluidiques avec une section de  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . Les canaux sont disposés en parallèle et connectés en réseau arborescent (*Figure 21A*). Premièrement, le puit du côté « racine » est rempli avec la solution de l'échantillon à cristalliser et les puits de l'extrémité des 8 canaux sont remplis avec les 8 solutions de précipitant. Le caractère original de cette méthode microfluidique en CD est représenté par plusieurs exemples de cristallisation de protéines (*Figure 21B-E*). Sur la figure 21B-E, le côté droit des canaux voit la précipitation d'amorphes ou de microcristallites induite par la concentration de précipitant qui est la plus élevée proche du réservoir du précipitant. En diffusant peu à peu à travers le canal de droite à gauche, un gradient décroissant de sursaturation se présente. Ainsi, une augmentation progressive de la taille des cristaux est observée à la fin vers le côté de faible sursaturation.



*Figure 21. Système microfluidique en CD pour la cristallisation des biomolécules. (A) géométrie arborescent du dispositif ; (B) cristallisation par contre-diffusion de la thaumatococcus à l'intérieur du canal microfluidique; (C) cristaux de l'insuline bovine ; (D) cristaux d'un virus de plante ; (E) cristaux du lysozyme du blanc d'œuf de dinde. (Dhouib et al., 2009)*

Ce système microfluidique en CD a été récemment adapté pour réaliser l'analyse in-situ de structures biologiques de protéines par DRX (*Figure 22*) (Pinker *et al.*, 2013). Le dispositif microfluidique, appelé le *ChipX* (*Figure 22B*), est fabriqué en copolymère d'oléfine cyclique (« *cyclic olefin copolymer* », COC) qui est suffisamment transparent aux RX. L'effet d'épaisseur du matériau est testé. Les résultats démontrent que des données cristallographiques précises peuvent être collectées directement avec le *ChipX* à température ambiante.

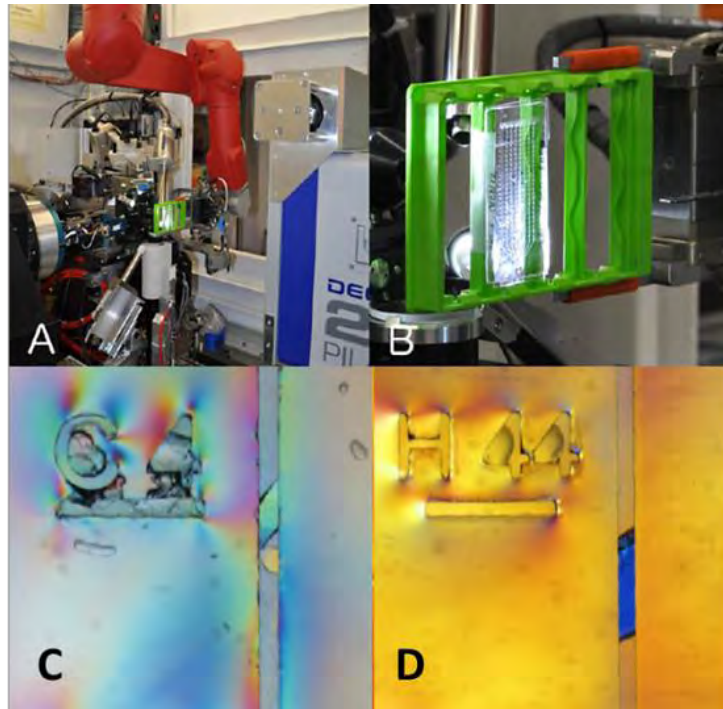
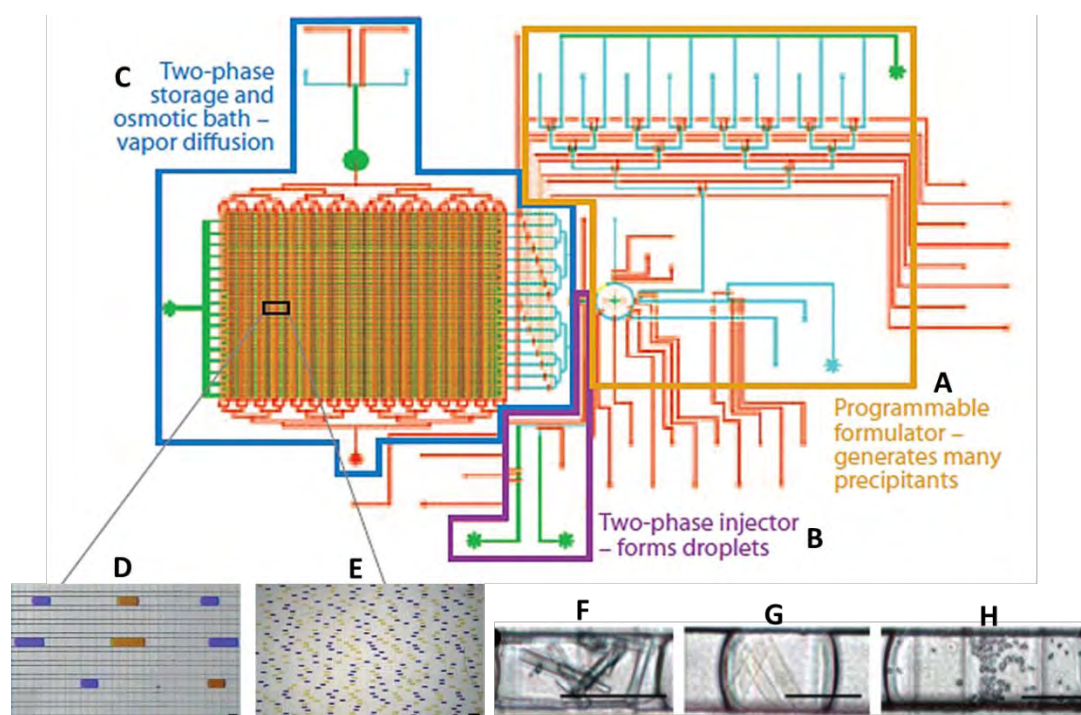


Figure 22. Analyse de structures biologiques in-situ par DRX en système microfluidique en CD. (A) ensemble du dispositif expérimental. (B) porte-échantillon. (C) monocristaux de la thaumatine bipyramides. (D) un monocristal de lysozyme dans le canal du ChipX. (Pinker et al., 2013)



## 2.1.4 Systèmes « high-throughput »

Le groupe de Hansen a développé un système microfluidique de type « high-throughput » pour le criblage des conditions de cristallisation (Hansen *et al.*, 2004). L'ensemble du système contient trois modules : un module de mélange (*Figure 23A*), appelé le « *formulateur* », un module de génération des gouttes (*Figure 23B*), appelé l'injecteur diphasique, et un module de stockage (*Figure 23C*). Le *formulateur* permet un mélange combinatoire de 16 tampons et 16 précipitants avec la protéine, utilisant des micro-vannes programmables (*Figure 24*). Dans le *formulateur*, une jonction appelée « *positive displacement crossinjection* » (PCI) comprenant 4 entrées-sorties est utilisée pour l'injection d'échantillons en séquentiel et de façon précise (*Figure 24A*, la partie de forme hexagonale). Ensuite, les différentes solutions sont envoyées et mélangées dans un réacteur de bague de 5nL (*Figure 24C et D*). Enfin, ces différentes solutions sont poussées dans l'injecteur diphasique pour former des gouttes de l'ordre du nL (*Figure 23B*). Les gouttes formées sont envoyées et incubées dans le module de stockage (*Figure 23C-E*). La *figure 23F-H* représente les photos des cristaux obtenus respectivement à partir du glucose isomérase, de la catalase et de la thaumatine.



*Figure 23. Schéma de l'ensemble du système « high-throughput ». (A) « Formulateur », (B) Injecteur diphasique, (C) Module de stockage. (D) Gouttes générées et stockées. (E) Matrice de gouttes. (F) (G) (H) photos des cristaux obtenus avec respectivement du glucose isomérase, de la catalase et de la thaumatine. Les barres d'échelle sont de 100µm. (Hansen *et al.*, 2004, Lau *et al.*, 2007)*

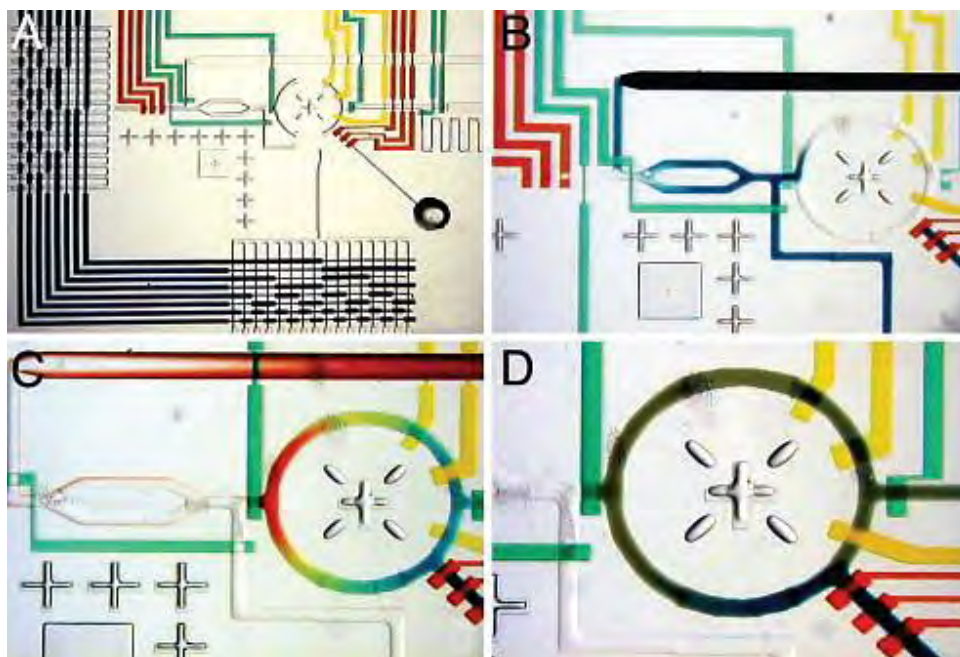


Figure 24. Mélange combinatoire utilisant un dispositif microfluidique de formulation. (A) Intégration des composants à la formulation combinatoire on-chip. Le multiplexeur en bleu foncé, les pompes péristaltiques en rouge, le mélangeur rotatif en jaune, et la jonction PCI (centre, hexagonale). (B) Injection de 250pL du colorant bleu dans le mélangeur rotatif. (C) Gradient de couleur formé par injections consécutives dans la bague de mélange. (D) Mélange complet dans la bague pendant 3 secondes. (Hansen et al., 2004)

Un inconvénient de ce genre d'équipement robotique est le budget initial qui est généralement élevé pour la plupart des laboratoires individuels. En plus, il n'est pas très pratique et transportable dans les laboratoires comme une petite boîte à outils selon les besoins des chercheurs. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir un outil de criblage rapide des conditions de cristallisation adapté à l'industrie pharmaceutique ou aux laboratoires de biologie. Cet outil doit présenter un coût raisonnable, consommer très peu de matière et être facile à installer, à déplacer et à utiliser par des non-spécialistes en microfluidique. En tenant compte de ce cahier de charges, nous avons choisi la méthode microfluidique basée sur des gouttes isolées et monodispersées (qui sont autant de cristallisoirs) de volume du  $\mu\text{L}$  au  $\text{nL}$ , tout en manipulant de multiples fluides.

## 2.2 Etudes physicochimiques de la cristallisation en utilisant les systèmes microfluidiques

### 2.2.1 Etude de solubilité

La solubilité d'un soluté est affectée par de nombreux paramètres (température, pH, sel, impuretés...). Le criblage de ces paramètres de cristallisation peut rendre la mesure de solubilité très longue. Pour cela, Laval *et al.* ont mis au point un dispositif microfluidique qui permet une lecture *on-chip* rapide de la courbe de solubilité d'un soluté dans un solvant donné (Figure 25) (Laval *et al.*, 2007).

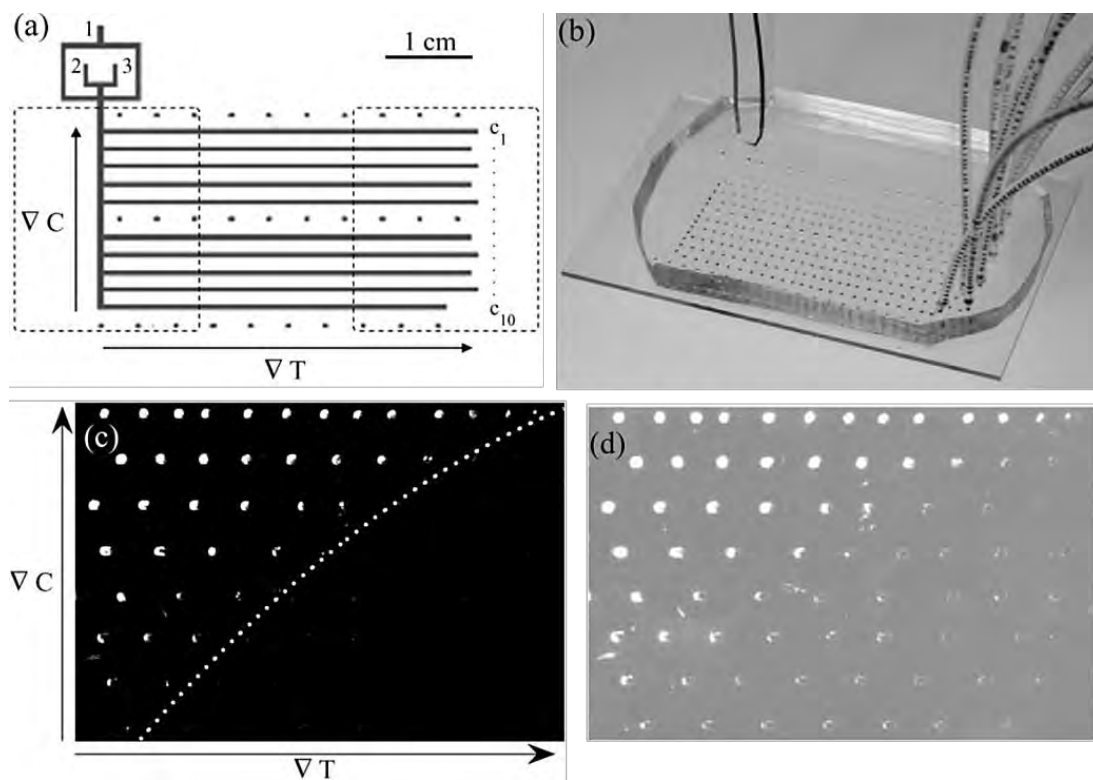


Figure 25. Mesure directe de la solubilité. La concentration en acide adipique a été graduellement diminuée dans les canaux de haut en bas. (a) conception du dispositif microfluidique (la largeur du canal est de  $500\mu\text{m}$ ). L'huile silicone est injectée par l'entrée 1 et les solutions aqueuses par l'entrée 2 et 3. Les deux zones en pointillés à gauche et à droite indiquent les positions des deux modules Peltier utilisés pour appliquer des gradients de température  $\nabla T$ . Les trois lignes horizontales en pointillés marquent les positions des mesures de température. (b) ensemble de la puce PDMS. (c) courbe de solubilité en ligne pointillée qui sépare des gouttes vides (sans cristal) et des gouttes avec des cristaux. (d) même image de la position des gouttes avec un contraste différent. (Laval *et al.*, 2007)

La puce microfluidique est fabriquée en poly-diméthylsiloxane (PDMS) avec des micro-canaux parallèles. Cette puce microfluidique permet de générer des gouttes (micro-cristallisoirs) en consommant de faibles quantités de produit ( $\sim 25 \mu\text{L}$ ). Grâce aux micro-canaux en parallèle, une matrice de gouttes ( $\sim 100$ ) avec un gradient de concentration diminuant de haut en bas sont incubées à la température de cristallisation (*Figure 25a et b*). Après l'étape de cristallisation, toutes les gouttes sont cristallisées. Ensuite, la température est remontée pour l'ensemble de la puce mais avec un gradient diminuant (de  $65$  à  $32^\circ\text{C}$ ) de gauche à droite (*Figure 25a et b*). Ainsi pour les gouttes dans lesquelles la température est supérieure à la température d'équilibre, les cristaux commencent à se dissoudre, et celle inférieure à la température d'équilibre les cristaux croissent. La superposition des deux gradients, température et concentration, dans la puce permet une lecture directe de la courbe de solubilité en fonction de la température. (*Figure 25c et d*).

## 2.2.2 Etudes du Polymorphisme

Récemment, les études de cristallisation en microfluidique ont montré que la probabilité d'observer une phase métastable était augmentée dans les cristallisoirs de faible volume (Lee *et al.*, 2006, Laval *et al.*, 2008, Ildfonso, Revalor, *et al.*, 2012). Laval *et al.* ont étudié le polymorphisme du nitrate de potassium et la solubilité des différentes polymorphes (Laval *et al.*, 2008) en utilisant la puce microfluidique décrite dans la partie 2.2.1. Au début, les gouttes de solution de  $\text{KNO}_3$  sont stockées à une température supérieure à celle de solubilité pour éviter la cristallisation. En refroidissant par palier de  $1^\circ\text{C}$ , presque toutes les gouttes sont cristallisées à une température reproductible et deux formes cristallines sont observées dans les gouttes: la plupart des gouttes présentent le faciès « facetté » (*Figure 26*, forme III) tandis que les autres ont un faciès rugueux et irrégulier (*Figure 26*, forme II). Ensuite, la température est ré-augmentée par palier de  $1^\circ\text{C}$  et la dissolution des deux faciès n'est pas observée à la même température, ce qui indique que ce sont 2 phases différentes, ce qui a été confirmé par l'étude *in situ* par spectroscopie Raman. La forme II est stable et la forme III est métastable – c'est la phase ferroélectrique (Kracek, 1929, Nimmo & Lucas, 1976).



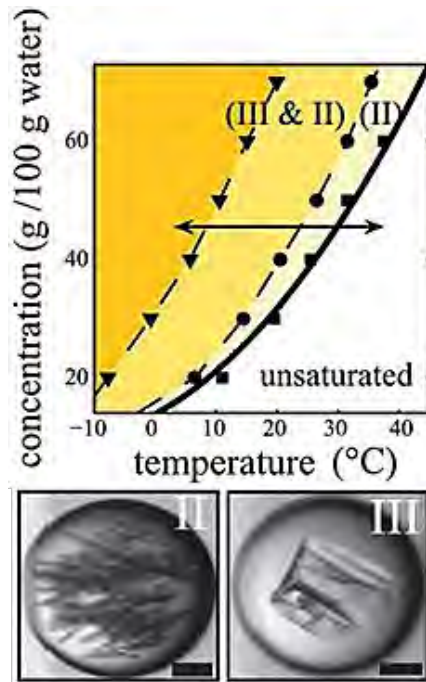


Figure 26. Etude du polymorphisme. En haut : Mesures de solubilité des formes II et III du nitrate de potassium. En bas : Les faciès dans les gouttes correspondent aux formes II (gauche) et III (droite). Barre d'échelle de 100mm. (Laval et al., 2008)

Ildefonso *et al.* (Ildefonso, Revalor, *et al.*, 2012) ont aussi montré que la microfluidique était un outil adapté pour étudier le polymorphisme, avec l'étude de la cristallisation du lysozyme dont les faciès sont déjà connus par des études précédentes (Ataka & Asai, 1988, Legrand *et al.*, 2002). Dans un premier temps, les expériences de cristallisation du lysozyme à 20mg/mL sont réalisées séparément à une série de températures entre 10 et 40°C. Seul le faciès tétragonal est alors observé. Ensuite, la solution de lysozyme (20 mg/mL) est cristallisée à 6°C et le faciès « oursin » est mis en évidence dans 6 gouttes parmi 237 (Figure 27a). Pour prouver que les faciès observés correspondent bien à différents polymorphes, la température est ré-augmentée à 30°C et la dissolution du faciès « oursin » est observée tandis que la phase tétragonale est encore stable et continue à croître (Figure 27b et c).

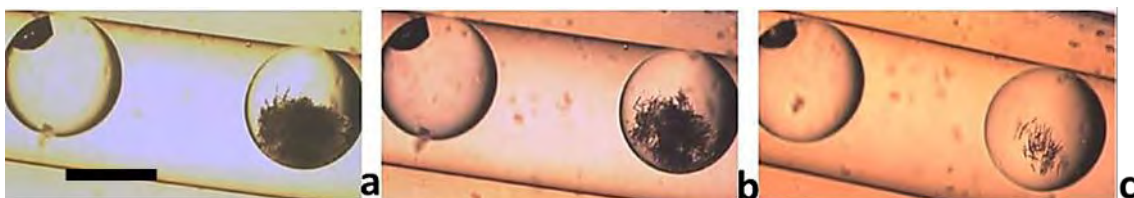


Figure 27. Gouttes de lysozyme à 20mg/mL (0.7M NaCl, pH=4.5) : (a) observées à 20°C après le stockage pendant 20h à 6°C ; (b) 6mn après avoir augmenté la température à 30°C ; (c) 12mn après avoir augmenté la température à 30°C. Barre d'échelle de 500µm. (Ildefonso, Revalor, *et al.*, 2012)

En conclusion, la miniaturisation des expériences en microfluidique (~250 nL) est favorable pour l'étude du polymorphisme par rapport à des volumes classiques plus élevés (>1mL). En effet dans un premier temps, le mécanisme de nucléation dans des gouttes en microfluidique est très souvent mononucléaire. C'est-à-dire qu'il n'y a qu'un seul événement de nucléation par goutte (Kashchiev *et al.*, 1991), la déplétion due à la nucléation empêchant tout autre événement de nucléation. Ainsi, la phase métastable étant la seule phase présente dans la solution, elle est comme « gelée » dans les gouttes puisqu'elle ne peut pas se transformer en une phase plus stable via le mécanisme de dissolution-croissance (Sato, 1993, Lee *et al.*, 2006). Alors que dans un grand volume de cristallisation, la probabilité de nucléation concomitante de plusieurs phases est plus grande et la transition de phase est plus fréquente (Kashchiev *et al.*, 1991). Dans un deuxième temps, la sursaturation élevée est souvent exigée pour les expériences en petits volumes afin de réduire le temps d'induction de la nucléation. Ainsi la probabilité d'apparition d'une phase métastable est plus grande dans un petit volume (Mangin *et al.*, 2009).

## 2.2.3 Cinétiques de nucléation

Du fait de la stochasticité de la nucléation, le nombre de cristaux dans un cristalliseur de volume donné est une variable aléatoire. Cependant, les gouttes en microfluidique nous permettent de réaliser un grand nombre d'expériences indépendantes et ainsi de traiter statistiquement les données des cinétiques de nucléation. Dans cette partie on va discuter des études et du traitement des données dans la littérature.

### 2.2.3.1 Fréquence de nucléation primaire: méthode du « double pulse »

Un problème lors de la mesure de fréquence de nucléation est la taille des germes qui est trop faible au moment de leur apparition, ce qui les rend impossible à observer. Il faut donc que les cristaux aient atteint une taille détectable grâce à l'étape de croissance. Pour s'affranchir de ce problème, Ildefonso *et al.* ont utilisé la méthode du « *double pulse* » (décrite en 1.2.1.3.1) pour étudier la cinétique de nucléation primaire du lysozyme en microfluidique (Ildefonso *et al.*, 2011). Au début, les gouttes de la solution de cristallisation sont générées et incubées dans une puce en PDMS (*Figure 28a-c*) à une température élevée pour se situer dans la zone métastable et ainsi éviter la nucléation. Ensuite pour déclencher la nucléation, la température est réduite jusqu'à la température de nucléation ( $T_{nucléation}=20^{\circ}\text{C}$ ) choisie dans la zone labile (*Figure 28d*). Après un temps de nucléation  $\Delta t$ , la température est ramenée à la température de croissance

( $T_{\text{croissance}}=40^{\circ}\text{C}$ ) choisie dans la zone métastable pour inhiber la nucléation et induire la croissance jusqu'à des tailles détectables (*Figure 28d*). Un  $\Delta t$  entre 15 minutes et 2 heures est généralement choisi, car plus  $\Delta t$  est long, plus la concentration en lysozyme diminue dû à la croissance dans un faible volume de la goutte (250 nL).

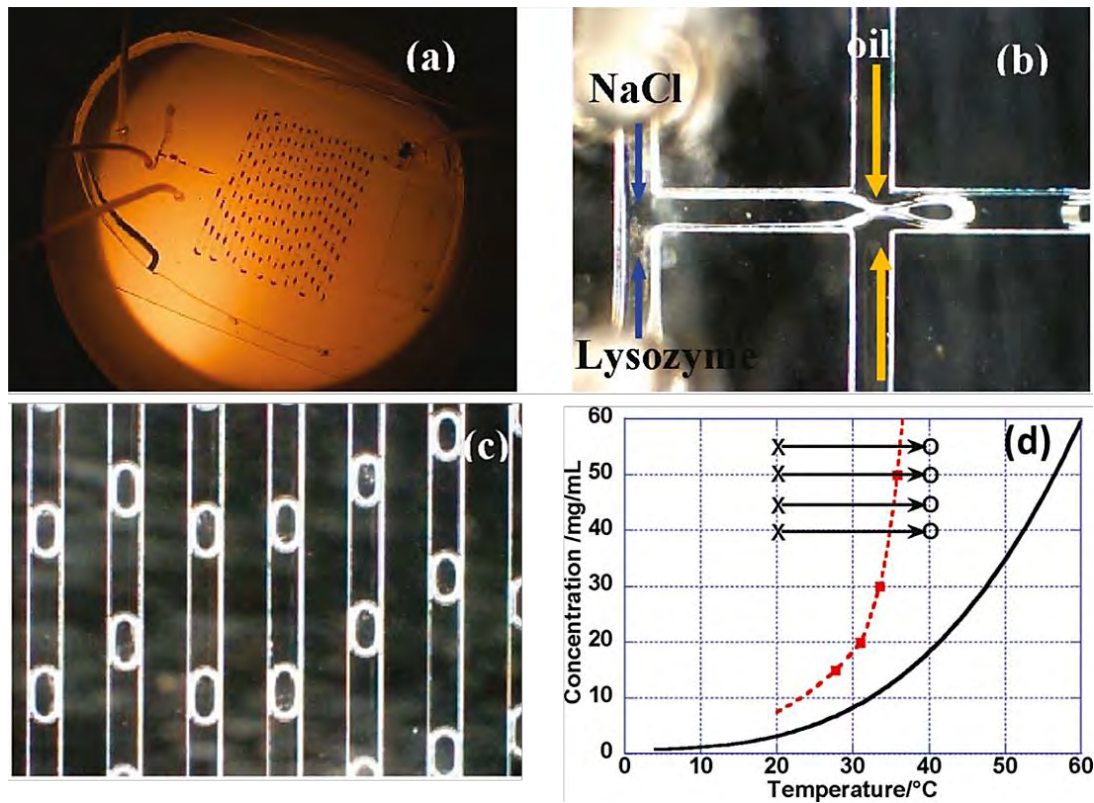


Figure 28. (a) Puce microfluidique en PDMS, (b) Génération des gouttes dans le "plug factory", (c) Image des gouttes stockées, (d) Diagramme de phase du lysozyme tétragone en fonction de la température. Les points (×) et (O) représentent respectivement les conditions de nucléation et de croissance. Les flèches indiquent la trajectoire expérimentale de « double pulse ». (Ildefonso et al., 2011)

Après l'étape de croissance, les cristaux sont comptés et le nombre de cristaux moyen est tracé en fonction de  $\Delta t$  (*Figure 29a*). Il est vérifié que la nucléation du lysozyme présente un régime stationnaire. C'est-à-dire que le nombre moyen de cristaux par goutte augmente linéairement avec  $\Delta t$ . Ainsi  $J$  peut être déterminée directement avec la pente de la droite (*Figure 29a*). La *figure 29b* représente la courbe de la fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation. Ce résultat est en bon accord avec les données de Galkin et Vekilov (Galkin & Vekilov, 2000) obtenus sur le lysozyme à plus faible sursaturation.

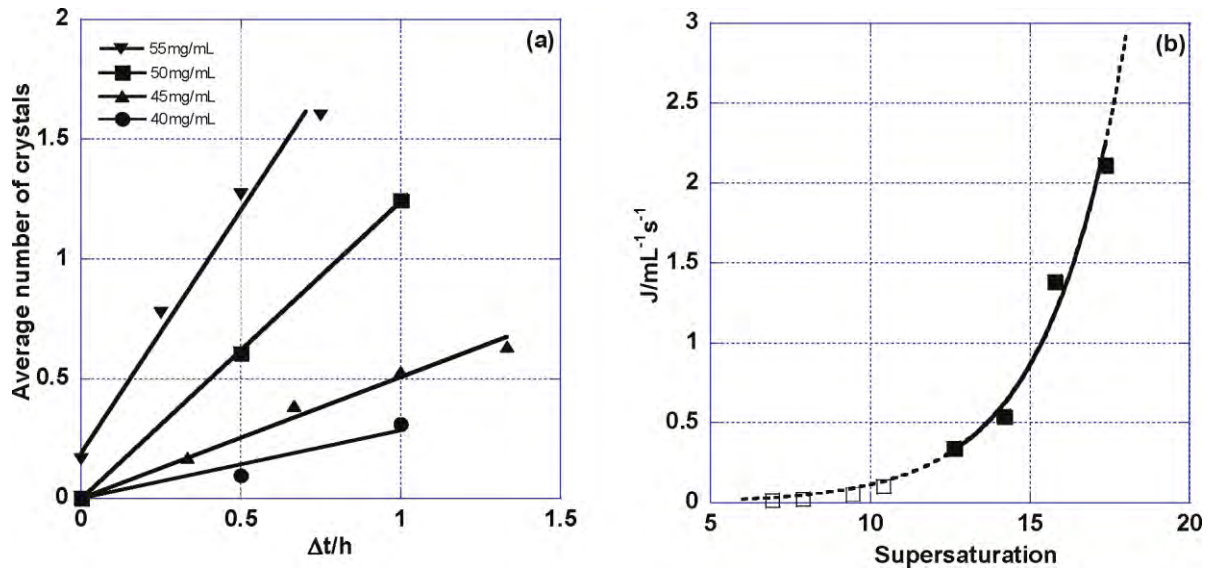


Figure 29. (a) Nombre moyen des cristaux nucléés par goutte en fonction du temps de nucléation ( $C_{NaCl} = 0.7M$  and  $pH= 4.5$ ), (b) Fréquence de nucléation vs sursaturation à  $20^{\circ}C$ , (■) données de Ildefonso et al., (Ildefonso et al., 2011) et (□) données de Galkin et Vekilov. (Galkin & Vekilov, 2000)

### 2.2.3.2 Effet des impuretés

Laval et al. ont suggéré que les gouttes générées par la méthode classique d'émulsification ne sont jamais monodispersées et contiennent souvent des impuretés et des tensioactifs (Laval *et al.*, 2009). Ainsi, le mécanisme de nucléation observé est toujours hétérogène, quel que soit la sursaturation (Laval *et al.*, 2009). La présence de ces hétérogénéités complique les mesures de cinétique de nucléation (Kashchiev *et al.*, 1998) et les tensioactifs peuvent interférer dans le processus de cristallisation. Pour analyser statistiquement les données de cinétique de nucléation primaire, un autre terme souvent utilisé dans le cas de la cristallisation en gouttes microfluidiques est la probabilité ( $P'$ ) qu'une goutte ne contienne pas de cristal ou la proportion ( $Q/Q_0$ ) des gouttes non-cristallisées parmi toutes les gouttes au temps  $\Delta t$  (Équation 20). Si les événements individuels de nucléation observés sont indépendants dans toutes les gouttes,  $P'$  peut être caractérisée par  $J$  :  $P' = Q/Q_0 = \exp(-JV\Delta t)$ .

Avec la puce microfluidique en PDMS, Laval *et al.* ont caractérisé par la probabilité  $P'$ , la cinétique de nucléation du nitrate de potassium. La nucléation de 300 gouttes de  $KNO_3$  est observé pour différentes températures de refroidissement  $T_C$ . La figure 30 présente l'évolution de  $P'$  en fonction du temps  $t$ , pour différentes  $T_C$ .

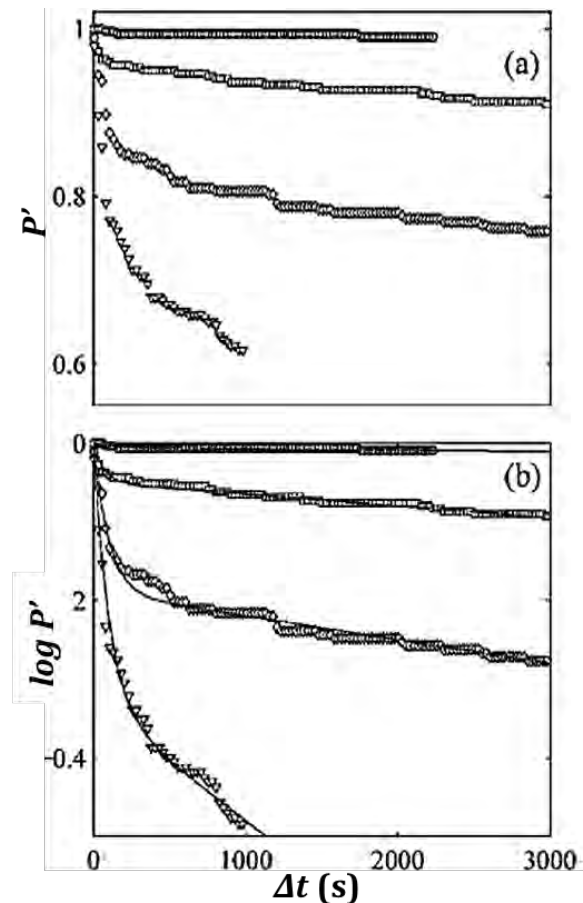


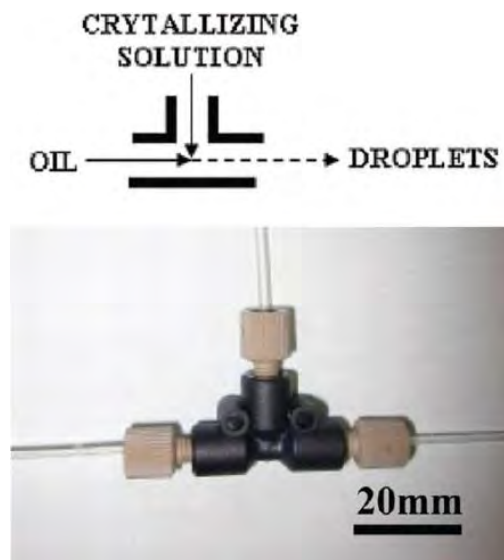
Figure 30. (a)  $P'(t)$  pour les différentes températures de refroidissement  $T_c$ . La concentration de la solution de  $\text{KNO}_3$  est de 40% massique et  $T_c$  est de ( $\circ$ )  $3.8^\circ\text{C}$ , ( $\square$ )  $2.8^\circ\text{C}$ , ( $\diamond$ )  $1.9^\circ\text{C}$ , ( $\nabla$ )  $0.9^\circ\text{C}$ , (b)  $\log(P)$  vs  $t$ . (Laval et al., 2009)

Comme prévu,  $P'(t)$  diminue plus rapidement pour des valeurs faibles de  $T_c$  que pour des valeurs élevées. Par contre, en traçant  $\log P'$  en fonction de  $\Delta t$  (Figure 30 b), il est observé que la cinétique de nucléation n'obéit pas à l'équation  $P'=Q/Q_0=\exp(-JV\Delta t)$ . Le régime stationnaire n'est donc pas atteint. Ce phénomène s'explique par la présence d'impuretés (de différentes natures) qui provoquent une nucléation hétérogène rapide dans certaines gouttes et plus lente dans d'autres, donnant les différents régimes observés sur la figure 30b.

### 2.2.3.3 Effet de l'interface solution-huile

Ildefonso et al. ont examiné comment la nature chimique de l'interface des gouttes microfluidiques (huile-eau) pouvait affecter les cinétiques de nucléation du lysozyme, en analysant les fréquences de nucléation qu'ils avaient mesurées précédemment avec différents dispositifs microfluidiques utilisant différentes huiles et matériaux (Ildefonso et al., 2011, Ildefonso, Candoni, et al., 2012b). Dans ces travaux, l'interface huile-eau agit

en tant que le substrat sur lequel les cristaux poussent. Les fréquences de nucléation du lysozyme sont analysées pour deux types de systèmes microfluidiques : la puce en PDMS avec l'huile silicone comme phase continue et le système PEEK/Téflon avec l'huile fluorée comme phase continue. La puce en PDMS est montrée *figure 28a* et *b*. L'autre système, couplant une jonction en PEEK et des capillaires en Téflon (Ildefonso *et al.*, 2013), est représenté *figure 31*. L'huile fluorée FC70 est utilisée pour ce système comme phase continue.



*Figure 31. Schéma et photo du « plug-factory » en PEEK et Téflon. (Ildefonso et al., 2013)*

Les résultats sont analysés à l'aide de l'équation 15. Ildefonso et al. ont observé que  $\gamma_{\text{eff}}(\text{PEEK/Téflon-huile fluorée}) > \gamma_{\text{eff}}(\text{PDMS-huile silicone})$  (*Figure 32*), ce qui signifie que le système PDMS-huile silicone a un effet catalytique<sup>3</sup> sur la nucléation plus important que le système PEEK/Téflon-huile fluorée. De plus, le rapport des pentes (*Figure 32*) est une quantité qui peut être déterminée par l'expérience sans aucune hypothèse et qui est égale au rapport de l'énergie libre d'activation dans les différentes conditions expérimentales. Donc,  $\Delta G^*_{\text{HEN}}(\text{PEEK/Téflon-huile fluorée}) = 3 \times \Delta G^*_{\text{HEN}}(\text{PDMS-huile silicone})$ .

---

<sup>3</sup> L'hétérogénéité du système PDMS/huile silicone est plus efficace puisque la fréquence de nucléation est plus importante comparée au système PEEK/Téflon-huile fluorée.



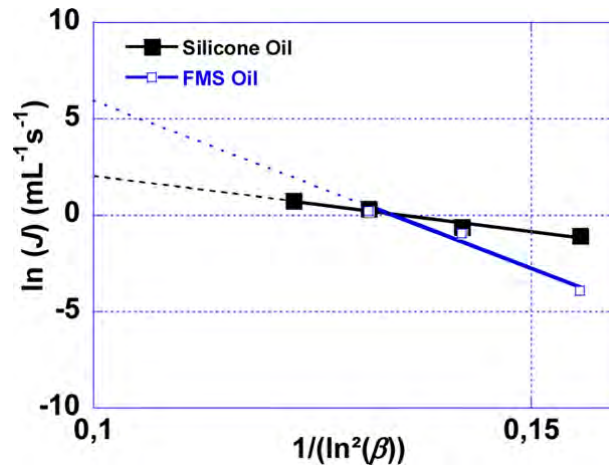


Figure 32.  $\ln(J)$  en fonction de  $1/(\ln \beta)^2$ , (Ildefonso et al., 2013, Ildefonso et al., 2011, Ildefonso, Candoni, et al., 2012b). Les barres d'erreur sont de la taille des symboles.

#### 2.2.3.4 Milieux confinés (nL → fL): effet du confinement

Récemment dans notre laboratoire, un dispositif facile à utiliser et à construire (Figure 33A) a été développé pour former une matrice de gouttes posées (~1000) de phase aqueuse dans l'huile avec des volumes allant du nL au fL sans utiliser de tensioactif (Grossier et al., 2010, Grossier et al., 2011, Rodríguez-Ruiz et al., 2013).

Figure 33. (A) Montage expérimental pour générer des microgouttes: (a) microscope, (b) microcapillaire et (c) nano-déplaceur piézoélectriques XYZ, (B)-(D) séquence montrant la création de gouttes, la taille augmente (de manière contrôlée) avec la vitesse de déplacement du microcapillaire. (Grossier et al., 2010, Grossier et al., 2011)

Dans un premier temps, les gouttes de NaCl sont générées sous huile par un micro-injecteur utilisée en biologie (diamètre interne du capillaire est 0,5µm). Le positionnement et le déplacement du micro-injecteur sont assurés par des nano-déplaceurs piézoélectriques. En contrôlant la pression d'injection et la vitesse de déplacement on contrôle le volume des microgouttes qui sont générées dans le domaine du nL au fL (Figure 33B-D). Ces gouttes de volumes réduits servent de nanocristalloirs sur le phénomène de nucléation/croissance

La figure 34 illustre la nucléation du NaCl dans des gouttes de NaCl 4,5M de 3 à 1pL. Lorsque les gouttes sont générées (Figure 34a-c), le solvant (phase aqueuse) diffuse et la sursaturation augmente fortement. Cette sursaturation est très importante ( $>1,9$ ). Abs qu'en milieu non-confiné cette sursaturation de seuil est plutôt de l'ordre de 1,03 et du confinement sur la nucléation.

Figure 34. Séquence illustrant la nucléation du NaCl dans des gouttes de NaCl 4,5M de 3 à 1pL : (a) à t=0s, (b) à t=4638s et (c) t=6120s. (Grossier et al., 2010)

Les auteurs ont montré que le confinement pouvait empêcher totalement la nucléation de se produire. Il y a alors deux types de confinement: (1) le confinement cinétique classique, car il diminue le volume de cristallisation, puisque  $t_N \sim 1/V$ ; (2) le confinement thermodynamique, car à sursaturations égales, un volume confiné contient beaucoup moins de molécules dissoutes qu'un volume non-confiné. Dans un milieu non-confiné saturé, le nombre de molécules contenues est assez en excès par rapport au nombre de molécules nécessaires pour former un germe critique. Ainsi il est considéré comme un



réservoir infini assurant une sursaturation constante durant la nucléation. Alors que dans un milieu confiné, le réservoir devient fini et la variation de sursaturation au cours de la nucléation doit être prise en compte. Plus le volume est réduit, plus la concentration est diminuée rapidement au moment de la naissance du premier germe, plus le cluster critique est difficile à atteindre et plus il faut une sursaturation initiale élevée pour que la nucléation spontanée soit possible (Figure 35). On peut donc définir, un milieu confiné comme le volume à partir duquel il existe un effet thermodynamique du volume sur la nucléation. Dans le cas du lysozyme, cet effet commence pour des volumes de l'ordre du pL (Grossier & Veessler, 2009)

Figure 35. Valeurs de la sursaturation initiale en fonction du volume de la goutte à partir de laquelle la nucléation devient possible (en rouge: 1 seul cristal, en bleu: 2 cristaux). Cas du lysozyme, pH=4,5, 0,7M NaCl à 20°C (Grossier & Veessler, 2009)

# Chapitre 3. Hydrodynamique

La microfluidique a changé significativement la façon de réaliser les études en chimie et biologie moderne en offrant la possibilité de travailler avec des volumes de réactif plus petits, des temps de réaction plus courts, et des opérations en parallèle (van der Woerd et al, 2003). Ces avantages conférés par la miniaturisation sont reliés à la physique à l'échelle microscopique en microfluidique. La compréhension des phénomènes non-accessibles à l'échelle macroscopique et de faire émerger de nouvelles fonctionnalités et paradigmes expérimentaux. Dans le contexte de cette thèse, la technique microfluidique est dédiée à la cristallisation. Notre but est de générer des gouttes identiques en taille et en composition chimique qui jouent le rôle de nanocristalloirs (Candoniet al., 2012). En outre, c'est également un facteur crucial car cela permet de réaliser des mélanges de solutions. Ainsi, le contrôle des écoulements des phases liquides est primordial.

On commence par introduire les notions générales. Ensuite on présentera les géométries des systèmes microfluidiques ainsi que les différents régimes de génération des gouttes.

### 3.1 Notions hydrodynamiques

Il est important de rappeler que les fluides sont des milieux continus composés de molécules. Des quantités discrètes (i.e. la masse et la force) donnent lieu à des champs continus. Les valeurs représentatives des propriétés sont présentées dans le tableau 2

Tableau 2. Propriétés physiques des fluides (Lide, 1998)

conséquent, le comportement macroscopique des fluides. Dans notre cas, nous nous intéressons à la génération des gouttes. En outre, les quantités discrètes se révèlent aussi dans le phénomène de diffusion - quel que soit les molécules, les "traceurs" ou les additifs, ils vont diffuser à travers le fluide (Squires & Quake, 2005). Une grande variété de phénomènes physiques se produit en microfluidique, et que le comportement macroscopique des fluides va dépendre de la concurrence entre ces phénomènes physiques. On va donc, dans cette partie, introduire et définir les propriétés physiques des phases et les forces principales qui agissent en microfluidique ainsi que les grandeurs sans dimension pour comparer ces forces.

### 3.1.1 Viscosité, contrainte de cisaillement et fluide newtonien

La viscosité est un des paramètres principaux à mesurer lors de l'étude de cisaillement en considérant le mouvement relatif de deux surfaces planes dans un fluide (Figure 36). Ces deux surfaces parallèles à distance  $h$  se déplacent à des vitesses différentes, ce qui crée un gradient de vitesse  $(dv/dy)$  aussi appelé vitesse de déformation ou taux de cisaillement. La viscosité  $\mu$  est définie comme le rapport entre la contrainte de cisaillement  $\tau$  et le gradient de vitesse  $dv/dy$  (Stone, 2007), et est appelé la contrainte de cisaillement. Pour tout fluide qui possède une viscosité, il y a une contrainte de cisaillement tangentielle: les particules de fluide allant plus vite sont freinées par celles allant moins vite. C'est d'ailleurs pour cela qu'il faut exercer une certaine force pour mettre un fluide en mouvement. Lorsque la force nécessaire est linéairement proportionnelle au gradient de vitesse entre les couches, ce type de comportement d'écoulement est appelé "newtonien". Autrement dit, si on double la force exercée, le fluide se déplacera à une vitesse double. Ainsi la contrainte de cisaillement  $\tau$  est donnée par :

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy}$$

Équation 24

- $\tau$  est la contrainte de cisaillement,
- $\mu$  est la viscosité dynamique du fluide,
- $dv/dy$  est le gradient de vitesse.

Figure 36. Ecoulement de cisaillement: écoulement relatif entre les deux couches planes en parallèle. Modèle pour définir et mesurer la viscosité. La direction et la longueur des flèches représentent respectivement la direction et la vitesse du fluide (Stone, 2007).

la contrainte de cisaillement. Dans cette étude de la cristallisation en microfluidique, les fluides étudiés sont tous Newtoniens.

### 3.1.2 Ecoulement entraîné par la pression

fluides parallèles, dans ce cas la vitesse varie linéairement à travers le canal (figure 37a) comme montré précédemment. Néanmoins, la situation réelle en microfluidique est "cas, pour un fluide ayant une viscosité dans un canal cylindrique, la vitesse varie paraboliquement à travers le canal (figure 37b) à maximale au centre du canal. Cet écoulement est appelé « écoulement de Poiseuille » et est décrite par la loi de Poiseuille (Stone, 2007)

Figure 37. (a) (b). (Stone, 2007)

### 3.1.3 Nombre de Reynolds et écoulement laminaire

Dans un écoulement, le nombre de Reynolds (Re) est un nombre sans dimension qui représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses. En microfluidique, Re est défini

$$4 AL \frac{(KN?A @ " E J \acute{A} N R E H \acute{A} ;}{(KN?A R E O M Q A \textcircled{O} O A}$$

Équation 25

- $\rho$  est la densité du fluide
- $v$  est la vitesse du fluide,
- $D$  est le diamètre du canal,
- $\mu$  est la viscosité dynamique du fluide.

Il existe généralement une valeur critique du nombre de Reynolds  $Re_{crit} \approx 2000$  (Figure 38). Lorsque  $Re > 2000$ , le régime est turbulent. Dans ce cas, il est impossible de prédire la position d'une particule en fonction du temps dans un flux. Lorsque  $Re < 2000$ , le régime est laminaire. Dans ce cas, le mouvement est aléatoire en fonction de temps. Du fait de la faible valeur de la taille des canaux microfluidique, les valeurs de  $Re$  sont toujours inférieures à 2000 (Gadde & Hak, 2005).

Figure 38. Représentation de la vitesse et la direction de fluide.

### 3.1.4 Tension interfaciale

Lorsque des gouttes sont générées dans un canal microfluidique, le changement de phase est caractérisé par la tension interfaciale (en N/m) (Baroud et al, 2010). La tension interfaciale est une propriété qui tend à minimiser l'énergie libre. La tension interfaciale peut être définie comme l'énergie par unité de surface. Cette énergie est aussi appelée tension superficielle, énergie interfaciale ou énergie d'interface.

### 3.1.5 Longueur capillaire

La longueur capillaire  $l_c$  est la longueur au-dessus de laquelle l'effet de la gravité microfluidique,  $l_c$  est donnée par,

$$l_c = \sqrt{\frac{\sigma}{\Delta \rho g}}$$

Équation 26

- $\sigma$  est la tension interfaciale,
- $\Delta \rho$  est la différence des densités entre les deux phases,
- $g$  est l'accélération due à la gravité.

### 3.1.6 Nombre de Weber

En microfluidique à gouttes, le nombre de Weber  $We$  est un nombre sans dimension pour paramétrer le processus de la formation ou du détachement de gouttes. Il correspond au rapport entre la force d'inertie et la tension interfaciale (Christopher & Anna, 2007)  $We = \frac{\rho U^2 R}{\sigma}$ . Ainsi,  $We$  est donné par,

$$We = \frac{\rho U^2 R}{\sigma}$$

Équation 27

Pour un écoulement ayant un  $We$  supérieur à 12, les gouttes se désagrègent en de nombreuses petites gouttes avec des tailles inhomogènes. En microfluidique, les valeurs de  $We$  sont généralement faibles et  $We < 1$ . Ainsi, la taille des gouttes est prévisible avec la tension interfaciale. Sachant que  $\sigma = \frac{1}{2} \rho v^2 R$  (Baroud et al., 2010).

### 3.1.7 Nombre capillaire

En microfluidique, les nombres de Reet de We, les forces à considérer lors de l'écoulement dans un canal, sont la tension superficielle et le cisaillement. Par conséquent, on utilise le nombre capillaire  $Ca$ , qui est un nombre sans dimension, pour comparer la tension superficielle et le cisaillement. On définit le nombre capillaire  $Ca$  par :

$$Ca = \frac{\mu U}{\sigma}$$

Équation 28

### 3.1.8 Nombre de Bond

En microfluidique à gouttes, la forme des gouttes est déterminée par une compétition entre la tension interfaciale et la gravité (Berthier & Brakke, 2012). La tension interfaciale aide à minimiser l'aire totale de la goutte en prenant la forme sphérique. Le nombre de Bond  $Bo$ , appelé aussi le nombre d'Eötvös  $Eu$ , est un nombre sans dimension pour prédire la forme de la goutte au sein d'un canal microfluidique (Christopher & Anna, 2007).  $Bo$  est donné par,

$$Bo = \frac{\rho g R^2}{\sigma}$$

Équation 29

$R$  est la dimension caractéristique du système et est souvent égal à la longueur de la goutte. Si  $Bo \ll 1$ , la goutte est sphérique, sinon, la goutte est aplatie contre la paroi du canal par la gravité.

### 3.1.9 Nombre de Péclet

Généralement, il y a deux mécanismes de transferts massiques : le transfert par convection et le transfert par diffusion. Le transfert massique par convection est plus rapide que celui par diffusion. On utilise le nombre de Péclet  $Pe$ , qui est un nombre sans dimension, pour comparer le transfert par convection sur le transfert par diffusion.  $Pe$  est donné par :



$$2 AL \frac{7_4 H D}{\&a}$$

Équation 30

- $U_0$  est la vitesse moyenne d'écoulement axial,
- $h_0$  est une dimension typique du microcanal, par exemple son diamètre,
- $D_m$  est le coefficient moléculaire de la diffusion.

assez important. En microfluidique, les valeurs classiques des paramètres de l'équation 30 sont :  $U_0=0.1$  cm/s,  $h_0=10^{-3}$  à  $10^{-2}$  cm, et  $D_m=10^{-7}$  à  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s (la faible valeur  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s correspond aux macromolécules biologiques comme les protéines). Ainsi,  $10 < Pe < 10^3$  et dans la plupart des cas,  $Pe$  est grand. Ainsi le transfert de masse est plutôt réalisé par convection que par diffusion même si la dimension du microcanal est toujours petite. Dans le cas de la microfluidique en gouttes, les flux sont laminaires avec  $Pe$  élevé, ce qui est un cas particulier et idéal pour le transfert contrôlé et le confinement des réactifs.

La figure 39a montre l'écoulement de deux fluides miscibles au sein d'un microcanal rectangulaire (Ismagilov et al., 2000). La définition de  $Pe$  est donnée par l'équation 30. Les flux laminaires sont observés par microscopie confocale à fluorescence. Figure 39b montre l'écoulement de deux fluides miscibles au sein d'un microcanal rectangulaire. La définition de  $Pe$  est donnée par l'équation 30. Les flux laminaires sont observés par microscopie confocale à fluorescence.

Figure 39. (a) Écoulement de deux fluides miscibles au sein d'un microcanal rectangulaire.

„  $\pm \dot{f} \cdot \%_0 \ddagger ' f'' \ddagger \hat{\hat{}} - \bullet \langle ' \bullet \bullet \ddagger \ddot{\ddot{}} \langle \bullet \text{ flux laminaire est observé par } \dots ' \text{ microscopie confocale à fluorescence. (Ismagilov et al., 2000)$

Ainsi, dans le cas de la cristallisation en gouttes microfluidiques, le mélange se fait plus efficace. Par conséquent, le temps de mélange peut être relativement long du fait des flux laminaires. C'est un avantage si on veut un temps de diffusion long et un milieu sans convection pour obtenir un monocristal de taille suffisante et de bonne qualité. Par contre ça peut être un désavantage si on veut connaître et assurer la condition de réaction car un mélange complet et rapide des flux laminaires adjacents est nécessaire. Pour cela, on peut mettre des ondulations dans le canal (Stonet al., 2004; Wiggins & Ottino, 2004; Squires & Quake, 2005) à l'intérieur des gouttes (Figure 40) (Song et al., 2003). On peut également réduire le volume des réacteurs, c'est-à-dire des gouttes, pour réduire le temps de diffusion et donc de réaction.

Figure 40. Le mélange amélioré par l'ondulation du canal à l'intérieur des gouttes qui se sont servies en tant que les réacteurs chimiques isolés (Song et al., 2003)

## 3.2 Génération des gouttes

### 3.2.1 Géométries des systèmes microfluidiques

Les méthodes de génération de gouttes sont basées sur la génération de gouttes à partir de l'écoulement de deux phases immiscibles. Les trois méthodes les plus répandues sont celle du « coflowing » (Figure 41a) (Umbanhowar et al., 2000, Garstecki et al., 2005), celle du « cross-flowing » (Figure 41b) (Thorsen et al., 2001, Garstecki et al., 2006, Glawde et al., 2012b) et celle du « flow-focusing » (Figure 41c) (Anna et al., 2003, Gañán-Calvo & Gordillo, 2001, Gañán-Calvo, 2004). Dans les trois méthodes la phase dispersée est poussée dans un microcanal où elle va rencontrer une phase continue (immiscible avec la phase dispersée) qui est poussée de façon indépendante. La géométrie de la jonction où les deux fluides se rencontrent est conçue pour optimiser la reproductibilité de la production des gouttes.

Figure 41. Schémas des trois mécanismes de génération de gouttes : (a) coflowing, (b) flow-focusing et (c) cross-flowing. Baroud et al., 2010

#### 3.2.1.1 Méthode du « coflowing »

La méthode du « coflowing » nécessite une géométrie coaxiale (Figure 41a) où le flux interne de la phase dispersée est entraîné dans le même sens que le flux externe de la phase continue, à l'intérieur de canaux concentriques. Les dispositifs expérimentaux utilisant la géométrie coaxiale sont souvent construits en insérant un capillaire dans un autre capillaire (Utada et al., 2007, Guillet et al., 2007).

### 3.2.1.2 Méthode du « flow-focusing »

La méthode du « flow-focusing » nécessite une jonction en forme de croix qui permet aux flux de se croiser. La phase dispersée s'écoule à travers le canal principal droit (flux 1). La phase continue arrive par deux canaux latéraux (flux 2 et 3) et vient « pincer » le flux de phase dispersée au niveau de la jonction en croix. Ainsi des gouttes de phase dispersée sont formées et portées par le flux dans le canal de sortie (flux 4) (*Figure 41b*).

### 3.2.1.3 Méthode du « cross-flowing »

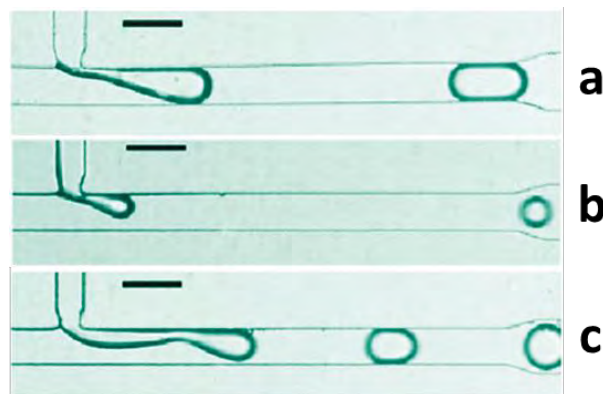
La méthode de « cross-flowing » a été introduite pour la première fois par Thorsen et al. avec une jonction en T (Thorsen *et al.*, 2001), et a été ensuite adoptée pour former des gouttes (Glawdel *et al.*, 2012b, Xu *et al.*, 2006, Xu *et al.*, 2008). La phase continue s'écoule à travers un canal principal droit, et la phase dispersée arrive perpendiculairement par un canal latéral (*Figure 41c*).

## 3.2.2 Régimes de génération des gouttes

Dans la littérature, un grand nombre de simulations et d'études expérimentales sont réalisées à partir des trois géométries vues au-dessus. Dans le contexte de cette thèse, on a choisi la méthode de « cross-flowing » pour générer les gouttes, soit avec une jonction en T, soit avec une jonction en croix. Pour présenter les différents régimes de génération des gouttes en « cross-flowing », on prend l'exemple de la jonction en T qui est la plus décrite dans la littérature (Thorsen *et al.*, 2001). Quatre régimes sont couramment décrits et sont reliés au nombre capillaire  $Ca$  calculé à partir de la vitesse et de la viscosité de la phase continue (*Équation 28*):

- le régime « squeezing » correspond à une goutte qui remplit le canal de sortie (*Figure 42a*) avant de se détacher dû à la chute de pression interne (Garstecki *et al.*, 2006). La longueur de la goutte est supérieure au diamètre du canal de sortie ce qui lui confère le nom de « plug ». Ce régime est observé aux faibles valeurs de  $Ca$ .
- le régime « dripping » correspond à une goutte qui ne remplit pas le canal de sortie avant de se détacher (*Figure 42b*). dû à la contrainte de cisaillement de la phase continue (Thorsen *et al.*, 2001). Sa taille est donc inférieure à celle du canal de sortie. Ce régime est observé aux valeurs de  $Ca > 0,01$ .

- le régime « jetting » correspond à un écoulement de la phase dispersée sous forme d'un fil ou d'un jet (*Figure 42c*). Lorsque la tension interfaciale est faible, le jet se déstabilise pour former des gouttes (*De Menech et al., 2008*) qui sont transportées par l'écoulement de la phase continue. Ce régime est observé aux valeurs très élevées de  $Ca$ .
- le régime transitoire est le régime intermédiaire entre le « squeezing » et le « jetting » (*Xu et al., 2008*). Le détachement des gouttes est contrôlé à la fois par la chute de pression et la contrainte de cisaillement. Même si la plupart des auteurs ne décrivent pas ce régime transitoire, une valeur critique de  $Ca \sim 0.015$  peut être définie (*De Menech et al., 2008*).



*Figure 42. Trois régimes de gouttes dans la jonction en T. (a) Squeezing, (b) Dripping, (c) Jetting. (Zagnoni et al., 2010)*

### 3.2.3 Caractérisation des gouttes

Dans la littérature, de nombreuses études et simulations expérimentales s'intéressent aux propriétés des gouttes. A notre connaissance, les géométries étudiées sont en général planes avec une section rectangulaire de 50 à 300  $\mu\text{m}$  de côté. Les gouttes sont caractérisées par les propriétés des phases telles que la viscosité (*Xu et al., 2008, Garstecki et al., 2006*) et la tension interfaciale (*Thorsen et al., 2001, Wehking et al., 2014*), par les dimensions des canaux telles que leur hauteur et leur largeur (*Glawdel et al., 2012a, b, van Steijn et al., 2010*) et par les paramètres opératoires tels que les débits des phases dispersée et continue et le ratio de ces débits (*Christopher & Anna, 2007, Gupta & Kumar, 2010, Tice et al., 2004*). Les paramètres des gouttes généralement étudiés sont leur taille, en utilisant leur diamètre (*Xu et al., 2006, Thorsen et al., 2001, Liu & Zhang, 2009a*) ou leur volume (*Wehking et al., 2014, van Steijn et al., 2010, Gupta & Kumar, 2010*) et leur forme (*Garstecki et al., 2006, Xu et al., 2008*).

# **Chapitre 4.**

## **Matériels et méthodes**

Ce chapitre a pour but de présenter l'ensemble des matériaux étudiés (molécules, solvants, huiles), le matériel constituant le système microfluidique, ainsi que les méthodes utilisées pendant ces 3 années de doctorat.

## 4.1 Matériaux : solutions et huiles pertinentes

Dans cette partie on commence par présenter les molécules étudiées dans cette thèse et leurs milieux de cristallisation (solvants). On décrit ensuite les huiles utilisées et leurs propriétés physico-chimiques (structure chimique, viscosité, masse volumique,...). On explique à la fin comment choisir l'huile en fonction des milieux de cristallisation (immiscibilité, viscosité, mouillabilité...) pour que notre système microfluidique soit efficace.

### 4.1.1 Molécules étudiées

Pour chaque molécule, on présente brièvement sa structure biologique, son rôle, son origine, ses propriétés physico-chimiques (masse moléculaire, densité, point isoélectrique...) et ses conditions de cristallisation.

#### 4.1.1.1 Urate oxydase recombinante ou Rasburicase

L'urate oxydase, retrouvée largement dans de nombreux organismes, est une enzyme qui intervient dans la dégradation de l'acide urique. Chez les mammifères, l'urate oxydase participe à l'expulsion d'excès d'azote dans l'organisme en facilitant la dégradation des purines en allantoiné qui est un composé plus soluble. Cependant, l'urate oxydase n'est pas produite naturellement chez l'homme. Par conséquent, l'acide urique est le produit terminal du métabolisme des purines, qui est très peu soluble dans les conditions physiologiques. L'accumulation rénale d'acide urique (signe fréquent d'un syndrome de lyse tumorale) est un effet secondaire du traitement de certains cancers très chimio sensibles (Spada, 2005, Giffard *et al.*, 2009).

Initialement, l'urate oxydase était directement extraite du champignon « *Aspergillus flavus* », ainsi appelée l'urate oxydase « extractive ». Elle était stabilisée avec un inhibiteur, la 8-azaxanthine. La structure tridimensionnelle de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* a été résolue pour la première fois en 1997, sur l'urate oxydase extractive (Colloc'h *et al.*, 1997). L'urate oxydase est un homotétramère dont chaque monomère est constitué de 301 acides aminés, ayant une masse d'environ 34 kD. Sans présence de ponts disulfures, les monomères sont reliés entre eux par de faibles liaisons

ioniques. L'acide aminé N terminal est une sérine N- $\alpha$ -acétylé (Jean-Marc *et al.*, 2005). La résolution de cette structure, à 2,05 Å, a confirmé que l'urate oxydase était un tétramère dont les dimensions externes sont comprises entre 60 et 85 Å (Figure 43).

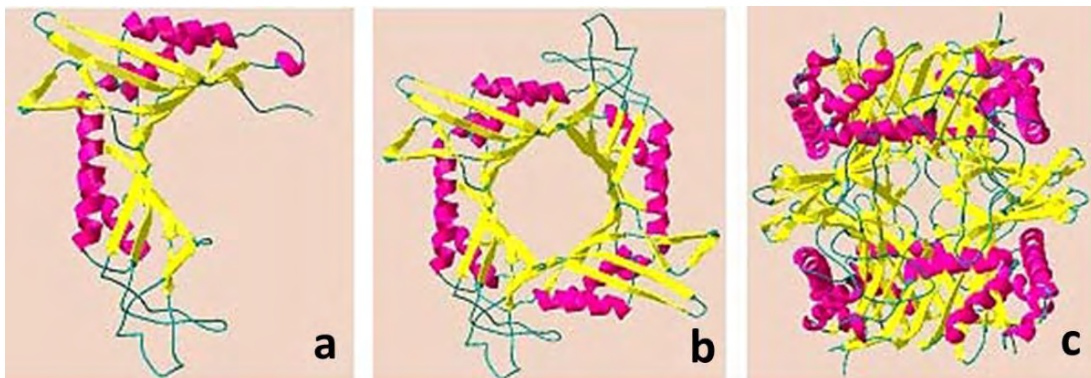


Figure 43. Structure de l'urate oxydase. (a) monomère. (b) dimère (vue supérieure). (c) tétramère, composé de l'empilement de dimères (vue latérale). (Giffard *et al.*, 2009)

L'urate oxydase recombinante (ou la rasburicase) est le principe actif du premier produit biotechnologique issu de la recherche Sanofi-Aventis, Fasturtec®, approuvé en Europe en 2001. Elle est utilisée comme un médicament indiqué dans la prévention et le traitement de l'hyperuricémie (accumulation d'acide urique) aiguë, liée au traitement des cancers hématologiques (leucémies, lymphomes et myélomes) et des tumeurs solides malignes (Giffard *et al.*, 2009). La principale différence avec l'urate oxydase extractive est que la rasburicase n'est pas complexée à la 8-azaxanthine. Elle présente la même structure que l'urate oxydase d'*Aspergillus Flavus*, mais elle est plus pure (Bayol *et al.*, 1995).

Les expériences d'*Iso Electro Focusing*, réalisées par Giffard *et al.*, montrent que la rasburicase dans le tampon de cristallisation (Tris 50mM pH 8) présente deux bandes principales à des points isoélectriques pI de ~7,5 et 7,8 et une bande mineure à pI~7,3 (Giffard *et al.*, 2008). La stabilité optimale de cette enzyme est à pH 7,5.

La cristallogénèse de l'urate oxydase recombinante a été déjà réalisée dans notre laboratoire, au cours de la thèse de Marion Giffard, qui avait pour but d'utiliser la cristallisation comme méthode de purification. Ci-après, on présente les résultats principaux que Marion Giffard a obtenus pendant sa thèse, tels que la solubilité, les faciès et les polymorphes de la rasburicase.



#### 4.1.1.1.1 Solubilité de la rasburicase

La solubilité de la rasburicase a été mesurée, par Giffard *et al.*, en fonction de la température entre 6 et 20°C dans le tampon Tris 50mM à pH 8 (Figure 44). Il est à noter que la solubilité est basse et ne varie pas beaucoup dans cette gamme de température. Dans ce cas-là, la formation de nombreux petits cristaux en aiguille ou en plaquette (Figure 45) au lieu de quelques gros cristaux est observée. Il est suggéré que la zone métastable est étroite.

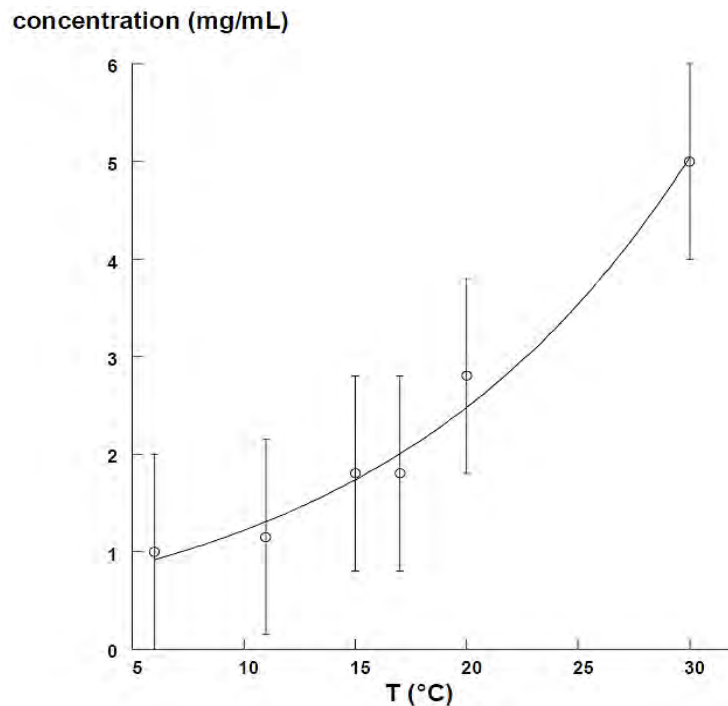


Figure 44. Courbe de solubilité de la rasburicase en fonction de la température entre 5 et 30°C, dans le tampon Tris 50 mM pH 8.(Giffard *et al.*, 2008)

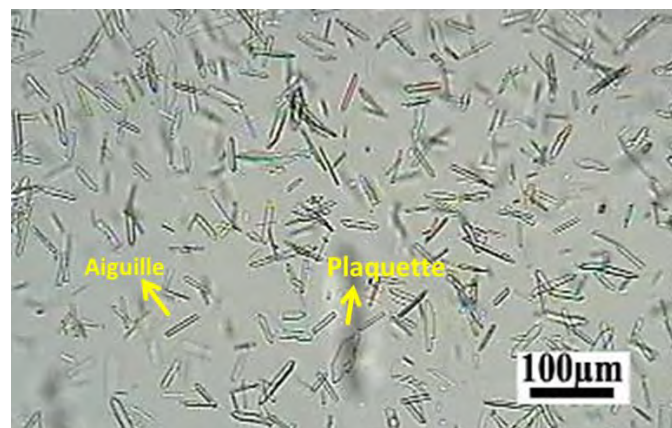


Figure 45. Cristaux de rasburicase. Conditions de cristallisation : 50 mM Tris pH 8, 10°C. (Giffard *et al.*, 2009)

#### 4.1.1.1.2 Effets de l'ajout de polymère

Le rôle du Poly Ethylène Glycol (PEG) sur la cristallisation de la rasburicase est d'induire des interactions attractives, dites de déplétion (Vivarès *et al.*, 2002, Vivares & Bonnete, 2002). La solubilité de la rasburicase est mesurée, par Giffard *et al.* (Giffard *et al.*, 2008) en fonction de la concentration en PEG 8000 dans le tampon Tris 50 mM pH 8, avec et sans sel (100 mM KCl et NaCl) (Figure 46). Il est clairement montré que l'effet attractif du PEG est valable à la fois pour les expériences avec et sans sel.

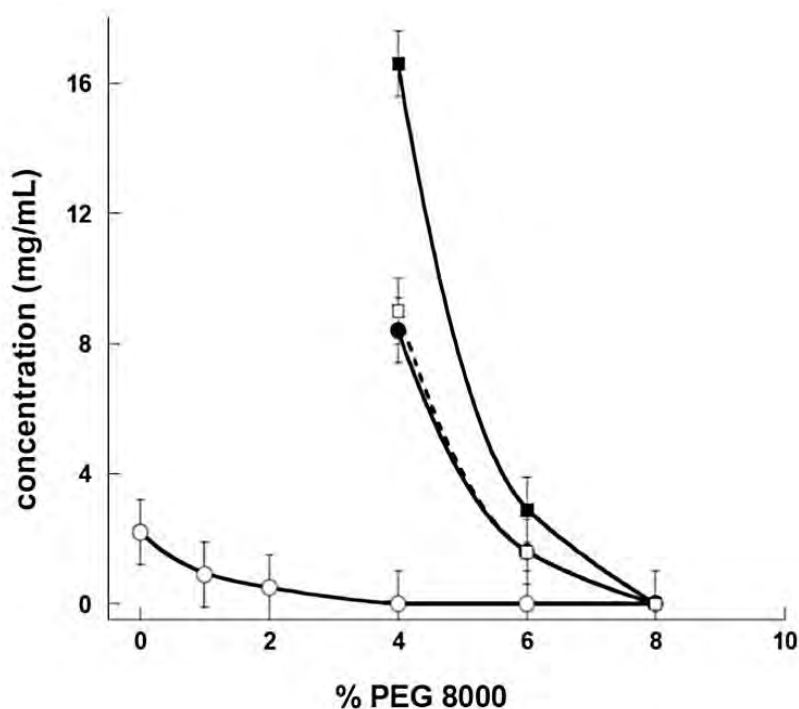


Figure 46. Variation de la solubilité de la rasburicase en fonction de la concentration massique de PEG 8000. Conditions de cristallisation : Tris 50mM, pH 8, à 20°C. (O) sans sel, (●) avec 100mM de NaCl, (■) avec 100mM de KCl donnant un polymorphe métastable, (□) avec 100mM de KCl donnant un polymorphe stable (Giffard *et al.*, 2008).

#### 4.1.1.1.3 Faciès cristallins et polymorphes

Dans une étude antérieure (Vivares *et al.*, 2006), les faciès et les polymorphes de l'urate oxydase extractive, toujours complexée à la 8-azaxanthine, avaient déjà été analysés en fonction de la concentration en PEG ajoutée (Figure 47).

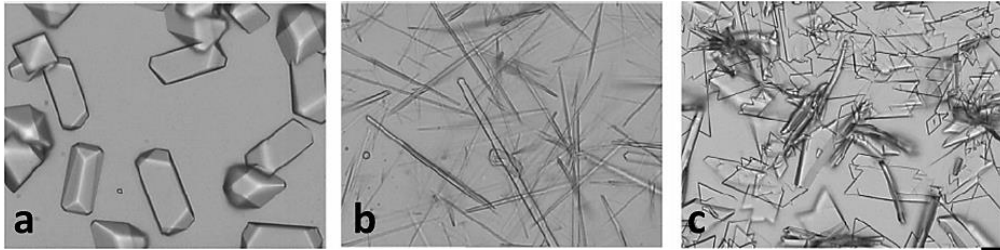


Figure 47. Faciès des cristaux d'urate oxydase extractive observés aux différentes concentrations de PEG. (a) et (b) sont les faciès stables obtenus à des concentrations en PEG inférieures à 8 %. (a): cristaux massifs. (b) : cristaux en aiguille. (c) : faciès stables (cristaux en plaquettes) obtenus à des concentrations en PEG supérieures à 8 %. Barre d'échelle est 225 $\mu$ m. (Vivares et al., 2006)

Généralement, l'urate oxydase présente trois faciès cristallins - massif, aiguille et plaquette, les massifs (Figure 47a) et les aiguilles (Figure 47b) sont les mêmes polymorphes (Vivares et al., 2006). Pour de faibles sursaturations (PEG 8000 5%), les cristaux sont massifs (Figure 47a) alors que pour de plus fortes sursaturations (PEG 8000 6%), ils sont sous forme d'aiguilles (Figure 47b). Pour des concentrations encore plus élevées de 7%, 8% et 9%, un troisième faciès cristallin est observé : les cristaux sont sous forme de plaquettes (Figure 47c). Ces plaquettes correspondent à une variété polymorphique différente. Vivares et al. ont proposé un diagramme de phases des deux polymorphes (polymorphe I : massif/aiguille ; polymorphe II : plaquette) (Figure 48).

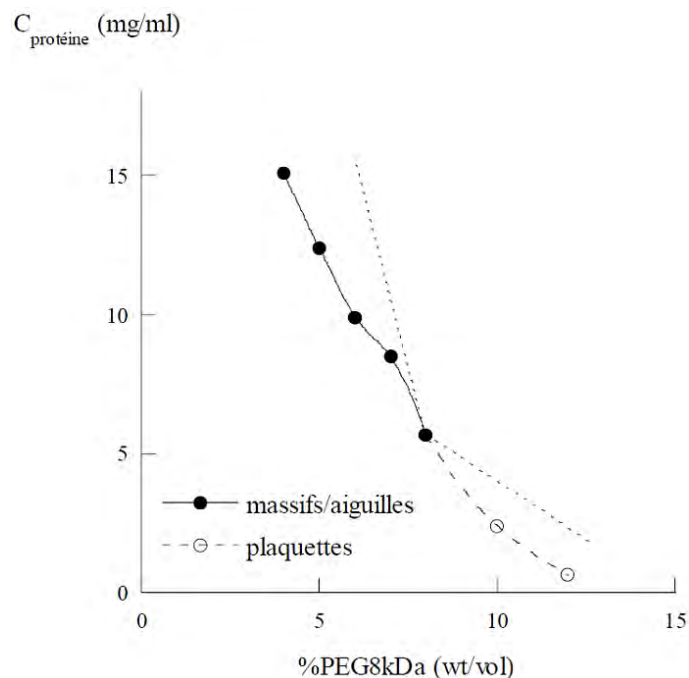


Figure 48. Courbes de solubilité des deux polymorphes observés. Les courbes en pointillés courts correspondent aux prolongements théoriques des deux courbes de solubilité (Vivares et al., 2006).

Il est à noter qu'il n'y a pas de différence majeure entre les structures cristallines de la rasburicase et de l'urate oxydase extractive (Giffard *et al.*, 2009). De plus, il a été montré que la rasburicase est plus pure que l'urate oxydase extractive. La rasburicase présente aussi deux polymorphes : polymorphe I : massif/aiguille et polymorphe II : plaquette.

#### 4.1.1.1.4 La rasburicase utilisée dans cette thèse

Pour valider le système microfluidique dans le cas d'un milieu visqueux et complexe, la cristallisation de la rasburicase en tampon Tris 50mM KCl 30mM pH 7,5, en présence de PEG 8000 est testée dans cette thèse. Il s'agit de résoudre les problèmes de génération des gouttes avec une solution visqueuse, d'homogénéité en composition chimique dans les gouttes lors du mélange de deux phases aqueuses de viscosités différentes et du risque de précipitation au moment du mélange.

## 4.1.2 Le Lysozyme

Le lysozyme de blanc d'œuf est une protéine qui a une masse de 14,6 kDa. C'est une protéine globulaire formée d'une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés. Il s'agit d'un des antibiotiques et antibactériens les plus puissants (Erlandsen *et al.*, 1974, A. Pellegrini, 1992, H. Jentsch, 2003), et il est présent naturellement en forte concentration dans les larmes, la salive et le sérum des vertébrés. Cependant celui qu'on trouve chez les vertébrés est formé d'une chaîne polypeptidique de 130 acides aminés (Revalor, 2009).

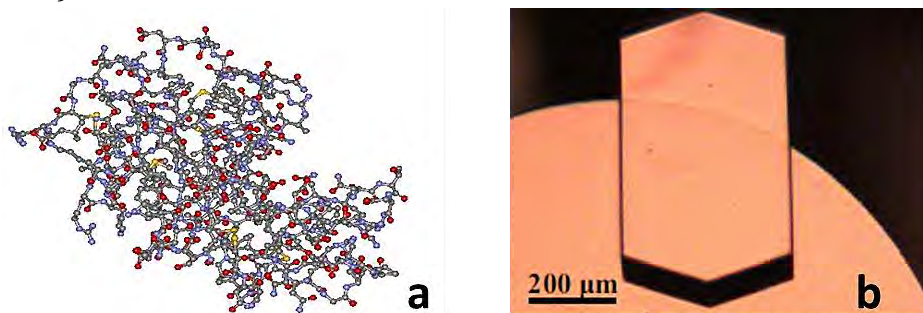


Figure 49. Représentation de la molécule de Lysozyme de blanc d'œuf et cristal (Revalor, 2009).

Il est présent en solution sous forme de monomères. Le point isoélectrique, pI, du lysozyme est 11,2. Les valeurs de pH le plus souvent employées dans ces études, est pH=4,5 dans 0,7 M de NaCl (Erlandsen *et al.*, 1974, A. Pellegrini, 1992, H. Jentsch, 2003). A pH=4,5, le lysozyme est électriquement chargé positivement, il contient de 10 à 12 charges positives. Dans cette thèse, le lysozyme est choisi pour valider la caractérisation en ligne des compositions chimiques des gouttes en mesurant l'absorbance du lysozyme aux UV dans chaque goutte.

### 4.1.3 Phases en microfluidique : solvant et huiles

Les phases présentes en microfluidique sont la phase dispersée (solvant et/ou solution à cristalliser) et la phase continue (huile). Les solvants de cristallisation, aussi appelés les milieux, sont importants pour la génération des gouttes et la réalisation des conditions de cristallisation. Dans la partie sur l'étude hydrodynamique du montage microfluidique, on étudie les régimes de formation des gouttes pour un solvant organique donné qui est l'éthanol. Dans la partie sur l'étude de la cristallisation, on valide le système microfluidique pour un milieu (solvant) visqueux – la rasburicase est cristallisée dans une solution aqueuse de PEG. L'huile, c'est-à-dire la phase continue, est choisie selon plusieurs critères liés à leurs propriétés physiques. Une bonne capacité de mouillage avec la paroi du capillaire (en Téflon) est nécessaire afin de former des gouttes de la phase dispersée dans l'huile et non des gouttes d'huile dans la phase dispersée. L'immiscibilité entre l'huile et le solvant de cristallisation est indispensable. La densité, la viscosité de l'huile et la tension interfaciale huile/solvant sont cruciales pour générer les gouttes appropriées pour l'expérience de cristallisation. Ci-dessous voici la liste des huiles utilisées en fonction des milieux de cristallisation :

- Pour les solvants aqueux, nous avons utilisé de l'huile FMS (Hampton Research, Poly-3,3,3-trifluoropropylmethylsiloxane) qui est une huile *silicone-fluoré* présentant une affinité pour le Téflon (*Figure 50a*). Ainsi les gouttes de solvant aqueux sont stabilisées à l'intérieur du capillaire, avec des formes bien rondes. De plus, les gouttes peuvent être stockées dans le capillaire pendant au moins une semaine sans coalescer.
- Pour les solvants organiques, étant donné que l'huile FMS y est partiellement miscible (comme dans l'acétone), nous avons choisi de l'huile FC-70 (3M™ Fluorinert™ *Electronic Liquid*) qui est un composé carboné et fluoré (*Figure 50b*). L'huile FC70 est immiscible avec un maximum de solvants organiques et est suffisamment mouillante vis-à-vis du Téflon pour stabiliser les gouttes dans les capillaires de stockage.

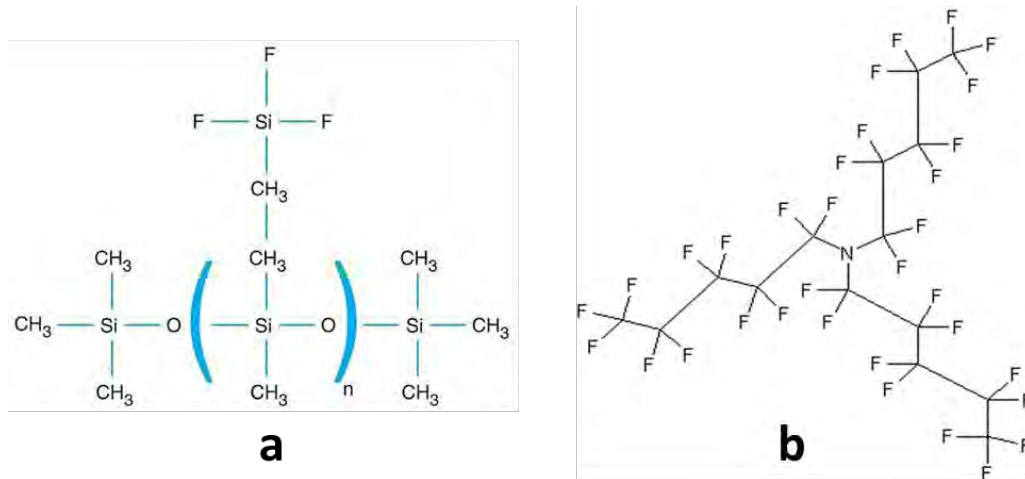


Figure 50. Formule chimique de l'huile (a) FMS et (b) FC70.

Les propriétés physiques des deux huiles sont données dans le *tableau 3*.

	huile FC70	huile FMS	éthanol	PEG 0%	PEG 2.5%	PEG 5%	PEG 7.5%	PEG 10%
masse volumique $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	1940	1250-1270	789	1002,60	1005,25	1006,40	1019,67	1027,00
Viscosité cinématique $\nu \times 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	12	350-450	0,0152	1,00	2,24 <sup>a</sup>	2,75 <sup>b</sup>	4,89 <sup>a</sup>	8,70
Viscosité dynamique $\mu$ (10 <sup>-2</sup> ×kg/(m×s))	2,33	43,75	0,12	0,1	0,23	0,28	0,50	0,89 <sup>c</sup>

Tableau 3. Propriétés physiques des différentes phases. <sup>a</sup> Marcq personal communication, <sup>b</sup> (Ninni et al., 2003), <sup>c</sup> (Gonzalez-Tello et al., 1994) et les % correspondent à des solutions de PEG 8000 dans l'eau.



## 4.2 Système microfluidique

On rappelle que l'objectif de cette thèse est de développer un outil microfluidique polyvalent qui soit compatible pour la cristallisation de tout type de molécules dans tout milieu. En plus de cela, notre désir de rendre la technologie microfluidique plus accessible conduit à la notion de « microfluidique modulable », avec laquelle les utilisateurs peuvent construire un système microfluidique en utilisant une boîte à outils avec des variables techniques constitutifs – le stockage, le mélange, la génération et la détection des gouttes, etc. (Trivedi *et al.*, 2010) La figure 51 présente l'ensemble du montage microfluidique que j'ai développé au cours de ma thèse (les réalisations mécanique et électronique ont été confiées en partie à la société ANACRISMAT).

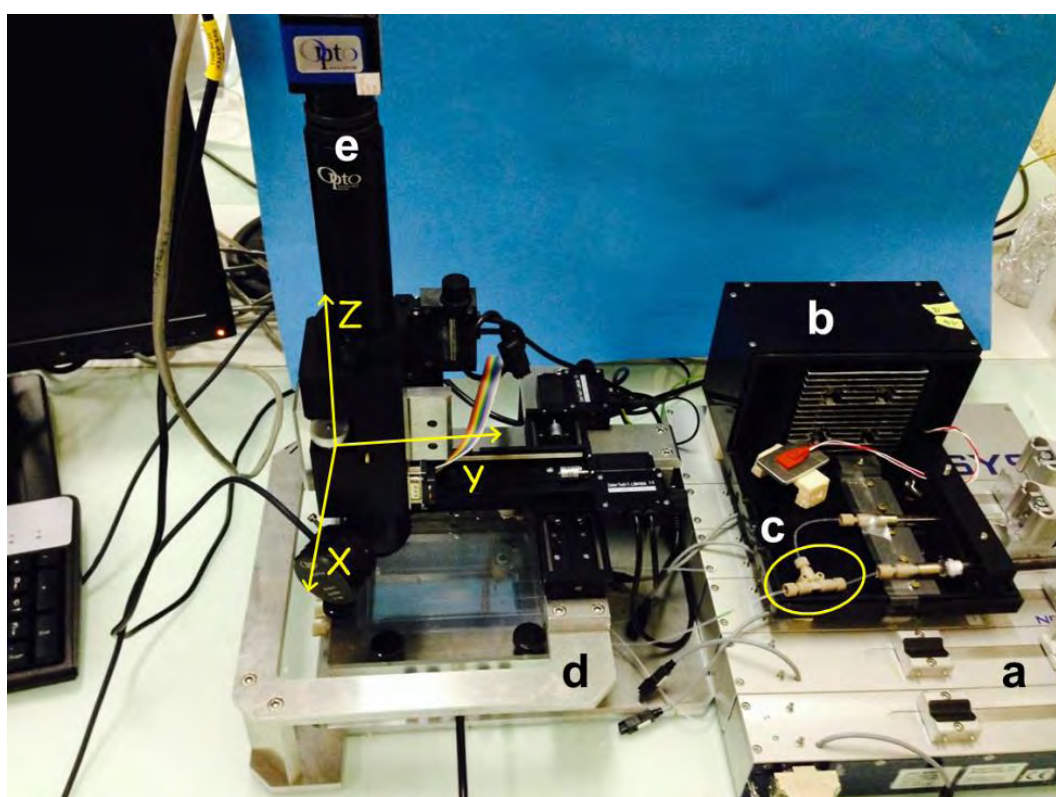


Figure 51. Ensemble du système microfluidique. (a) Pousses-seringue, (b) Enceinte thermostatée pour les seringues, (c) Jonction microfluidique, (d) Porte-capillaire thermostaté, (e) Caméra avec zoom motorisée en XYZ.

Ce système est composé de quatre modules avec des fonctions différentes : (1) le mélange des phases et la génération des cristalliseurs (pousse-seringues (Figure 51a et b), jonctions microfluidiques (Figure 51c), (2) l'incubation des gouttes (Figure 51d), (3) l'observation de la nucléation et la croissance dans les gouttes (Figure 51e) et (4) la caractérisation des gouttes en ligne par leur taille et leur composition chimique (non

présentée dans cette figure). L'ensemble du système est flexible et modulable, chaque module est indépendant et peut être associé avec d'autres modules, démonté ou remonté selon le besoin de l'expérimentateur. Dans nos études, l'incubation et l'observation sont réalisées en même temps, permettant ainsi l'observation *in situ* des gouttes pendant l'incubation (Figure 51*d et e*).

## 4.2.1 Génération des gouttes

Les gouttes sont générées grâce à l'écoulement des différentes phases, géré par des pousses-seringues, dans des capillaires et à leur rencontre dans une jonction.

### 4.2.1.1 Jonctions et capillaires

Le choix du matériau des capillaires et de la méthode de génération des gouttes sont des questions cruciales dans l'utilisation des systèmes microfluidiques. Dans cette thèse, les jonctions microfluidiques qui servent à former les gouttes, et que nous appelons « *plug-factory* », sont celles conçues pour les systèmes HPLC (Chromatographie en phase liquide à haute performance) pour faire circuler des solvants sous fortes pressions dans des capillaires de diamètre interne allant de  $\sim 100\mu\text{m}$  à 1mm (IDEX Health and Science). Ces jonctions sont en PEEK (poly-éther éther cétone) – un polymère plastique inerte, très résistants aux solvants organiques. Les jonctions microfluidiques existent avec plusieurs géométries (Figure 52). Avec les géométries présentant plus de 3 entrées, plusieurs phases dispersées peuvent être mélangées dans les gouttes (Figure 52*b et c*).

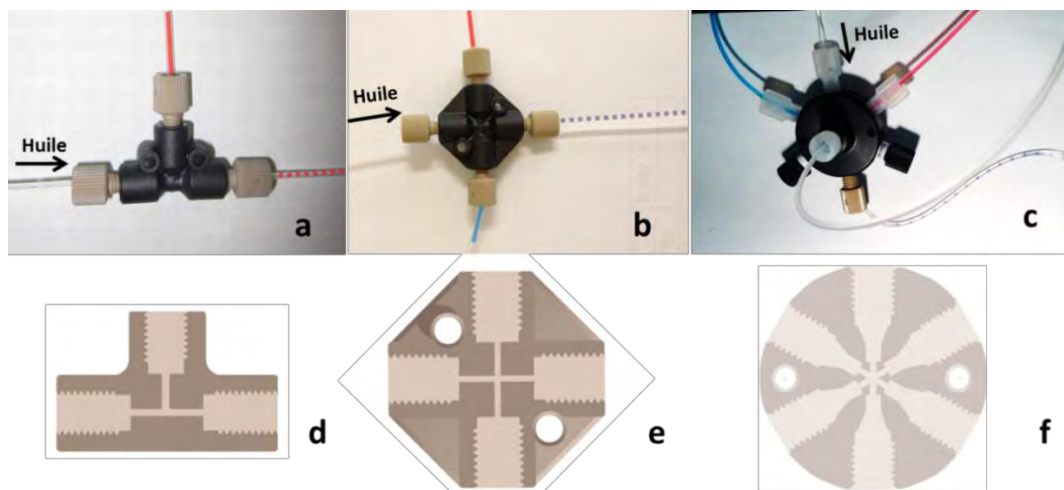


Figure 52. Photos des jonctions microfluidiques (a) en T, (b) en croix, (c) avec 6 entrées/sorties, appelés multiports. (d), (e) et (f) : Schémas respectifs des canaux intérieurs dans les jonctions (catalogue IDEX Health and Science).



Les jonctions en PEEK sont couplées avec des capillaires en Téflon qui présentent l'avantage d'être compatibles avec tous les solvants organiques. Ce genre de capillaire est aussi capable d'éviter toute évaporation même après une semaine de stockage à température ambiante, comme démontré par Ildefonso *et al.* par des mesures de l'évolution de la taille des gouttes (Ildefonso, Candoni, *et al.*, 2012a). Les diamètres internes et externes des capillaires sont calibrés et uniformisés avec les jonctions microfluidiques pour permettre toutes sortes de connexions. Au cours de cette thèse j'ai principalement utilisé des diamètres internes de 508 $\mu\text{m}$  (P-729 IDEX Health and Science) et 1016 $\mu\text{m}$  (P-714 IDEX Health and Science).

#### 4.2.1.2 Système des pousSES-seringue : débits et gradient

Pour réaliser les gouttes, la phase continue et la phase dispersée sont chargées séparément dans des seringues distinctes placées dans une plateforme de pousse-seringues neMESYS (Figure 51a). Ces pousse-seringues peuvent générer des écoulements microfluidiques avec des débits précis à partir de 0.01 $\mu\text{L/s}$ , extrêmement réguliers et sans pulsation. Cette plateforme neMESYS est programmable par ordinateur via une interface qui permet de délivrer un gradient de débit (Figure 53a) allant de quelques  $\mu\text{L/h}$  à plusieurs milliers de  $\mu\text{L/h}$ . Lorsque deux solutions sont mélangées, ce gradient de débit peut se traduire par un gradient de composition chimique dans les gouttes (Figure 53b).

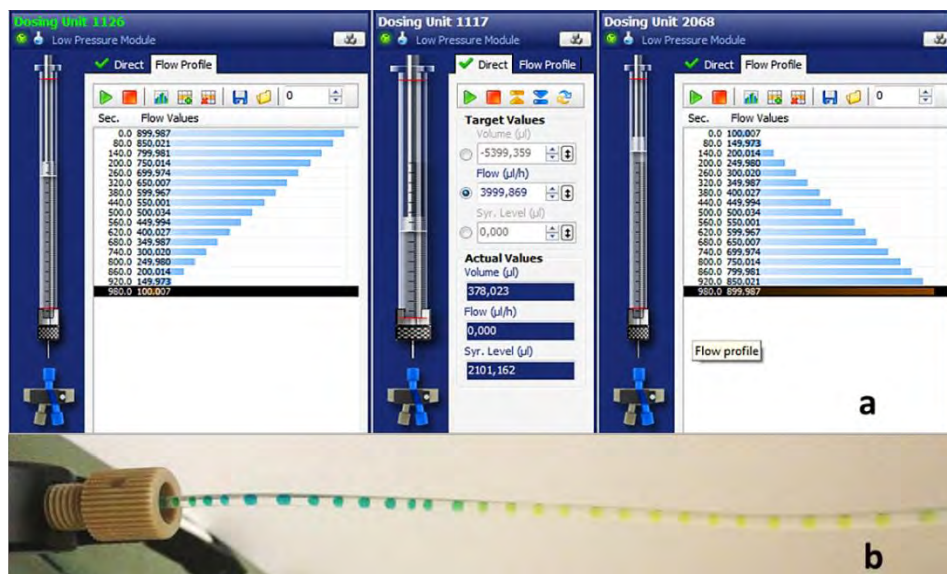


Figure 53. (a) Interface logicielle du système programmable du pousse-seringues « neMESYS », dont les gradients fins sont appliqués sur le « Dosing Unit 1126 » et le « Dosing Unit 2068 » (deux seringues). (b) Gradients de composition chimique dans des gouttes, illustrés par le mélange de 2 colorants, dont les débits sont générés par les « Dosing Unit 1126 » et « Dosing Unit 2068 » du (a).

Le système de pousse seringues peut être complété par une enceinte thermostatée qui permet de chauffer les solutions dans les seringues, à des températures allant jusqu'à 65°C (Figure 51b). Ceci permet d'éviter la cristallisation dans les seringues et les capillaires dans le cas de solutions très sursaturées. L'enceinte thermostatée se compose d'une partie chauffante ventilée, d'un capot transparent et d'une sonde de température (ANACRISMAT). La partie motrice des pousse-seringues étant sensible aux fortes températures, l'enceinte est placée à 1cm au-dessus des pousse-seringues.

## 4.2.2 Incubation et observation des gouttes

L'incubation des gouttes est réalisée par un porte-capillaire (ANACRISMAT) qui est régulé en température grâce à un bain thermostaté (Figure 51d, Figure 54). Le bain thermostaté permet d'une part d'incuber les gouttes et d'autre part d'immerger le capillaire pour faciliter l'observation par adaptation d'indice optique. Le porte-capillaire présente plusieurs entrées et sorties qui permettent d'incuber soit un capillaire de 72cm contenant environ 300 gouttes (pour un diamètre interne de 500 $\mu$ m) jusqu'à 6 capillaires de 12cm de longueur contenant une cinquantaine de gouttes chacun (pour un diamètre interne de 500 $\mu$ m) (Figure 54b et c).

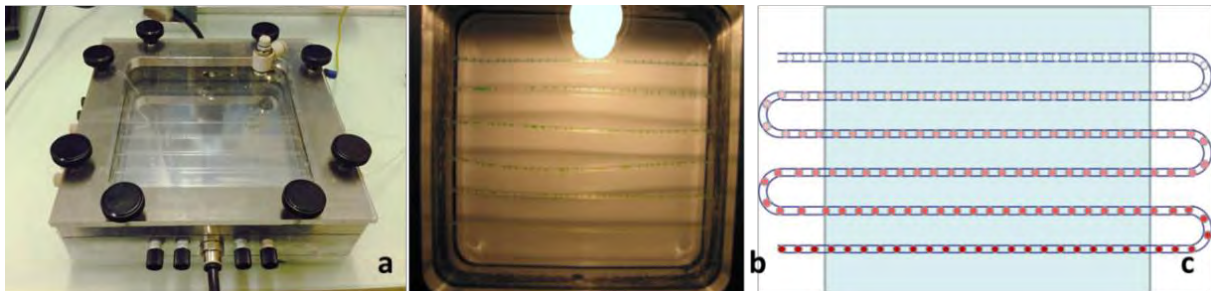
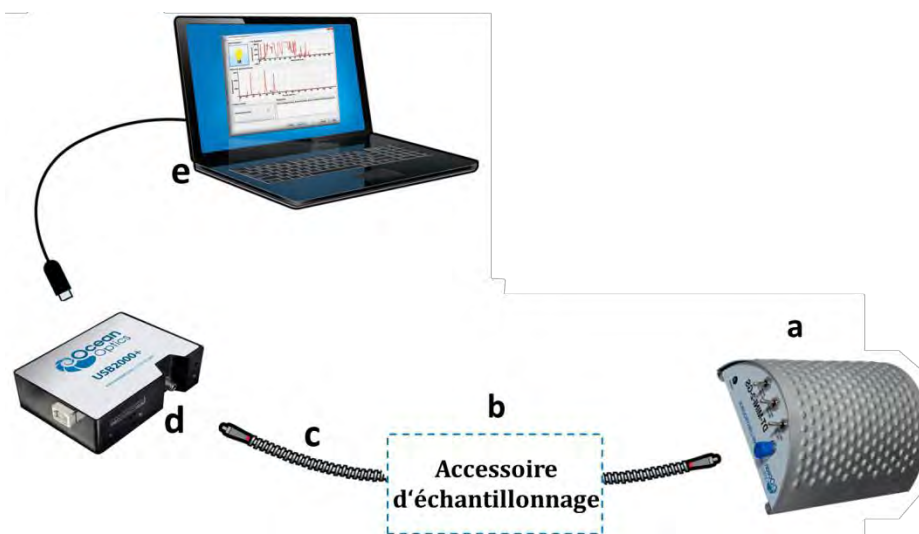


Figure 54. Photos (a) du porte-capillaire avec plusieurs entrées et sortie et (b) des gouttes incubées dans le porte-capillaire. (c) Schéma des gouttes en gradient de composition chimique dans le porte-capillaire.

L'observation des gouttes est réalisée à l'aide d'une caméra (OPTO à zoom variable motorisée montée sur une table motorisée XYZ (Figure 51e). Enfin, les images des gouttes sont traitées par un logiciel d'analyse d'images, ImageJ (NIH, USA). Les films d'évolution des gouttes, au cours de l'incubation, sont montés par le logiciel Movie Maker 12 (© 2015 Microsoft).

### 4.2.3 Caractérisation en ligne des gouttes

Le troisième module du montage vise la « caractérisation en ligne » des compositions chimiques des gouttes par absorbance UV-Vis. Ce module, présenté sur la *figure 55*, se compose d'une source de lumière (*Figure 55a*), d'une cellule d'échantillonnage pour les gouttes en circulation (*Figure 55b*), de deux fibres optiques (*Figure 55c*), d'un spectromètre (*Figure 55d*) et d'une interface logicielle pour la lecture des données (*Figure 55e*). Pour ce module, j'ai d'abord testé des outils commerciaux pour voir leur adéquation avec le système microfluidique et l'étude des gouttes.



*Figure 55. Module de caractérisation en ligne des compositions chimique des gouttes. (a) Source de lumière, (b) Cellule d'échantillonnage pour les gouttes en circulation, (c) Fibres optiques, (d) spectromètre UV-Vis-NIR, et (e) Interface logicielle.*

#### 4.2.3.1 Partie optique

J'ai regroupé dans la partie « optique » les éléments commerciaux suivants:

- Une lampe miniature appelée DT-MINI-2-GS (Ocean optics), est utilisée comme source de lumière (*Figure 55a*). Cette lampe combine le spectre continu d'une source de lumière UV, excitée par deutérium, et d'une source de lumière VIS-NIR, excitée par halogène de tungstène, dans un chemin optique unique. Les longueurs d'onde accessibles vont donc de 215 à 2500nm.
- Deux fibres optiques de diamètre 400 $\mu$ m (« Premium-grade Patch Cords », QP400-1-UV-VIS, Ocean optics) sont utilisées pour transporter

la lumière de la source de lumière à la cellule d'échantillonnage et de cette dernière au spectromètre (Figure 55c).

- Le spectromètre miniature (USB2000+, Ocean optics) permet d'effectuer les analyses telles que l'absorption, la transmission, la réflexion, l'émission et la couleur, dans la gamme spectrale allant de 190 à 2300nm (Figure 55d).
- L'acquisition et l'analyse en temps réel du signal provenant du spectromètre peuvent être réalisées par le logiciel « OceanView » (Ocean optics) (Figure 55e), qui permet de configurer manuellement les paramètres d'acquisition et de représenter graphiquement les résultats.

Les différents éléments sont adaptés à la caractérisation chimique des gouttes générées par le système microfluidiques. De plus, le spectromètre étant petit, rapide et puissant, il rend l'ensemble du système microfluidique modulable et transportable. Enfin, il est relié à l'ordinateur par une connexion USB.

#### 4.2.3.2 Cellule d'échantillonnage

La première cellule d'échantillonnage testée est une cellule commerciale ULTEM (SMA-Z-Cell-2.5, FIALab) composée de résine polyétherimide amorphe et conçue pour l'analyse chimique de solutions en flux continu. Son canal interne de 750 $\mu$ m de diamètre est sous forme de « Z » et le trajet optique est de 2,5mm (Figure 56a). Deux ports servent à connecter les fibres optiques et le canal interne de la cellule peut être connecté aux capillaires (Figure 56b et c) permettant de faire circuler les gouttes dans la cellule.

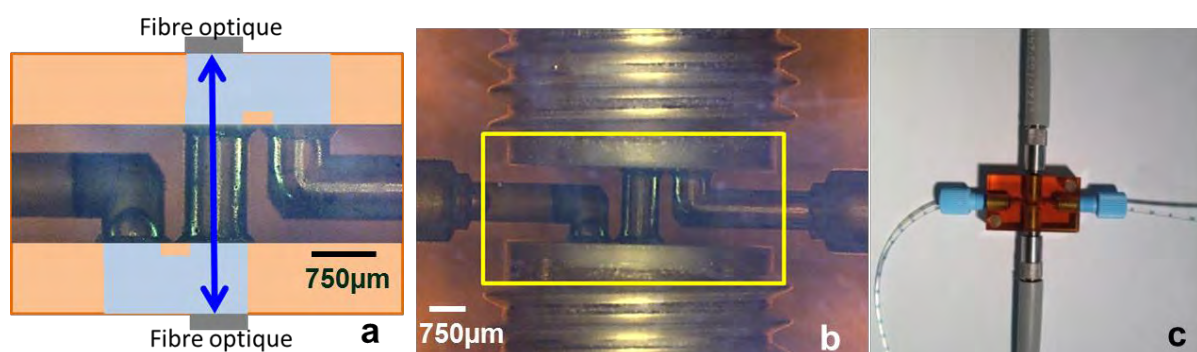


Figure 56. Cellule d'échantillonnage commerciale: (a) Zoom du canal interne en « Z » et trajet optique (en bleu) ; (b) Ports de connexion des fibres optiques et des capillaires ; (c) Adaptation de la cellule aux fibres optiques et aux capillaires.

Les essais de circulation des gouttes montrent que les gouttes qui sont sphériques au moment de l'entrée dans le canal se collent ensuite sur la paroi du canal interne de la

cellule (Figure 57). Ce problème est probablement dû à la rugosité de surface du canal et/ou au mouillage de la phase dispersée sur la surface du canal, et/ou à la contrainte de cisaillement lors du passage des gouttes. Ainsi cette cellule conçue pour l'analyse chimique de solutions en flux continu n'est pas adaptée à la détection de gouttes. Il a donc fallu mettre au point une autre cellule permettant de connecter les fibres optiques et les capillaires et de détecter des gouttes en circulation. Le dispositif et les résultats sont présentés dans le chapitre « Résultats et Discussions ».

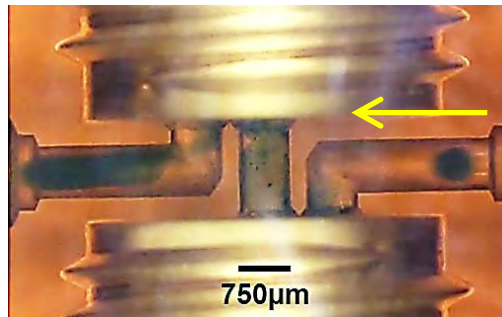


Figure 57. Photo du passage des gouttes dans la cellule commerciale. La flèche indique le sens de circulation de la solution.

## 4.3 Méthodes

Les méthodes que l'on a appliquées au cours de cette thèse ont été dédiées à la caractérisation de la génération des gouttes dans le système microfluidique, d'un point de vue expérimental et numérique et à l'étude de la cristallisation dans les gouttes.

### 4.3.1 Caractérisation des expériences

Nous avons caractérisé les expériences par les propriétés physiques des phases et par la détermination de la taille, le volume et la forme des gouttes.

#### 4.3.1.1 Tension interfaciale par la méthode de la goutte pesée

La mesure de la tension interfaciale a été réalisée avec la méthode de la goutte pesée qui a été mise au point par Tate (Tate, 1864). Le schéma du dispositif expérimental de la méthode de la goutte pesée est représenté dans la figure 58. Pour mesurer la tension interfaciale entre deux phases immiscibles, on forme très lentement une goutte d'une phase à l'extrémité d'une aiguille verticale dans une autre phase. Dans notre cas, les densités des deux phases étant différentes, on détermine la tension interfaciale  $\gamma$  entre deux phases en formant une goutte pendante de la phase la plus



dense dans la phase la moins dense. Par exemple, nous déterminons la tension interfaciale  $\gamma_{\text{FC70-éthanol}}$  en formant une goutte pendante de l'huile FC70 dans l'éthanol contenu dans une cuve (Figure 58b).

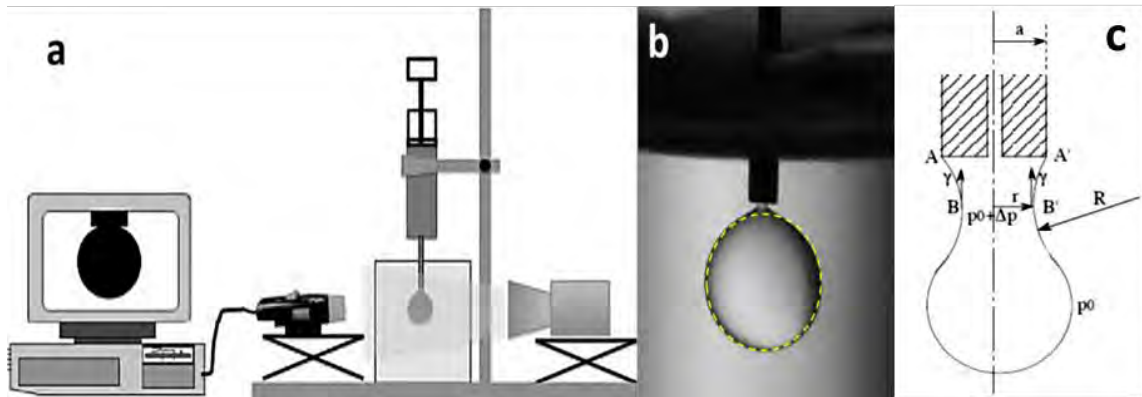


Figure 58. (a) Schéma du dispositif expérimental de la méthode de la goutte pendante. (b) Photo d'une goutte pendante de l'huile FC70 dans l'éthanol au moment du détachement. (c) Surpression de Laplace  $\Delta p$  due aux rayons de courbure  $r$  et  $R$ .

La goutte est alors soumise à trois forces :

- le poids (corrigé par la poussée d'Archimède)  $P = \Delta\rho \times V \times g$  (Équation 31). Cette force est dirigée vers le bas. ( $\Delta\rho$ ) est la différence de densité entre le liquide de la goutte ( $\rho_g$ , en  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) et celui environnant ( $\rho_e$ , en  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ).  $\rho_g - \rho_e > 0$ . le volume de la goutte ( $V$ ) est en  $\text{m}^3$ . l'accélération de la pesanteur ( $g$ ) est en  $\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$ . La poussée d'Archimède est prise en compte à travers la différence de densité.
- la force capillaire  $F_c = 2 \times \pi \times a \times \gamma$  (Équation 32) avec le rayon externe de l'aiguille ( $a$ , en m) et la tension interfaciale ( $\gamma$ , en  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Cette force est dirigée vers le haut.
- La force de Laplace liée à la surpression de Laplace  $\Delta p = \gamma \times (1/r - 1/R)$  (Équation 33) qui est due aux deux rayons de courbure de la gorge (Figure 58c) :  $r$  (en m) est le rayon du cercle de la gorge ( $BB'$ ) et ( $R$ , en m) le rayon de courbure dans le plan méridien. Dans l'équation de Laplace-Young (Équation 33), ( $\Delta p$ ) est en  $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$  (ou en  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$ ). La force de Laplace dirigée vers le bas s'exerce sur la surface ( $\pi r^2$ ) et s'écrit  $\Delta p \times \pi \times r^2$ .

La goutte suspendue est en équilibre sous l'action des trois forces :

$$(\Delta\rho)Vg - 2\pi a\gamma + \gamma\left(\frac{1}{r} - \frac{1}{R}\right)\pi r^2 = 0$$

Équation 34

(R) étant toujours très grand par rapport à (r) et (r) étant égale au rayon externe (a) de l'aiguille lorsque le liquide mouille l'extrémité de l'aiguille (*Figure 58c*).

$$(\Delta\rho)Vg = \pi r\gamma \left(1 - \frac{r}{R}\right)$$

*Équation 35*

De plus, on pèse la goutte après son détachement  $m=\rho_g \times V$  (en kg). La tension de surface est alors donnée par la loi de Tate:

$$\gamma = \frac{mg \left(\frac{\rho_e}{\rho_g} - 1\right)}{\pi r}$$

*Équation 36*

Dans notre cas  $r=107,5\mu\text{m}$ . Afin d'améliorer la précision sur la valeur de la masse, on réalise une moyenne sur une cinquantaine de gouttes que l'on pèse avec une balance de précision.

En fait, cette technique présente plusieurs avantages : elle est applicable à des interfaces gaz/liquide et liquide/liquide et elle permet également des mesures in situ et non destructive. Les mesures réalisées avec la méthode de la goutte pesée sur les différentes interfaces phase continue/phase dispersée étudiées dans le cadre de cette thèse (huile FC70/éthanol et huile FMS/solution de PEG (à différents pourcentages)) sont présentées dans le *tableau 4*.

Interface	Tension interfaciale (mN/m)
HuileFC70/éthanol	6, 67 ( $\pm 3.75\%$ )
HuileFMS/PEG0%	32, 45 ( $\pm 2.39\%$ )
HuileFMS/PEG2,5%	21, 53 ( $\pm 3.57\%$ )
HuileFMS/PEG5%	21, 05 ( $\pm 2.7\%$ )
HuileFMS/PEG7,5%	20, 94 ( $\pm 4.31\%$ )
HuileFMS/PEG10%	19, 97 ( $\pm 3.51\%$ )

*Tableau 4. Tensions interfaciales entre la phase continue et la phase dispersée à 23°C.*

Ces mesures ont été confirmées grâce à un stage d'IUT (Tatiana Omar) sur la mesure de la tension interfaciale par la technique de la goutte pendante. Cette méthode est basée sur le même principe de formation d'une goutte d'un liquide dense dans un liquide environnant moins dense. Cependant cette méthode demande un logiciel de détermination du profil de la goutte avant son détachement (Rapport de stage de Tatiana Omar).

### 4.3.1.2 Détermination du mouillage par la mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à mouiller une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur la surface. Plus cet angle est petit devant  $90^\circ$ , plus le liquide mouille la surface. A l'inverse, plus l'angle est grand devant  $90^\circ$  (Figure 59a), plus le liquide ne mouille pas la surface (Figure 59b). Dans notre cas, comme on veut générer dans le capillaire microfluidique des gouttes de la phase dispersée dans la phase continue, la phase continue doit mouiller la paroi du capillaire et la phase dispersée ne doit pas mouiller la phase continue. On vérifie d'abord que la phase continue mouille bien une surface plane constituée du matériau composant le capillaire. Puis on forme une goutte de la phase dispersée sur la surface plane recouverte de phase continue et on vérifie que l'angle de contact de la goutte est très supérieur à  $90^\circ$  (voire proche de  $150^\circ$ ).

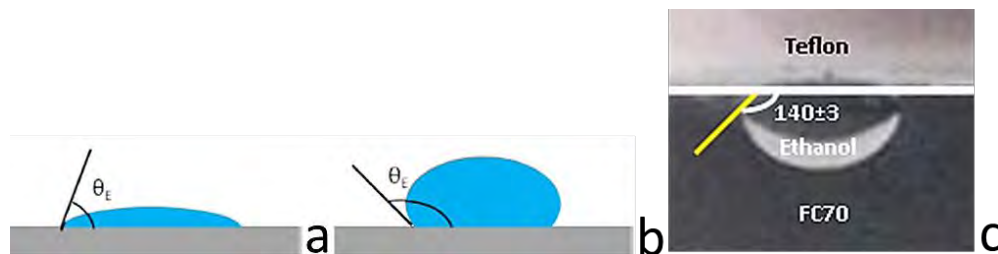


Figure 59. (a) Mouillage partiel : fluide mouillant. (b) Mouillage partiel : fluide non mouillant (c) Angle de contact éthanol/FC70/téflon ( $140 \pm 3^\circ$ ) mesuré par la méthode de goutte posée à  $23^\circ\text{C}$ , pour une goutte d'environ  $2\mu\text{L}$ .  $\theta_E$  représente l'angle de contact.

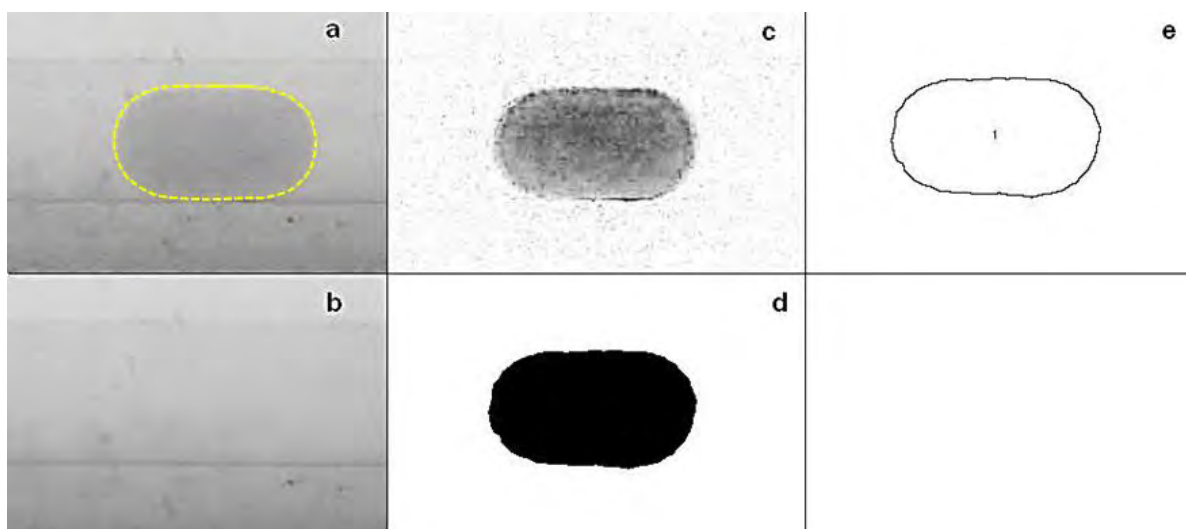
L'exemple du système éthanol (phase dispersée)/FC70 (phase continue)/téflon (surface du capillaire microfluidique) est montré dans la (figure 59c). Comme l'éthanol est moins dense que l'huile FC70, la surface de téflon est posée sur un bain d'huile FC70 et nous avons formé la goutte d'éthanol par-dessous. La goutte monte alors vers la surface et se dépose sur celle-ci en formant un angle de contact à l'interface (éthanol/FC70/téflon) de  $140 \pm 3^\circ$  (Figure 59c). Ainsi on voit que l'huile FC70 mouille la surface de téflon et que l'éthanol mouille peu l'huile FC70 et la surface de téflon avec un angle de contact proche de  $150^\circ$ . Cette mesure nous servira par la suite pour réaliser la simulation 2D de la formation des gouttes dans le capillaire.



### 4.3.1.3 Taille, volume et forme des gouttes

#### 4.3.1.3.1 Taille des gouttes

Le grand nombre de gouttes générées au cours des expériences (de 50 à quelques centaines), rend la mesure manuelle des paramètres de chaque goutte fastidieuse. C'est pour cela que nous avons automatisé les mesures sur les gouttes. Chaque goutte est photographiée après son détachement et la photo est traitée à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (*ImageJ*) dont les principales étapes sont représentées sur la *figure 60*.



*Figure 60. Etapes du traitement d'image réalisé sur ImageJ : (a) Image de la goutte ; (b) Image de référence du capillaire sans gouttes ; c) Soustraction de l'image de la goutte par le fond de référence ((a)-(b)) ; (d) Seuillage de l'image ; (e) Détermination du diamètre  $D$  et de la longueur  $L$  de chaque goutte.*

Il faut préciser qu'un colorant bleu (Vahiné, E133) a été rajouté à la phase dispersée afin d'améliorer le contraste (il a aussi été vérifié que l'ajout de colorant ne modifiait pas la taille et la forme des gouttes générées). Le protocole a été développé au cours d'un stage de Master 2 (Benjamin Benhaim). Le logiciel ImageJ prend en compte l'image de la goutte (*Figure 60a*) et celle de référence du capillaire sans gouttes (*Figure 60b*). Puis on soustrait l'image de la goutte par le fond de référence (*Figure 60c= Figure 60a-Figure 60b*) pour supprimer le contour du tube en téflon et les éventuelles impuretés dans l'eau du porte-échantillon. Un filtre passe-bas permet également d'éliminer le bruit de fond du capteur et un filtre rouge permet de faire ressortir le colorant bleu et d'obtenir une image en niveaux de gris (*Figure 60c*). A la suite un seuillage de l'image permet de séparer le fond de l'image de la zone bleue correspondant

à la goutte (Figure 60d). Enfin on utilise une fonction d'analyse de particules qui donne les dimensions de la zone seuillée (Figure 60e).

#### 4.3.1.3.2 Volume des gouttes

Afin de calculer le volume de chaque goutte, on fait différentes approximations : si la goutte est sous forme de « long plug », son volume est égale à la somme du volume d'une forme cylindrique et de deux demi-sphères à chaque extrémité (Figure 61a). Le diamètre  $D$  ( $2 \times R$ ) de la goutte est très proche du diamètre du capillaire  $W$  ; dans le cas où la goutte a une taille égale ou inférieure au diamètre du capillaire, c'est le volume d'une sphère (Figure 61b et c).

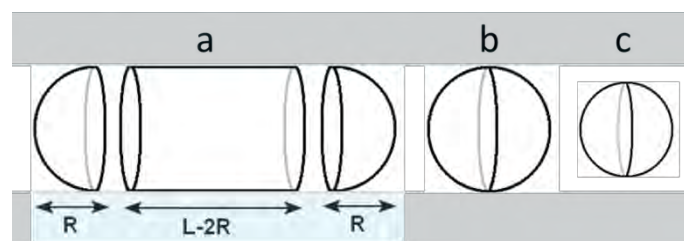


Figure 61. Illustration du volume et La forme des gouttes dans le canal microfluidique : (a) un long plug dont  $L/W > 2$ , (b) une goutte sphérique dont  $L/W = 1$  et (c) une goutte sphérique dont  $L/W < 1$ .

#### 4.3.1.3.3 Forme des gouttes

La forme des gouttes a un rôle clé sur la stabilisation des gouttes ainsi que sur l'homogénéité de composition chimique pour les expériences de cristallisation (voir le chapitre « Résultats et Discussion »). En fait, la forme d'une goutte au sein du canal microfluidique est soit allongée (Figure 61a) soit sphérique (Figure 61b et c). Par la suite, on utilisera le ratio de la longueur de la goutte et du diamètre du capillaire que l'on peut approximer à  $W$  ( $L/W$ ) pour caractériser la forme des gouttes.

#### 4.3.1.3.4 Fréquence des gouttes

La fréquence des gouttes est définie par le nombre de gouttes par secondes. Ainsi elle est donnée par le rapport entre le débit de la phase dispersée et le volume de gouttes. Dans notre étude hydrodynamique, nous décrivons un écoulement par sa vitesse. Donc nous définissons la fréquence des gouttes ( $f_D$ ) comme le taux de production de longueur  $L$  d'une goutte de la phase dispersée dû à sa vitesse ( $v_D$ ) -  $f_D = v_D/L$ .

#### 4.3.1.4 Simulations numériques en 2D

Les modélisations numériques 2D ont été réalisées, en collaboration avec Carine Guivier-Curien (Institut des Sciences du Mouvement à Marseille) qui a utilisé le logiciel de volumes finis Fluent (ANSYS). La géométrie a été créée avec le logiciel Design Modeler (ANSYS). La géométrie de la jonction 2D choisie est une géométrie en T similaire à la géométrie expérimentale en 3D. Le canal principal est planaire avec une largeur de 1mm et une longueur de 20mm. Le canal secondaire a la même largeur mais une longueur de 30mm. La longueur d'entrée du canal principal s'étend sur 30mm afin d'assurer un écoulement parfaitement établi au niveau de la jonction des deux canaux. Le maillage a été réalisé avec Meshing (ANSYS). Le maillage est structuré, homogène et composé de 30 cellules sur la largeur du canal.

Compte tenu des conditions d'incompressibilité et d'immiscibilité, nous avons choisi le modèle Volume of Fluid (VOF) pour correctement décrire l'interface. L'écoulement des deux phases est considéré laminaire, non-stable, et isotherme. Les champs de vitesse et de pression sont résolus par l'équation classique de continuité et l'équation de Navier-Stokes:

$$\rho = \varphi_C \rho_C + \varphi_D \rho_D$$

*Équation 37*

$$\mu = \varphi_C \mu_C + \varphi_D \mu_D$$

*Équation 38*

$\rho_C$  et  $\rho_D$  sont respectivement la densité de la phase continue et celle de la phase dispersée,  $\varphi_C$  et  $\varphi_D$  sont respectivement la fraction volumique de la phase continue et celle de la phase dispersée,  $\mu_C$  et  $\mu_D$  sont respectivement la viscosité dynamique de la phase continue et celle de la phase dispersée.

Un terme source supplémentaire  $\vec{F}$  a été ajouté dans les équations de Navier-Stokes pour prendre en compte la tension à l'interface au travers d'une force de surface continue, avec  $\kappa$  la courbure de l'interface,  $\vec{n}$  le vecteur normal dirigé vers l'extérieur et  $\gamma$  la tension interfaciale.

$$\vec{F} = 2\gamma_{CD} \times \frac{\rho\kappa\vec{n}}{(\rho_C + \rho_D)}$$

*Équation 39*

Les équations gouvernant les fluides ont été discrétisées en utilisant un solveur instationnaire (à base de la pression). La méthode « PRESTO ! » a été utilisée pour l'interpolation des termes de pression. L'algorithme PISO et un schéma amont au deuxième ordre ont été utilisés pour le couplage vitesse pression et pour l'équation de continuité respectivement. Un schéma de résolution en temps non itératif (NITA) a été préféré à un schéma classique pour diminuer le temps CPU tout en préservant l'exactitude des résultats. Le pas de temps est de  $10^{-4}$ s et le nombre de Courant total reste inférieur à 2.

Au début, le canal principal est rempli avec la phase continue et le canal secondaire avec la phase dispersée. L'angle de contact des gouttes est réglé à constante  $140^\circ$  d'après la mesure expérimentale (*Figure 59*). Les propriétés des phases sont celles décrites dans la section 4.1.2. La condition d'écoulement à la sortie de la jonction est laissée libre. A l'entrée de chacun des deux canaux, un profil de vitesse plateau d'amplitude constante est imposé.

## 4.3.2 Méthodes pour l'étude de la cristallisation

### 4.3.2.1 Cristallisation en Microbatch®

La méthode de microbatch® est idéale pour estimer le diagramme de phase d'une protéine en fonction de l'ajout de sels ou de polymères (Chayen *et al.*, 1992, Chayen *et al.*, 1990) , car la composition de la solution est parfaitement connue, en fait ce que l'on obtient comme information est un diagramme cinétique qui délimite le plan en 3 zones la zone sans cristaux (sousaturée et métastable) la zone de nucléation spontanée et la zone dite de « précipitation ». Ce diagramme est mesurée avec une expérience de microbatch® de 72 puits pour de la rasburicase en présence de PEG 8000 (de 2.5 à 10%) à  $20^\circ\text{C}$  (*Figure 62*), par variation de la concentration en protéine par pas de  $1\text{mg/mL}$  et en PEG 8000 par pas de 2.5%.

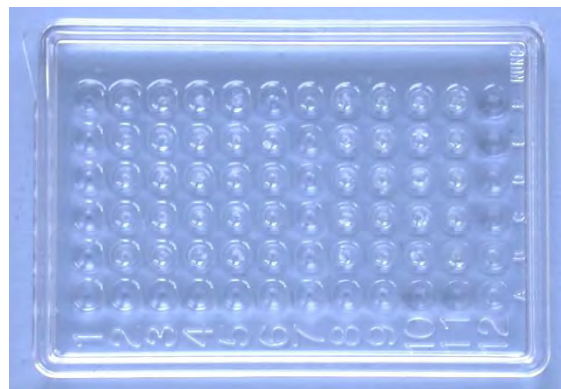


Figure 62. Photo d'une boîte de microbatch®

### **4.3.2.2 Cristallisation en microfluidique**

Les méthodes de cristallisation en microfluidique ont pour but de tester la faisabilité du système microfluidique dans différents milieux (solvants). Il s'agit de valider la formation et le stockage des gouttes dans les capillaires microfluidiques. Dans cette thèse, le milieu à tester et à valider pour notre système microfluidique est un milieu de viscosité variable. Afin d'assurer l'homogénéité de la taille et de la composition chimique des gouttes, le montage microfluidique est testé suivant la ou les géométries de la ou des jonctions associées pour générer les gouttes. Ensuite, la caractérisation en ligne est mise en œuvre pour valider le système. Les méthodes pour réaliser le montage microfluidique ainsi que pour caractériser en ligne les gouttes seront présentées dans le Chapitre 5 : Résultats et discussions.

# **Chapitre 5.**

## **Résultats et discussion**

Au cours de ma thèse, mon objectif a été de maîtriser le contrôle de la taille et de la composition des gouttes générées dans le système microfluidique car ces gouttes constituent mes cristallisoirs. J'ai alors commencé par comprendre l'hydrodynamique mis en jeu dans la jonction de génération des gouttes. Puis j'ai rendu la plateforme microfluidique modulable pour l'analyse chimique des gouttes. Enfin j'ai étudié la polyvalence du dispositif pour la cristallisation en milieu visqueux.

Dans ce chapitre, je présente donc en 3 parties les résultats obtenus au cours de cette thèse sur le montage microfluidique:

- La première partie présente l'étude hydrodynamique visant à prédire la taille, la forme et la fréquence des gouttes ;
- la deuxième partie décrit la caractérisation de la composition chimique des gouttes en « off line » et en « on line » ;
- la troisième partie montre l'application de mon système microfluidique pour l'étude de la cristallisation d'une protéine – la rasburicase- en présence d'un milieu visqueux – une solution aqueuse de PEG.

Ces travaux ont donné lieu à deux publications qui sont insérées dans le texte des parties correspondantes.

## 5.1 Etude Hydrodynamique

L'objectif de l'étude hydrodynamique est de maîtriser les paramètres de taille (ou volume), de formes ( $L/W$ ) et de fréquence ( $f_D$ ) afin de réaliser des expériences reproductibles et stables. Cette maîtrise permettra aussi de réduire le volume mis en jeu au cours des expériences de cristallisation. Cependant, il n'existe pas de loi universelle décrite dans la littérature. Il est juste montré que lors de la formation des gouttes des effets liés à la géométrie de la jonction et des capillaires, aux débits et aux propriétés des phases sont à considérer. Ainsi les géométries des systèmes microfluidiques et les conditions expérimentales étant variées, les paramètres des gouttes sont souvent étudiés au cas par cas (Guillot, 2011).

Au cours de l'étude hydrodynamique, on a étudié d'abord la génération des gouttes par la méthode de cross-flowing dans une jonction en T avec des canaux et des capillaires circulaires de  $500\mu\text{m}$  et  $1\text{mm}$  de diamètre interne. Il est à noter que la configuration généralement étudiée dans la littérature est celle présentant des canaux à section rectangulaire. Les débits sont gérés avec précision. Les phases sont choisies pour les expériences en milieu organique: la phase dispersée choisie est alors l'éthanol et la phase continue, l'huile FC70.

Nous présenterons d'abord les caractéristiques des gouttes qui jouent sur la reproductibilité et la stabilité des expériences. Nous décrirons également les propriétés des phases et des écoulements qui peuvent avoir une influence sur les caractéristiques des gouttes. Puis nous comparerons les résultats expérimentaux en 3D et numériques en 2D concernant le régime des gouttes et les paramètres influant ces régimes. Enfin nous établirons des lois de comportement permettant de contrôler les caractéristiques des gouttes.

### 5.1.1 Caractéristiques des gouttes : $L/W$ et $f_D$

La forme des gouttes ( $L/W$ ) (§4.3.1.3.3) et la fréquence des gouttes ( $f_D$ ) (§4.3.1.3.4) présentent un enjeu clé quant à leur stabilité et leur homogénéité en composition chimique dans les expériences de cristallisation car :

- Les gouttes qui ont une taille inférieure au diamètre du capillaire (*Figure 63a*) ( $L/W < 1$ ) sont mobiles et présentent un risque élevé de coalescence et donc d'instabilité.
- Les gouttes allongées telles que  $L/W > 2$ , appelées plugs (*Figure 63b*), risquent d'être inhomogènes en composition chimique lorsque l'on mélange plusieurs solutions dans une goutte. Ici on prend l'exemple de la génération de gouttes dans une jonction transparente en croix (*Figure 64*) de diamètre interne de  $500\mu\text{m}$  avec deux solutions aqueuses A (en rouge) et B (en jaune). On injecte les deux solutions face à face avec les mêmes débits, perpendiculairement à la phase continue. Ces deux solutions sont mélangées lors de la génération des gouttes. L'interface de ces deux solutions est observée au moment où la goutte est formée (*Figure 64*). Sachant que le transfert de matière ne se fait que par diffusion du fait d'un écoulement laminaire, le temps de mélange ( $t_{\text{mix}}$ ) peut être assez long pour une goutte allongée.
- Les gouttes de taille de  $1 \leq L/W \leq 2$  présente une bonne stabilité de gouttes (pas de coalescence) et un  $t_{\text{mix}}$  suffisamment court (voir ci-après).



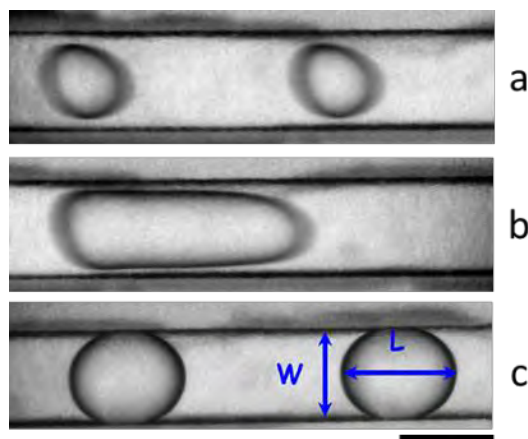


Figure 63. Trois types de formes de gouttes. (a) Gouttes petites et non-stables avec  $L/W < 1$ . (b) Gouttes de type plug avec  $L/W > 2$ . (c) Gouttes avec  $1 \leq L/W \leq 2$ . Barre d'échelle de  $500 \mu\text{m}$ .

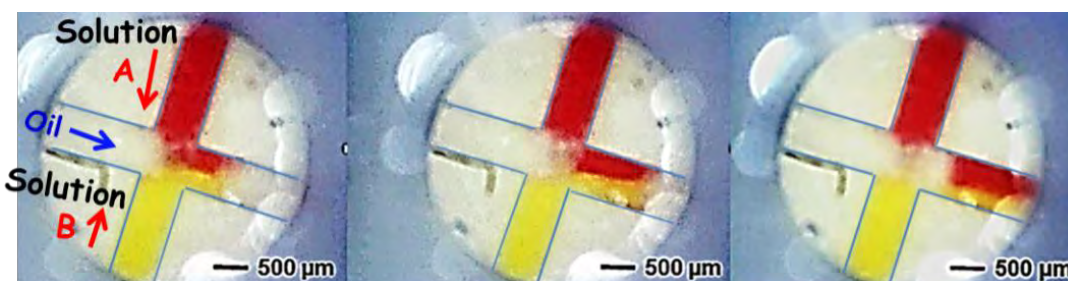


Figure 64. Génération de gouttes dans une jonction en croix en injectant face à face deux solutions aqueuses afin de les mélanger dans la goutte.

La figure 65 est un exemple de l'effet de la taille des gouttes sur  $t_{\text{mix}}$ . Les gouttes sont générées en mélangeant deux phases dispersées (jaune et rouge) dans un capillaire de 1mm de diamètre. Le mélange par diffusion entre les deux phases est observé au cours de la circulation. Ainsi un  $t_{\text{mix}}$  correspond aussi la longueur du passage d'une goutte. Nous avons observé un  $t_{\text{mix}}$  de plus de 2 minutes (Figure 65a) pour les gouttes de taille  $L/W > 2$  qui peut perturber la reproductibilité des expériences ( $t_{\text{mix}}$  non négligeable devant le temps de nucléation), tandis que un  $t_{\text{mix}}$  moins de 30 secondes (Figure 65b) est observé pour une taille  $1 \leq L/W \leq 2$  – assurant ainsi une bonne reproductibilité des expériences de cristallisation. Dans la littérature, Tice et al. ont trouvé  $t_{\text{mix}} = 25 \text{ms}$  pour les gouttes de taille  $1 \leq L/W \leq 2$  dans un canal rectangulaire de largeur de  $50 \mu\text{m}$  (Tice *et al.*, 2003). Pourquoi  $t_{\text{mix}}$  est augmenté presque 400 fois lorsque l'on passe le diamètre du canal de  $50 \mu\text{m}$  à 1mm ? C'est parce que  $t_{\text{mix}}$  augmente avec le diamètre du canal avec une puissance de 2 :  $t_{\text{mix}} = stl^2/D$  (avec  $stl$  la longueur de striation, c'est-à-dire le diamètre ou la largeur du canal en microfluidique, et  $D$  le coefficient de diffusion) (Tice *et al.*, 2003). De plus, Tice et al. ont observé que  $stl$  et ainsi  $t_{\text{mix}}$  diminue lorsque nous augmentons les vitesses de fluide (i.e.,  $50 \text{mm/s}$  utilisé par Tice et al. et  $\sim 10 \text{mm/s}$  dans notre cas).

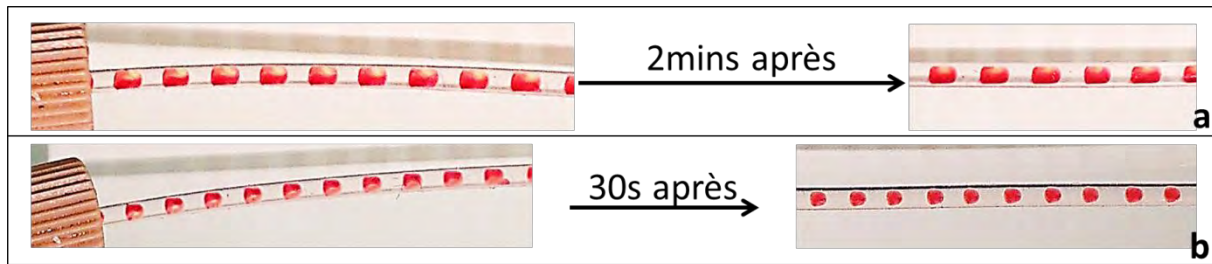


Figure 65. Temps de diffusion dans les gouttes en circulation. Les gouttes sont générées dans l'huile FMS en mélangeant deux solutions aqueuses (du colorant rouge et jaune) au sein du canal de diamètre interne de 1mm. (a) 2 minutes pour les gouttes allongées avec  $L/W > 2$ , (b) 30 secondes pour les gouttes avec  $1 \leq L/W \leq 2$ .

Dans tous ces cas on peut limiter la coalescence (pour  $L/W < 1$ ) ou éviter les interactions (pour  $L/W > 1$ ) grâce à une fréquence des gouttes (nombre de gouttes par seconde)  $f_D$  faible. De plus dans le cas d'expériences de mélanges de gouttes de solutions différentes, le contrôle de  $f_D$  permet de synchroniser la rencontre des gouttes dans la jonction.

## 5.1.2 Propriétés des écoulements

Nous avons mené l'étude hydrodynamique sur la formation de goutte d'éthanol dans un flux continu d'huile FC70. La phase continue (huile FC70) et la phase dispersée (éthanol) sont des fluides newtoniens comme définis en §3.1.1. Dans notre jonction en T, les propriétés physico-chimiques qui vont influencer la formation des gouttes sont :

- les dimensions caractéristiques du système microfluidique comme le diamètre  $W$  (ou le rayon) des canaux qui est de 1mm ou 500 $\mu$ m,
- le débit  $Q_C$  (ou la vitesse équivalente  $v_C$ ) de la phase continue (huile FC70) que j'ai fait varier de de 0,14 à 13,89 $\mu$ L/s dans les canaux de 1mm de diamètre et de 0,14 à 11,11  $\mu$ L/s dans les canaux de 500 $\mu$ m de diamètre,
- le débit  $Q_D$  (ou la vitesse équivalente  $v_D$ ) de la phase dispersée (éthanol) que j'ai fait varier de de 0,014 à 11,11 $\mu$ L/s dans les canaux de 1mm de diamètre et de 0,014 à 4.45 $\mu$ L/s dans les canaux de 500 $\mu$ m de diamètre,
- la densité  $\rho$ , la viscosité dynamique  $\mu$  des deux phases (Tableau 3)
- la tension interfaciale entre les deux phases (Tableau 4)

Pour caractériser les propriétés d'écoulement, nous avons calculé les nombres adimensionnels généralement utilisés dans le paragraphe 3.1. Les nombres adimensionnels de Reynolds  $Re$  (Équation 25), de Weber  $We$  (Équation 27) et capillaire  $Ca$  (Équation 28) sont déterminés à partir de la vitesse moyenne de la phase continue  $v_C$  car la phase continue est le fluide porteur lors de la génération des gouttes. La vitesse moyenne de la phase continue  $v_C$  est donnée par l'équation 35.

$$v_c = \frac{Q_c}{\pi(W/2)^2}$$

Équation 35

Les valeurs de  $v_c$ , de  $Re$ , de  $We$  et de  $Ca$  sont reportées dans le tableau 5 suivant les débits extrêmes et les deux diamètres de canaux utilisés.

	Huile FC70			
W (mm)	1		0,5	
$Q_c$ ( $\mu\text{l/s}$ )	0,14	13,89	0,14	11,11
$V_c$ ( $\times 10^{-3}$ (m.s <sup>-1</sup> ))	0,18	18	0,72	57,6
Re	0,015	1,5	0,06	4,8
We	$4,7 \times 10^{-8}$	$4,7 \times 10^{-4}$	$7,52 \times 10^{-7}$	$4,81 \times 10^{-3}$
Ca ( $\times 10^{-2}$ )	0,06	6	0,25	20,12

Tableau 5. Calculs des valeurs extrêmes de la vitesse  $v_c$ , du nombre de Reynolds  $Re$ , du nombre de Weber  $We$  et du nombre capillaire  $Ca$  aux différents débits pour les canaux de diamètres 1 mm et 500  $\mu\text{m}$ .

- Le nombre de Reynolds  $Re$  est toujours inférieur à 2000. C'est-à-dire que l'effet de viscosité prédomine et que l'effet d'inertie peut être ignoré. L'écoulement dans le canal microfluidique est donc laminaire ce qui confirme que l'on peut représenter l'écoulement des phases par leur vitesse.
- Le nombre de Weber  $We$  est toujours faible ( $We < 12$ ), c'est-à-dire que l'effet capillaire prédomine sur l'effet d'inertie. Ainsi les gouttes sont stables et ne peuvent pas se désagréger en multiples fines gouttelettes après le détachement. Cet effet capillaire peut être en compétition avec l'effet de la gravité suivant la dimension du canal microfluidique. La taille au-delà de laquelle l'effet de gravité domine l'effet capillaire est donnée par la longueur capillaire (Équation 26) qui est de 2,4mm dans notre cas. Ainsi l'effet de la gravité peut être négligé dans le cas de canaux de diamètre inférieur ou égal à 1mm.
- L'effet de viscosité lié à la contrainte de cisaillement et la tension interfaciale déterminent donc le comportement de l'écoulement. De plus ces deux propriétés peuvent être comparées à travers le nombre capillaire  $Ca$  (Équation 28) qui varie dans une large gamme dans nos expériences ( $Ca \sim 0,06 \times 10^{-2} - 0,2$ ). Cette gamme encadre la valeur

critique décrite dans la littérature ( $Ca \sim 0,01-0,015$ ) qui permet de décrire les régimes (Thorsen et al., 2001, Tice *et al.*, 2004, 2003, Garstecki et al., 2006, Xu et al., 2008, Christopher et al., 2008, Liu et al., 2009, Van Steijn et al., 2010, Zhao et al., 2011), comme nous le verrons en §3.2.

Cependant lorsque les valeurs de  $\mu_C$  et  $\gamma_{CD}$  sont fixées, comme dans notre étude,  $Ca$  ne varie qu'avec  $v_C$ . Or on peut avoir différentes valeurs de la vitesse de la phase dispersée  $v_D$  et ainsi différentes valeur de la vitesse totale des deux phases  $v_{TOT}$  ( $=v_D+v_C$ ) pour une valeur fixée de  $Ca$ . On a alors varié  $v_{TOT}$  dans une gamme étendue (plus qu'un ordre de grandeur) en variant  $v_D$  et en gardant  $v_C$  constante. Puis pour chaque  $v_{TOT}$  donné, on a fait varier le rapport des vitesses ( $v_D/v_C$ ) de 0,1 à 0,8. La figure 66 représente les conditions des expériences et des simulations en traçant les valeurs de  $v_{TOT}$  que l'on a explorées en fonction de  $Ca$ . Nous devons préciser qu'en raison du temps de calcul numérique très long, nous avons limité les conditions de simulation à seulement trois valeurs de  $v_{TOT}$  et de ( $v_D/v_C$ ) pour un canal de 1mm de diamètre.

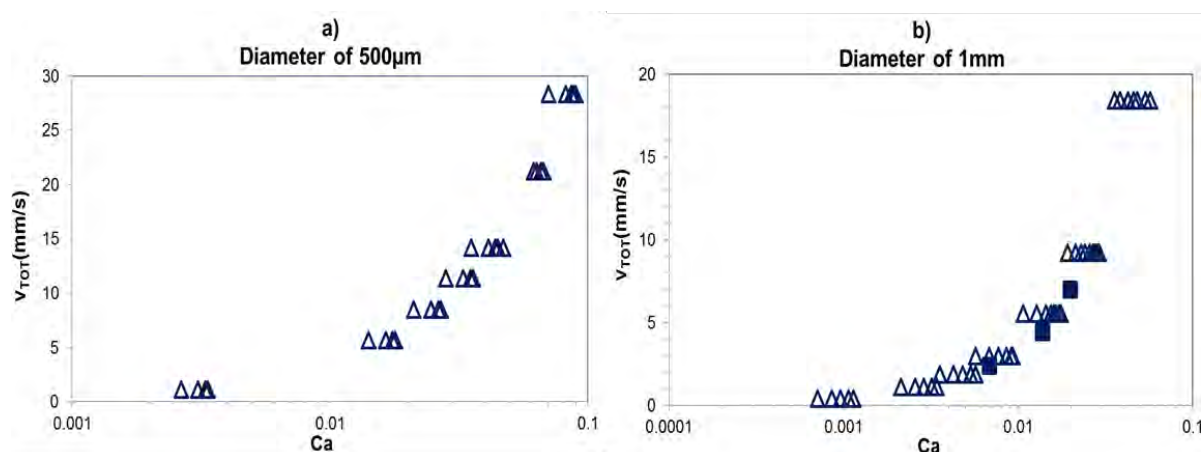


Figure 66. Vitesse totale des phases  $v_{TOT}$  en fonction de  $Ca$  pour les canaux de diamètres a)  $500\mu m$  et b)  $1mm$ . ( $\Delta$ ) expériences en 3D et ( $\blacksquare$ ) simulations en 2D.

### 5.1.3 Régimes de gouttes

Dans le but d'observer les gouttes, elles ont été générées avec une jonction en T transparente de  $500\mu m$  de diamètre interne dans le dispositif décrit en §4.2.1.1. L'observation expérimentale est réalisée avec un microscope optique (Zeiss Axio Observer D1) équipé d'une caméra rapide sCMOS (Neo, ANDOR Technology). Comme la surface interne de la jonction en T n'est pas parfaite, on a traité les images obtenues avec le logiciel ImageJ (Figure 57). La simulation 2D a été réalisée en utilisant la méthode présentée dans la partie 4.3.1.4 avec une jonction de  $1mm$  de diamètre interne. Les différents régimes observés en expérience 3D et en simulation 2D sont représentés dans la figure 67 pour différentes valeurs de ( $v_D/v_C$ ).




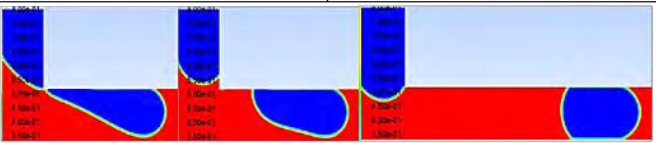
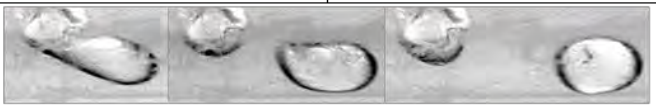

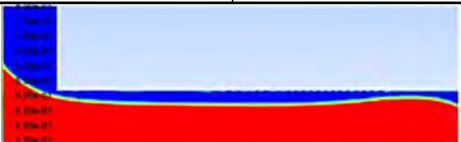


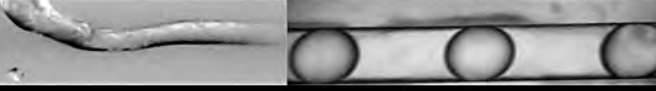
	Ca	$V_{TOT}$
$v_D/v_C$	0.016	5,1mm/s
a) 0.1		
	0.075	23.6mm/s
		
	0.24	75mm/s
		
b) 0.2	0.014	4.9mm/s
		
c) 0.25	0.02	7.07mm/s
		
	0.237	84.9mm/s
		
d) 0.335	0.14	54.3mm/s
		
e) 0.8	0.02	10.2mm/s
		
	0.05	26mm/s
		
	0.2	111mm/s
		

Figure 67. Observation des régimes de gouttes d'éthanol dans l'huile FC70 dans les expériences et la simulation 2D. (a), (c) et (e) : la génération expérimentale des gouttes dans une jonction transparente de 500 $\mu$ m de diamètre interne. (b) et (d) : la génération des gouttes en simulation 2D dans une jonction de 1mm de diamètre interne.

Dans les expériences (*Figure 67 a, c et e*), on peut distinguer différents régimes de génération des gouttes suivant la valeur de  $Ca$ :

- Jusqu'à  $Ca=0,02$ , la goutte émerge sous forme hémisphérique. et la goutte se rapproche de la paroi opposée en remplissant le canal de phase dispersée. Ensuite la goutte étant continuellement alimentée, elle s'étend en longueur jusqu'à  $L$  supérieure à  $W$ . Puis un « pincement » se forme dû à la pression exercée par la phase continue, ce qui détache finalement la goutte. Ce régime est appelé « squeezing » (Garstecki et al., 2006).
- Lorsque  $Ca>0,02$ , l'écoulement de la phase dispersée est comprimé contre la paroi supérieure du canal due à la pression exercée par la phase continue. En fait, le « pincement » se forme juste après la sortie de la phase dispersée. Pour une vitesse d'écoulement donnée, ce « pincement » devient plus long et plus fin lorsque  $Ca$  augmente, réduisant ainsi l'alimentation de la goutte en phase dispersée avant son détachement sous forme de gouttes sphériques de diamètre proche de  $W$ . Ce régime est appelé « dripping » (Thorsen et al., 2001). Dans ce cas-là les gouttes sont plus petites que la taille du canal  $W$ . c'est clairement montré dans la figure 67 que la transition entre les régimes squeezing et dripping est affectée par  $Ca$ .
- Pour les valeurs de  $Ca$  importantes ( $\sim 0,2$ ), un filet de la phase dispersée est observé à la sortie de la phase dispersée (*Figure 67*, premières images pour  $Ca=0,2$  et  $0,24$ ) et les gouttes se forment loin de la jonction. En fait, la raison de la rupture du filet est qu'une goutte est plus stable qu'un fluide cylindrique pour un volume fixé, grâce à une tension interfaciale  $\gamma_{CD}$  plus faible. Ces instabilités de Rayleigh-Plateau créent des gouttes loin de la sortie de phase dispersée, dont le diamètre augmente avec  $v_{TOT}$ . Ce régime est appelé « jetting » (De Menech et al., 2008).

Les régimes de génération des gouttes observés en simulation 2D (*Figure 67 b et d*) ressemblent qualitativement à ce que l'on a observé dans des conditions similaires dans les expériences, même si la géométrie et l'état de la jonction ne sont pas parfaits. Cependant, les simulations nous fournissent les informations supplémentaires :

- Dans les régimes « dripping » et « squeezing », la goutte se forme juste à la sortie de la phase dispersée, puis elle s'allonge et se détache et avance sous la pression de la phase continue.

- Le Ca de transition entre les régimes « dripping » et « jetting » décroît de 0,2 à 0,1 lorsque ( $v_D/v_C$ ) croît.
- Le régime « jetting » semble être corrélé à la valeur de  $v_{TOT}$ , la transition entre les régimes « dripping » et « jetting » se produisant à une valeur de  $v_{TOT}$  proche de  $50\text{mm.s}^{-1}$ . Cette valeur est observée expérimentalement pour toutes les valeurs de  $v_D/v_C$ . Par conséquent la phase continue confine la phase dispersée près de la paroi supérieure, réduisant ainsi le diamètre du filet.

Pour conclure, les trois régimes de gouttes sont observés dans les expériences et les simulations. La transition entre les régimes « squeezing » et « dripping » est affectée par Ca et celle entre les régimes « dripping » et « jetting » est affectée par  $v_{TOT}$ . A notre connaissance, le fait que le régime « jetting » soit influencé par  $v_{TOT}$  est observé pour la première fois dans ce travail. Cependant pour les applications, nous ne nous intéresserons pas aux gouttes plus petites que W car elles risquent de coalescer dû à leur mobilité dans le capillaire. Ainsi, l'étude quantitative porte sur l'effet des paramètres opératoires (i.e.  $v_D/v_C$ ,  $v_{TOT}$  et Ca) sur les caractéristiques des gouttes (i.e. la forme L/W et la fréquence  $f_D$ ), dans les régimes « squeezing » et « dripping ».

## 5.1.4 Etude de L/W

Dans cette partie, on étudie la forme des gouttes à travers le rapport (L/W) ce qui permet de comparer les gouttes générées avec des diamètres de jonction différents. De plus même si la taille ou le volume des gouttes n'est pas étudié directement, comme W est fixé (à  $500\mu\text{m}$  ou  $1\text{mm}$  dans notre cas) une valeur donnée de L/W correspond bien à une valeur de taille et donc de volume de la goutte. Enfin L est une moyenne réalisée sur une centaine de gouttes générées dans les mêmes conditions.

### 5.1.4.1 Influence de $v_D/v_C$ sur L/W

Dans la littérature, il est montré que L/W est influencé par ( $v_D/v_C$ ). On a alors tracé L/W en fonction de  $v_D/v_C$  pour les différentes valeurs de  $v_{TOT}$  explorées (*Figure 68*). La *figure 68a* regroupe les résultats expérimentaux obtenus dans les jonctions de  $500\mu\text{m}$  de diamètre interne et la *figure 68b* regroupe les résultats expérimentaux et numériques obtenus avec une jonction de  $1\text{mm}$  de diamètre interne.



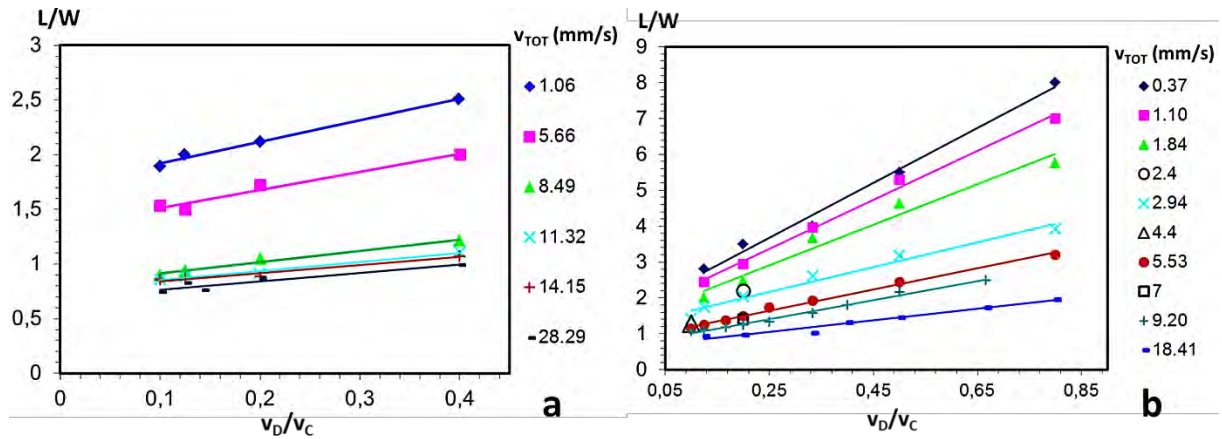


Figure 68. Forme de la goutte ( $L/W$ ) en fonction du rapport des débits ( $v_D/v_C$ ) pour différentes valeurs données de  $v_{TOT}$ . (a) diamètre interne de  $500\mu m$ . (b) diamètre interne de  $1mm$ .  $\circ$ ,  $\square$  et  $\triangle$  sont les résultats obtenus en simulation.

Dans un premier temps, on note que les données obtenues en simulation 2D sont cohérentes avec celles mesurées expérimentalement dans des canaux circulaires (Figure 68b). Ceci signifie qu'en première approximation, on peut caractériser les écoulements dans les canaux cylindriques par la vitesse moyenne donnée par l'équation 35, et ainsi le rapport des vitesses ( $v_D/v_C$ ) correspond au rapport des débits ( $Q_D/Q_C$ ). De plus, nous pouvons comparer nos résultats (Figure 68) avec ceux obtenus dans la littérature qui sont généralement obtenus dans des jonctions composées de canaux rectangulaires.

On remarque alors que pour les deux diamètres internes employés,  $L/W$  augmente linéairement avec ( $v_D/v_C$ ). Cette croissance linéaire est également observée dans la littérature pour  $L$  en fonction de ( $Q_D/Q_C$ ) dans des canaux rectangulaires (Tice *et al.*, 2004, Garstecki *et al.*, 2006, Christopher *et al.*, 2008, Liu & Zhang, 2009a, van Steijn *et al.*, 2010) mais seulement dans le régime « squeezing » avec  $Ca < 0,01$ . Dans nos expériences, la relation linéaire est présente dans les régimes « squeezing » et « dripping, c'est-à-dire pour toutes les valeurs de  $Ca$  explorées de 0,001 à 0,1.

Par ailleurs nous constatons que  $L/W$  diminue également avec  $v_{TOT}$  pour une valeur de ( $v_D/v_C$ ) donnée que ce soit expérimentalement ou dans les simulations en 2D. Ceci est plus marqué pour  $v_{TOT} < 7mm/s$ . Ainsi les gouttes de  $L/W$  proche de 1 sont obtenues avec des valeurs élevées de  $v_{TOT}$  et faibles de ( $v_D/v_C$ ). Cela correspond au régime « dripping » observé dans la figure 68 et correspondant à  $Ca > 0,015$ , où la présence d'un « pincement » réduit l'alimentation de la goutte en phase dispersée. Par conséquent,  $Ca$  influe également sur  $L/W$ . Ainsi, au lieu de suivre  $L/W$  en fonction de  $v_D/v_C$  comme dans la littérature, il est également important d'étudier l'influence de  $v_{TOT}$  et de  $Ca$ .



### 5.1.4.2 Influence de $v_{TOT}$ sur $L/W$ en tenant compte de $v_D/v_C$

On décrit la relation linéaire obtenue expérimentalement entre  $L/W$  et  $v_D/v_C$  (Figure 68) avec l'équation 40,

$$\frac{L}{W} = \alpha \frac{v_D}{v_C} + \beta$$

Équation 40

Deux paramètres sont alors impliqués sur les courbes linéaires d'ajustement, une pente  $\alpha$  et une valeur initiale  $\beta$  (pour  $v_D/v_C=0$ ).  $\beta$  correspond à la longueur minimum des gouttes. Dans la littérature les valeurs de  $\alpha$  et  $\beta$  sont fixes de l'ordre de 1 d'après Garstecki et al. (Garstecki *et al.*, 2006). Dans nos expériences les deux paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  diminuent linéairement avec  $v_{TOT}$  (Figure 69), mais avec deux pentes différentes suivant la gamme de  $v_{TOT}$ .

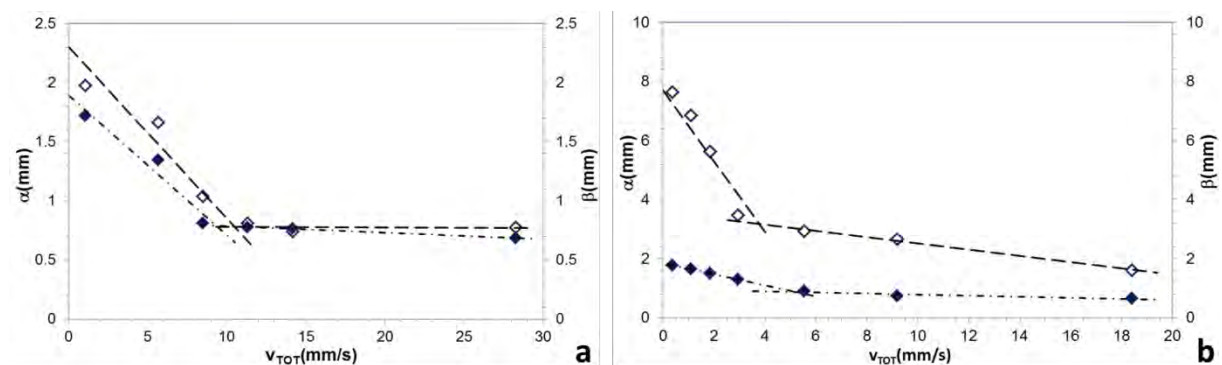


Figure 69. Courbes des paramètres ( $\diamond$ )  $\alpha$  et ( $\blacklozenge$ )  $\beta$  en fonction de  $v_{TOT}$  obtenues pour le diamètre interne de (a)  $500\mu\text{m}$  et (b)  $1\text{mm}$ .

Le changement de pente pour  $\alpha$  et  $\beta$  se produit à des valeurs très proches de  $v_{TOT}$ , i.e.  $9\text{-}10\text{mm/s}$  pour le diamètre interne de  $500\mu\text{m}$  (Figure 69a) et  $4\text{-}5\text{mm/s}$  pour le diamètre interne de  $1\text{mm}$  (Figure 69b). La valeur de  $\beta$  au point d'intersection des deux pentes est proche de 1, c'est-à-dire que la longueur des gouttes est de l'ordre du diamètre du canal. En fait, les deux pentes de  $\alpha$  et  $\beta$  correspondent à deux régimes de gouttes qui dépendent de la valeur de  $v_{TOT}$  :

- Pour les valeurs de  $v_{TOT}$  faibles ( $0\text{-}9\text{mm/s}$ )  $\beta > 1$ , ce qui signifie que quelle que soit la valeur de  $v_D/v_C$ , la goutte se détache seulement après que son diamètre atteigne le diamètre du canal et la goutte s'étend même encore en longueur. Ainsi, même pour  $v_D$  très faible,  $v_C$  est suffisamment faible pour que la phase

dispersée remplit la jonction. L'estimation de  $Ca$  aux  $v_{TOT}$  faibles (Figure 66) donne  $Ca < 0,01-0,015$ , ce qui correspond au régime « squeezing » de la littérature. Nos résultats expérimentaux montrent que dans ce régime, les deux paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  varient considérablement avec  $v_{TOT}$  (Figure 68 et Figure 69).

- Pour les valeurs de  $v_{TOT}$  élevées (9-15mm/s),  $\beta < 1$ , c'est-à-dire, pour les petites valeurs de  $v_D/v_C$ , la goutte est détachée avant son diamètre atteigne le diamètre du canal. Même pour les valeurs de  $v_D$  importantes, la phase dispersée ne peut pas remplir le coup transversal du canal car  $v_C$  est aussi très élevée. Dans ce cas-là, c'est le régime de dripping. Nos résultats expérimentaux montrent que  $\alpha$  et  $\beta$  sont moins affectés par  $v_{TOT}$  et  $v_D/v_C$  dans ce régime (Figure 68 et Figure 69).

La relation linéaire avec  $(v_D/v_C)$  et la dépendance des deux régimes avec  $Ca$  sont en accord avec la littérature. Cependant, nos résultats montrent que  $\alpha$ ,  $\beta$  et ainsi  $L/W$  sont clairement influencés par  $v_{TOT}$  c'est-à-dire les valeurs absolues de  $v_C$  et  $v_D$ . De plus, deux valeurs différentes de  $v_D/v_C$  peuvent donner la même valeur de  $L/W$  si  $v_{TOT}$  est variée de la façon adéquate (Figure 68). Ainsi dans la figure 70 nous avons regroupé les influences de  $(v_D/v_C)$  et  $v_{TOT}$  sur  $L/W$  en traçant  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$ .

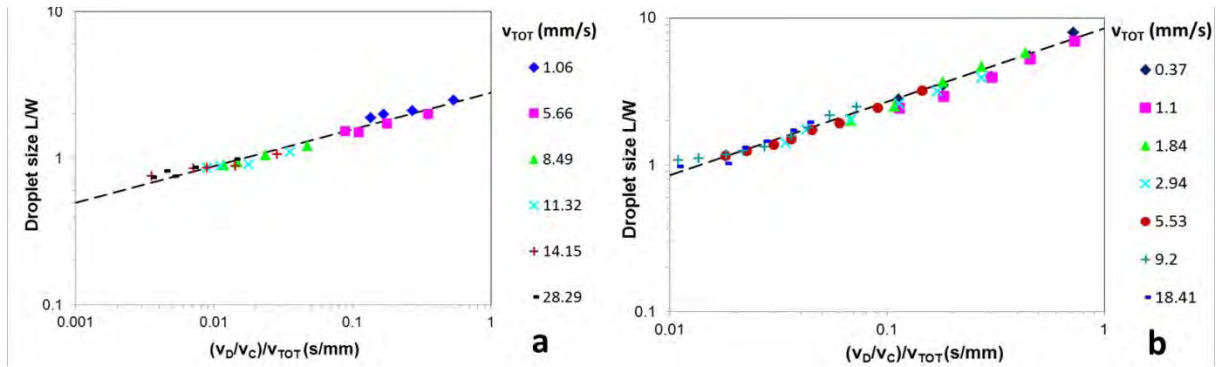


Figure 70. Courbe de  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  obtenue expérimentalement pour les diamètres internes de (a)  $500\mu m$  et (b)  $1mm$ .

On peut déduire la loi d'échelle de  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  (Équation 41) à partir des courbes d'ajustement de la figure 70,

$$\frac{L}{W} = (K_1 \times \frac{v_D/v_C}{v_{TOT}})^m$$

Équation 41

La valeur de  $m$  est proportionnelle au diamètre interne du canal – soit 0,25 pour 500 $\mu\text{m}$  et 0,5 pour 1mm ce qui conduit à une influence croissante de  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  sur  $L/W$  avec le diamètre interne du canal. Par contre, le préfacteur  $K_1$  est similaire ( $\sim 68\text{mm/s}$ ) pour les deux diamètres. Le rapport  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  nous permet de contrôler la taille des gouttes. Les gouttes monodispersées peuvent être produites pour une variété de  $(v_D/v_C)$  en gardant  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  constant. D'un autre côté, les gouttes avec différentes tailles peuvent être générées tout en gardant  $v_D/v_C$  constant si on varie  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$ . Pour nos applications, la valeur de  $K_1$  peut être considérée comme une vitesse caractéristique pour définir la zone de travail qui permettrait d'obtenir des gouttes bien mélangées et donc proche de la forme sphérique tout en évitant leur coalescence.

Cette relation entre  $L/W$  et  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  ne tient pas compte des propriétés physico-chimiques des deux phases, i.e. la viscosité  $\mu_C$  et la tension interfaciale  $\gamma_{CD}$ . De même Garstecki et al. (Garstecki *et al.*, 2006) ont montré que dans le régime « squeezing » ( $Ca$  faible),  $L/W$  dépendait peu des propriétés physico-chimiques des deux phases. Cependant comme nous observons deux régimes de goutte suivant la valeur de  $Ca$ , nous ne pouvons ignorer le rôle de ces propriétés.

### 5.1.4.3 Influence de $Ca$ sur $L/W$ en tenant compte de $v_D/v_C$

Nous avons vu précédemment que  $Ca$  et  $v_D/v_C$  avaient une influence sur  $L/W$ . Nous étudions donc dans cette partie les influences combinées de  $Ca$  et de  $v_D/v_C$  sur  $L/W$ . en traçant la courbe de  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/Ca]$  pour des valeurs données de  $v_{TOT}$  (Figure 71).

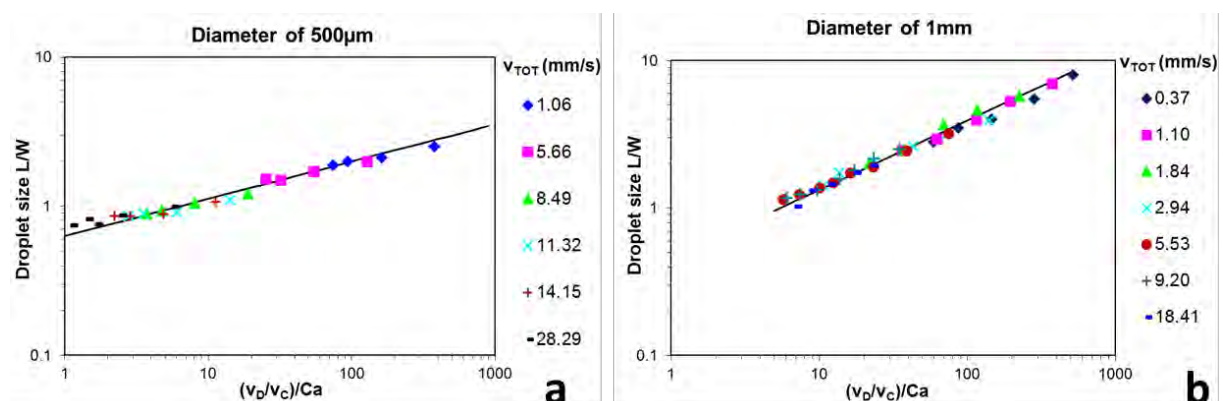


Figure 71. Courbe de  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/Ca]$  obtenue expérimentalement pour les diamètres internes de (a) 500 $\mu\text{m}$  et (b) 1mm.

On peut déduire une loi d'échelle de  $L/W$  en fonction de  $[(v_D/v_C)/Ca]$  (Équation 42) à partir des courbes d'ajustement de la *figure 71*,

$$\frac{L}{W} = \left( K_2 \times \frac{v_D/v_C}{Ca} \right)^n$$

Équation 42

La valeur de  $n$  est proportionnelle au diamètre interne du canal – soit 0,25 pour 500 $\mu$ m et 0,5 pour 1mm conduisant à une influence croissante de  $[(v_D/v_C)/Ca]$  sur  $L/W$  avec le diamètre interne du canal. Par contre, le préfacteur  $K_2$  est similaire ( $\sim 19$ ) pour les deux diamètres.

Cette loi empirique est cohérente avec la littérature pour les valeurs de  $Ca$  élevées (0.05–1) (Xu et al., 2008, Christopher et al., 2008, Zhao & Middelberg, 2011). C'est en accord avec l'augmentation de  $L/W$  avec  $\gamma_{CD}$  observée par Wehking (Wehking *et al.*, 2014) et la diminution de  $L/W$  avec  $\mu_C$  observée par Gupta (Gupta & Kumar, 2010). Cependant, il est à noter que notre relation est valable pour une gamme de  $Ca$  plus large que celle de la littérature de 0,005 à 1.

Les paramètres  $\gamma_{CD}$  et  $\mu_C$  étant fixes dans notre étude, ils peuvent être pris en compte dans  $K_2$ . Par conséquent, on remarque que l'équation 41 et l'équation 42 dépendent de  $(v_D/v_C)$  avec les mêmes valeurs des exposants ( $m$  et  $n$ ), qui dépendent du diamètre interne du canal. De plus  $K_1$  et  $K_2$  ne sont pas influencés par ce diamètre interne. Ainsi pour un diamètre de canal donné, on peut déterminer ces lois empiriques et prédire la forme  $L/W$  des gouttes en connaissant  $v_C$  et  $v_D$  appliquées et les propriétés physico-chimiques des phases. Enfin  $v_C$  étant fixée par  $Ca$  et  $v_D$  par  $v_{TOT}$ , il est intéressant de regarder les influences combinées de  $v_{TOT}$  et  $Ca$  sur la forme des gouttes.

#### 5.1.4.4 Influence de $Ca$ sur $L/W$ sans tenir compte de $v_D/v_C$

Nous avons montré précédemment que  $v_{TOT}$  et  $Ca$  influençait  $L/W$  en plus de  $(v_D/v_C)$ . Il reste alors une question : est-ce que l'on peut relier directement  $L/W$  à  $v_{TOT}$  et  $Ca$ , sans tenir compte  $v_D/v_C$  ? Pour cela, nous avons d'abord tracé  $L/W$  en fonction de  $Ca$  pour des valeurs données de  $v_{TOT}$  (*Figure 72*).

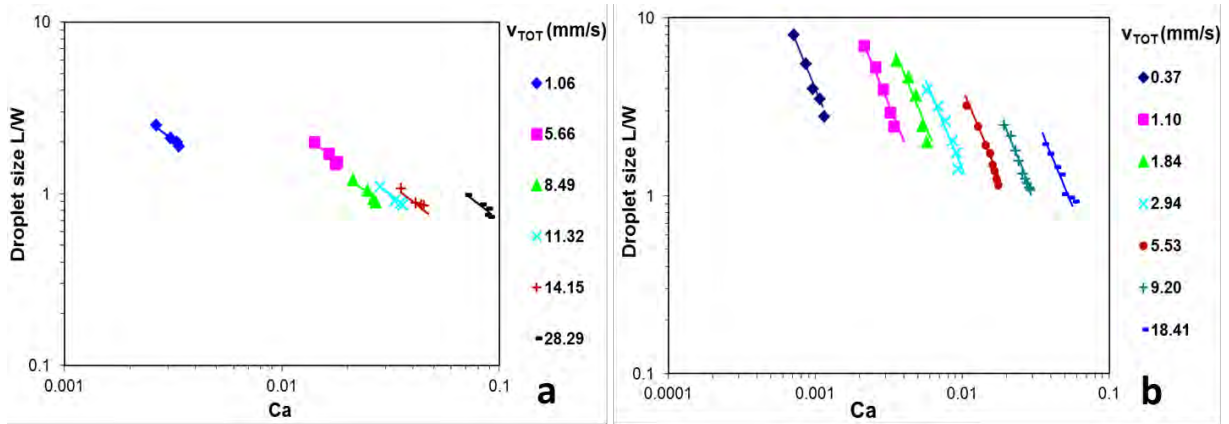


Figure 72. Courbes de  $L/W$  en fonction de  $Ca$  obtenue expérimentalement pour des valeurs données de  $v_{TOT}$  et pour les diamètres internes de (a)  $500 \mu m$  et (b)  $1 mm$ .

Nous remarquons que pour une valeur donnée de  $v_{TOT}$ ,  $L/W$  diminue avec  $Ca$ . Ainsi, nous pouvons déduire une loi d'échelle de  $L/W$  en fonction de  $v_{TOT}$  et de  $Ca$  (Équation 43) à partir des courbes d'ajustement de la figure 72.

$$\frac{L}{W} = \frac{v_{TOT}}{K_3 \times Ca^{4/3}}$$

Équation 43

L'équation 43 nous montre que  $L/W$  augmente linéairement avec  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  ce qui nous conduit donc à tracer  $L/W$  en fonction de  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  afin de combiner tous les résultats obtenus pour différents  $v_D/v_C$  (Figure 73).

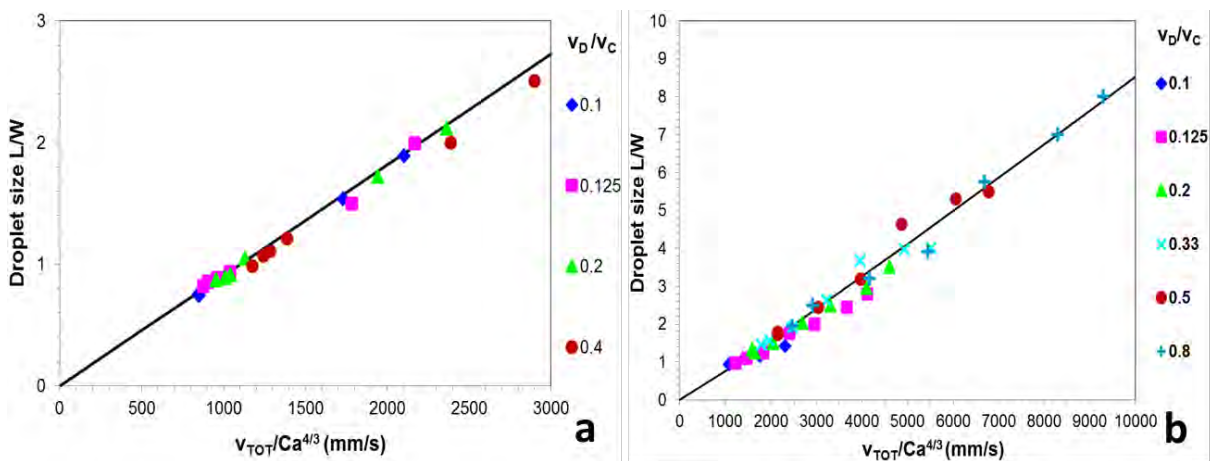


Figure 73. Courbe de  $L/W$  en fonction de  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  obtenue expérimentalement pour des valeurs données de  $v_D/v_C$  pour les diamètres internes de (a)  $500 \mu m$  et (b)  $1 mm$ .

Le pré-facteur  $K_3$  est similaire ( $10^{-3}$ mm/s) pour les deux diamètres du canal. Ainsi on peut considérer  $K_3$  comme une vitesse caractéristique pour définir la zone de travail qui permettrait d'obtenir des gouttes bien mélangées et donc proche de la forme sphérique tout en évitant leur coalescence. Ainsi, cette loi empirique permet de prédire la valeur de  $L/W$  pour chaque couple  $(v_{TOT}, Ca)$ . Dans la littérature,  $L$  est reliée soit à  $(v_D/v_C)$  (Garstecki *et al.*, 2006), soit à  $v_C$  (Liu & Zhang, 2009a). Dans notre étude,  $v_{TOT}$  contient  $v_C$  et  $v_D$ , et  $Ca$  contient  $v_C$ . Par conséquent il semble plus important de connaître les valeurs absolues des vitesses que leur rapport.

### 5.1.5 Etude de $f_D$

Dans cette partie, nous nous intéressons à la fréquence des gouttes que nous avons défini en §4.3.1.3.4. Cette fréquence est peu étudiée dans la littérature, même si elle n'est pas compliquée à calculer avec les données expérimentales. Nous commençons alors par regarder  $f_D$  en fonction de  $v_D/v_C$  pour des valeurs données de  $v_{TOT}$  (Figure 74) comme pour  $L/W$ .  $f_D$  est déterminée à partir des expériences réalisées dans les canaux de diamètre interne  $500\mu\text{m}$  (Figure 74a) et de  $1\text{mm}$  (Figure 74b). Les simulations numériques réalisées avec un canal de diamètre interne de  $1\text{mm}$  (Figure 74b) sont cohérents avec les résultats expérimentaux.

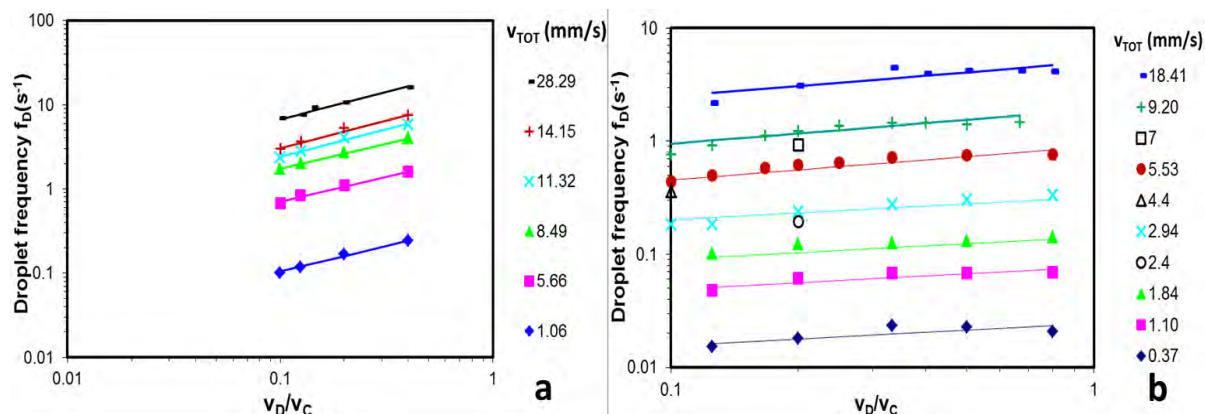


Figure 74. Courbes de la fréquence des gouttes  $f_D$  en fonction du rapport des débits  $(v_D/v_C)$  pour des valeurs données de  $v_{TOT}$  : (a) diamètre interne de  $500\mu\text{m}$ . (b) diamètre interne de  $1\text{mm}$ .  $\circ$ ,  $\square$  et  $\triangle$  sont les résultats obtenus en simulation.

Pour les deux diamètres internes,  $f_D$  augmentent suivant une loi en puissance avec  $v_D/v_C$  (Figure 74) ce qui est cohérent avec la littérature, Gupta qui étudie  $f_D$  en fonction du rapport de débits  $Q_D/Q_C$  ( $v_D/v_C$  est égale à  $Q_D/Q_C$ ) (Gupta, 2010). Il est à noter que les auteurs utilisent des canaux rectangulaires tandis que nous utilisons des canaux cylindriques. Cependant, dans nos expériences,  $f_D$  dépend clairement de  $v_{TOT}$ . En effet pour une valeur donnée de  $v_D/v_C$ ,  $f_D$  augmente avec  $v_{TOT}$  ce que l'on retrouve dans les simulations en 2D pour  $v_D/v_C = 0,2$ .



D'après notre étude de  $L/W$ ,  $Ca$  doit influencer  $f_D$  comme  $v_{TOT}$ . De plus, l'équation 43 et la figure 73 montre que nous pouvons relier directement  $L/W$  à  $v_{TOT}$  et  $Ca$ , sans tenir compte de  $v_D/v_C$ . Nous traçons donc également  $f_D$  en fonction de  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  afin de combiner tous les résultats obtenus pour différents  $v_D/v_C$  (Figure 75).

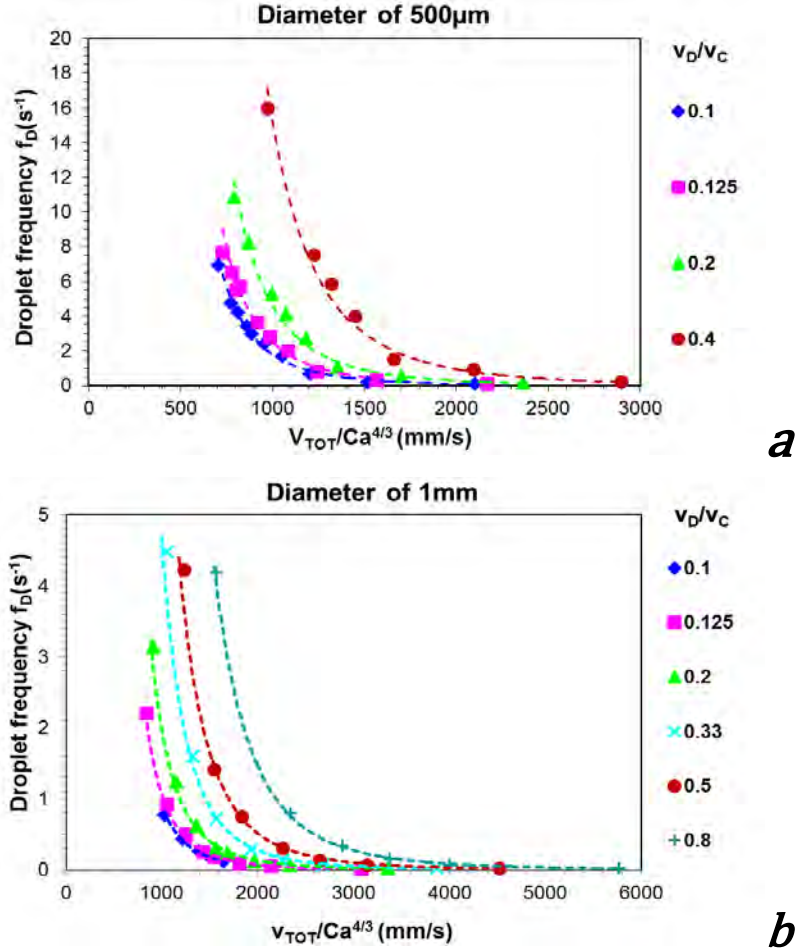


Figure 75. Courbes de  $f_D$  en fonction de  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  obtenue expérimentalement pour des valeurs données de  $v_D/v_C$  et pour le diamètre interne de (a) 500μm et (b) 1mm.

$f_D$  augmente avec  $v_D/v_C$  et diminue quand le diamètre du canal augmente. On a obtenu la loi d'échelle de  $f_D$  en fonction de  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  (Équation 44) à partir des courbes d'ajustement dans la figure 75,

$$f_D \propto \left( \frac{v_{TOT}}{Ca^{4/3}} \right)^p$$

Équation 44

Le paramètre  $p$  est identique ( $\sim -4$ ) pour les deux diamètres du canal.  $f_D$  est reliée à  $Ca^{4/3}$  comme le montre également Christopher et al. (Christopher *et al.*, 2008) et Gupta et al. (Gupta & Kumar, 2010). Néanmoins, Gupta et al. ont varié  $W_D/W_C$  - le rapport des diamètres des canaux de la phase dispersée ( $W_D$ ) et de la phase continue ( $W_C$ ) - et ils ont observé que  $f_D$  était influencée par  $W_D/W_C$  mais pas par la valeur absolue du diamètre du canal. Dans notre cas,  $W_D/W_C$  est égale à 1 et il est à noter que pour des valeurs de  $Ca$ ,  $v_D$  et  $v_{TOT}$  données,  $f_D$  diminue quand  $W$  augmente (*Figure 75*).

Dans les applications de l'équipe, la zone de travail qui permettrait d'obtenir des gouttes bien mélangées et donc proche de la forme sphérique tout en évitant leur coalescence correspond à  $L/W \sim 1$  et les valeurs faibles de  $f_D$  :

- Pour atteindre  $L/W \sim 1$ ,  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  doit être de l'ordre de 1000 mm/s d'après la *figure 73*.
- Lorsque  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  est de l'ordre de 1000 mm/s,  $f_D$  augmente avec  $v_D/v_C$ , et ceci d'autant plus rapidement que le diamètre du canal est faible, ce qui augmente donc le risque de coalescence (*Figure 75*)

D'un point de vue pratique, pour une valeur donnée de  $v_C$  (mm/s), on calcule d'abord  $v_D$  (mm/s) pour obtenir  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}] \sim 1000$ . Cela donne alors une valeur de  $v_D/v_C$  ce qui nous permet ensuite d'évaluer graphiquement la fréquence des gouttes (*Figure 75*).

Pour une valeur donnée de  $v_D$ , un moyen simple d'évaluer  $v_C$  consiste à introduire le rapport  $(v_D/v_{TOT})$  qui correspond à « la fraction de phase dispersée »  $\Phi_D$  comme définie par Tice et al. (Tice *et al.*, 2004) dans ses études du mélange dans les gouttes. Dans l'équation 45 qui résulte de l'équation 43 avec  $Ca$  et  $v_{TOT}$ , on fait apparaître ce rapport:

$$f_D = \frac{K_4 \times Ca^{4/3}}{W} \times \frac{v_D}{v_{TOT}}$$

Équation 45

Puis en traçant  $f_D$  en fonction de  $(Ca^{4/3} \times \Phi_D)$ , nous combinons tous les résultats expérimentaux obtenus pour différents rapports  $(v_D/v_C)$  (*Figure 76*). Nous évaluons alors le préfacteur  $K_4$  qui est de l'ordre de 1000 mm/s pour les deux diamètres du canal. Comme nous avons choisi  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  de l'ordre de 1000 mm/s pour nos applications,  $K_4$  peut être considéré comme une vitesse caractéristique qui définit la zone de travail pour obtenir des gouttes bien mélangées ( $L/W \sim 1$ ) sans coalescence. La valeur absolue de  $v_D$  peut alors être choisie (sans fixer ni  $v_C$ , ni  $v_D/v_C$ ) en utilisant l'équation 45, de façon à



obtenir la valeur souhaitée de  $f_D$ . Enfin, la même valeur de  $f_D$  pouvant être réalisée avec différentes valeurs de  $v_D$  comme le montre la figure 75, cela revient à élargir la zone de travail de  $(v_D/v_C)$ .

En conclusion, à partir des équation 43 et 45, on peut prédire  $L/W$  et  $f_D$  pour des applications pratiques avec des paires de valeurs des vitesses des fluides qui sont :  $[v_{TOT}$  et  $(v_D$  ou  $v_C)$ ] pour l'équation 43 et  $[v_D$  et  $v_C]$  pour l'équation 45. De plus, on peut définir la zone de travail pour ces paires de paramètres à partir d'un  $v_D$  fixé de façon à générer des gouttes homogènes de diamètre proche de celle du capillaire et une fréquence basse.

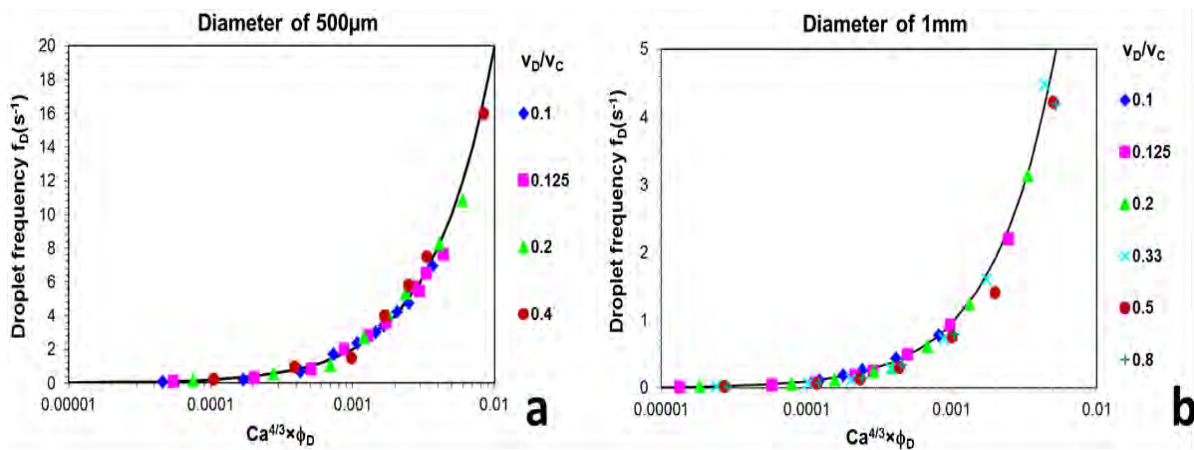


Figure 76. Courbe de  $f_D$  en fonction de  $(Ca^{4/3} \times \phi_D)$ , correspondant à l'équation 45, obtenue expérimentalement pour des valeurs données de  $v_D/v_C$  et pour le diamètre interne de (a)  $500\mu m$  et (b)  $1mm$ .

En conclusion de ce chapitre, notre étude hydrodynamique a porté sur un outil microfluidique, utilisé pour les expériences de cristallisation, qui est composé d'une jonction en T et de deux canaux de section circulaire. Dans un premier temps, les résultats expérimentaux en 3D et les simulations en 2D confirment que nos canaux cylindriques peuvent être comparés aux géométries planaires avec des sections rectangulaires décrites dans la littérature. Par conséquent, l'écoulement des phases dans les canaux réels en 3D peut être représenté par une vitesse moyenne à la place du débit. De plus, cette étude explore l'influence sur la génération, de la vitesse totale des phases  $v_{TOT}$  et du nombre capillaire  $Ca$ , en plus du rapport des vitesses des phases  $(v_D/v_C)$ . Ainsi nous démontrons que pour prédire la forme et la fréquence des gouttes :

- le rapport  $(v_D/v_C)$  est insuffisant,
- la valeur absolue de vitesse  $v_{TOT}$  ou de  $v_D$  et  $v_C$  sont indispensables,
- on peut établir des lois empiriques impliquant  $v_D$ ,  $v_C$  et  $Ca$ .

## 5.1.6 Article 1:

### **Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics**

Résumé : Nous étudions la génération de gouttes de taille à l'échelle nanométrique dans un système microfluidique qui est composé d'une jonction en PEEK sous forme de T et des capillaires en Téflon. Ce système est conçu pour une approche statistique des expériences de cristallisation à base de gouttes. Ainsi le but est de générer des centaines de gouttes qui sont identiques en taille et en composition chimique et qui sont homogènes dans l'espace. Les paramètres que l'on cherche à contrôler sont la taille des gouttes et la fréquence des gouttes. Cependant, la géométrie de la jonction en T n'est pas parfaite. En plus, à l'inverse des géométries planaires avec des sections transversales rectangulaires qui sont souvent utilisées, les canaux internes de la jonction en T sont circulaires. Cependant, dans les expériences en 3D et les simulations en 2D, nous avons observé les mêmes régimes de la génération de gouttes avec la même stabilité pour les canaux circulaires et les géométries planaires. Ainsi, cela nous permet d'utiliser des vitesses de fluide au lieu des débits de fluide pour caractériser le système microfluidique. Afin d'assurer une homogénéité des gouttes dans les canaux de 500 $\mu$ m et de 1mm de diamètre interne, nous définissons une zone de travail en termes de taille et de fréquence des gouttes en établissant des relations empiriques impliquant la vitesse totale, le rapport de vitesse et le nombre capillaire.



# Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics

Shuheng Zhang<sup>a</sup>, Carine Guivier-Curien<sup>b</sup>, Stéphane Veesler<sup>a</sup>, Nadine Candoni<sup>a,\*</sup>

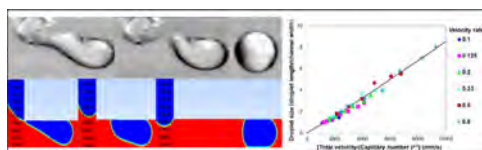
<sup>a</sup> Aix Marseille Université, CNRS, CINaM UMR 7325, 13288 Marseille, France

<sup>b</sup> Aix Marseille Université, CNRS, ISM UMR 7287, 13288 Marseille, France

## HIGHLIGHTS

- Hydrodynamic of nanodroplets in a microfluidic system using a T-junction.
- Comparison of 3D cylindrical channels with 2D simulations using average velocity.
- Relation between size and frequency of droplets and total velocity, velocity ratio and Ca.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 December 2014

Received in revised form

10 July 2015

Accepted 30 July 2015

Available online 10 August 2015

### Keywords:

Microfluidic

Drop

Microreactor

Multiphase flow

Hydrodynamics

Fluid mechanics

## ABSTRACT

We study the formation of nanoliter-sized droplets in a microfluidic system composed of a T-junction in PEEK and tubing in Teflon. This system, practical for a 'plug and play' set-up, is designed for droplet-based experiments of crystallization with a statistical approach. Hence the aim is to generate hundreds of droplets identical in size and composition and spatially homogeneous. Therefore, parameters of control are droplet size and frequency. However, the geometry of the T-junction is not perfect and, moreover, its channels are circular, as opposed to the planar geometries with rectangular cross-sections that are usually used. However, based on 3D experiments and 2D simulations, we observe the same regimes of droplet generation in circular channels as in planar geometries, and with the same stability. Therefore, we refer to velocities instead of flow rates to characterize the system. Then we define operating range in terms of droplet size and frequency through empirical relations using total velocity, velocity ratio and capillary number, to ensure homogeneous droplets in channels of 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm diameters.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nanoliter-sized droplets are increasingly used as nano-reactors in chemistry, for crystallization (Li et al., 2006; Selimovic et al., 2009), reaction (Li and Ismagilov, 2010) and analysis (Zare and Kim, 2010; Brouzes et al., 2009; Burns et al., 1998) studies. First, less material is consumed in nanoliter-sized droplets than in milliliter crystallizers. It is important to reduce material consumption when only small quantities of material are available, i.e. rare molecules such as pharmaceutical ingredients, purified proteins,

or dangerous materials (energetic materials). Second, generating hundreds of nanoliter-sized droplets permits statistical analysis. Therefore microfluidic technologies are used with two-phase non-miscible flows, through flow-focusing (Gañán-Calvo and Gordillo, 2001; Anna et al., 2003), co-flowing (Umbanhowar et al., 1999; Garstecki et al., 2005) and cross-flowing (Thorsen et al., 2001; Garstecki et al., 2006). In our application, the microfluidic system is dedicated to droplet-based crystallization experiments. Nanoliter volumes makes it possible to nucleate a limited number of crystals that we can locate easily, and the generation of hundreds of nanoliter-sized droplets allows stochasticity of nucleation to be addressed Candoni et al. (2012). Therefore, our purpose is to generate hundreds of droplets identical in size and composition. Moreover, as we mix different solutions before the generation of

\* Corresponding author. Tel.: +33 617248087.

E-mail address: [candoni@cinam.univ-mrs.fr](mailto:candoni@cinam.univ-mrs.fr) (N. Candoni).

droplets, the droplets' spatial homogeneity is also a crucial consideration.

In this paper, we study a 'plug and play' microfluidic system composed of a T-junction in PEEK and tubing in Teflon. Droplets are generated by cross-flowing the crystallization solution and the non-miscible oil, which is the continuous phase. The advantage of both Teflon and PEEK polymers over PDMS, which is only compatible with water, is their compatibility with organic solvents such as ethanol, acetone or nitrobenzene (Ildefonso et al., 2012). We choose ethanol as crystallization medium in order to ensure maximum versatility; we use as continuous phase fluorinated oil FC-70 which has no or very low miscibility with solvents like ethanol and good wettability with Teflon. Hence the shear of the continuous phase, which is injected into the junction perpendicular to the dispersed phase, leads to the break-up of dispersed phase droplets. We use Nemesys pumps to inject the continuous and the dispersed phase with reproducible flow rates, allowing us to generate droplets of the dispersed phase identical in size and frequency. Mixing inside droplets after their break-up is accelerated by the flow of the continuous phase if droplets can twirl in the channel, and hence the droplets are spatially homogeneous. But this twirling requires spherical droplets, which means that droplet diameter must be smaller than or equal to the channel diameter. However, droplets smaller than channel diameter can move in the channel and coalesce, depending on the frequency at which they are generated. The minimum droplet size must therefore be of the order of channel diameter and the frequency must be low.

The literature contains many experimental studies and simulations investigating the size of droplets. To the best of our knowledge, the studies presented in the literature use planar geometries with rectangular cross-section typically between 50 and 300  $\mu\text{m}$ . They explore phase properties (viscosity (Garstecki et al., 2006; Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Gupta and Kumar, 2010; Glawdel et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2011; Wehking et al., 2013) and surface tension (Thorsen et al., 2001; Xu et al., 2008; Wehking et al., 2013), channel geometry (the height and the width of the channels (Garstecki et al., 2006; Glawdel et al., 2012a, 2012b; Wehking et al., 2013; Van Steijn et al., 2010)) and operating parameters (flow rate ratio (Garstecki et al., 2005, 2006; Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Gupta and Kumar, 2010; Glawdel et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2011; Van Steijn et al., 2010; Tice et al., 2003; Zhao and Middelberg, 2011)). Droplet size is shown to be influenced by flow rate ratio and capillary number (Garstecki et al., 2006; Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Wehking et al., 2013; Van Steijn et al., 2010; Tice et al., 2003; Zhao and Middelberg, 2011) ( $Ca$ ). Moreover flow velocities are generally used instead of flow rates to represent droplet parameters (Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Glawdel et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2011; Tice et al., 2003; Nisisako et al., 2002). To date, four distinct regimes of droplet formation or break-up within the confined geometry of a microfluidic T-junction have been

described in the literature: squeezing, transient, dripping and jetting (Thorsen et al., 2001; Garstecki et al., 2006; Xu et al., 2008; De Menech et al., 2008). At low  $Ca$ , squeezing operates as a rate-of-flow-controlled regime, break-up arising from the pressure drop across the emerging droplet in the channel (Garstecki et al., 2006). At  $Ca > 0.01$ , dripping operates, shear stress playing an important role in break-up (Thorsen et al., 2001). Jetting operates at very high flow rates and/or with low surface tension (De Menech et al., 2008). An intermediate regime between squeezing and dripping, named transient, is observed by Xu et al. (2008) for  $0.002 < Ca < 0.01$ , in which break-up is controlled by both pressure drop and shear stress. But most authors did not use a transient regime and worked with a critical  $Ca$  of  $\approx 0.015$  to define the transition between squeezing and dripping (De Menech et al., 2008). In contrast, few studies deal with droplet frequency (Christopher et al., 2008; Gupta and Kumar, 2010; Wehking et al., 2013) even though it is easy to calculate using experimental results from the literature.

Our microfluidic configuration is easy to build and to use (Candoni et al., 2012; Ildefonso et al., 2012); it has circular channels, and the T-junction is not intended to be used for microfluidic experiments because its geometry is not perfect. Thus in this paper, we compare our non-perfect T-junction with circular channels to purpose-designed planar geometries with rectangular cross-sections molded in PDMS. We investigate the effect of total flow rate, flow rate ratios and capillary numbers on both droplet size and frequency. The aim is to define the operating range through empirical relations to ensure homogeneous droplets in channels of 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm diameters.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental set-up

The microfluidic system (Fig. 1a) is composed of two tubings of identical internal diameter  $W$  ( $W$  is either 500  $\mu\text{m}$  or 1 mm) made of Teflon. They are connected in a T-junction from IDEX in PEEK (polyether ether ketone) at right angles. The main channel contains the continuous phase (oil) whereas the orthogonal channel contains the dispersed phase (ethanol). The inner diameter of the T-junction is identical to that of the tubings, i.e. 500  $\mu\text{m}$  or 1 mm (Fig. 1b).

The continuous phase and the dispersed phase are separately loaded using separate syringes placed in a syringe pump (neMESYS), which generates extremely smooth and pulsation-free fluid streams from 0.01  $\mu\text{L/s}$ . The two phases are injected with given flow rates as follows: 0.15–12.3  $\mu\text{L/s}$  for the continuous phase ( $Q_C$ ) and 0.03–6.2  $\mu\text{L/s}$  for the dispersed phase ( $Q_D$ ). The ratio between the dispersed and the continuous flow rates ( $Q_D/Q_C$ ) is varied from 0.1 to 0.8 and the total flow rate  $Q_{TOT} (=Q_D+Q_C)$  is varied from 0.28–14  $\mu\text{L/s}$ . Variation in droplet size is 5% of the mean diameter, corresponding to 15% in terms of volume. However this variability is

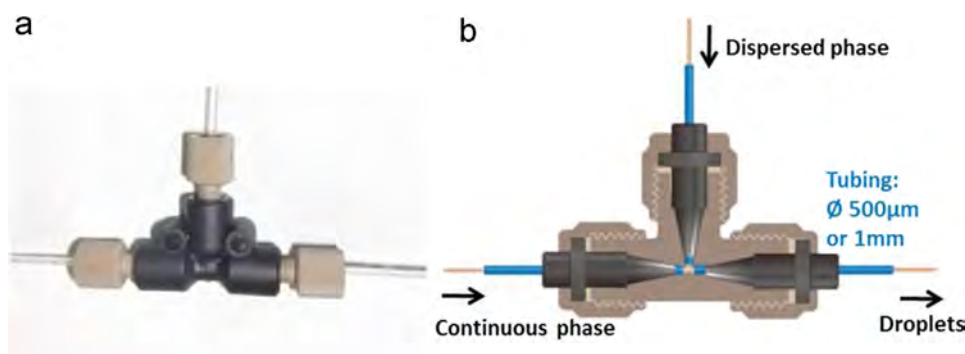
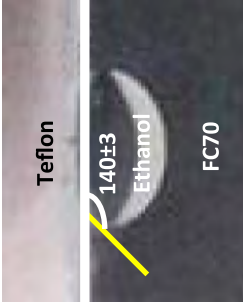


Fig. 1. (a) Photo and (b) scheme of PEEK T-junction from IDEX Health and Science catalog.

**Table 1**  
Physico-chemical phase properties; density and dynamic viscosity are from the manufacturer's data sheet; surface tension is measured by the pendant drop method at 23 °C; contact angle is measured by the sessile drop method at 23 °C.

Phases	Density (kg/m <sup>3</sup> )	Dynamic viscosity (Pa s)	Surface tension (mN/m)	Contact angle (°)
Continuous phase: fluorinated oil FC70 Dispersed phase: ethanol	$\rho_C = 1940$ $\rho_D = 789$	$\mu_C = 0.023$ $\mu_D = 0.0012$	$\gamma_{CD} = 6.7$	

acceptable for chemical applications such as crystallization. Similarly, variability in droplet frequency is also acceptable because we are mainly interested in avoiding the coalescence of droplets.

## 2.2. Phase properties

The phases are fluorinated oil FC-70 for the continuous phase and ethanol for the dispersed phase. Fluorinated oil FC-70 (Hampton research) is chosen because it shows no or very low miscibility with ethanol and good wettability with the channel wall in Teflon, allowing droplets to be generated without addition of surfactants. Physico-chemical properties such as density, dynamic viscosity and surface tension are given in Table 1. The surface tension between the two phases is measured with the pendant drop method by forming droplets of ethanol in the oil at 23 °C, as previously described (Bukiet et al., 2012). Ethanol contact angle at FC-70/Teflon interface is measured at 23 °C.

## 2.3. Flow properties

The two phases are Newtonian. For a given T-junction geometry, the physico-chemical properties influencing droplet formation are density, dynamic viscosity, surface tension between the continuous and the dispersed phases, velocity of the flows and dimensions characteristic of the system, i.e. the radius of channels ( $W/2$ ) (Zhao and Middelberg, 2011). We calculate the following parameters:

- The inertial forces and the viscous forces are compared through the Reynolds number, which is calculated using the continuous phase properties: its density  $\rho_C$ , viscosity  $\mu_C$  and flow velocity  $v_C$ . It gives values of Re lower than 1, showing that the effect of inertia can be ignored:

$$Re = \frac{\rho_C \times v_C \times (W/2)}{\mu_C} \quad (1)$$

Thus the flow is laminar and their average velocity in our cylindrical microfluidic system is evaluated from the diameter  $W$  of channels and the flow rate  $Q$  as follows:

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

- The generation of droplets in a T-junction leads to the creation of a free interface between the two phases, characterized by the surface tension  $\gamma_{CD}$ . The corresponding capillary effects are in competition with gravity effects. The length above which gravity effects dominate capillary effects is the capillary length  $l_c$ :

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma_{CD}}{\Delta\rho \times g}} \quad (3)$$

with  $g$  the gravity acceleration and  $\Delta\rho$  the difference in density between the two phases. From the values of Table 1,  $l_c = 2.4$  mm. Hence the gravity does not influence the deformation of the interfaces in millimetric or sub-millimetric channels.

- The *shear stress* and the surface tension are compared through the capillary number Ca. In the generation of droplets of a dispersed phase in a continuous phase, Ca is usually calculated using the average velocity  $v_C$  and viscosity  $\mu_C$  of the continuous phase, and the surface tension  $\gamma_{CD}$ : (Thorsen et al., 2001; Garstecki et al., 2006; Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Gupta and Kumar, 2010; Wehking et al., 2013; Van Steijn et al., 2010; Tice et al., 2003; Zhao and



Middelberg, 2011).

$$Ca = \frac{\mu_C \times v_C}{\gamma_{CD}} \quad (4)$$

Note that in this work  $\mu_C$  and  $\gamma_{CD}$  are fixed. We have varied  $v_{TOT}$  ( $=v_D+v_C$ ) in a large range, i.e. more than one order of magnitude. And for a given  $v_{TOT}$ , we have varied the flow velocity ratio ( $v_D/v_C$ ) from 0.1 to 0.8. Therefore,  $v_C$  is varied in almost two orders of magnitude.

#### 2.4. 2D numerical simulations

2D numerical simulations are performed with software ANSYS and its computational phase dynamics package Fluent (version 12.1). The geometry is designed with DesignModeler, included in ANSYS software. The chosen geometry is a 2D T-junction similar to the experimental 3D geometry. The main channel is planar, with a width of 1 mm and a length of 20 mm. The secondary channel is similar, with the same width and 30 mm long. The entrance to the second channel is 30 mm away from the entrance to the main channel, assuming that the continuous phase is fully developed after 30 mm. Mesh is generated with meshing included in ANSYS software. A homogeneous structured mesh is used with 30 square cells per channel width.

Given that both phases are incompressible and immiscible, we choose the Volume of Fluid (VOF) model because it clearly describes the interface. Two-phase flows are fixed as laminar, unsteady and isothermal. The velocity and pressure fields are solved through the classical continuity equation and Navier–Stokes equation with the density  $\rho$  and the dynamic viscosity  $\mu$  such that:

$$\rho = \phi_C \rho_C + \phi_D \rho_D \quad (5)$$

$$\mu = \phi_C \mu_C + \phi_D \mu_D \quad (6)$$

with  $\phi_C$  and  $\phi_D$  the volume fraction,  $\rho_C$  and  $\rho_D$  the density, and  $\mu_C$  and  $\mu_D$  the dynamic viscosity of continuous and dispersed phases respectively.

An additional source term  $F$  is added to the Navier–Stokes equation to take into account the interfacial tension through a continuum surface force model, with  $\kappa$  the interface curvature,  $\vec{n}$  the interface outward normal vector and  $\gamma_{CD}$  the surface tension:

$$\vec{F} = 2\gamma_{CD} \times \frac{\rho\kappa\vec{n}}{(\rho_C + \rho_D)} \quad (7)$$

The governing equations are discretized to algebraic equations using a pressure based unsteady solver. The PRESTO! method is used for the pressure interpolation. The PISO algorithm and second-order upwind scheme is used for the pressure–velocity coupling and momentum equation respectively. A non-iterative time advancement (NITA) scheme is used in preference to a classical iterative time advancement scheme to speed up the simulation with equally accurate results. The time step is  $10^{-4}$  s and the global courant number is kept under 2.

At the initial stage, the main channel is filled with the continuous phase and the secondary channel with the dispersed phase. The contact angle of droplets is set constant to  $140^\circ$  as ethanol contact angle at FC-70/Teflon interface is  $140 \pm 3^\circ$  (Table 1). Phase properties are the same as described in Section 2.2. The outflow condition for the outlet is chosen. At the inlet of each channel, a constant and flat velocity profile is imposed. This 2D numerical simulation is a preliminary feasibility test, which needs to be developed further. Additional numerical simulations will be realized, including 3D and complex geometries.

### 3. Results

Our aim is to define operating range in terms of droplet size and frequency to achieve homogeneous droplets in circular channels using our T-junction. We begin by comparing our circular 3D geometry to our 2D simulation. This 2D simulation yields the same results as the planar geometries generally used in the literature. Then we investigate the role of total flow rate, flow rate ratios and capillary numbers on both droplet size and frequency in order to establish empirical laws that will help in defining the operating range in channels of 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm diameters.

#### 3.1. Relevance of velocities explored in 3D-experiments and in 2D-simulations

In this work, 2D simulations are carried out by controlling flow velocities as used in previous experimental studies to represent droplet parameters (Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Glawdel et al., 2012a, 2012b; Chen et al., 2011; Tice et al., 2003; Nisisako et al., 2002). Here, the aim is to demonstrate that the displacement of phases in 3D cylindrical channels can be expressed by the average velocity instead of the flow rate, in a first approximation. In this way, experimental droplet generation in our cylindrical channels can be compared to the literature in which planar geometry with rectangular cross-section is used.

The experimental results are obtained by varying the flow rates of the continuous and the dispersed phases. In order to study the role of the total flow velocity  $v_{TOT}$  ( $=v_D+v_C$ ), the total flow rate  $Q_{TOT}$  ( $=Q_D+Q_C$ ) is varied in a large range, i.e. more than one order of

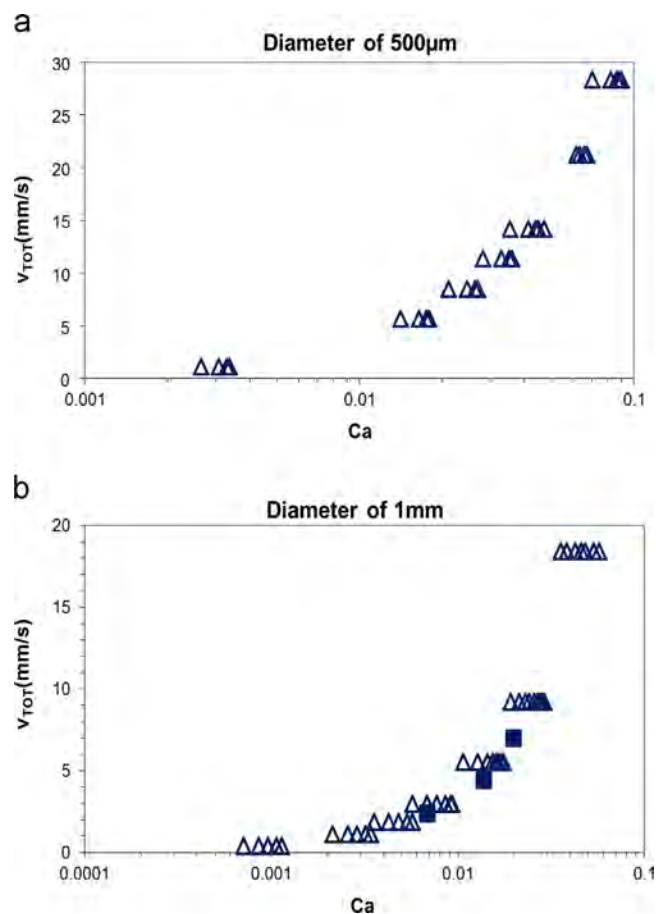


Fig. 2. Plot of the total flow velocity  $v_{TOT}$  versus  $Ca$  for diameters of (a) 500  $\mu\text{m}$  and (b) 1 mm from 3D-experiments (open symbols) and 2D-simulations (square filled symbols).

magnitude. Then for a given  $Q_{TOT}$ , i.e.  $\nu_{TOT}$ , the protocol consists in varying the flow rate ratio ( $Q_D/Q_C$ ) and so the flow velocity ratio ( $\nu_D/\nu_C$ ) from 0.1 to 0.8. Therefore,  $\nu_C$  is varied in almost two orders of magnitude. As different regimes of droplet generation are observed in the literature according to the capillary number  $Ca$ , experimental and simulation conditions are represented in Fig. 2 by plotting the explored values of  $\nu_{TOT}$  versus  $Ca$ . Here, we limit the simulations to three total flow velocities and flow velocity ratios for a channel of 1 mm diameter (Fig. 2b), due to numerical calculation time. Fig. 2 shows that  $Ca$  is explored over a wide range which surrounds the critical value of 0.01–0.015 described in the literature to represent the importance of shear stresses on interfacial forces (Thorsen et al., 2001; Garstecki et al., 2006; Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Van Steijn et al., 2010; Tice et al., 2003; Zhao and Middelberg, 2011). However  $Ca$  is based on the continuous phase only. Hence  $Ca$  is not enough to characterize the flow regime as a  $Ca$  value can be obtained for different  $\nu_D$  and so different  $\nu_{TOT}$ . Therefore we have also explored different values of  $\nu_{TOT}$  for the same  $Ca$  by varying  $\nu_D$  while keeping  $\nu_C$  constant.

### 3.2. Observation of droplet formation regimes with 3D-experiments and 2D-simulations

Experimental results obtained with 3D microfluidics using channels of 500  $\mu\text{m}$  diameter are compared with 2D simulations using channels of 1 mm diameter, in Fig. 3. In experimental results (Fig. 3a, c and e), ethanol plugs were generated and transported by the flow of oil in a transparent ETFE (Ethylene tetrafluoroethylene, a fluorine-based plastic from IDEX Health and Science catalog) T-junction. The observations were made under an optical microscope (Zeiss Axio Observer D1) equipped with a camera sCMOS (Neo, ANDOR Technology).

In experiments of Fig. 3a, c and e, different regimes of droplet formation are observed for a given  $\nu_D/\nu_C$ , depending on  $Ca$  value:

- Up to  $Ca=0.02$ , the droplet emerges in a hemispherical shape and the channel is filled by the dispersed phase as the droplet approaches the opposite wall. Then the droplet feeding proceeds making it grow in length before it forms a neck due to the flow of the continuous phase, which finally pulls it out. Hence the length of droplets is longer than  $W$ . This is the squeezing regime (Garstecki et al., 2006).
- When  $Ca$  is greater than 0.02, the flow of the continuous phase appears to compress the dispersed phase against the upper channel wall. In fact, due to the pressure exerted by the continuous phase, the dispersed phase forms a neck just after its outlet. For a given flow velocity, this neck becomes longer and thinner with increasing  $Ca$ , reducing droplet feeding before detachment. Hence droplets are shorter than  $W$ . This is called the dripping regime (Thorsen et al., 2001).
- At high values of  $Ca$  (near 0.2), a jet of the dispersed phase is observed at the junction (first pictures, Fig. 3  $Ca=0.2$  and 0.24,) with droplets forming far away from the junction. The reason why the dispersed phase jet breaks is that the surface tension  $\gamma_{CD}$  is lower for droplets than for a cylinder, while having the same volume. These Rayleigh-Plateau instabilities make droplets form farther from the dispersed phase outlet, and with a greater diameter, as the value of  $\nu_{TOT}$  increases. Therefore jet length increases with  $\nu_{TOT}$ . This is the jetting regime (De Menech et al., 2008). From our experiments, this jetting regime is obviously due to high values of both  $\nu_C$  and  $\nu_D$ .

Interestingly the simulations in Fig. 3b and d show that the behavior of phase flows qualitatively resembles that observed in experiments in similar conditions, even though the geometry is not perfect at the experimental junction. Moreover, simulations add the following information to experimental observations:

- In the dripping and the squeezing regimes, the droplet first emerges from the dispersed phase channel, and then grows until it detaches and moves under the pressure of the continuous phase.
- The transition  $Ca$  between dripping and jetting regimes decreases from 0.2 to 0.1 when  $(\nu_D/\nu_C)$  increases.
- The jetting regime appears to be correlated to total flow rate value  $\nu_{TOT}$  ( $=\nu_D+\nu_C$ ), the transition occurring at  $\nu_{TOT}$  close to  $50 \text{ mm s}^{-1}$ . This value is observed experimentally for all ratios of flow velocities. Hence the continuous phase confines the dispersed phase near the upper wall, reducing jet diameter.

In conclusion, how  $Ca$  affects squeezing-to-dripping transition and how  $\nu_{TOT}$  affects dripping-to-jetting transition are clearly shown in Fig. 3. To our knowledge, how  $\nu_{TOT}$  affects the jetting regime is observed here for the first time. However, we do not aim for droplets smaller than  $W$  diameter because of the risk of coalescence due to their mobility in the tubing. Therefore, in the quantitative comparisons of our results below, we will focus on squeezing and dripping regimes.

### 3.3. Quantitative comparison of 3D-experiments and 2D-simulations

For quantitative comparison between 2D simulations and 3D experimental results, two parameters are explored in this work: droplet size and frequency (Fig. 4).

#### 3.3.1. Droplet size

The experimental droplet length  $L$  is evaluated on pictures using the software ImageJ and  $L/W$  is calculated in order to compare results obtained with both channel diameters  $W$ . Fig. 4a represents  $L/W$  versus  $(\nu_D/\nu_C)$  for given values of  $\nu_{TOT}$ . For each value of  $(\nu_D/\nu_C)$  and  $\nu_{TOT}$ ,  $L$  is measured on roughly one hundred droplets. Simulations are carried out for 1 mm channel diameters and values of  $L/W$  are consistent with those measured in 3D experiments for given  $(\nu_D/\nu_C)$  and  $\nu_{TOT}$ .

In Fig. 4a, values of  $L/W$  increase linearly with  $(\nu_D/\nu_C)$  as reported in the literature for  $L$  versus flow rate ratio  $Q_D/Q_C$  (Garstecki et al., 2006; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Van Steijn et al., 2010; Tice et al., 2003). Our study is consistent with the literature because we define velocities by the ratio between flow rates and channel diameter, leading to  $(\nu_D/\nu_C)$  values equal to  $(Q_D/Q_C)$ . However the linear fitting curves of  $L/W$  obviously depend on  $\nu_{TOT}$ . This is confirmed by 2D simulations at  $(\nu_D/\nu_C)$  of 0.2, which lead to distinct values of  $L/W$  due to different values of  $\nu_{TOT}$ .

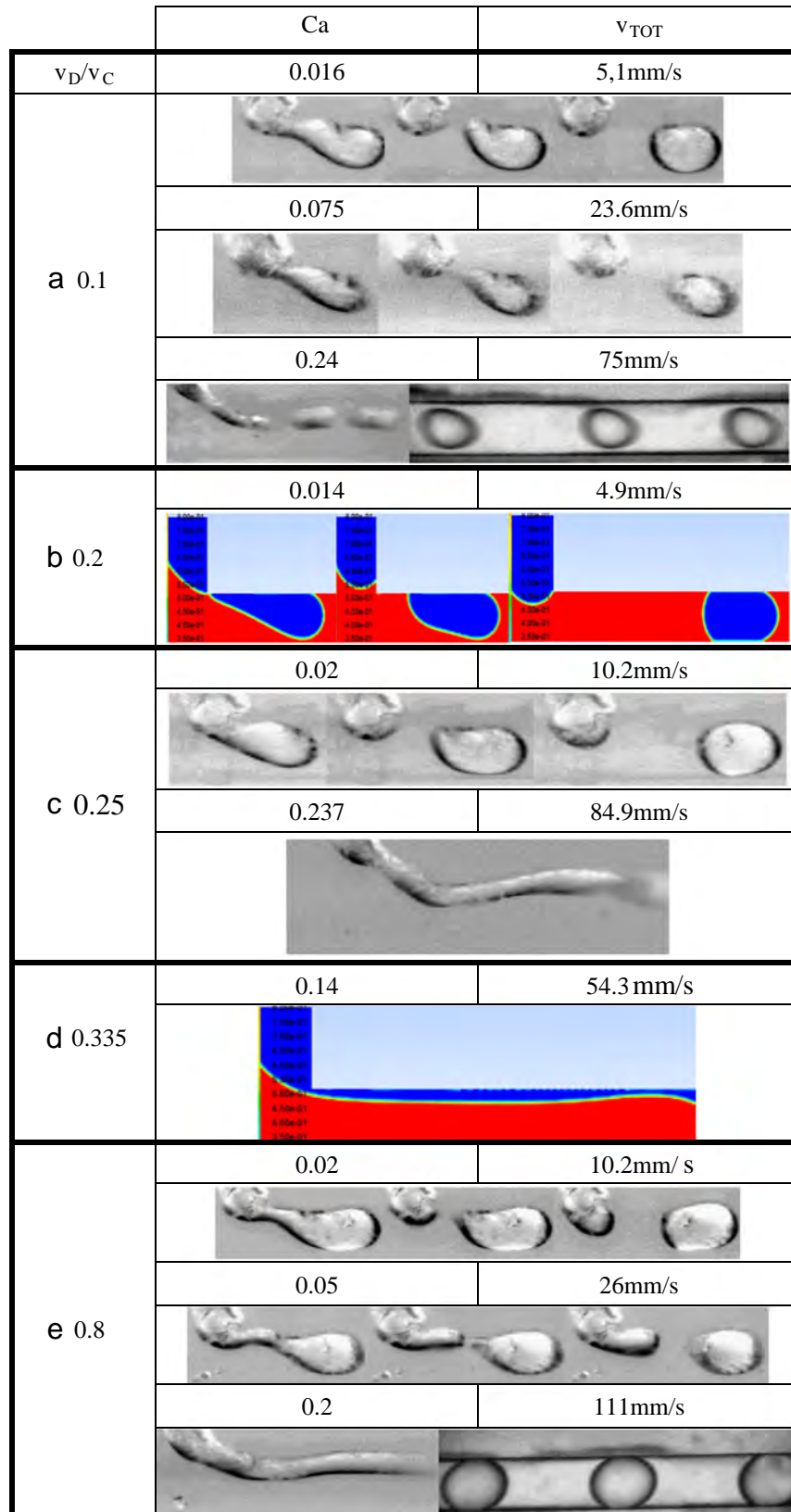
Note that droplets of similar size to the channel diameter or smaller ( $L/W \leq 1$ ) are generated with high values of  $\nu_{TOT}$  and low values of  $(\nu_D/\nu_C)$ . Moreover, for  $\nu_{TOT}$  values higher than 7 mm/s, the dependence of droplet size on  $\nu_{TOT}$  is less marked. In fact, it corresponds to the dripping regime observed in Fig. 3 at  $Ca > 0.015$ , where the presence of a neck reduces droplet feeding. Hence the dependence on  $\nu_D/\nu_C$  is also reduced.

#### 3.3.2. Droplet frequency

In the literature, droplet frequency, defined as the number of droplets per second, is given by the ratio between the flow rate of the dispersed phase and the volume of droplets in a steady regime, in order to conserve the mass of the dispersed phase. As our aim is to represent a flow by its velocity, we define the droplet frequency  $f_D$  as the production rate of a dispersed phase of  $L$  length due to injection at a velocity  $\nu_D$ . Hence  $f_D$  is given by:

$$f_D = \frac{\nu_D}{L} \quad (8)$$

Fig. 4b represents  $f_D$  measurements, varying  $(\nu_D/\nu_C)$  and  $\nu_{TOT}$  in experiments with both  $W$  values and in simulations with 1 mm



**Fig. 3.** (a), (c) and (e): droplet formation in 3D-experiments using channels of 500  $\mu\text{m}$  diameter; (b) and (d): droplet formation in 2D-simulations using channels of 1 mm diameter.

channel diameter. As for  $L/W$ ,  $f_D$  values obtained in 2D simulations are consistent with  $f_D$  measured in 3D experiments for given  $(v_D/v_C)$  and  $v_{TOT}$ .

Furthermore,  $f_D$  values increase as a power-law of  $(v_D/v_C)$  as reported in the literature for  $f_D$  versus flow rate ratio  $Q_D/Q_C^{18}$ . However the fitting curves of  $f_D$  obviously depend on  $v_{TOT}$ . This is



confirmed by simulations at  $(v_D/v_C)$  of 0.2, which lead to distinct values of  $L/W$  due to different values of  $v_{TOT}$ .

In conclusion, 3D experimental and 2D simulation results taken together confirm that it is relevant to interpret experimental results through flow velocities, even though the geometry is cylindrical at the experimental T-junction. Moreover, the average velocity of flows being defined proportional to flow rates in this paper, it is easy to compare with flow rates in the literature. We not only observe that  $L/W$  and  $f_D$  are influenced by  $(v_D/v_C)$  as described in the literature but our experimental and simulation results also show clearly that  $v_{TOT}$  plays a significant role in the generation of droplets. This contribution of  $v_{TOT}$  through the absolute values of  $v_D$  and  $v_C$  is described thoroughly in Section 4 of this paper.

## 4. Discussion

### 4.1. Is $v_D/v_C$ alone sufficient to describe $L/W$ ?

According to Sections 3.2 and 3.3,  $L/W$  is influenced by  $v_D/v_C$ , as found in the literature. However, it is obvious that the parameters  $v_{TOT}$  and  $Ca$  also play a role in droplet formation. Therefore, we start the investigation by exploring the influence of  $v_{TOT}$  and  $Ca$ , in addition to  $v_D/v_C$  on  $L/W$ .

### 4.1.1. Influence of $v_{TOT}$ on droplet size in addition to $(v_D/v_C)$

Fig. 4a shows that experimental results of  $L/W$ , obtained with 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm channel diameters ( $W$ ), indicate a linear increase of  $L/W$  with  $(v_D/v_C)$ . These linear fitting curves involve two parameters, a slope  $\alpha$  and an initial value  $\beta$  (for  $v_D/v_C=0$ ) that corresponds to the minimum droplet length:

$$\frac{L}{W} = \alpha \frac{v_D}{v_C} + \beta \quad (9)$$

In the literature, the linear relationship between  $L/W$  and  $(Q_D/Q_C)$  was described in rectangular channels only for the squeezing regime for  $Ca < 0.01$  (Garstecki et al., 2006; Christopher et al., 2008; Liu and Zhang, 2009; Van Steijn et al., 2010). In contrast, in our work the linear relationship is valid for all explored  $Ca$  values, from 0.001 to 0.1, and thus for both squeezing and dripping regimes (Fig. 3). Moreover, the variation of  $L/W$  is explained in the literature essentially by the influence of  $(Q_D/Q_C)$ , with fixed values of  $\alpha$  and  $\beta$  (in the order of 1 for Garstecki et al. (2006)). In our case, both  $\alpha$  and  $\beta$  decrease linearly with  $v_{TOT}$  (Fig. 5a), with two slopes depending on the range of  $v_{TOT}$ . The slope change occurs at a similar  $v_{TOT}$  value for both  $\alpha$  and  $\beta$ , i.e. 9–10 mm/s and 4–5 mm/s for 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm diameters respectively (Fig. 5a). The value of  $\beta$  at the intercept of the two slopes is close to 1, meaning that the droplet length is close to the channel diameter. In fact two droplet regimes are generated with two slopes for  $\alpha$  and  $\beta$  variations, depending on  $v_{TOT}$  value:

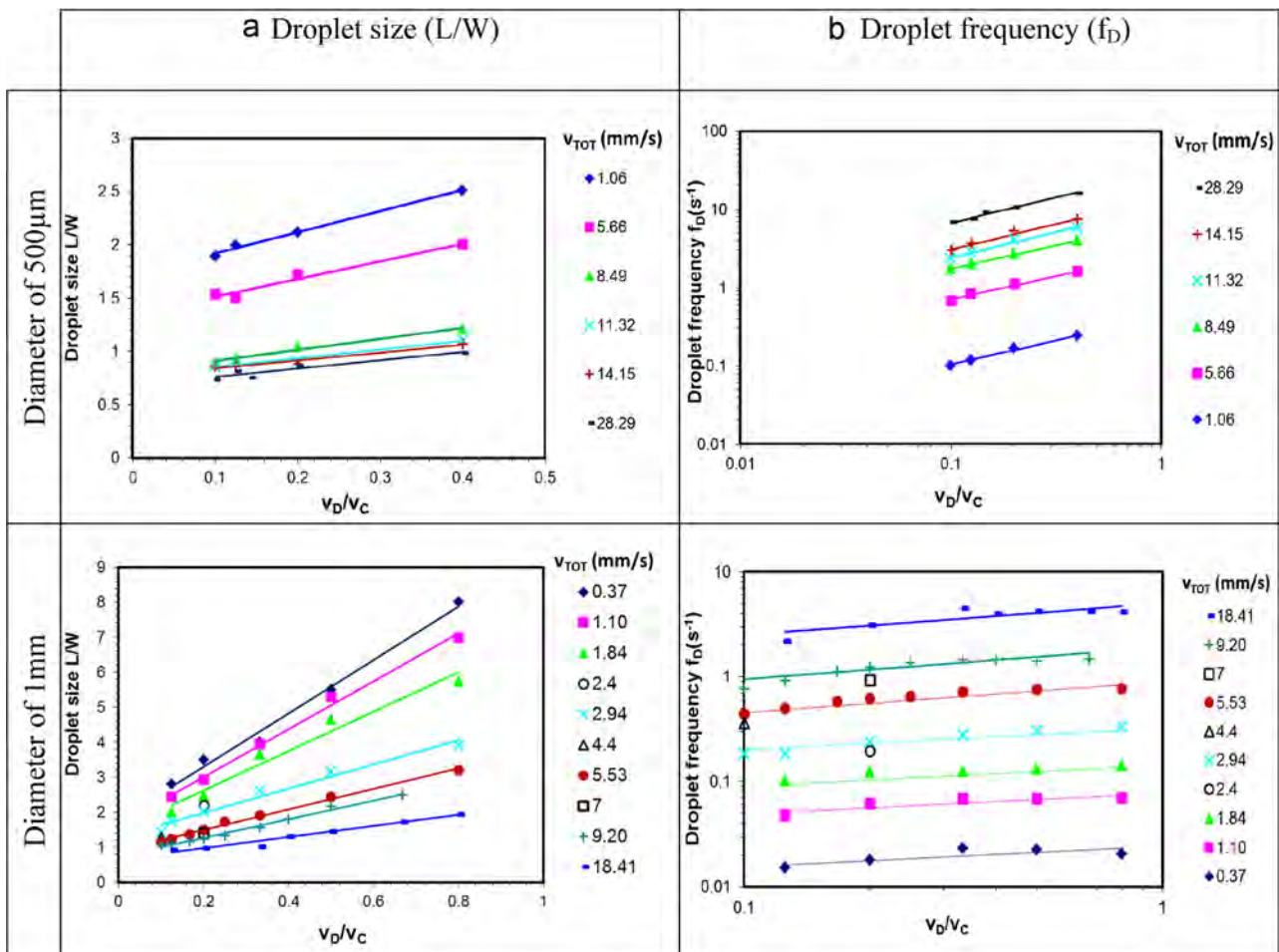


Fig. 4. Plots of (a) droplet size ( $L/W$ ) and (b) droplet frequency ( $f_D$ ) versus  $(v_D/v_C)$  for given  $v_{TOT}$  from: 3D experiments for channel diameters of 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm and 2D simulations for a channel diameter of 1 mm (open symbols).

- For low  $v_{TOT}$ ,  $\beta$  is higher than 1, meaning that whatever the value of  $(v_D/v_C)$ , the droplet is detached only after its diameter has further expanded the channel diameter and the droplet has further expanded length-wise. Hence even for low values of  $v_D$ ,  $v_C$  is low enough to let the dispersed phase fill the channel cross-section. The evaluation of Ca related to low  $v_{TOT}$  (Fig. 2) leads to  $Ca < 0.01$ – $0.015$ , corresponding to the squeezing regime in the literature. Our experimental results show that in this regime, both  $\alpha$  and  $\beta$  vary considerably with  $v_{TOT}$  (Figs. 4a and 5a).
- For high  $v_{TOT}$ ,  $\beta$  is lower than 1, meaning that at low values of  $(v_D/v_C)$ , the droplet can detach before its diameter has reached the channel diameter. Hence even for high values of  $v_D$  the dispersed phase does not fill the channel cross-section because  $v_C$  is also very high. Here, Ca is higher than  $0.01$ – $0.015$ , corresponding to the dripping regime. Our experimental results show that in this regime,  $\alpha$  and  $\beta$  are less influenced by  $v_{TOT}$  and  $v_D/v_C$  (Figs. 4a and 5a).

The linear relationship with  $(v_D/v_C)$  and the two regimes observed depending on the Ca value are in accordance with the literature. However  $L/W$  values are obviously influenced by  $v_{TOT}$ , i. e. absolute values of  $v_C$  and  $v_D$ . Moreover two different values of  $(v_D/v_C)$  can give the same  $L/W$  if  $v_{TOT}$  varies in the right way (Fig. 4a). We thus seek to merge  $(v_D/v_C)$  and  $v_{TOT}$  influences by plotting  $L/W$  versus  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  (Fig. 5b).

The curves are fitted to the scaling law:

$$\frac{L}{W} = \left( K_1 \times \frac{v_D/v_C}{v_{TOT}} \right)^m \quad (10)$$

The value of  $m$  is proportional to the channel diameter ( $1/4$  for  $500 \mu\text{m}$  and  $1/2$  for  $1 \text{ mm}$ ) leading to an increasing influence of  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  on  $L/W$  with increasing channel diameter. It is

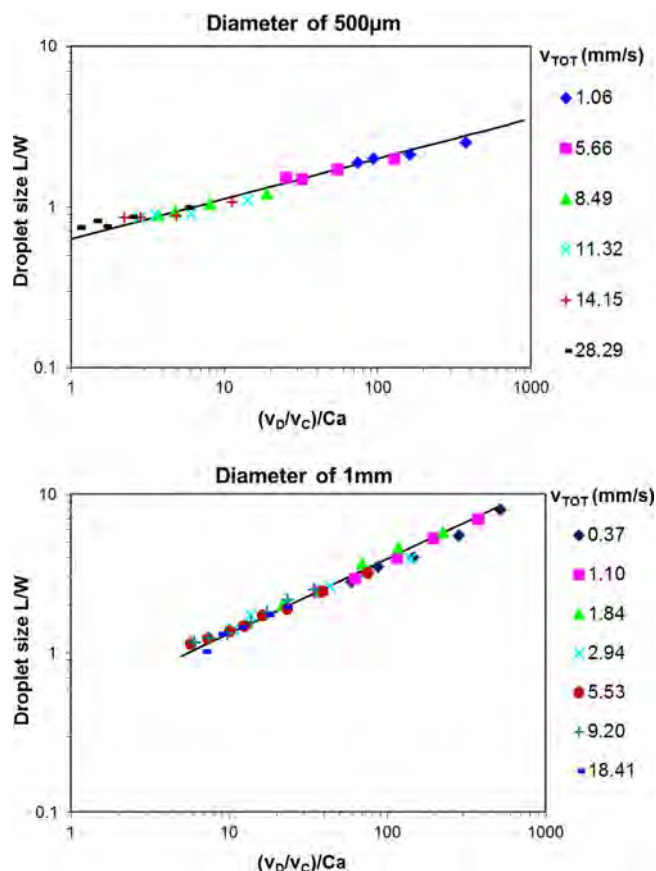


Fig. 6. Plot of  $L/W$  versus  $[(v_D/v_C)/Ca]$  for  $500 \mu\text{m}$  and  $1 \text{ mm}$  channel diameters.

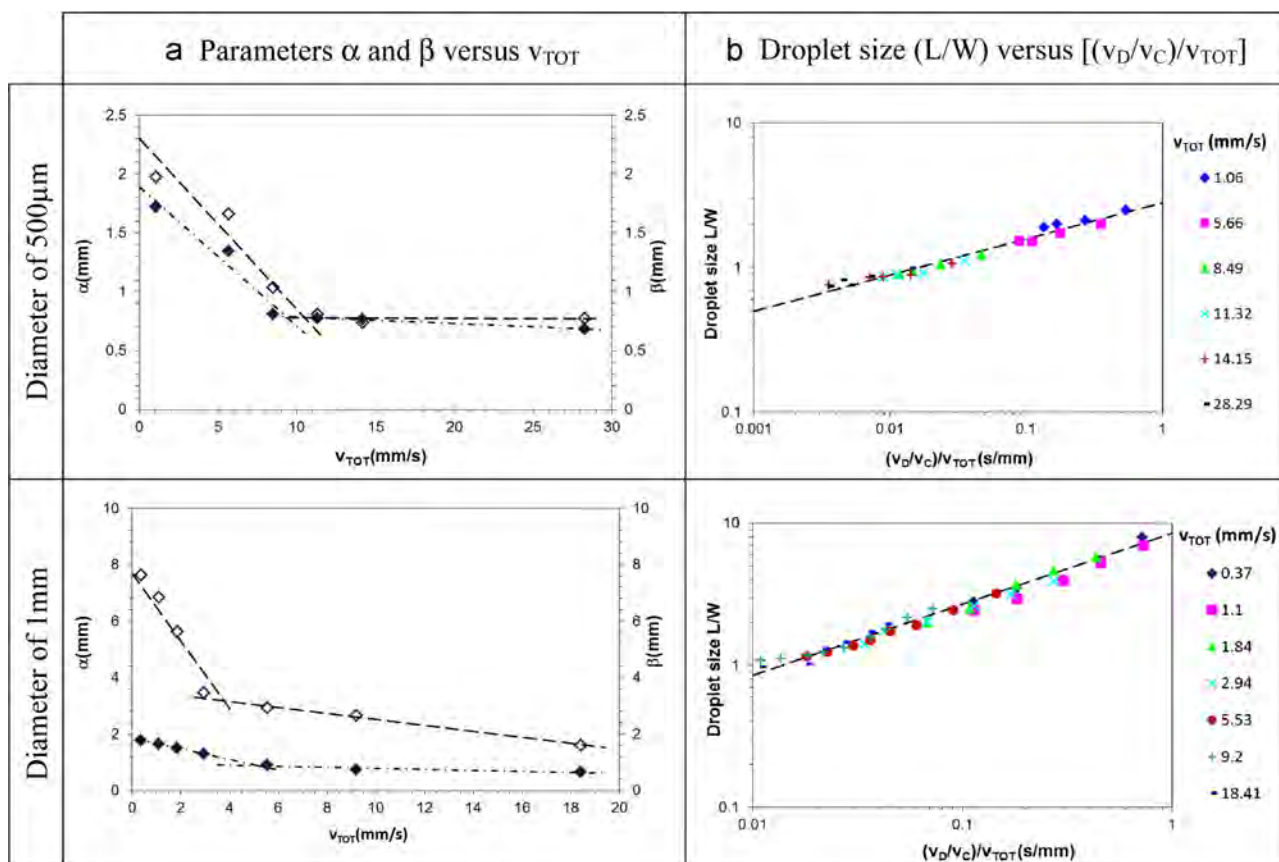


Fig. 5. Plot of (a) parameters  $\alpha$  (open symbols) and  $\beta$  (filled symbols) versus  $v_{TOT}$  and (b) droplet size ( $L/W$ ) versus  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$ , for channel diameters of  $500 \mu\text{m}$  and  $1 \text{ mm}$ .

noteworthy that the pre-factor  $K_1$  is similar (68 mm/s) for both channel diameters. Hence, in addition to the flow rate ratio, the total flow rate permits droplet size to be adjusted from shorter to longer than the channel diameter. Here therefore, mono-dispersed droplets can be produced at a variety of  $(v_D/v_C)$  values, by keeping the ratio  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$  constant. On the other hand, droplets of different sizes can be produced by keeping  $(v_D/v_C)$  constant while varying  $[(v_D/v_C)/v_{TOT}]$ . For our application, the value of  $K_1$  can be considered as a characteristic velocity which defines the operating range permitting droplets to mix without coalescence, as explained in Section 1.

However, this relationship does not take into account the physico-chemical properties of the two phases, i.e. the viscosity  $\mu_C$  and the surface tension  $\gamma_{CD}$ . Moreover Garstecki et al. (2006) showed that for the squeezing regime (low Ca values), the scaling relation giving  $L/W$  is independent of phase properties. Nevertheless, as two regimes of droplet generation are observed depending on Ca values, phase properties must play a role in droplet size.

#### 4.1.2. Influence of Ca on droplet size in addition to $(v_D/v_C)$

$L/W$  is shown above to increase with  $(v_D/v_C)$  (Fig. 4a). Hence we assume that the influence of Ca on  $L/W$  is combined with the influence of  $(v_D/v_C)$  by plotting  $L/W$  versus  $[(v_D/v_C)/Ca]$ , for given  $v_{TOT}$  (Fig. 6). Fig. 6 shows how all the results for each channel

diameter can be combined so that the fitting curves correspond to a scaling law:

$$\frac{L}{W} = \left( K_2 \times \frac{v_D/v_C}{Ca} \right)^n \quad (11)$$

The value of  $n$  is proportional to the diameter (1/4 for 500  $\mu\text{m}$  and 1/2 for 1 mm) leading to an increasing influence of  $[(v_D/v_C)/Ca]$  on  $L/W$  as the diameter increases. It is noteworthy that the dimensionless pre-factor  $K_2$  is similar ( $\sim 19$ ) for both channel diameters. Moreover, this empirical law is consistent with the literature for high values of Ca (0.05–1) (Xu et al., 2008; Christopher et al., 2008; Zhao and Middelberg, 2011). It is in accordance with the increase of  $L/W$  with the surface tension  $\gamma_{CD}$  observed by Wehking et al. (2013) and the decrease of  $L/W$  with the viscosity  $\mu_C$  observed by Gupta and Kumar (2010). However, it must be noted that our relation is valid over a wider range of Ca, from 0.005 to 1.

Physico-chemical parameters  $\gamma_{CD}$  and  $\mu_C$  are fixed here, and so can be moved to  $K_2$ . Hence it is interesting to note that relations (Eqs. (10) and (11)) depend on  $(v_D/v_C)$  with the same exponent values ( $m$  and  $n$ ) depending on channel diameter. Moreover the parameters  $K_1$  and  $K_2$  do not depend on channel diameter. Thus these empirical laws can be determined for a given diameter if the absolute flow velocity and phase physico-chemical properties are known. Moreover as  $v_C$  value is fixed by Ca and  $v_D$  value by  $(v_{TOT})$ , droplet size may be related to  $v_{TOT}$  and Ca.

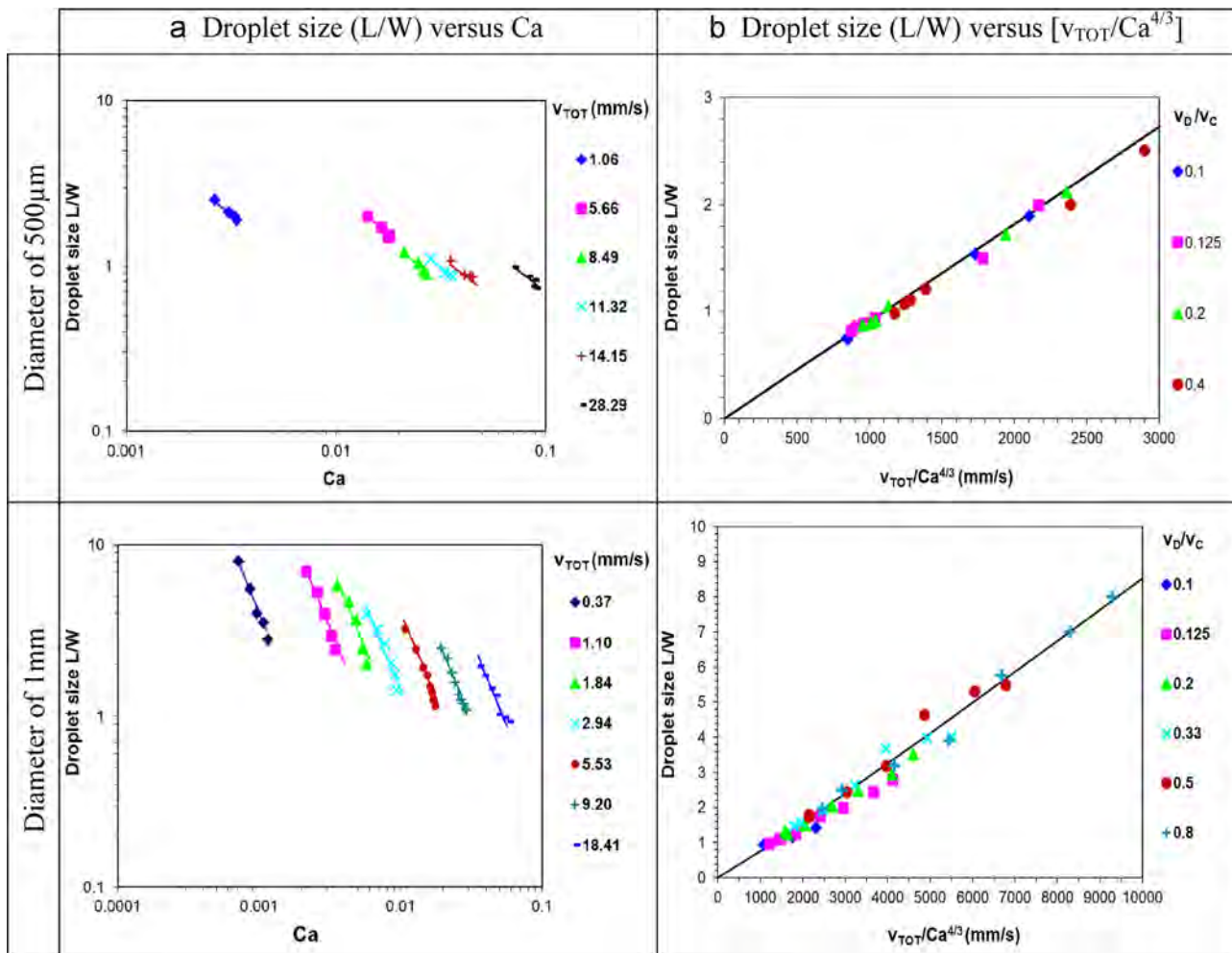


Fig. 7. Plot of droplet size ( $L/W$ ) versus (a) the capillary number Ca for given  $v_{TOT}$  and (b)  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  for given  $v_D/v_C$ , from experiments with of 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm channel diameters.



#### 4.2. Influence of $Ca$ and $v_{TOT}$ without using $(v_D/v_C)$

As we have demonstrated that  $v_{TOT}$  and  $Ca$ , in addition to  $v_D/v_C$ , influence  $L/W$ , the remaining question is whether we can directly correlate  $L/W$  to  $v_{TOT}$  and  $Ca$  without using  $(v_D/v_C)$ , and how this can be applied to droplet frequency?

##### 4.2.1. Influence of $Ca$ and $v_{TOT}$ on droplet size

$L/W$  was observed above to decrease with  $v_{TOT}$  (Fig. 4a). In order to explore the influence of  $Ca$ , we plot  $L/W$  versus  $Ca$ , for given  $v_{TOT}$  (Fig. 7a). In Fig. 7a for given  $v_{TOT}$ ,  $L/W$  decreases with  $Ca$  and fitting curves depend on  $Ca$  and  $v_{TOT}$ :

$$\frac{L}{W} = \frac{v_{TOT}}{K_3 \times Ca^{4/3}} \quad (12)$$

Plotting  $L/W$  versus  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  combines all the results obtained for different flow rate ratios  $v_D/v_C$  (Fig. 7b).

It is noteworthy that the pre-factor  $K_3$  is similar ( $10^{-3}$  mm/s) for both channel diameters and it can be considered as a characteristic velocity which defines the operating range permitting droplets to mix without coalescence for our application. Therefore, this empirical law allows the prediction of  $L/W$  value for each given  $v_{TOT}$  and  $Ca$ . In the literature, droplet length is related either to flow rate ratio (Garstecki et al., 2006) or to continuous phase flow rate (Liu and Zhang, 2009). Here, the total velocity  $v_{TOT}$  contains the continuous phase velocity  $v_C$  and the dispersed phase velocity  $v_D$ , and the capillary number  $Ca$  contains  $v_C$ . Hence it is more important to know the absolute values of both velocities than the ratio  $(v_D/v_C)$ . Moreover, because  $Ca$  depends on the viscosity  $\mu_C$  and the surface tension  $\gamma_{CD}$ , their influence on  $L/W$  needs to be tested in future to check the validity of our law.

##### 4.2.2. Application to droplet frequency

Fig. 4b shows that experimental results of droplet frequency  $f_D$ , obtained with 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm channel diameters, indicate that  $L/W$  increases with  $(v_D/v_C)$ . However for a given  $(v_D/v_C)$ , droplet frequency  $f_D$  also increases with  $v_{TOT}$ . Moreover our detailed investigation of  $L/W$  suggests that the parameter  $Ca$  plays a role in the frequency of droplet generation. Therefore, we plot  $f_D$  versus  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  for given  $v_D/v_C$  (Fig. 8) (as above for  $L/W$ ).

The fitting curves in Fig. 8 correspond to a scaling law:

$$f_D \propto \left( \frac{v_{TOT}}{Ca^{4/3}} \right)^p \quad (13)$$

For both channel diameters, it is noteworthy that the value of  $p$  is identical ( $\sim -4$ ). Moreover the factor  $f_D$  increases with  $(v_D/v_C)$  and it decreases with channel diameter.

The droplet frequency in T-junction microfluidics has rarely been studied, even though the definition of  $f_D$  ( $v_D/L$ ) makes it easy to calculate using the experimental results of the literature. However, Christopher et al. (2008) and Gupta and Kumar (2010) also showed that  $f_D$  scales with  $Ca^{4/3}$ . Nevertheless, Gupta and Kumar (2010) varied the diameter ratio ( $W_D/W_C$ ) between the channels of the dispersed phase and the continuous phase, and observed that  $f_D$  is influenced by this ratio, but not by the absolute value of channel diameters. Here, the ratio ( $W_D/W_C$ ) is equal to 1 and we note that for given values of  $Ca$ ,  $v_D$  and  $v_{TOT}$ ,  $f_D$  is inversely proportional to channel diameters  $W$  (Fig. 8).

For our application, the operating range permitting droplets to mix without coalescence, as explained in Section 1, corresponds experimentally to  $L/W$  near a value of 1 and low values of  $f_D$ :

- For  $L/W \approx 1$ ,  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  must be 1000 mm/s for both diameters (Fig. 7b).

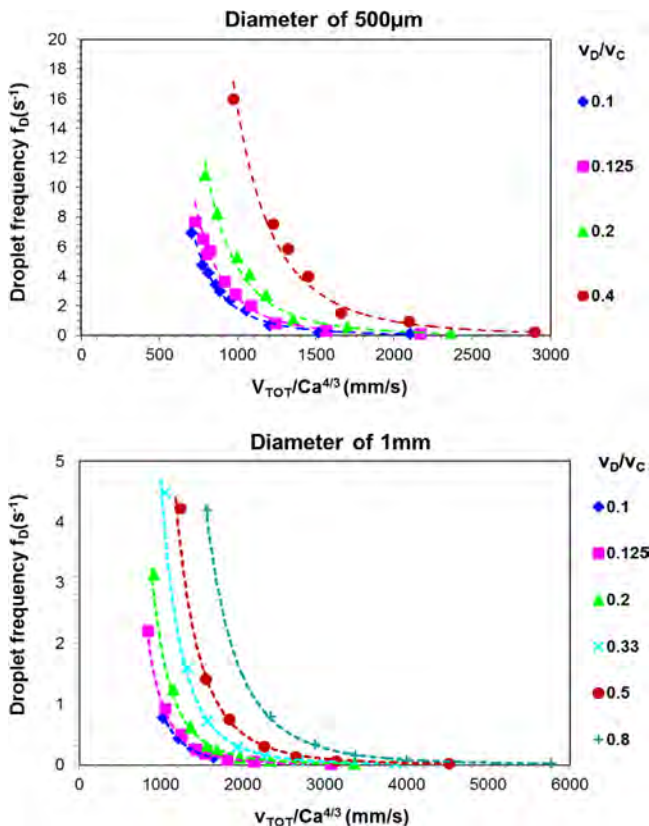


Fig. 8. Plot of droplet frequency  $f_D$  versus  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  for given  $v_D/v_C$ , from experiments with 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm channel diameters.

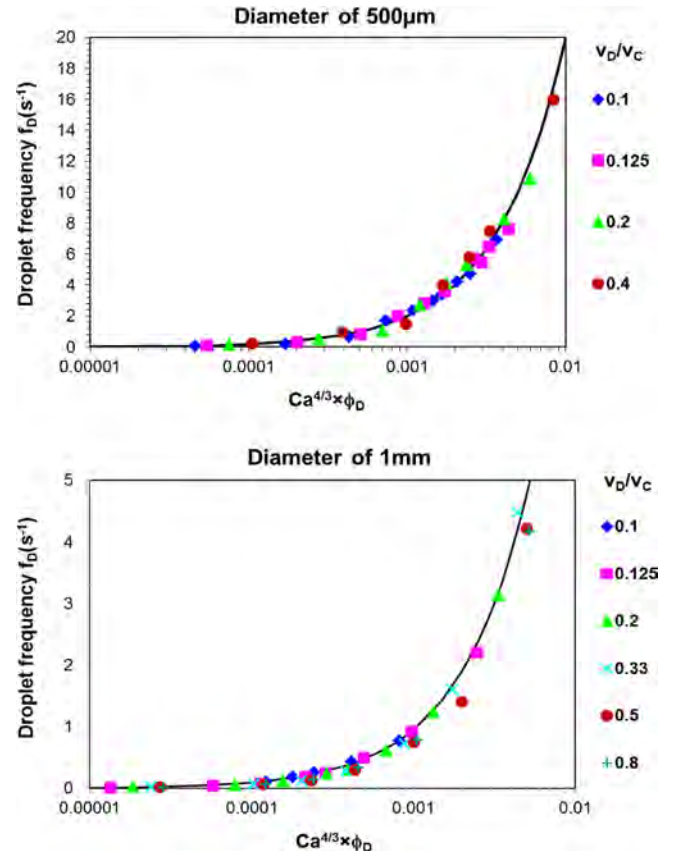


Fig. 9. Plot of  $f_D$  versus  $(Ca^{4/3} \times \phi_D)$  for given  $(v_D/v_C)$ , from experiments with 500  $\mu\text{m}$  and 1 mm channel diameters.

- For  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  of 1000 mm/s,  $f_D$  increases with  $(v_D/v_C)$  and this increase is enhanced, thereby increasing the risk of coalescence, when the diameter is reduced (Fig. 8).

Thus for a given  $v_C$ (mm/s),  $v_D$ (mm/s) is first calculated for  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  equal to 1000. This yields a ratio  $(v_D/v_C)$  permitting droplet frequency to be evaluated graphically (Fig. 8).

For a given  $v_D$ , an easy way to evaluate  $v_C$  is by introducing the ratio  $(v_D/v_{TOT})$  which corresponds to “the fraction of dispersed phase”  $\phi_D$  as defined by Tice et al. (2003) in mixing studies. This ratio appears in the relation of  $f_D$ , with Ca and  $v_{TOT}$  resulting from Eq. (12):

$$f_D = \frac{K_4 \times Ca^4}{W} \times \frac{v_D}{v_{TOT}} \quad (14)$$

Then by plotting  $f_D$  versus  $(Ca^{4/3} \times \phi_D)$  all the results obtained for different flow rate ratios  $(v_D/v_C)$  can be combined with pre-factor  $K_4$  value of 1000 mm/s for both channel diameters. In our application, as  $[v_{TOT}/Ca^{4/3}]$  is equal to 1000 mm/s,  $K_4$  can be considered as a characteristic velocity which defines the operating range permitting droplets to mix without coalescence.  $v_D$  can be chosen (without knowing  $v_C$ ) so as to obtain the desired  $f_D$  using Eq. (14), and hence different ratios  $(v_D/v_C)$ . Finally Fig. 9 shows how the operational range of  $(v_D/v_C)$  can be broadened.

In conclusion, for practical applications  $L/W$  and  $f_D$  can be predicted with given pairs of absolute values  $(v_{TOT}$  and  $v_D$  or  $v_C$ ) or  $(v_D$  and  $v_C)$ , using Eqs. (12) and (14), respectively. Moreover, we can define the operating range for these pairs of parameters for a given  $v_D$  in order to generate homogeneous droplets with droplet size similar to the channel diameter and low frequency.

## 5. Conclusion

This paper presents a hydrodynamic study of our microfluidic system used for crystallization studies (Ildefonso et al., 2012), which is based on a T-junction with two channels of circular cross-section with the same diameter. Firstly, 3D experiment and 2D simulation results obtained in this work confirm that our cylindrical microfluidic channels can be compared to the planar geometries with rectangular cross-section described in the literature. Therefore the displacement of phases in our 3D cylindrical channels can be represented by the average flow velocity instead of the flow rate. Secondly, this study investigates the influence of the total flow velocity  $v_{TOT}$  and the capillary number Ca, in addition to the flow velocity ratio  $(v_D/v_C)$ , on droplet generation. We thus demonstrate, for the first time, that the flow velocity ratio  $(v_D/v_C)$  is not sufficient to predict droplet size and frequency; and that the total flow velocity  $v_{TOT}$  or the absolute flow velocity values  $v_D$  and  $v_C$  are required. Hence, we establish empirical laws predicting droplet size and frequency with  $v_D$ ,  $v_C$  and Ca. These correlations allow us to define the operating range that will generate homogeneous droplets. Moreover, our results are obtained for channel diameters of 500  $\mu$ m and 1 mm, which are one order of magnitude larger than that usually tested in the literature (between 50 and 300  $\mu$ m), while remaining smaller than the capillary length (2.4 mm).

## Nomenclature

Ca	Capillary number ( $\mu_C \times v_C / \gamma_{CB}$ ) (dimensionless)
$d$	Distance between 2 droplets (m)
$f$	Frequency ( $s^{-1}$ )
$g$	Gravity acceleration ( $m/s^2$ )
$K_1$	Proportionality factor ( $m/s$ )

$K_2$	Proportionality factor (dimensionless)
$K_3$	Proportionality factor ( $m/s$ )
$K_4$	Proportionality factor ( $m/s$ )
$L$	Droplet length (m)
$l_c$	Capillary length ( $[\gamma_{CB}/(\Delta\rho \times g)]^{1/2}$ ) (m)
$m$	Power factor (dimensionless)
$n$	Power factor (dimensionless)
$\vec{n}$	Outward normal vector of the interface (dimensionless)
$p$	Power factor (dimensionless)
$Q$	Flow rate ( $m^3/s$ )
Re	Reynolds number ( $\rho_C \times v_C \times (W/2) / \mu_C$ ) (dimensionless)
$v$	Absolute flow velocity ( $m/s$ )
$W$	Channel diameter (m)

## Greek symbols

$\alpha$	Slope (dimensionless)
$\beta$	Initial value (dimensionless)
$\Delta\rho$	Difference in density ( $kg/m^3$ )
$\phi$	Volume fraction (dimensionless)
$\gamma$	Surface tension (N/m)
$\kappa$	Curvature of the interface (m)
$\mu$	Dynamic viscosity (Pa s)
$\rho$	Density ( $kg/m^3$ )

## Subscripts

C	Continuous phase
D	Dispersed phase
TOT	Total (continuous and dispersed phases)

## Acknowledgments

We thank M. Sweetko for English revision and the laboratory IRPHE for access to computational phase dynamics package Fluent.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2015.07.046>.

## References

- Anna, S.L., Bontoux, N., Stone, H.A., 2003. Formation of dispersions using flow focusing in microchannels. *Appl. Phys. Lett.* 82 (3), 364–366.
- Brouzes, E., Medkova, M., Savenelli, N., Marran, D., Twardowski, M., Hutchison, J.B., Rothberg, J.M., Link, D.R., Perrimon, N., Samuels, M.L., 2009. Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (34), 14195–14200.
- Bukiet, F., Couderc, G., Camps, J., Tassery, H., Cuisinier, F., About, I., Charrier, A., Candoni, N., 2012. Wetting properties and critical micellar concentration of benzalkonium chloride mixed in sodium hypochlorite. *J. Endod.* 38 (11), 1525–1529.
- Burns, M.A., Johnson, B.N., Brahma Sandra, S.N., Handique, K., Webster, J.R., Krishnan, M., Sammarco, T.S., Man, P.M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C.H., Burke, D.T., 1998. An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science* 282 (5388), 484–487.
- Candoni, N., Hammadi, Z., Grossier, R., Ildefonso, M., Revalor, E., Ferte, N., Okutsu, T., Morin, R., Veessler, S., 2012. Nanotechnologies dedicated to nucleation control. *Int. J. Nanotechnol.* 9 (3–7), 439–459.
- Chen, N., Wu, J., Jiang, H., Dong, L., 2011. CFD simulation of droplet formation in a wide-type microfluidic T-junction. *J. Dispers. Sci. Technol.* 33 (11), 1635–1641.
- Christopher, G.F., Noharuddin, N.N., Taylor, J.A., Anna, S.L., 2008. Experimental observations of the squeezing-to-dripping transition in T-shaped microfluidic junctions. *Phys. Rev. E* 78 (3), 036317.
- De Menech, M., Garstecki, P., Jousse, F., Stone, H.A., 2008. Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. *J. Fluid Mech.* 595, 141–161.

- Gañán-Calvo, A.M., Gordillo, J.M., 2001. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Phys. Rev. Lett.* 87 (27), 274501.
- Garstecki, P., Stone, H.A., Whitesides, G.M., 2005. Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: a route to monodisperse emulsions. *Phys. Rev. Lett.* 94 (16), 164501.
- Garstecki, P., Fuerstman, M.J., Stone, H.A., Whitesides, G.M., 2006. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up. *Lab Chip* 6 (3), 437–446.
- Glawdel, T., Elbuken, C., Ren, C.L., 2012a. Droplet formation in microfluidic T-junction generators operating in the transitional regime. II. Modeling. *Phys. Rev. E* 85 (1), 016323.
- Glawdel, T., Elbuken, C., Ren, C.L., 2012b. Droplet formation in microfluidic T-junction generators operating in the transitional regime. I. Experimental observations. *Phys. Rev. E* 85 (1), 016322.
- Gupta, A., Kumar, R., 2010. Flow regime transition at high capillary numbers in a microfluidic T-junction: viscosity contrast and geometry effect. *Phys. Fluids* 22, 12.
- Ildefonso, M., Candoni, N., Veessler, S., Cheap, A., 2012. Easy microfluidic crystallization device ensuring universal solvent compatibility. *Org. Process Res. Dev.* 16, 556–560.
- Li, L., Ismagilov, R.F., 2010. Protein crystallization using microfluidic technologies based on valves, droplets, and slipchip. *Annu. Rev. Biophys.* 39 (1), 139–158.
- Li, L., Mustafi, D., Fu, Q., Tereshko, V., Chen, D.L., Tice, J.D., Ismagilov, R.F., 2006. Nanoliter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (51), 19243–19248.
- Liu, H., Zhang, Y., 2009. Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction. *J. Appl. Phys.* 106, 3.
- Nisisako, T., Torii, T., Higuchi, T., 2002. Droplet formation in a microchannel network. *Lab Chip* 2 (1), 24–26.
- Selimovic, S., Jia, Y., Fraden, S., 2009. Measuring the nucleation rate of lysozyme using microfluidics. *Cryst. Growth Des.* 9 (4), 1806–1810.
- Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H., Quake, S.R., 2001. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys. Rev. Lett.* 86 (18), 4163–4166.
- Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D., Ismagilov, R.F., 2003. Formation of droplets and mixing in multiphase microfluidics at low values of the Reynolds and the capillary numbers. *Langmuir* 19 (22), 9127–9133.
- Umbanhowar, P.B., Prasad, V., Weitz, D.A., 1999. Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream. *Langmuir* 16 (2), 347–351.
- Van Steijn, V., Kleijn, C.R., Kreutzer, M.T., 2010. Predictive model for the size of bubbles and droplets created in microfluidic T-junctions. *Lab Chip* 10 (19), 2513–2518.
- Wehking, J., Gabany, M., Chew, L., Kumar, R., 2013. Effects of viscosity, interfacial tension, and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction. *Microfluid. Nanofluid.* 1–13.
- Xu, J.H., Li, S.W., Tan, J., Luo, G.S., 2008. Correlations of droplet formation in T-junction microfluidic devices: from squeezing to dripping. *Microfluid. Nanofluid.* 5 (6), 711–717.
- Zare, R.N., Kim, S., 2010. Microfluidic platforms for single-cell analysis. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12 (1), 187–201.
- Zhao, C.-X., Middelberg, A.P.J., 2011. Two-phase microfluidic flows. *Chem. Eng. Sci.* 66 (7), 1394–1411.

## 5.2 Caractérisation des gouttes

Dans cette partie, je présente les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse sur l'analyse chimique des gouttes. Il s'agit de la caractérisation de la composition chimique de chaque goutte en « off line » (hors ligne) et en « on line » (en ligne). Le but est de connaître la composition de chacune des gouttes générées lors d'un criblage des conditions de cristallisation et donc d'obtenir un système microfluidique, pour la cristallisation à base de gouttes, qui soit le plus modulable possible.

### 5.2.1 Caractérisation préliminaire des gouttes: « off-line »

Avant de disposer de la caractérisation en ligne de la composition chimique des gouttes avec un spectromètre UV in-situ, j'ai réalisé une tâche (fastidieuse) de caractérisation « off-line » et manuelle des gouttes avec le spectromètre Nanodrop®. Cette caractérisation « off-line » a pour but de déterminer quel est le temps de mise à l'équilibre (ou le temps de réponse) du système par rapport aux gradients de débits programmés sur les pousse-seringues, et aussi de vérifier que l'on retrouve bien ce gradient de concentration dans la composition chimique des gouttes formées.

Dans un premier temps, pour les phases dispersées on a simplement choisi des solutions aqueuses colorées avec des colorants alimentaires - jaune (Vahiné, E102) et bleu (Vahiné, E133). En réalisant le spectre d'absorbance des solutions colorées avec un seul colorant, on a obtenu pour les colorants jaune et bleu des absorptions à 430nm et 631 nm respectivement. Les coefficients d'absorption ainsi que les concentrations des deux colorants sont inconnus. Cependant, l'évolution des absorbances à 430nm et 630nm permet d'obtenir une bonne indication de l'évolution des compositions chimiques dans les gouttes, par effet de proportionnalité.

Pour générer une série de gouttes (~100) avec un gradient de composition, nous utilisons une jonction en PEEK avec « 7-entrées/sorties » de 1mm de diamètre interne et nous avons fermé trois des entrées/sorties (*Figure 77a*). L'huile FMS est injectée en continu et les solutions aqueuses jaune et bleu sont injectées en « Y » (*Figure 77a*). Le débit d'huile est de 4000 $\mu$ L/h. Les débits des phases aqueuses, synchronisés pour les deux pousse-seringues indépendants, sont reportés dans la *figure 77b*. Ici on fait simplement une variation des deux débits en gardant le débit total des deux phases constant à 500 $\mu$ L/h. On s'attend à ce qu'il y ait un temps de mise à l'équilibre lors du changement de débit. Cette zone que l'on appellera de stabilisation est représentée par le profil en trait continu de la *figure 77c*, par rapport au profil souhaité qui est en pointillé.

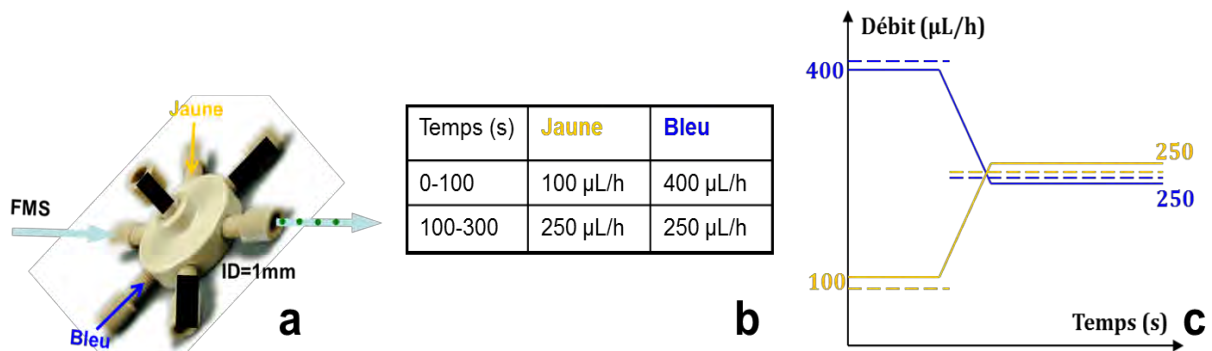


Figure 77. (a) Schéma de la jonction en PEEK avec « 7-entrées/sorties » de 1mm de diamètre interne utilisée pour générer une série de gouttes avec un gradient de composition chimique. (b) Débits programmés des deux phases dispersées. (c) Profil des débits pour les deux phases dispersées. Lignes en pointillés : profil programmé. Lignes en continu : débits réels attendus s'il existe une zone de transition. Les couleurs des courbes de débits correspondent aux couleurs des phases utilisées.

Pour mesurer l'absorbance de chaque goutte avec le spectromètre Nanodrop®, un capillaire rempli avec les gouttes est connecté à une seringue contenant de l'huile. Les gouttes sont alors poussées par un faible débit d'huile ce qui permet de les récolter une par une. Ensuite pour chaque goutte sortie on mesure l'absorbance à 430nm et à 631nm. Les résultats sont représentés dans la figure 78. Le numéro de gouttes correspond à l'ordre de récolte des gouttes et donc au temps de génération. Ainsi, le N°1 est la goutte récoltée en premier qui est donc générée en premier. L'évolution des valeurs d'absorbance correspond à l'évolution de la concentration des colorants dans les gouttes.

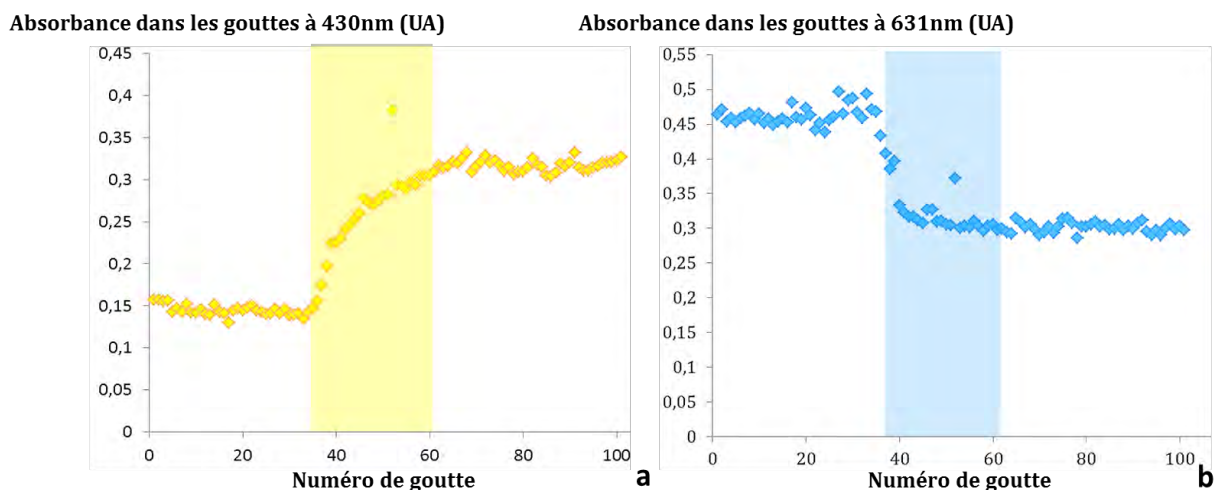


Figure 78. Mesures d'absorbance à 430nm (a) et à 631nm (b) pour toutes les gouttes générées par le gradient programmé dans la figure 77b dans un capillaire de 1mm. Les zones en couleur sont les zones de stabilisation.



La *figure 78* montre clairement que l'évolution de la composition chimique dans les gouttes correspond bien au gradient programmé. Cependant, une zone de stabilisation est observée lors du changement de débit (*Figure 78*) dont la largeur (~25gouttes) correspond au temps de mise à l'équilibre de ~20s quel que soit les débits. En superposant la *figure 78a et b*, on montre que le profil de gradient est bien synchronisé pour les deux pousse-seringues contenant les phases dispersées (*Figure 79*). Pour les débits que l'on a appliqués, 4000 $\mu$ L/h pour l'huile et 500 $\mu$ L/h pour la somme des deux phases dispersées, ce temps de mise à l'équilibre est d'une vingtaine de secondes.

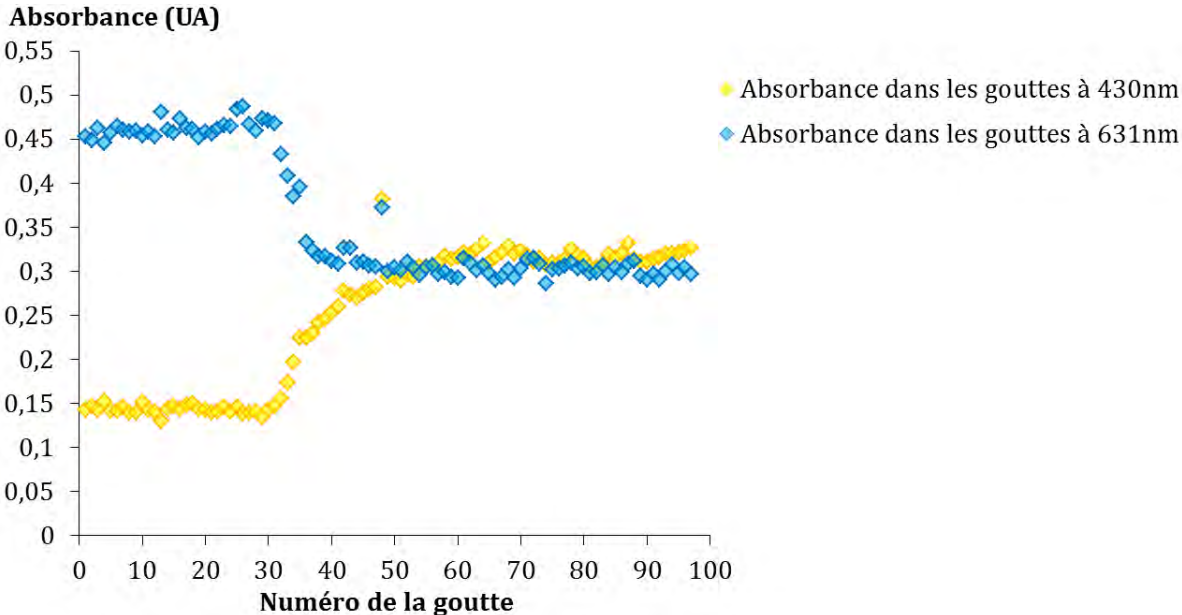


Figure 79. Superposition de la figure 78a et b.

Un autre profil est testé en répétant plusieurs cycles de gradients progressifs (*Figure 80a*).

Temps (s)	Jaune	Bleu
0-40	50 $\mu$ L/h	450 $\mu$ L/h
40-80	250 $\mu$ L/h	250 $\mu$ L/h
80-120	450 $\mu$ L/h	50 $\mu$ L/h
120-160	250 $\mu$ L/h	250 $\mu$ L/h

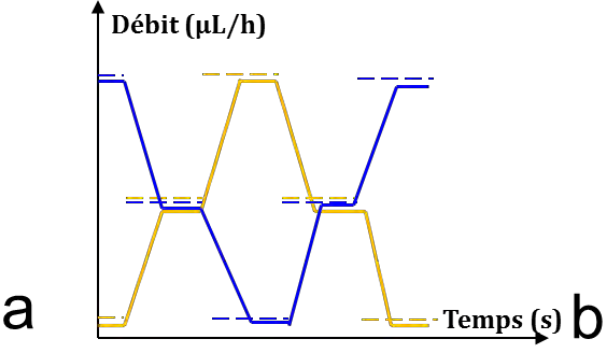
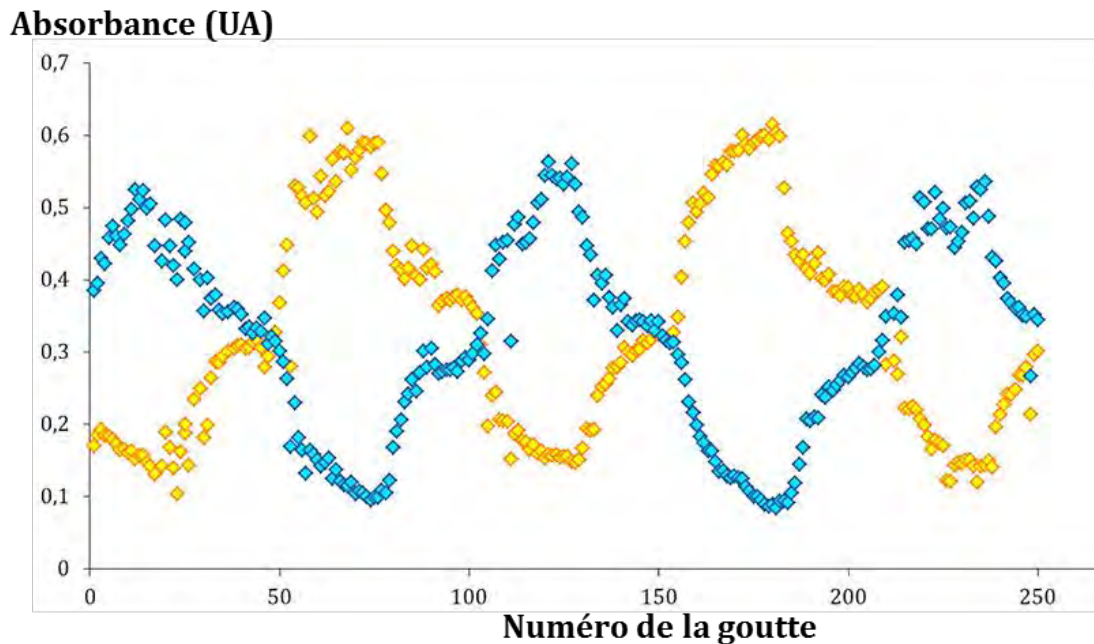


Figure 80. (a) Débits programmés des deux phases dispersées pour un gradient progressif répété sur plusieurs cycles. (b) Profil de débits pour les deux phases dispersées : ligne en pointillés : débits programmés, ligne en continu : débits réels attendus.

Les mesures d'absorbance pour toutes les gouttes générées par ces gradients sont représentées dans la *figure 81*. Les mesures ne sont pas assez précises dû à la façon de récolter les gouttes et aux temps d'application des débits (par pas de 40s) par rapport à une mise à l'équilibre de 20s. Cependant elles nous donnent une bonne indication sur le fait que le gradient de la composition chimique des gouttes et le gradient des débits programmés sont bien corrélés, même sur plusieurs cycles.



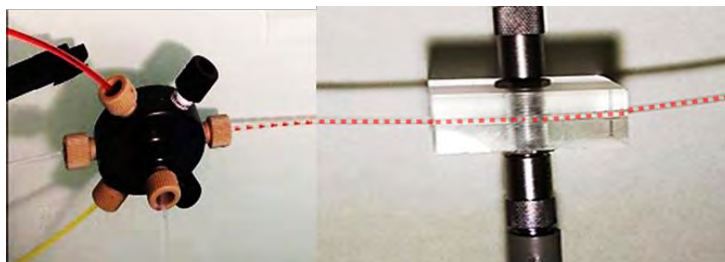
*Figure 81. Mesures d'absorbance à 430nm (a) et à 631nm (b) pour toutes les gouttes générées par le gradient programmé dans la figure 80a. On a mis deux cycles pour le gradient programmé.*

## 5.2.2 Caractérisation « on-line » des gouttes : Taille et composition chimique

Dans cette partie, je présente la mise au point du troisième module de notre montage microfluidique : la caractérisation en ligne de la composition des gouttes. En complément de l'étude hydrodynamique qui permet de prédire la forme et la fréquence des gouttes, il s'agit ici d'analyser la taille et la composition chimique de chaque goutte au cours de l'écoulement. La caractérisation en ligne des gouttes est réalisée à la fois pour une série de gouttes avec la même composition chimique et pour un train de gouttes présentant un gradient de concentration créé en variant les débits des phases dispersées.

### 5.2.2.1 Développement du spectromètre d'UV in situ

Dans un premier temps, on a testé la cellule commerciale de spectrométrie UV décrite en décrite en 4.2.3.2, avec laquelle on faisait circuler les gouttes dans la cellule, ce qui les déformait. On a alors fabriqué et mis au point une cellule de type « porte-capillaire » (que nous appellerons cellule UV) dans laquelle on peut insérer le capillaire microfluidique contenant des gouttes en circulation, ce qui permet de ne pas les perturber. La cellule est en PMMA (Polyméthacrylate de méthyle) qui est transparente, permettant l'observation des gouttes dans le capillaire. Un canal est creusé à l'intérieur de la cellule pour porter le capillaire et des connexions réalisées sur le porte-capillaire qui permettent de fixer les fibres optiques (*Figure 82*).



*Figure 82. Photo du couplage de la jonction microfluidique et la cellule UV réalisée au laboratoire.*

Une des deux fibres optiques apporte la lumière émise par la lampe DT-MINI-2-GS qui traverse ainsi le capillaire contenant les gouttes. Le diamètre du faisceau de lumière UV est de  $400\mu\text{m}$ . De l'autre côté, la cellule UV est connectée au spectromètre UV-Vis-NIR décrit en §4.2.3. L'ensemble de la ligne d'assemblage est représenté dans la *figure 83*. Comme les capillaires en Téflon de diamètre interne  $500\mu\text{m}$  ou  $1\text{mm}$  que nous avons utilisés présentent une épaisseur de  $543\mu\text{m}$  ou  $293\mu\text{m}$  respectivement, ils sont assez transparents à la lumière. Ainsi, nous pouvons envisager de mesurer la partie du signal lumineux qui sera absorbée par les phases contenues dans le capillaire.

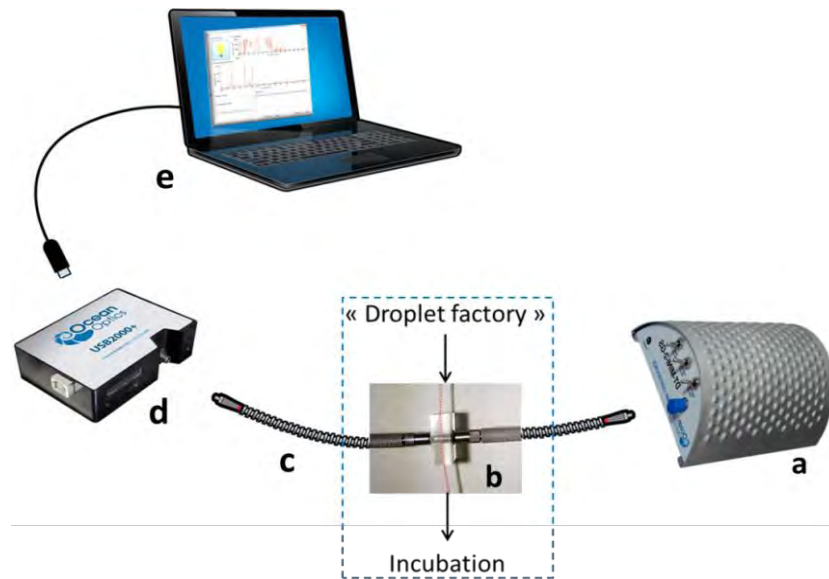


Figure 83. Schéma et photos de la ligne d'« assemblage » pour la caractérisation de la composition chimique des gouttes. (a) Source de lumière DT-MINI-2-GS d'UV-Vis-NIR, (b) Cellule « UV » pour porter le capillaire, (c) Fibres optiques, (d) Spectromètre UV-Vis-NIR (190 → 2300nm), (e) Interface logicielle.

Dans le cas d'une protéine, la caractérisation de la composition chimique des gouttes (concentration en protéine) est réalisée par la mesure de l'absorbance à 280nm avec la loi de Beer-Lambert (Équation 46). La quantité de lumière absorbée (ou l'absorbance  $A(\lambda)$ ) est analysée en mesurant la transmission à travers l'échantillon. La référence est faite avec la solution d'éluion de la protéine. La concentration de l'échantillon  $C$  est calculée à partir de la longueur du trajet optique  $l$  et du coefficient d'absorption  $\varepsilon(\lambda)$ ,

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times C \times l = -\log \frac{I}{I_0}$$

Équation 46

- $A(\lambda)$  : l'absorbance de la solution de protéine à une longueur d'onde donnée  $\lambda$ ,
- $\varepsilon(\lambda)$  : le coefficient d'absorption ou d'extinction massique de la molécule d'absorption en fonction de la longueur d'onde ( $L/mol*cm$ ), i.e.,  $\varepsilon(\text{lysozyme})=2,64\text{mL}/(\text{cm}*mg)$ .
- $C$  : la concentration de la solution ( $mol/L$ ),
- $l$  : la longueur de trajet parcourue par la lumière à travers la solution ( $cm$ )
- $I_0$  : l'intensité incidente,
- $I$  : l'intensité transmis.

### 5.2.2.2 Calibration de l'intensité de la source lumière

Dans un premier temps, on a calibré l'intensité de la source de lumière DT-MINI-2-GS de 200 à 850nm. La courbe de calibration de l'intensité est représentée dans la *figure 84*.

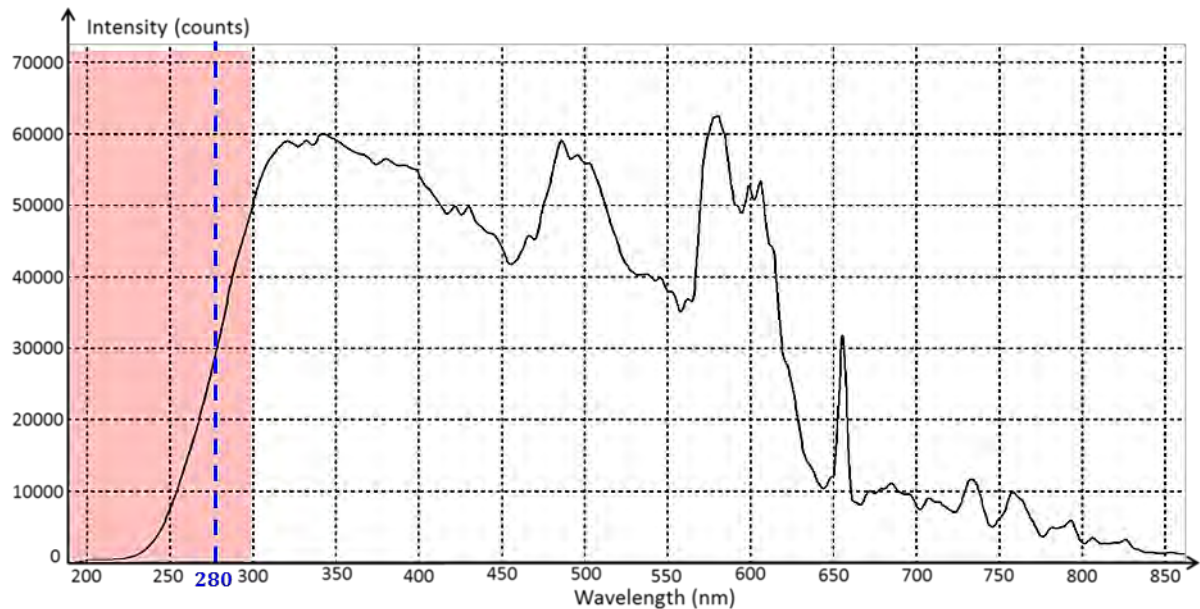


Figure 84. Calibration de l'intensité de la source de lumière de 200 à 850nm.

Ce spectre d'émission est en accord avec les données du constructeur. On observe alors une limitation de cette source de lumière car elle est moins efficace en dessous de 300 nm. Sachant que l'absorption à 280 nm est caractéristique des protéines, cette diminution en dessous de 300nm peut poser un problème pour les protéines selon leur coefficient d'absorption. Toutefois il est possible si cela devient critique de changer la lampe DT-MINI-2-GS par une DH-mini qui est plus efficace à 280nm (Annexe 1).

### 5.2.2.3 Mesure d'absorbance avec un flux continu de solution

L'idée est de tester d'abord l'absorbance en ligne dans un capillaire microfluidique rempli avec la solution de protéine. Pour nos essais nous avons choisi le lysozyme dont nous connaissons le coefficient d'extinction massique en fonction de la longueur d'onde  $\epsilon(\text{lysozyme})=2,64\text{mL}/(\text{cm.mg})$ . Pour cela, un capillaire en Téflon de 500 $\mu\text{m}$  de diamètre interne est choisi du fait d'une épaisseur importante (543 $\mu\text{m}$ ), se plaçant ainsi dans le cas le moins favorable. Dans un premier temps, un spectre d'absorbance est réalisé avec un capillaire rempli de l'huile FMS choisie pour générer les gouttes. La *figure 85* montre que l'huile n'absorbe pas dans la gamme de longueur d'onde dans laquelle on travaille.

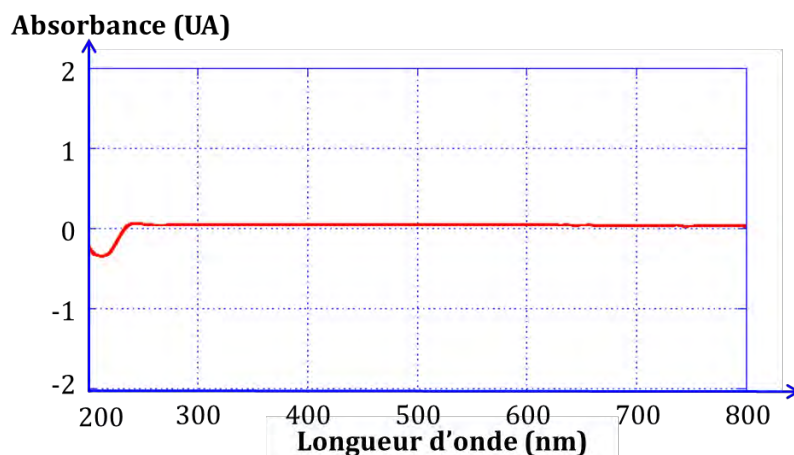


Figure 85. Spectre d'absorbance de l'huile FMS dans un capillaire de 500 $\mu$ m de diamètre interne qui est placé dans la cellule UV.

Puis le spectre d'absorbance entre 200 et 350nm est réalisé avec un capillaire rempli de la solution de lysozyme (9,86 mg/mL). La référence est réalisée avec un capillaire rempli avec la solution de tampon d'acétate de sodium (pH=4.5). Le spectre obtenu est comparé avec le spectre d'absorbance de la même solution de lysozyme obtenu avec le Nanodrop®. On a normalisé ces deux spectres à 280nm (Figure 86).

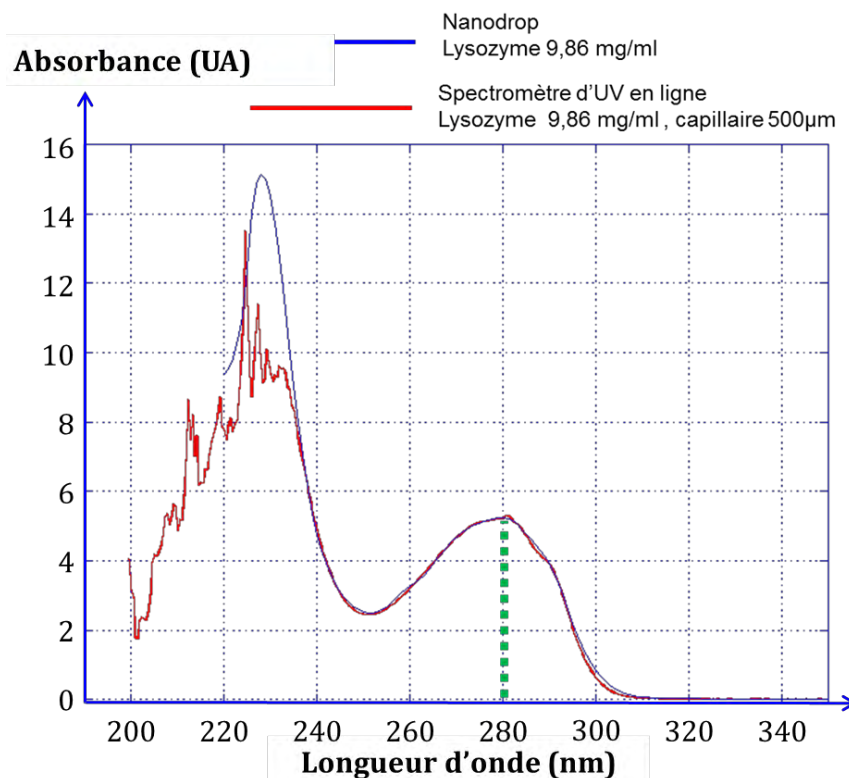


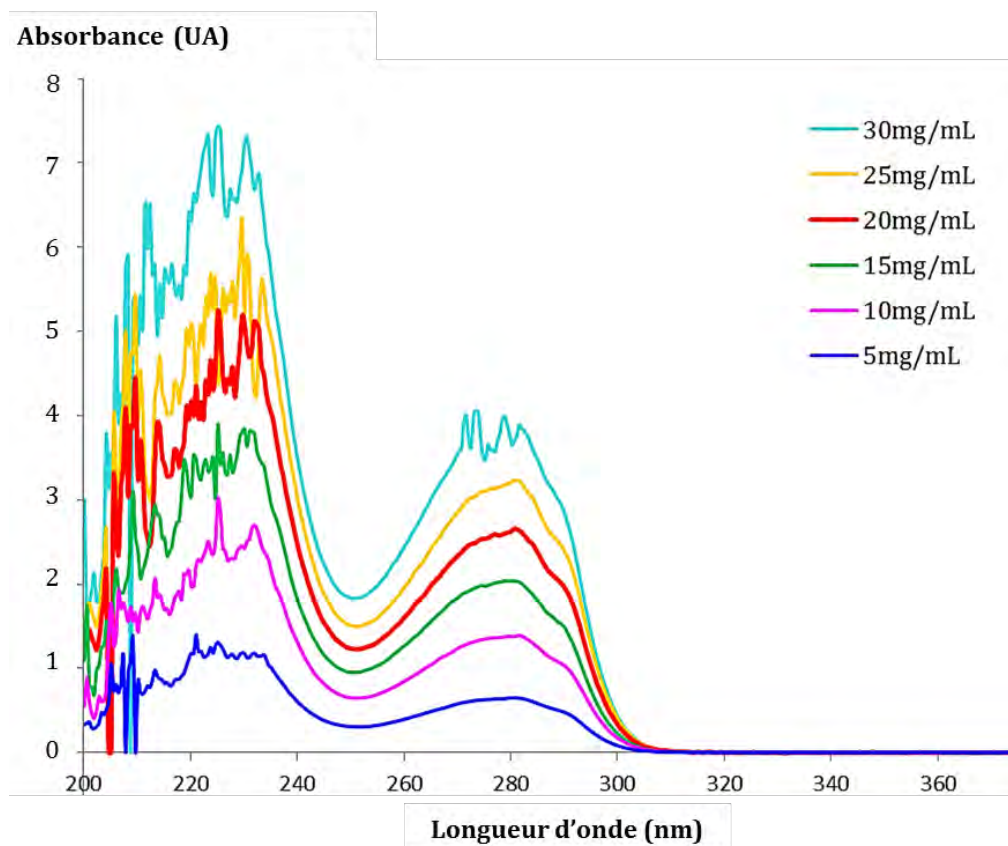
Figure 86. Spectre d'absorbance du lysozyme (9,86 mg/mL) dans un capillaire de 500 $\mu$ m de diamètre interne mesuré avec le spectromètre d'UV en ligne (en rouge) normalisé avec le spectre d'absorbance de la même solution mesuré avec le Nanodrop® (en bleu).



La *figure 86* montre qu'il est difficile de réaliser des mesures pour les longueurs d'onde en dessous de 230nm du fait d'une faible intensité de la lampe dans cette gamme-ci. En outre, l'épaisseur de la paroi du capillaire peut aussi interférer car le Téflon est un matériau un peu moins transparents et qui absorbe légèrement à 280nm (Galante *et al.*, 2009). Cependant, cela n'est pas un problème pour nous car l'épaisseur du capillaire employé n'est pas très grande (i.e. 543 $\mu$ m ou 293 $\mu$ m d'épaisseur pour respectivement 500 $\mu$ m ou 1mm de diamètre interne).

#### 5.2.2.4 Optimisation des mesures : Signal / Bruit

La *figure 87* représente l'évolution du spectre d'absorbance du lysozyme de 200 à 800nm en augmentant la concentration en protéine de 5 à 30mg/mL. On observe un pic d'absorbance à 280nm dont la hauteur croît avec la concentration. Cependant, pour une forte concentration (*Figure 87*, 30mg/mL), la courbe d'absorbance à 280nm sature avec son pic présentant une allure qui ressemble au bruit. On va expliquer ce phénomène ci-après.



*Figure 87. Evolution du spectre d'absorbance en augmentant la concentration de lysozyme. Les courbes sont capturées in-situ par l'interface logicielle « Oceanoptics » avec un gradient de la concentration en lysozyme de 5 à 30mg/mL.*

### 5.2.2.4.1 Limite de linéarité de la concentration avec l'absorbance

A partir de la figure 87, on trace l'absorbance à 280nm en fonction de la concentration en protéine (Figure 88). Nous observons que l'absorbance à 280nm croît linéairement avec la concentration en lysozyme jusqu'à 25mg/mL. Cette gamme de concentration correspond au domaine de linéarité ou la gamme de validité de la loi de Beer-Lambert. Il existe alors trois solutions pour pouvoir quantifier la concentration en lysozyme à partir de l'absorbance à 280nm:

- utiliser une solution relativement diluée, ce qui n'est pas réaliste car nous sommes intéressés par la caractérisation en ligne de solutions sursaturées.
- diminuer le trajet optique et donc le diamètre du capillaire.
- réduire l'effet de la lumière parasite qui interfère la détection de la lumière transmise (voir en §5.2.2.4.2).
- augmenter l'intensité incidente par le temps d'intégration ( $t_I$ ) pour augmenter le ratio signal/bruit (S/N) (voir en §5.2.2.4.3).

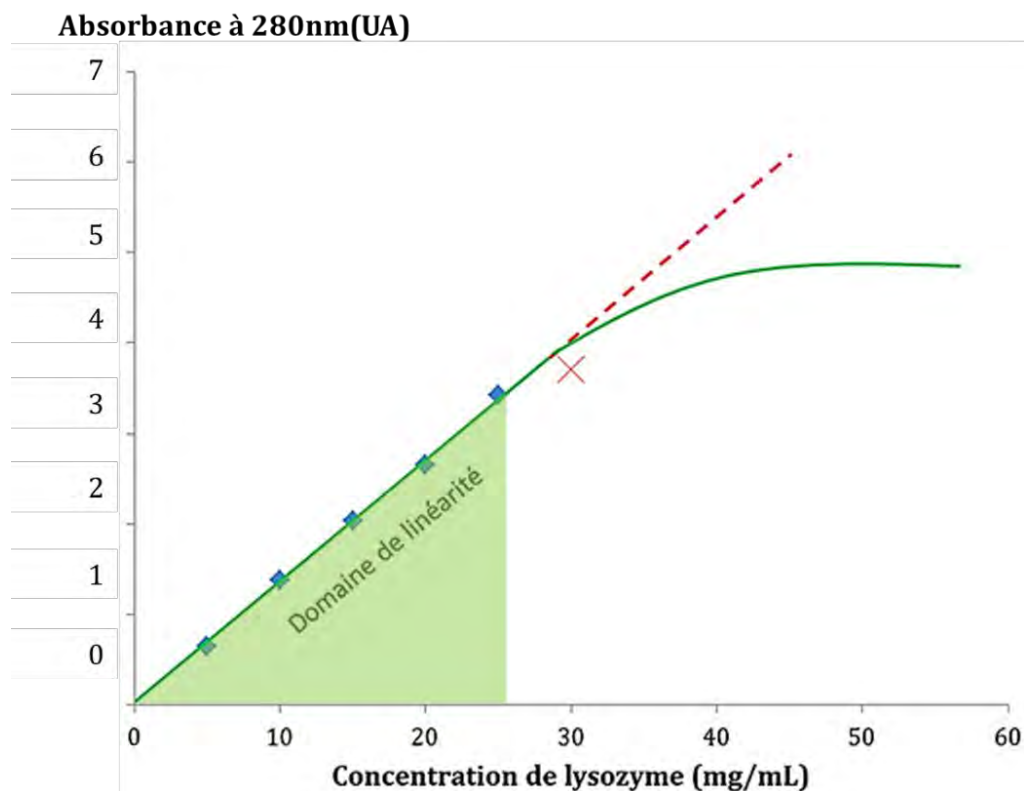


Figure 88. Courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de lysozyme (mg/ml).



#### 5.2.2.4.2 Effet de la lumière parasite

La qualité du spectre d'absorbance obtenu par utilisation d'un instrument dispersif est une fonction de la monochromaticité de la lumière incidente. Celle-ci dépend de la quantité de lumière parasite. La lumière parasite ( $I_P$ ) peut être due à la lumière ambiante, le porte-échantillon devant être transparent dans cette gamme de longueur d'onde, à la diffusion par les surfaces optiques à l'intérieur du spectromètre, etc. Cet effet peut être minimisé ou corrigé en réalisant une référence ( $I_0$ ). Néanmoins, lorsque l'on travaille avec un échantillon très concentré, la lumière absorbée étant importante, la lumière transmise devient faible. Par exemple, pour un échantillon concentré avec une absorbance près de 5, la lumière transmise atteignant le détecteur serait réduit d'un facteur 10000 (données constructeur). Ainsi, l'intensité mesurée à ce moment-là peut être considérée comme l'intensité parasite ! Cela peut expliquer les oscillations observées sur le pic d'absorbance à 30mg/mL (*Figure 87*), comparées aux pics « lisses » observées de 5 à 25mg/mL.

Par ailleurs, la diffusion sur la paroi du capillaire peut également contribuer à l'effet parasite. La solution serait alors de choisir un capillaire dont la paroi soit plus transparente à 280nm : en diminuant son épaisseur, en choisissant un matériau moins absorbant que le Téflon (Galante *et al.*, 2009).

#### 5.2.2.4.3 Choix du temps d'intégration : signal/bruit, saturation du spectromètre, fréquence d'acquisition

Sachant que dans notre montage l'intensité de la lampe est non-réglable, la seule façon d'avoir une intensité suffisamment importante quand l'absorption est forte est d'augmenter le temps d'intégration ( $t_I$ ). Le temps d'intégration ( $t_I$ ), allant de 1ms à 65s, est le temps pendant lequel le spectromètre accumule les photons incidents ou transmis.  $t_I$  est choisi selon les règles suivantes :

- Le ratio signal/bruit (S/N) peut être amélioré en augmentant le temps d'intégration. Généralement, il est suggéré de régler  $t_I$  de sorte que le signal pour les solutions analysées corresponde à 85% de l'intensité de saturation du spectromètre (*Figure 89*, ligne bleue).
- Il est aussi important de ne pas dépasser la capacité de spectromètre (*Figure 89*, ligne violette) ce qui le sature. Pour notre application, comme on ne s'intéresse qu'à l'absorption à 280nm afin de valider la caractérisation en ligne du lysozyme, on peut augmenter  $t_I$  jusqu'à obtenir un signal suffisant à 280nm, même s'il est saturé pour d'autres longueurs d'onde (*Figure 89*).

- $t_i$  est l'inverse de la fréquence d'acquisition  $f_A$  ( $f_A = 1/t_i$ ). Pour mesurer précisément l'absorbance d'une goutte, il faut alors réaliser plusieurs acquisitions ( $\geq 10$ ) au cours du passage de la goutte à travers le faisceau optique. Ainsi le  $t_i$  doit être au moins 10 fois plus petit que le temps de passage de la goutte, ce qui impose une valeur maximale pour  $t_i$ . Dans la partie suivante (5.2.2.5), on va expliquer le passage d'une goutte dans le porte échantillon, l'enregistrement in-situ des données d'absorbance ainsi que le choix de  $t_i$  en fonction du temps de passage.

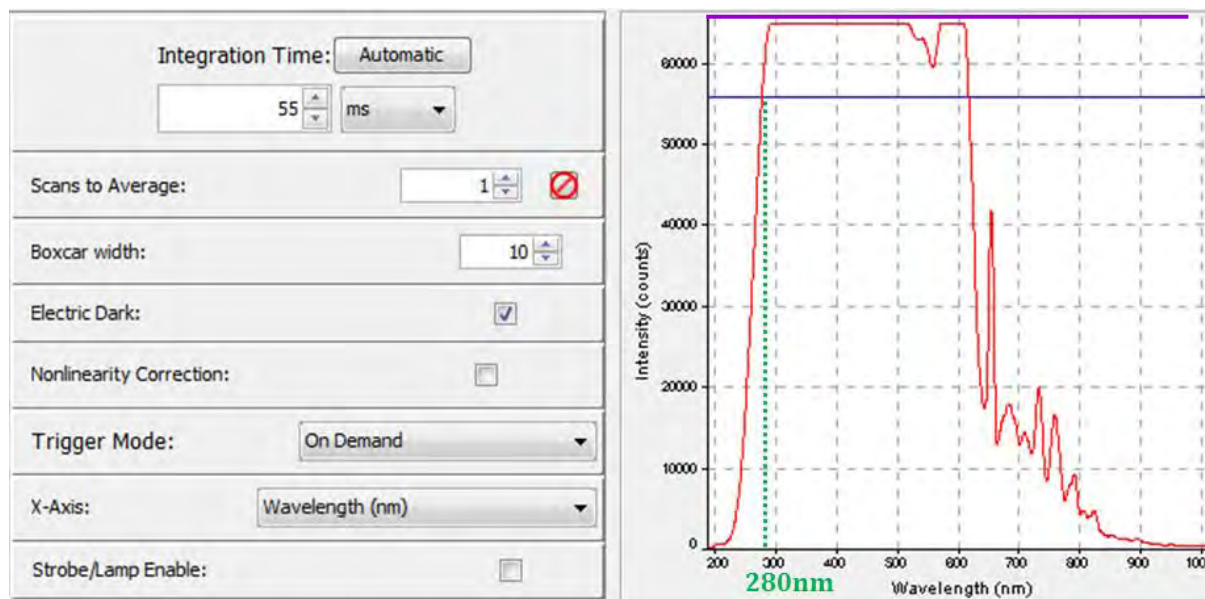


Figure 89. Interface de « Oceanoptic » pour régler l'intensité par le temps d'intégration. Ligne bleue : un signal d'intensité d'environ 85% de la capacité de spectromètre. Ligne violette : la saturation du spectromètre.

## 5.2.2.5 Mesure d'absorbance avec les gouttes

La mesure d'absorbance dans les gouttes est réalisée en enregistrant toutes les données d'absorbance à une longueur d'onde donnée (choisie par le manipulateur) au cours de la circulation des gouttes. Cette longueur d'onde est de 280nm lorsqu'il s'agit d'expériences avec une protéine et de 430nm ou 631nm dans le cas du mélange de deux couleurs. La fréquence d'acquisition  $f_A$  est réglée avec le temps d'intégration  $t_i$ .

### 5.2.2.5.1 Passage d'une goutte à travers le faisceau d'UV

Dans cette partie, je vais expliquer l'enregistrement de l'absorbance in-situ à partir d'un schéma du passage d'une goutte à travers le faisceau de lumière. Les mesures sont effectuées pour les capillaires de diamètre interne 500 $\mu$ m et 1mm sur des gouttes générées avec une jonction en croix de diamètre interne adapté.

### a) Capillaire de 1mm de diamètre interne

Les mesures sont effectuées à 280nm avec une série de gouttes de lysozyme de concentration identique dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Les débits appliqués sont 4000 $\mu$ L/h pour l'huile FMS et 1000 $\mu$ L/h pour la solution de lysozyme. Le schéma du passage d'une goutte à travers le faisceau lumineux et l'enregistrement de l'absorbance à 280nm sont présentés dans les figures 90 et 91, respectivement :

- Avant l'entrée d'une goutte dans le faisceau de lumière, l'absorbance est à zéro car l'huile FMS n'absorbe pas (Figure 90a, Figure 91a).
- Au moment où la goutte commence à entrer dans le faisceau (de Figure 90a à Figure 90b), les molécules de protéine de la goutte commencent à absorber le signal et ainsi l'absorbance commence à augmenter (>0) (de Figure 91a à Figure 91b).
- Lorsque le centre de la goutte est aligné avec le centre du faisceau (Figure 90c), la quantité de molécule qui absorbe est au maximum ainsi que l'absorbance (Figure 91c).
- Lorsque la goutte continue à passer et jusqu'à ce qu'elle sorte du faisceau (de Figure 90d à Figure 90e), l'absorbance diminue jusqu'à zéro (de Figure 91d à Figure 91e).

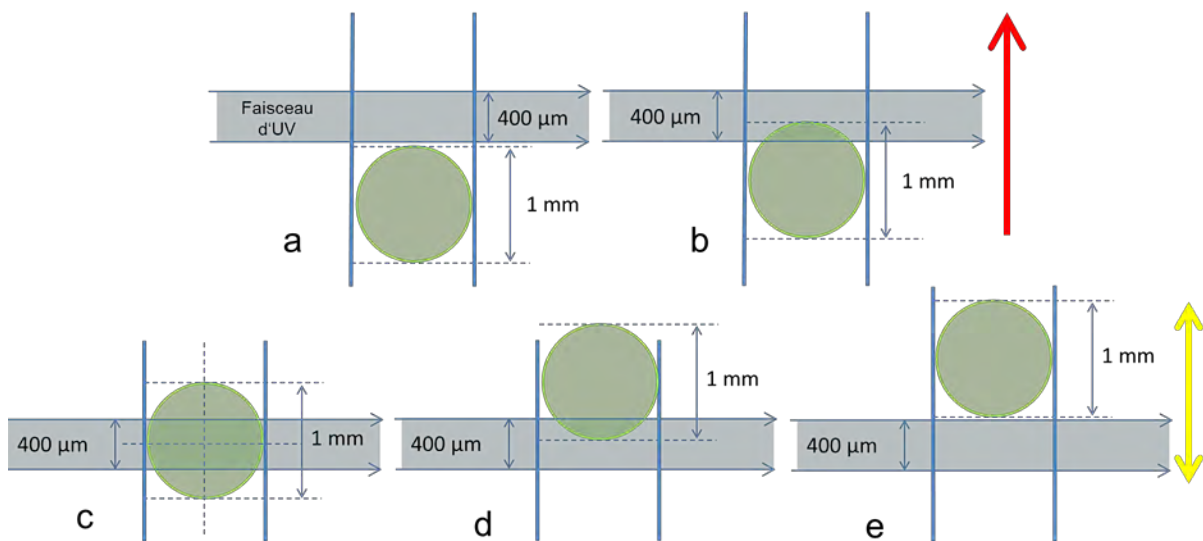


Figure 90. Schéma du passage d'une goutte à travers le faisceau de lumière dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Le diamètre du faisceau est de 400 $\mu$ m et le diamètre de la goutte est de 1mm. La flèche rouge correspond à la direction du passage de la goutte. (a) juste avant que la goutte entre dans le faisceau, (b) la goutte commence à entrer dans le faisceau, (c) le centre de la goutte est aligné avec le centre du faisceau, (d) la goutte est en train de sortir du faisceau, (e) juste après que la goutte sorte du faisceau. La flèche jaune correspond au chemin de passage d'une goutte.

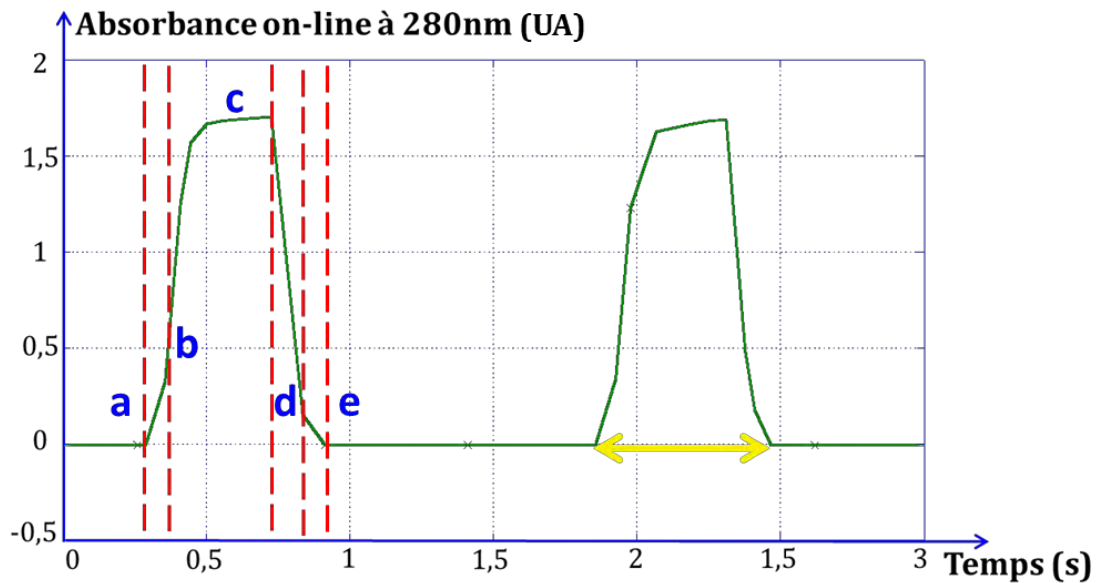


Figure 91. Absorbance in-situ à 280nm de deux gouttes dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Le temps d'intégration  $t_i$  est de 35ms. (a), (b), (c), (d), (e) correspondent aux étapes de passage correspondant à la figure 90. La flèche jaune correspond au temps de passage d'une goutte à travers le faisceau.

Selon la figure 91, les courbes d'absorbance d'une goutte en fonction du temps se présentent sous la forme d'un pic large. Les pics ne sont pas symétriques car les gouttes ne sont plus sphériques dû à leur mouvement dans le capillaire poussées par la phase continue (Figure 92).

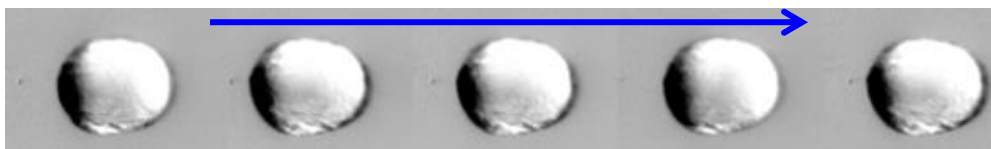


Figure 92. Gouttes au cours de l'écoulement dans le capillaire poussées par la phase continue. La flèche bleue correspond à la direction de l'écoulement.

### b) Capillaire de 500 $\mu$ m de diamètre interne

Les mesures pour les gouttes de lysozyme en concentration identique ont également été réalisées dans un capillaire de 500 $\mu$ m de diamètre interne. Les débits appliqués sont 1000 $\mu$ L/h pour l'huile FMS et 500 $\mu$ L/h pour la solution de lysozyme. Le schéma du passage d'une goutte à travers le faisceau lumineux et l'enregistrement de l'absorbance à 280nm sont présentés dans les figures 93 et 94, respectivement. L'évolution de l'absorbance en fonction du temps suit les mêmes étapes que pour le capillaire de 1mm de diamètre interne.

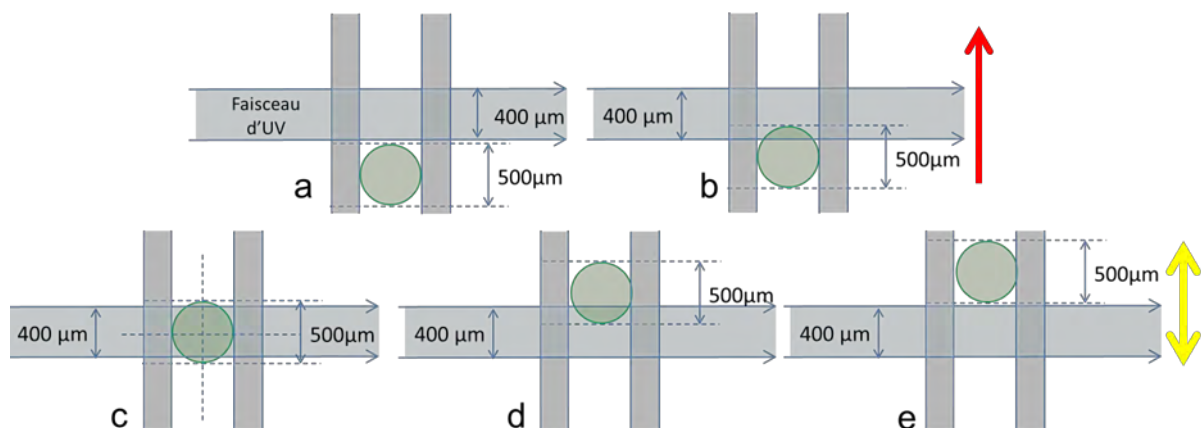


Figure 93. Schéma du passage d'une goutte ( $a \rightarrow b \rightarrow c \rightarrow d \rightarrow e$ ) à travers le faisceau de lumière dans un capillaire de  $500\mu\text{m}$  de diamètre interne. Le diamètre du faisceau est de  $400\mu\text{m}$  et le diamètre de goutte est de  $500\mu\text{m}$ . La flèche rouge correspond à la direction du passage de la goutte. La flèche jaune correspond au chemin de passage d'une goutte.

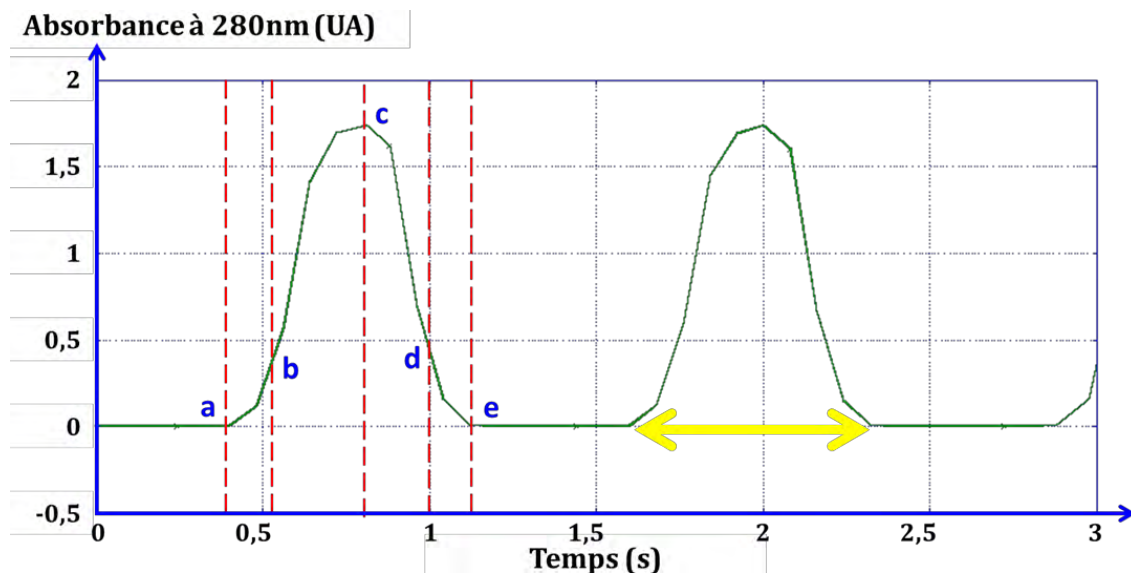


Figure 94. Absorbance in-situ à  $280\text{nm}$  de deux gouttes dans un capillaire de  $500\mu\text{m}$  de diamètre interne. Le temps d'intégration est  $80\text{ms}$ . (a), (b), (c), (d) et (e) correspondent aux étapes de passage respectives dans la figure 93.

### 5.2.2.5.2 Traitement des données : composition chimique, paramètre des gouttes

Le traitement des données de l'absorbance in situ à  $280\text{nm}$  ( $A_{280}$ ) est réalisé pour une série de gouttes avec des concentrations identiques dans des capillaires de  $500\mu\text{m}$  et  $1\text{mm}$  de diamètre interne. Les figures 95 et 96 représentent l'absorbance in-situ d'une série de gouttes dans un capillaire de  $500\mu\text{m}$  et  $1\text{mm}$  de diamètre interne respectivement, avec des concentrations en lysozyme de  $13,97\text{mg/mL}$  et  $8,12\text{mg/mL}$  respectivement.

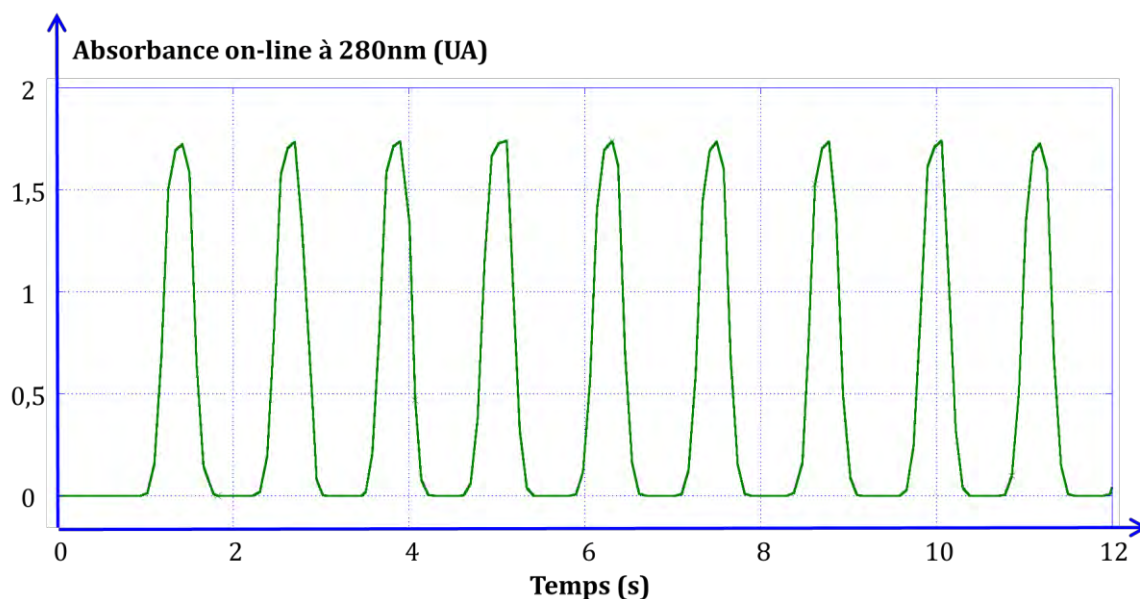


Figure 95. Absorbance in-situ à 280nm d'une série de gouttes de lysozyme en concentration identique (13,97mg/mL) dans un capillaire en 500µm de diamètre interne. Le temps d'intégration est 80ms.

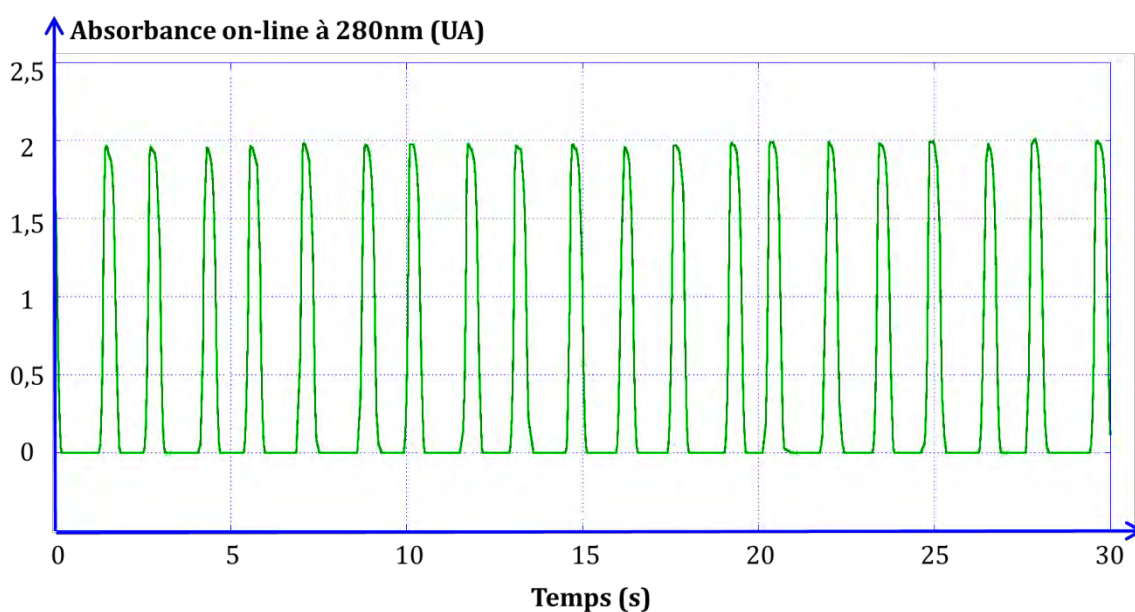


Figure 96. Absorbance in-situ à 280nm d'une série de gouttes de lysozyme de concentration identique (8,12mg/mL) dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Le temps d'intégration est de 35ms.

A partir des pics d'absorbance obtenus, on mesure les hauteurs, les durées (ou largeurs) des pics et les espacements entre les pics et ainsi on peut calculer ses valeurs moyennes afin de mesurer la composition chimique et les paramètres des gouttes (composition chimique, taille et fréquence).



### a) Concentration des gouttes

La hauteur du pic  $h$  correspond à une absorbance ( $A_{280}$ ) maximum lors du passage, avec une longueur du trajet optique ( $l$ ) maximum qui est égale à la largeur du canal ( $W$ ). Sachant que je m'intéresse aux gouttes avec  $1 \leq L/W \leq 2$ , comme expliqué en §5.1.1, le diamètre d'une goutte n'est jamais plus petit que le diamètre du capillaire. Autrement dit, la largeur du canal  $W$  est toujours remplie avec la goutte ou le trajet optique ( $l$ ) est toujours rempli avec la solution à analyser. Ainsi, il est correct de calculer la concentration en lysozyme de la goutte  $C_{in-situ}$  avec  $W$ , à partir de l'équation 46, on obtient:

$$C_{in-situ} = \frac{A_{280}}{\varepsilon \times l} = \frac{h}{\varepsilon \times W}$$

Équation 47

### b) Paramètres des gouttes : longueur et fréquence

Les paramètres des gouttes sont déterminés en utilisant la forme des pics :

- La durée (ou largeur) du pic ( $w'$ ) correspond au temps de passage ( $t'$ ) d'une goutte à travers le faisceau ( $t' = w'$ ). Le chemin de passage de la goutte ( $L$ ) dépend de son temps de passage ( $t'$ ) à travers le faisceau et de la vitesse total ( $v_{TOT}$ ). Or ( $L$ ) est la somme de la longueur de la goutte ( $L$ ) et du diamètre du faisceau ( $d'$ ) (Figure 90, flèche jaune). Connaissant la vitesse de fluide ( $v_{TOT}$ , en cm/s), on peut donc calculer  $L$ :

$$L = (v_{TOT} \times t') - d'$$

Équation 48

- L'espacement entre les gouttes ( $D'$ , en cm) dépend de l'espacement entre les pics ( $E$ ) la vitesse total ( $v_{TOT}$ ). la fréquence de gouttes ( $f$ ) en gouttes/cm peut être calculée avec la longueur de la goutte ( $L$ ) et l'espacement entre les gouttes ( $D'$ , en cm). Donc on obtient l'équation 49:

$$f \text{ (gouttes/cm)} = \frac{1 \text{ cm}}{L + D'} = \frac{1}{L + (v_{TOT} \times E)}$$

Équation 49

- La fréquence des gouttes ( $f_D$ ) en goutte/s est ainsi calculée avec  $f$  et  $v_{TOT}$  (Équation 50),

$$f_D \text{ (gouttes/s)} = f \times v_{TOT}$$

Équation 50

### c) Résultats des mesures in-situ

A partir de la valeur moyenne des hauteurs des pics ( $h$ ), des durées (ou largeurs) des pics ( $t'$ ) et de l'espacement entre les pics  $E$ , de la vitesse totale  $v_{TOT}$  et du diamètre du faisceau ( $d'$ ), nous avons calculé la concentration ( $C_{in-situ}$ ), la longueur des gouttes  $L$  ainsi que les fréquences  $f$  des gouttes  $f$  et  $f_D$  (Tableau 6).

	Diamètres	
	500 $\mu$ m	1mm
h (unité arbitraire)	1,71 $\pm$ 0,04	1,95 $\pm$ 0,03
t' (ms)	770 $\pm$ 20	637 $\pm$ 18
E (s)	1,22 $\pm$ 0,04	1,43 $\pm$ 0,05
$v_{TOT}$ (mm/s)	2,12	1,77
d' (mm)	0,4	0,4
$C_{in-situ}$ (mg/mL)	12,87	7,40
L (mm)	1,23	1,02
f (gouttes/cm)	2,63	3,95
$f_D$ (gouttes/s)	0,56	0,73

Tableau 6. Valeurs mesurées des paramètres des pics : moyenne des hauteurs des pics  $h$ , des durées (ou largeurs) des pics  $t'$  et des espacements entre les pics  $E$ , vitesse totale  $v_{TOT}$ , diamètre du faisceau  $d'$ . Valeurs calculées de la composition chimique et les paramètres des gouttes: concentration  $C_{in-situ}$ , longueur des gouttes  $L$ , fréquences des gouttes  $f$  et  $f_D$ .

Nous pouvons alors comparer les valeurs calculées et les valeurs réelles :

- La valeur calculée de la concentration ( $C_{in-situ}$ ) sous-estime la concentration en lysozyme des gouttes de 7,8% et 8,8% pour les diamètres internes de capillaire de 500 $\mu$ m et 1mm. Nous expliquons cela par le fait que les gouttes en circulation sont déformées et ne sont plus sphériques. Or comme on le voit sur les figures 90c et 93c, au moment où le centre de la goutte est aligné avec le centre du faisceau il reste de l'huile dans le faisceau (intersection entre un cercle et un rectangle) donc on n'a jamais 100% de la goutte dans le faisceau. De plus, les gouttes générées sont entourées d'une couche d'huile et ne touchent pas la paroi du capillaire. Par conséquent, le vrai trajet optique est plus petit que  $W$  et donc l'équation 47 sous-estime la concentration. Cependant, comme nous sommes plus intéressés par la caractérisation qualitative de la concentration des gouttes en présence d'un gradient de débit, ces mesures sont suffisantes.



- Les longueurs de goutte calculées in-situ correspondent bien aux longueurs mesurées sur les gouttes au microscope comme le montre la photo de la figure 97, qui a été réalisée lors des expériences avec le capillaire de 1mm de diamètre interne. En parallèle, les fréquences des gouttes calculées correspondent bien aux valeurs calculées en utilisant les débits lors de l'étude hydrodynamique (chapitre 4).

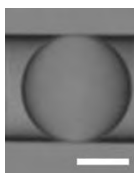


Figure 97. Goutte générée dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Barre d'échelle=500 $\mu$ m

En conclusion, le système de caractérisation en ligne utilisant notamment la cellule UV est adapté pour des mesures qualitatives des compositions chimiques des gouttes et pour des mesures quantitatives des longueurs et des fréquences des gouttes. Nous avons donc testé ce système avec un gradient de débit.

### 5.2.2.5.3 Caractérisation en ligne du gradient

#### a) Gradient de couleur

Nous avons d'abord comparé avec les expériences « off-line » réalisées avec le Nanodrop® en menant une expérience de caractérisation en ligne avec les gradients de couleurs générés par les profils de la figure 77b. La mesure d'absorbance in situ est faite à 631nm (bleu) pour toutes les gouttes (Figure 98).

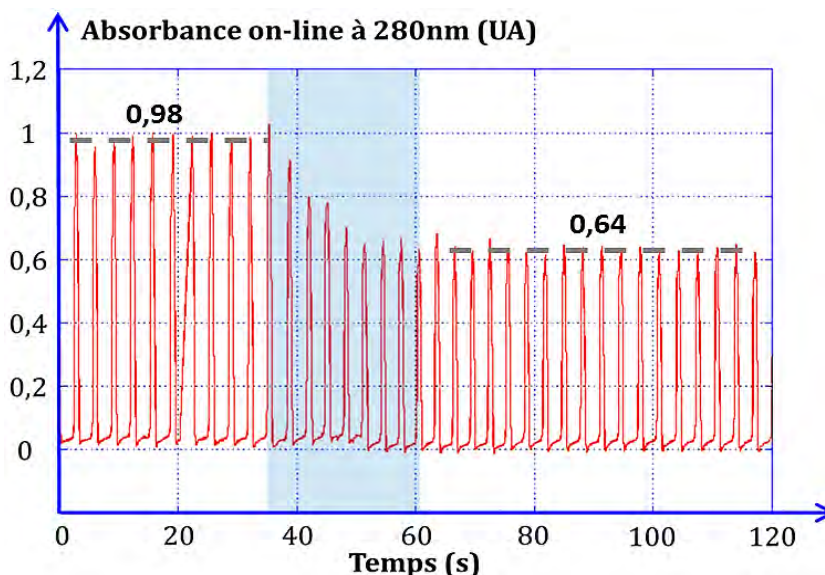


Figure 98. Absorbance in-situ à 631nm d'une série de gouttes dans un capillaire de 1mm de diamètre interne avec un gradient de couleur généré avec la même condition de débit que celle représentée dans la figure 77b. Le temps d'intégration est 20ms.

Il est impossible d'analyser les compositions chimiques des gouttes du fait que le coefficient d'absorption est inconnu pour le colorant utilisé. Cependant, le rapport d'absorbance des gouttes avant et après avoir changé le débit est identique pour les expériences « on-line » (Figure 98) et « off-line » (Figure 78b) :

$$\text{Rapport d'absorbance(on - line)} = \frac{0,98}{0,64} = 1,53$$

$$\text{Rapport d'absorbance(off - line)} = \frac{0,46}{0,3} = 1,53$$

### b) Gradient de la concentration en lysozyme

Nous avons testé l'absorbance in situ du lysozyme avec un gradient progressif en 9 paliers de 1min allant de 3 à 27mg/ mL (par pas de 3mg/mL) dans un capillaire de 1mm de diamètre interne. Pour cela, nous avons mélangé deux phases dispersées, le tampon d'acétate de sodium (pH=4,5) et la solution de lysozyme (30mg/mL), et nous avons utilisé l'huile FMS comme phase continue. Les débits programmés pour les phases utilisées sont reportés dans le tableau 7. Le temps d'intégration a été choisi le plus grand possible (35ms) pour avoir un signal important en gardant une fréquence d'acquisition suffisante. Le but est de mesurer l'absorbance des gouttes le plus précisément possible.

Tampon (μL/h)	FMS (μL/h)	Lysozyme 30mg/mL (μL/h)	Durée (mn)	Concentration de lysozyme attendue dans les gouttes (mg/mL)
900	4000	100	1	3
800		200	1	6
700		300	1	9
600		400	1	12
500		500	1	15
400		600	1	18
300		700	1	21
200		800	1	24
100		900	1	27

Tableau 7. Débits programmés pour générer un gradient de lysozyme allant de 3 à 27 mg/mL.

La figure 99 représente l'absorbance in situ des gouttes de lysozyme générées avec le gradient programmé dans le tableau 7.

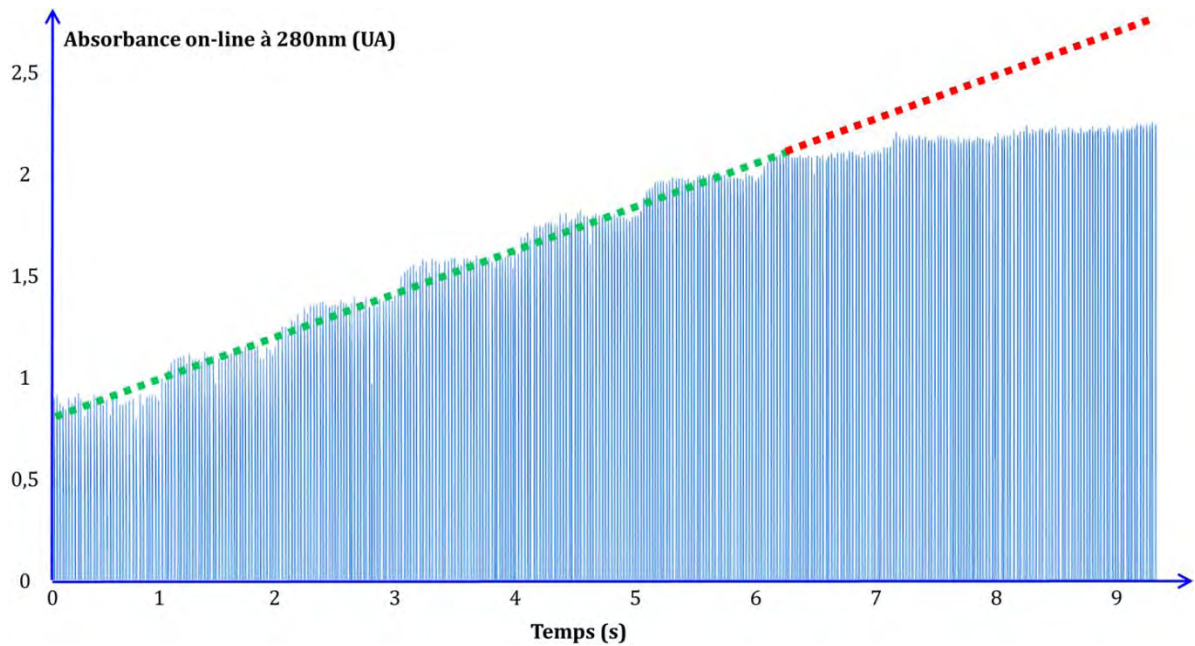


Figure 99 absorbance in-situ à 280nm pour les gouttes de lysozyme générées avec le gradient de débits programmé dans le tableau 7. Le temps d'intégration est 35ms.

On a trouvé qu'aux débits de 900 à 400 $\mu$ L/h pour la solution de tampon et de 100 à 600 $\mu$ L/h pour la solution de lysozyme, qui correspondent aux faibles concentrations de lysozyme dans les gouttes, l'évolution de la concentration des gouttes est régulière et linéaire avec le profil des débits comme attendu (Figure 99, les pics dans la zone encadrée par les pointillés verts). Par contre, aux débits qui correspondent aux fortes concentrations en lysozyme dans les gouttes (de 300 à 100 $\mu$ L/h pour la solution de tampon et de 700 à 900 $\mu$ L/h pour la solution de lysozyme), l'absorption est très importante et on est en dehors du domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert (Figure 99, les pics dans la zone encadrée par les pointillés rouges). Pour travailler dans ce domaine de concentration en protéine, il faut donc diminuer la quantité de matière absorbante. Pour cela on peut utiliser un faisceau de largeur plus petite ou travailler avec un capillaire de diamètre plus petit.

Pour conclure cette partie, on a mis au point un troisième module du montage microfluidique qui permet de mesurer en ligne la composition, la taille et la fréquence des gouttes générées dans des capillaires de 500 $\mu$ m et 1mm.

## 5.3 Cristallisation

Dans cette partie, nous présentons une application de notre dispositif microfluidique. Au laboratoire, la jonction en PEEK et les capillaires en Téflon que nous utilisons ont déjà permis de cristalliser diverses molécules dans des solvants organiques et aqueux (Ildefonso, Revalor, *et al.*, 2012). Pour valider la polyvalence de notre système, il reste alors à confirmer la possibilité de cristalliser dans un milieu visqueux. C'est ainsi que dans ma thèse, j'ai étudié la cristallisation de la rasburicase dans une solution aqueuse de PEG 8000 (agent de cristallisation) en variant les conditions de viscosité. Pour cela, nous commençons par un criblage rapide des conditions de cristallisation (concentration de protéine vs concentration de PEG 8000) avec la méthode de microbatch®. Le but est d'estimer la solubilité et de déterminer la zone sans cristaux, la zone de nucléation spontanée et la zone de « précipitation ». Pour les expériences en microfluidique, nous nous sommes basés sur les résultats de la caractérisation des gouttes en termes de forme (§5.1) et de composition (§5.2). Le but est de déterminer la géométrie du système microfluidique et la phase continue à choisir pour former des gouttes homogènes (forme et composition) en milieu visqueux, avec la solution de PEG 8000.

### 5.3.1 Criblage rapide en microbatch

Nous avons utilisé la méthode microbatch® pour cribler rapidement les conditions de cristallisation de la rasburicase en présence de PEG 8000 (en concentration massique de 2,5 à 10%) à 20°C. Le choix de conditions expérimentales de ce criblage préliminaire provient du travail de Giffard (Giffard *et al.*, 2008). Les résultats sont présentés sur la figure 100.

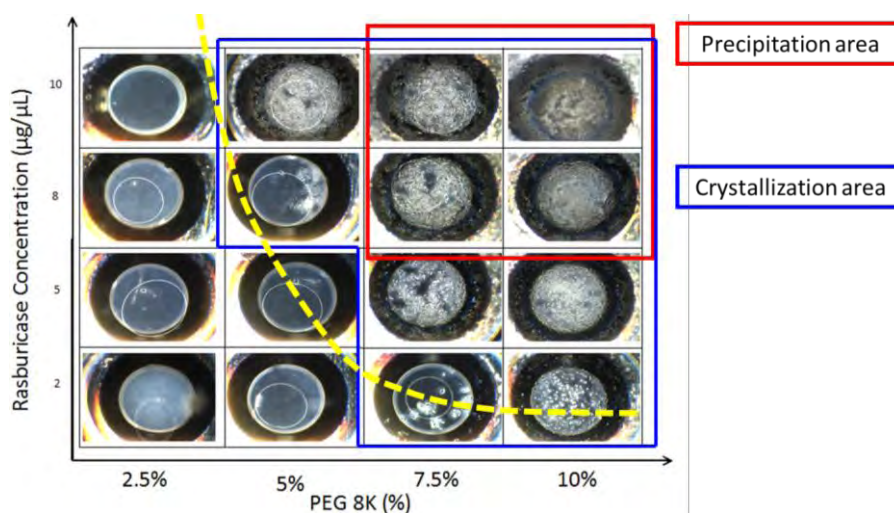


Figure 100. Morphodrome obtenu par microbatch dans le plan concentration en rasburicase vs concentration en PEG 8000. À 20°C.

Les meilleures conditions de cristallisation correspondent à la zone en bleu (Figure 100, « crystallization area ») de la figure 100, c'est-à-dire pour des concentrations en rasburicase  $\geq 5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  et des pourcentages en PEG  $\geq 5\%$ . En effet la figure 100 montre qu'au-dessous de ces concentrations, il n'y a pas de cristaux dans la solution. Cependant pour des concentrations de rasburicase  $\geq 8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  et des pourcentages en PEG  $\geq 8\%$ , des précipitations sont observées (Figure 100, « precipitation area »). Néanmoins, dans un système de cristallisation en microfluidique à base des gouttes, le confinement cinétique induit une augmentation du temps d'induction de la nucléation car  $t_N \sim 1/V$  (§2.2.3.4). Par conséquent, on doit travailler à des concentrations en soluté plus élevées en microfluidique.

### 5.3.2 Expériences en microfluidique

Pour former les gouttes de façon reproductible en termes de forme et de composition dans le système microfluidique, nous avons testé différentes huiles avec les solutions de (rasburicase+PEG8000) et nous avons choisi l'huile FMS. Les propriétés physico-chimiques des huiles et des solutions de PEG8000 sont données dans le tableau 3 du chapitre 4. La cristallisation de la rasburicase, dans les gouttes de volumes nanométriques formées en microfluidique, donne lieu à un effet de confinement cinétique qui nous oblige à augmenter la concentration en rasburicase. Nous nous sommes alors placés dans la zone de précipitation. Cependant le risque est de cristalliser dans les seringues ou les capillaires avant même que les gouttes soient formées, et ainsi d'obstruer les capillaires. Pour éviter cela, les solutions de rasburicase et de PEG concentrées ne doivent être mélangées qu'au moment de la formation des gouttes. Nous avons donc testé différentes méthodes de mélange des phases aqueuses:

- Le premier dispositif comprend deux jonctions en T (Système à 2T) : la première jonction T permet d'injecter la solution de rasburicase perpendiculairement à la solution de PEG, les mélangeant directement dans une portion de capillaire de 25mm de longueur ; la deuxième jonction T permet de former des gouttes dans l'huile FMS (Figure 101a). Pour ce système 2T, le mélange du PEG 8000 (20%) et de la rasburicase (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) précipite dans le capillaire avant de former des gouttes qui ne sont donc pas homogènes en composition.
- Le deuxième dispositif, développé pour éviter la précipitation avant la génération des gouttes, comprend trois jonctions en T (Système à 3T). L'idée est de former séparément deux séries de gouttes en PEG et en rasburicase en utilisant deux des jonctions en T et de les faire coalescer

à travers la troisième jonction en T (*Figure 101b*). Dans ce système à 3T, les gouttes de PEG et de rasburicase ne coalescent pas pour se mélanger et former le milieu de cristallisation, contrairement aux travaux de Su et al. (Su et al., 2007) qui utilisent pour cela des tensioactifs. Or, comme nous l'avons vu au §, l'interface solution/huile a une forte influence sur la cristallisation ce qui nous conduit à éviter tout tensioactif qui s'adsorberait à cette interface. Ainsi il est difficile de mélanger les gouttes de rasburicase et de PEG avec le système à 3T.

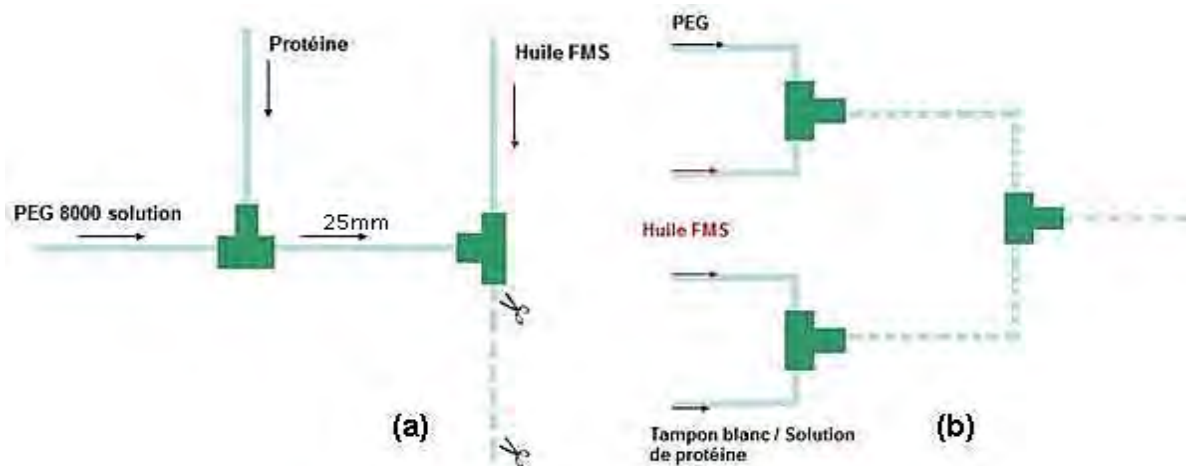


Figure 101. (a) Système 2T, (b) Système 3T

Au vu des difficultés rencontrées avec les jonctions en T, le dernier dispositif que nous avons testé utilise une jonction en croix (*Figure 102*). Les gouttes sont générées de la façon représentée en §5.1.1 grâce aux 4 entrées-sorties, en mélangeant les solutions aqueuses de rasburicase et de PEG, perpendiculairement au flux de la phase continue. Les débits des deux phases dispersées et de la phase continue sont contrôlés avec la loi d'échelle obtenue dans l'étude hydrodynamique (§5.1), afin d'assurer le volume des gouttes efficace ( $1 < L/W < 2$ ). L'homogénéité de la composition chimique des gouttes est vérifiée d'abord par les mesures optiques *off-line* et ensuite par les mesures en ligne d'absorbance de l'UV. Les expériences réalisées par ce dispositif sont présentée dans la partie suivante.



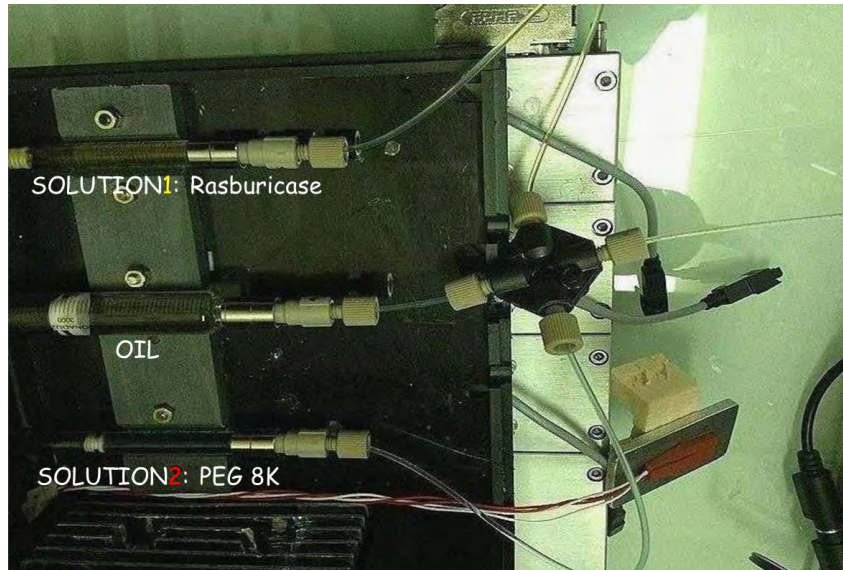


Figure 102. Photo du montage expérimental de l'expérience de la cristallisation de la rasburicase en microfluidique avec une jonction en croix.

### 5.3.3 Résultats de la cristallisation en microfluidique

Le montage microfluidique utilisant une jonction en croix nous a permis de reproduire les conditions de cristallisation du criblage rapide en microbatch (§5.3.1). La cristallisation a été réalisée dans des gouttes de 65nL par incubation pendant 24h à deux températures : 5 et 20°C. Les résultats obtenus à 20°C sont reportés dans la figure 103:

- Pour les conditions les plus sursaturées (10% de PEG8k et 10 $\mu$ g/ $\mu$ L de rasburicase), dès la formation des gouttes, des précipités apparaissent qui deviennent des cristaux par un mécanisme de mûrissement d'Ostwald (Figure 103a) (Candoni, Grossier, et al., 2012).
- Pour des conditions sans précipitation au moment de la génération des gouttes, soit à faible sursaturation (7,5% PEG 8k et 2 $\mu$ g/ $\mu$ L rasburicase), la goutte apparaît transparente au début de l'incubation (Figure 103b). A 6h, on observe clairement un cristal qui croit par la suite.



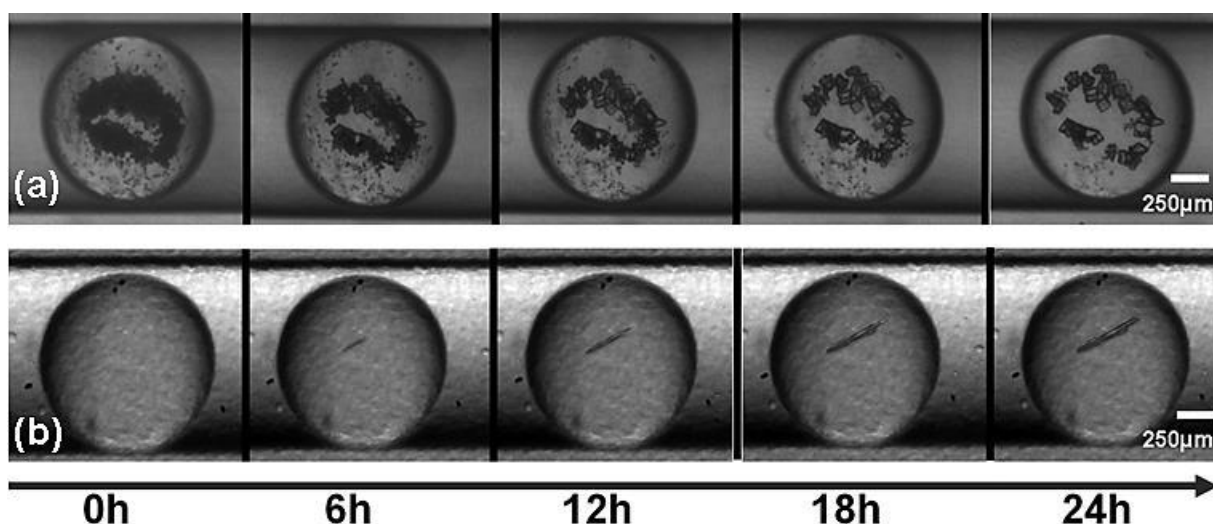


Figure 103. Séquence temporelle de deux gouttes de 65nL incubées à 20°C et observées pendant 24h : (a) la goutte contient du PEG8k 10% et de la rasburicase 10µg/µL. (b) la goutte contient du PEG8k et 7,5% et de la rasburicase 2µg/µL.

Les résultats obtenus à 5°C et à d'autres concentrations sont regroupés avec les précédentes dans la figure 104.

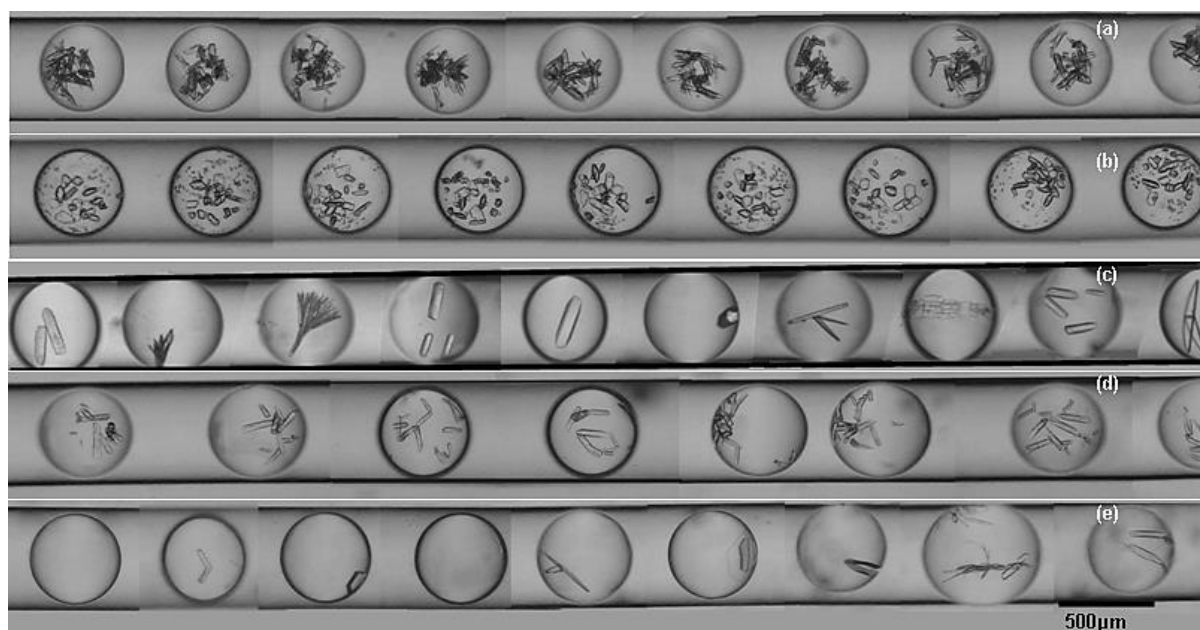


Figure 104. Images des cristaux obtenus dans des gouttes de 65nL au bout de l'incubation de 24h. (a) 10% de PEG, 10µg/µL de rasburicase, à 5°C. (b) 10% de PEG, 10µg/µL de rasburicase, à 20°C. (c) 5% de PEG, 10µg/µl rasburicase, à 5°C. (d) 7.5% de PEG, 5µg/µl de rasburicase, à 5°C. (e) 7.5% de PEG, 5µg/µl de rasburicase, à 20°C.

De bas en haut de la figure 104, on voit cinq expériences indépendantes de concentration croissante et chaque expérience (soit chaque ligne) correspond à un

capillaire. Pour chaque condition expérimentale, on a sélectionné une dizaine de gouttes parmi 200-300 gouttes que contenait le capillaire. La figure 104 correspond alors à un "morphodrome" des images des cristaux obtenus dans des conditions variées. On remarque qu'une même condition expérimentale peut produire des faciès différents. Par exemple, la figure 104c montre des cristaux soit massifs, soit en forme d'aiguille ou de plaquettes. Dans des études précédentes menées au laboratoire (Giffard *et al.*, 2008), il a été montré que les faciès «massif» et «en plaquettes» de la rasburicase correspondaient à deux phases différentes. Cependant comme ces phases cristallines correspondent à des compositions différentes, on ne parle pas de polymorphes différents.

Le tableau 8 montre la distribution statistique du nombre de cristaux recensés par goutte en fonction de la température et de la composition des gouttes.

C <sub>Rasburicase</sub> (µg/µL)	C <sub>PEG8k</sub> (%)	N <sub>cristaux par goutte</sub> (%) <sup>a</sup>	Température	
			5°C	20°C
10	10		<i>Figure 104a</i>	<i>Figure 104b</i>
		0	0	0
		1	0	0
		>1	100	100
10	5		<i>Figure 104c</i>	
		0	6,1	
		1	51,1	
		>1	42,8	
5	7,5		<i>Figure 104d</i>	<i>Figure 104e</i>
		0	0	30,2
		1	0	20,7
		>1	100	49,1

Tableau 8. Distribution statistique du nombre de cristaux par goutte en fonction de la température et des concentrations en rasburicase et en PEG. <sup>a</sup> 0, 1, et >1 correspondent respectivement au pourcentage de gouttes avec zéro cristal, un cristal et plus qu'un cristal par goutte.

Malgré la dispersité des résultats, certaines conditions permettent de faire apparaître des tendances:

- Les solutions de rasburicase à 5µg/µL et PEG 8000 à 7,5% (Figure 104d et e) donnent une augmentation du nombre de cristaux lorsqu'on abaisse la température de 20°C à 5°C. Ainsi à 5°C, toutes les gouttes nucléent.

- Les solutions de rasburicase à  $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$  à  $5^\circ\text{C}$  (Figure 104c et a) donnent une augmentation du nombre de gouttes présentant des cristaux lorsqu'on augmente la concentration en PEG8k de 5% à 10%. Ainsi en PEG de 10%, toutes les gouttes nucléent.

Par conséquent, nous pouvons choisir les conditions expérimentales suivant le paramètre que nous voudrions étudier avec la rasburicase :

- L'effet de la température sera étudié avec une concentration en rasburicase faible ;
- L'effet de la concentration en PEG sera étudié avec une température faible ;
- Le faciès et la phase des cristaux seront explorés dans des gouttes contenant des monocristaux comme dans les expériences des figure 104c et e.

Pour conclure, ces résultats montrent l'importance de réaliser un grand nombre d'essais par condition du fait de la stochasticité de la nucléation (§1.2.1.4). Ainsi, statistiquement chaque condition de cristallisation doit être testée 50-100 fois pour obtenir un bon niveau de confiance, c'est-à-dire de décider si le résultat (taux de réussite de la cristallisation) est positif ou négatif. Cela est un problème principal dans les études effectuées avec les robots classiques utilisés dans le criblage des conditions de cristallisation qui testent une centaine des conditions mais seulement 1-5 fois chacune, obtenant souvent les résultats non-reproductibles ou négatifs.

## 5.3.4 Article 2:

### **Versatile Microfluidic Approach to Crystallization**

Résumé: Nous présentons un montage microfluidique simple et facile à utiliser pour la cristallisation de molécules minérale, organique et de matériaux biologiques. Nous présentons d'abord brièvement les propriétés hydrodynamiques de ce montage. Ensuite, ce montage est testé et validé pour un milieu visqueux – la cristallisation d'une protéine dans une solution aqueuse de PEG. Les données de nucléation sont obtenues en testant différentes conditions de cristallisation dans des nano-cristallisoirs, grâce une méthode à base des gouttes, en contrôlant précisément l'écoulement à injecter.

# Versatile Microfluidic Approach to Crystallization

S. Zhang, N. Ferté, N. Candoni, and S. Veessler\*

CNRS, CINaM, Aix-Marseille Université Campus de Luminy, Case 913, 13288 Marseille Cedex 09, France

## S Supporting Information

**ABSTRACT:** We present a simple and easy-to-use microfluidic setup for the crystallization of mineral, organic, and biological materials. After briefly presenting the hydrodynamic properties of the setup, we test and validate it with viscous media by crystallizing a protein in an aqueous solution of PEG. We obtain nucleation data in nanocrystallizers using a droplet-based method and precisely controlling input flows to test different crystallization conditions.

## INTRODUCTION

A better understanding and control of crystallization will open the way to new approaches to crystallization in production, for instance of pharmaceuticals and nanomaterials. Crystallization is influenced by several parameters such as supersaturation, temperature, chemical composition, and hydrodynamics. Rapid screening of phases and crystallization conditions is, therefore, often required during the study of the crystallization of a material. High-Throughput Screening (HTS), initially developed for biocrystallization<sup>1</sup> and applied in the pharmaceutical industry,<sup>2</sup> is used for this purpose. But sometimes only a small quantity of material is available, which poses the problem of developing a suitable experimental tool to reduce material consumption. Using microfluidic systems to form microdroplets, as increasingly done over the past decade,<sup>3</sup> could provide the solution, allowing the manipulation of fluids on submillimeter scale.<sup>4,5</sup> Our microfluidic system dedicated to crystallization is based on the generation of nanocrystallizers (nL droplets) isolated from each other and in which crystallization can occur independently.<sup>6</sup> Moreover we are able to form hundreds of droplets, which are monodispersed in size and in chemical composition, without using surfactant. Hence we can generate a large number of experiments per condition for statistical studies, in order to deal with the stochasticity of the phenomenon of nucleation, while consuming only small quantities of material.

Transforming microfluidics into a versatile tool for the screening of crystallization conditions and phases offers promise for many potential applications.<sup>7</sup> Our goal is to create a microfluidic device compatible with all solvents and molecules. This device should be simple and easily incorporated into any laboratory, even those not specialized in microfluidics. Thus, we initially constructed a microfluidic system based on a T-shaped junction<sup>8–10</sup> coupled with Teflon tubing, which is resistant to many solvents,<sup>11</sup> rendering the device applicable to mineral,<sup>12</sup> organic<sup>11</sup> and biological materials.

Here, after studying the hydrodynamic properties of the system, we obtain control of droplet generation regimes by adjusting flow rates. We present scaling laws for droplet size, depending on the capillary number. We test the microfluidic setup with organic and mineral molecules, organic solvents and viscous media. Finally, replacing the T-junction with a cross-

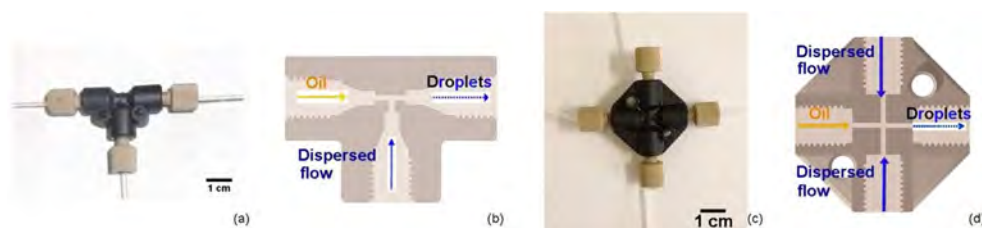
junction, we present crystallization experiments in which experimental conditions are varied by a precise control of input flows of solute and crystallization medium.

## RESULTS AND DISCUSSION

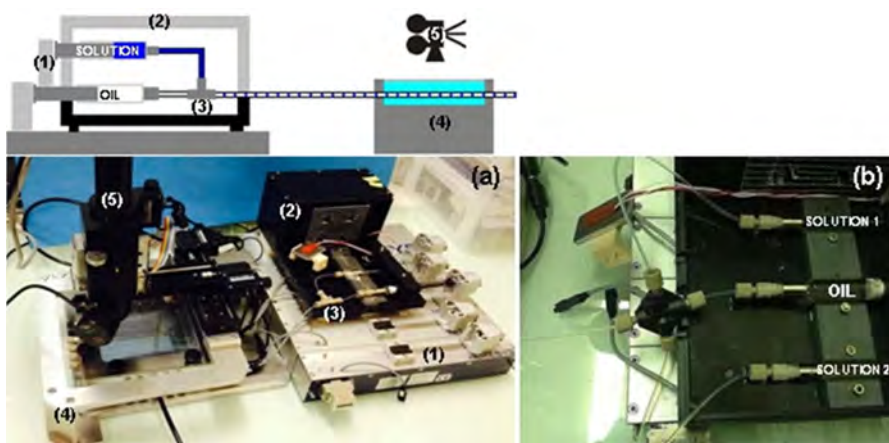
**Microfluidic setup.** PEEK (polyether ether ketone) devices based on HPLC techniques; T-shaped (Figure 1a and b), as described previously,<sup>9,11</sup> or cross-shaped (Figure 1c and d) (“plug-factory”) designs were used to form the droplets without addition of surfactants. Teflon tubing (“storage chip”) was used because it is compatible with almost all organic solvents. Water, ethanol (Figure 3), acetone, ethyl acetate, acetonitrile, nitrobenzene and acetate were previously tested.<sup>11,12</sup> Moreover, no evaporation was observed after 1 week at room temperature. To ensure maximum versatility, we used Fluorinated oil FC-70 (Hampton research) for organic solvents and FMS oil (Hampton Research) for aqueous solvents. These oils show no or very low miscibility with corresponding solvents and good wettability with Teflon. The pending drop method was used to measure the interfacial energy between immiscible phases; method and setup were previously described.<sup>13</sup>

Crystallization solutions and oil were separately loaded using separate syringes placed in a temperature-controlled incubator (from room temperature to 65 °C). The homemade setup is presented in Figure 2 (available commercially - ANACRIS-MAT). The channel was filled with different batches of monoconcentrated droplets. A T-junction was used for hydrodynamics studies and a cross-junction for crystallization studies. With a T-junction, droplets of crystallizing solution can be dispersed in oil, supersaturation being generated by temperature variation. In a cross-junction, the supersaturation is directly created by mixing 2 solutions and simultaneously dispersing this solution in oil. The droplet concentration and composition were varied using a programmable multichannel syringe pump (neMESYS) and controlling the relative flow rates of the different solutions (solution 1 and solution 2 in Figure 2b—from several  $\mu\text{L}/\text{h}$  up to thousands of  $\mu\text{L}/\text{h}$ ). Droplet sizes were controlled both via the channel size of the plug-factory and via the flow rates. The tubing containing the droplets was placed in a thermostated tubing-holder and

Received: January 23, 2015



**Figure 1.** Photos and schemes of PEEK plug-factory junctions. (a) and (b) T-shaped; (c) and (d) cross-shaped. Schemes of PEEK Tee and Cross from IDEX Health and Science catalog.

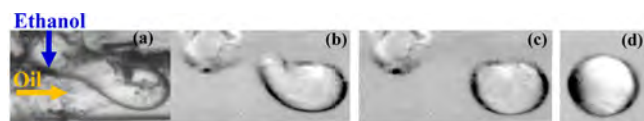


**Figure 2.** (a) Scheme and photograph of the homemade microfluidic setup: (1) syringe pump, (2) temperature controlled incubator, (3) T-junction, (4) thermostated tubing-holder (tubes are immersed in water for thermostating and observation), and (5) XYZ-motorized camera. (b) Cross-junction.

incubated (Figure 2a(4)), to obtain crystallization. Droplets were observed using an XYZ-motorized camera (OPTO) with variable zoom.

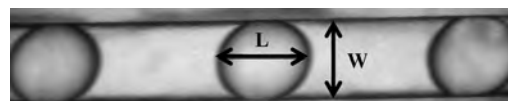
#### Droplet formation and volume with the T-junction.

The dispersed phase (crystallization solution) is injected perpendicularly to the continuous phase (oil). Figure 3 shows



**Figure 3.** Microphotographs of ethanol droplets generated and transported by the flow of FC70 oil in a transparent T-junction (ETFE) of 508  $\mu\text{m}$  of internal diameter: the capillary number  $Ca$  is 0.016, the ratio  $u_D/u_C$  between the dispersed phase (ethanol) and the continuous phase (oil) velocities is 0.1, and the total flow velocity  $u_{TOT}$  ( $u_D + u_C$ ) is 5.1 m/s. Background was removed from images (b–d) using ImageJ software (NIH).

ethanol plugs generated and transported by the flow of oil in a transparent T-junction (ETFE); observations were made under an optical microscope (Zeiss Axio Observer D1) equipped with a camera sCMOS (Neo, ANDOR Technology). The channel diameters were 508  $\mu\text{m}$  (P-729 IDEX). Droplets were spontaneously formed and transported when the flow of crystallization medium was sheared into the continuous flow of oil (Figure 3), leading to a dispersed phase of crystallization medium. A complete description of the different regimes of droplet formation is beyond the scope of this paper. The resulting droplets of the dispersed phase are monodispersed in size and uniformly spaced (Figure 4).



**Figure 4.** Photo of ethanol droplets surrounded by FC70 oil equally sized and uniformly spaced, in Teflon tubing of 508  $\mu\text{m}$  internal diameter.

The scaling law of droplet formation by cross-flow shear method in T-junction microfluidic devices has been systematically studied, and it was observed that droplet formation is controlled by a competition between the interfacial energy and the viscous or shear force imposed by the continuous phase.<sup>8,10,16–19</sup> The relative strength of the two is expressed by the capillary number  $Ca$  defined as

$$Ca = \frac{\mu_c \times u_c}{\gamma} \quad (1)$$

where  $u_c$  is the continuous phase velocity calculated with the ratio between the flow rate of the continuous phase and the section of the channel,  $\mu_c$  is the continuous phase viscosity (Table 1), and  $\gamma$  is the interfacial energy between the continuous and the dispersed phases (Table 2).  $Ca$  values characterizing the flow of the continuous phase in the channel are shown in Table 3. A low  $Ca$  indicates that the interfacial energy is strong compared to viscous stresses and dominates the shear force. Hence droplets tend to minimize their surface area. We characterized the droplet size using a normalized size given by the droplet length/width ratio ( $L/W$ ). We measured  $L$  and calculated  $L/W$  for our experimental conditions,  $0.002 \leq Ca \leq 0.12$  (Figure 4 and Table 3). The results are shown in Figure 5. This droplet formation regime is the dripping regime



Table 1. Physical Properties of the Phases

	FC70	FMS	Ethanol	PEG 8K 0%	PEG 8K 2.5%	PEG 8K 5%	PEG 8K 7.5%	PEG 8K 10%
Density $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	1940	1250–1270	789	1003	1005	1006	1020	1027
Kinematic viscosity $\nu \times 10^6$ (m <sup>2</sup> /s)	12	350–450	1.52	1.00	2.24 <sup>a</sup>	2.75 <sup>b</sup>	4.89 <sup>a</sup>	8.70
Dynamic viscosity $\mu_c$ (10 <sup>-2</sup> × kg/(m × s))	2.33	43.75–57.15	0.12	0.10	0.23	0.28	0.50	0.89 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Marcq personal communication. <sup>b</sup>Reference 14. <sup>c</sup>Reference 15 and percentage of PEG 8K in buffer solution.

Table 2. Interfacial Energy between Continuous and Dispersed Phases at 23°C

Interface	$\gamma$ (mN/m)
Water/air	72.8
FC70/ethanol	6.7 ( $\pm 3.75\%$ )
FMS/PEG 0%	32.5 ( $\pm 2.39\%$ )
FMS/PEG 2.5%	21.5 ( $\pm 3.57\%$ )
FMS/PEG 5%	21.1 ( $\pm 2.7\%$ )
FMS/PEG 7.5%	20.9 ( $\pm 4.31\%$ )
FMS/PEG 10%	20.0 ( $\pm 3.51\%$ )

that Xu et al.<sup>18</sup> obtained with  $0.002 \leq Ca \leq 0.3$ . Our values of  $L/W$  measured for different total flow velocities  $u_{TOT}$  (sum of ethanol and FC70 oil flow velocities) lead to a scaling law that depends on  $Ca$  and channel diameter (Figure 5):  $L/W$  scales with  $Ca^{-4/3}$ . Therefore, depending on absolute values of  $u_D$  (implied in  $u_{TOT}$ ) and  $u_c$  (implied in  $Ca$  and  $u_{TOT}$ ), droplet length  $L$  can be smaller than ( $L/W < 1$ ), similar to ( $1 < L/W < 2$ ) or much larger than ( $L/W > 2$ ) the channel width  $W$ . In the case of  $L/W < 1$ , droplets are mobile in the continuous phase even when the channel is closed. Therefore, they can coalesce. When  $L/W > 2$ , droplets are called plugs.

**Crystallization.** To test our setup, we crystallized a biological macromolecule, rasburicase, in a viscous medium (see viscosities in Table 1). First, the microbatch method<sup>20</sup> was used for rapid screening of rasburicase crystallization conditions to determine the microfluidic experimental conditions. The conditions for this preliminary screening come from the work of Giffard et al.<sup>21</sup> Droplets were prepared by mixing the concentrated protein solution with the agent of crystallization or precipitant agent (PEG 8000 40%) in a 72-well microbatch plate (Hampton Research). Results are presented in Figure 6.

Since precipitation is observed as soon as the solutions are mixed for high concentrations of rasburicase ( $>8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) and high percentages of PEG ( $>7.5\%$ ), it is obviously essential to mix the protein and PEG solution and form droplets at the same time. This is a potential problem with microfluidic methods because precipitates tend to adhere to the walls of the channels and perturb or even obstruct the flow, with the consequent risk of clogging the channel, one of the major drawbacks in microfluidics.<sup>22,23</sup> Another problem with microfluidic methods is the effect of the change of scale on nucleation kinetics: the smaller the volume the longer the induction time, all things being equal. Thus, the “scale-down” requires

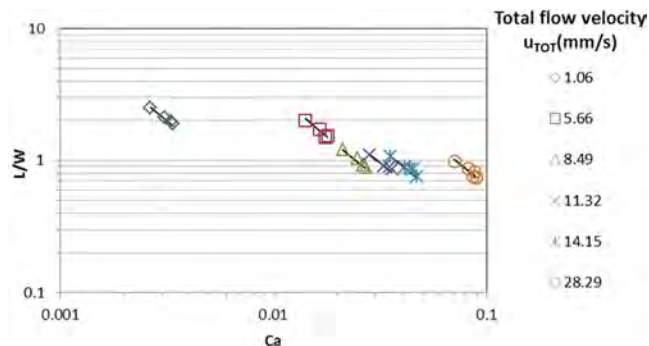


Figure 5. Evolution of  $L/W$  ratio versus  $Ca$  for different total flow velocities (mm/s) in a channel of 508  $\mu\text{m}$  diameter ( $W$ ). Lines represent data fitting with a  $Ca^{-4/3}$  law.

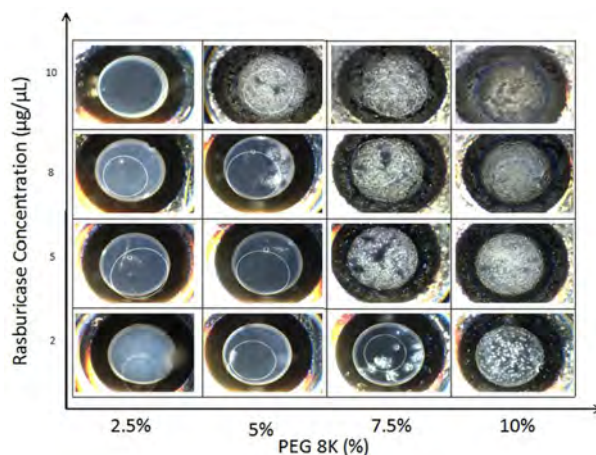


Figure 6. Rasburicase morphodrome in 10  $\mu\text{L}$  microbatch (protein concentration vs PEG concentration).

generation of higher supersaturation in the nanocrystallizers, with a risk of unwanted nucleation inside the syringe before droplet generation.

To avoid clogging and ensure higher supersaturation, we use a cross-shaped junction (Figure 2b) where the three fluids meet and mix at the intersection and generate droplets of reproducible composition (tested by off-line optical density measurement). The operating parameters ( $0.0057 \leq u_c \leq 0.8587 \text{ mm/s}$ ) were chosen so as to obtain  $1 \leq L/W \leq 2$ ,

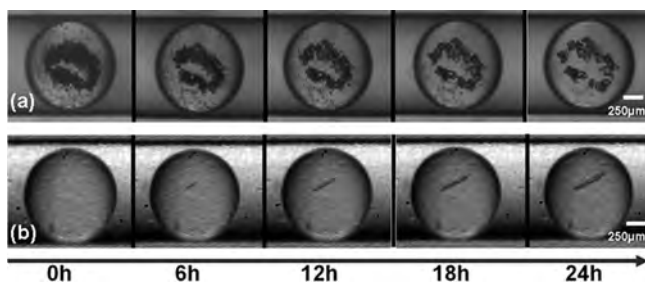
Table 3.  $Ca$  for Experimental Conditions of This Work (Channel Diameter of 508  $\mu\text{m}$ )

Oil	Dispersed phase	Flow rate of the continuous phase (oil) ( $\mu\text{L}/\text{h}$ )	$u_c$ (10 <sup>-3</sup> × (m/s))	$\mu_c$ (10 <sup>-2</sup> × kg/(m × s))	$\gamma$ (mN/m)	$Ca$ ( $\times 10^{-2}$ )
FC70	Ethanol	400	0.57	2.33	6.7	0.20
FC70	Ethanol	4000	5.66	2.33	6.7	1.97
FMS	PEG 0%	400	0.57	43.75	32.5	0.76
FMS	PEG 0%	4000	5.66	43.75	32.5	7.63
FMS	PEG 10%	400	0.57	43.75	20.0	1.24
FMS	PEG 10%	4000	5.66	43.75	20.0	12.40



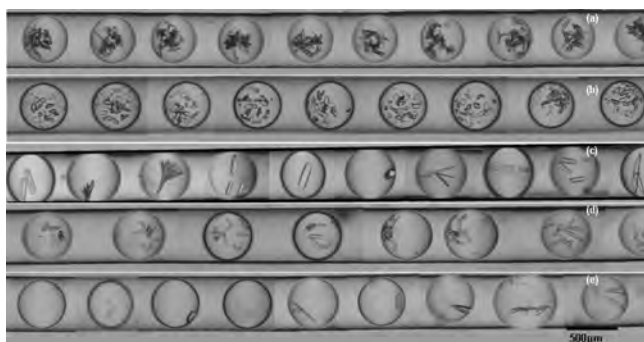
ensuring droplet homogeneity, for the following reasons. First, for long plugs of  $L/W > 2$  there is a risk of a concentration gradient inside the plug after nucleation because mass transfer occurs solely via diffusion. Second, when droplets are generated, shearing interactions between the two dispersed phases and the continuous phase causes the mixing of the PEG and protein solutions inside the droplet, which Tice et al.<sup>24</sup> demonstrate works better with shorter plugs.

Droplets are generated at room temperature and stored at 5 and 20 °C. For high supersaturated conditions (10% PEG 8K and 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase), precipitates appear at the moment of droplet formation, leading to crystals by the Ostwald ripening mechanism (Figure 7a).<sup>25</sup> We focused on exper-



**Figure 7.** Time sequence of droplets for 24 h storage. (a) 10% PEG, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 20 °C. (b) 7.5% PEG, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 20 °C. See also Supporting Information videos.

imental conditions where no precipitates appear, but which permit nucleation after a few hours. For instance, at a lower supersaturation (7.5% PEG 8K and 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase), transparent drops form without precipitates, leading to a single crystal (Figure 7b). Figure 8 shows crystals obtained under



**Figure 8.** Photos of crystals obtained in 65 nL droplets after 24 h. (a) 10% PEG, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 5 °C. (b) 10% PEG, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 20 °C. (c) 5% PEG, 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 5 °C. (d) 7.5% PEG, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 5 °C. (e) 7.5% de PEG, 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  rasburicase, at 20 °C.

different conditions, and Table 4 gives the representative statistical distribution of the number of crystals per droplet versus temperature for different protein concentrations. Only some of the 100–200 droplets per experimental condition are shown in Figure 8. Here the same conditions obviously produce different crystal habits and phases (the crystallization of a protein gives rise not to real polymorphs but to different crystalline phases of the same protein, because the different phases of the same protein have different compositions). It was previously shown in our laboratory that the different crystal habits of rasburicase correspond to two different phases.<sup>26</sup>

**Table 4.** Statistical Distribution of the Number of Crystals per Droplet versus Temperature for Different Protein Concentrations

Rasburicase conc (mg/mL)	PEG conc (%)	$\alpha$	temp (°C)	
			5	20
10	10	0	0	0
		1	0	0
		>1	100	100
		N	107	109
10	5	0	6.1	51.1
		1	51.1	15.6
		>1	42.8	33.3
		N	229	90 <sup>b</sup>
5	7.5	0	0	30.2
		1	0	20.7
		>1	100	49.1
		N	146	159

<sup>a</sup>0, 1 and >1 correspond to 0, 1 and more than 1 crystals per droplet in percentage and N the total number of droplets. <sup>b</sup>experiment in 100 nL plugs (Figure.S1).

These results, with the highly dispersed number and phases of crystals presented in Figure 8 and Table 4, highlight the importance of carrying out statistical studies through a large number of experiments per condition because of the stochasticity of nucleation. Statistically, each crystallization condition should be tested from 50 to 100 times in order to obtain a good confidence level and thus to decide whether the result (crystallization success rate) is positive or negative. This is the main problem with the conventional crystallization assay robots, where typically a few hundred different conditions are tested only 1 to 5 times each, leading often to false negative results or nonreproducible positive results.

## CONCLUSION

In this communication we present a simple and easy-to-use microfluidic setup for the crystallization of mineral, organic, and biological materials. The hydrodynamic properties of the setup are briefly presented, and then we test and validate this setup with viscous media by crystallizing a protein in an aqueous solution of PEG. We obtain nucleation data in nanocrystallizers of 65 and 100 nL. This study illustrates the importance of carrying out a large number of experiments per condition for statistical studies. Here, conditions are varied by a precise control of input flows of solute and crystallization medium. Future perspectives include screening crystallization conditions using this microfluidic setup.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Testing molecules.** The recombinant urate oxidase (Rasburicase) was supplied by Sanofi-Aventis without inhibitor in a phosphate buffer. The rasburicase was then purified by gel filtration chromatography on a Superdex S200PG system,<sup>21</sup> and concentrated by ultrafiltration on an Amicon cell to 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , in 0.05 M Tris buffer pH 7.5 containing 30 mM KCl. Series of PEG 8000 solution were prepared and used as agents of crystallization with concentrations in the range 2.5–10% w/v. Physical properties of the different phases are given in Table 1.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

Experiment in 100 nL plugs, and videos of Figure 7a (Ostwald ripening) and Figure 7b (Nucleation and growth) (AVI). The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00122.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

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

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marjorie Sweetko for English revision. We thank Région PACA and C'Nano PACA for financial support. We thank Dr. M. El-Hajji (Sanofi) for the rasburicase and Minh Phat La, B. Benhaim, T. Bactivelane (CINaM), and Mr. Audiffren (ANACRISMAT) for technical assistance.

## ■ REFERENCES

- (1) Stevens, R. C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 558–563.
- (2) Morissette, S. L.; Soukasene, S.; Levinson, D.; Cima, M. J.; Almarsson, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 2180–2184.
- (3) Leng, J.; Salmon, J. B. *Lab Chip* **2009**, *9*, 24–34.
- (4) Squires, T. M.; Quake, S. R. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 977.
- (5) Lorber, N.; Sarrazin, F.; Guillot, P.; Panizza, P.; Colin, A.; Pavageau, B.; Hany, C.; Maestro, P.; Marre, S.; Delclos, T.; Aymonier, C.; Subra, P.; Prat, L.; Gourdon, C.; Mignard, E. *Lab Chip* **2011**, *11*, 779–787.
- (6) Laval, P.; Salmon, J.-B.; Joanicot, M. J. *Cryst. Growth* **2007**, *303*, 622–628.
- (7) Li, L.; Ismagilov, R. F. *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 139–158.
- (8) Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4163–4166.
- (9) Dombrowski, R. D.; Litster, J. D.; Wagner, N. J.; He, Y. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 4802–4810.
- (10) Nisisako, T.; Torii, T.; Higuchi, T. *Lab Chip* **2002**, *2*, 24–26.
- (11) Ildefonso, M.; Candoni, N.; Veessler, S. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 556–560.
- (12) Rodríguez-Ruiz, I.; Veessler, S.; Gómez-Morales, J.; Delgado-López, J. M.; Grauby, O.; Hammadi, Z.; Candoni, N.; García-Ruiz, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2014**, *14*, 792–802.
- (13) Bukiet, F.; Couderc, G.; Camps, J.; Tassery, H.; Cuisinier, F.; About, I.; Charrier, A.; Candoni, N. *J. Endodontics* **2012**, *38*, 1525–1529.
- (14) Ninni, L.; Burd, H.; Fung, W. H.; Meirelles, A. J. A. *J. Chem. Eng. Data* **2003**, *48*, 324–329.
- (15) Gonzalez-Tello, P.; Camacho, F.; Blazquez, G. J. *Chem. Eng. Data* **1994**, *39*, 611–614.
- (16) Cristini, V.; Tan, Y.-C. *Lab Chip* **2004**, *4*, 257–264.
- (17) Garstecki, P.; Fuerstman, M. J.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. *Lab Chip* **2006**, *6*, 437–446.
- (18) Xu, J. H.; Li, S. W.; Tan, J.; Luo, G. S. *Microfluid Nanofluid* **2008**, *5*, 711–717.
- (19) Baroud, C. N.; Gallaire, F.; Dangla, R. *Lab Chip* **2010**, *10*, 2032–2045.
- (20) Ducruix, A.; Giégé, R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins A Practical Approach*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, 1999; p 460.
- (21) Giffard, M.; Colloc'h, N.; Ferté, N.; Castro, B.; Bonneté, F. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4220–4226.
- (22) Poe, S. L.; Cummings, M. A.; Haaf, M. P.; McQuade, D. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1544–1548.

(23) Zheng, B.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11170–11171.

(24) Tice, J. D.; Song, H.; Lyon, A. D.; Ismagilov, R. F. *Langmuir* **2003**, *19*, 9127–9133.

(25) Candoni, N.; Grossier, R.; Hammadi, Z.; Morin, R.; Veessler, S. *Protein Pept. Lett.* **2012**, *19*, 714–724.

(26) Vivares, D.; Veessler, S.; Astier, J. P.; Bonneté, F. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 287–292.

# Conclusions générales

Cette thèse a pour objectif de développer une plateforme microfluidique polyvalente, compatible à tout solvant et toute molécule, pour l'étude fondamentale de la nucléation et de la croissance et pour le criblage rapide des conditions de cristallisation. Cette approche microfluidique est basée sur la génération par centaines/milliers de gouttes identiques de volume nanométrique qui sont autant de nano-cristallisoirs, tout en consommant très peu de matière et en visant une bonne statistique. Etant la suite du travail de Manuel Ildefonso (Ildefonso *et al.*, 2013) sur la faisabilité de cette méthode pour étudier les paramètres de cristallisation, ma thèse s'est focalisée sur le développement de la plateforme microfluidique. Nous avons comme objectif de maîtriser la taille et la composition des gouttes, de valider le système microfluidique pour tous les solvants et toutes les molécules d'intérêt et de rendre le système modulable et facile à utiliser même pour des non-spécialistes.

Les trois parties principales du travail qui a été réalisé au cours de ma thèse sont présentées dans ce manuscrit :

- l'étude hydrodynamique qui a pour but de contrôler la forme et la fréquence des gouttes ;
- la caractérisation de la composition chimique des gouttes ;
- la cristallisation en microfluidique d'une protéine dans un milieu visqueux.

L'étude hydrodynamique a été réalisée dans un premier temps. L'objectif est de maîtriser les paramètres de forme et de fréquence des gouttes afin de réaliser des expériences reproductibles et stables pour la mise au point d'une approche statistique des expériences de cristallisation à base de gouttes, en réduisant le volume mis en jeu. L'étude hydrodynamique a été abordée en générant les gouttes par la méthode de cross-flowing dans une jonction en T avec des canaux et des capillaires circulaires de 500 $\mu$ m et 1mm de diamètre interne.

- Nous avons d'abord étudié les caractéristiques des gouttes qui jouent sur la reproductibilité et la stabilité des expériences.
- Nous avons décrit les propriétés des phases et des écoulements qui peuvent avoir une influence sur les caractéristiques des gouttes.
- Nous avons comparé les résultats expérimentaux en 3D et numériques en 2D concernant le régime des gouttes et les paramètres influant ces régimes. Trois régimes de gouttes sont observés dans les expériences et les simulations. La transition entre les régimes « squeezing » et « dripping » est affectée par le nombre capillaire,  $Ca$ , et celle entre les régimes « dripping » et « jetting » est affectée par la vitesse totale,  $v_{TOT}$ .

Il est à remarquer que nous avons observé, pour la première fois à notre connaissance, que le régime « jetting » était influencé par  $v_{TOT}$ .

- Enfin nous avons élaboré des lois de comportement permettant de contrôler les caractéristiques des gouttes. Nous avons défini la zone de travail qui permettrait d'obtenir des gouttes bien mélangées et donc proche de la forme sphérique tout en évitant leur coalescence. Pour cela nous avons établi des relations empiriques de la forme et de la fréquence des gouttes avec la vitesse totale, le rapport des vitesses des phases et le nombre capillaire.

Pour la deuxième partie du travail – la caractérisation de la composition chimique des gouttes - Il s'agit de l'analyse des gouttes par la mesure de l'absorbance en « off line » (hors ligne) et en « on line » (en ligne). Le but est de rendre notre système microfluidique plus modulable pour effectuer un criblage en ligne.

- Nous avons d'abord réalisé une tâche fastidieuse de caractérisation « off-line » en récoltant les gouttes une par une et en mesurant la composition chimique de chaque goutte. Cette analyse « off-line » a pour but de déterminer le temps de mise à l'équilibre du système par rapport aux gradients de débits programmés sur les pousse-seringues. Nous avons observé un temps de mise à l'équilibre correspondant à  $\sim 20s$  quels que soient les débits employés. On a aussi vérifié que le profil de gradient est bien synchronisé pour les deux pousse-seringues de phases dispersées et que l'on retrouve bien ce gradient de concentration au niveau de la composition chimique des gouttes formées.
- Ensuite, nous avons mis au point le troisième module de notre montage microfluidique - la caractérisation en ligne de la composition des gouttes - en intégrant une cellule UV de type « porte-capillaire » que j'ai développée. L'optimisation des mesures est effectuée en analysant le domaine de linéarité de la loi de Beer-Lambert et en étudiant l'effet de la lumière parasite. Enfin on a réalisé la caractérisation en ligne pour une série de gouttes avec la même composition chimique ainsi que pour un train de gouttes présentant un gradient de concentration créé en variant les débits des phases dispersées. La mesure en ligne de la composition chimique des gouttes est validée avec le lysozyme pour des concentrations allant jusqu'à 25mg/mL. De même nous montrons que notre système peut caractériser qualitativement le gradient de concentration obtenu par le mélange deux solutions.

Dans la dernière partie du travail - l'étude de la cristallisation - nous avons présenté une application du dispositif microfluidique développé dans ma thèse. Au laboratoire, la jonction en PEEK et les capillaires en Téflon que nous utilisons ont déjà permis de cristalliser diverses molécules dans des solvants organiques et aqueux (Ildefonso, Revalor, *et al.*, 2012). Pour valider la polyvalence de notre système, il restait alors à confirmer la possibilité de cristalliser dans un milieu visqueux. C'est ainsi que dans ma thèse, j'ai étudié la cristallisation de la rasburicase dans une solution aqueuse de PEG 8k (agent de cristallisation) en variant les conditions de viscosité. Pour cela, nous avons commencé par un criblage rapide des conditions de cristallisation avec la méthode de microbatch® afin d'estimer la solubilité et de déterminer la zone sans cristaux, la zone de nucléation spontanée et la zone de « précipitation ». Pour les expériences en microfluidique, nous nous sommes basés sur les résultats de la caractérisation des gouttes en termes de forme (§5.1) et de composition (§5.2). Afin d'assurer l'homogénéité de la forme et de la composition chimique des gouttes, le montage microfluidique a été testé suivant la ou les géométries de la ou les jonctions associées pour générer les gouttes. Ensuite, la caractérisation en ligne est mise en œuvre pour valider le système. L'observation de la nucléation et de la croissance au cours de l'incubation a été faite pour différentes conditions de sursaturation dans les gouttes. On a remarqué qu'une même condition expérimentale peut produire un nombre de cristaux et de faciès différents. Enfin, la distribution statistique du nombre de cristaux par goutte a été étudiée en fonction de la température et des concentrations en rasburicase et en PEG.

Pour conclure, nous avons développé un système microfluidique pour lequel on connaît des lois de comportement lors de la génération des gouttes. Avec ces lois, un flux de gouttes de forme stable, reproductible et favorable pour des expériences de cristallisation peut être généré en contrôlant les débits des phases (§5.1). La composition chimique des gouttes en circulation et l'influence d'un gradient de débit sur la concentration peuvent être analysées qualitativement avec le module de caractérisation en ligne que l'on a couplé au système microfluidique au cours de cette thèse (§5.2). Enfin, en se basant sur les résultats de la caractérisation des gouttes en termes de forme (§5.1) et de composition (§5.2), nous avons pu valider la polyvalence de notre dispositif microfluidique et confirmer la possibilité de cristalliser dans un milieu visqueux (§5.3).

Pour les études futures à envisager, je présente les perspectives à court et long termes pour les trois parties de mon travail,

- Pour l'étude hydrodynamique, comme le nombre capillaire  $Ca$  dépend de la viscosité et de la tension interfaciale, l'influence des propriétés physiques des phases sur la forme des gouttes  $L/W$  est à étudier à la

suite de ce travail, pour confirmer la validité des lois empiriques obtenues au cours de ma thèse. La simulation en 2D est à développer en élargissant la gamme de débits employés et en changeant le diamètre interne du canal (par exemple 500 $\mu\text{m}$  et 150 $\mu\text{m}$ ), afin d'obtenir plus de détails sur les régimes de gouttes et de déterminer la loi empirique d'échelle en 2D. A plus long terme, la loi d'échelle obtenue est à tester pour d'autres géométries (comme les jonctions en croix et en multi entrées/sorties) et d'autres phases (comme les solvants aqueux ou visqueux) qui peuvent être employées dans l'étude de la cristallisation.

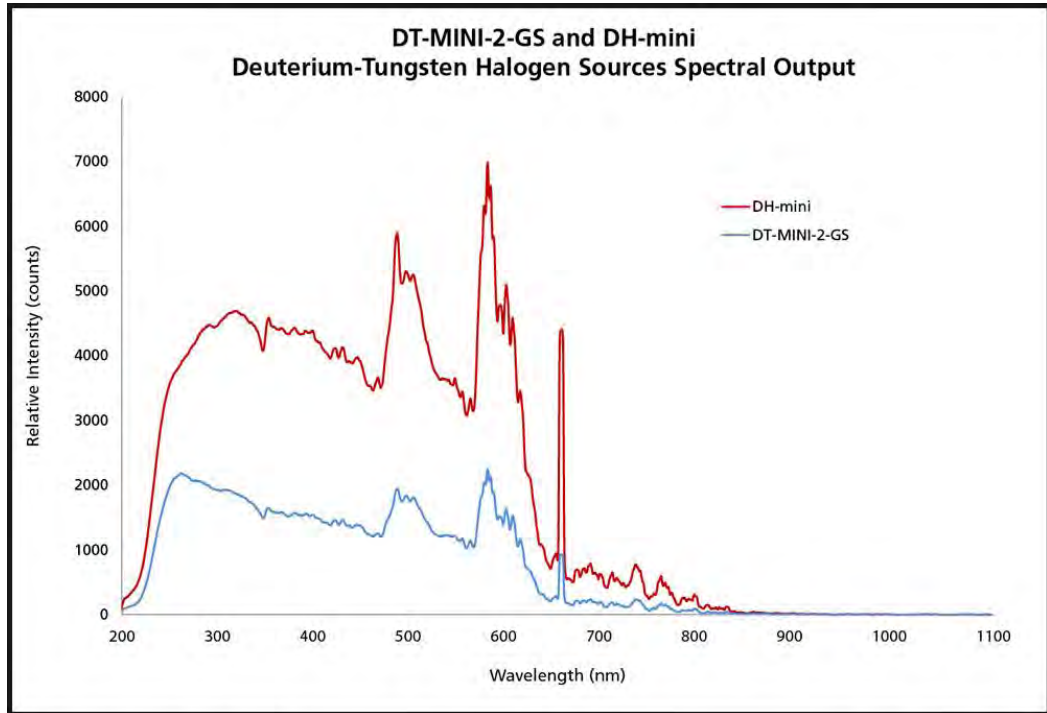
- Pour la caractérisation des gouttes, le module optique que l'on a développé est à améliorer pour optimiser les mesures. Du fait de la faible efficacité de la source de lumière DT-MINI-2-GS en dessous de 280nm, on peut le changer par une DH-mini qui est plus efficace à 280nm. Le changement du faisceau optique ou le changement du matériau de la paroi des capillaires sont également des voies à explorer pour obtenir un bon ratio signal/bruit. A plus long terme, la détection en ligne des gouttes dans un capillaire de diamètre interne plus petit (par exemple 150 $\mu\text{m}$  qui donne des gouttes de  $\sim 1\text{nL}$ ) est à réaliser, afin de minimiser encore la matière consommée tout en conservant l'apport des études statistiques.
- Pour l'étude en général de la cristallisation en microfluidique, un criblage avec un gradient des différentes conditions de cristallisation est à développer en intégrant la caractérisation en ligne et les résultats obtenus en §5.2. La fréquence de nucléation peut alors être déterminée en microfluidique en utilisant la méthode du « double pulse ». La cristallisation dans des gouttes de volume plus faible ( $\sim 1\text{nL}$ ) sera à explorer.

Enfin, dans le but de rendre notre système modulable, d'autres techniques de caractérisation en ligne peuvent aussi être intégrées: SAXS, WAXS, DRX, Raman...



# Annexe

# 1. Calibration de l'indensité de la source de lumière DT-MINI-2GS et DH-mini.



# Bibliographie

- A. Pellegrini, U. T., R. Fellenberg, P. Wild, (1992). *Journal of Applied Microbiology* **72**, 180-187.
- Akella, S. V., Mowitz, A., Heymann, M. & Fraden, S. (2014). *Crystal Growth & Design* **14**, 4487-4509.
- Anna, S. L., Bontoux, N. & Stone, H. A. (2003). *Applied Physics Letters* **82**, 364-366.
- Asherie, N., Lomakin, A. & Benedek, G. B. (1996). *Physical Review Letters* **77**, 4832-4835.
- Astier, J.-P. & Veessler, S. (2008). *Crystal Growth & Design* **8**, 4215-4219.
- Ataka, M. & Asai, M. (1988). *Journal of Crystal Growth* **90**, 86-93.
- Baroud, C. N., Gallaire, F. & Dangla, R. (2010). *Lab on a Chip* **10**, 2032-2045.
- Bayol, A., Dupin, P., Boe, J. F., Claudy, P. & Létoffé, J. M. (1995). *Biophysical Chemistry* **54**, 229-235.
- Berthier, J. & Brakke, K. A. (2012). *The Physics of Microdroplets*, pp. 83-103: John Wiley & Sons, Inc.
- Boistelle, R. (1985). *Flammarion Médecine Science Paris*, 159-202.
- Boistelle, R., Astier, J. P., Marchis-Mouren, G., Desseaux, V. & Haser, R. (1992). *Journal of Crystal Growth* **123**, 109-120.
- Candoni, N., Grossier, R., Hammadi, Z., Morin, R. & Veessler, S. (2012). *Protein and Peptide Letters* **19**, 714-724.
- Candoni, N., Hammadi, Z., Grossier, R., Ildefonso, M., Revalor, E. & Ferté, N. (2012). *International Journal of Nanotechnology* **9**, 439-459.
- Chayen, N. (1998). *Acta Crystallographica Section D* **54**, 8-15.
- Chayen, N. E. (2005). *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **88**, 329-337.
- Chayen, N. E. & Saridakis, E. (2008). *Nat Meth* **5**, 147-153.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D. & Blow, D. M. (1992). *Journal of Crystal Growth* **122**, 176-180.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D., Maeder, D. L. & Blow, D. M. (1990). *Journal of Applied Crystallography* **23**, 297-302.
- Christopher, G. F. & Anna, S. L. (2007). *Journal of Physics D: Applied Physics* **40**, R319.
- Christopher, G. F., Noharuddin, N. N., Taylor, J. A. & Anna, S. L. (2008). *Physical Review E* **78**, 036317.
- Colloc'h, N., Hajji, M. E., Bachet, B., L'Hermite, G., Schiltz, M., Prange, T., Castro, B. & Mornon, J.-P. (1997). *Nat Struct Mol Biol* **4**, 947-952.
- De Menech, M., Garstecki, P., Jousse, F. & Stone, H. A. (2008). *Journal of Fluid Mechanics* **595**, 141-161.
- Dhouib, K., Khan Malek, C., Pfleging, W., Gauthier-Manuel, B., Duffait, R., Thuillier, G., Ferrigno, R., Jacquamet, L., Ohana, J., Ferrer, J.-L., Theobald-Dietrich, A., Giege, R., Lorber, B. & Sauter, C. (2009). *Lab on a Chip* **9**, 1412-1421.

- Drenth, J. & Haas, C. (1998). *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 867.
- Du, W., Li, L., Nichols, K. P. & Ismagilov, R. F. (2009). *Lab on a Chip* **9**, 2286-2292.
- Erdemir, D., Lee, A. Y. & Myerson, A. S. (2009). *Accounts of Chemical Research* **42**, 621-629.
- Erlandsen, S. L., Parsons, J. A. & Taylor, T. D. (1974). *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 401-413.
- Evans, R. M. L., Poon, W. C. K. & Cates, M. E. (1997). *EPL (Europhysics Letters)* **38**, 595.
- Filobelo, L. F., Galkin, O. & Vekilov, P. G. (2005). *The Journal of Chemical Physics* **123**, 014904.
- Fletcher, N. H. (1958). *The Journal of Chemical Physics* **29**, 572-576.
- Gad-el-Hak, M. (2005). *MEMS: Introduction and Fundamentals*. CRC Press.
- Galkin, O. & Vekilov, P. G. (1999). *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, 10965-10971.
- Galkin, O. & Vekilov, P. G. (2000). *Journal of the American Chemical Society* **122**, 156-163.
- Galante, A. M. S., Galante, O. L. & Campos, L. L. (2010). Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment **619**, 177-180.
- Gañán-Calvo, A. M. (2004). *Physical Review E* **69**, 027301.
- Gañán-Calvo, A. M. & Gordillo, J. M. (2001). *Physical Review Letters* **87**, 274501.
- García-Ruiz, J. M. (2003). *Methods in Enzymology*, edited by Charles W. Carter, Jr. & M. S. Robert, pp. 130-154: Academic Press.
- Garcia-Ruiz, J. M. & Moreno, A. (1994). *Acta Crystallographica Section D* **50**, 484-490.
- Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A. & Whitesides, G. M. (2006). *Lab on a Chip* **6**, 437-446.
- Garstecki, P., Stone, H. A. & Whitesides, G. M. (2005). *Physical Review Letters* **94**, 164501.
- Gavira, J. A., Toh, D., Lopez-Jaramillo, J., Garcia-Ruiz, J. M. & Ng, J. D. (2002). *Acta Crystallographica Section D* **58**, 1147-1154.
- Georgalis, Y., Umbach, P., Raptis, J. & Saenger, W. (1997). *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **53**, 691.
- Gerds, C. J., Tereshko, V., Yadav, M. K., Dementieva, I., Collart, F., Joachimiak, A., Stevens, R. C., Kuhn, P., Kossiakoff, A. & Ismagilov, R. F. (2006). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **45**, 8156-8160.
- Gibbs, J. W. (1876). *Trans. Connect. Acad. Sci.* **3**, 108-248.
- Gibbs, J. W. (1878). *Trans. Connect. Acad. Sci.* **16**, 343-524.
- Giffard, M., Bonnete, F., Castro, B., Université, d. A.-M., II & Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la, S. (2009). thesis, [s.n.], [S.l.].
- Giffard, M., Colloc'h, N., Ferté, N., Castro, B. & Bonneté, F. (2008). *Crystal Growth & Design* **8**, 4220-4226.

- Glawdel, T., Elbuken, C. & Ren, C. L. (2012a). *Physical Review E* **85**, 016322.
- Glawdel, T., Elbuken, C. & Ren, C. L. (2012b). *Physical Review E* **85**, 016323.
- Gonzalez-Tello, P., Camacho, F. & Blazquez, G. (1994). *Journal of Chemical & Engineering Data* **39**, 611-614.
- Grossier, R., Hammadi, Z., Morin, R., Magnaldo, A. & Veessler, S. (2011). *Applied Physics Letters* **98**, 091916.
- Grossier, R., Magnaldo, A. & Veessler, S. (2010). *Journal of Crystal Growth* **312**, 487-489.
- Grossier, R. & Veessler, S. (2009). *Crystal Growth & Design* **9**, 1917-1922.
- Grouazel, S., Bonneté, F., Astier, J.-P., Ferté, N., Perez, J. & Veessler, S. (2006). *The Journal of Physical Chemistry B* **110**, 19664-19670.
- Guillot, P. (2011). thesis, Université Paris-Est.
- Guillot, P., Colin, A., Utada, A. S. & Ajdari, A. (2007). *Physical Review Letters* **99**, 104502.
- Gupta, A. & Kumar, R. (2010). *Physics of Fluids (1994-present)* **22**, 122001.
- H. Jentsch, R. P., G. Kundt, R. Göcke, (2003). *Journal Of Clinical Periodontology* **30**, 159-164.
- Hampel, A., Labanauskas, M., Connors, P. G., Kirkegard, L., RajBhandary, U. L., Sigler, P. B. & Bock, R. M. (1968). *Science* **162**, 1384-1387.
- Hansen, C. & Quake, S. R. (2003). *Current Opinion in Structural Biology* **13**, 538-544.
- Hansen, C. L., Skordalakes, E., Berger, J. M. & Quake, S. R. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16531-16536.
- Hansen, C. L., Sommer, M. O. A. & Quake, S. R. (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14431-14436.
- Heymann, M., Ophalage, A., Wierman, J. L., Akella, S., Szebenyi, D. M. E., Gruner, S. M. & Fraden, S. (2014). *IUCrj* **1**, 349-360.
- Igarashi, K., Azuma, M., Kato, J. & Ioshima, H. (2006). *J. Cryst. Growth* **204**, 181.
- Ildefonso, M., Candoni, N. & Veessler, S. (2011). *Crystal Growth & Design* **11**, 1527-1530.
- Ildefonso, M., Candoni, N. & Veessler, S. (2012a). *Organic Process Research & Development* **16**, 556-560.
- Ildefonso, M., Candoni, N. & Veessler, S. (2012b). *Organic Process Research & Development* **16**, 556-560.
- Ildefonso, M., Candoni, N. & Veessler, S. (2013). *Crystal Growth & Design* **13**, 2107-2110.
- Ildefonso, M., Revalor, E., Punniam, P., Salmon, J. B., Candoni, N. & Veessler, S. (2012). *Journal of Crystal Growth* **342**, 9-12.
- Ismagilov, R. F., Stroock, A. D., Kenis, P. J. A., Whitesides, G. & Stone, H. A. (2000). *Applied Physics Letters* **76**, 2376-2378.
- Jean-Marc, B., Pascual, F., Alain, B., Gérard, L., René, C., Françoise, L. & Denis, L. (2005). *Directory of Therapeutic Enzymes*, pp. 159-178: CRC Press.

- Kashchiev, D. (2000a). *Nucleation*, edited by D. Kashchiev, pp. 45-57. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Kashchiev, D. (2000b). *Nucleation*, edited by D. Kashchiev, pp. 174-177. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Kashchiev, D., Kaneko, N. & Sato, K. (1998). *Journal of Colloid and Interface Science* **208**, 167-177.
- Kashchiev, D. & van Rosmalen, G. M. (2003). *Crystal Research and Technology* **38**, 555-574.
- Kashchiev, D., Verdoes, D. & van Rosmalen, G. M. (1991). *Journal of Crystal Growth* **110**, 373-380.
- Kim, S. H., Quigley, G., Suddath, F. L., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J. J., Weinzierl, J. & Rich, A. (1973). *Journal of Molecular Biology* **75**, 421-428.
- Knezic, D., Zaccaro, J. & Myerson, A. S. (2004). *The Journal of Physical Chemistry B* **108**, 10672-10677.
- Kracek, F. C. (1929). *The Journal of Physical Chemistry* **34**, 225-247.
- Lafferrère, L., Hoff, C. & Veessler, S. (2004). *Crystal Growth & Design* **4**, 1175-1180.
- Lau B. T. C., Baitz C. A., Dong X. P., and Hansen C. L. (2007) *Journal of the American Chemical Society* **129**, 454-455
- Laval, P., Crombez, A. & Salmon, J.-B. (2009). *Langmuir* **25**, 1836-1841.
- Laval, P., Giroux, C., Leng, J. & Salmon, J.-B. (2008). *Journal of Crystal Growth* **310**, 3121-3124.
- Laval, P., Lisai, N., Salmon, J.-B. & Joanicot, M. (2007). *Lab on a Chip* **7**, 829-834.
- Lee, A. Y., Lee, I. S. & Myerson, A. S. (2006). *Chemical Engineering & Technology* **29**, 281-285.
- Legrand, L., Ries-Kautt, M. & Robert, M. C. (2002). *Acta Crystallographica Section D* **58**, 1564-1567.
- Leng, J. & Salmon, J.-B. (2009). *Lab on a Chip* **9**, 24-34.
- Li, L. & Ismagilov, R. F. (2010). *Annual Review of Biophysics* **39**, 139-158.
- Lide, D. R. (1998). *CRC handbook of chemistry and physics, 1998-1999*. Boca Raton: CRC Press.
- Liu, H. & Zhang, Y. (2009a). *Journal of Applied Physics* **106**, 034906.
- Liu, H. & Zhang, Y. (2009b). *Journal of Applied Physics* **106**, -.
- Liu, X. Y. (2000). *Langmuir* **16**, 7337-7345.
- Mangin, D., Puel, F. & Veessler, S. (2009). *Organic Process Research & Development* **13**, 1241-1253.
- McCrone, W. C. (1965). **2**.



- McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McPherson, A., Jr. (1976). *Methods of biochemical analysis* **23**, 249-345.
- McPherson, A. & Shlichta, P. (1988). *Science* **239**, 385-387.
- Mullin, J. W. (2001). *Crystallization (Fourth Edition)*, edited by J. W. Mullin, pp. 181-215. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Ng, J. D., Gavira, J. A. & García-Ruíz, J. M. (2003). *Journal of Structural Biology* **142**, 218-231.
- Nimmo, J. K. & Lucas, B. W. (1976). *Acta Crystallographica Section B* **32**, 1968-1971.
- Ninni, L., Burd, H., Fung, W. H. & Meirelles, A. J. A. (2003). *Journal of Chemical & Engineering Data* **48**, 324-329.
- Penkova, A., Chayen, N., Saridakis, E. & Nanev, C. N. (2002). *Acta Crystallographica Section D* **58**, 1606-1610.
- Pinker, F., Brun, M., Morin, P., Deman, A.-L., Chateaux, J.-F., Oliéric, V., Stirnimann, C., Lorber, B., Terrier, N., Ferrigno, R. & Sauter, C. (2013). *Crystal Growth & Design* **13**, 3333-3340.
- Pontoni, D., Narayanan, T. & Rennie, A. R. (2004). *Prog. Colloid Polym. Sci.* **123**, 227.
- Revalor, E. (2009). thesis, Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III.
- Rodríguez-Ruiz, I., Hammadi, Z., Grossier, R., Gómez-Morales, J. & Veessler, S. (2013). *Langmuir* **29**, 12628-12632.
- Rupp, B. (2003). *Accounts of Chemical Research* **36**, 173-181.
- Salemme, F. R. (1972). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **151**, 533-539.
- Saridakis, E., Dierks, K., Moreno, A., Dieckmann, M. W. M. & Chayen, N. E. (2002). *Acta Crystallographica Section D* **58**, 1597-1600.
- Sato, K. (1993). *Journal of Physics D: Applied Physics* **26**, B77.
- Song, H., Tice, J. D. & Ismagilov, R. F. (2003). *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 768-772.
- Spada, S. W., G (2005). *Directory of approved biopharmaceutical products*. USA: CRC press.
- Squires, T. M. & Quake, S. R. (2005). *Reviews of Modern Physics* **77**, 977-1026.
- Stevens, R. C. (2000). *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 558-563.
- Stone, H. (2007). *CMOS Biotechnology*, edited by H. Lee, R. Westervelt & D. Ham, pp. 5-30: Springer US.
- Stone, H. A., Stroock, A. D. & Ajdari, A. (2004). *Annual Review of Fluid Mechanics* **36**, 381-411.
- Su, Y.-F., Kim, H., Kovenklioglu, S., Lee W.Y., (2007) *Journal of Solid State Chemistry*, 180, Issue 9, 2625-2629.

- Tate, T. (1864). *Philosophical Magazine Series 4* **27**, 176-180.
- Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H. & Quake, S. R. (2001). *Physical Review Letters* **86**, 4163-4166.
- Tice, J. D., Lyon, A. D. & Ismagilov, R. F. (2004). *Analytica Chimica Acta* **507**, 73-77.
- Tice, J. D., Song, H., Lyon, A. D. & Ismagilov, R. F. (2003). *Langmuir* **19**, 9127-9133.
- Trivedi, V., Doshi, A., Kurup, G. K., Ereifej, E., Vandevord, P. J. & Basu, A. S. (2010). *Lab on a Chip* **10**, 2433-2442.
- Umbanhowar, P. B., Prasad, V. & Weitz, D. A. (2000). *Langmuir* **16**, 347-351.
- Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Stone, H. A. & Weitz, D. A. (2007). *Physical Review Letters* **99**, 094502.
- van der Woerd, M., Ferree, D. & Pusey, M. (2003). *Journal of Structural Biology* **142**, 180-187.
- van Steijn, V., Kleijn, C. R. & Kreutzer, M. T. (2010). *Lab on a Chip* **10**, 2513-2518.
- Veesler, S., Lafferrère, L., Garcia, E. & Hoff, C. (2003). *Organic Process Research & Development* **7**, 983-989.
- Veesler, S. M., Denis; Puel, Francois (2005). *Polymorphisme et Transition de Phases Solides en Solution*. Ed. Techniques Ingénieur.
- Vekilov, P. G. (2004). *Crystal Growth & Design* **4**, 671-685.
- Vivarès, D., Belloni, L., Tardieu, A. & Bonneté, F. (2002). *Eur. Phys. J. E* **9**, 15-25.
- Vivares, D. & Bonneté, F. (2002). *Acta Crystallographica Section D* **58**, 472-479.
- Vivares, D., Kaler, E. W. & Lenhoff, A. M. (2005). *Acta Crystallographica Section D* **61**, 819-825.
- Vivares, D., Veesler, S., Astier, J.-P. & Bonneté, F. (2006). *Crystal Growth & Design* **6**, 287-292.
- Wehking, J., Gabany, M., Chew, L. & Kumar, R. (2014). *Microfluid Nanofluid* **16**, 441-453.
- Wiggins, S. & Ottino, J. M. (2004). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **362**, 937-970.
- Wolde, P. R. t. & Frenkel, D. (1997). *Science* **277**, 1975-1978.
- Xu, J. H., Li, S. W., Tan, J. & Luo, G. S. (2008). *Microfluid Nanofluid* **5**, 711-717.
- Xu, J. H., Li, S. W., Tan, J., Wang, Y. J. & Luo, G. S. (2006). *AIChE Journal* **52**, 3005-3010.
- Young, H. D. (1962). *Statistical treatment of experimental data*.
- Zagnoni, M., Anderson, J. & Cooper, J. M. (2010). *Langmuir* **26**, 9416-9422.
- Zhao, C.-X. & Middelberg, A. P. J. (2011). *Chemical Engineering Science* **66**, 1394-1411.
- Zheng, B., Tice, J. D., Roach, L. S. & Ismagilov, R. F. (2004). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **43**, 2508-2511.

