

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Discipline : Science du vivant

Domaine : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Kaouthar Dhouib

Mise au point de dispositifs microfluidiques pour la cristallisation et l'analyse cristallographique des biomolécules

Soutenue le 14 octobre 2009 devant la commission d'examen

Mme Chantal Abergel

M. Jean-Pierre Samama

M. Andrew Griffiths

M. Richard Giegé

M. Claude Sauter

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements	7
1 Introduction : Cristallisation et Microfluidique	9
1.1 Introduction générale	9
1.2 Vue d'ensemble de la cristallisation des macromolécules biologiques	11
1.2.1 L'intérêt des études cristallographiques	11
1.2.2 Cristallisation et cristallogenèse	14
1.2.3 La cristallisation : étape limitante d'une étude cristallographique	15
1.2.4 Diagramme de phase	18
1.2.5 Étapes de la cristallisation	19
1.2.6 Les méthodes de cristallisation	22
1.2.7 Caractérisation de la qualité cristalline	27
1.3 Cristallisation en milieux diffusifs	28
1.3.1 Cristallisation en milieux diffusifs et perfection cristalline	29
La convection comme mode de transport	29
La diffusion comme mode de transport	30
Cristallisation en microgravité	30
Cristallisation en gel	31
1.3.2 Cristallisation en milieu diffusif par la méthode de contre-diffusion	32
1.3.3 Les systèmes miniaturisés ou de microcristallisation	33
1.4 La microfluidique : un outil pour la cristallographie des biomolécules	33
1.4.1 La microfluidique : champ scientifique et technologique émergent	35
1.4.2 Les phénomènes physiques résultant de la miniaturisation	36
1.4.3 Exemples d'applications microfluidiques dans les sciences du vivant	38

1.4.4	Microfluidique et cristallisation des macromolécules biologiques	43
	De la robotique à la microfluidique	43
	La diffusion à l'interface comme méthode de cristallisation	44
	Le « batch » comme méthode de cristallisation	46
	Article1 « From macrofluidics to microfluidics for the crystallization of biological macromolecules »	46
1.5	Contributions de mon travail de thèse	52
2	Puces microfluidiques : Idées, réalisations, validation	55
2.1	Introduction	55
2.1.1	Pourquoi la microfluidique	55
2.1.2	Notre concept de puce multifonctionnelle	56
2.1.3	Principe de fonctionnement des puces	56
2.2	La première génération de dispositif en PDMS lithographie	57
2.2.1	Géométrie	57
2.2.2	Prototypage rapide	57
2.2.3	Remplissage des dispositifs	58
2.2.4	Protocole du remplissage	60
2.2.5	Choix du motif	60
2.2.6	Cristallisation et observation des cristaux	61
2.2.7	Analyse cristallographique <i>in situ</i>	61
2.2.8	Bilan	63
2.3	Sélection des matériaux	64
2.3.1	Absorption théorique	65
2.3.2	Analyses aux rayons X	66
2.4	Conception de nouvelles séries de prototypes en matériaux peu absorbants . . .	69
2.4.1	Matériaux et modes de fabrication	69
2.4.2	Contrôle de l'état de surface	70
2.4.3	Remplissage	71
2.4.4	Cristallisation et analyse aux rayons X	71
2.4.5	Article 2 « Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis »	72

2.4.6	Bilan	83
2.5	Optimisation de la géométrie et de l'ergonomie des dispositifs microfluidiques .	84
2.5.1	Nouveau cahier des charges	84
2.5.2	Difficultés pratiques et solutions techniques	84
2.5.3	Réalisation des nouvelles puces	87
3	Application de la croissance cristalline en gel	95
3.1	Étude structurale de l'Aspartyl-tRNA synthétase 1	95
3.2	Préparation de cristaux en présence d'analogues de substrat	96
3.3	Article 3 « Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand »	98
3.4	Zoom dans le site actif de l'AspRS-1	104
4	Matériel biologique et aspects méthodologiques	107
4.1	De la cristallisation des macromolécules à leur structure tridimensionnelle	107
4.1.1	Les macromolécules biologiques	107
4.1.2	Détermination des concentrations	110
4.1.3	Détermination de l'homogénéité	110
4.1.4	Cristallisation de macromolécules modèles	111
4.1.5	Analyse cristallographique	111
4.2	Microfluidique	113
4.2.1	Matériaux	114
4.2.2	Méthodes de fabrication	115
5	Conclusion, perspectives et aspects économiques	121
	Annexe I : Valorisation des compétences, un nouveau chapitre de thèse	139
	Annexe II : Formations de l'École Doctorale des sciences de la vie et de la santé	151
	Annexe III : Production scientifique	161

Remerciements

J'adresse de vifs remerciements à Mme Chantal Abergel du Laboratoire Information Génomique et Structure (Marseille), M. Jean-Pierre Samama du Synchrotron Soleil (Paris) et M. Andrew Griffiths de l'Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (Strasbourg) pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail de thèse.

Lorsque j'adresse le bilan de ces trois années passées dans le laboratoire, ce n'est pas sans un pincement au coeur que je vais le quitter. Les gens que j'ai cotoyés tous les jours ne sont plus de simples collaborateurs mais une nouvelle famille. Écrire ces remerciements n'est pas l'exercice le plus facile.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux directeurs de thèse : Claude Sauter, pour m'avoir offert un projet co-financé par le CNRS et la Région Alsace, formée à la cristallographie, au logiciel libre, encouragée dans tout ce que j'ai entrepris comme activité même en dehors de la thèse, ce qui m'a permis de m'épanouir scientifiquement et humainement et Richard Giegé de m'avoir accueilli dans son équipe, pour sa culture et sa curiosité scientifique contagieuse. Ils y sont pour beaucoup, ils m'ont permis de bien me préparer à l'ensemble de la thèse.

Un grand Merci à Bernard Lorber de m'avoir tout appris sur la cristallisation, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils pratiques. Le travail avec Bernard a été un vrai plaisir, très enrichissant, me permettant d'acquérir de nombreuses compétences techniques, scientifiques, rédactionnelles, réflexionnelles. Merci pour ton temps, ta patience, tes idées, pour tout...

Mes remerciements se dirigent également vers l'ensemble de l'équipe de Daniel Kern, passé et présente, qui leur aide technique était indispensable pour les purifications d'enzymes, vers l'équipe de Shen-Xiang Lin au Québec de m'avoir accueillie pendant 2 mois, vers nos collabo-

rateurs à Lyon et Besançon pour m'avoir transmis leur savoir en matière de microfluidique et sciences des matériaux.

Merci à Catherine Florentz, responsable de notre nouvelle équipe, pour son engagement et son travail en sa qualité de Directrice de l'École Doctorale pour faire du doctorat une expérience professionnelle de qualité et d'assurer ainsi l'avenir des doctorants.

Je remercie de même tous mes professeurs et enseignants qui m'ont accompagné tout au long de ma scolarité. Une pensée particulière à Philippe Dumas, mon premier professeur de cristallographie, et à Catherine Dock-Bregeon, ma tutrice de Master, qui m'a aidée à trouver une équipe d'accueil et un sujet de thèse qui me correspond.

Merci à toute l'équipe du 443-447 et plus particulièrement Joëlle, Marie, Anne, Magali, Caro, Agnès, et à mes collègues doctorants qui sont devenus amis...

Enfin un grand merci à tous ceux dans le laboratoire, l'institut, par leurs actes, leurs paroles, leur soutien, et leur amitié ont contribué au présent travail.

Merci à toute l'équipe de l'Addal pour son engagement toujours dans la bonne humeur pour faire du doctorat une expérience scientifique et humaine réussie.

1 Introduction : Cristallisation et Microfluidique

1.1 Introduction générale

La biologie structurale nous apporte une vision tridimensionnelle des macromolécules biologiques qui peut atteindre une précision atomique. Pluridisciplinaire par nature, elle fait appel à des techniques de la physique, de la chimie, de la biologie et de l'informatique pour mieux cerner la chronologie des événements physico-chimiques impliqués dans les interactions intermoléculaires et intramoléculaires du système étudié. Ainsi, l'étude structurale d'une macromolécule biologique (protéine, acide nucléique...) permet de répondre aux nombreuses questions biologiques posées sur les rôles de la macromolécule dans la cellule. En effet, les macromolécules biologiques adoptent des structures spatiales qui leur permettent d'interagir avec leurs partenaires de manière coordonnée et de remplir leurs diverses fonctions au sein de la cellule. La disponibilité d'un modèle structural à l'échelle atomique pour une macromolécule biologique d'intérêt ouvre entre autres la possibilité de concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, l'utilisation de l'approche rationnelle appelée "Structure Based Drug Design" (SBDD) permet de raccourcir le cycle de développement d'un médicament (Babine et Abdel-Meguid, 2003) et de réduire les coûts de la recherche. Les méthodes principales d'investigation de la biologie structurale sont la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la radiocristallographie, qui est la méthode utilisée dans cette thèse.

La cristallographie aux rayons X (ou radiocristallographie) des macromolécules biologiques a commencé avec la mise en évidence du pouvoir diffractant des cristaux de protéines dans les années 30 par Bernal. La découverte de la structure hélicoïdale de l'acide désoxyribonucléique

(ADN) par Watson et Crick, en 1953, en utilisant des clichés de diffraction aux rayons X, a été considérée comme l'une des découvertes les plus importantes du XX^{ème} siècle et le point de départ de la biologie moléculaire. Depuis, la radiocristallographie n'a cessé de se développer d'une façon spectaculaire tant sur le plan théorique que sur le plan technique (Chayen et al., 1996).

Grâce au développement de la radiocristallographie, le nombre de structures de macromolécules biologiques connues croît très rapidement. La Protein Data Base (PDB) a été créée en 1971, avec 7 structures de protéines. Selon le rapport de la PDB de juillet 2008¹, le nombre de structures déposées dépasse les 50000 structures, 82% de ces structures ont été déterminées par diffraction aux rayons X. Pour 2014, selon les estimations le nombre de structures répertoriées à la PDB devrait encore tripler pour atteindre les 150 000 structures.

Cependant, déterminer une structure par diffraction aux rayons X peut se révéler long et difficile, et l'étape cruciale de toute étude cristallographie reste bien souvent la cristallisation des molécules, l'obtention de cristaux demeurant l'étape limitante. Depuis 30 ans, de nombreux travaux ont été réalisés pour comprendre et maîtriser le processus de cristallisation. Ainsi, des techniques de cristallisation adaptées au traitement des biomolécules ont vu le jour, des progrès ont été réalisés dans les méthodes de production et de purification du matériel biologique, mais en dépit des avancées significatives accomplies, tant méthodologiques que théoriques, dans la production et l'analyse des cristaux biologiques, leur obtention reste essentiellement le fruit d'un long travail biochimique.

L'utilisation des robots de plus en plus perfectionnés a considérablement facilité la tâche de recherches des conditions de cristallisation, en permettant le criblage à haut débit de plusieurs centaines, voire milliers, de conditions, tout en consommant moins d'échantillon biologique par essai. Dans la même logique, la microfluidique a récemment fait son apparition dans le domaine de la cristallisation. Depuis les années 90, la microfluidique est en pleine expansion. C'est une technologie à l'intersection de diverses disciplines scientifiques et qui répond aux besoins dans différents domaines (de la physique, de la chimie, de la biologie ...). La microfluidique a fait sa première apparition en biologie, en 1975, à l'université de Stanford (Terry et al., 1979). Il s'agissait d'un dispositif qui miniaturisait une colonne de chromatographie en phase

¹http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=general_information/news_publications/index.html

gazeuse. En 2002, la microfluidique a fait son entrée en cristallographie, alors qu'un premier dispositif microfluidique dédié à la cristallisation des macromolécules biologiques s'affichait en couverture du journal PNAS ² (Hansen et al., 2002).

Mon travail de thèse était centré sur le développement de puces microfluidiques dédiées à la cristallisation et à l'analyse aux rayons X des macromolécules biologiques. Il fait partie d'un projet interdisciplinaire dont le but est de concevoir et valider un dispositif microfluidique pour la cristallisation et l'analyse aux rayons X des biomolécules simple d'utilisation, peu coûteux, suffisamment évolutif pour répondre aux besoins des cristallographes.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la cristallogénèse, une discipline qui a émergé au milieu des années 80 pour rationaliser la démarche des biochimistes visant à obtenir des cristaux. L'accent sera mis sur la cristallisation en milieu diffusif pour obtenir des cristaux de meilleure qualité, et la microfluidique comme champ scientifique et technologique au service des sciences du vivants. En particulier l'apport de la microfluidique comme outil pour la cristallisation des macromolécules biologique sera mis en exergue.

La deuxième partie de la thèse portera sur la conception de séries de prototypes de puces microfluidiques pour la cristallisation et l'analyse aux rayons X : le choix de la géométrie des puces, le choix des matériaux et des méthodes de fabrication, l'adaptation et l'ergonomie des puces aux différentes fonctions envisagées.

1.2 Vue d'ensemble de la cristallisation des macromolécules biologiques

1.2.1 L'intérêt des études cristallographiques

Les molécules biologiques responsables de toute vie cellulaire sont des hétéropolymères de très grande taille. Les processus biologiques complexes sont les résultats d'interactions souvent dynamiques soit de macromolécules biologiques entre elles, soit de macromolécules avec de petits

²(*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*)

substrats cellulaires. La compréhension de ces mécanismes nécessite en premier lieu la connaissance des structures tridimensionnelles de ces macromolécules soit seules, soit engagées dans des complexes spécifiques.

La connaissance de la structure des macromolécules, de leurs interactions et associations statiques et dynamiques, est au coeur de la compréhension du fonctionnement du vivant et représente une source de progrès qui génère des retombées non seulement en recherche fondamentale mais aussi en recherche appliquée. Cela justifie les investissements importants réalisés depuis plusieurs années dans les secteurs publics et privés.

En effet, l'étude de la relation entre structures et fonctions est au cœur même de la biologie : cette relation s'exprime chez les êtres vivants et pose une série de problèmes absolument fondamentaux, comme la compréhension des mécanismes à l'origine du vivant, le rapport entre analogie et homologie, perfectionnement structural et niveau évolutif. La génomique structurale vise à décrire systématiquement la structure tridimensionnelle de l'ensemble des protéines codées par un génome donné ou de l'ensemble d'une famille de protéines assurant une même fonction cellulaire, ce qui permet d'étudier de façon élargie les déterminants structuraux et les mécanismes qui assurent la performance, la précision et la spécificité des processus biologiques. Ainsi, elle permet la compréhension des causes du dysfonctionnement des processus biologiques et les artifices permettant de les corriger. La détermination de la structure tridimensionnelle permet aussi la conception rationnelle de molécules thérapeutiques. La biologie structurale à haute résolution des cibles thérapeutiques sert de support à la modélisation de molécules actives, notamment en santé humaine.

La diffraction des rayons X par des monocristaux est une méthode de choix pour l'étude structurale des macromolécules biologiques à très haut débit ([Pusey et al., 2005](#)). L'explosion de cette méthode est due aux progrès réalisés tant au niveau de la technologie (biologie moléculaire, sources de rayons X, détecteurs de rayons X, supercalculateurs) qu'au niveau des logiciels de traitement des données de diffraction (collecte, phasage, affinement) ([Chayen et al., 1996](#)). Cela se traduit par un raccourcissement extraordinaire du délai séparant l'obtention d'un premier cristal et la détermination de la structure cristalline. Une étude cristallographique peut maintenant être conduite en quelques mois, voire quelques jours, après l'obtention des premiers cristaux.

La cristallographie a permis la détermination des structures tridimensionnelles de plusieurs dizaines de milliers de macromolécules biologiques dans des gammes de taille et de complexité très variées. Mais des défis restent à relever concernant beaucoup de protéine à architecture modulaire, les complexes macromoléculaires et les protéines peu solubles. Cependant des progrès ont été réalisés :

Prenons l'exemple du ribosome qui est le complexe macromoléculaire ARN-protéines responsable de la synthèse protéique dans la cellule. La masse moléculaire d'un tel complexe est d'environ 2,7 Mega Daltons chez les procaryotes et 4,5 Mega Daltons chez les eucaryotes. L'utilisation du rayonnement synchrotron a permis de déterminer plusieurs structures du ribosome contenant de l'ARNm et des ARNt dans divers états fonctionnels. Ces études ont clarifié le mécanisme du déplacement de l'ARNm sur le ribosome (Jenner et al., 2007; Marzi et al., 2007).

Un autre exemple est celui des molécules peu solubles, plus particulièrement les protéines membranaires, qui ont comme rôles d'isoler les compartiments, réguler les transferts, et assurer la communication. On estime que ces protéines présentent 30% des gènes exprimés, 50% des cibles pharmaceutiques, mais que 4% des structures 3D résolues. Cependant, la diffraction des rayons X a permis récemment d'avoir accès à la structure de la transglycosylase PBP1b de *Escherichia coli* avec un inhibiteur ce qui fera de cette protéine une excellente cible pour développer des nouveaux antibactériens (Sung et al., 2009).

Notre équipe a une expérience d'une trentaine d'années en matière de cristallogénèse biologique, elle a travaillé sur la machinerie traductionnelle et en particulier sur les *aminoacyl*-ARNt synthétases (aaRS). Le décodage ou traduction de l'ADN en protéine passe par l'Acide RiboNucléique messager (ARNm) et nécessite une haute fidélité de traduction. L'ARNm est traduit en protéines selon le code génétique. À chaque triplet de nucléotide correspond un acide aminé. L'ARN de transfert (ARNt) joue le rôle d'adaptateur en faisant correspondre les codons de l'ARNm aux acides aminés. Les enzymes chargées du couplage spécifique entre ARNt et acide aminé sont les *aminoacyl*-ARNt synthétases (aaRS) (Ibba et al., 2005). Les ARNt qui sont des acides nucléiques « facilement » cristallisables (Dock et al., 1984) et les aaRS formées de plusieurs modules structuraux ont servi à maintes reprises de modèles pour comprendre le phénomène de la cristallisation (Giegé et al., 1986; Sauter et al., 1999; Lorber et al., 2002; Ng et al., 2002; Giegé et al., 2008). Les chercheurs du domaine ont utilisé l'outil ARNt et aaRS pour

développer des techniques plus appropriées à la réalité quotidienne du cristallographe. Ainsi, c'est à la fin des années 60 qu'émerge la technique de diffusion de vapeur en goutte assise (Hampel et al., 1968), suivie un peu plus tard de la microdialyse.

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser au phénomène de cristallisation : les conditions et les paramètres mis en jeu pour la naissance du cristal (nucléation), sa croissance, l'arrêt de croissance. Ensuite, les méthodes de cristallisation les plus utilisées en biologie structurale seront abordées, puis nous verrons que le processus de cristallisation peut se décrire à l'aide d'un diagramme de phase. Enfin, nous examinerons les critères de qualités d'un cristal.

1.2.2 Cristallisation et cristallogénèse

L'histoire du sel occupe une place unique et privilégiée dans celle des Hommes ; elle nous apprend que la cristallisation est une technique ancestrale utilisée pour isoler le sel par évaporation de l'eau de mer. La cristallisation correspond au passage d'un état désordonné en solution à un état ordonné solide. L'objectif de la cristallisation en biologie structurale est d'isoler une entité moléculaire en solution pour la faire passer à l'état solide et de sélectionner une forme cristalline compatible avec son étude par diffraction des rayons X. Dans un cristal, les molécules sont arrangées de manière régulière et répétitive dans les trois dimensions de l'espace. Les cristaux sont souvent délimités par un ensemble de faces définies, dépendant de leur structure interne et de leurs conditions de formation (Tableau 1.1).

L'obtention du cristal de la macromolécule biologique est nécessaire pour toute étude de diffraction des rayons X parce que la technique exige que toutes les molécules soient orientées avec précision. En effet, lorsque une molécule est soumise aux rayonnements X, ses électrons diffusent des rayons X dans toutes les directions. Le signal produit par une molécule isolée est trop faible pour être mesuré. Par contre, dans un cristal, l'arrangement tridimensionnel périodique des molécules induit des interférences entre les rayonnements diffusés par chacune d'elles. Dans certaines directions bien précises (dictées par la géométrie du cristal), il y a amplification du signal par interférences constructives : c'est le *phénomène de diffraction* qui génère des ondes diffractées appelées *réflexions*. En dehors de quelques cas rares de cristallisation naturelle, les cristaux sont essentiellement le fruit d'un travail biochimique (Chayen et Saridakis,

2008). La cristallisation a été longtemps considérée comme un art dont les meilleurs praticiens font preuve d'une grande persévérance et de patience. Une nouvelle discipline a émergé au milieu des années 80 : la *cristallogénèse des macromolécules biologiques* dont le but est de comprendre et maîtriser le processus de cristallisation.

1.2.3 La cristallisation : étape limitante d'une étude cristallographique

Les techniques de résolution de structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques ayant considérablement progressé depuis les travaux pionniers de Perutz et Kendrew,³ l'obtention de cristaux est vite apparue comme un obstacle majeur. C'est pourquoi la communauté scientifique internationale a organisé à Stanford en 1985 un premier congrès sur la cristallisation des macromolécules biologiques. Il est à présent admis et démontré que les mécanismes gouvernant la nucléation et la croissance des cristaux inorganiques et des cristaux de macromolécules biologiques sont similaires (Boistelle et Astier, 1988). Cependant les macromolécules biologiques sont connues pour être en général beaucoup plus difficiles à cristalliser que les sels ou complexes inorganiques ou même que les petites molécules organiques. En 2006, à l'issue de la 11^{ème} édition de ce congrès, Sheng-Xiang Lin et collaborateurs écrivaient un article intitulé « Good Crystals, still a challenge for structural biology » (Lin et al., 2007). Le problème est donc toujours d'actualité, il faut obtenir le premier cristal, puis optimiser les conditions de cristallisation pour obtenir le meilleur cristal possible.

En effet, le cristallographe doit gérer un phénomène multi-paramétrique (Tableau 1.1) pour trouver un environnement favorable à la nucléation et à la croissance de cristaux de qualité. Il n'est, pour l'instant, pas envisageable de prévoir les conditions de cristallisation d'une molécule biologique en raison du nombre élevé de paramètres physico-chimiques et biochimiques qui affectent sa solubilité et interviennent dans sa cristallisabilité (Ducruix et Giegé, 1999; McPherson, 1999).

Obtenir une molécule pure et homogène produite en quantité suffisante est nécessaire, avant même de tenter toute cristallisation. Il faut en contrôler la pureté (par électrophorèse ou chromatographie, ...), analyser sa structure primaire (par microséquençage, spectrométrie de masse,

³John Kendrew et Max Ferdinand Perutz ont eu le 1962 prix Nobel de chimie, pour leurs travaux sur la structure des protéines. J.C.Kendrew a travaillé sur la myoglobine, protéine monomérique, alors que M.F. Perutz a travaillé sur l'hémoglobine, protéine tétramérique.

Paramètres biochimiques

Effets des paramètres physico-chimique sur la macromolécule (oxydation, hydrophobicité, hydrophilicité, électrolytes...)
Effets des ligands (substrat, cofacteurs, ion métalliques..)
Additifs spécifiques (agents réducteurs, détergents, polyamines)
Vieillessement, dégradation de l'échantillon
Faible abondance des macromolécules biologiques (difficulté à les purifier, à les surproduire)
Origine du lot de la macromolécule (l'organisme, lot...)
Contaminants macromoléculaires
Microhétérogénéité de séquences, de modifications post-traductionnelles
Microhétérogénéité conformationnelles

Paramètres physique

Température
Pression
Temps
Méthode de cristallisation,
Effet de surface
Gravité
Vibration
Agitation
Ultrasons
Champs magnétique
Champs électrique
Densité
Viscosité

Paramètres chimiques

Degré de sursaturation
PH, force ionique
Nature de l'agent cristallisant
Contaminants non macromoléculaires

TAB. 1.1: Les trois groupes de paramètres affectant la cristallisation de biomolécules : Le processus de cristallisation est influencé par plusieurs paramètres biochimiques, chimiques, et physiques. Le cristallographe joue sur ces paramètres pour obtenir le premier cristal ou/et pour optimiser les conditions de cristallisation.

...), analyser sa structure quaternaire (ultracentrifugation, diffusion de lumière, ...). Il faut enfin trouver expérimentalement des conditions dans lesquelles la macromolécule est homogène. La diffusion de lumière constitue un excellent outil de diagnostic pour tester l'homogénéité de la macromolécule en solution. En utilisant la diffusion de lumière, on peut aussi tester l'effet des agents précipitants potentiels sur l'homogénéité de la macromolécule (Kam et al., 1978; Mikol et al., 1990). Dès qu'une condition est détectée, elle est affinée en variant les différents paramètres qui peuvent influencer la cristallisation.

Pour faciliter la recherche de conditions initiales qui permettent l'obtention du premier cristal, les premières pistes à explorer viennent des matrices d'échantillonnages. C'est une technique de criblage factorielle dont le principe est de couvrir efficacement l'ensemble de l'espace expérimental (Carter et Carter, 1979). L'exploitation de l'information liée au nombre exponentiel

de structures cristallographiques disponibles dans la PDB et à la collection des conditions de cristallisation dans des banques de données comme la *Biological Macromolecule Crystallization Database* (BMCD)⁴ (Gilliland et al., 2002) ou plus récemment la *Marseille Protein Crystallization Database* (MPCD)⁵ (Charles et al., 2006) permettent de voir quelles sont les conditions ayant conduit au plus de succès et de les utilisés en premier.

Le développement de robots de cristallisation de plus en plus perfectionnés, a considérablement facilité la tâche du cristallographe. En effet, leur utilisation permet le criblage à haut débit, de tester plusieurs milliers de conditions, avec la même quantité de macromolécule, avec moins de moyens humains et en augmentant la reproductibilité de la cristallisation (Abola et al., 2000; Service, 2001; Chayen et Saridakis, 2002).

Afin de limiter la quantité de matériel nécessaire au criblage de conditions de cristallisation, d'autres techniques de criblage ont été développées. Par exemple, le Professeur A. McPherson (*Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California, Irvine, USA*) a proposé de combiner une base d'agent cristallisant (30% PEG 3350 ou 50% Tacsimate TM) à un large crible de petites molécules d'additifs (composés polyvalents chargés, ligands, composés phosphatés...) (McPherson et Cudney, 2006). Cette approche repose sur une variation limitée des paramètres de cristallisation. Par ailleurs, le Professeur J.M. García-Ruiz (*Laboratorio de Estudios Cristalográficos, Granada, Spain*) propose la contre-diffusion en capillaire comme méthode de cristallisation (García-Ruiz, 2003)⁶. Néanmoins, l'obtention de cristaux d'une qualité suffisante pour être exploités par diffraction aux rayons X nécessite souvent l'optimisation des conditions (Kundrot, 2004) (Figure 1.1).

Il est important de ne pas oublier que les biomolécules sont sensibles aux paramètres physico-chimiques lors de leur cristallisation mais aussi sur le plan de leur stabilité structurale (Price II et al., 2009). Une conformation macromoléculaire active est souvent incompatible avec une large gamme de température, de pH ou de concentration saline.

L'utilisation des robots pour la cristallisation apporte un gain d'échelle et de productivité incontestable, mais la cristallisation reste d'un coût élevé et peut requérir un matériel biologique conséquent avant d'aboutir à une structure tridimensionnelle. Les difficultés rencontrées lors

⁴<http://xpdb.nist.gov:8060/BMCD4/index.faces>

⁵<http://www.cinam.univ-mrs.fr/mpcd/>

⁶Capillary Counterdiffusion Kits®, www.trianatech.com

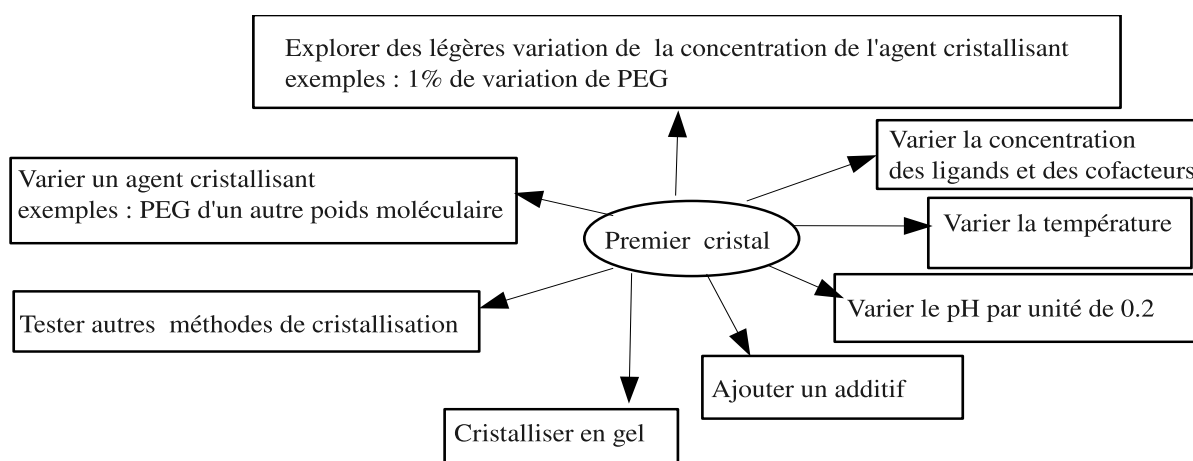


FIG. 1.1: L'optimisation des conditions de cristallisation : se fait à partir du premier cristal dans le but d'avoir des cristaux plus grands ou/et de meilleur qualité.

de la recherche de conditions de cristallisation, pour des systèmes de plus en plus grands et complexes à cristalliser, encouragent la mise au point de nouvelles stratégies et techniques pour augmenter les chances de succès en utilisant moins de temps et de produit, en réduisant le nombre d'étape conduisant à la résolution d'une structure 3D. L'élaboration de puces microfluidiques dédiée à la recherche, à l'optimisation de conditions de cristallisation et à l'analyse par diffraction des rayons X *in situ* offrira peut-être aux cristallographes cette opportunité.

1.2.4 Diagramme de phase

La cristallisation en solution des macromolécules biologiques comme dans le cas des petites molécules organiques, est réalisée en conduisant lentement la molécule cible vers un minimum de solubilité. Ceci s'obtient par exemple en modifiant les propriétés physico-chimiques du milieu par addition d'un agent cristallisant. On atteint alors un état de sursaturation de la solution, qui conduit les molécules qui s'y trouvent à interagir de manière à s'ordonner en un réseau périodique. Le comportement de molécules en solution variera en fonction de leur environnement. Les études de croissance cristalline nécessitent la détermination des courbes de solubilité, en fonction du ou des paramètres que l'on fait varier. Par exemple, on pourra facilement réaliser un diagramme bidimensionnel en fonction de la concentration de biomolécules d'une part, de la concentration d'agent cristallisant (sel, polymère, alcool) ou de la température, d'autre part, les autres paramètres restant constants. Le diagramme de phase est obtenu expérimentalement (Saridakis et al., 1994; Ducruix et Giegé, 1999; McPherson, 1999; Sauter et al.,

1999).

La courbe de solubilité n'est accessible qu'après avoir obtenu des cristaux. La courbe définit la limite entre la phase soluble et la phase solide (cristal, précipité microcristallin). Au niveau de la courbe, états soluble et solide sont en équilibre dynamique, leurs potentiels chimiques sont égaux : $\mu_{cristal} = \mu_{solution} = \mu_{équilibre}$. Pour qu'une macromolécule en solution cristallise, elle doit dépasser cette courbe et entrer dans une zone hors équilibre thermodynamique ($\mu_{solution} > \mu_{équilibre}$) ; la solution est alors dite sursaturée.

L'état de sursaturation est une condition nécessaire à la cristallisation mais non suffisante. Une solution saturée contient à l'état dissous une quantité de soluté telle qu'il ne peut y avoir ni croissance ni dissolution pour des cristaux présents. Une augmentation de la concentration de soluté élève l'énergie libre du système et provoque un écart à l'équilibre thermodynamique pour entrer dans cet état de sursaturation. Cet état permet à la macromolécule en solution d'initier sa cristallisation. Cette initiation, ou nucléation, ne s'opère que si la sursaturation est suffisante. Il existe de ce fait, une seconde courbe, dite courbe de supersolubilité, qui sépare deux zones sursaturées du diagramme : la zone de nucléation, encore appelée zone labile, où la sursaturation suffisamment élevée conduit à la nucléation du cristal, et la zone métastable où la sursaturation plus faible est juste suffisante pour qu'un cristal existe et croisse, mais insuffisante à sa nucléation (Figure 1.2). Le taux de nucléation (définissant le nombre de germes et donc de cristaux) dépend lui-aussi directement du niveau de sursaturation. La zone métastable peut persister très longtemps sans qu'aucun cristal n'apparaisse, à moins que l'on applique une perturbation (choc mécanique, variation de température,...). C'est une zone idéale pour l'ensemencement (voir 1.2.6).

1.2.5 Étapes de la cristallisation

Toute cristallisation peut se décomposer en trois étapes qui sont la nucléation, la croissance et l'arrêt de croissance.

La nucléation : La création d'un état de sursaturation constitue la force motrice qui apporte aux molécules l'énergie nécessaire pour s'associer et former des noyaux stables : dans

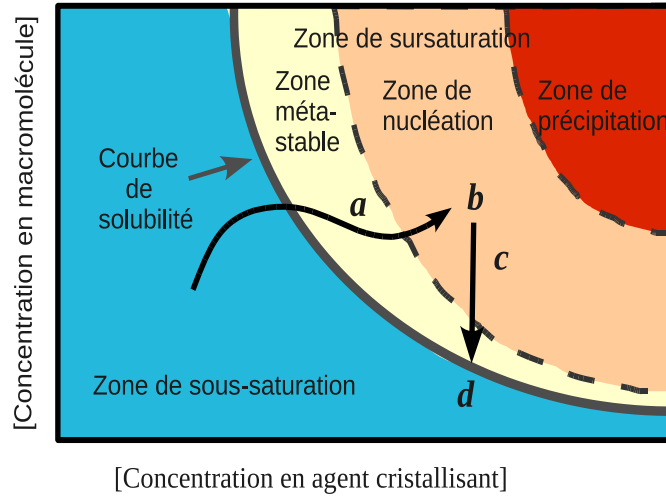


FIG. 1.2: Diagramme de phase : représentation bidimensionnelle schématisque de la concentration d'une macromolécule en fonction de la concentration d'un agent cristallisant. Etapes de la cristallisations : (a) Passage de la zone de sous-saturation à la zone de nucléation . (b) La nucléation a lieu dans la zone de nucléation : les molécules s'assemblent pour former le noyau cristallin. La nucléation a lieu quand l'énergie nécessaire à cette opération est atteinte. (c) La croissance cristalline : Le crystal grandit, le système va se déplacer de la zone de nucléation vers la zone métastable. (d) L'arrêt de la croissance.

une solution sursaturée où les molécules d'une espèce dissoute diffusent de façon aléatoire, certaines molécules finissent par se rencontrer pour former des germes thermodynamiquement stables. La nucléation ou germination est l'étape de transition entre deux états d'organisation de la matière. Elle nécessite de franchir une barrière énergétique. Plus la sursaturation est élevée, plus l'énergie d'activation ΔG^* est faible et le nombre de noyaux dans la solution est élevé. ΔG^* s'exprime par la relation :

$$\Delta G^* = -\frac{V_{\text{noyau}}}{\Omega} kT \ln \beta + S_{\text{noyau}} \cdot \gamma$$

avec V_{noyau} et Ω les volumes du noyau en cours de formation et de la macromolécule isolée, k la constante de Boltzmann, T la température absolue, β la sursaturation, S_{noyau} la surface du noyau et γ l'énergie libre interfaciale entre noyau et solution (Boistelle et Astier, 1988).

Le noyau de taille critique peut être désigné par son rayon ; c'est donc seulement à partir d'une certaine taille que le cristal est susceptible de se développer. La nucléation constitue donc le premier stade de la cristallisation : ce germe joue le rôle d'une amorce. On qualifie de primaire la nucléation qui prend place dans un milieu constitué de la seule phase-mère, c'est-à-dire la

solution liquide sursaturée dans le cas de la cristallisation. La nucléation est homogène lorsque le milieu est continu, en particulier, sans hétérogénéité, sans impureté, ni interfaces. Or, l'expérience montre que ces conditions idéales sont rarement réalisées, particulièrement en phase liquide, à cause de la présence des parois, mais aussi du fait de la présence de poussières, bulles, cristaux pré-existants, pouvant servir de support à des germes. Dans ces conditions, on qualifiera la nucléation d'hétérogène. Lorsque la nucléation prend place dans un milieu contenant déjà des cristaux de la nouvelle phase, elle est qualifiée de secondaire. Elle trouve une application en cristallisation : l'ensemencement de la zone métastable avec des micro ou macro-cristaux. Cette technique permet de provoquer la croissance cristalline en pourvoyant un noyau sans attendre une nucléation spontanée (Stura et al., 1992).

La croissance cristalline : En croissance cristalline, on distingue en général deux étapes, le transport de matière jusqu'à l'interface cristal / solution, et l'attachement de la molécule sur le cristal (intégration). Le transport de matière est régi par la diffusion et la convection dues à des gradients de concentration autour du cristal, ou par l'agitation de la solution. L'association des molécules en réseau est un phénomène dynamique où le flux d'arrivée des molécules sur la face cristalline en croissance est supérieur à leur flux de départ. Les sites d'intégration des unités sont caractérisés par le nombre de liaisons (contacts) que l'unité établit avec la surface du cristal. Il existe 3 situations (Figure 1.3). Les sites B (sur la surface en croissance) où l'unité établit une liaison avec la surface. Dans les sites A (sur une marche du cristal en croissance) l'unité de croissance établit deux liaisons (avec la surface en croissance et la marche). Dans les sites C (noeud), elle se lie à trois surfaces différentes. D'un point de vue énergétique les sites A, B et C ont différentes énergies de liaison. Plus l'unité de croissance établit de liaisons avec la couche en croissance et plus son énergie sera minimale. Les sites C sont donc plus favorables que les sites A et à leur tour que les sites B : la vitesse de croissance sera maximale quand la face est couverte de nœuds ou marches.

Plusieurs méthodes (Van Driessche et al., 2008) permettent d'étudier la croissance cristalline macromoléculaire. Ces méthodes ont confirmé pour les cristaux de macromolécules l'existence de mécanismes déjà décrits pour les petites molécules (Figure 1.4). On observe : la *croissance en dislocation spirale* qui naît d'une dislocation et se propage sous forme d'une spirale. Ce mode de croissance est compatible avec une sursaturation faible à moyenne. La *croissance*

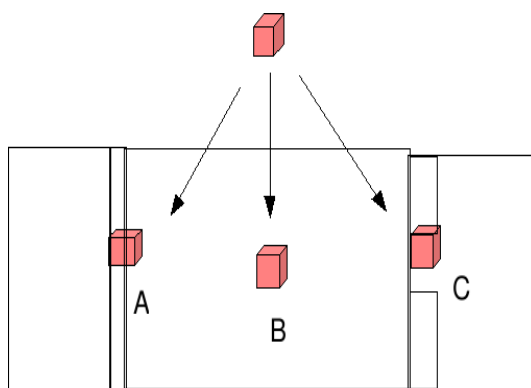


FIG. 1.3: Croissance cristalline 1 : une molécule s'incorpore sur le cristal selon trois modes possibles. Les sites A, B, C ont différentes énergies de liaison suivant le nombre de liaisons que l'unité établit avec la surface du cristal. Le site C est le plus favorable (3 contacts), suivi du site A (2 contacts) puis du site B (1 seul contact).

bidimensionnelle : débute par la formation d'îlots à la surface du cristal. La nouvelle couche moléculaire se propage ensuite par croissance bidimensionnelle. Ce mode de croissance s'observe à sursaturation faible et moyenne. La croissance par *nucléation tridimensionnelle* : correspond à la sédimentation et à l'incorporation de gros agrégats ou de petits cristaux à la surface du cristal. Elle d'observe généralement à sursaturation élevée et génère de fortes densités de défauts (Sunagawa, 2005).

L'arrêt de croissance : En système fermé, dans le cas le plus favorable, lorsque la nucléation et la croissance ont lieu, la sursaturation diminue progressivement, l'arrêt de croissance intervient lorsque le système atteint son point d'équilibre, au niveau de la courbe de solubilité. La concentration de molécule en solution est alors égale à la solubilité : il y a autant de molécules qui se détachent du cristal que d'entités qui quittent la solution pour passer en phase cristalline. D'autres facteurs peuvent affecter la croissance avant le retour à l'équilibre comme l'empoisonnement des faces par des impuretés, la présence de micro-hétérogénéités et l'apparition de défauts structuraux. Un cristal empoisonné, même s'il est transféré dans un milieu sursaturé, ne reprendra sa croissance qu'après dissolution partielle de sa surface, de manière à éliminer les couches périphériques empoisonnées.

1.2.6 Les méthodes de cristallisation

La cristallisation des biomolécules nécessite des techniques en solution adaptées à leur sensibilité et compatibles avec la quantité d'échantillon disponible. Les méthodes de cristallisation les

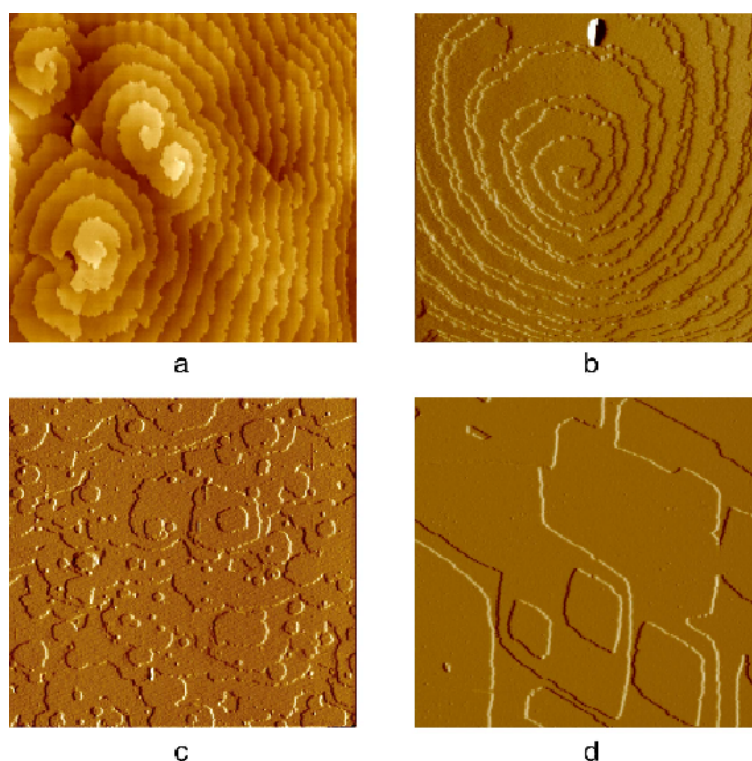


FIG. 1.4: Croissance cristalline 2 : Mécanismes de croissance cristalline observés par microscopie de force atomique. (a) et (b) images de croissance en spirale à la surface des cristaux. (c) et (d) images de croissances en 2D.

plus utilisées sont la diffusion de vapeur, la microdialyse et la cristallisation en batch, la plus populaire restant sans doute la méthode de diffusion de vapeur. La contre-diffusion, méthode récente qui a fait ses preuves, sera également abordée dans ce paragraphe (Figure 1.5). Le principe est toujours le même : il s'agit d'amener la macromolécule, sans la dénaturer, en condition de sursaturation propice à la nucléation, puis à la croissance du cristal. En fonction de la méthode choisie, le chemin suivi dans le diagramme de phase change (Figure 1.6).

« **Batch** » : La méthode de batch consiste à mélanger directement la macromolécule avec l'agent cristallisant à raison d'un volume équivalent de chaque solution. Le mélange à cristalliser est placé dans une enceinte fermée. L'échantillon est recouvert d'huile de paraffine (quasi-imperméable aux gaz) qui limite l'évaporation et les variations de concentrations incontrôlées. Les concentrations en macromolécule et en agent cristallisant restent donc constantes dans la solution au cours du temps jusqu'à l'apparition de cristaux. Les concentrations initiales doivent donc être choisies pour conduire à une cristallisation spontanée. L'utilisateur de cette méthode se trouvera face à trois situations : le mélange

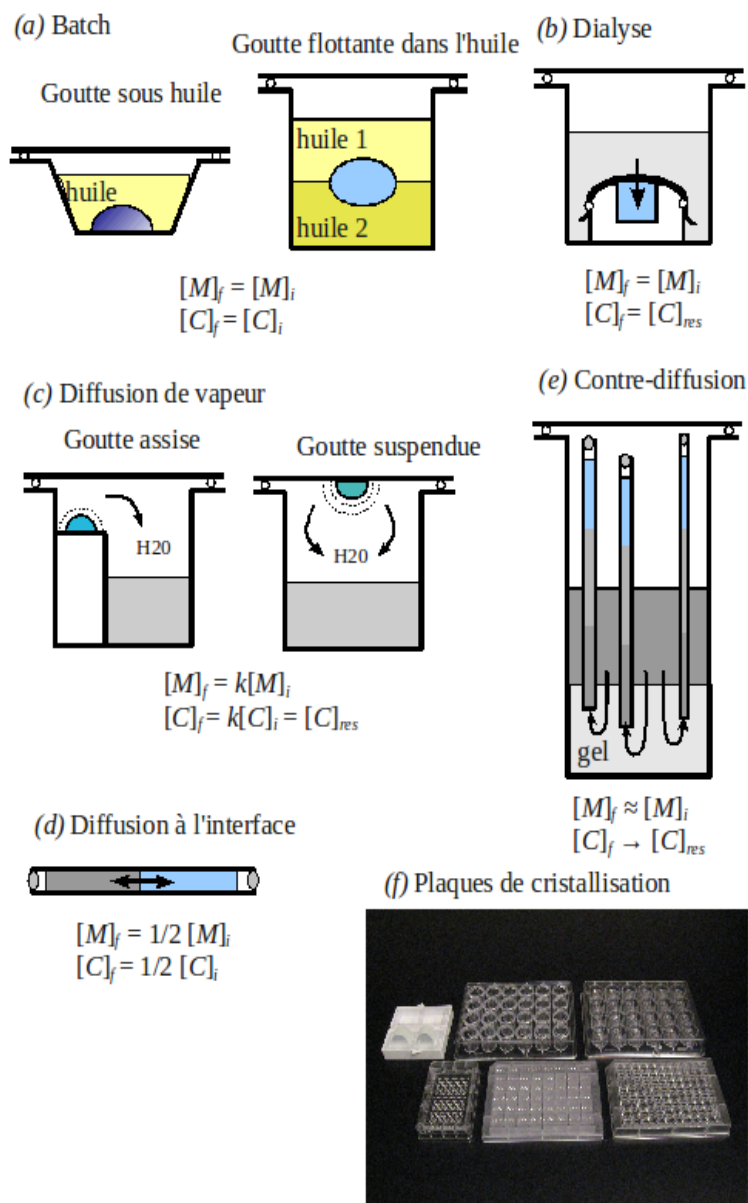


FIG. 1.5: Méthodes de cristallisation des macromolécules biologiques. (a) Deux versions de la cristallisation en batch. (b) Dispositifs de cristallisation par la dialyse. (c) Deux façon de cristalliser par diffusion de vapeur soit en goutte assise soit en goutte suspendue. (d) La diffusion à l'interface dans un capillaire. (e) La contre-diffusion dans des tubes capillaires plongés dans du gel. L'évolution de la concentration de la macromolécule $[M]$, et de l'agent cristallisant $[C]$ dans les différentes méthodes est indiquée (i pour initiale, f pour finale). $[C]_{res}$ est la concentration de l'agent cristallisant dans le réservoir. K est le facteur de dilution. (f) Quelques exemples de plaques de cristallisation commercialisées.

aboutit dans une zone sous-saturée, aucune cristallisation ne se produira ; si la concentration initiale se situe entre la courbe de solubilité et la zone de précipitation, alors la nucléation et la croissance de cristaux deviennent possibles ; une précipitation immédiate observée lorsque la sursaturation est trop forte. De façon générale, on générera facilement une nucléation importante si le niveau de sursaturation n'est pas contrôlée avec précision. Cette méthode, totalement compatible avec l'utilisation de robot de cristallisation, peut être utilisée pour le criblage automatisé de conditions de cristallisation. En utilisant le robot le volume de la goutte peut se réduire à une centaine de nanolitres (100 nl).

Diffusion de vapeur : Une goutte de faible volume (typiquement 100 nl à 1-5 μ l) contenant la macromolécule, le tampon et l'agent cristallisant, est déposée sur un support. Ce support est scellé sur un réservoir d'un volume très supérieur (100 – 500 μ l) du même tampon et l'agent cristallisant deux fois plus concentré que dans la goutte. Le système retourne à l'équilibre des concentrations par diffusion de vapeur conduisant à une déshydratation de la goutte et donc à un accroissement de la concentration en macromolécule et en agent cristallisant pouvant mener à une cristallisation. En plus de l'aspect thermodynamique, le degré de sursaturation et la formation des cristaux dépendent de la cinétique des échanges de vapeur qui sont fonction de la nature et des concentration initiales des constituants, de la température, de la taille et la forme de la goutte, de la distance goutte-réservoir (McPherson, 1999; Newman, 2005; Newman et al., 2007). Cette méthode est particulièrement bien adaptée à l'utilisation des robots de cristallisation. La configuration de goutte assise en microplaques à 96 réservoirs permet, à raison de un à cinq emplacements de goutte jouxtant chaque réservoir, la préparation d'une centaine jusqu'à 500 essais par plaque.

Dialyse : La séparation des substances se fait en fonction de leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane. La circulation des substances dépend de la taille des pores de la membrane. La cinétique des échanges est en fonction de la concentration de l'agent cristallisant, de la température et de la surface de la membrane d'échange. La technique de dialyse a été adaptée pour dialyser des petits volumes (10 μ l par expérience) en utilisant les tubes capillaires Zeppenzauer (1971).

Diffusion de liquide-liquide ou diffusion à l'interface : La diffusion liquide de l'agent cristallisant consiste à superposer dans un capillaire la solution de macromolécule biologique et une

Diamètre en mm	Vmax en µl
0,2	1,9
0,3	4,2
0,5	11,8
1	47,1

TAB. 1.2: La quantité d'échantillon utilisé en contre-diffusion varie selon le diamètre du capillaire pour un capillaire de 5 cm de longueur.

solution plus concentrée en agent cristallisant. Cette méthode est très similaire à la dialyse, sauf qu'elle se fait sans membrane. Cette interface liquide liquide est difficile à mettre en oeuvre, nécessite l'absence de convection dans des tubes capillaires.

Contre-diffusion : La mise en oeuvre de la contre-diffusion nécessite l'absence de convection, de longues chambres de cristallisation, et un important rapport volumique entre réservoir apportant l'agent cristallisant et le volume de l'échantillon. De ce fait, le meilleur outil pour faire la contre-diffusion est un capillaire de fin diamètre. La solution de la macromolécule est tout d'abord introduite par capillarité dans le capillaire. Ensuite, l'agent cristallisant est ajouté à une extrémité et va diffuser à travers la solution de biomolécules. Sa diffusion génère une vague de sursaturation qui se propage le long du capillaire créant une infinité de conditions de cristallisation. Plus le capillaire est long, plus le gradient de concentration est étalé et plus le criblage est large. Le capillaire jouera le rôle de chambre de cristallisation. Ainsi, la méthode de contre-diffusion permet de tester une infinité de conditions dans le gradient de sursaturation, en une seule expérience (Figure 1.6). Quand il y a cristallisation, on observe des microcristaux ou précipités microcristallins à l'entrée du capillaire, et des monocristaux de tailles suffisantes pour la diffraction des rayons X en fin de capillaire, le tout en une seule expérience et dans un temps court, de l'ordre de quelques jours (Ng et al., 2003). Le tableau 1.2 montre la variation du volume de l'échantillon en fonction du diamètre du capillaire.

Ensemencement : Cette technique permet de provoquer la croissance cristalline en pourvoyant un noyau sans attendre une nucléation spontanée (Stura et al., 1992). Lorsque les courbes de solubilité et de précipitation sont très proches, on obtient souvent des microcristaux en grand nombre. On introduira un germe cristallin dans une solution sursaturée (zone métastable). Les avantages sont la diminution de l'énergie nécessaire à la nucléation, l'augmentation de la taille et de la qualité d'un cristal. Il existe trois types d'ensemencement :

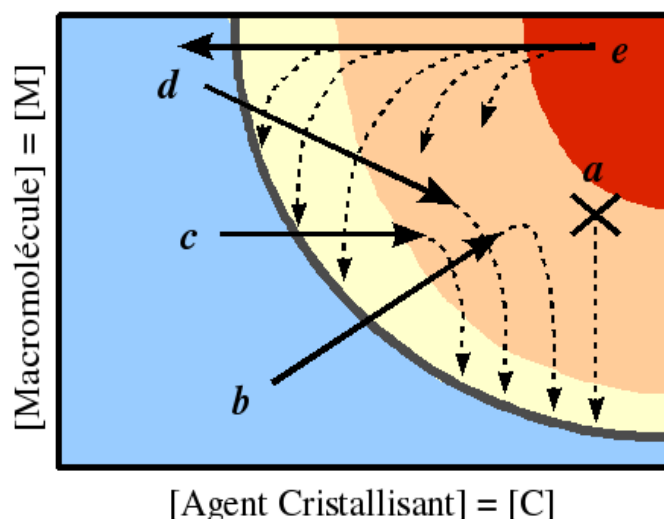


FIG. 1.6: Chemin de cristallisation en fonction de la méthode de cristallisation. (a) Le batch. (b) La diffusion de vapeur. (c) Dialyse. (d) La diffusion à l'interface. (e) La contre-diffusion.

mencement : 1/ le « macroseeding » avec l'introduction d'un microcristal lavé dans une goutte pré-équilibrée contre un réservoir à des concentrations telles qu'il y ait croissance mais pas nucléation (concentration en agent cristallisant plus faible qu'à la nucléation) ; 2/ le « microseeding » : c'est l'introduction d'un germe microscopique ; 3/ l'ensemencement hétérogène où le germe peut provenir d'une autre protéine. Ainsi la barrière énergétique de la nucléation est franchie et la formation du cristal a lieu. L'ensemencement s'utilise le plus facilement pour des essais réalisés en diffusion de vapeur et en batch.

1.2.7 Caractérisation de la qualité cristalline

Lorsqu'un cristal est obtenu se pose la question de l'évaluation de sa qualité. L'aspect visuel donne une première indication (taille, morphologie), mais le véritable test est l'analyse aux rayons X ; tout ce qui perturbe la périodicité cristalline sera néfaste pour la qualité de diffraction. Les critères en sont les suivants :

La limite de résolution : cet aspect intéresse directement le cristallographe. En théorie, la résolution maximale est le moitié de la longueur d'onde utilisé pour l'analyse. En pratique, la limite de diffraction va dépendre de l'échantillon, de la précision, de la régularité de son empilement cristallin. Plus la limite est élevée et plus l'information que l'on pourra tirer des données de diffraction sur la molécule cristallisée sera précise. Si on dispose de

phases de qualités suffisantes, on peut pour une résolution donnée obtenir les informations suivantes : A partir de 6 Å de résolution on différencie les contours de la molécule de la zone de solvant. Si la résolution atteint 3 Å, on peut construire la structure du squelette de la macromolécule biologique à partir de la structure primaire. À 2 Å de résolution, les chaînes latérales sont définies, on peut établir avec précision les conformations. À partir de 1,5 Å on distingue clairement les détails, on a la résolution individuelle des atomes (C, N, O, S, P). La valeur de résolution n'est significative qu'à condition de préciser le R_{sym} (facteur d'accord entre réflexions équivalentes après réduction à un jeu de réflexions uniques), la complétude (nombre de réflexions mesurées divisé par le nombre de réflexions mesurables à cette résolution) et rapport signal sur bruit. En général, on choisit un seuil de coupure à $\frac{I}{\sigma} > 2$ ou $R_{\text{sym}} < 40\%$ dans la tranche de plus haute résolution du jeu de données.

La mosaïcité : La mosaïcité peut se définir par la largeur à mi-hauteur des réflexions : elle est le reflet de la structure « mosaïque » du cristal, indique l'ampleur du décalage angulaire entre les blocs monocristallins qui le constituent et permet d'évaluer l'ordre à grande distance au sein du cristal. Une forte mosaïcité est souvent liée aux défauts de croissance ou aux effets de la congélation préalable à l'analyse aux rayons (Figure 1.7) (Vahedi-Faridi et al., 2003) .

Ces différents aspects sont complémentaires et constituent un diagnostic précis de conditions favorisant la croissance de cristaux de qualité souhaitable pour des études structurales. Leur application à des systèmes modèles a contribué à mieux définir des méthodes optimales de cristallisation. On va s'intéresser à la cristallisation en milieux diffusifs qui offrent une solution simple pour obtenir des cristaux de qualité supérieure.

1.3 Cristallisation en milieux diffusifs

Dans un milieu diffusif le mode de transport de masse se fait par la diffusion. En réalisant la cristallisation dans un milieu diffusif, notre but est de minimiser la convection qui est une source de défauts de croissance dans les cristaux.

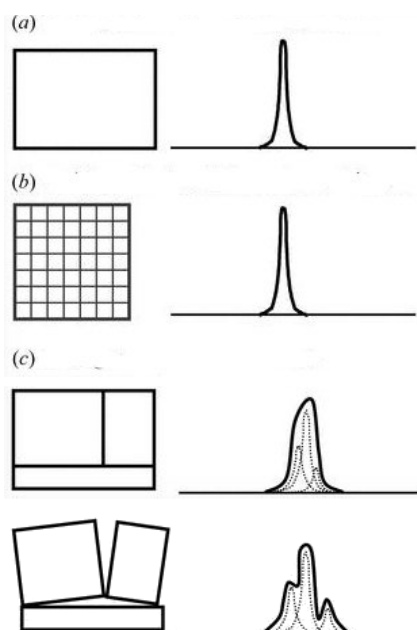


FIG. 1.7: Structure mosaïque des cristaux macromoléculaires. Sur ce schéma nous voyons différents profils de mosaïcité. (a) Le cristal parfait serait formé d'un bloc produisant des réflexions fines. (b) et (c) Un cristal réel est plutôt formé de plusieurs blocs et peut montrer des profils de réflexions très différents (de fin à très large), suivant que les blocs qui le forment sont plus ou moins bien alignés (d'après [Vahedi-Faridi et al., 2003](#)).

1.3.1 Cristallisation en milieux diffusifs et perfection cristalline

Les processus de nucléation et de croissance dans un système de cristallisation nécessitent des transports de masse dans la solution cristalline. Les deux principaux modes de transport sont la convection et la diffusion.

La convection comme mode de transport

Le milieu dans lequel pousse un cristal ne présente pas une densité homogène : Le cristal se nourrit de la solution alentour et crée une zone de déplétion ([McPherson, 1999](#)). Ceci engendre un gradient de concentration et de densité. Les échanges thermiques avec l'extérieur de la goutte de cristallisation induisent eux-aussi des gradients de densité. Les variations de densité engendrent des déplacement de volumes. Le déplacement des volumes dont les densités diffèrent dans la solution est appelé la convection. Cette agitation des liquides perturbe les phénomènes de transfert qui approvisionnent la surface du cristal en molécules libres de la solution. Ainsi, la convection a un effet négatif sur les processus d'intégration de la molécule

dans le site de croissance. Par ailleurs, le cristal est un volume qui a une concentration plus importante que la solution autour de lui, il est donc plus dense que la solution. Le cristal se déplace dans la solution en fonction du vecteur gravité.

La diffusion comme mode de transport

La diffusion est un autre mode de transport : Elle n'implique que des déplacements du soluté, sans déplacement du solvant. La force motrice de la diffusion est le gradient de concentration entre différentes zones de la solution. En effet, selon la première loi de Fick, en présence d'un gradient de concentration, il apparaît un flux de matière tendant à équilibrer cette concentration. En pratique, le cristal se nourrit de la solution alentour et crée une zone de déplétion. Un déplacement de soluté, la macromolécule biologique dans notre cas, va apparaître pour équilibrer la concentration dans la solution. La force motrice du transport est donc le gradient de concentration de la macromolécule biologique. Par conséquent, le coefficient de diffusion des macromolécules étudiées est le plus important dans la solution.

Les solutions biologiques contiennent un grand nombre d'impuretés qui sont défavorables à la cristallisation. Les impuretés peuvent être de différentes natures (incluant le solvant et les éventuelles formes dégradées de la macromolécule). Elles peuvent venir s'adsorber sur la surface cristalline diminuant fortement la croissance cristalline et la qualité cristalline. Le transport par diffusion présente l'avantage de limiter ce phénomène ([Moreno et al., 2005](#)).

Dans un milieu idéal, la croissance cristalline se fait par diffusion. Dépourvu de gravité, la convection tend à disparaître et le transport des molécules vers le cristal s'opère en régime diffusif. Cet argument est une des justifications des programmes de cristallisation en apesanteur.

Cristallisation en microgravité

Dans la réalité, la situation 0g n'existe pas, mais elle peut être approchée en conditions dites de microgravité, durant quelques secondes dans une tour à chute libre, dans un avion en vol parabolique, ou encore pour une durée de quelques jours à quelques mois dans un véhicule spatial en orbite. La dernière situation est de loin la plus adaptée aux expérimentations de

cristallisation de biomolécules. Il a été montré que des conditions de microgravité peuvent produire des cristaux de plus grande taille et de meilleure qualité que les cristaux obtenus au sol (Ng et al., 1997, 2002). En effet, les cristaux de l'espace ont une taille supérieure et présentent une croissance tridimensionnelle. Les données de diffraction collectées à partir de cristaux spatiaux sont souvent de meilleure qualité : dans certain cas, il y a augmentation de la limite de résolution et pour la thaumatine, le lysozyme, l'AspRS, le rapport signal/ bruit des données $\left(\frac{I}{\sigma(I)}\right)$ plus élevé que pour les cristaux terrestres (DeLucas et al., 1989; Day et McPherson, 1992; Ng et al., 1997; Declercq et al., 1999; Ng et al., 2002).

La mosaïcité des cristaux spatiaux est généralement plus faible, indiquant un empilement plus régulier (Snell et al., 1995; Ng et al., 1997; Otálora et al., 1999). Les analyses par topographie X confortent le résultat précédent en démontrant que les cristaux obtenus en microgravité sont plus homogènes. En microgravité, l'incorporation d'impuretés est aussi réduite.

Les résultats dans leur ensemble indiquent un gain net de qualité en condition de microgravité qui va dans le sens d'une moindre perturbation de la croissance cristalline. Notons que la cristallisation en apesanteur est coûteuse et elle n'est pas à la portée de tous les cristallographes. Ces expériences en milieu quasi idéal sont d'avantages des investigations aux frontières de ce qui est réalisable, ceci dans le but d'en tirer des améliorations pour les manipulations terrestres. Sur terre, en dépit du champ gravitationnel des alternatives existent pour contrôler ou moduler la dynamique des phénomènes de transport moléculaire qui président à la croissance des cristaux de macromolécules biologiques. Il s'agit de la cristallisation en milieux gélifiés (Robert et Lefauchaux, 1988; Vidal et al., 1998) ou par contre – diffusion (García-Ruiz, 2003). Par certains aspects, elles miment des effets de la microgravité. La combinaison des avantages d'une croissance en gel et de l'effet microgravité conduit à une amélioration encore accrue de la qualité des cristaux de protéine (Lorber et al., 1999b).

Cristallisation en gel

On désigne par gel un réseau tridimensionnel constitué d'éléments de base liés d'une façon ou d'une autre et capable de retenir une quantité importante de solvant. Un gel possède la propriété unique de pouvoir contenir et retenir une proportion de molécules de liquide dépassant largement celle de son constituant de base, puisque, dans certains cas un gel peut contenir

jusqu'à 99,9% de solvant. Un gel immergé dans un excès de solvant doit rester inchangé, ou bien gonfler mais jamais se dissoudre ou se désagréger. Deux types de gels sont principalement utilisés : l'un est un gel physique réversible, le gel d'agarose, produit par refroidissement d'une solution de ce polysaccharide, l'autre un gel chimique irréversible, le gel de silice, obtenu par polymérisation de silicate. Ils s'adaptent tous deux très facilement à l'ensemble des dispositifs classiques de cristallisation : dialyse, diffusion à l'interface, « batch » et diffusion de vapeur et même la contre-diffusion en capillaire (Ducruix et Giegé, 1999). Les gels ont prouvé leur capacité à améliorer la croissance de cristaux de molécules organiques (Henisch, 1988) et s'adaptent parfaitement à celle de cristaux de protéines (Robert et Lefaucheur, 1988; Provost et C., 1991). Les avantages du milieu gélifié sont multiples (García-Ruiz et al., 2001). Ainsi, le gel crée un environnement diffusif, exempt de convection, à l'intérieur de ses pores, ce qui génère des conditions optimales de croissance cristallines ; il maintient les cristaux suspendus en solutions, il empêche la sédimentation, ce qui favorise une croissance tridimensionnelle ; piège les agrégats et les minicristaux suspendus et, en évitant leur sédimentation, il limite la nucléation tridimensionnelle sur les surfaces cristallines ; il est de surcroît un atténuateur de vibrations et de variations thermiques. Cet dernier aspect peut se révéler très intéressant d'un point de vue pratique pour conserver intacte la qualité de diffraction des cristaux lorsqu'ils sont transportés jusqu'au synchrotron. Le gel apporte une protection mécanique des cristaux et n'interfère en rien avec leur analyse cristallographique. En effet, les cristaux incorporent la matrice de gel dans laquelle ils poussent, ce qui renforce leurs propriétés physiques et facilite leur manipulation (montage, trempage) (Sauter et al., 2009). La comparaison de la diffraction de rayons X par des cristaux obtenus de lysozyme de dinde, thaumatococcus, AspRS et du virus TBSV (*Tomato Bushy Stunt Virus*) en absence et en présence de gel d'agarose a montré que les milieux gélifiés améliorent la qualité cristalline (Provost et Robert, 1995; Lorber et al., 1999a,b; Biertumpfel et al., 2002; Moreno et al., 2005).

1.3.2 Cristallisation en milieu diffusif par la méthode de contre-diffusion

On a vu plus haut que la mise en oeuvre de la contre-diffusion nécessite l'absence de convection. L'agent cristallisant est déposé largement en excès à l'extrémité du capillaire et la différence de concentration entre l'échantillon et l'agent cristallisant va servir de force motrice

pour la diffusion. L'agent cristallisant diffuse ainsi à travers la solution de biomolécules le long du capillaire en générant une vague de sursaturation d'amplitude décroissante permettant le criblage de plusieurs conditions. Plus le capillaire est fin moins il y a de convection. La contre-diffusion se fait en absence de convection, le transport de molécules se fait par pure diffusion ainsi elle combine des conditions idéales de croissance cristalline avec un processus d'auto-optimisation (Otálora et García-Ruiz, 1996). En effet, les cristaux obtenus par contre-diffusion sont de meilleure qualité (García-Ruiz et al., 1999). Cette méthode a fait ses preuves sur plusieurs systèmes dont voici quelques exemples : lysozyme (Sauter et al., 2001), aspartyl-tRNA synthétase (Moreno et al., 2005), ornithine acetyltransferase (Maes et al., 2006), insuline (Gavira et al., 2002)...

1.3.3 Les systèmes miniaturisés ou de microcristallisation

Le travail dans le domaine de la cristallogénèse a permis de valider de nouvelles méthodes facilitant la production de cristaux biologiques de taille et de qualité compatible avec une étude structurale. Des travaux effectués en impesanteur et en milieux gélifiés ont démontré que l'absence de convection favorise la croissance de cristaux dépourvus de défauts. Ces conditions non convectives, optimales pour la cristallisation, se retrouvent à l'intérieur d'un tube capillaire de diamètre inférieur à 0,1 mm, ce qui correspond typiquement à la taille des canaux microfluidiques. La micro-fluidique permet aussi de travailler sur des volumes d'échantillon très réduits et de paralléliser les essais en vue d'une approche de criblage à haut débit. La microfluidique est un outil qui permettra de franchir un nouveau cap dans l'utilisation des méthodes de cristallisation déjà citées plus haut, comme le batch, la contre-diffusion, la diffusion à l'interface, en réduisant la quantité de produit et en améliorant la qualité des cristaux.

1.4 La microfluidique : un outil pour la cristallographie des biomolécules

La microfluidique est la science et la technologie des systèmes manipulant des fluides au sein de systèmes ayant au moins une dimension de l'ordre du micromètre. La microfluidique a

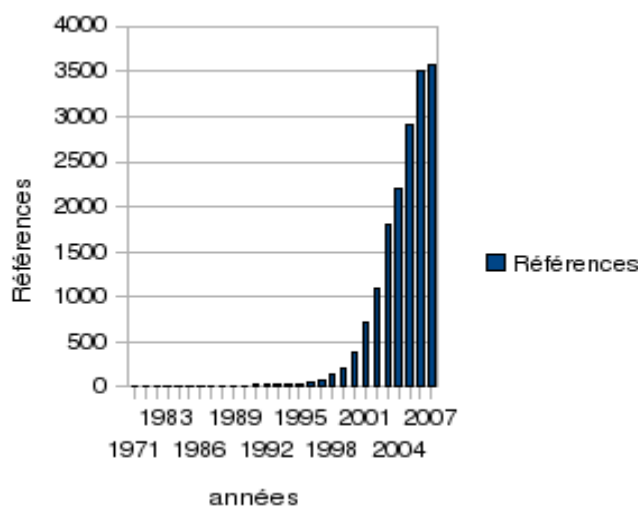


FIG. 1.8: L'évolution annuelle du nombre de références indexées dans la base de données du *Chemical Abstracts Service* (CAS) concernant la microfluidique.

été désignée en 2001 par la Technology Review du *Massachusetts Institute of Technology* (MIT, Cambridge, USA) comme l'une des « dix technologies émergentes allant changer le monde ». C'est un domaine en pleine expansion qui se situe à l'intersection de diverses disciplines scientifiques et offre une foule de possibilités d'applications dans de nombreux domaines de la physique (Psaltis et al., 2006), de la chimie (Demello, 2006; Janasek et al., 2006), de la biologie (Craighead, 2006; El-Ali et al., 2006) et de la médecine (Minc et Viovy, 2004; Yager et al., 2006; Blow, 2007). Cet intérêt s'illustre par le nombre de publications qui a explosé dans les deux dernières décennies comme le montre la figure 1.8 .

Il y a plusieurs avantages à l'utilisation de la microfluidique : la miniaturisation permet de manipuler de petits volumes de réactifs, de réduire l'encombrement, de rendre les analyses portables et de minimiser les coûts. La physique mise en jeu permet une nette amélioration en termes de vitesse des réactions, de sensibilité d'analyse, et dans certains cas, la réalisation de réactions infaisables en dehors d'un système microfluidique. La microfluidique a donné naissance au concept de « lab – on - chip » qui permet la parallélisation des essais en microsystèmes, le criblage à haut débit, l'automatisation des analyses, la combinaison de plusieurs fonctions sur un même système (Whitesides, 2006).

1.4.1 La microfluidique : champ scientifique et technologique émergent

La microfluidique est un champ scientifique, une branche récente de la mécanique des fluides qui traite de la mise en oeuvre, la compréhension, la manipulation et l'exploitation d'écoulement de fluides (liquides et/ou gaz) dans des systèmes ayant au moins une dimension micrométrique. Au sein des canaux microfluidiques de quelques dizaines de micromètres, l'effet de la gravitation cède le pas aux forces de surface. Dans ce contexte, il a tout d'abord fallu résoudre le problème de l'immobilisation des liquides, puis celui de l'avancement des fluides. Une fois les fluides en mouvement, il a bien fallu les arrêter, inventer des vannes par des croisements de canaux (Steven Quake à *Stanford University, USA* - (Quake et Scherer, 2000)). Ensuite, résoudre le problème du non mélange des fluides. Le Dr. George Whitesides du *Department of chemistry and Chemical Biology, Harvard University à Cambridge (USA)*, a mis au point un système fait d'une succession de divisions et de serpentins. Le Pr. Patrick Tabeling de l'École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle (ESPCI), à Paris, a créé une sorte de mini-chaos dans un écoulement en ajoutant une variation de pression périodique perpendiculairement à l'écoulement (Tabeling, 2003). On notera que la nature pratique la microfluidique d'une façon remarquable. Un exemple frappant nous est fourni par les arbres qui sont irrigués par la sève depuis leurs racines jusqu'au bout de leurs feuilles. Nous sommes encore loin de parvenir à gérer les fluides avec autant d'efficacité. La conception des microsystèmes s'envisage suivant deux approches : la microfluidique continue, qui est fondée sur des écoulements dans les canaux, et la microfluidique discrète qui manipule des gouttes (Fouillet et Achard, 2004). On trouve ces deux approches dans les systèmes développés pour la cristallisation des macromolécules biologiques (voir 1.4.4).

Les réalisations microfluidiques ont largement profité des technologies de microfabrication, développées à l'origine pour la micro-électronique et les microsystèmes. Les matériaux traditionnels tels que le verre et le silicium ont été utilisés dans un premier temps. À partir des années 1990, ce domaine s'est considérablement diversifié. Les matériaux à base de silicium paraissant de moins en moins appropriés, de nouveaux matériaux ont fait leur apparition, essentiellement des polymères qui présentent une grande variété de composition et un bas coût. Dès lors, il est possible d'avoir recours à des technologies plus simples, plus rapides et moins coûteuses que celle du silicium pour la réalisation de systèmes microfluidiques. Ces tech-

exemples	R en cm	H en cm	V en cm^3	S en cm^2	$\frac{S}{V}$ en cm^{-1}
cylindre 1	2,75	90	2140	1550	0,72
cylindre 2	0,05	3	0,23	0,094	400

TAB. 1.3: Effet de la miniaturisation sur le rapport surface/volume. Cylindre 1 : dimensions d'un tube « porte-affiche ». Cylindre 2 : dimensions d'un canal microfluidique. Le calcul montre une différence d'un facteur 500 du rapport S/V .

nologies sont dites « douces », car basées sur des élastomères comme PDMS (poly-diméthylsiloxane) ou sur les matériaux plastiques qui tendent à prendre une grande place aujourd'hui dans ce domaine. La microfluidique reste une discipline relativement jeune, de très nombreux dispositifs ont été développés, enrichissant la boîte à outil microfluidique. Un des premiers domaines concernés est celui de l'interface avec les sciences du vivant, recouvrant biologie, santé et biotechnologie (voir 1.4.3). Avant d'aborder l'application de la microfluidique pour concevoir les laboratoires sur puce, nous allons résumer les principaux phénomènes physiques mis en jeu au sein de systèmes micrométriques.

1.4.2 Les phénomènes physiques résultant de la miniaturisation

La miniaturisation en microfluidique permet la manipulation de petits volumes d'échantillons. La réduction de la taille des systèmes et des échantillons va avoir plusieurs conséquences sur les propriétés des solutions et la vitesse des réactions chimiques (Franke et Wixforth, 2008). Cela est en partie dû au fait que lorsque la taille des dispositifs et des échantillons diminue, les rapports surface sur volume augmentent. Prenons deux exemples de cylindres droits tel que le montre le tableau 1.3, avec V ($V = \pi R^2 H$) étant le volume d'un cylindre droit, S ($S = 2\pi R H$) étant la surface interne du cylindre sans les deux bases, R le rayon et H la longueur du cylindre et regardant le rapport surface sur volume. Le calcul montre une différence d'un facteur 500 du rapport S/V . Ceci aura des conséquences sur la vitesse des réactions chimiques.

Différents indicateurs (Squires et Quake, 2005) découlant de la loi d'échelle, comme les nombres de Reynolds, de Grashof et de Péclet peuvent être introduits pour expliquer les propriétés des fluides dans les microsystèmes. Le nombre de Reynolds, Re , est défini comme :

$$Re = \frac{\rho U L}{\mu}$$

avec ρ la masse volumique du fluide (en g/cm^3), U la vitesse du fluide (cm/s), L la longueur caractéristique (cm), μ la viscosité dynamique du fluide (g/cm.s). Re caractérise le rapport entre forces d'inertie et forces de viscosité et dépend de la vitesse d'écoulement, du diamètre du capillaire et de la viscosité du fluide. Un petit nombre de Reynolds entraîne souvent un écoulement laminaire (Hansen et Quake, 2003). Les systèmes microfluidiques sont caractérisés par un petit nombre de Reynolds, $Re < 1$, dans les régimes de vitesses habituels (inférieur au centimètre par seconde), pour de l'eau ou une solution aqueuse plus visqueuse. Les forces de viscosité sont alors prépondérantes. En microfluidiques, les nombres de Reynolds sont tels qu'il n'y a jamais apparition de turbulence. Les mélanges ne se font que par diffusion. Ce comportement se traduit par des flux laminaires.

On définit par ailleurs le nombre de Grashof Gr qui caractérise l'importance du phénomène de convection dans un fluide comme le rapport des forces de gravité et des forces visqueuses. Le nombre de Grashof massique s'écrit de la façon suivante :

$$Gr = \frac{g\alpha\Delta CL^3}{\nu^2}$$

avec g la constante gravitationnelle (cm/s^2), α le coefficient de dilatation en fonction de la concentration (cm^3/mg), ΔC la différence de concentration (mg/cm^3), L la longueur caractéristique (cm), ν la viscosité cinématique (cm^2/s). L'équation montre que les conditions favorables pour avoir moins de convection sont une viscosité élevée, un environnement de microgravité, ou des canaux de petites tailles. Un faible nombre de Gr , en général $Gr < 1$ dans les systèmes microfluidiques, indique que l'interface entre deux solutions distinctes est stable. Dans les systèmes miniaturisés, on considère que la convection est supprimée et le transport de masse est dominé par la diffusion. Ainsi, la miniaturisation permet d'une part une nette amélioration en termes de vitesse de réaction, et d'autre part elle offre un environnement de travail sans turbulence ni convection.

Le nombre de Péclet, Pe , correspond au rapport entre la convection et la diffusion. Il s'écrit de la façon suivante :

$$Pe = \frac{Uw}{D}$$

avec U la vitesse du fluide (cm/s), w la largeur du canal (cm), et D la constante de diffusion du fluide (cm²/s) .

L'équation montre que la condition favorable pour avoir moins de convection est une petite taille des canaux. Un faible nombre de Pe , en général $Pe < 1$ dans les systèmes microfluidiques, indique que le transport de masse se fait par diffusion.

1.4.3 Exemples d'applications microfluidiques dans les sciences du vivant

Les systèmes microfluidiques sont composés de chambres de réactions et de réseaux de canaux de dimensions transverses allant de quelques microns à quelques centaines de microns, et de longueur allant de quelques centimètres à quelques millimètres. Le domaine des microsystèmes d'analyses intégrés, désigné par μ TAS (microsystèmes d'analyse totale ou *Micro Total Analysis Systems* en anglais) permet de miniaturiser les étapes d'analyse, puis de les associer. Aujourd'hui, il est possible d'intégrer en un système unique soit un nombre de fonctions plus élevé, soit un débit important d'analyses en parallèle, soit une combinaison de ces deux progrès (Burns et al., 1998; Thorsen et al., 2002) (Figure 1.9). Ces systèmes sont appelés laboratoires sur puce ou « lab-on-chip ». On envisage grâce à ces avancées, de miniaturiser une usine entière sur une surface équivalente à une carte de crédit.

Nombreuses sont les sociétés qui ont profité de ces nouvelles potentialités pour créer de nouveaux produits basés sur des systèmes microfluidiques répondant aux besoins dans le domaine de la santé, de l'analyse biologique, biochimique, l'environnement... Les laboratoires sur puces sont des systèmes d'analyse à très haut débit, puissants, peu coûteux et qui limitent les contaminations. Voici quelques exemples d'applications (Figure 1.10).

Puce d'électrophorèse : Agilent Technologies ⁷ est une société spécialisée dans les systèmes d'analyse pour la chimie et la biologie. Elle développe des solutions innovantes dans le domaine des puces et des analyseurs associés, dont une puce pour la séparation électrophorétique de protéines et d'ADN développée en collaboration avec la société Caliper Technologies. Ce système est capable de séparer un échantillon de 4 μ l contenant 10 protéines dont la masse moléculaire se situe entre 14 et 200 kDa en moins d'une minute. La

⁷www.chem.agilent.com

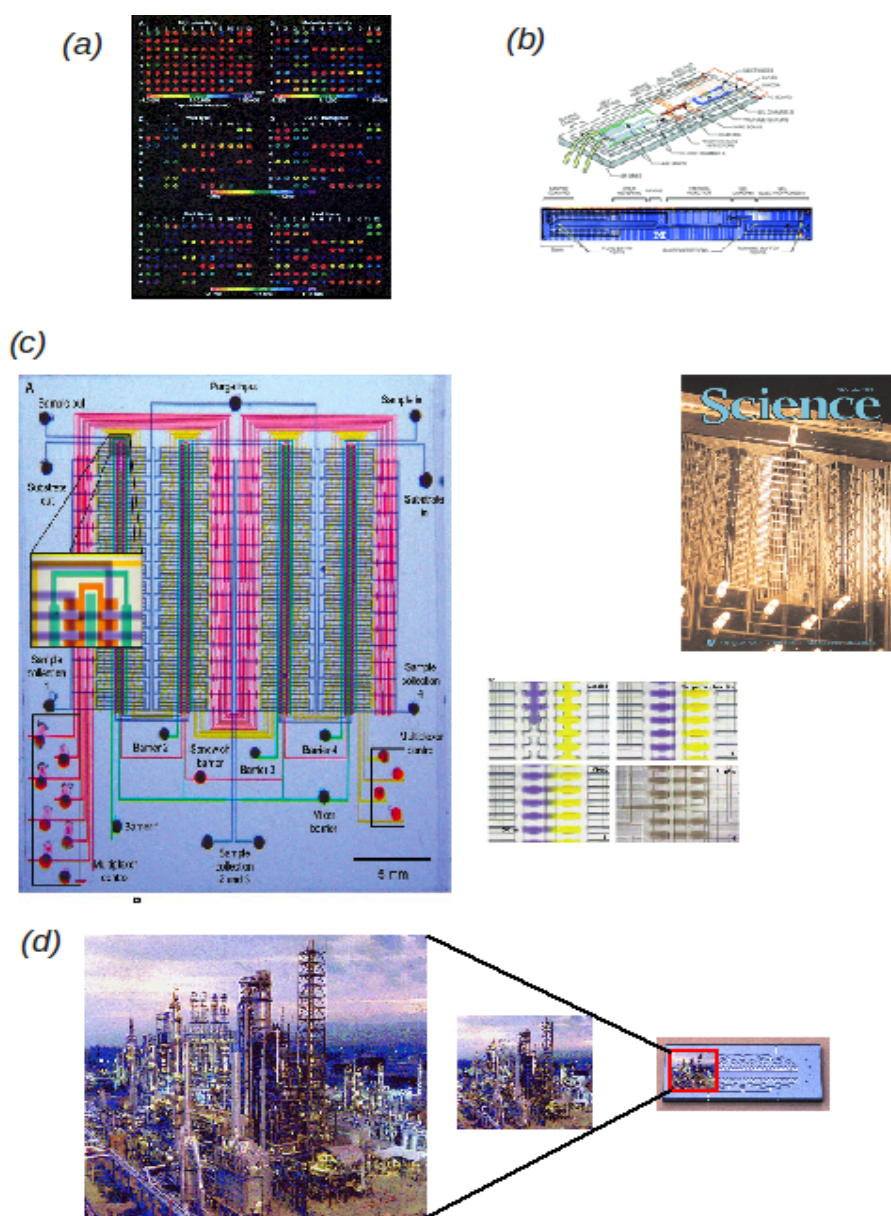


FIG. 1.9: Lab-on-chip : (a) Les puces ADN microarray. En 1995, une nouvelle biotechnologie est apparue : les puces à ADN ("microarray"). Ci-contre, la première puces à ADN avec 45 sondes fluorescentes d'*Arabidopsis thaliana* (Schena et al., 1995). (b) Exemple de puce pour application biologique. En 1998 ce dispositif, capable de titrer des solutions aqueuses, mélanger, amplifier, effectuer une digestion enzymatique, séparer par électrophorèse et détecter a été publié dans Science (Burns et al., 1998). (c) Schéma du comparateur microfluidique MHTSC (Multi High Throughput screening chip). Cette puce intègre 2056 valves, 256 chambres (Thorsen et al., 2002). Le dispositif microfluidique pour la cristallisation des macromolécules qui a fait la couverture de Science en 2002. (d) Le défi que la microfluidique veut relever est de miniaturiser une usine entière sur une surface équivalente à une carte de crédit.

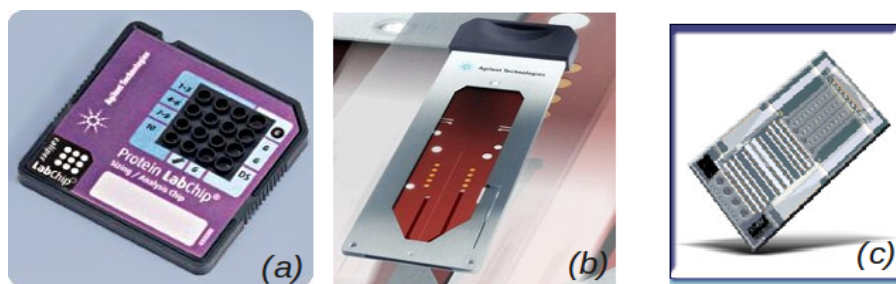


FIG. 1.10: Exemples de systèmes microfluidiques répondant à des besoins spécifiques. a- Puce pour électrophorèse commercialisés par la société Agilent Technologies. b- Puce de chromatographie commercialisés par la société Agilent Technologies. c- Puce à ADN de STMicroelectronics.



FIG. 1.11: Puce Biosite pour diagnostic sanguin.

résolution en taille de la séparation est de l'ordre de 10% et la sensibilité est comprise entre 20 et 2000 ng.μl⁻¹ de BSA (Bovine Serum Albumin) en solution dans un tampon salin. En comparaison, un système d'électrophorèse 2D sur gel polyacrylamide donne la même séparation en 100 minutes sous 125 V avec la même résolution de taille. La Puce pour électrophorèse « labChip® » fabriqué par Agilent est représentée sur la figure 1.10

Puce de chromatographie : La première puce de chromatographie liquide haute performance couplée avec une analyse par spectrométrie de masse a été mise sur le marché en mars 2005 par Agilent Technologies. Il s'agit du « HPLC-Chip/MS system ». Celui-ci est fabriqué en polymère et contient une colonne de chromatographie échangeuse d'ion, une colonne d'enrichissement de l'échantillon (préconcentration) et une colonne de séparation directement terminée par une pointe « d'electro-spray » intégrée sur la puce pour l'analyse en spectrométrie de masse. Les colonnes sont remplies de bille de silice ou de carbone. Les dimensions typiques de la colonne de séparation sont : 50 μm de profondeur sur 75 à 250 μm de largeur pour une longueur comprise entre 43 et 150 mm. La colonne

d'enrichissement permet de concentrer les fragments peptidiques peu nombreux dans l'échantillon. Enfin, la colonne de séparation analytique assure la séparation des 21 peptides (Figure 1.10 Laboratoire sur puce de type « HPLC » d'Agilent Technologies).

La puce Biosite pour diagnostic : La société Biosite ⁸ commercialise des systèmes permettant au corps médical de faire un diagnostic en moins de 15 minutes à partir d'une goutte de sang ou d'urine prélevée sur un malade. La goutte de sang est transportée par capillarité à travers un filtre, et analysée dans un micro-canal fonctionnalisé. Selon la version de puce utilisée, le test immunologique diffère et peut permettre de détecter les symptômes d'une crise cardiaque en relation avec trois protéines du myocarde, ou la présence de drogues chez le patient. La figure 1.11 montre la puce Biosite et l'appareil de lecture des résultats.

Puces ADN : Une puce à ADN est constituée d'un ensemble de fragments d'ADN fixés en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Le développement des puces à ADN a permis d'obtenir des mesures massivement parallèles de la concentration des ARNm d'une cellule dans un état physiologique donné, c'est-à-dire de quantifier le niveau d'expression des gènes transcrits dans une cellule d'un tissu donné (foie, intestin...), à un moment donné (embryon, adulte...) et dans un état donné (cellules malades, saines...). Concrètement, les ARN totaux sont extraits des cellules, sont transformés en ADN complémentaires (ADNc) par rétrotranscription, puis subissent une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction), ce qui va permettre d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour l'analyse. Lors de cette étape, seuls les ARN messagers (ARNm) sont transformés en ADNc. Grâce à des fluorochromes, marqueurs d'ADN qui fluorescent sous un laser, on peut marquer des ADNc provenant de la rétrotranscription d'ARNm. Le marquage des cibles consiste en l'incorporation de nucléotides portant soit le fluorophore cyanine 3 (Cy3TM) ⁹sous forme de Cy3-dUTP, soit le fluorophore cyanine 5 (Cy5TM) ¹⁰sous forme de Cy5-dUTP. Ces 2 molécules sont les plus classiquement utilisées (Tableau 1.4). La technologie des puces à ADN a permis de générer des "images" de l'état de l'expression des gènes d'une cellule. L'application immédiate a été d'améliorer et de préciser le diagnostic, le pronostic et l'orientation thérapeu-

⁸www.biosite.com

⁹indodicarbocynine 3-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite

¹⁰indodicarbocynine 5-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite

cyanine	longueur d'onde émission fluorescence	couleur
Cy3™	563-570 nm	vert
Cy5™	662-670 nm	rouge

TAB. 1.4: Les Fluorochromes

tique dans le cas de pathologies diverses.

Exemple 1 de puce ADN : La division microfluidique de STMicroelectronics ¹¹ a développé une puce à ADN en technologie silicium / verre ainsi qu'un analyseur adapté (injection d'échantillon, détection optique) faisant l'interface avec l'utilisateur (Figure 1.10). La puce contient un système d'amplification de l'ADN (PCR). Cet ADN amplifié est ensuite dirigé vers une zone de détection sur le même circuit comprenant plusieurs sondes greffées avec des fragments d'ADN. Des fragments de l'échantillon s'attachent aux fragments complémentaires sur les électrodes et sont détectés de manière optique. La lecture de la puce est effectuée par mesure de la fluorescence des sondes. Le rendement global d'amplification PCR de cette puce est équivalent à celui d'une réaction traditionnelle en tubes à essai.

Exemple 2 de puce ADN : développée pour le diagnostic du papilloma virus humain (HPV pour *Human Papilloma Virus*). L'infection par le HPV est actuellement la maladie sexuellement transmissible la plus fréquente dans le monde. Certains types de papillomavirus humains (par exemple HPV16 et HPV18) sont associés à des tumeurs malignes, notamment le cancer du col de l'utérus associé neuf fois sur dix à un papillomavirus, qui est la seconde cause de cancer chez la femme dans le monde. La société Greiner BioOne a développé un kit qui permet le génotypage simultané de 24 types de HPV anogénitaux (Figure 1.12). La puce consiste en une plaque de petite taille environ 6 cm x 3 cm et regroupe 12 tests. Chaque test peut détecter jusqu'à 24 types de HPV, chacun étant présent en cinq exemplaires. L'ensemble des étapes de l'analyse, l'extraction de l'ADN, l'amplification par PCR, l'hybridation sur la puce à température ambiante, le rinçage puis la révélation des résultats, ne nécessite que 4 heures. Cette approche est sensible, spécifique, reproductible, rapide et pas cher.

¹¹www.st.com/stonline/products/technologies/labonchip/labonchip.htm

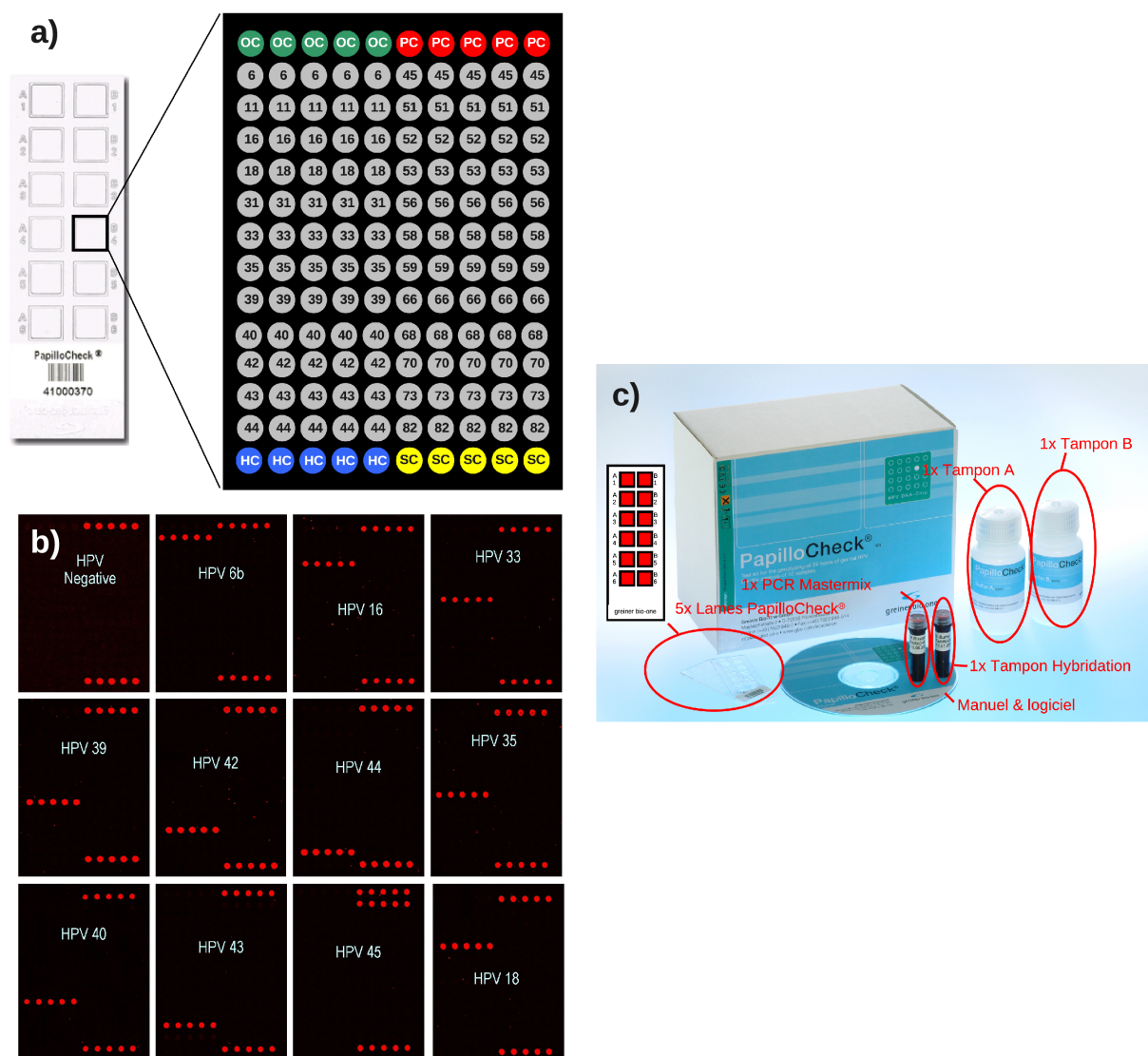


FIG. 1.12: Puce ADN développée pour le diagnostic du HPV. (a) La puce consiste en une plaque de petite taille environ 6 cm x 3 cm et regroupe 12 tests. Chaque test peut détecter jusqu'à 24 types de HPV, chacun étant présent en cinq exemplaires. (b) Lecture des résultats. (c) Le Kit Greiner BioOne pour le diagnostique du HPV tel qu'il est vendu dans les laboratoires. Il contient 5 lames PapilloCheck (puces microfluidiques), 1 PCR Mastermix, tampon d'hybridation, tampon de lavage, un manuel et le logiciel.

1.4.4 Microfluidique et cristallisation des macromolécules biologiques

De la robotique à la microfluidique

Dès les années 90, la miniaturisation et l'automatisation des essais de cristallisation ont permis de diminuer significativement le volume d'échantillon requis pour identifier les conditions de cristallisation d'une nouvelle molécule cible. Les robots actuels utilisent les méthodes de cristallisation classiques qui avaient été mises au point pour les préparations manuelles (dif-

fusion de vapeur, batch). Ils apportent un gain d'échelle certain et facilitent la multiplication des essais parce qu'ils manipulent des volumes de l'ordre du microlitre (robots Tecan, cyberlab et Douglas Instrument) voire 10 à 50 fois moins (robots TTP Labtech et Cartesian). Ces systèmes, qui allient miniaturisation et haut débit, ont l'inconvénient d'être onéreux à l'achat (50000 à 150000 EUR) et à l'utilisation (maintenance, consommables). La technologie microfluidique permet de franchir un pas supplémentaire dans la miniaturisation (Hansen et Quake, 2003; van der Woerd et al., 2003). Elle a pour la première fois été utilisée en cristallisation en 2002 (Hansen et al., 2002). Depuis plusieurs outils microfluidiques ont été développés pour la cristallisation. D'autres dispositifs dérivés destinés à l'étude du diagramme de solubilité des biomolécules (une étape en amont de la cristallisation) ont vu le jour (Hansen et al., 2004; Zheng et al., 2004; Sommer et Larsen, 2005; Anderson et al., 2006; Li et al., 2006; Shim et al., 2007). En effet, plusieurs méthodes de cristallisation ont été adaptées sur puces (Leng et Salmon, 2009) et différents matériaux ont été utilisés pour la réalisation de ces outils. Voyons plus en détail les deux premières réalisations microfluidiques publiées appliquées au criblage haut débit en cristallisation.

La diffusion à l'interface comme méthode de cristallisation

Une puce microfluidique rivalisant au niveau des volumes d'échantillon avec les robots les plus performants a été proposée en 2003 par la société californienne Fluidigm (Frederickson, 2002)¹². Il s'agit de la première puce conçue pour la cristallisation des macromolécules bio-logiques. Cette puce fabriquée en PDMS par lithographie multicouche utilise la méthode de cristallisation par diffusion à l'interface et fonctionne avec un système de vannes activées par pression (Hansen et al., 2002). Elle contient un ensemble de nanochambres de cristallisation, reliées par des canaux. La circulation des solutions dans la puce est contrôlée par des vannes qui s'ouvrent et se ferment sous l'effet de la pression. Bien que son coût soit élevé, elle offre une alternative séduisante aux systèmes robotisés en réduisant la convection dans les chambres de cristallisation et en offrant, par conséquent, des conditions optimales de croissance cristalline. Cette puce évite à l'utilisateur certaines contraintes liées à l'utilisation des robots de cristallisation qui sont par exemple sensibles à la viscosité des solutions et à leur tension de surface. En revanche, elle

¹²www.fluidigm.com/products/topaz-main.html

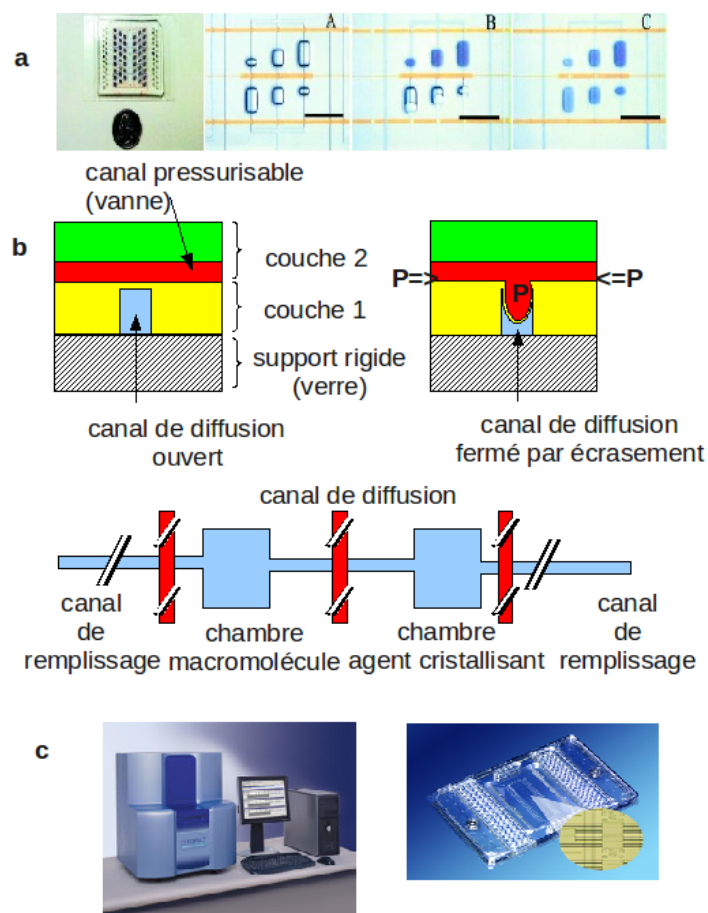


FIG. 1.13: Puce de cristallisation par diffusion à l'interface. (a) La première version de cette puce permet de cribler 48 conditions de cristallisation. Pour cribler l'effet de la concentration sur la cristallisation, la puce présente trois volumes de chambres différents. La quantité d'échantillon utilisé varie de 5 à 20 nl selon la taille des chambres. C'est au niveau des traits en jaune que l'ouverture et la fermeture des canaux à lieu. (b) Coupes schématiques de la puce au niveau d'un canal. Ces puces sont formées de plusieurs couches de PDMS, l'ouverture et la fermeture des vannes se fait sous l'effet de la pression. Les canaux et les chambres sont en bleu et les vannes sont en rouge. Dans un premier temps, les vannes entre canaux et réservoirs sont ouvertes, pour introduire d'un côté la solution de macromolécules et de l'autre la solution d'agent de cristallisation, les vannes du milieu étant fermées. Dans un deuxième temps, les vannes entre canaux et chambres sont fermées pour ouvrir la vanne entre les 2 chambres. La cristallisation se produit par diffusion à l'interface de la macromolécule et de l'agent cristallisant. (c) image de la puce actuelle TOPAZ1.96 avec le système TOPAZ AutolnspeX II Workstation.

sert principalement au criblage de conditions et est peu adaptée à leur optimisation. De plus, ce système ultra-sophistiqué doit être rempli à la main et requiert un appareil pour contrôler l'ouverture et la fermeture des vannes mettant en contact les différentes solutions. Selon les utilisateurs, il est difficile de transférer une condition trouvée avec cette puce vers une autre méthode opérant sur un volume de solution plus important dans le but d'obtenir des cristaux de

plus grande taille. Par ailleurs, l'épaisse couche de PDMS ne permet pas d'analyser les cristaux dans la puce, ni de les extraire pour l'analyse soit biochimique soit cristallographique. Enfin, le prix élevé de cette technologie ne la rend accessible qu'aux industriels ou aux laboratoires publics bien dotés. Aujourd'hui, les variantes du système développées sont la TOPAZ4.96 et la TOPAZ1.96 (Figure 1.13). Elles permettent respectivement de tester 96 conditions de cristallisation en parallèle sur 4 protéines ou 96 conditions de cristallisation sur 1 protéine, avec la possibilité d'effectuer l'analyse aux rayons X dans la puce (Hansen et al., 2006).

Le « batch » comme méthode de cristallisation

Une seconde méthode de cristallisation a fait l'objet d'adaptation en microfluidique : il s'agit de la technique de « batch » en gouttelettes (Zheng et al., 2003; Chen et al., 2005). Cette puce est également réalisée en PDMS, mais elle est de conception bien plus simple que la précédente. Elle fonctionne comme un mélangeur de solutions stock et peut générer des milliers de nanogouttes de composition variée chaque jour. Ce système en constant développement qui trouve de nombreuses applications en chimie (Song et al., 2006) et en biochimie (Baret et al., 2009) est utilisé en cristallisation. Chaque nanogoutte est formée de solution de macromolécule biologique, de tampon, et d'agent de cristallisation. En jouant sur le flux à l'entrée on joue sur la composition des gouttes. Ce système produit des centaines de nanogouttes par jour, il permet de faire du criblage à haut débit. Les nanogouttes sont véhiculées dans les canaux de la puce par un flux d'huile inerte et recueillies en sortie de puce dans des tubes de capillaire en verre. Ainsi stockées, elles peuvent directement être analysées par diffraction rayon X lorsque les cristaux apparaissent (Zheng et al., 2005). Cette approche est donc particulièrement adaptée au criblage à haut débit, pour un coût très raisonnable (Figure 1.14).

L'article ci-dessous présente un travail de synthèse sur les dispositifs conçus pour la cristallisation des macromolécules biologiques entre 2002 à 2007. Depuis ces outils ont été perfectionnés, et d'autres dispositifs ont vu le jour. La suite du manuscrit se focalisera sur un de ces systèmes qui a été au cœur de mon travail de thèse.

Article1 « From macrofluidics to microfluidics for the crystallization of biological macromolecules »

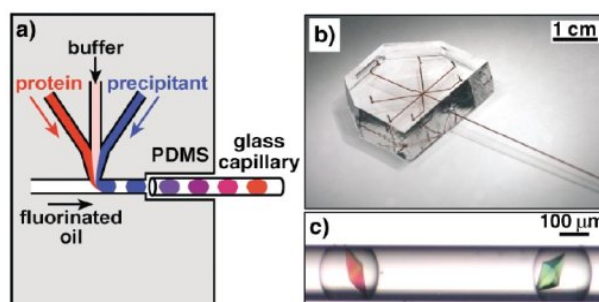


FIG. 1.14: Le batch comme méthode de cristallisation. (a) Le mélangeur de solutions stock permet de générer des milliers de nanogouttes de composition variée ainsi ce système est adapté au criblage à haut débit. (b) On voit le mélangeur des solutions dans le PDMS et le capillaire lieu de stockage des gouttelettes. (c) Des cristaux dans le capillaire de stockage.

From Macrofluidics to Microfluidics for the Crystallization of Biological Macromolecules[†]

Claude Sauter, Kaouthar Dhoub, and Bernard Lorber*

Architecture et Réactivité de l'ARN, Université Louis Pasteur de Strasbourg, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

Received October 1, 2007

CRYSTAL
GROWTH
& DESIGN

2007
VOL. 7, NO. 11
2247–2250

ABSTRACT: This review presents the goals and principles of microfluidic technologies applied to the crystallization of biological macromolecules. A comparison of the devices that are available commercially or described in the literature summarizes the current state-of-the-art in microfluidics. A novel chip based on the counter-diffusion of solute molecules playing the role of crystallization agents is described. Inside the microfluidic channels composing the chip mass transport essentially occurs by diffusion. The chip is made of a rigid polymer that is impermeable to gases and compatible with crystal examination and monitoring in polarized light. The selected material is also transparent to X-rays, and three-dimensional protein structures can be determined from crystals contained inside this device using X-ray diffraction data collected on a synchrotron source. The outstanding quality of the electron-density maps demonstrates that on-chip crystal analysis is feasible. The replacement of conventional crystallization setups by inexpensive microfluidic chips for screening best crystallization agents and automated crystal diffraction analysis is discussed.

Introduction

Since its first meeting in San Diego in 1985, the goals of the international community of crystal growers of biological macromolecules have been to understand the multiparametric process of biocrystallization and to find rational ways to prepare three-dimensional (3D) crystals with better diffraction properties to get sharper electron or neutron density maps from which more accurate 3D structures can be derived.¹ Beside the influence of biochemical variables (such as purity or homogeneity of sequence and conformation) that are specific to biomolecules, investigators have studied the effects of parameters such as pH, temperature, pressure, or gravity.^{2,3} In particular, they found that microgravity levels on board orbiters provide quasi-ideal environments for crystal nucleation and growth because of the strong reduction of convective flow in solution. There, nuclei are surrounded by stable depletion zones and grow by purely diffusive mass transport. As a consequence, the internal order of the crystals is enhanced.^{4,5} On Earth, convection is reduced inside the network of hydrogels such as agarose or silica.⁶ Nuclei immobilized in such reticulated media yield crystals that are of superior crystallographic quality with respect to those growing in the bulk of the solution.^{7,8} Alternatively, viscous forces are predominant, and convective flow is minimal inside capillary tubes with a diameter less than 0.1 mm. Counter-diffusion in capillaries has the supplementary advantage to screen a wide range of conditions in a single experiment.^{9–12} In parallel with this research, experimenters have always tried to find a compromise between the amount of highly pure biological material and the greatest number of crystallization assays. The obvious solution to this problem was to minimize as much as possible the sample volume per assay. On this path, microbatch under oil on only 1 μ L samples was an important intermediary step.¹³ Nowadays, liquid dispensing stations handle volumes as small as a 50 nL at high frequency. The recently introduced microfluidic methods permit one to further scale down crystallization assays. In addition, the microfluidic devices offer many advantages over macrofluidic

methods: they provide convection-free environments and can replace almost all conventional crystallization methods. Their principles are reviewed below, and the impact of the microfluidic technology on biocrystallization is discussed.

Major Characteristics of Current Microfluidic Devices

The microfluidic technology enables the processing of liquid samples down to a few nanoliters. It is thus suitable for a miniaturization and efficient parallelization of broad ranges of biological and chemical experiments that require solution handling and mixing. Inside microfluidic devices or chips, the fluids are contained in capillary channels or in small chambers with at least one dimension inferior to 0.1 mm.^{14,15} This geometry is characterized by a surface-to-volume ratio superior to that of greater chambers. At this scale, liquids flow without turbulence, and two solutions flowing in parallel only mix by diffusion at their interface. Viscous forces dominate over buoyancy forces, convection is minimal, and all molecules in solution displace exclusively by diffusion as in gels or in thin capillaries. So far, all chips dedicated to biocrystallization are made of the elastomer poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and produced by lithography. This soft material is convenient for fast and inexpensive prototyping. Most devices are composed of a glass substrate and one or several layers of PDMS containing microfluidic channels and chambers. Multilayer chips with active valves or pumps are used to build complex integrated fluidic circuits. Positive pressure is applied onto the gas-permeable polymer to remove the air bubbles trapped in dead-end channels.¹⁶ The transparency of PDMS is suitable for optical examination of crystals and monitoring of crystal growth in polarized light. X-ray diffraction analyses of the crystals enclosed in thin PDMS layers have been reported recently.¹⁷

Microfluidics Applied to Biocrystallization

The first application of microfluidics in biocrystallization is a miniaturized version of the free-interface diffusion (FID) technique in which the absence of convection is essential.¹⁸ The chip is a complex network of channels for liquid handling or serving as actuation valves. Its commercial version dedicated to high-throughput screening can test 96 potential crystallization

[†] Part of the special issue (Vol 7, issue 11) on the 11th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Québec, Canada, August 16–21, 2006 (preconference August 13–16, 2006).

* Corresponding author. Address: UPR 9002 du CNRS Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67000 Strasbourg, France. Phone: + 33 3 8841 7008. Fax: + 33 3 8860 2218. E-mail: b.lorber@ibmc.u-strasbg.fr.

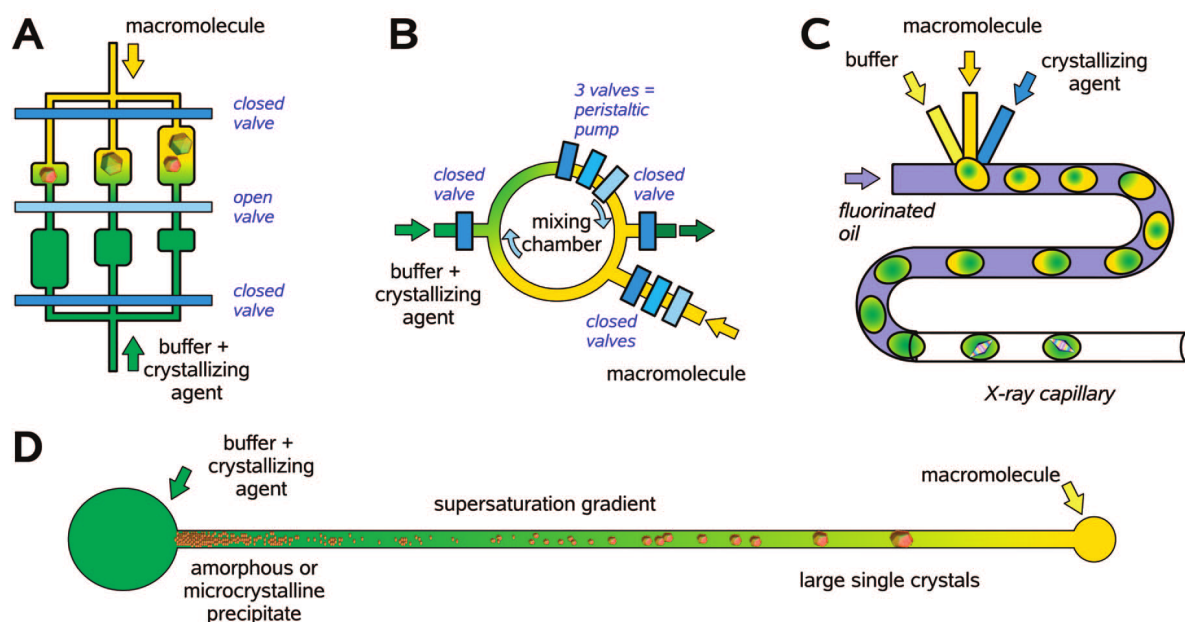


Figure 1. Microfluidic devices for biocrystallization. (A) Schematic view of one of the 96 modules composing the FID chip. An integrated fluidic circuit dispenses the biomolecular and crystallizing agent (CA) solutions in the final chambers. The microchannels are then closed, and those connecting top and bottom chambers are opened with the help of pneumatic valves integrated in the chip. The CA diffuses in the biomolecule chamber and triggers crystallization. Each module is divided into three pairs of chambers with volumes of 5–20 nL to create different final biomolecule and precipitant concentrations. (B) The mixing rotor of a formulation chip designed for the high throughput study of precipitation diagrams. This chip generates biomolecules/buffer/CA mixtures at different concentrations in its 7 nL rotor. The three valves in a row constitute a peristaltic pump that homogenizes the mixture. A CCD camera is used to detect the appearance of a precipitate. (C) The nanobatch chip. Nanodroplets are produced in a microfluidic channel and displaced by inert oil (the flow rate determines the drop size from 10 to 20 nL). Droplets are stored into capillaries connected to the exit of the chip. They can be inspected and crystals can be characterized by X-ray diffraction. (D) Microfluidic setup for counter-diffusion experiments. This method relies on the diffusion of a CA into an elongated chamber (the microfluidic channel) containing a biomolecular solution. A concentration gradient is generated that develops along the entire crystallization chamber. The propagating supersaturation wave of gradually decreasing amplitude tests a broad range of nucleation and growth conditions in a single experiment. While a precipitate may form at the entrance of the chamber, monocrystals may grow at the opposite end. Crystals can be observed and analyzed by X-ray diffraction directly inside the chip.

Table 1. Properties of Microfluidic Systems and Advantages for Crystallization

geometry	consequence	advantage for crystallization in solution
single capillary channel with a diameter < 0.1 mm	high surface-to-volume ratio viscous forces > buoyancy forces small volume	neither convection nor turbulence mass transport by diffusion; reduced sample amount; shorter equilibration time
multiple channels	possibility of mixing solutions numerous assays in parallel	applicable to all crystallization methods, ^a to qualitative precipitation ^b or phase diagrams ^c high-throughput screening of conditions

^a That is, free interface diffusion (ref 18), vapor diffusion (ref 17), and microbatch (refs 21–23, 25). ^b Based on the appearance of a precipitate. ^c Monitored by the occurrence of crystals (refs 19 and 20).

conditions with less than 10 μL of sample solution (Fluidigm, CA). Three parallel chambers are designed to bring into contact different proportions of macromolecular and crystallizing agent solutions (Figure 1A). Afterward FID has been combined with vapor diffusion for fine-tuning the supersaturation achieved in crystallization chambers.¹⁷ On the other hand, a mixing chip has been designed that can be applied to determine precipitation diagrams (Figure 1B).¹⁹ A single assay consumes less than 10 nL sample solution, and it takes just a few hours to perform hundreds of assays. A precipitation map is obtained that serves as a guide to delineate a grid of crystallization conditions.²⁰ Other authors have adapted the batch method.^{21–23} A microfluidic channel plays the role of a pipe in which 10 nL droplets are prepared by mixing biomolecular buffer and crystallizing agent solutions in various ratios. Chemically inert and nonmiscible fluorocarbon oil carries the droplets inside the channel for transfer and storage in X-ray capillaries plugged at the chip

exit (Figure 1C). Thousands of assays can be prepared per day, and crystals can be analyzed directly by X-ray diffraction. High-resolution electron density maps and refined models can be obtained when the microcapillaries are made of Teflon.²⁴ A last microfluidic device uses nanodroplets produced in a similar way but inside an integrated circuit that dilutes or concentrates them by water permeation through the walls of the storage chambers. This chip is destined to establish phase diagrams with total control over supersaturation, nucleation, and growth kinetics.²⁵ These examples give an idea of the potential applications of microfluidics in the field of biocrystallization. Besides working with minimal sample volumes and processing great numbers of samples in parallel, this emerging technology also exploits physical properties of fluid flow and of mass transport that are not accessible in conventional crystallization techniques (Table 1). In particular, equilibration by free interface diffusion that is difficult to achieve under classical conditions becomes feasible

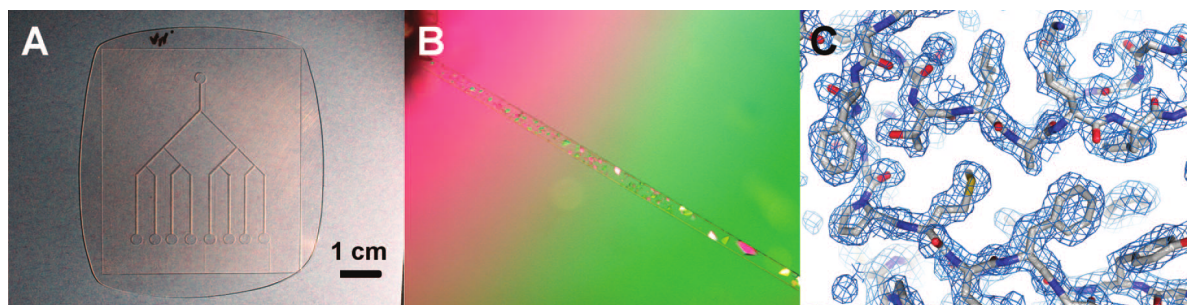


Figure 2. Thaumatococcus crystallization and on-chip X-ray diffraction analysis. (A) Microfluidic chip made of PMMA by hot embossing. The biomolecule sample loaded in the little well at the top fills simultaneously eight crystallization chambers by capillarity. The crystallizing agents are deposited in the eight reservoirs located at the opposite end of the chambers at the bottom of the picture. (B) Typical distribution of crystals inside a microfluidic channel (with a section of $100 \times 100 \mu\text{m}^2$) seen in panel A during a counter-diffusion experiment. Microcrystals have grown where supersaturation was highest, that is, close to the reservoir of crystallizing agent (in the top left corner). Large monocrystals appeared at the opposite end of the chamber where supersaturation was lower. (C) Electron density map at $1.9 \text{ \AA}$ resolution derived from diffraction data collected on a large thaumatococcus crystal contained inside a channel as displayed in panel B (bottom right-hand corner).

Table 2. Potential Benefits of Growth of Biological Macromolecules in Microfluidic Devices

property of microfluidic chips	benefit for crystallization	status
small sample volume	- less biological material required - time saving per individual assay - numerous assays in parallel in a small space - screening and optimization of conditions - faster crystal growth	all proven
material transparency	- observation and monitoring of crystal growth in visible or polarized light - in situ X-ray diffraction analysis	to be demonstrated
convection-free environment	- optimal nucleation and growth conditions, stable depletion zone around the crystal, and mass transport by diffusion - improved lattice order - higher diffraction limit, lower mosaicity	all to be demonstrated

since the solutions inside the chip are in an environment comparable to that existing in a gel or under microgravity.

Toward On-Chip Crystal Production and X-Ray Analysis

In the above inventory, the only current crystallization method that has not yet been transposed inside a microfluidic device is counter-diffusion^{9,10} (Figure 1D). The latter approach relies on the formation of a concentration gradient by diffusing a crystallizing agent through an elongated crystallization chamber. As a consequence, a broad range of supersaturation states is screened in a single experiment.¹⁰ In practice, the method requires working under diffusive conditions as they exist in X-ray capillary tubes. On the basis of the observation that microfluidic channels are an ideal alternative to capillaries, we have designed a crystallization chip consisting of an ensemble of microfluidic channels arranged in a treelike network (Figure 2). In this simple device, the sample is dispensed in all chambers simultaneously. Droplets of crystallizing agents are deposited at the opposite ends of the channels, and counter-diffusion starts immediately. Crystals of several model particles including thaumatococcus, lysozymes, insulin, and turnip yellow mosaic virus have been successfully grown in this chip.²⁶ Some characteristic features of thaumatococcus crystallization by counter-diffusion in a microfluidic channel are shown in Figure 2. On initial prototypes produced in PDMS by soft-lithography the disadvantages of this material were obvious. In particular, (i) gas permeability causes uncontrolled sample dehydration during storage, (ii) less than 1 mm thick layers are flexible and difficult to manipulate, and (iii) the strong absorption and scattering of X-rays by silicon restrict the application for on-chip crystal analysis.

With respect to this last property, polymers such as polymethyl methacrylate (PMMA), polycarbonate, or polyimide seem

more adapted for X-ray diffraction data collection.^{27,28} They are also more rigid at a thickness of only $250 \mu\text{m}$. For this reason prototypes made of PMMA with the same tree-like pattern of channels as above were manufactured at FEMTO-Innovation (Carnot Institute, Besançon, France). The design and fabrication of the chips will be published elsewhere. A preliminary on-chip X-ray diffraction analysis of several thaumatococcus crystals gave complete data sets from which high resolution structures could be derived (Figure 2). As in the case of our PDMS prototypes, data collection was carried out at room temperature using the robotic arm installed on beamline FIP-BM30 at the European Synchrotron Facility (ESRF, France).²⁹ Diffraction data obtained in PMMA chips are characterized by a significantly stronger signal-to-noise ratio that is beneficial for recording reflections at high resolution. For crystals of comparable volumes, the diffraction limit is shifted from $2.8 \text{ \AA}$ in PDMS to $1.9 \text{ \AA}$ in PMMA. This result clearly demonstrates that routine on-chip crystal characterization is feasible. To summarize, the example of our counter-diffusion biocrystallization chip proves that a simple and inexpensive microfluidic device can be fully compatible with a complete crystal analysis from optical inspection to characterization by X-ray diffraction. With 1.5-cm-long channels with a $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ section only about 150 nL of biomolecule solution was consumed per channel. Largest crystals obstructed the channel, and smaller ones were either in contact with the channel wall or suspended in the gel. Our final device will be made of two layers of airtight polymer to prevent premature desiccation and protect sensitive proteins from ambient oxygen. Detergents used to solubilize membrane proteins will facilitate sample loading in the tiny channels. Since counter-diffusion also screens a broad continuum of supersatu-

ration conditions,³⁰ the chances of crystallizing difficult proteins are in principle increased with respect to conventional techniques. Another peculiarity of counter-diffusion is that crystal size and volume vary along the capillary, from smallest ones at high supersaturation near the entrance to largest ones far away from it.¹¹ Further, crystal quality depends upon crystal growth rate; the slower the growth, the better the diffraction properties.^{31,10} A chip equipped with a Peltier element will provide the possibility to work at controlled temperature. With several elements, the effects of a temperature gradient can be explored. As demonstrated above, in situ diffraction analyses eliminate any risky manipulation of the crystals. Similiar to glass capillaries,^{32,11} heavy atoms, ligands, or cryoprotectants can be diffused inside the microchannels prior to freezing crystals for longer data collection sessions. The current chip is now being implemented as a platform for high throughput crystal screening. The standardization of its geometry will facilitate automated sample and precipitant filling on a liquid-handling station.

Using a robotic arm installed on a synchrotron beamline, it will be possible to automate the scanning of the diffraction properties of great numbers of crystals contained in the channels of a single chip. From a practical point of view, such a chip costing not more than a conventional crystallization plate should be affordable to most laboratories. In addition, its small size should also simplify crystal shipping to synchrotrons.

Outlook

Microfluidics has been applied for the first time to biocrystallization five years ago. At present only one device is commercially available, although almost all crystallization methods have been miniaturized at the 1–100 nL scale. The results presented here confirm that a complete on-chip crystal diffraction analysis is realizable if the chip is made of the right material. It can be foreseen that among the coming development steps of microfluidic crystallization devices, the optical examination of high-throughput screening will probably be complemented with diagnostic tools such as monitoring of aggregation by light scattering or recording of precipitation or crystal growth by interferometry (Table 2). Several other issues are still open. New chip materials should be tested to be sure that they are really chemically neutral and biocompatible, and do not release compounds that might interfere with crystallization. Microchannels are perfect convection-free environments for the search of crystallization conditions, but scaling-up and optimization in larger volumes may not be straightforward. In that respect, crystallization in hydrogels or counter-diffusion in capillary tubes may be alternatives.³³ So far, it has not yet been verified whether the crystals grown inside microchannels display superior diffraction properties (higher diffraction limit and lower mosaicity) than those produced with conventional methods as do crystals grown in gels or under microgravity and by counter-diffusion. On the other hand, novel materials and manufacturing processes will certainly push the limits of miniaturization, namely, reduce the section of the channels to 50 or even less than 20 μm . Crystals reaching only half of the latter size would just be right for an analysis on the microdiffractometers that are already installed on many synchrotron beamlines. The generalization of the microfluidic technology will surely make crystal production for structural biology more efficient and cost-effective.

Acknowledgment. We thank C. Khan-Malek, G. Thuillier, B. Gauthier-Manuel (LPMO, FEMTO-ST, Besançon, France), and R. Ferrigno (INL, Lyon, France) for their contribution during the design and realization of the novel microfluidic chip, as well as all the members of the team of the FIP-BM30 beamline (ESRF, Grenoble, France) for their assistance during material and on-chip

crystal characterization. We are grateful to R. Giegé for support and discussions. K.D. benefited from a BDI grant from CNRS and Région Alsace. This project was supported by the Interdisciplinary Research Programme (PIR-CNRS) "Microfluidics and fluidic microsystems". Preliminary results were presented at the 11th International Conference for the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM 11, Québec, 2006).

References

- (1) McPherson, A.; Giegé, R. *Cryst. Growth Des.* **2007**, *7*, 2126–2133.
- (2) Ducruix, A.; Giegé, R., 1999, *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins*; IRL Press: Oxford, 1999.
- (3) McPherson, A. *Crystallization of biological macromolecules.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1999.
- (4) Vergara, A.; Lorber, B.; Zagari, A.; Giegé, R. *Acta Crystallogr. D* **2003**, *59*, 2–15.
- (5) Vergara, A.; Lorber, B.; Sauter, C.; Giegé, R.; Zagari, A. *Biophys. Chem.* **2005**, *118*, 102–112.
- (6) Robert, M.-C.; Lefaucheux, F. *J. Cryst. Growth* **1988**, *90*, 358.
- (7) Miller, T. Y.; He, X. M.; Carter, D. C. *J. Cryst. Growth* **1992**, *122*, 306–309.
- (8) Lorber, B.; Sauter, C.; Robert, M.-C.; Capelle, B.; Giegé, R. *Acta Crystallogr. D* **1999**, *55*, 1491–1494.
- (9) García-Ruiz, J. M.; Moreno, A. *Acta Crystallogr. D* **1994**, *50*, 484–490.
- (10) García-Ruiz, J. M. *Methods Enzymol.* **2003**, *368*, 130–154.
- (11) Ng, J. D.; Gavira, J. A.; García-Ruiz, J. M. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 218–231.
- (12) Moreno, A.; Théobald-Dietrich, A.; Lorber, B.; Sauter, C.; Giegé, R. *Acta Crystallogr. D* **2005**, *61*, 789–792.
- (13) Chayen, N. E.; Steward, P. D. S.; Blow, D. M. *J. Cryst. Growth* **1992**, *122*, 176–180.
- (14) Hansen, C.; Quake, S. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 538–544.
- (15) Tabeling, P. *Introduction to microfluidics*; Oxford University Press: New York, 2006.
- (16) Thorsen, T.; Maerkl, S. J.; Quake, S. R. *Science* **2002**, *298*, 580–584.
- (17) Hansen, C. L.; Classen, S.; Berger, J. M.; Quake, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3142–3143.
- (18) Hansen, C. L.; Skordalakes, E.; Berger, J. M.; Quake, S. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16531–16536.
- (19) Hansen, C. L.; Sommer, M. O. A.; Quake, S. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14431–14436.
- (20) Sommer, M. O. A.; Larsen, S. *J. Synchrotron Rad.* **2005**, *12*, 779–785.
- (21) Zheng, B.; Roach, S.; Ismagilov, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11170–11171.
- (22) Zheng, B.; Tice, J. D.; Roach, S.; Ismagilov, R. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2508–2511.
- (23) Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tesehko, V.; Chen, D. L.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 19243–19248.
- (24) Yadav, M. K.; Gerdt, C. J.; Sanishvili, R.; Smith, W. W.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38*, 900–905.
- (25) Shim, J. U.; Cristobal, G.; Link, D. R.; Thorsen, T.; Jia, Y.; Piatelli, K.; Fraden, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8825–8835.
- (26) Sauter, C.; Lorber, B.; Théobald-Dietrich, A.; Giegé, R.; Khan-Malek, C.; Gauthier-Manuel, B.; Thuillier, G.; Ferrigno, R. *French patent application*. FR 06/06583, **2006**.
- (27) Greaves, E. D.; Manz, A. *Lab Chip* **2005**, *5*, 382–391.
- (28) Barrett, R.; Faucon, M.; Lopez, J.; Cristobal, G.; Destremaut, F.; Dodge, A.; Guillot, P.; Laval, P.; Masselon, C.; Salmon, J. *Lab Chip* **2006**, *6*, 494–499.
- (29) Jacquamet, L.; Ohana, J.; Joly, J.; Borel, F.; Pirocchi, M.; Charraut, P.; Bertoni, A.; Israel-Gouy, P.; Carpentier, P.; Kozielski, F.; Delphine Blot, D.; Ferrer, J. L. *Structure* **2001**, *232*, 149–155.
- (30) García-Ruiz, J. M.; Gonzales-Ramirez, L. A.; Gavira, J. A.; Otálora, F. *Acta Crystallogr. D* **2002**, *58*, 16381642.
- (31) García-Ruiz, J. M.; Otálora, F.; Novella, M. L.; Gavira, J. A.; Sauter, C.; Vidal, O. *J. Cryst. Growth* **2001**, *232*, 149–155.
- (32) Gavira, J. A.; Toh, D.; López-Jaramillo, J.; García-Ruiz, J. M.; Ng, J. D. *Acta Crystallogr. D* **2002**, *58*, 11471154.
- (33) Biertümpfel, C.; Basquin, J.; Suck, D.; Sauter, C. *Acta Crystallogr.* **2002**, *D 58*, 1657–1659.

1.5 Contributions de mon travail de thèse

Mon travail de thèse était centré sur le développement de puces microfluidiques dédiées à la cristallisation et à l'analyse aux rayons X des macromolécules biologiques. Le projet incluait également le passage d'une phase de prototypage à une phase plus industrielle avec l'objectif de déboucher sur des dispositifs fonctionnels et faciles à utiliser. La méthode de cristallisation que nous avons choisi de mettre en oeuvre dans ces microsystèmes est la contre-diffusion. Comme cela a été décrit plus haut, il est essentiel pour cette méthode de réduire les phénomènes de convection et un canal microfluidique remplace idéalement le tube capillaire en apportant grâce à sa taille réduite (section $<100\text{ }\mu\text{m}$) un environnement diffusif. L'unité de base de nos puces microfluidiques est donc constituée d'un canal jouant le rôle de chambre de cristallisation. Chaque puce microfluidique comporte un motif composée de huit canaux microfluidiques reliés entre eux, ce qui permet à l'utilisateur de remplir simultanément l'ensemble des canaux avec l'échantillon et d'effectuer huit essais de cristallisation en parallèle. L'objectif était de développer des systèmes microfluidiques assurant à la fois et de façon efficace la recherche de conditions de cristallisation et leur optimisation à partir de quantités réduites de macromolécules cibles, et permettant l'observation et le suivi des cristallisations par microscopie, puis l'analyse aux rayons X des cristaux. Ces dispositifs devaient être ergonomiques et simples d'utilisation à tous les niveaux : lors du remplissage des différentes solutions, de l'observation des cristaux, de leur manipulation et stockage, et de l'analyse des cristaux *in situ* (« on chip ») sous rayonnement X synchrotron.

Ce projet s'est déroulé en plusieurs étapes et a fait appel à une approche pluridisciplinaire impliquant des collaborations avec deux équipes de spécialistes en microfluidique et en micro-fabrication à l'institut FEMTO-ST à Besançon et à l'institut des nanotechnologies de Lyon. Un dialogue permanent entre spécialistes des nanotechnologies (assurant la réalisation des puces dans un environnement extrêmement propre) et spécialistes de la cristallisation (testant l'utilisation des puces) a été nécessaire pour identifier le plus tôt possible les problèmes liés aux différents aspects du projet : le choix de la géométrie des puces, le choix des matériaux et des méthodes de fabrication, l'adaptation et l'ergonomie des puces aux différentes fonctions envisagées. J'ai été impliquée dans la conception de chaque nouvelle série de prototypes, puis dans la mise en place et la réalisation de tests opérationnels qui incluaient les étapes suivantes : i)

l'évaluation de la qualité globale des prototypes, ii) la manipulation et le remplissage des puces avec différents échantillons biologiques, iii) des essais de cristallisation de ces échantillons, iv) le suivi du processus de cristallisation au sein des puces, v) la caractérisation *in situ* des cristaux obtenus par diffraction des rayons X.

Les chapitres suivants décriront les aspects méthodologiques du travail, puis le cheminement du projet, depuis la fabrication et les tests des premiers prototypes en PDMS (Poly-diméthylsiloxane) par photolithographie jusqu'aux dernières générations de puces réalisées en matériaux plastiques, PMMA (polyméthyl metacrylate) et COC (copolymère d'oléfine cyclique), par des techniques d'emboutissage à chaud (hot embossing) ou de moulage par injection. Ce travail a tout d'abord permis de valider le concept initial de puce microfluidique de cristallisation par contre-diffusion. Il conduit à la conception de dispositifs simples d'utilisation, assurant le criblage des conditions de cristallisation et leur optimisation, le suivi de la croissance cristalline et l'analyse des cristaux par diffraction aux rayons X. La dernière génération de puce a été conçue sur un format standard compatible avec l'utilisation de robots de pipetage pour la préparation des expériences et d'automates passeurs d'échantillons pour l'analyse aux rayons X sur source synchrotron.

En parallèle de ce projet microfluidique, j'ai également participé à l'étude structurale de plusieurs protéines présentant un intérêt biologique direct pour notre laboratoire, des amino-acyl-ARNt synthétases. Lors de cette étude, les milieux diffusifs (croissance en gel d'agarose) ont été mis à profit pour obtenir des cristaux de qualité et à la détermination des structures tridimensionnelles, notamment en présence d'inhibiteurs, à des résolutions jusqu'alors inégalées pour ces enzymes. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée dans le troisième chapitre du manuscrit.

2 Puces microfluidiques : Idées, réalisations, validation

2.1 Introduction

2.1.1 Pourquoi la microfluidique

Toute étude structurale utilisant la diffraction des rayons X passe inmanquablement par la préparation de cristaux de qualité. Le cristal est non seulement indispensable, mais ses propriétés de diffraction conditionnent directement la précision de l'image 3D finale. Les difficultés rencontrées lors de la préparation de cristaux de macromolécules ont conduit notre équipe à développer depuis une trentaine d'années une activité de cristallogenèse qui vise à valider de nouvelles méthodes facilitant la production de cristaux biologiques de taille et de qualité compatible avec une étude structurale. Des travaux effectués en impesanteur (à bord des navettes et stations spatiales) et en milieux gélifiés (au sol et dans l'espace) ont notamment démontré que l'absence de convection favorise la croissance de cristaux dépourvus de défauts (Ng et al., 1997; Lorber et al., 1999a; Biertumpfel et al., 2002). Ces conditions non convectives, optimales pour la cristallisation, se retrouvent à l'intérieur d'un tube capillaire de diamètre inférieur à 0,1 mm, ce qui correspond typiquement à la taille des canaux microfluidiques. Cette constatation est à l'origine même du projet, d'autant que la microfluidique permet aussi de travailler sur des volumes d'échantillon très réduits et de paralléliser les essais en vue d'une approche de criblage à haut débit.

2.1.2 Notre concept de puce multifonctionnelle

Notre projet s'appuie sur ces trois avantages intrinsèques à la technologie microfluidique. Les dispositifs développés ont été pensés pour couvrir à la fois les étapes de recherche et d'optimisation des conditions de cristallisation dans un objectif unique qui consistait à effectuer l'analyse cristallographique des cristaux *in situ*. Nos puces assureront une cristallisation dans des conditions de convection minimale, ce qui favorise la croissance de cristaux de qualité. Le but de ce travail a été de réaliser des puces multifonctionnelles répondant aux conditions suivantes :

1. un principe de fonctionnement simple qui ne requiert ni vanne ni pompe
2. la contre-diffusion comme méthode de cristallisation
3. la recherche des conditions de cristallisation et leur optimisation se font dans un seul et même dispositif
4. un dispositif compatible avec l'observation des cristaux
5. l'analyse cristallographique est réalisable *in situ* pour éviter toute manipulation pouvant détériorer la qualité des cristaux
6. cette analyse peut être automatisée sur ligne synchrotron
7. le coût de revient de la puce sera modeste du fait de la simplicité de sa conception.

2.1.3 Principe de fonctionnement des puces

Les dispositifs microfluidiques conçus pour fonctionner selon la méthode de contre-diffusion (voir introduction 1.2.6 et 1.3.2). Celle-ci combine des conditions idéales de croissance cristalline avec un processus d'auto-optimisation (García-Ruiz, 2003). Cette méthode requiert un environnement diffusif, exempt de convection, qui ne peut être obtenu qu'en tube capillaire, en gel ou en absence de gravité (microgravité). Un système microfluidique est donc particulièrement bien adapté à cette méthode parce que la taille réduite des chambres et canaux microfluidiques conduit à la minimisation de la convection. La puce fonctionne de la façon suivante : d'abord le remplissage de la puce par la macromolécule, ensuite le remplissage par l'agent cristallisant.

L'agent cristallisant va diffuser à travers la solution de biomolécules le long du canal microfluidique en générant une vague de sursaturation permettant le criblage d'une infinité de conditions. Ainsi le canal microfluidique va jouer le rôle de chambre de cristallisation.

2.2 La première génération de dispositif en PDMS lithographie

L'objectif est d'aboutir à un prototype regroupant les caractéristiques essentielles d'un produit « puce multifonctionnelle » à même de remplir les différentes étapes d'une étude structurale selon le cahier de charge défini plus haut.

2.2.1 Géométrie

La première étape du projet a consisté à définir la géométrie de la puce. Trois motifs ont été proposés. Tout d'abord, un ensemble de huit canaux isolés, c'est la géométrie la plus simple équivalente à huit capillaires : des canaux microfluidiques avec 2 réservoirs, un pour déposer la solution de macromolécule et un autre pour déposer la solution de cristallisation. Puis deux dessins avec des canaux connectés : une disposition en peigne à 2 entrées et une arborescence dichotomique. Tous les canaux ont une section de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ pour une longueur de 1,5 cm, donc par canal un volume de 150 nl (Figure 2.1).

2.2.2 Prototypage rapide

Les différentes géométries de puces proposées ont été réalisées en poly-diméthyl-siloxane (PDMS) par lithographie (voir 4.2.2 Méthodes de fabrication) (Figure 2.1). La combinaison du PDMS comme matériau et de la lithographie comme méthode de fabrication permet un prototypage rapide. Les prototypes avec ces trois motifs ont été réalisés, puis testés en effectuant les essais de remplissage. Le remplissage des canaux implique leur fermeture préalable. Les canaux moulés dans la couche de PDMS (d'environ 2,5 - 3 mm d'épaisseur) sont fermés par un couvercle en PDMS collé par activation plasma (Owen et Smith, 1994), une technique de collage irréversible. Les premiers prototypes avaient une épaisseur totale d'environ 5 mm (2x2,5mm).

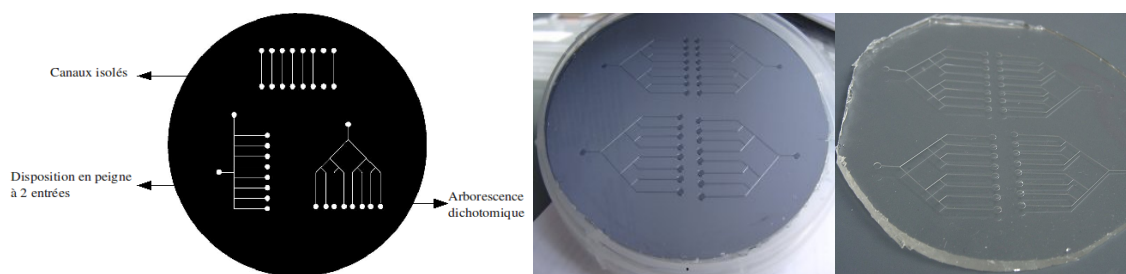


FIG. 2.1: Le prototypage rapide par photolithographie. L'image de gauche montre le masque utilisé pour réaliser les systèmes microfluidiques selon trois géométries de canaux. Les trois motifs testés sont les suivants : le motif du haut est constitué de huit canaux microfluidiques de 1,5 cm de longueur, pour une section de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Pour remplir un canal, il faut 150 nl. L'idée est de faire un essai par canal. Nous déposons la macromolécule dans un puit, elle remplit le canal, puis l'agent de cristallisation est ajouté dans le réservoir. Le motif de gauche est un peigne à deux entrées. Une seule entrée pour la protéine, huit entrées pour l'agent cristallisant, et une entrée pour injecter de l'air. L'idée est de déposer la solution de macromolécule dans le puit, cette solution occupera tout le motif, nous déconnectons les huit canaux en injectant l'air sur le côté. Le motif de droite est une arborescence dichotomique. Nous déposons la solution de macromolécule dans le puit, elle remplit le motif puis nous déposons les agents cristallisants dans les réservoirs. L'image du milieu montre le moule fabriqué en résine SU8 pour réaliser 4 puces simultanément en PDMS par coulage. La dernière image montre 4 puces fabriquées moulées dans une couche de PDMS.

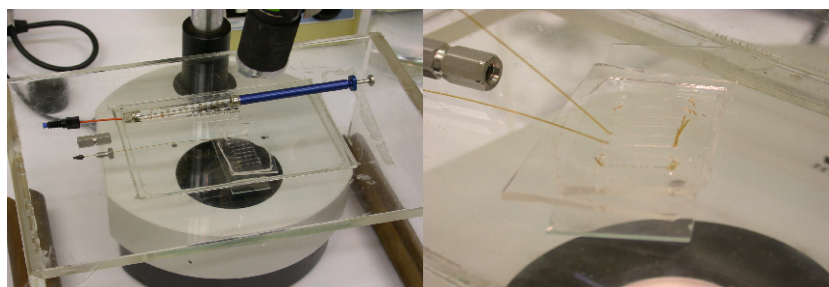


FIG. 2.2: Remplissage des puces en PDMS. Le remplissage actif se fait par injection à l'aide d'une seringue connectée à des capillaires en silicium piqués dans le PDMS tel que le montrent les deux images.

2.2.3 Remplissage des dispositifs

Les premiers essais de remplissage ont été réalisés par injection active à l'aide d'une seringue connectée à des capillaires en silicium piqués à travers le PDMS (Figure 2.2). Ce mode de remplissage actif rendait l'opération délicate, gourmande en échantillon vu les risques de fuites et les volumes morts des tubulures. Nous nous sommes donc orientés vers un autre mode de remplissage, dit passif, utilisant la capillarité pour entrer le liquide dans les canaux. Les prototypes en PDMS (non traité et non modifié) sont hydrophobes et de faible mouillabilité. La simple ad-

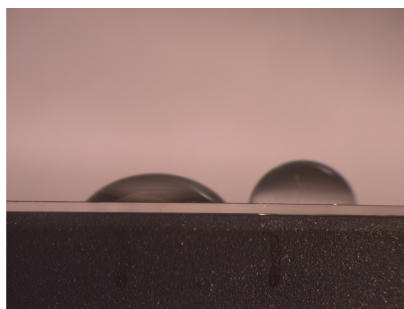


FIG. 2.3: Effet d'un détergent sur l'angle de contact et la mouillabilité d'une solution. L'observation de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à « mouiller » une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. La goutte de gauche : de l'eau avec le β OG à la CMC (20 mM). La goutte de droite : de l'eau. Les deux gouttes ont un volume de 5 μ l. On voit que la goutte avec détergent est aplatie, le liquide s'étale et mouille d'avantage la surface.

dition de détergent à faible concentration devait augmenter l'angle de contact entre solutions macromoléculaires et matériau, et favoriser le remplissage spontané (Figure 2.3). Les questions que nous nous sommes posées sont les suivantes : comment vont réagir les macromolécules en présence de détergent ? quels détergents choisir ? quelle concentration ?

Un détergent est une molécule amphiphile, composée de deux parties d'affinités distinctes, une partie polaire dite hydrophile (ou lipophobe) soluble dans l'eau et une partie apolaire dite hydrophobe (ou lipophile) soluble dans un solvant apolaire. En milieux aqueux, un détergent se place à l'interface, avec la tête polaire dans l'eau et la queue hydrophobe hors de l'eau (dans l'air) pour réduire l'énergie interfaciale du système. Lorsque sa concentration augmente, le système tend à former des micelles pour protéger les queues aliphatiques du milieu aqueux, et y exposer les têtes polaires. Les micelles apparaissent au-delà d'une concentration critique (concentration micellaire critique, CMC). Pour les concentrations inférieures à la CMC, les molécules sont présentes sous forme monomérique. Aux concentrations supérieures à la CMC, les micelles sont en équilibre avec les molécules à l'interface et celles en solution. Ces micelles sont des agrégats qui comportent typiquement une centaine de molécules de détergent. La tension interfaciale décroît à mesure que la concentration en détergent augmente. Au delà de la CMC le nombre de micelles augmente, sans effet sur l'énergie du système, les tensions interfaciales ne diminuent plus.

Il existe quatre types de détergents, qui sont regroupés selon la nature de la partie hydrophile : les anioniques dont la partie hydrophile est chargée négativement, les cationiques dont la par-

tie hydrophile est chargée positivement, les zwitterioniques ou amphotères qui ont une partie hydrophile ayant une charge positive et une charge négative de sorte que la charge globale est nulle et les détergents non ioniques qui ne comportent aucune charge. Les détergents utilisés en biologie sont les zwitterioniques et les non ioniques, ayant des CMC entre 0,2 et 20 mM. Ces détergents ne dénaturent pas les macromolécules biologiques. Ayant une faible CMC, nous n'en mettons qu'une petite quantité, nous introduisons ainsi moins d'impureté. Dans la PDB, nous avons noté que le n-octyl- β -D-glucoside (β OG, un détergent non ionique, ayant une masse moléculaire de 292,4 g/mol et une CMC de 24,5 mM) est le détergent le plus utilisé en cristallisation. En effet, en comparant le nombre de macromolécules biologiques qui cristallisent avec un détergent en présence ou en absence de ligand, le β OG, est de loin le détergent le plus utilisé, suivi du lauryldiméthylamine-oxide (LDAO, un détergent zwitterionique de masse moléculaire de 229,4 g/mol et une CMC de 2 mM). De plus, dans la littérature le n-dodecyl- β -D-maltoside (détergent de la même famille que le β OG, les esters de sucre) a été utilisé pour minimiser l'adsorption des protéine sur le PDMS (Huang et al., 2005). Nous avons décidé d'utiliser le β OG et nous avons varié la concentration du détergent entre 1 et 100% de la CMC pour déterminer la concentration optimale. Dans le cas des puces en PDMS, nous avons utilisé le β OG à la CMC.

2.2.4 Protocole du remplissage

En présence de détergent (β OG), lorsque la solution de macromolécule est déposée dans un réservoir, elle remplit tout le canal ou l'arborescence par capillarité. Une fois le réservoir contenant la solution de macromolécule fermé, l'agent cristallisant est introduit dans le réservoir situé à l'autre extrémité (Figure 2.4).

2.2.5 Choix du motif

Les tests de remplissage ont montré que l'arborescence dichotomique était la plus simple à utiliser, l'échantillon biologique étant distribué en une seule opération dans tous les canaux. L'idée d'utiliser des simples canaux a été abandonnée, car on peut difficilement pipeter manuellement 150 nl. En pipetant plus, nous gaspillons l'échantillon et une des raisons qui justifie l'utilisation de la microfluidique, la réduction des volumes utilisés, devient caduque.

2.2.6 Cristallisation et observation des cristaux

Des essais de cristallisation réalisés avec ces prototypes ont permis d'obtenir des cristaux de quatre protéines, les lysozymes de poule et de dinde (14 kDa), la thaumatine (22 kDa), l'insuline bovine (5,8 kDa) ainsi que du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV, 5.10^3 kDa). Plusieurs essais de cristallisation ont été tentés et montrent la reproductibilité des expériences. Il apparaît que le matériau est compatible avec la croissance des cristaux et l'observation des cristaux au microscope sous lumière polarisée. On peut aussi utiliser la lumière polarisée dans ce type de matériau (Figure 2.4). Ces expériences ont confirmé que le phénomène de contre-diffusion peut être miniaturisé et reproduit en canaux microfluidiques. Le gradient de concentration de l'agent cristallisant est visible par l'effet sur la taille des cristaux. Tout le long de la chambre de cristallisation, nous observons des cristaux allant de microcristaux ou précipités microcristallins en début de gradient, aux monocristaux de taille suffisante pour la diffraction des rayons X en fin de gradient, le tout en une seule expérience et dans un temps relativement court, de quelques heures à quelques jours (Figure 2.4). La durée de l'expérience est d'une semaine. Le PDMS est un matériau poreux qui permet le passage des petites molécules de gaz comme l'oxygène ou la vapeur d'eau. Cette propriété est un désavantage à cause du problème d'évaporation qui dessèche les échantillons dans nos puces en produisant des bulles dans les microcanaux. Pour remédier à ce problème, les dispositifs étaient conservés dans des boîtes en atmosphère humide. Ainsi les cristaux atteignent des tailles ($> 50 \mu\text{m}$) compatibles avec une analyse directe par diffraction des rayons X.

2.2.7 Analyse cristallographique *in situ*

La faisabilité de l'analyse *in situ* des cristaux a été testée au synchrotron sur la ligne de lumière CRG FIP (BM30A, ESRF, Grenoble). Au début de nos travaux, cette ligne était la seule équipée d'un bras robotisé capable de tenir une microplaque et de la positionner dans le faisceau de rayons X. L'analyse des cristaux par diffraction des rayons X a été effectuée à température ambiante. La première tentative était une déception : des cristaux de bonne taille toujours en solution ont été testés, mais aucune diffraction n'a été observée. L'épaisseur du dispositifs (5 mm) était trop importante, tout le faisceau direct était absorbé par le matériau (voir la partie sélection des matériaux 2.3).

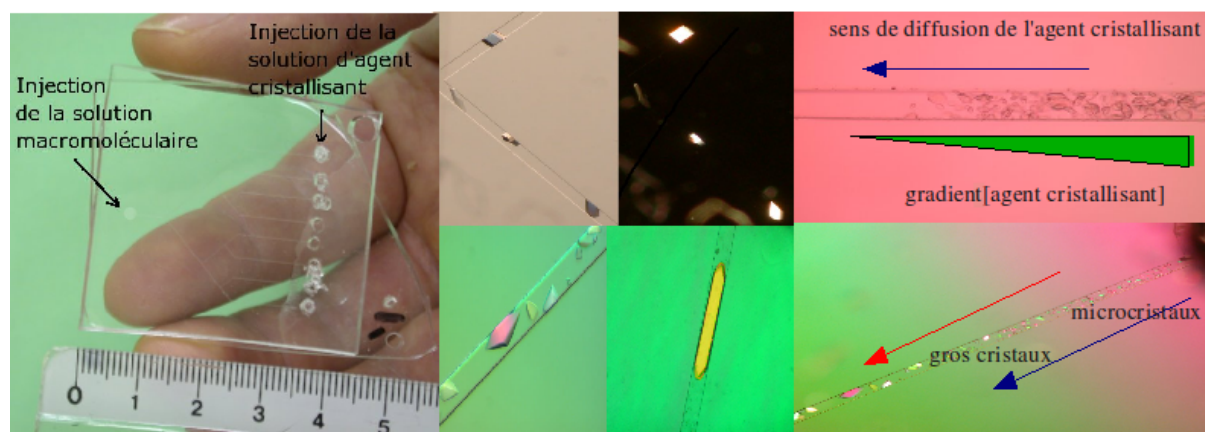


FIG. 2.4: **Cristallisations en prototype microfluidique.** En haut à gauche, une vue d'ensemble d'un premier prototype à géométrie arborescente. Au centre, des cristaux de lysozymes, de thaumatine, de virus obtenus dans cette première version fabriquée par collage de deux couches de polydiméthyl-siloxane (PDMS). On voit une image des cristaux de lysozyme en lumière polarisée (non croisée et croisée). A droite, le gradient d'agent cristallisant s'établit par diffusion de la droite vers la gauche à partir du puits de dépôt. La taille des cristaux augmente et leur nombre diminue à mesure que la concentration d'agent cristallisant (et la sursaturation) décroît le long du canal, selon le principe de contre-diffusion.

Pour que l'analyse *in situ* soit possible, les dispositifs ont été repensés et une réduction d'un facteur 5 à 10 de leur épaisseur a été effectuée. De plus, la fermeture des canaux par une couche de PDMS a été remplacée par un film en matière plastique transparente ou un ruban adhésif mince de quelques microns d'épaisseur. Cette configuration a nécessité la conception d'un porte échantillon pour solidariser entre elles les différentes couches de matériaux et permettre le remplissage, la manipulation et le stockage des dispositifs (Figure 2.5).

Malgré l'utilisation du porte et du film adhésif, le problème de déshydratation persistait. Cette déshydratation est vraisemblablement liée à la nature du matériau et à des fuites de liquide due au décollage de la couche du film adhésif. Du gel dilué (0,2-0,5% m/v d'agarose) ayant pour rôle d'immobiliser solutions et cristaux dans les chambres de cristallisation a été rajouté. Sur la ligne synchrotron, nous avons orienté la puce de telle sorte que le faisceau incident traverse d'abord la couche de PDMS, puis le cristal et enfin la dernière couche de plastique, afin que le signal provenant du cristal ne soit pas absorbé par le PDMS (voir la partie concernant la sélection des matériaux 2.3). Un jeu de 20 images successives a été collecté sur un cristal de thaumatine, soit 40 degrés d'oscillation. Le manque de précision du positionnement de la microplaque du fait de la configuration du bras robotisé ne nous permettait pas d'étendre

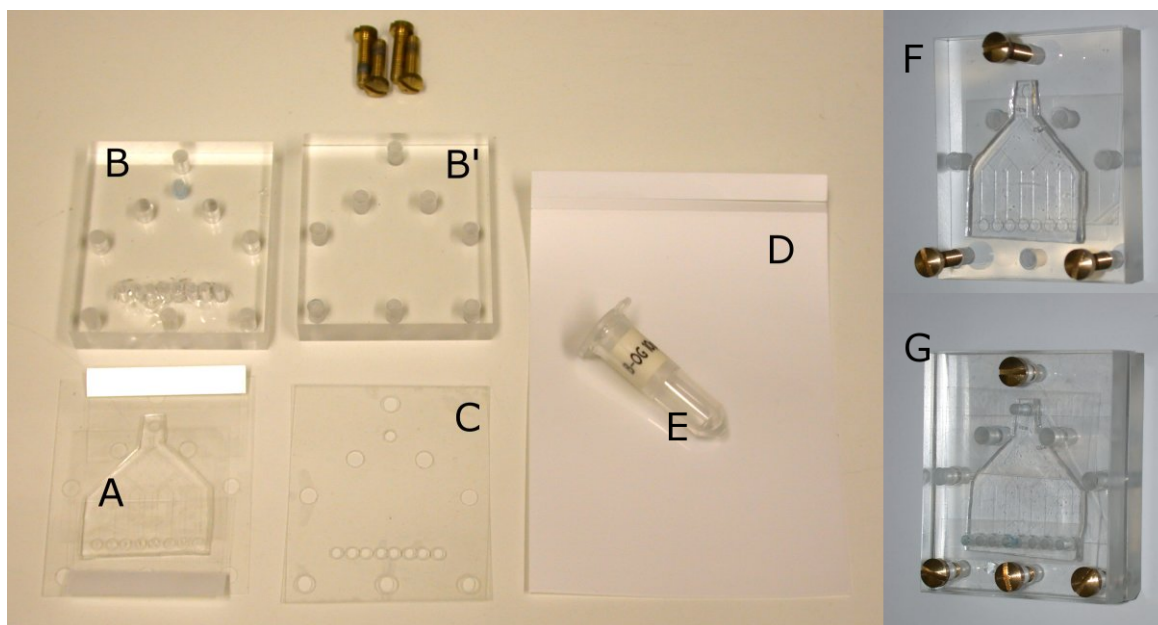


FIG. 2.5: Remplissage passif. Le remplissage passif pour les dispositifs en PDMS a nécessité la conception d'un porte échantillon. Le système est montré sur l'image. Le dispositif est composé des canaux arborescents en PDMS (A) et de deux parties en PMMA (B et B') dans lesquelles les canaux en PDMS sont pris en sandwich tel que c'est montré en (G). Le remplissage passif (F) se fait après fermeture de la puce. Différent système de fermeture ont été testé : un film rigide en plastique (C) ou un film adhérent en plastique (D). (E) est le détergent utilisé pour effectuer le remplissage (le β OG à la CMC).

d'avantage la plage d'analyse sous peine de voir sortir l'échantillon du faisceau. Les données résultantes sont partielles (84% de complétude), mais ont permis grâce à la haute symétrie des cristaux de résoudre la structure par remplacement moléculaire et calculer une carte de densité électronique de bonne qualité à 2.8 Å de résolution (Dhouib et al., 2009).

2.2.8 Bilan

L'ensemble des étapes conduisant d'une biomolécule en solution à la détermination de sa structure 3D, en passant par sa cristallisation, a été testé avec succès. Le dispositif est donc fonctionnel en cristallisation et compatible avec l'analyse aux rayons X bien que non optimal. La validation du premier prototype a démontré la faisabilité du concept de puce que nous proposons. Cette première évaluation et l'identification claire et précise des problèmes liés à la fabrication et à l'utilisation de ces puces ont servi de bases aux évolutions futures des dispositifs.

Ces puces microfluidiques fonctionnelles ont été réalisées en PDMS, matériau adapté au pro-

totypage rapide, en assemblant des canaux réalisés par moulage (« casting ») de PDMS et un couvercle en film plastique transparent. Mais à ce stade, le dispositif en PDMS est d'une épaisseur d'un 1mm, trop souples ce qui impose l'utilisation d'un support rigide lors de leur manipulation (Figure 2.5), et le remplissage nécessite 10 µl de produit, à cause des problèmes de fuite et d'étanchéité rencontrés. L'utilisation du PDMS comme matériau nous a mis face à des problèmes de déshydratation donc à une durée de vie courte de l'expérience de l'ordre de 3 à 7 jours. Cet inconvénient a été contourné en utilisant une enceinte maintenant un environnement humide, ce qui a permis l'obtention de cristaux. Une autre crainte venait du fait que le PDMS peut adsorber les protéines et provoque leur précipitation (Toepke et Beebe, 2006). Enfin, la contrainte majeure du PDMS est observée lors de l'analyse *in situ* des cristaux est l'absorption importante des rayons X incidents par le matériau malgré l'amincissement de la puce et l'orientation du dispositif devant le faisceau de rayons X. En conséquence, l'utilisation d'un autre matériau convenant mieux à notre usage devient une nécessité.

2.3 Sélection des matériaux

Dans cette phase du projet, notre objectif était d'identifier des matériaux les mieux adaptés à l'analyse cristallographique dans la puce sur sources de rayons X classique et synchrotron. Nous allons évaluer les propriétés d'absorption d'autres matériaux que le PDMS pour ne retenir que ceux qui absorbent le moins de rayons X pour la réalisation du prototype final. Le but est d'analyser les cristaux obtenus dans la puce *in situ* sans perdre en qualité du signal. D'une manière générale, aucun matériau n'est idéal et un choix s'impose par rapport aux propriétés du matériau qui doivent être compatibles avec les critères imposés par les conditions expérimentales. Une attention toute particulière est portée au choix du (des) matériau(x) parce qu'en plus ses (leurs) propriétés (mécaniques, thermiques, rhéologiques et chimiques, d'absorption et de diffusion des rayons X), ils conditionneront directement les caractéristiques des prototypes (procédés de fabrication, rigidité, planéité, rugosité, mouillabilité, étanchéité).

Une première sélection des matériaux a été faite selon leur disponibilité, leur transparence à la lumière visible, leur coût et le savoir faire de nos partenaires en matière de microfabrication. Dans ce paragraphe, nous discutons que des propriétés d'absorption et de transparence optique

E	λ	Si	O	C	H	PDMS	PMMA
6 KeV	2 Å	147	28	11	0,4	66	16
20 KeV	0,62 Å	4,5	0,9	0,4	0,4	2	0,56

Table 2.1: Coefficients d'atténuation des éléments composants les matériaux.

aux rayons X des matériaux sélectionnés. Ces matériaux sont le PDMS, le PMMA, le COC, Zeonex 480, Zeonex 48R, Zeonor, le polycarbonate, le polypropylène (PP) et la résine SU8.

Pour y parvenir, il y a deux façons de faire : soit le calcul de l'absorption des matériaux à partir des tables existantes, soit le test des matériaux pour déterminer le meilleur compromis entre transparence optique et aux rayons X, épaisseur, rigidité en les exposant aux rayons X.

2.3.1 Absorption théorique

Dans un premier temps, nous avons étudié le coefficient d'atténuation massique à partir des tables disponibles ¹ dans la gamme de l'énergie du synchrotron de la ligne BM30 de l'ESRF à Grenoble (gamme d'énergie 7-18 keV). Nous savons que l'ensemble des matériaux testés sont composés de Silicium (Si), d'oxygène (O), de carbone (C) et d'hydrogène (H). Le coefficient d'atténuation associé à chacun de ces atomes est donné dans le tableau (Tableau 2.1).

Concernant les matériaux testés, on sait que le PDMS est composé de Si à 38%, O à 22%, C à 32% et H à 8%, le PMMA de C à 60%, O à 32% et H 8%. Ceci nous permet de calculer un coefficient d'absorption relatif qui indique que le PMMA absorbe quatre fois moins que le PDMS dans cette gamme d'énergie. Le COC et les autres matériaux testés ne sont composés que de C et d'H et sont encore plus favorables. Ceci explique le résultat de la première expérience au synchrotron, les rayons X étant entièrement absorbés par la couche épaisse de PDMS. C'est à la fois la nature du PDMS et son épaisseur qui contribuent à l'absorption importante des rayons X incidents et à la production d'un bruit de fond diffus sur les images de diffraction.

L'étape suivante consistait à calculer les spectres d'absorption théoriques des matériaux, mais cette idée a été abandonnée, parce que leur formule chimique n'était pas disponible (secret de fabrication). En effet, des additifs non connus des utilisateurs sont ajoutés aux matériaux selon les marques.

¹<http://physics.nist.gov/PhysRefData>

2.3.2 Analyses aux rayons X

Nous avons également analysé les matériaux aux rayons X au synchrotron sur la ligne FIP-BM30, la même ligne utilisée pour les analyses des cristaux. Ces expériences ont été faites à deux longueurs d'onde : à $\lambda = 0,98 \text{ \AA}$ qui est la longueur d'onde utilisée pour l'analyse des protéines contenant de la sélénométhionine (phasage MAD), et $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, qui est la longueur d'onde habituellement utilisée pour analyser les cristaux au laboratoire. Nous savons que l'absorption d'un faisceau dans un milieu homogène et isotrope est proportionnelle à la longueur du trajet optique suivi par cette radiation. De ce fait, tous les matériaux avaient la même épaisseur 250 μm , sauf le PDMS qui avait une épaisseur 1mm, pour des raisons pratiques car le PDMS est un matériau mou. Tous les matériaux ont été placés à la même distance (300 mm) du détecteur et ont été exposés de la même façon aux rayons X pendant 30 s. Nous avons étudié le signal de diffusion des matériaux. Le passage du faisceau dans l'air a servi de contrôle. Les profils de diffusion ont été tracés aux deux longueurs d'onde. Le bruit de fond de chaque matériau ainsi que les courbes de profils sont discutés dans l'article 2 (Dhouib et al., 2009).

À ce niveau, nous avons sélectionné deux matériaux : le COC et le PMMA, matériaux à la fois rigides, transparents et moins absorbants aux rayons X.

Le COC étant un matériau déjà utilisé pour fabriquer les microplaques de cristallisation, les techniques de fabrications étant connues et mises au point à un niveau industriel même pour des utilisations microfluidique, nous avons décidé d'approfondir les tests de matériaux avec le COC pour déterminer quelle épaisseur maximale devrait avoir la puce microfluidique.

Pour répondre à cette question, nous avons testé l'absorption des rayons X en fonction de l'épaisseur du COC. Cette expérience a été faite à l'IBMC à une longueur d'onde de $1,54 \text{ \AA}$. Nous avons mesuré la différence entre l'intensité de faisceau incident et l'intensité du faisceau sortant en plaçant des plaques de COC d'épaisseurs différentes dans le faisceau. L'intensité du faisceau sortant diminue au fur et à mesure que l'épaisseur du COC augmente. Si nous fixons la quantité maximale de faisceau absorbé à 30%, l'épaisseur maximale de notre dispositif est de 1200 μm (Figure 2.6)

Sur la ligne FIP-BM30, nous avons effectué le test de diffusion du COC à différentes épaisseurs (Figure 2.7). L'ajout d'une couche fine supplémentaire (film ou un ruban adhésif) pour fermer

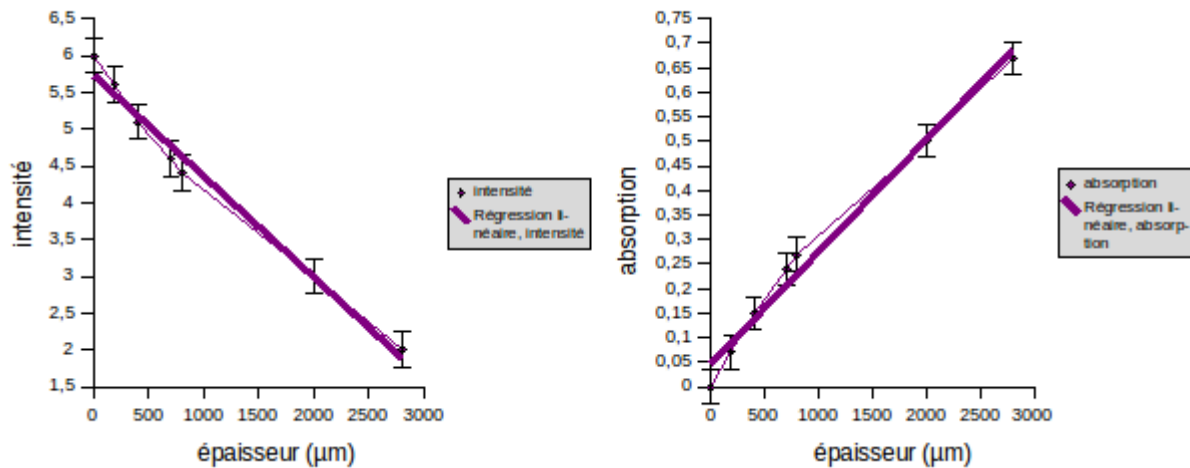


FIG. 2.6: L'absorption du COC. La figure à gauche montre la variation de l'intensité du faisceau mesurée à l'aide d'un compteur à rayon X en fonction de l'épaisseur du COC. L'intensité du faisceau sortant diminue de façon linéaire avec l'augmentation de l'épaisseur du COC. La figure de droite montre la variation de l'absorption du COC en fonction de son épaisseur. Plus la plaque de COC est épaisse plus le faisceau est absorbé.

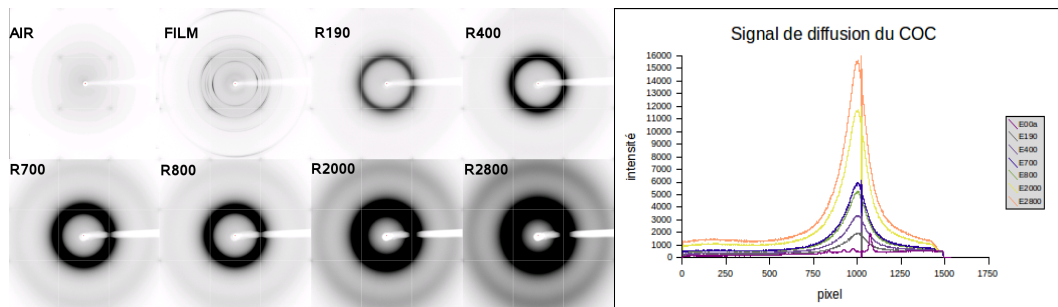


FIG. 2.7: Diffusion du COC. La figure de gauche montre les clichés collectés sur ligne synchrotron lorsque le faisceau traverse l'air, un film plastique, différentes épaisseurs de COC. Les chiffres correspondent à l'épaisseur de la plaque. Le bruit de fond augmente avec l'épaisseur du COC. Les profils de diffusion ont été tracés pour une longueur d'onde de $0,98 \text{ \AA}$ et une distance plaque détecteur de 300 mm. L'ajout d'une couche fine supplémentaire (film ou ruban adhésif) pour fermer les canaux avant remplissage ne modifie pas significativement le signal du matériau. Le diagramme de droite montre les profils du signal de diffusion aux différentes épaisseurs de COC. Sur l'axe des pixels, 0 est le bord et 1500 au le centre du détecteur. Le pic caractéristique de diffusion se situe vers $4,5 \text{ \AA}$.

les canaux avant remplissage ne modifie pas significativement le signal du matériau.

Un test systématique de la réponse du matériau sélectionné (COC) sous rayonnement X classique et synchrotron (bruit de fond des images de diffraction, absorption et atténuation du faisceau incident de rayons X) a permis de fixer une épaisseur totale maximale souhaitable de 1-1,5 mm pour la partie centrale de la puce. Pour avoir le minimum d'absorption de faisceau

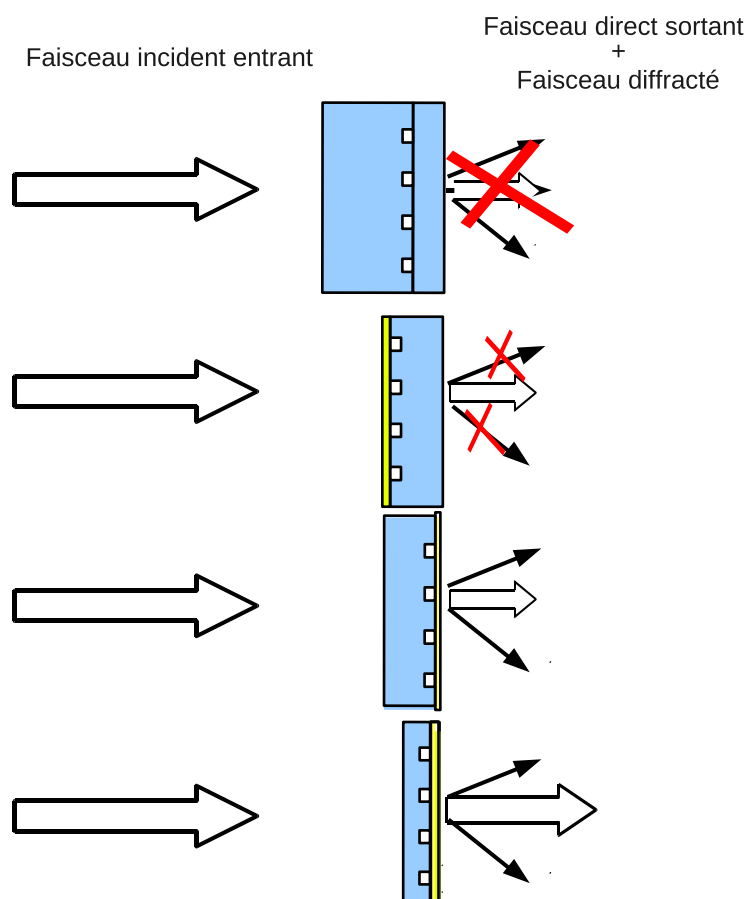


FIG. 2.8: Orientation de la puce dans le faisceau. La couleur bleu représente le PDMS, le blanc le canal microfluidique, le jaune le film en plastique transparent. Dans le système du haut, le faisceau incident est totalement absorbé par le matériau la couche épaisse du PDMS. Il n'y a pas de signal à la sortie. Dans les systèmes suivant l'épaisseur de la puce a été réduite, devant les canaux, il n'y a qu'un film de plastique fin. Pas de signal à la sortie pour le deuxième dispositif, le PDMS absorbe le signal provenant du cristal. Si on change l'orientation de la puce on a un signal à la sortie mais ce signal reste faible. Le quatrième système montre une puce encore plus fine, orientée de la même façon que le troisième système. L'épaisseur traversée par le rayon incident est faible. On a encore plus de signal. Il faut donc que la puce soit la plus fine possible.

diffraqué, la puce doit être orientée devant le faisceau de sorte que les rayons X traversent en premier temps la couche de matériau la plus épaisse, ensuite le cristal, enfin la couche la plus fine. Ainsi le signal provenant du cristal n'est que très peu absorbé (Figure 2.8).

En conclusion, la réponse (absorption / diffusion) d'échantillons de diverses épaisseurs et compositions a été comparée expérimentalement sous rayonnement X conventionnel ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) et synchrotron ($\lambda = 0.9 - 1.6 \text{ \AA}$). Ceci a permis de déterminer quels matériaux offrent le meilleur compromis entre transparence (optique et aux rayons X), épaisseur et rigidité. Le COC et le PMMA sont particulièrement intéressants : ils sont suffisamment transparents pour observer

les cristaux, y compris en lumière polarisée. La suite de projet a consisté à réaliser des moules pour les différentes techniques de réplique et de mettre au point des procédés de fabrication adaptés à ces matériaux. Un travail sur l'épaisseur totale de matériau (paramètre crucial) devait aboutir à un dispositif rigide qui soit manipulable facilement et compatible avec l'analyse cristallographique.

2.4 Conception de nouvelles séries de prototypes en matériaux peu absorbants

2.4.1 Matériaux et modes de fabrication

Les procédés de fabrication disponibles dans les laboratoires FEMTO et INL nous ouvrent des nouvelles possibilités. La première est l'utilisation de l'ablation laser : le matériau est sublimé par l'application localisée d'un faisceau laser intense. Le motif est ainsi gravé dans le matériau. La deuxième possibilité consiste à imprimer un motif dans une fine lame de polymère ramolli par matriçage à chaud (voir 4.2.2). Le motif utilisé est l'arborescence dichotomique, donc le même moule a été utilisé pour le matriçage à chaud. La mise au point des procédés de fabrication et la réalisation des prototypes est faite par nos partenaires. Nous prenons en charge les tests de prototypes. Les propriétés à tester sont la compatibilité avec les conditions d'expérience (milieu de cristallisation, température, pH...), la compatibilité des propriétés de la surface de la puce (rugosité, mouillabilité) et la compatibilité des propriétés physiques (rigidité, transparence, perméabilité) avec l'usage que nous faisons de la puce. Les tests de remplissage et d'étanchéité interviennent en premier, puis les tests de cristallisation, les tests de diffraction avec des macromolécules modèles de type lysozyme, thaumatine, insuline visant la détermination de structures 3D.

Nous avons testé les puces suivantes : puces en PMMA (250 μm) réalisées par ablation laser, puces en PMMA (250 μm) fabriquées par matriçage à chaud, puces en COC (300 μm) produites par matriçage à chaud. Toutes ces puces sont transparentes.

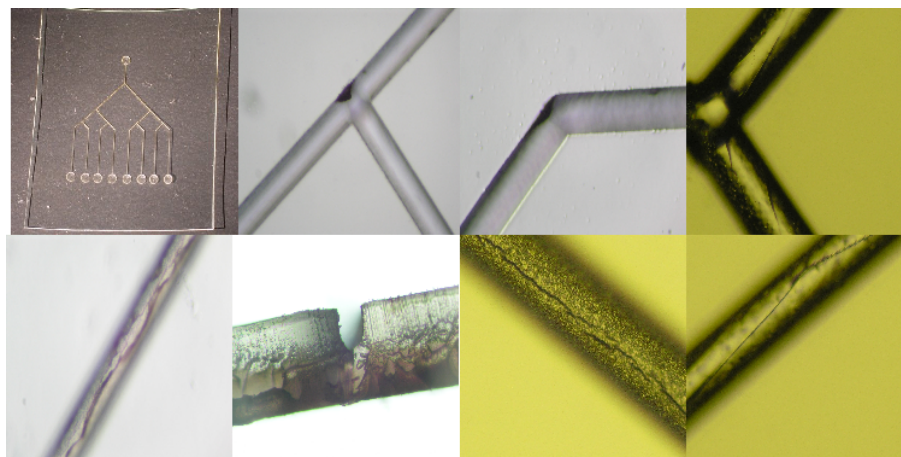


FIG. 2.9: Analyse par microscopie optique des dispositifs réalisés en PMMA par ablation laser. En haut à gauche, une vue d'ensemble du dispositif, fin et rigide. Les images du haut montre l'état des canaux dans la puce avant utilisation, présence de fissures, de résidus de matériaux et différence d'épaisseur au niveau des jonction. La surface est rugueuse. Les images du bas montre l'état de surface de la puce après utilisation : les fissures s'élargissent et la puce devient cassante.

2.4.2 Contrôle de l'état de surface

La première étape consistait à étudier l'état de surface des puces avant utilisation. Des photos des canaux microfluidiques ont été prises sous microscope au laboratoire. Concernant les dispositifs en ablation laser, nous voyons des fissures tout au long du motif, dans les canaux et au niveau des jonctions. Ces fissures ont des trajectoires différentes et peuvent être plus ou moins fréquentes selon les endroits d'une même puce. En comparant les puces d'un même lot, nous observons une hétérogénéité. Nous notons la présence de dépôts de résidus de matériau au niveau des jonctions et une différence de profondeur (Figure 2.9).

Les dispositifs fabriqués par matriçage à chaud en revanche sont lisses, sans fissures et sans étranglement au niveau des noeuds. Les dispositifs sont homogènes entre eux qu'ils soient en COC ou en PMMA. On notera cependant que les dispositifs en COC attrapent la poussière dès qu'ils sont en contact avec l'air libre (Figure 2.10). Il apparaît clairement que le matriçage à chaud donne un résultat plus intéressant en terme de qualité des motifs microfluidiques.

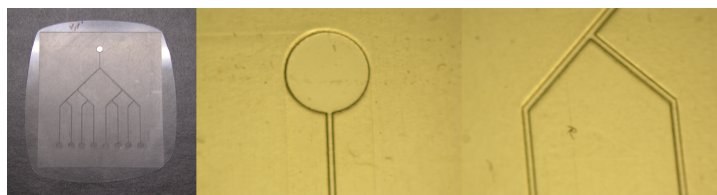


FIG. 2.10: Analyse par microscopie des dispositifs réalisés par matriçage à chaud. À gauche, la puce fine et rigide. Ces montrent l'état de surface des puces en PMMA et en COC. Les surfaces sont lisses.

2.4.3 Remplissage

Pour limiter l'épaisseur des dispositifs, les canaux sont fermés en utilisant un film adhésif. Ces puces sont fines et rigides et pour effectuer le remplissage, nous n'avons plus besoin de support. Nous ouvrons le film au niveau des puits au scalpel. Un premier essai de remplissage à l'éthanol permet de vérifier que la puce n'est pas bouchée. Mais cette étape peut causer des dommages, elle a donc été supprimée. En effet, le film se décolle et la puce fabriquée par ablation laser perd sa transparence et devient cassante. Le remplissage se fait en injectant par une micropipette entre 3 et 5 μl de la solution de macromolécules biologiques avec détergent (le βOG à la CMC). Le remplissage des dispositifs préparés par ablation laser est difficile : un ralentissement a été observé au niveau des jonctions et dans certains cas les canaux sont bouchés. Dans les dispositifs fabriqués par matriçage à chaud la progression du liquide se fait plus facilement et tous les canaux sont remplis en même temps. Une fois la solution de la macromolécule arrivée au niveau des réservoirs d'agent cristallisant, le puit où la macromolécule a été injectée est fermé (film adhésif ou cire). L'agent cristallisant est déposé et les réservoirs sont fermés. Si lors du remplissage, il y a apparition de bulles d'air, c'est que la puce n'est pas tout à fait étanche. L'échantillon introduit dans la puce doit arriver au niveau des réservoirs pour agents cristallisants et les remplir sinon lors de l'ajout de l'agent cristallisant, des bulles d'airs se forment et viennent bloquer l'entrée des canaux. Si il n'y a pas contact entre l'agent cristallisant et l'échantillon, il n'y a pas de diffusion possible et donc pas de cristallisation.

2.4.4 Cristallisation et analyse aux rayons X

La thaumatine, le lysozyme, l'insuline, la protéine clamp β ont été cristallisés dans ces dispositifs. La cristallisation des protéines modèles se fait en 3 jours. Des cristaux ont été obtenus dans

tous les dispositifs. La durée de l'expérience est d'une semaine en dehors de l'enceinte humidifiée car le film se décolle et les puces ne sont plus étanches. La cristallisation dans les puces PMMA abrasion laser est de type hétérogène contrairement à ce qu'on observe dans les puces PMMA ou COC préparées par matriçage à chaud. Les cristaux ont été analysés sur la ligne de lumière FIP. Les résultats obtenus avec ces dispositifs fins ont été concluants. Ils sont détaillés dans l'article qui suit ([Dhouib et al., 2009](#)) :

2.4.5 Article 2 « Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis »

Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis

Kaouthar Dhoubi,^a Chantal Khan Malek,^{*b} Wilhelm Pfleging,^c Bernard Gauthier-Manuel,^b Roland Duffait,^b Gaël Thuillier,^b Rosaria Ferrigno,^d Lilian Jacquamet,^e Jeremy Ohana,^e Jean-Luc Ferrer,^e Anne Théobald-Dietrich,^a Richard Giegé,^a Bernard Lorber^a and Claude Sauter^{*a}

Received 3rd November 2008, Accepted 30th January 2009

First published as an Advance Article on the web 2nd March 2009

DOI: 10.1039/b819362b

Microfluidic devices were designed to perform on micromoles of biological macromolecules and viruses the search and the optimization of crystallization conditions by counter-diffusion, as well as the on-chip analysis of crystals by X-ray diffraction. Chips composed of microchannels were fabricated in poly-dimethylsiloxane (PDMS), poly-methyl-methacrylate (PMMA) and cyclo-olefin-copolymer (COC) by three distinct methods, namely replica casting, laser ablation and hot embossing. The geometry of the channels was chosen to ensure that crystallization occurs in a convection-free environment. The transparency of the materials is compatible with crystal growth monitoring by optical microscopy. The quality of the protein 3D structures derived from on-chip crystal analysis by X-ray diffraction using a synchrotron radiation was used to identify the most appropriate polymers. Altogether the results demonstrate that for a novel biomolecule, all steps from the initial search of crystallization conditions to X-ray diffraction data collection for 3D structure determination can be performed in a single chip.

1. Introduction

X-ray crystallography is a major investigation method in structural biology. In spite of the expanding knowledge of biological crystallogenes, the production of well-diffracting crystals is frequently the rate-limiting step in the determination of the three-dimensional structure of a biomolecule.^{1,2} One reason is that a limited quantity of pure targets (including proteins, nucleic acids, their complexes and viruses) is available. Another one is that usually myriads of assays must be prepared in order to find the crystallant (*i.e.* a salt, an alcohol, a polymer or a mixture of them) in which the best crystals grow. Screening at large scale has become possible owing to the use of robots that can handle micro- or nano-volumes of solution at high speed, which is a necessity in structural genomics and drug design projects to enhance the success of crystallization experiments.³ Recently a new technological breakthrough happened when microfluidics pushed the limits of miniaturization and parallelization with sample volumes much smaller than those dispensed by robots.⁴

So far there are two major types of microfluidic devices dedicated to biomolecule crystallization. The first one is a block of poly-dimethylsiloxane (PDMS) composed of several polymer layers prepared by multi-layer soft lithography. It contains a multitude of pneumatically actuated valves which serve to fill small parallelepipedic chambers with nanovolumes of biomolecule and reagent solutions and to control their mixing. Crystallization occurs by free interface diffusion (FID)⁵ as soon as the latter solutions are brought in contact *via* a short connecting channel.^{4,6} This type of large scale integrated microfluidic chips has been commercialized since 2003 (Topaz[®] crystallizer, Fluidigm Corp., CA) and advanced versions provide more control over the crystallization conditions by equilibrating the solutions through a combination of FID and vapour diffusion.^{7,8} However, the use of these devices is limited by the evaporation due to the permeability of the polymer, the current cost of the chips and the necessity of an external pressure system to activate the experiments.

The second example is a drop-based or digital microfluidic device also made of PDMS. It uses batch crystallization in nanodroplets, or plugs, formed at regular interval inside a microfluidic channel and separated by an immiscible carrier fluid.^{9–11} Biomolecule, buffer, and crystallant solutions are mixed at the junction of independent microfluidic channels. Composition and volume of the droplets can be varied and the latter are stored off-chip either in glass or in plastic capillary tubes for crystal observation and X-ray analysis.^{10,12} Using a similar concept, a phase chip was designed to modulate the volume of the drop by water permeation and so to control crystal nucleation and growth kinetics.¹³

We recently developed a novel microfluidic device to crystallize biomolecules in microchannels by counter-diffusion (CD).

^aArchitecture et réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France. E-mail: c.sauter@ibmc.u-strasbg.fr

^bFEMTO-Innovation IFEMTO-ST, UMR CNRS 6174 and CTMN, 32 avenue de l'observatoire, F-25044 Besançon, France. E-mail: chantal.khanmalek@femto-st.fr

^cInstitute for Materials Research I, Forschungszentrum Karlsruhe, P.O. Box 3640, D-76021, Karlsruhe, Germany

^dLyon Institute of Nanotechnology, INL, CNRS UMR5270, Université de Lyon, F-69003 Lyon, France and Université Lyon 1, F-69622 Villeurbanne, France

^eGroupe Synchrotron, Institut de Biologie Structurale, CEA, CNRS, Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble Cedex 1, France

This efficient crystallization method,¹⁴ initially implemented in glass capillaries,^{15,16} is compatible with direct analysis of crystals by X-ray diffraction¹⁷ and our first results showed that microfluidics is ideal for setting up such kind of experiments in parallel screening on minimal samples volumes.^{18,19} Here we report on the manufacturing techniques used to produce four such chips either in PDMS, in poly-methyl-methacrylate (PMMA) or in cycloolefin-copolymer (COC). We also discuss important practical aspects, such as solution filling, chip handling, crystal growth monitoring and material X-ray scattering background. Crystals of two proteins grown in these chips were analyzed on-chip by X-ray diffraction on a synchrotron source. The derived protein structures contribute to define the characteristics of a chip in which all steps from initial search of crystallization conditions to optimized crystal growth and 3D structure analysis can be performed.

2. Design and manufacture of microfluidic devices

All chips were designed for equilibrating biomolecule and crystallant solutions according to the principle of counter-diffusion. Therefore, the solution containing the biomolecule must be contained in a long chamber with a small diameter (like a capillary tube or a microchannel). The crystallant (*i.e.* the reagent that will decrease the solubility of the biomolecule and bring it to a supersaturated state) enters this chamber from one side and diffuses gradually across the biomolecule solution. When the concentrations of the compounds are sufficient, the biomolecule becomes supersaturated and may start to crystallize.

The layout of all chips consists of a set of eight parallel microfluidic crystallization channels arranged in a tree-like network on a plane substrate (Fig. 1A). Each channel with a length of 1.5 cm and a $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ section contains a total

volume of about ~ 150 nl biomolecule solution. Four chips with the same geometry were fabricated in various materials using three manufacturing routes, two methods based on micro-moulding using either replica moulding (casting) or hot-embossing, and an alternative method consisting of a one-step laser-based direct manufacturing.

Casting of PDMS chips

PDMS is an inexpensive, rubber-like elastomer with good optical transparency and biocompatibility. It is also the most commonly used material for fast, easy and low-cost prototyping of microfluidic devices in research laboratories. For these reasons, the first prototypes were made of PDMS. Casting was carried out using a two-component rubber temperature vulcanized PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) following a standard process based on curing the liquid solution of prepolymer and base (ratio 1/10) on a master.²⁰ The masters were produced in epoxy-based SU8 negative photoresist patterned by photolithography. The initial thickness of the chip of ~ 5 mm was subsequently reduced to 1 mm to avoid excessive X-ray absorption. In the first version of the chip, channels were sealed by a layer of PDMS, which was later replaced by two types of thin adhesive films. The first one (ViewSeal™, Greiner BioOne) is a pressure sensitive sealing film made from a polyester/polyolefin laminate coated with a silicone adhesive ($130 \mu\text{m}$). The second (CrystalClear, Hampton Research) corresponds to Henkel Duck high performance tape (HP260) with a thickness of about $80 \mu\text{m}$ and an acrylic adhesive. These types of films are widely employed to seal crystallization microplates and were manually applied following manufacturer's recommendation to seal PDMS, PMMA and COC microstructures.

Direct laser machining of PMMA chips

Some PMMA prototypes were fabricated by excimer laser ablation. Structuring was performed with the laser micro-machining system Promaster (Optec s.a., France) which operates with an ATLEX-500-SI at a wavelength of 248 nm and a laser pulse length of 5 ns. It is expected that short laser pulses in the ns range significantly reduce thermal contributions to a laser process. The used short pulse excimer generates a raw "flat-top" beam with an intensity fluctuation better than 5%, which is directly applicable without homogenizing devices for a well-defined laser-assisted structuring of polymers. Micro-channels with a depth of $50 \mu\text{m}$ and a width of $100 \mu\text{m}$ were fabricated as illustrated in Fig. 2A. The reservoirs (Fig. 2A, left) have a larger depth ($250 \mu\text{m}$). At the bottom of the reservoir a periodical structure is detected which is caused by the scanning of the laser beam during patterning. A laser beam with a circular aperture of $100 \mu\text{m}$ was used for the generation of the micro-channels (Fig. 2A, right). Using the excimer laser it took 13 min to produce a prototype.

CO₂-laser processing was performed with the laser system "Firestar v40" (Synrad Inc., USA) operating in continuous mode at $10.6 \mu\text{m}$. The beam intensity distribution is Gaussian with a high beam quality. PMMA was patterned using a laser power in the range of 0.2 to 2 W. The processing speed ranged from 10 to 100 mm s^{-1} . The parameters (focus position and line energy,

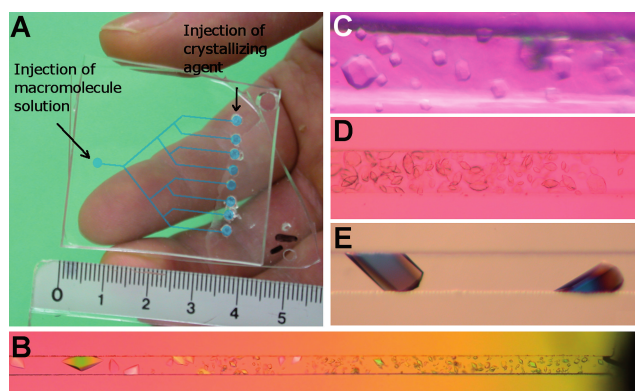


Fig. 1 A chip for biomolecule crystallization by counter-diffusion. (A) Chip geometry: all eight crystallization channels with a section of $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ are connected through a dichotomic tree-like network on one side to a single inlet or well. First, the sample is filled in this well. Then, the crystallant solution is deposited in the wells at the opposite side of the channels (B) Counter-diffusion in a microfluidic channel: this example of thaumatin crystallization shows typical features of a counter-diffusion experiment. On the right-hand side, close to the reservoir the crystallant concentration is highest and induces a strong amorphous or microcrystalline precipitation. By diffusing through the channel from right to left, it creates a gradient of decreasing biomolecule supersaturation that results in a gradual increase of crystal size. Crystals of: (C) bovine insulin, (D) a plant virus and (E) turkey egg-white lysozyme.

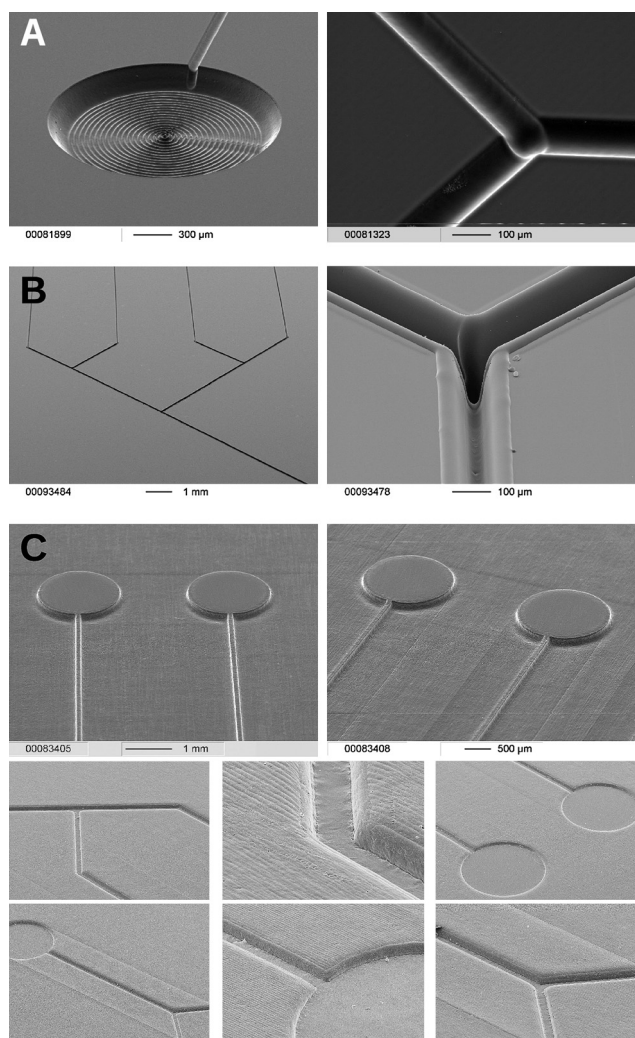


Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) images of different mould and chip versions. (A) PMMA prototypes micromachined with excimer laser radiation: reservoir (left, repetition rate 300 Hz) and close-up view of the branching zone of the manifold (right, repetition rate 100 Hz). (B) PMMA prototypes micromachined with CO₂-laser radiation: detail of a portion of the tree-like structure of the channel network (left) and close-up view of an intersection (right). (C) Hot embossing mould and PMMA and COC chips: (top panel) mould insert fabricated by laser-microcarving (material: stainless steel V4A, laser power 7 W, laser scan velocity 40 mm s⁻¹, scan offset 10 µm) and, on the right, a close-up and rotated view; (middle panel) details of the microfluidic chip made by hot-embossing in PMMA showing, from left to right, channels with split and bend, close-up view of the bend, and two crystallant reservoirs; (bottom panel) details of the microfluidic chip made by hot-embossing in COC showing, from the left to the right, a reservoir for biomolecule to be crystallized, close-up view of the reservoir, and of channel split.

i.e. ratio of laser power to scanning velocity) for channel widths of 50 up to 200 µm and an aspect ratio of up to 1 were determined. As an example, a focus position of $z = 500$ µm above the surface and a line energy of 19.5 J/m were used to generate fluidic channels with a width of 100 µm (Fig. 2B). Patterning was highly reproducible and average deviation between fabricated and desired cross-section areas of microchannels was better than 3%. It took 3 min to prepare a prototype using the CO₂ laser.

Mould manufacture for hot embossing using laser microcaving

Laser microcaving was performed using a solid state laser radiation source (Nd:YAG, wavelength 1064 nm) with laser powers of $P_L = 1\text{--}10$ W in continuous wave mode. The steel substrate used to produce the mould is locally heated up by laser radiation, leading to a temperature rise above the melting temperature. In combination with oxygen as processing gas laser-induced oxidation of the melt occurs. Under special conditions the mechanical tensions inside the oxide layer reach a critical value, and the oxide layer lifts off from the bulk material. The Gaussian laser beam is focused onto the sample surface by an objective lens and scanned over the sample surface *via* deflection mirrors at a speed of up to of 2000 mm s⁻¹. Large areas of up to 110 × 110 mm² can be treated. During one laser scan the generated ablation depth is between 1 and 20 µm. A surface quality with a roughness of $R_a = 100$ nm can be realized. Volume ablation rate is in the range of 10⁵–10⁸ µm³ s⁻¹.

Hot embossing of PMMA and COC biochips

PMMA is an amorphous polymer widely used in microfluidics. COC, a new generation of polyolefin material based on cyclic and linear olefins, has a number of advantages over other thermoplastic polymers like PMMA, such as reduced water absorption (<0.01%), better chemical resistance to aqueous acids and bases and to most polar solvents. COC is also transparent in the visible and near-UV spectrum, biocompatible and becoming popular in the manufacture of opto-fluidic components. PMMA sheets with a T_g of 105 °C were purchased from Goodfellow. Two grades of Topas® COC 5013 and 6013 (from Ticona now Topas Advanced Polymers GmbH) with $T_g = 130$ °C and 140 °C, respectively were purchased as granulates of 1.5 mm diameter. COC 5013 was used for the replication of the chip because its viscosity is lower at high temperature, *i.e.* its melt flow index is higher (48 at 260 °C under 2.16 kg compared to 14 for COC 6013 measured under the same conditions recommended by the manufacturer). For comparison, the melt flow index of PMMA measured at 230 °C and 3.8 kg load following the norm for PMMA [ISO] was 5.5.²¹

Hot embossing was carried out using an in-house built heating press.²⁰ The embossing tool and the polymers (either in the sheet or granulate form) were first heated at a temperature $T = T_g + 50$ °C. The tool was then brought into contact with the substrate and embossed with a controlled force, typically on the order of 0.1 kN for a tool with a square surface of 40 × 40 mm² during several hundreds of seconds so that the polymeric replica conformed to the shape of the mould (Fig. 2C). The tool-substrate assembly was cooled to a temperature $T = T_g - 50$ °C, while the embossing force was still applied. The demoulding took place below this temperature and the embossed polymer substrate was separated from the mould manually. No release layer was used for facilitating the de-embossing process.

3. Crystallization and crystallography experiments

Materials

Bovine insulin, plant thaumatin, turkey egg-white lysozyme, N-(2-acetamido)-2-iminodiacetic acid (ADA), 2-(N-morpholino)

ethanesulfonic acid (MES) and DL-tartaric acid were purchased from Sigma. Hen egg-white lysozyme was from Seikagaku. Turnip yellow mosaic virus (TYMV) was purified as reported.²² All other chemicals were of ACS grade and used without further purification. All crystallization solutions were prepared with distilled water and filtered before use. PEG-3350, agarose (gelling temperature 28 °C at 1% m/v), and Crystal Clear adhesive tape were from Hampton Research and N-octyl- β -D glucopyranoside (β OG) from Bachem. The critical micellar concentration (CMC) of pure β OG is $\sim$ 20 mM (0.58% m/v) in water at 22 °C.⁴⁵

Crystallization assays

Protein or virus stock solutions were filtered over 0.22 μ m membranes. Solutions used for crystallization assays contained 0.3–1% w/v β OG. Experiments performed in the presence of 0.5% (m/v) agarose sol were set up as following: a 2% (m/v) agarose stock solution was heated at 90 °C during 5 min and cooled to 35 °C before addition to the protein/detergent solution. The final mixture was kept at 35 °C until it was loaded in the channels. The standard procedure for growing crystals in all chips at 20 °C consisted in three steps. First, the sealed wells were opened. Second, 3 μ l macromolecular solution was injected (or deposited) with a Hamilton Microliter syringe in the sample well to fill the entire channel arborescence. Third, 2 μ l reagent was introduced in each of the 8 crystallizing agent wells with a micropipette. After each filling step, the wells were sealed without delay to prevent the evaporation of well solution and the displacement of channel solution. Following couples of solutions were used to produce crystals: 17 mg mL⁻¹ insulin and sodium phosphate 0.5 M pH 10.2; 34–47 mg mL⁻¹ thaumatin and 1.5 M sodium tartrate containing 0.1 M ADA pH 6.5; 80–110 mg mL⁻¹ turkey lysozyme and 2–4 M NaCl buffered with 0.1 M sodium acetate pH 4.5; 80 mg mL⁻¹ hen lysozyme and 0.8 M NaCl containing 30% (m/v) PEG-3350 and 0.1 M sodium acetate pH 4.5; and finally 35–80 mg mL⁻¹ TYMV and 2 M ammonium phosphate with 0.1 M MES pH 3.7.

X-ray analysis

All X-ray analyses were performed at room temperature (T = 20–25°) on the automated synchrotron FIP-BM30A beamline^{23,24} of the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble France). Material samples and chips were attached onto a microplate that was held in the beam by the robotic arm for single image or 30–60° oscillation data collection on an ADSC Quantum 315r detector.

The scattering signal of various materials including a 1 mm-thick layer of PDMS and 220–250 μ m thick sheets of PMMA, SU8, polypropylene (PP), COC and cyclo-olefin-polymers (COP) (Zeonex 480 or 480R, Zeonor), was measured for an exposure of 30 sec with a sample-to-detector distance of 350 mm. Images were recorded at the wavelengths 0.98 Å and 1.54 Å commonly used in structural biology. Scattering images and radial intensity plots were compared using adxv X-ray image viewer (<http://www.scripps.edu/~arvai/adxv.html>).

Crystal characterization was performed a week after the beginning of the crystallization assays. Crystals were irradiated inside the chips. In a first set of experiments, thaumatin crystals

grown in parallel in PMMA and PDMS chip were compared with a total oscillation range of 40° (ESRF storage ring operating at 200 mA). In a second one, thaumatin crystals grown in COC chip in the presence of agarose gel as well as lysozyme crystals were analyzed with a total oscillation range of 60° (storage ring operating at 50 mA). All analyses were carried out at the selenium edge (wavelength of 0.98 Å), exposure time and angle were adjusted to avoid too many overloaded pixels. Reflections were indexed, processed, and scaled using XDS package²⁵ and structure factors were generated using the program TRUNCATE from CCP4.²⁶ Structures were solved by molecular replacement and refined with PHENIX.²⁷ Thaumatin and hen lysozyme structures contained in the PDB (accession codes 1THW and 1AZF, respectively) were used as search models.

4. Results and discussion

Counter-diffusion in microfluidic environments

Beside sample volume miniaturization, microfluidic systems present a supplementary advantage for crystal growth: channels and chambers with sections below 100 $\times$ 100 μ m² provide convection-free environments. This property was instrumental for the design of the aforementioned FID chip. Indeed, the absence of convection is required in FID to ensure a gentle mixing of biomolecule and crystallant solutions. Thus, it will occur by pure diffusion at the liquid–liquid interface created when the two solutions are brought in contact.

More generally, it was demonstrated that crystals of superior quality can be grown when convection is low or negligible, as it is the case under microgravity,²⁸ within hydrogels (like agarose or silica)²⁹ or inside thin capillary tubes. Convection-free environments are also a prerequisite for counter-diffusion. In the absence of convection the crystallant diffuses into the biomolecule solution and generates a concentration gradient inside an elongated crystallization chamber like a cylindrical capillary tube³⁰ (otherwise both solutions mix by convection and reach quickly the equilibrium.) For this reason CD is the most powerful method for searching and optimizing crystallization conditions.

In the case of FID chips, typical lengths for crystallization chambers are 0.1–1 mm and crystallant concentration will equilibrate rapidly. If one considers Einstein's relation for the mean-square displacement of molecules in solution $\langle x^2 \rangle = 2Dt$ and an average diffusion coefficient for a salt $D = 10^{-5}$ cm² s⁻¹, small crystallant molecules will cross a 1 mm chamber in a few minutes and equilibration will be achieved in a few hours. Biomolecules diffuse 1 to 2 orders of magnitude slower than the crystallants (for instance $D = 1.2 \times 10^{-6}$ and 10^{-7} cm² s⁻¹ for lysozyme and a small quasi-spherical plant virus, respectively). In that respect, FID can be seen as a delayed batch experiment in which biomolecule and crystallant solutions mix slowly by diffusion.

In contrast, CD setups require starting conditions far from equilibrium, *i.e.* high crystallant concentration, and much longer crystallization chambers, measuring typically 4–5 cm. The same small molecule will take about 15 days to cross the chamber and, doing so, it will generate a concentration and a related supersaturation gradient. Each single CD experiment is actually characterized by the propagation of a supersaturation wave of gradually

decreasing amplitude that samples a broad range of nucleation and growth conditions^{15,31} At the entrance of the chamber a precipitate may form and at the opposite end single crystals may grow. Major experimental prerequisites for such a crystallization experiment, namely a long diffusion path and the absence of convection, are easily met inside a microfluidic channel. Therefore, microfluidic devices are very well adapted for the miniaturization of counter-diffusion experiments^{19,32} as it is illustrated below.

Chip design and production

In the first step of this project, several layouts including alignments of isolated channels and comb- or tree-like arrangements of channels have been compared (not shown). The retained design consisting of parallel channels arranged as a dichotomic tree confers two practical advantages (Fig. 1). Firstly, the macromolecular solution can be loaded manually in a single operation through one inlet (the submicroliter sample volume required per individual experiment would be hardly manageable by hand). Then the solution flows simultaneously in the 8 crystallization chambers with a length of 1.5 cm and a section $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. Secondly, dead-volume, liquid handling, and sample consumption are minimal. Crystallization chambers are connected with voluminous reservoirs in which the concentrated crystallant solutions are deposited. The volume of a reservoir is typically 10 to 100 times that of the channel to ensure a large excess of crystallant (salt, alcohol or polymer) and create a supersaturation gradient by diffusion. Reservoir solutions can be handled manually or *via* a liquid dispensing system.

Four chips with the same geometry were fabricated in various materials using three manufacturing routes. Two methods are based on micro-moulding, therefore involve the use of a master or mould with *negative* features to produce the parts with the desired *positive* features in a soft elastomer (PDMS) or rigid thermoplastic polymers (PMMA, COC) using respectively replica moulding or hot-embossing in a subsequent replication step. The alternative method involves a one-step laser-based direct manufacturing with neither a mask nor a mould. Advanced laser processing was used in different instances, for generating a metallic mould for hot embossing using micro-caving and for direct patterning of the microfluidic circuit in polymer. The use of lasers for chip manufacture, in particular for microfluidics applications, was the object of recent reviews.^{33–35}

The first chip was made of PDMS by soft lithography which is very suitable for fast prototyping. PDMS prototypes showed that crystals could be grown and analyzed in a chip. Although they served to validate the concept, we abandoned them because of several practical limitations explained below. For this reason, chip prototypes with the same geometry were then produced in PMMA and COC by either laser ablation or hot embossing.

UV-laser was applied for micro machining fluidic components in PMMA by photo-ablation (“cold ablation”) in the prototyping phase.³⁶ UV-laser-assisted machining is relatively slow and it cannot be used beyond small series to produce a large number of components at a low cost. On the other hand, infrared (IR) lasers are commercial equipment widespread in industrial applications. Unlike UV laser ablation of polymers, IR laser processing is a purely thermal process. IR laser machining evaporates the substrate material directly by applying heat with the laser beam.

CO₂ lasers can provide a cost effective alternative to UV lasers for structuring some polymer substrates. In particular, a CO₂ laser can be used not only for prototyping but also cost-effective production of microstructured components. Prototypes made in PMMA were manufactured by maskless direct-writing using an excimer or a CO₂ laser (Fig. 2A and B).³⁷

Hot embossing is a micro-replication technique used to imprint microstructures into a polymer substrate with a mould (Fig. 2C). It exploits the flow of the polymer material heated above its glass transition temperature and compressed between two plates under constant load. In contrast to other more conventional forming processes (extrusion, injection), the hot-embossing process may be performed at temperatures slightly higher than the glass transition temperature of the polymer. It is generally used to manufacture prototypes or small series, whereas the micro-injection process is more adapted to produce micro-components in large batches, *i.e.* mass production. The mould used for this microreplication technique was produced by laser-assisted micro-patterning. The main challenge is to obtain defect free and smooth surfaces during laser processing. Laser-micro-carving^{38,39} which can be described as laser-induced oxidation was used to produce the mould in stainless steel V4A. The patterning of metallic surface enables a “clean” patterning process with only a small amount of debris and melt. No release layer was used for facilitating the de-embossing process. The microstructures from the master were fully transferred to the polymer replica with a good fidelity. Fig. 2C shows pictures of details of the hot-embossed biochips in PMMA and COC substrates.

Material constraints in biocrystallization applications

The materials used to manufacture our chips must meet some requirements to facilitate sample loading in the microchannels, crystal growth monitoring and be suitable for on-chip crystal analysis. First all polymers employed here are essentially hydrophobic. *A priori* this is a hindrance for the filling of aqueous solutions in channels by capillarity. We have found that the addition of a small amount of detergent (*e.g.* 0.3–1% w/v of β OG) greatly accelerates the introduction of biomolecule solutions inside PDMS, PMMA and COC. For instance, a 3 μl droplet of aqueous solution with detergent fills the channels within 20–60 s. Detergents are commonly employed in membrane protein crystallization but they are also useful during the crystallization of cytoplasmic, and presumably water soluble, biomolecules to increase their conformational stability and to facilitate the preparation of concentrated samples.⁴⁰

Once the sample is inside the channels, the crystallant solution is deposited in the well located at the other end of each channel and CD starts immediately. Several biomolecules including bovine insulin (6 kDa), turkey egg white lysozyme (14 kDa), the sweet protein thaumatin (22 kDa), and a spherical plant virus (TYMV, 9 MDa) were successfully introduced in the various chips and crystallized in the presence of their respective crystallant (Fig. 1B to E). The distribution pattern of the crystals along the channel is characteristic of CD. As can be seen in Fig. 1B, a precipitate and very small crystals forms on the side of the entry of the crystallant (on the left of the picture) where supersaturation is maximal. The thaumatin crystals are bigger near the opposite end of the channel where supersaturation is

lower. In some cases thaumatin and lysozyme crystals filled completely the channel.

Material transparency in visible light is another necessary condition to observe and monitor crystal growth. PDMS, PMMA and COC are colourless and show no birefringence in polarized light (Fig. 1). The rigidity and air-tightness of PMMA and COC are advantages over the flexibility and permeability of PDMS. They provide a better control over crystallization conditions and improve the stability of crystals since the latter contain on average 35 to 80% solvent, are fragile and very sensitive to dehydration.

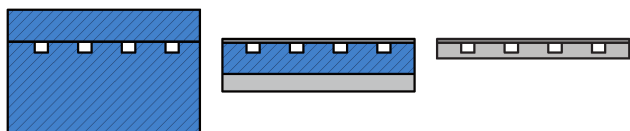


Fig. 3 Evolution of chip thickness and design for on-chip crystal characterization. (Left) First chips consisting in a PDMS layer with channels closed by a PDMS cover. Overall thickness (5 to 6 mm) is incompatible with X-ray analysis. (Center) Second version consisting of a 1 mm thick PDMS layer and a PMMA foil of 250 μm . Channels are closed with a thin tape or adhesive film. This configuration permitted the on-chip characterization of a thaumatin crystal (see Fig. 6A). (Right) Third version made of PMMA or COC that are more rigid than PDMS and interfere less with X-ray (see Fig. 4 and 5).

Sample dehydration and mechanical stress, as well as solution movements and crystal destruction during handling are avoided.

We noticed that sample loading varies with the quality of the surface of the channels. Indeed, the quality of chips produced by laser ablation was more heterogeneous than that of chips prepared by hot embossing. The channels in the former chips did not fill simultaneously due to manufacturing defects like surface roughness, depth variation at channel connections, or material residues. Microfissures in the materials increased the fragility of chips produced by laser ablation, the bubble formation upon sample loading and sample dehydration. The properties of chips made by hot-embossing in PMMA and COC were the most satisfactory in terms of batch homogeneity and easiness of use for crystallization setup. Clean embossed channels also favor the growth of large mono crystals (see Fig. 5B) whereas rough relieves and material debris trigger heterogeneous nucleation and the growth of small crystals in channels produced by laser ablation.

Towards on-chip X-ray crystal analysis: When matter matters

On-chip crystal analysis was the ultimate goal of this project. Our first diffraction tests with the PDMS chip indicated that a 5 mm thick layer totally absorbs the incident X-ray beam. When the thickness of the polymer was reduced to ~ 1 mm and channels were

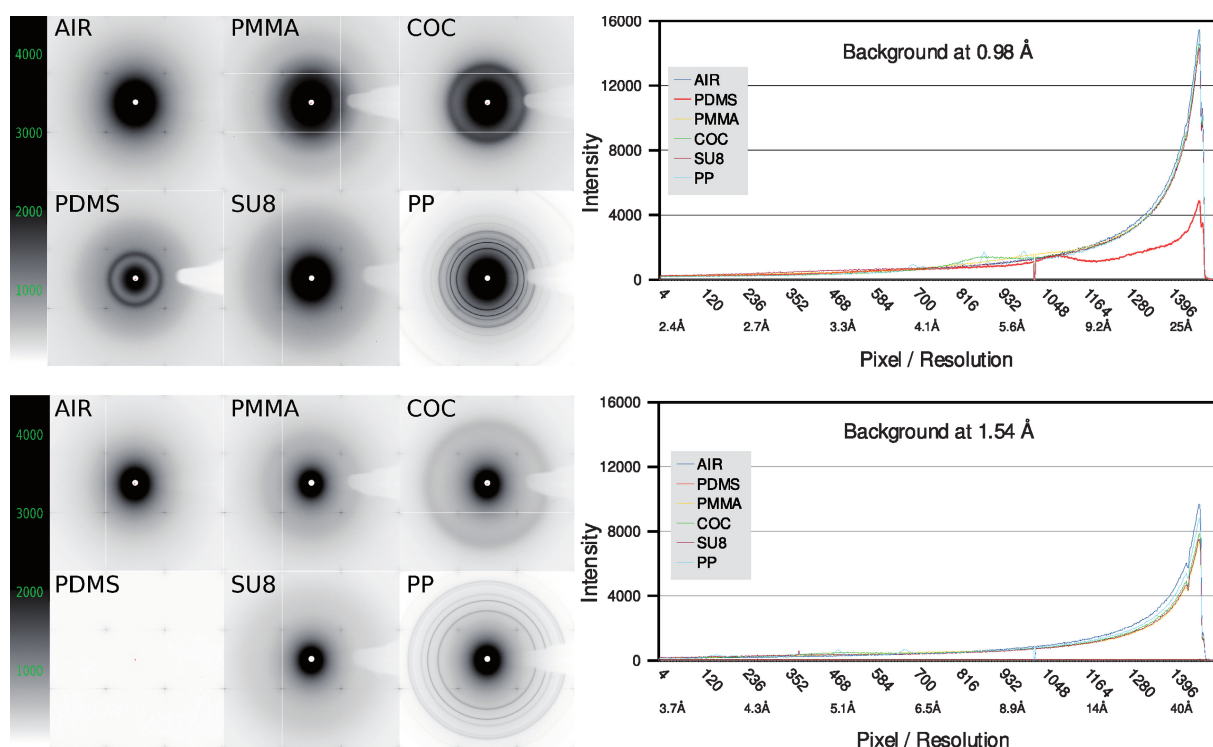


Fig. 4 Comparison of material X-ray scattering properties. This experiment compares the background image (30 sec exposure, 350 mm sample-to-detector distance) produced in the absence (*i.e.* in air only) and in the presence of some material in the X-ray beam. Scattered background signals were collected with an ADSC Quantum 315r detector which consists in a 3×3 array of CCD (charge-coupled device) modules. The active area is 315×315 mm² with 51 micron pixels in a 6144 grid. The images on the left hand side were collected at 0.98 Å (Top) and 1.54 Å (Bottom) in 2×2 binned mode and contained 3072×3072 pixels. The intensity of X-ray signal measured at each pixel site with a dynamic range of 16 bits (a value of 65536 corresponds to pixel saturation). The grayscale shown on the left is the same for all images. Corresponding radial profiles (pixels 1 to 1536 along the image x axis) are shown on the right hand side. Sample thickness (1 mm for PDMS and 230–250 μm for PMMA, COC, SU8 or PP) was chosen to be compatible with chip production. The background of thin materials does not differ significantly from that of air. In contrast, the background for PDMS is much lower at 0.98 Å and inexistent at 1.54 Å, revealing the strong direct beam attenuation due to material absorption.

sealed with a thin adhesive film (Fig. 3), the background scattering was much lower (Fig. 4) and diffraction patterns of a thaumatin crystal contained in a chip could be collected at room temperature. The limit of diffraction was modest (2.8 Å) because the material absorbs a great part of the direct beam and background scattering masks most of the weak reflections. Thus, in our opinion a chip made solely of PDMS is clearly not the best choice to collect high resolution diffraction data from biomolecule crystals. In spite of being very useful for fast prototyping, PDMS is too flexible at low thickness, generates parallax defects at high thickness and, for these reasons, makes an accurate alignment of the crystals in the X-ray beam difficult. Further, its permeability causes sample

dehydration and its chemical composition is responsible for a strong absorption and scattering of X-rays.

This prompted us to undertake a systematic comparison of the X-ray absorption and scattering properties of PDMS and of those of various light and rigid polymers, like PMMA, different types of COC, polypropylene or SU8 photoresist. Indeed, PMMA, polycarbonate or polyimide have recently been shown to be interesting alternatives.^{41,42} Sheets of these materials with a thickness in conformity with the requirements of chip production (*i.e.* a thickness of 250 µm for rigid polymers and of 1 mm for PDMS) were placed in the incident beam of a synchrotron source (Fig. 4). The scattering backgrounds were measured at two wavelengths: 0.98 Å (corresponding to the selenium absorption edge used for structure phasing using the anomalous signal of selenomethionine-derivatized proteins) and 1.54 Å (produced by the copper anode of laboratory X-ray sources). The very low to null scattering signal measured with PDMS at both wavelengths clearly demonstrates that the high silicon content is not suitable for biomolecule crystals analysis by X-ray diffraction (Fig. 4). In contrast, all polymers containing only light atoms (C, O, N, H) exhibit scattering backgrounds that are comparable in intensity to that of air and this even at the highest wavelength. Polypropylene is the only material which shows discrete ring-like patterns characteristic of a micro-crystalline structure. In summary, the four polymers interfere much less with X-rays than PDMS and they are thus more compatible with the on-chip crystal characterization.

On the basis of these results, we selected PMMA and COC to manufacture new prototypes (Fig. 5). The better mechanical properties of these materials allow to reduce chip thickness by a factor 4 (*i.e.* down to 250 µm while a 1 mm layer of PDMS is very flexible and difficult to manipulate) while maintaining a good rigidity. As a consequence, the quality of the crystallographic data collected from crystals contained inside the chip was much improved (Table 1). Data collected on thaumatin crystals of the same age and size inside PDMS and PMMA chips can be directly compared. The lower diffraction limit (*i.e.* 2.8 Å with regard to 2 Å) and higher *R*_{merge} values (*i.e.* lower agreement

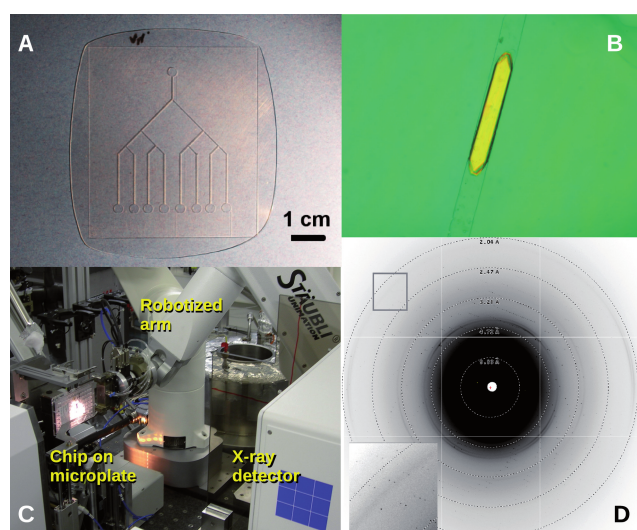


Fig. 5 On-chip crystal analysis at room temperature using synchrotron radiation. (A) Close-up view of a PMMA chip manufactured by hot embossing (thickness 250 µm). (B) Thaumatin crystal filling almost the entire crystallization channel. (C) Experimental setup on the FIP-BM30A beamline with a chip taped to a microplate hold in the beam by the arm of the robot.^{23,24} (D) Diffraction pattern of a sample PMMA#1 (Table 1). The insert displays high resolution reflections in the boxed zone.

Table 1 On-chip crystal analysis in different chip versions^a

Chip version /crystal	PDMS	PMMA#1	PMMA#2	PMMA#3	COC#1	COC#2	COC
Protein	Thaumatin	Thaumatin	Thaumatin	Thaumatin	Thaumatin	Thaumatin	Lysozyme
Nb of images	20	40	40	40	114	124	62
Distance (mm)	300	300	300	300	250	250	300
Oscillation (s, degree)	2; 180	1; 30	1; 30	1; 20	0.5; 20	0.5; 30	1; 30
Space group	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₁ ₂ ₁ ₂	<i>P</i> ₄ ₃ ₂ ₁ ₂
Cell parameters a, c (Å)	58.3 151.6	58.4 151.6	58.4 151.5	58.5 151.7	58.6 151.5	58.6 151.4	79.1 37.9
Mosaicity (degree)	0.09	0.07	0.06	0.04	0.07	0.08	0.08
Resolution range (Å)	20–2.8	20–1.85	20–2.0	20–1.9	20–1.65	20–1.7	20–1.5
High resolution shell (Å)	2.97–2.8	1.96–1.85	2.12–2.0	2.01–1.9	1.75–1.65	1.8–1.7	1.6–1.5
No. observations	19494	63426	55386	61743	132297	136359	83112
No. unique reflections	5883	22357	17315	20044	29862	29362	18739
Completeness (%)	84.2 (87.3)	95.9 (86.5)	93.2 (94.3)	92.7 (89.0)	91.4 (88.5)	98 (97.2)	94.4 (83.7)
<i>R</i> _{merge} (%)	12.9 (22.6)	5.7 (15.1)	11.6 (47.6)	10.4 (34.9)	10.2 (47.8)	10.7 (43.9)	6.6 (41)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	9.0 (5.3)	13 (4.9)	8.0 (2.5)	8.7 (2.7)	8.9 (2.2)	9.6 (2.8)	13.4 (2.74)
Wilson plot B factor (Å ²)	22	23	27	24	27	24	24
Final <i>R</i> _{free} and <i>R</i> _{work}	0.29; 0.22	0.22; 0.18	0.24; 0.19	0.24; 0.20	0.25; 0.19	0.24; 0.19	0.16; 0.18
No. of water molecules	—	117	90	125	129	121	77

^a Statistics for the high resolution shell are indicated between brackets.

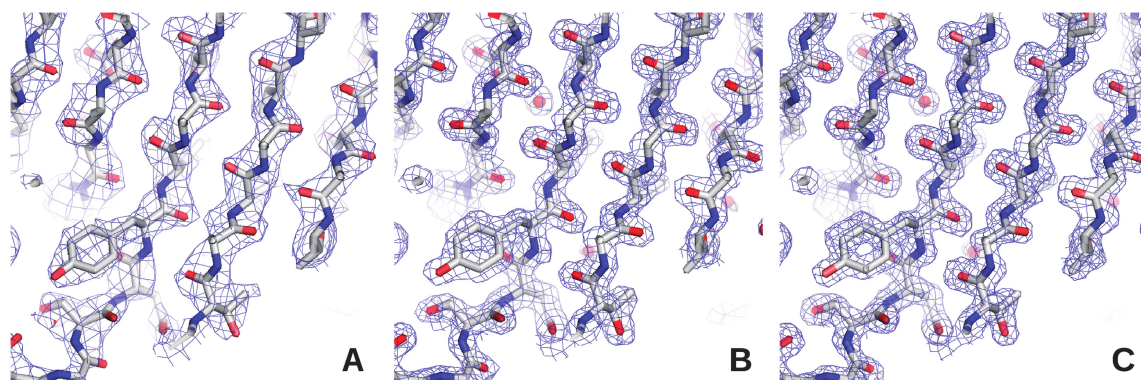


Fig. 6 Data collected in chips made of PMMA or COC lead to more detailed 3D structures. From left to right, same part of the $2F_o - F_c$ electron density maps derived from thaumatin crystals of similar volume analyzed in PDMS, PMMA#1 and COC#1. The maps contoured at 1.2 rms are at resolutions of 2.8, 1.85 and 1.65 Å, respectively. See data statistics given in Table 1.

between measurements of equivalent reflections) of the crystals inside PDMS are due to the stronger absorption of the incident and diffracted X-ray beam by this material. In contrast, crystals grown in PMMA chips (Fig. 6B) diffract X-rays beyond to 2 Å resolution, show better *R*_{merge} statistics, even though the exposure times were 3 times shorter (30 s degree⁻¹ instead of 90 s degree⁻¹). All thaumatin crystals display the same unit cell parameters, excellent crystal mosaicity values (<0.1°), as illustrated by the very sharp diffraction spots in the inset of Fig. 5D, and comparable B-factors (22–27 Å²), indicating low molecular agitation in the crystal packing. This also stands for crystals of lysozyme and thaumatin grown in the presence of agarose gel in COC chips. In other words, the quality of all crystals is similar and differences in diffraction data are essentially due to the nature of chip material, PMMA and COC offering better thickness /absorption /rigidity compromise than PDMS. The quality of thaumatin crystals grown in COC chips cannot be directly compared to that observed in PMMA chips since the analysis was not carried out at the same time and in the same experimental conditions. In addition, the presence of agarose in the former might affect (improve) crystal diffraction properties.

Finally, our diffraction analyses demonstrate that preliminary crystal characterization, if not complete dataset measurements, can be carried out at room temperature *in situ*. The derived electron density maps (EDM) illustrate the quality of structural information that can be achieved (Fig. 6): data collected in PMMA and COC chips led to more detailed EDMs, and thus to improved 3D models, as indicated by better refinement statistics (lower R-factors) and an increased number of observable water molecules in the protein solvation shell.

5. Conclusion

We have demonstrated that the design we have chosen is suitable to produce simple and inexpensive microfluidic chips dedicated to the preparation of biomolecule crystals by CD. Our very first chips made of PDMS had the disadvantage to be too flexible for handling, insufficiently airtight to prevent dehydration during crystallization and not enough transparent to X-rays. Better performances were obtained with chips made of the thin and rigid polymers PMMA or COC that are transparent in visible

light and X-rays. With these lab-on-a-chip prototypes, all steps of a structural genomics study from macromolecule to determination of its 3D structure could be performed.

Since on-chip crystal characterization is feasible, hazardous handling of crystals, *i.e.* the transfer in capillaries or nylon loops, is no longer necessary and best crystals can rapidly be identified at room temperature. In this way, each crystal will reveal its real diffraction potential. If cryo-cooling is required for the collection of full datasets, crystals can be extracted from the channels of the current set-up by removing the sealing film. However, room temperature data collection, which was the rule before the generalization of cryo-cooling, brings supplementary insights into biomolecule structure and dynamics in more realistic conditions. Presently, radiation damage occurring in a synchrotron beam is a major issue, but the situation may change in near future with the development of a new generation of detectors, for instance PILATUS detectors with ms readout times,⁴³ that enable continuous and much faster diffraction data collection.^{43,44} The use of X-ray compatible chips and fast acquisition protocols that maximize data collection before severe crystal decay takes place will certainly contribute to the renaissance of crystallographic analyses at room temperature and provide valuable alternatives for samples that cannot be vitrified. In the present study, we have exploited a high crystal symmetry to reach near-to-complete data from single crystals despite some experimental constraints (sweep angle of the robotic arm <40°), but one can anticipate that the current developments on synchrotron facilities in automated sample handling, selection and analysis will soon provide convenient solutions for collecting and merging partial data from several low-symmetry crystals.

Finally, as mentioned above, crystals obtained in convection-free systems display better diffraction properties than those produced by conventional methods. Recently, an independent study using CD in microfluidic channels has confirmed this tendency.³² Anyhow, CD chips open new opportunities for the fast, efficient and cost-effective growth of high quality crystals in miniaturized systems. Of course the application range of these chips is not at all restricted to biomolecules; it can easily be extended to small inorganic and organic compounds.

Acknowledgements

The authors thank the team of beamline FIP-BM30A at ESRF (Grenoble, France) for assistance during material and on-chip crystal characterization, as well as the MIMENTO technology platform at FEMTO-Innovation, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) for support in the frame of the Programme Interdisciplinaire de Recherche (PIR) 'Microfluidique et Microsystèmes Fluidiques', of the PNANO Programme from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and the European Union (EU) Network of Excellence 'Multi-Material Micro Manufacture: Technologies and Applications (4M)' (FP6-500274-1). K.D. benefited from a joined BDI doctoral grant from CNRS and Région Alsace, G.T. from a grant in the framework of the EU thematic network 'NetMED: Virtual Institute on Micromechatronics for biomedical industry' (G7RT-CT-2002-05113) and C.S. was recipient of a Marie Curie European Reintegration Grant (MERG-CT-2004-004898).

References

- 1 A. Ducruix and R. Giegé, *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach* (second edition), IRL Press, Oxford, 1999.
- 2 R. Giegé and A. McPherson, Crystallization general methods, in *Crystallography Of Biological Macromolecules*, M. Rossmann and E. Arnold, Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001; pp 81–110.
- 3 M. L. Pusey, Z. Liu, W. Tempel, J. Praissman, D. Lin, B. Wang, J. A. Gavira and J. D. Ng, Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2005, **88**, 359–386.
- 4 C. Hansen and S. R. Quake, Microfluidics in structural biology: smaller, faster, better, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, **13**, 538–544.
- 5 F. Salemme, A free interface diffusion technique for crystallization of proteins for X-ray crystallography, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1972, **151**, 533–540.
- 6 C. L. Hansen, E. Skordalakes, J. M. Berger and S. R. Quake, A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 16531–16536.
- 7 C. L. Hansen, S. Classen, J. M. Berger and S. R. Quake, A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and *in situ* structure determination, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 3142–3143.
- 8 M. J. Anderson, C. L. Hansen and S. R. Quake, Phase knowledge enables rational screens for protein crystallization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 16746–16751.
- 9 B. Zheng, L. S. Roach and R. F. Ismagilov, Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11170–11171.
- 10 B. Zheng, J. D. Tice, L. S. Roach and R. F. Ismagilov, A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, **43**, 2508–2511.
- 11 B. Zheng, C. J. Gerdt and R. F. Ismagilov, Using nanoliter plugs in microfluidics to facilitate and understand protein crystallization, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005, **15**, 548–555.
- 12 M. K. Yadav, C. J. Gerdt, R. Sanishvili, W. W. Smith, L. S. Roach, R. F. Ismagilov, P. Kuhn and R. C. Stevens, *In situ* data collection and structure refinement from microcapillary protein crystallization, *J. Applied Crystallogr.*, 2005, **38**, 900–905.
- 13 J. Shim, G. Cristobal, D. R. Link, T. Thorsen, Y. Jia, K. Piattelli and S. Fraden, Control and measurement of the phase behavior of aqueous solutions using microfluidics, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8825–8835.
- 14 J. M. García-Ruiz and A. Moreno, Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 1994, **50**, 484–490.
- 15 J. M. García-Ruiz, Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization, *Meth. Enzymol.*, 2003, **368**, 130–154.
- 16 J. D. Ng, J. A. Gavira and J. M. García-Ruiz, Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination, *J. Struct. Biol.*, 2003, **142**, 218–231.
- 17 J. A. Gavira, D. Toh, J. López-Jaramillo, J. M. García-Ruiz and J. D. Ng, *Ab initio* crystallographic structure determination of insulin from protein to electron density without crystal handling, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2002, **58**, 1147–1154.
- 18 C. Sauter, B. Lorber, R. Giegé, A. Théobald-Dietrich, C. Khan Malek, B. Gauthier-Manuel, G. Thuillier and R. Ferrigno, Dispositif microfluidique pour la cristallisation et l'analyse cristallographique de molécules, *French patent application*, 19/07/2006., *FR 06/06583*.
- 19 C. Sauter, K. Dhoubi and B. Lorber, From macrofluidics to microfluidics for the crystallization of biological macromolecules, *Crystal Growth Design*, 2007, **7**, 2247–2250.
- 20 C. Khan Malek, G. Thuillier and P. Blind, Hybrid replication development for construction of polymeric devices, *J. Microsystem Technologies*, 2004, **10**, 711–715.
- 21 M. Sahli, C. Roques-Carmes, R. Duffait and C. Khan Malek, Study of the rheological properties of poly(methylmethacrylate) (PMMA) and cyclo-olefin-copolymer (COC) to optimize the hot-embossing process, In *Proc. 1st Int. Conf. on Multi-Material Micro Manufacture (4M)*, W. Menz and S. Dimov, Eds.; Elsevier, 2005; pp 71–74.
- 22 R. E. Matthews, Properties of nucleoprotein fractions isolated from turnip yellow mosaic virus preparations, *Virology*, 1960, **12**, 521–539.
- 23 L. Jacquamet, J. Ohana, J. Joly, F. Borel, M. Pirocchi, P. Charraut, A. Bertoni, P. Israel-Gouy, P. Carpentier, F. Kozielski, D. Blot and J. Ferrer, Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an X-ray beam, *Structure*, 2004, **12**, 1219–1225.
- 24 L. Jacquamet, J. Ohana, J. Joly, P. Legrand, R. Kahn, F. Borel, M. Pirocchi, P. Charraut, P. Carpentier and J. L. Ferrer, A new highly integrated sample environment for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2004, **60**, 888–894.
- 25 W. Kabsch, XDS, in *International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules*, M. G. Rossmann and E. Arnold, Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001; pp 730–734.
- 26 Collaborative Computational Project Number 4, The ccp4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 1994, **50**, 760–763.
- 27 P. D. Adams, R. W. Grosse-Kunstleve, L. W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter and T. C. Terwilliger, PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2002, **58**, 1948–1954.
- 28 A. Vergara, B. Lorber, C. Sauter, R. Giegé and A. Zagari, Lessons from crystals grown in the advanced protein crystallisation facility for conventional crystallisation applied to structural biology, *Biophys. Chem.*, 2005, **118**, 102–112.
- 29 B. Lorber, C. Sauter, J. D. Ng, D. W. Zhu, R. Giegé, O. Vidal, M. C. Robert and B. Capelle, Characterization of protein and virus crystals by quasi-planar wave X-ray topography: a comparison between crystals grown in solution and in agarose gel, *J. Crystal Growth*, 1999, **204**, 357–368.
- 30 F. J. López-Jaramillo, J. M. García-Ruiz, J. A. Gavira and F. Otálora, Crystallization and cryocrystallography inside X-ray capillaries, *J. Applied Crystallogr.*, 2001, **34**, 365–370.
- 31 J. M. García-Ruiz, F. Otálora, M. Novella, J. Gavira, C. Sauter and O. Vidal, A supersaturation wave of protein crystallization, *J. Crystal Growth*, 2001, **232**, 149–155.
- 32 J. D. Ng, P. J. Clark, R. C. Stevens and P. Kuhn, *In situ* X-ray analysis of protein crystals in low-birefringent and X-ray transmissive plastic microchannels, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2008, **64**, 189–197.
- 33 J. J. Brandner, W. Pfleging, T. Gietzelt, T. Henning, M. Kraut and H. Moritz, Microfabrication in metals and polymers, *Advanced Micro and Nano Systems*, 2006, **5**, 267–319.
- 34 C. Khan Malek, Laser processing for bio-microfluidics applications (part i), *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1351–1361.
- 35 C. Khan Malek, Laser processing for bio-microfluidics applications (part ii), *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 1362–1369.

- 36 W. Pfleging, M. Przybylski and H. J. Brückner, Excimer laser material processing – state of the art and new approaches in microsystem technology, *SPIE*, 2006, **6107**, 61070G-1-15.
- 37 W. Pfleging, P. Schierjott and C. Khan Malek, Rapid fabrication of functional pmma microfluidic devices by CO₂-laser patterning and hpd-laser transmission welding, in *Laser Assisted Net Shape Engineering 5*, Vol. 2, M. Geiger, A. Otto and M. Schmidt, Eds.; Meisenbach-Verlag, Bamberg, 2007; pp 1207–1220.
- 38 W. Pfleging, W. Bernauer, T. Hanemann and M. Torge, Rapid fabrication of microcomponents - UV-laser assisted prototyping, laser micro-machining of mold inserts and replication via photomolding, *Microsystem Technologies*, 2002, **9**, 67–74.
- 39 W. Pfleging, T. Hanemann, M. Torge and W. Bernauer, Rapid fabrication and replication of metal, ceramic and plastic mold inserts for application in microsystem technologies, *J. Mechanical Engineering Science*, 2003, **217**, 53–63.
- 40 A. McPherson, S. Koszelak, H. Axelrod, J. Day, R. Williams, L. Robinson, M. McGrath and D. Cascio, An experiment regarding crystallization of soluble proteins in the presence of beta-octyl glucoside, *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 1969–1975.
- 41 E. D. Greaves and A. Manz, Towards on-chip X-ray analysis, *Lab Chip*, 2005, **5**, 382–391.
- 42 R. Barrett, M. Faucon, J. Lopez, G. Cristobal, F. Destremaut, A. Dodge, P. Guillot, P. Laval, C. Masselon and J. Salmon, X-ray microfocussing combined with microfluidics for on-chip X-ray scattering measurements, *Lab Chip*, 2006, **6**, 494–499.
- 43 C. Broennimann, E. F. Eikenberry, B. Henrich, R. Horisberger, G. Huelsen, E. Pohl, B. Schmitt, C. Schulze-Briesse, M. Suzuki, T. Tomizaki, H. Toyokawa and A. Wagner, The PILATUS 1M detector, *J. Synchrotron Radiation*, 2006, **13**, 120–130.
- 44 R. J. C. Hilf and R. Dutzler, X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel, *Nature*, 2008, **452**, 375–379.
- 45 B. Lorber, J. B. Bishop and L. J. DeLucas, Purification of octyl β-D-glucopyranoside and re-estimation of its micellar size, *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, **1023**, 254–265.

2.4.6 Bilan

Les tests, de remplissage, de cristallisation et de diffraction avec des biomolécules modèles (lysozyme et thaumatine) ont permis la validation du fonctionnement de ces prototypes fins réalisés en COC et PMMA, en allant de la cristallisation à la détermination de structures 3D dans la puce sous rayonnement X synchrotron. Cette étape intermédiaire a conduit à la réalisation de prototypes pleinement fonctionnels à l'échelle pré-industrielle, selon la technique d'ablation laser et la technique du matriçage à chaud. Il ressort que l'ablation laser, qui permet un prototypage rapide, ne produit pas des canaux suffisamment lisses et propres, ce qui empêche une cristallisation reproductible et homogène. Le matriçage à chaud donne de meilleurs résultats et est mieux adaptés à une production industrielle. À ce stade, il reste à optimiser la géométrie de la puce et son ergonomie.

2.5 Optimisation de la géométrie et de l'ergonomie des dispositifs microfluidiques

2.5.1 Nouveau cahier des charges

L'optimisation du design de la puce est une étape importante puisqu'il s'agit de trouver le meilleur compromis tenant compte des différentes contraintes liées à la méthode de cristallisation utilisée (méthode de contre-diffusion), à la manipulation de la puce (remplissage avec les échantillons à cristalliser, parallélisation des expériences, stockage), au suivi des cristallisations et à l'observation des cristaux par microscopie, et à l'analyse cristallographique. L'évolution de la puce vers un format standard est souhaitée, permettant l'utilisation de robots lors du remplissage, l'observation et la caractérisation des cristaux dans une approche d'analyse structurale à haut-débit.

2.5.2 Difficultés pratiques et solutions techniques

Optimisation de la contre diffusion

Nos dispositifs microfluidiques exploitent la méthode de contre-diffusion qui la mise en oeuvre nécessite : l'absence de convection, un étalement satisfaisant du gradient, un important rapport volumique entre le réservoir apportant l'agent cristallisant et la chambre de cristallisation (canal microfluidique) contenant la molécule à cristalliser. Pour optimiser le processus de contre-diffusion, il nous faut des canaux plus longs pour étaler le gradient, plus fins pour consommer le moins de produit possible, et s'assurer que l'agent cristallisant est en large excès en faisant en sorte que le rapport volumique entre réservoir et canal microfluidique soit supérieur à 10. Le tableau 2.2 donne les volumes engagés dans différents cas de figure.

Remplissage

Le remplissage de nos dispositifs doit se faire spontanément. Idéalement, nous souhaiterions éviter l'ajout de détergent, éviter l'application d'une pression pour faire entrer la solution

longueur (mm)	largeur (mm)	profondeur (mm)	volume (mm ³ = µl)
50	0,100	0,100	0,500
50*	0,075*	0,075*	0,281*
50	0,075	0,050	0,188
50	0,050	0,050	0,125
15	0,100	0,100	0,150

diamètre (mm)	hauteur (mm)	volume (mm ³ = µl)
2	3	9,42
1,2	3	3,39
1,5	3	5,3
1,5	4	7,07
1,5	5	8,84
1,8 *	3*	7,63 *
1,8	4	10,18
1,8	5	12,72
2	3	9,42
2	4	12,57
2	5	15,71

TAB. 2.2: Volumes d'agent cristallisant et d'échantillon. Le tableau du haut donne les volumes d'échantillon engagés dans des canaux de différentes dimensions. Le tableau du bas donne les volumes d'agent cristallisant engagés dans les réservoirs de différentes dimensions. Dans les derniers prototypes (*) le rapport échantillon / agent cristallisant est supérieur à 60.

d'échantillon et améliorer l'écoulement des solutions aux jonctions. Pour ce faire, l'idée est d'augmenter les forces de surface et modifier la mouillabilité du matériau de la puce. Ceci peut se faire en allongeant les canaux et/ou en les affinant ce qui va dans le même sens que l'optimisation de la contre-diffusion, en modifiant la surface du matériau (greffage de fonctions hydrophiles) et en arrondissant les connexions de l'arborescence.

L'étanchéité

L'étanchéité était un problème majeur jusque là. C'est pourquoi il a été décidé de produire des puces fermées. Elles doivent être scellées par nos partenaires au moment de la fabrication en salle blanche pour éviter les problèmes de poussière et pour faire en sorte que la plaque fermant les canaux ne se décolle pas au contact de la solution de cristallisation.

Standardisation et automatisation

L'évolution de la géométrie de la puce va dans le sens de la standardisation en vue d'une automatisation pour une applications à haut débit et répondre aux besoins spécifiques de la génomique structurale. L'idée est de fabriquer des puces ayant une taille proche de celle d'une lamelle de microscope (76x26 mm²) qui permettra le remplissage et l'observation individuels, tout en étant compatible avec l'analyse aux rayons X sur une tête goniométrique classique (prise en compte des contraintes de place sur appareils de diffraction du laboratoire). Ces puces peuvent s'assembler, s'emboîter, se clipser sur un support aux dimensions d'une microplaque de cristallisation de taille standard (format SBS)². Ce design permettra un remplissage robotisé, le stockage des puces, l'analyse aux rayons X automatisée par robot manipulateur du type « robot CATS »³ développé sur FIP. Sur le marché, il existe différents modèles de plaques de cristallisation, parmi lesquelles les plus utilisées sont celles de 24 à 96 expériences. Dans un premier temps, nous pouvons retenir un système de 32 canaux (4 puces de 8) par cadre et l'utilisateur pourra facilement moduler le nombre d'expériences par groupes de huit. L'ergonomie de la puce peut être améliorée en ajoutant une grille de repères le long des canaux de la puce. Par exemple : annoter les canaux de A à H, puis numéroter tous les millimètres. Ceci dans le but de se repérer le long des canaux lors du remplissage, de l'observation au microscope, du repérage et du centrage des cristaux lors de l'analyse aux rayons X.

Nous avons pensé aussi rigidifier les bords de la puce. En effet réduire au maximum l'épaisseur de la puce à l'endroit des canaux peut fragiliser le dispositif. Rigidifier les bords en ajoutant un cadre rendra l'ensemble moins fragile, moins flexible. Ce cadre peut être pensé pour que, d'une part, les puces soient juxtaposables et « clipsable » sur un support normalisé (format SBS) et pour, d'autre part, faciliter la fixation des puces sur tête goniométrique classique pour analyse aux rayons X, tout en apportant des réservoirs de profondeur suffisante pour accueillir les solutions d'échantillons et d'agent cristallisant.

²Society for Biomolecular Screening

³<http://www.natx-ray.com>

2.5.3 Réalisation des nouvelles puces

La réalisation de ces prototypes suit actuellement deux axes complémentaires : le prototypage par la technique de matriçage à chaud (INL, Lyon) ; l'exploration et la mise au point de la fabrication par moulage par injection compatible avec une production en masse, ceci en tirant profit des infrastructures d'une plateforme technologique microsystemes de premier cercle (LPMO, FEMTO-ST, Besançon).

Il s'agit tout d'abord de réaliser des moules pour les deux techniques de réplcation et de mettre au point des procédés de fabrication et de scellement des canaux. L'étanchéité des puces est en effet cruciale pour éviter tout desséchement des solutions en cours d'expérience. Le travail sera affiné par des tests fonctionnels des différents prototypes sur les biomolécules modèles.

Premier modèle proposé

La figure 2.11 résume le nouveau cahier des charges. La puce fait $76 \times 26 \text{ mm}^2$, le motif de base restant une arborescence dichotomique. Les canaux présentent une section de $50 \times 75 \text{ }\mu\text{m}^2$ pour une longueur de 4 à 5 cm, les réservoirs font de 1,5 à 2,5 mm de diamètre pour une profondeur de 3 à 5 mm, et sont suffisamment espacés pour éviter la contamination d'un réservoir à un autre. La puce est composée de 3 plaques : une plaque avec le dessin du motif produit par matriçage à chaud ou moulage par injection, une plaque qui sert de système de fermeture pour les canaux, et le cadre rigide qui porte les réservoirs. Le système est pensé pour avoir deux entrées, la première pour introduire l'échantillon et la deuxième pour injecter l'air dans l'arborescence, pousser la solution d'échantillon et ainsi déconnecter les canaux les uns des autres.

Les prototypes réalisés

Une série de prototypes a été fabriquée à partir de l'automne 2008 et testée pour essayer de s'approcher du modèle. La méthode de fabrication utilisée est le matriçage à chaud sur du COC. Ces dispositifs sont fermés à la fabrication. Le premier prototype est fait de deux plaques de 2 mm d'épaisseur chacune. Les canaux font 4.5 mm de long, la section est de $100 \times 75 \text{ }\mu\text{m}^2$,

Support au format microplaquette SBS et puces (échelle 1:1)

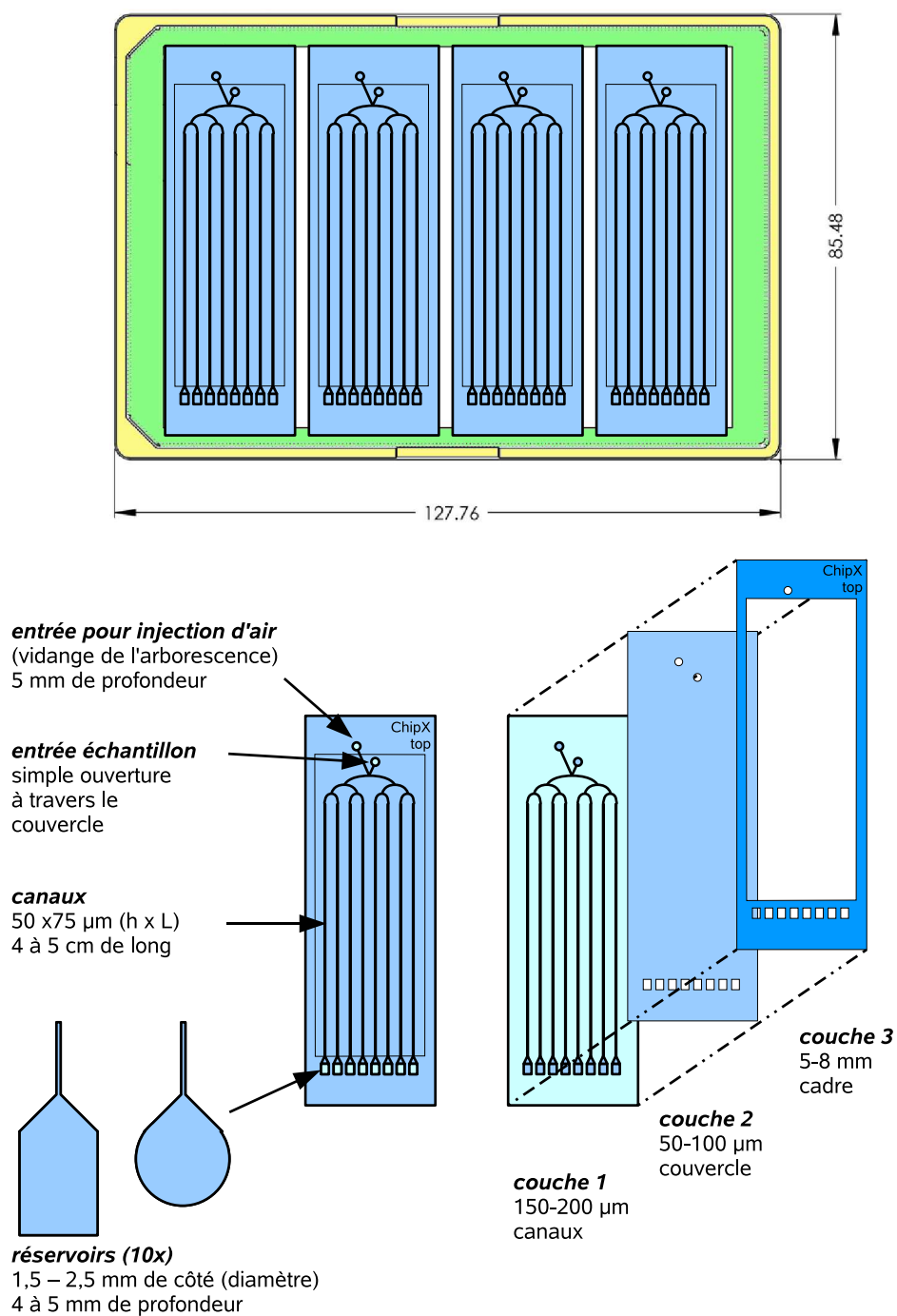


FIG. 2.11: Proposition de géométrie optimisée. Dessin des nouveaux prototypes.

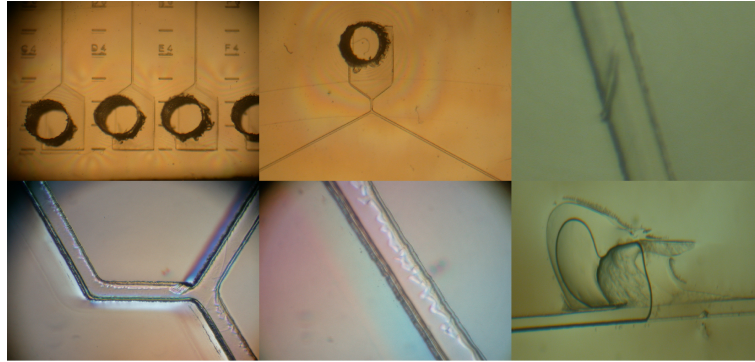


FIG. 2.12: Le premier prototype en COC matriçage à chaud optimisé. La série des images montre un ensemble de défauts observés sur les prototypes : poussière, défauts de fabrication, d'alignement, vieillissement. Sur la deuxième image en haut à gauche montre que le motif réalisé est à une entrée.

les réservoirs font 2 mm de profondeur. Le motif dessiné reprend l'arborescence dichotomique à une entrée. Les canaux sont annotés et numérotés.

L'analyse au microscope (Figure 2.12) a révélé des dispositifs lisses, sans fissures, de qualité homogène. Nous avons tout de même remarqué la présence de poussière (ces puces ont été fabriquées en salle grise), des problèmes d'alignement entre canaux et puits, des défauts de surfaces sur les côtés des canaux.

Le remplissage a été effectué dans un premier temps avec de l'éthanol pour vérifier que le liquide se distribue dans toute la puce. Dès qu'une goutte est déposée, l'alcool diffuse dans tous les canaux. Les canaux ne sont pas bouchés et la qualité des puces n'est pas altérée par l'alcool. Le remplissage par la solution d'échantillon se fait en injectant par une micropipette 2,5 μ l la solution de macromolécule biologique avec détergent (β OG à la CMC). Cette opération se fait aisément, la vitesse de progression du liquide diffère d'un canal à un autre, du fait des hétérogénéités de surface, conséquence directe des défauts du moule et de la présence de poussière à certains endroits. Une fois la solution de la macromolécule arrivée à l'extrémité des canaux au niveau des réservoirs d'agent cristallisant, le puit d'injection est fermé, on dépose l'agent cristallisant et on ferme les puits. Aucun problème de bulle, ni de décollement de couche n'est observé. Des cristaux de macromolécules modèles ont été obtenus dans tous les dispositifs avec un meilleur étalement des gradients de contre-diffusion. Enfin, les expériences peuvent être conservées plus d'un mois sans signe de dessèchement.

Suite à ce premier prototype de 4 mm d'épaisseur, utilisé pour étudier l'état de surface, ré-



FIG. 2.13: Prototype en COC réalisé par matriçage à chaud. Les annotations ajoutées le long des canaux facilitent le repérage, le suivi de la croissance des cristaux et leur alignement dans le faisceau de rayons X. Le remplissage des canaux par une solution alcoolique colorée montre que le volume mort en haut de l'arborescence a été réduit. Les essais de cristallisation ont été fructueux dans cette puce, avec des cristaux de thaumatococcus dont certains remplissent les canaux sur 500 μm (en bas à droite).

soudre le problème de remplissage, un deuxième prototype a été réalisé avec deux plaques d'épaisseurs différentes, une plaque de 700 μm portant les canaux et une de 2 mm d'épaisseur contenant les réservoirs. Ce dispositif a été testé aux rayons X. Il a été placé dans le faisceau de sorte que les rayons X traverse d'abord la plaque de 2 mm puis la plaque de 700 μm . Des difficultés d'alignement des cristaux dans le faisceau ont été rencontrées malgré l'annotation et la numérotation des canaux, ceci dû à l'effet de parallaxe lié à la différence d'épaisseur entre les 2 plaques. En conséquence les plaques qui forment les canaux et le couvercle doivent avoir la même épaisseur. Les jeux de données collectés sur cette version sont de qualité comparable en terme de résolution et mosaïcité à ceux obtenus avec des dispositifs plus fins.

Le troisième prototype fabriqué est composé de 3 plaques, deux plaques de 600 μm l'une portant les canaux, l'autre servant de couvercle et le cadre de 2,6 mm. Cette version est donc la plus fine et ne fait que 1,2 mm au centre. Les tests de cristallisation sont en cours et l'analyse aux rayons X reste à faire.

Entre temps, nous nous sommes penchés sur la question de déconnection des canaux. Nous souhaitons mener huit expériences indépendantes dans les huit canaux du dispositif, sans perdre de produit et en éliminant le volume mort qui fait qu'une quantité de macromolécule est perdue dans l'arborescence en dehors des chambres de cristallisation (Figure 2.13). Un nouveau motif est nécessaire.

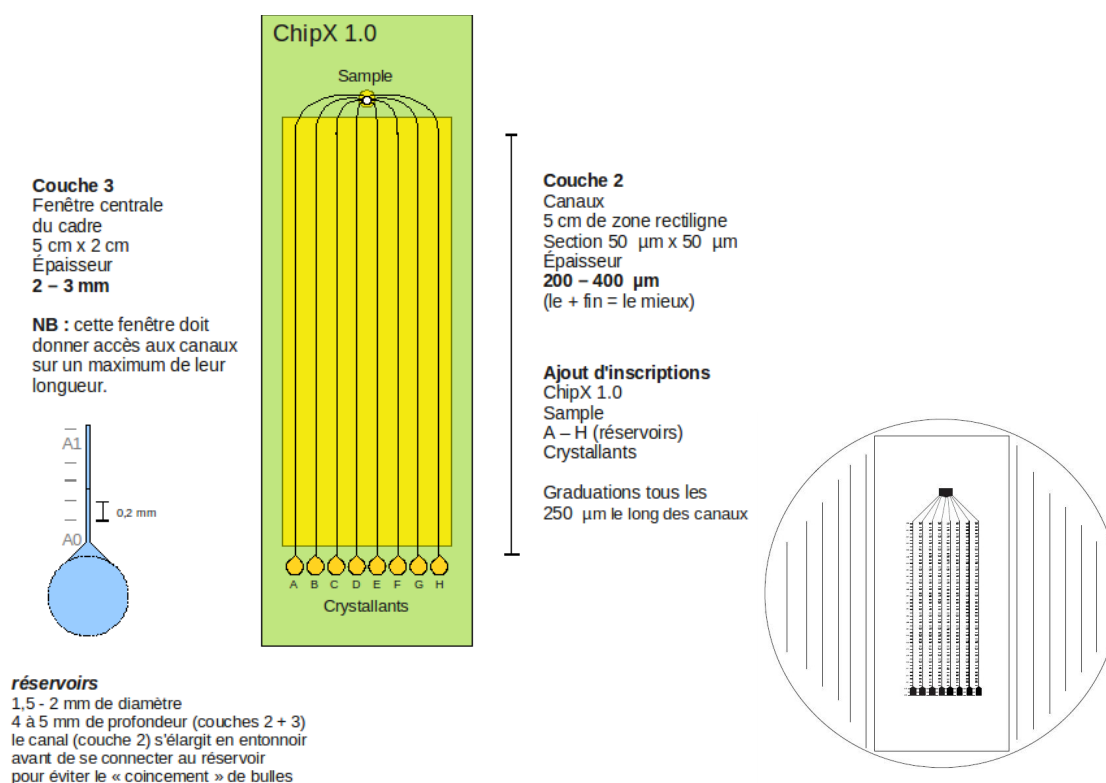


FIG. 2.14: Dessin des nouveaux prototypes. À gauche le schéma d'une puce à une entrée avec des canaux déconnectés. Ce dispositif aussi est composé de trois couche comme le précédent : une couche avec le motif, une couche pour fermer les canaux, et un cadre pour solidifier le dispositif et former des réservoirs profonds. L'image de droite est le dessin qui servira à la fabrication du moule de matriçage à chaud.

Deuxième motif proposé

Ce motif repensé selon les nouveaux besoins est présenté dans la Figure 2.14.

Il s'agit d'une puce de la dimension d'une lame de microscope (76x26 mm²). Le motif est fait de huit canaux indépendants d'une section de 75x75 µm² ou 50x50 µm² pour une longueur de 6 cm déconnectés les uns des autres à la fabrication, les réservoirs font 1,5 mm de diamètre pour une profondeur de 4 mm. La puce est composée de 3 plaques : une plaque avec le dessin du motif, une plaque qui sert à la fermeture des canaux, et le cadre. Le système a une seule entrée qui permettra d'introduire l'échantillon simultanément dans les huit canaux. Puis l'injection d'une bulle d'air permettra leur déconnexion.

Ce nouveau motif a été fabriqué en polypropylène par microinjection à FEMTO au cours de l'été 2009. La fabrication du dispositif par microinjection en COC nécessite encore de la mise au point. Nos collaborateurs ont décidé de faire les tests préliminaires sur des dispositifs en

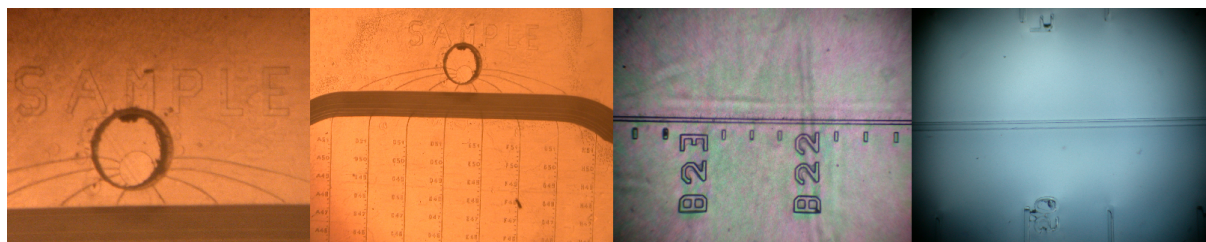


FIG. 2.15: Prototype réalisé en polypropylène par microinjection. Les images montrent différents détails de ce nouveau motif : les canaux sont déconnectés, absence de volume mort, dispositif lisse tout au long des canaux microfluidiques.

polypropylène, même si ces puces ne sont pas totalement transparentes pour évaluer la qualité du moule et de la méthode de fabrication. L'analyse au microscope montre des dispositifs parfaitement lisses, sans fissures, de qualité homogène, propres, sans défauts (Figure 2.15). Un nouveau masque a également été dessiné pour la fabrication par matriçage à chaud par nos collaborateurs à l'INL, et la réalisation des dispositifs est en cours (Figure 2.14).

Bilan

Les dispositifs microfluidiques ont beaucoup évolué comme le montre la figure 2.16. Plusieurs générations de puces se sont succédées : tout d'abord fabriquées en PDMS épais, puis en PDMS fin par photolithographie, la production s'est ensuite orientée vers le PMMA ablation laser, le PMMA et le COC par matriçage à chaud, et enfin le polypropylène par microinjection. L'évolution en terme de matériaux et de méthodes de fabrication s'est accompagnée d'une amélioration du motif des canaux microfluidiques pour optimiser la cristallisation et faciliter l'utilisation des puces.

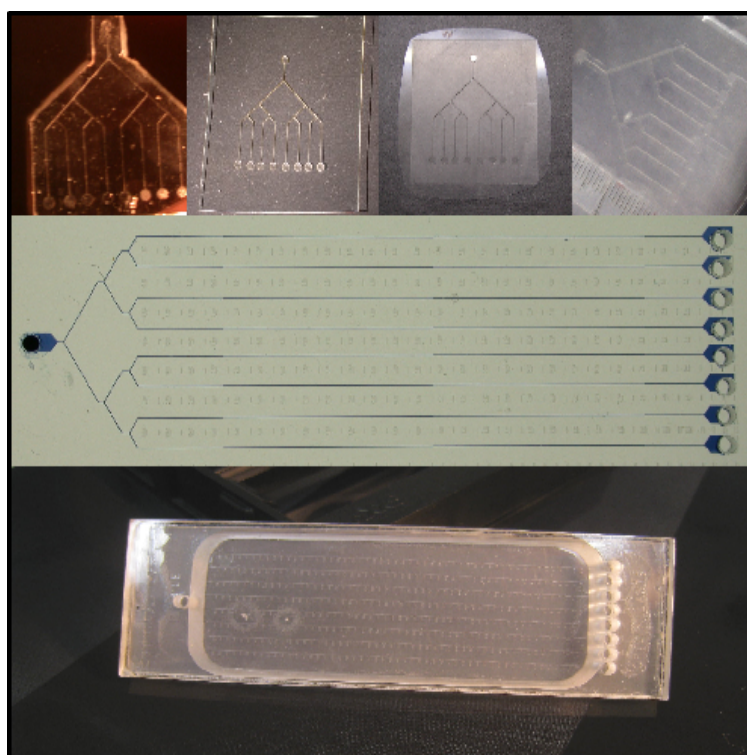


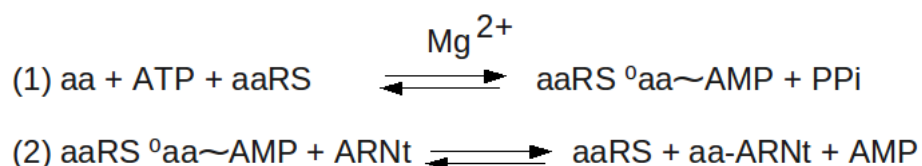
FIG. 2.16: Évolution des dispositifs microfluidiques. Ces images illustrent l'évolution des prototypes au cours du projet, tant au niveau de la géométrie que des matériaux, et donc des méthodes de fabrications.

3 Application de la croissance cristalline en gel

3.1 Étude structurale de l'Aspartyl-tRNA synthétase 1

En parallèle du projet microfluidique, j'ai participé à l'étude structurale de l'aspartyl-tRNA synthétase 1 (AspRS1) de *Thermus thermophilus*, qui est l'une des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) présentant un intérêt biologique direct pour notre laboratoire. Lors de cette étude, les milieux diffusifs (croissance en gel d'agarose) ont été mis à profit pour obtenir des cristaux de qualité requise pour une analyse aux rayons X. Les structures tridimensionnelles de cette enzyme, notamment en présence d'inhibiteurs, à des résolutions jusqu'alors inégalées ont été déterminées.

Comme rappelé en introduction (voir 1.2.1), le décodage de l'ADN en protéine passe par un ARNm qui est ensuite traduit en séquence protéique selon le code génétique. À chaque triplet de nucléotides (codon) correspond un acide aminé (aa). L'ARNt joue le rôle d'adaptateur en faisant correspondre les codons de l'ARNm aux acides aminés de la protéine. En amont, les aaRS se chargent du couplage spécifique entre ARNt et acides aminés. L'aminocyclation des ARNt par les aaRS implique deux étapes :



La première est l'activation de l'acide aminé (aa) par l'ATP en présence d'ions magnésium. La deuxième est le transfert de cet aa activé sur le 2' ou le 3' OH du ribose de l'adénosine 3' termi-

Code PDB	Résolution	Ligand	Année
1g51	2,4 Å	adénylate	1994
1efw	3 Å	ARNt ^{Asp} d' <i>E. coli</i>	2000
1l0w	2 Å	–	2002

TAB. 3.1: Structures cristallographiques d'AspRS-1 publiées dans la PDB.

nal de l'ARNt. Dans le cas de l'acide aspartique (L-Asp), l'aa se lie à une extrémité de l'ARNt portant l'anticodon GUC, complémentaire du codon GAU. Le triplet de l'anticodon se trouve dans une boucle à l'autre extrémité de la structure en « L » de l'ARNt à une distance de 70 Å de l'acide aminé. Les AspRS effectuent une réaction spécifique, elles discriminent entre des acides aminés structuralement et chimiquement (Asp et Asn) proches et des ARNt d'architecture 3D très semblable.

La bactérie *T. thermophilus* possède deux AspRS (Becker et al., 2000) : l'AspRS1, de type bactérien qui aspartyle uniquement l'ARNt^{Asp}, et l'AspRS2 de type archae qui aspartyle aussi bien l'ARNt^{Asp} que l'ARNt^{Asn} (Charron et al., 2003). Nous allons nous intéresser à l'AspRS1 dont l'étude de la première étape de catalyse nous permettra de mieux comprendre la relation entre la structure de son site catalytique, sa fonction et sa spécificité. Ceci est d'autant plus intéressant que l'AspRS1 est de type bactérien, proche de celle d'*E. coli*, et qu'elle peut de ce fait servir de cible thérapeutique. L'AspRS1 est étudiée au laboratoire depuis le début des années 90. Elle a été cristallisée en présence et en absence de ligand, et a servi de modèle pour des expériences de cristallogenèse, notamment pour des tests de cristallisation en milieux diffusifs (Lorber et al., 1999a; Zhu et al., 2001; Lorber et al., 2002; Ng et al., 2002; Moreno et al., 2005). La cristallisation de l'AspRS1 a conduit à la résolution de sa structure avec l'aspartyl-adénylate, l'intermédiaire réactionnel (Poterszman et al., 1994), avec l'ARNt^{Asp} d'*E. coli* (Briand et al., 2000) et sans ligand en microgravité (Ng et al., 2002) (voir tableau 3.1)

3.2 Préparation de cristaux en présence d'analogues de substrat

Dans le système aspartique, la première étape de la réaction d'aminocyclation est indépendante de l'ARNt, d'où l'idée de piéger l'intermédiaire adénylate et d'analyser la reconnaissance Asp et ATP dans le site catalytique. C'est ce qui avait été réalisé par Poterszman et al. (1994) en ajoutant ces deux petits substrats dans la liqueur mère de cristaux d'AspRS1 natifs. L'intérêt

pour ce type d'études a été relancé récemment lors de la découverte de la cible d'une molécule naturelle appelée microcine C (McC). En effet, la microcine C est un inhibiteur fort de la synthèse protéique, plus spécifiquement de l'étape de l'aminacylation où elle agit en bloquant l'AspRS bactérienne (Metlitskaya et al., 2006). La McC est un antibiotique heptapeptidique avec une adénosine modifiée tel que le montre la figure 3.1.

L'objectif de notre travail a été de caractériser avec plus grande précision le site catalytique de l'AspRS1 pour mieux comprendre la mécanistique de la première étape d'aminacylation et la fixation des substrats et de leurs analogues. Atteindre cet objectif a nécessité l'obtention de cristaux d'AspRS1 sans et avec analogues de l'adénylate diffractant à haute résolution. Nous disposons des analogues suivants de l'intermédiaire réactionnel : l'aspartyl-adénylate (ou Asp-AMS, 5'-o-[N-(L-aspartyl)sulfamoyl] adénosine, RNA-TEC, Belgique) et l'aspartol-adénylate (l'Asp-ol-AMP). Ce dernier nous a été fourni par l'équipe de Robert Chênevert de l'Université Laval au Québec (Figure 3.1). Ces analogues non hydrolysables se fixent dans le site catalytique de l'AspRS1 et bloquent son activité.

Il y a deux façons d'obtenir des cristaux d'une protéine : la première consiste à co-cristalliser la protéine et le ligand, c'est-à-dire qu'au moment de faire l'expérience nous préparons une goutte contenant l'AspRS1, l'inhibiteur et l'agent cristallisant. La seconde consiste à cristalliser la protéine, puis à tremper le cristal dans une solution contenant du ligand pour le laisser diffuser dans le cristal et se fixer sur le site actif de l'enzyme. C'est l'approche qui a été utilisée ici. En opérant de la sorte, nous étions sûrs d'obtenir des cristaux d'AspRS1. En effet, toute modification des conditions de l'expérience peut empêcher l'apparition de cristaux (le ligand peut être considéré comme une impureté) et il y a toujours le risque de produire des cristaux ne contenant que l'enzyme sans ligand. Différents analogues stables de l'adénylate ou de l'ATP ont été utilisés dans ces expériences de trempages (ou soaking) réalisées par Bernard Lorber et Abel Moreno au laboratoire. En ce qui concerne l'aspartol-AMP, les cristaux cassaient systématiquement au moment du trempage. Une solution a été d'ajouter du gel dans le milieu de cristallisation pour stabiliser les cristaux. De manière générale, le gel d'agarose est susceptible d'améliorer la qualité du cristal et en polymérisant il forme une matrice dans la goutte. Dans le cas de l'AspRS1, il a permis de maintenir la structure du cristal lors de la diffusion du ligand. La stratégie suivie est décrite dans l'article qui suit.

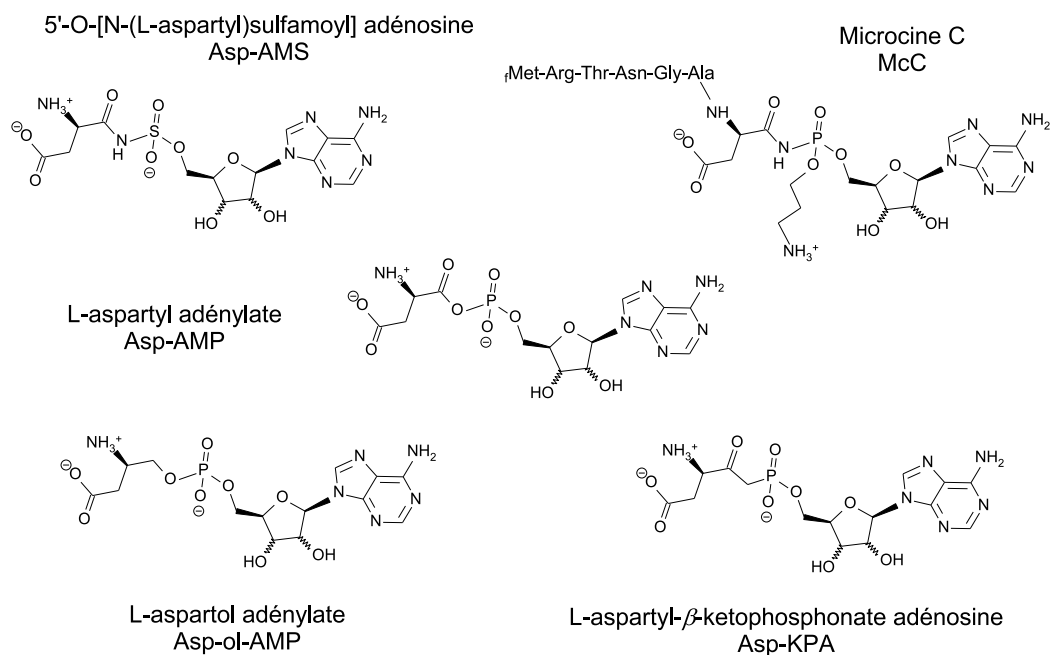


FIG. 3.1: Adénylate et analogues. La figure représente la formule de l'intermédiaire réactionnel naturel de la réaction d'aspartylation de l'ARNt^{Asp} (L-aspartyl-adénylate ou Asp-AMP, au centre) et celles des deux analogues utilisés dans l'étude, l'Asp-AMS (en haut à gauche) et l'aspartol-AMP (en bas à gauche), la microcine C en haut à droite, et l'Asp-KPA (L-aspartyl- β -ketophosphate adénosine) en bas à droite, un inhibiteur synthétisé plus récemment par nos collaborateurs québécois, mais que nous n'avons pas testé ici.

3.3 Article 3 « Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand »

Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand analog

Claude Sauter,^a Christian Balg,^b Abel Moreno,^{a‡} Kaouthar Dhouib,^a Anne Théobald-Dietrich,^a Robert Chênevert,^b Richard Giegé^a and Bernard Lorber^{a*}

^aArchitecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg et CNRS, IBMC, 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France, and ^bDépartement de Chimie, PROTEO, Faculté des Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, Canada G1V 0A6. Correspondence e-mail: b.lorber@ibmc.u-strasbg.fr

Orthorhombic crystals of the enzyme aspartyl-tRNA synthetase (AspRS) were prepared in agarose gel, a chemical alternative to microgravity or nano-volume drops. Besides providing a convection-free medium, the network of the polysaccharide improved the stability of the crystalline lattice during soaking with L-aspartol adenylate, a synthetic and non-hydrolysable analog of the catalytic intermediate aspartyl adenylate. When crystals were embedded in the polysaccharide matrix the ligand reached their surfaces more uniformly. Gel-grown crystals exhibited well defined reflections even at high resolution and low mosaicity values, despite their fairly high solvent content and the relatively harsh flash cooling procedure. By contrast, soaked AspRS crystals prepared in solution broke apart within 10–30 s after the ligand was introduced into the mother liquor, and subsequently these fragments became an amorphous precipitate. A general objection to the use of gels in protein crystallization is that chemical interactions may occur between the polysaccharide matrix and proteins or ligands. The example of AspRS shows that this is not a major concern. This method may be generally applicable to crystal soaking with other small molecules or heavy atoms.

© 2009 International Union of Crystallography
Printed in Singapore – all rights reserved

1. Introduction

Convection in solution can be avoided by placing liquid samples in an unusual environment, such as weightlessness or a strong magnetic field (see *e.g.* Meyer *et al.*, 2008; Poodt *et al.*, 2006, respectively). Another way is to reduce at least one dimension of the container to less than 100 µm (see *e.g.* Tabeling, 2005). The latter situation exists inside very thin capillary tubes, nano-volume drops or microfluidic channels (see *e.g.* Sauter *et al.*, 2007). An alternative to these physical approaches consists in adding to the solution a chemical or biochemical compound that forms a gel (Gonzalez-Ramirez *et al.*, 2008).

Protein crystallization inside the hydrogel network formed by the algal polysaccharide agarose has been shown to have many advantages over that in pure solution. For instance, the loose carbohydrate mesh existing at low agarose gel concentration favors the growth of well ordered crystals that produce X-ray diffraction patterns with sharper and more intense reflections (*e.g.* Robert & Lefauchaux, 1988; Lorber, Sauter, Ng *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2005).

Here we report on a novel application of an agarose gel property that was used in the course of the structural study of

the catalytic site of the bacterial-type aspartyl-tRNA synthetase (AspRS-1) from *Thermus thermophilus*. AspRS-1 coexists in the same bacterium with an archaeal-type enzyme, AspRS-2 (Charron *et al.*, 2003). Whereas the former specifically charges aspartic acid onto the 3' end of tRNA^{Asp}, AspRS-2 recognizes also tRNA^{Asn} as a substrate. In both cases, tRNA aspartylation is a two-step reaction that involves the formation of the unstable intermediate aspartyl adenylate (Fig. 1).

The aim of this study was to prepare an isomorphous derivative by soaking crystals with L-aspartol adenylate, a synthetic and non-hydrolyzable analog of aspartyl adenylate. In the absence of the gel, the rapid entry of the small ligand into the crystalline lattice disrupted the latter and led to complete fracture. Conversely, crystals prepared in 0.2% (*m/v*) agarose gel could be soaked without damage and were suitable for structure determination at atomic resolution. The advantages of crystallizing enzymes in gels are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Protein and chemicals

AspRS-1 (a heterodimer with subunit Mr 66030, Swissprot sequence code number Q5SKD2) was overproduced in

‡ Present address: Instituto de Quimica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico, DF 04510, Mexico.

Escherichia coli and purified as reported by Ng *et al.* (2002). L-Aspartol adenylate was synthesized by condensation of 2',3'-isopropylideneadenosine with the L-aspartol derivative *t*-Bu-O₂C-CH₂-CH(NHBoc)CH₂OH and purified as reported by Bernier *et al.* (2005). Agarose with a gelling temperature of 301 K was obtained from SO.BI.GEL (Hendaye, France). A 6 M sodium formate stock solution was prepared by adjusting the pH of a formic acid solution with sodium hydroxide. All solutions that were in contact with the protein were prepared with ultrapure and sterile water (Cooper, France) and filtered over Millex or Ultra-Free membranes with a porosity of 0.22 µm (Millipore).

2.2. AspRS crystallization and crystal soaking with inhibitor

Orthorhombic AspRS-1 crystals were grown at 293 K in a range of conditions. Hanging drops were prepared in Linbro plates by mixing 2–6 µl of a protein solution at 8–20 mg ml⁻¹ in 10 mM magnesium chloride, 0.5 mM dithiothreitol and 100 mM Tris-HCl at pH 7.2 with the same volume of reservoir solution. They were equilibrated over 750 µl reservoirs containing 4 M sodium formate at 293 K. Agarose powder was mixed with water and heated to 363 K to prepare a 2% (*m/v*) solution. This solution was then cooled to 308 K before it was added to the drops at a final concentration of 0.2% (*m/v*). The gel was absent in controls. For comparative analyses crystals prepared at the same protein and precipitant concentrations and with a length of about 400 µm were treated in parallel. They were soaked by adding to gelified drops 1 µl aliquots of mother liquor containing 5 mM L-aspartol adenylate until a

concentration of 2 mM was reached in the mother liquor after 14 (1) d.

2.3. Crystallographic analyses

Prior to flash freezing in liquid ethane, crystals were transferred in cryo-protectant solution composed of 4 M sodium formate, 100 mM Tris-HCl pH 7.2 and 30% (*v/v*) glycerol. X-ray diffraction analyses were performed on beamline ID14-1 at the ESRF (Grenoble, France). Sets of 260 and 270 images were collected from two single crystals (labeled C1 and C2 in Table 1) on an ADSC Q4 detector (wavelength 0.934 Å, oscillation angle 0.5°, 10 s exposure, detector distance 235 and 210 mm, respectively). 50 supplementary images were collected on the second crystal with an oscillation angle of 3°, an exposure of 10 s, and a detector distance of 386 mm. Data were processed with *XDS* and *XSCALE* (Kabsch, 2001), and indexed intensities were converted to structure factors using *TRUNCATE* from the *CCP4* package (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The structure of AspRS-1 at a resolution of 2.0 Å (Protein Data Bank code 1l0w; Ng *et al.*, 2002) served as a model for molecular replacement using *PHENIX* (Adams *et al.*, 2002).

3. Results and discussion

3.1. Crystal derivatization with small substrates

In the study of catalytic pathways, small molecules that are substrates are frequently added in co-crystallization assays or soaked into pre-existing enzyme crystals (Hassell *et al.*, 2007).

Aminoacyl-tRNA synthetases activate amino acids using adenosine triphosphate (ATP) before transferring the amino acid unit onto the 3' end of tRNAs. ATP and amino acid are common additives used in crystallization assays [see the review by Giegé *et al.* (2008)]. The reaction intermediate adenylate generated *in situ* can be visualized inside the catalytic cleft (*e.g.* Schmitt *et al.*, 1998; Retailleau *et al.*, 2001). Since this chemical entity is highly reactive and unstable, non-hydrolyzable analogs have been synthesized to facilitate the derivatization of crystals of seryl-tRNA synthetase (Belrhali *et al.*, 1994). Nowadays such compounds replace the natural substrates.

When the crystallization medium or the mother liquor in which pure enzyme crystals have grown is supplemented with small substrates for co-crystallization or soaking experiments, these compounds are not always found in the electron density or occupy only part of the sites. In the worst cases, as was observed for example with aminoacyl-tRNA synthetases, soaking with ligands leads to crystal dissolution or to stress and strain

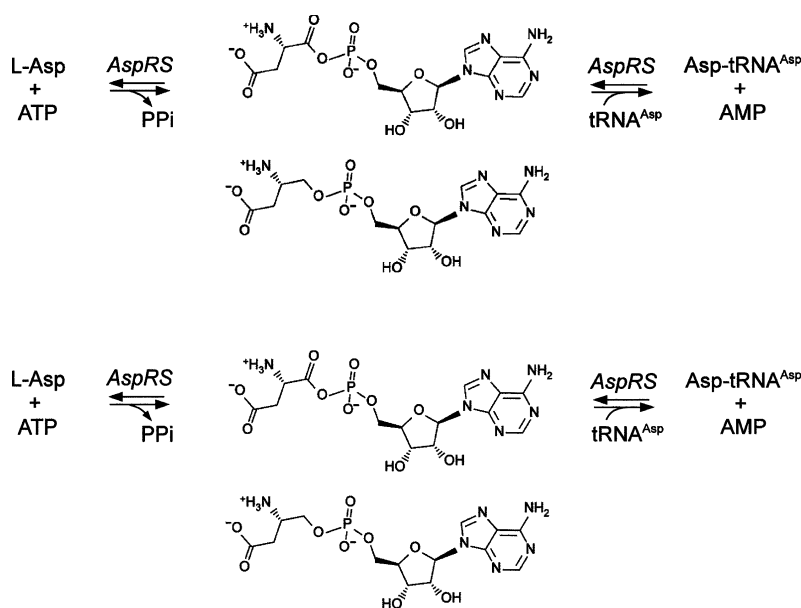


Figure 1

Schematic view of the tRNA aspartylation. (Top) Two-step reaction occurring in AspRS active site with the catalytic intermediate aspartyl adenylate shown in the center. This mechanism is common to all aminoacyl-tRNA synthetases. (Bottom) Chemical formula of L-aspartol adenylate, the non-hydrolyzable analog of the natural intermediate used in these investigations.

Table 1

X-ray analysis of AspRS-1 crystals soaked with L-aspartol adenylate.

The labels C1 and C2 are explained in §2.3. Values in parentheses are for the highest-resolution shell. For comparison, the cell parameters of native AspRS-1 crystals analyzed at 100 K are $a = 60.2$, $b = 154.5$ and $c = 173.7$ Å.

Crystal	C1	C2
Beamline	ID14-1/ESRF	
Temperature (K)	100	
Wavelength (Å)	0.934	
Space group	$P2_12_12_1$	
Unit-cell parameters (Å)	$a = 60.1$, $b = 154.6$, $c = 173.8$	$a = 60.1$, $b = 154.7$, $c = 173.6$
Crystal mosaicity (°)	0.19	0.15
Resolution range (Å)	20–2.16 (2.21–2.16)	30–1.85 (1.9–1.85)
No. of observations	389 692	640 906
No. of unique reflections	83 783	122 782
Completeness (%)	94.8 (72.4)	93.2 (61.8)
Multiplicity	4.65 (2.6)	5.21 (2.0)
$R_{\text{merge}}^{\dagger}$ (%)	3.3 (15.5)	5.3 (41.3)
R_{meas} (%)	3.7 (18.3)	5.8 (54.1)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	26.9 (6.5)	18.6 (3.0)
B factor from Wilson plot (Å ²)	37.8	32.5
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)		3.1
Solvent content (%)		60
Asymmetric unit content	1 dimer + 2 analogs	

$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ and R_{meas} , the redundancy-independent indicator, as defined by Diederichs & Karplus (1997).

within the crystal lattice. The latter may either lead to a space-group transition (Berthet-Colominas *et al.*, 1998) or be deleterious to diffraction (Sherlin & Perona, 2003). Minor conformational changes (associated with ligand binding and amplified by the periodicity along the three axes of the crystal) may affect the packing and result in visible alterations like cracks propagating as the ligand enters the lattice (Geremia *et al.*, 2006). Co-crystallization is an alternative in which the enzyme–substrate complex is formed before crystal growth, but this approach may produce only native crystals or not be applicable at all (see *e.g.* Sauter, 1999; Sherlin & Perona, 2003).

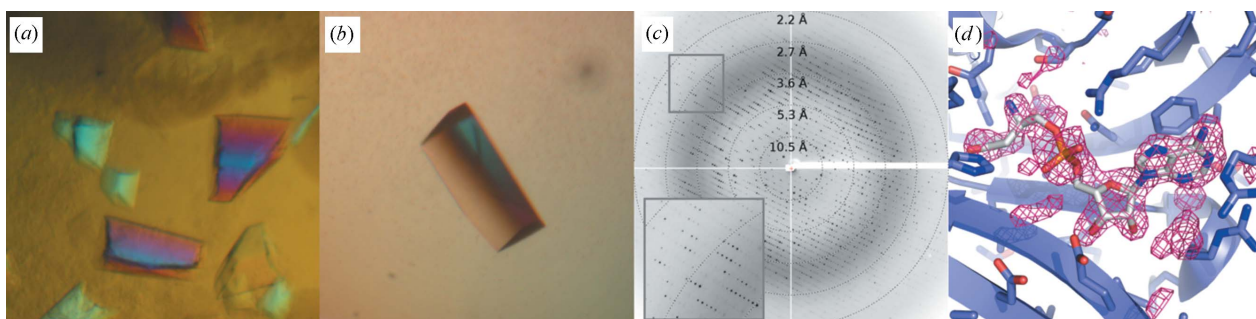
In the peculiar case of AspRS-1, co-crystallization with L-aspartol adenylate failed to produce crystals and soaking

damaged them. To overcome these difficulties, we have implemented a novel strategy in which the preformed enzyme crystal lattice is immobilized in a gel matrix before the ligand diffuses through it. This ‘smooth soaking technique’ (meaning without sudden, violent movements) relies on the fact that the macromolecular crystal is entirely embedded in the gel and that gel fibers are trapped inside its channels during the growth process (Gavira & García-Ruiz, 2002).

3.2. More stable protein crystal grown in agarose gel

AspRS-1 was first crystallized in an orthorhombic system which led to a native structure determination and to that of an adenylate-bound enzyme after soaking with aspartic acid and ATP (Delarue *et al.*, 1994; Poterszman *et al.*, 1994). Afterwards, a monoclinic crystal form was found in a different growth condition (Zhu *et al.*, 2001), but diffraction data could only be obtained under cryogenic conditions with crystals grown in the presence of a low concentration of agarose gel. This showed that the latter stabilized the crystal lattice and preserved its near-to-original properties upon freezing (Charron *et al.*, 2001).

In the present work, we wished to solve the structure of orthorhombic crystals of AspRS-1 having an analog of the catalytic intermediate in the active site. Since co-crystallization did not produce crystals and native crystals prepared in solution did not withstand the soaking step, native crystals were grown in the presence of 0.2% (*m/v*) agarose. Gel-grown crystals had exactly the same prismatic habit and exhibited the same birefringence in polarized light as crystals prepared in solution. The major difference was that crystals prepared in solution broke apart within 10–30 s after the ligand was introduced into the mother liquor (Fig. 2*a*). Furthermore, the crystal fragments were not stable; in a few minutes they were replaced by an amorphous precipitate. The crystalline state could not be recovered. This is in contrast to the situation reported in the case of lysozyme crystals subjected to a strong hypertonic shock (López-Jaramillo *et al.*, 2002). AspRS-1 crystal deterioration was independent of crystal size but

**Figure 2**

Soaking and X-ray analysis of AspRS-1 crystals grown in agarose gel. (*a*) Crystals prepared in solution broke into pieces shortly after the start of the soaking with L-aspartol adenylate. A few minutes later the fragments were replaced by a precipitate. (*b*) Intact crystals prepared in 0.2% (*m/v*) agarose after soaking. (*c*) Diffraction pattern of a crystal grown in gel and soaked with the substrate analog. The inset displays a close-up view of the diffraction pattern of crystal C2 in Table 1, with reflections extending beyond 2 Å resolution. (*d*) $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ difference electron density map in the catalytic site of both monomers of AspRS-1 (contour level 3σ), computed before including the substrate in the model, confirming the presence of the analog. Additional peripheral density clearly indicates that several amino acid side chains undergo conformational changes upon substrate binding. The images in panels (*a*) and (*b*) are displayed on the same scale, and the crystal in panel (*b*) is about 400 µm long.

appeared to be controlled by transport phenomena. On the other hand, crystals prepared in agarose were stable during the entire soaking process, which took at least two weeks (Fig. 2*b*). It was noticed that the result was independent of the rate at which the concentration of analog was increased in the mother liquor.

Visual inspection under a binocular microscope revealed that the soaking step occurred differently when the drop containing the crystals was a solution or a hydrogel. In the first case, the addition of the ligand was accompanied by turbulences and convectional flow in solution, visible as variations of refractive index and minor liquid movements. One can anticipate that, in such a situation, the local ligand concentration at the surface of the crystal facets fluctuated strongly. In the presence of the gel, these events were not observed to occur, or at least they were much weaker. The ligand diffused gently and homogeneously through the agarose matrix and thus reached the crystal surfaces more uniformly. Agarose at a concentration as low as 0.2% (*m/v*) is sufficient to suppress density differences in solution and hamper crystal sedimentation (Garcia-Ruiz *et al.*, 2001).

Furthermore, the gel-grown AspRS-1 crystals diffract X-rays at high resolution like native crystals (Fig. 2*c*) and are isomorphous. In spite of their fairly high solvent content and the harsh flash cooling procedure to which they have been subjected, these crystals exhibit low mosaicity values ($< 0.2^\circ$) and well defined reflections even at high resolution (Fig. 2*c*, inset). The beam smearing values on beamline ID14 (horizontal and vertical beam divergences of 10.7 and 3.2 μrad or 2.2 and 0.66 arc seconds, respectively, and spectral spread $\Delta\lambda/\lambda \simeq 3 \cdot 10^{-4}$) are much smaller than 0.2° or 720 arc seconds. When deconvoluted out these would not significantly alter the mosaicity estimate since a very tightly collimated X-ray undulator and pure spectral spread has been used (see Colapietro *et al.*, 1992). Thus, the viscoelastic hydrogel contributes to increase the mechanical resistance of the enzyme lattice and maintains its cohesion during soaking and cryo-cooling.

The presence of the adenylate analog is confirmed by the difference electron density map (Fig. 2*d*). Conformational changes affecting one loop and a few side chains in the neighborhood of the catalytic cleft are also observed. A detailed structural analysis (to be published elsewhere) shows that the amino acid and the ATP bind to the catalytic pocket of AspRS *via* a lock-and-key mechanism. Furthermore, two loops in the periphery participate in the selection of the substrates, including the tRNA (Cavarelli *et al.*, 1994; Poterszman *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1998). Many enzymes of the aminoacyl-tRNA synthetase family undergo such subtle conformational changes when they bind their natural ligands (Ibba *et al.*, 2005). The structural flexibility of these loops upon ligand binding likely explains the sensitivity of AspRS-1 crystals to soaking in the absence of a protective gel matrix. Furthermore, the diffraction limit of gel-grown and derivatized AspRS-1 crystals is comparable to that of native crystals grown in a convection-free solution under microgravity (Ng *et al.*, 2002). An additional advantage of the gel is that it makes

unnecessary the crosslinking with glutaraldehyde (Hassell *et al.*, 2007).

3.3. Conclusion and perspectives for crystallogenesis

From a practical point of view, hydrogels are an advantageous, convenient and relatively inexpensive alternative to approaches like microgravity or nano-droplets. The loose network of a hydrogel eliminates convectional flow in solution, and this is favorable to the nucleation and growth of crystals with enhanced diffraction properties. Crystals grown in a gel such as agarose have fewer packing defects and a smaller mosaic spread than those prepared in solution because nucleation and growth proceed *via* a diffusive regime (see *e.g.* Lorber, Sauter, Ng *et al.*, 1999). A similar situation exists in solutions placed inside capillary tubes, such as for instance during counter-diffusion experiments (*e.g.* Otálora *et al.*, 1999; Boggon *et al.*, 2000). Crystallization conditions found in free solution can easily be transposed to the gel case. In practice, on the one hand agarose may be used in combination with various crystallization methods, like vapor diffusion, dialysis and counter-diffusion (Biertümpfel *et al.*, 2002). On the other hand, it is compatible with many crystallizing agents (Gonzalez-Ramirez *et al.*, 2008). A very low concentration may be sufficient to gel the crystallization medium and create a convection-free solution (Garcia-Ruiz *et al.*, 2001).

The results with aspartyl-tRNA synthetase demonstrate that crystals grown in gels are more resistant than crystals grown in solution to internal perturbations occurring during the soaking with a substrate analog. The implemented method may be applicable to other enzyme–ligand systems. Interestingly, it was shown with lysozyme crystals that the polysaccharide fibers of agarose are randomly distributed in the solvent channels (Gavira & García-Ruiz, 2002). On the one hand, this does not prevent crystals from diffracting X-rays at high resolution. On the other, and as demonstrated earlier and again here, it enhances the strength of the crystalline lattice.

Agarose gel was used to preserve the quality of thaumatin crystals grown under microgravity aboard the space shuttle since crystals produced in solution lost their optical and diffraction properties owing to mechanical shocks and possibly to temperature fluctuations during the re-entry and post-landing transportation across continents (Lorber, Sauter, Robert *et al.*, 1999). In this medium, crystals remained immobile at the place where they had nucleated, their nucleation was more synchronous than in solution, they did not sediment and they reached their optimal volume at a high growth rate (Lorber & Giegé, 2001). Since these crystals had contact neither with others nor with the container walls they did not suffer from abrasions or other damage prior to analysis (Lorber, Sauter, Robert *et al.*, 1999; Lorber & Giegé, 2001). This list of advantages is that usually attributed to microgravity [for a recent review see Snell & Helliwell (2005)], but it is also applicable to gels.

A possible objection to the use of gels in protein crystallization is that chemical interactions may occur between the polysaccharide matrix and proteins or ligands. The example of

AspRS shows that this is not a major concern. Furthermore, the method described above may be applicable to the soaking of crystals with other small molecules such as heavy atoms. Thus, there are numerous reasons to crystallize proteins in a gel like agarose.

We are indebted to D. Kern for the bacterial strain that overproduces AspRS-1 and to SO.BI.GEL for a generous gift of agarose. The authors are grateful to the ESRF for the beamtime allocated to this project and in particular to the team managing beamline ID14 for help with data collection. The authors also thank the referees for their constructive comments. This work was supported by a 'Projet International de Coopération Scientifique (PICS)' of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), by the French Ministry for Research (ACI 'BCMS' 04358), and by the grant 61.103 from 'Ministère des Relations Internationales du Québec' and 'Consulat Général de France' in the context of the program 'Coopération franco-québécoise de recherche scientifique et technologique'. AM thanks DGAPA-UNAM (Mexico) and CNRS for financial support during his sabbatical year in Strasbourg. CS was a recipient of a Marie Curie European Reintegration Grant (MERG-CT-2004-004898).

References

- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L.-W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. & Terwilliger, T. C. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 1948–1954.
- Belrhali, H., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Larsen, K., Berthet-Colominas, C., Leberman, R., Beijer, B., Sproat, B., Als-Nielsen, J., Grübel, G., Legrand, J.-F., Lehmann, M. & Cusack, S. (1994). *Science*, **263**, 1432–1436.
- Bernier, S., Akochy, P. M., Lapointe, J. & Chênevert, R. (2005). *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 69–75.
- Berthet-Colominas, C., Seignovet, L., Hartlein, M., Grotli, M., Cusack, S. & Leberman, R. (1998). *EMBO J.* **17**, 2947–2960.
- Biertümpfel, C., Basquin, J., Suck, D. & Sauter, C. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 1657–1659.
- Boggon, T. J., Helliwell, J. R., Judge, R. A., Olczak, A., Siddons, D. P., Snell, E. H. & Stojanoff, V. (2000). *Acta Cryst.* **D56**, 868–880.
- Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.-C. & Moras, D. (1994). *EMBO J.* **13**, 327–337.
- Charron, C., Roy, H., Blaize, M., Giegé, R. & Kern, D. (2003). *EMBO J.* **22**, 1632–1643.
- Charron, C., Sauter, C., Zhu, D. W., Ng, J. D., Kern, D., Lorber, B. & Giegé, R. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 376–386.
- Colapietro, M., Cappuccio, G., Marcianti, C., Pifferi, A., Spagna, R. & Helliwell, J. R. (1992). *J. Appl. Cryst.* **25**, 192–194.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Delarue, M., Poterszman, A., Nikonov, S., Garber, M., Moras, D. & Thierry, J.-C. (1994). *EMBO J.* **13**, 3219–3229.
- Diederichs, K. & Karplus, P. A. (1997). *Nat. Struct. Biol.* **4**, 269–275.
- García-Ruiz, J.-M., Novella, M. L., Moreno, R. & Gavira, J. A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 165–172.
- Gavira, J. A. & García-Ruiz, J. M. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 1653–1656.
- Geremia, S., Campagnolo, M., Demitri, N. & Johnson, L. N. (2006). *Structure*, **14**, 393–400.
- Giegé, R., Touzé, E., Lorber, B., Théobald-Dietrich, A. & Sauter, C. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**, 4296–4306.
- Gonzalez-Ramirez, L. A., Caballero, A. G. & Garcia-Ruiz, J. M. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**, 4291–4296.
- Hassell, A. M. *et al.* (2007). *Acta Cryst.* **D63**, 72–79.
- Ibba, M., Francklyn, C. & Cusack, S. (2005). Editors. *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*. Georgetown: Landes Bioscience.
- Kabsch, W. (2001). *XDS in International Tables for Crystallography*, Vol. F, ch. 22.5.9. *Crystallography of Biological Macromolecules*, edited by M. G. Rossmann & E. Arnold. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- López-Jaramillo, F. J., Moraleta, A. B., González-Ramírez, L. A., Carazo, A. & García-Ruiz, J. M. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 209–214.
- Lorber, B. & Giegé, R. (2001). *J. Cryst. Growth*, **231**, 252–261.
- Lorber, B., Sauter, C., Ng, J., Zhu, D. W., Giegé, R., Vidal, O., Robert, M.-C. & Capelle, B. (1999). *J. Cryst. Growth*, **204**, 357–368.
- Lorber, B., Sauter, C., Robert, M. C., Capelle, B. & Giegé, R. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 1491–1494.
- Meyer, A., Rypniewski, W., Szymanski, M., Voelter, M., Barciszewski, J. & Betzel, C. (2008). *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 1590–1595.
- Moreno, A., Théobald-Dietrich, A., Lorber, B., Sauter, C. & Giegé, R. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 789–792.
- Ng, J. D., Sauter, C., Lorber, B., Kirkland, N., Arnez, J. & Giegé, R. (2002). *Acta Cryst.* **D58**, 645–652.
- Otálora, F., Capelle, B., Ducruix, A. & García-Ruiz, J. M. (1999). *Acta Cryst.* **D55**, 644–649.
- Poodt, P. W. G., Heijna, M. C. R., Christianen, P. C. M., van Enckevort, W. J. P., de Grip, W. J., Tsukamoto, K., Maan, J. C. & Vlieg, E. (2006). *Cryst. Growth Des.* **6**, 2275–2280.
- Poterszman, A., Delarue, M., Thierry, J.-C. & Moras, D. (1994). *J. Mol. Biol.* **244**, 158–167.
- Retailleau, P., Yin, Y., Hu, M., Roach, J., Bricogne, G., Vonnrhein, C., Roversi, P., Blanc, E., Sweet, R. M. & Carter, C. W. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 1595–1608.
- Robert, M.-C. & Lefaucheux, F. (1988). *J. Cryst. Growth*, **90**, 358–367.
- Sauter, C. (1999). Thèse de l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Sauter, C., Dhoub, K. & Lorber, B. (2007). *Cryst. Growth Des.* **7**, 2247–2250.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J.-C. & Moras, D. (1998). *EMBO J.* **17**, 5227–5237.
- Sherlin, L. D. & Perona, J. J. (2003). *Structure*, **11**, 591–603.
- Snell, E. H. & Helliwell, J. R. (2005). *Rep. Prog. Phys.* **68**, 799–853.
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to Microfluidics*. New York: Oxford University Press.
- Zhu, D.-W., Lorber, B., Sauter, C., Ng, J. D., Bénas, P., Le Grimmelc, C. & Giegé, R. (2001). *Acta Cryst.* **D57**, 552–558.

3.4 Zoom dans le site actif de l'AspRS-1

Ainsi nous avons collecté des jeux de données à partir de cristaux d'AspRS1 native (isolée), d'AspRS1 avec l'Asp-AMS et avec l'Asp-ol-AMP (Tableau 3.2). L'analyse des données de diffraction collectées sur les lignes ID14-4 et ID14-1 de l'ESRF à Grenoble a conduit à la détermination de trois structures, dont celles de l'AspRS1 native et de deux complexes contenant des analogues d'aspartyl-adénylate à des résolutions jamais atteintes jusque là. Ces structures ont été résolues par remplacement moléculaire à partir de la structure de l'AspRS sous sa forme native (PDB 1l0w). Les cartes de densité électronique nous ont permis de placer sans ambiguïté les analogues dans le site actif de l'enzyme.

La fixation de l'adénylate dans le site actif de l'enzyme provoque des changements de conformations au cœur de l'AspRS1, en particulier, dans la boucle du motif II – un des trois motifs de séquence conservés chez les AspRS et plus généralement chez les aaRS de classe II (Eriani et al., 1990) et la « flipping loop » qui sont connues pour leur flexibilité (Schmitt et al., 1998) et le déplacement d'une zone plus périphérique (198 jusqu'à 202). On observe aussi un changement de l'orientation des chaînes latérales d'acides aminés directement impliqués dans la fixation des ligands (Arg 531, His 443, His 442, Gln 237, Gln 235, Phe 235, Arg 223, Gln 201, Glu 177). La superposition des structures de l'AspRS1 native avec les structures AspRS1 / analogue illustre ces mouvements (Figure 3.2).

Ce travail est en cours et fait partie d'une collaboration entre notre laboratoire et ceux des Professeurs Jacques Lapointe, Robert Chênevert et Shen-Xiang Lin de l'Université Laval à Québec¹. Le but est l'exploration structurale des sites catalytiques d'aminoacyl-tRNA synthétases et l'analyse des interactions aaRS / inhibiteurs. Les connaissances acquises seront mises à profit par les outils de modélisation moléculaire dans le but de concevoir de nouveaux inhibiteurs. La comparaison des structures RX enzyme / inhibiteur obtenues dans le cadre de cette collaboration, de celles disponibles dans la PDB, permettent également de proposer un mode d'interaction pour l'antibiotique naturel, la microcine C, ciblant spécifiquement l'AspRS. Ceci s'aligne avec l'idée de cibler l'AspRS pour le développement de nouvelles classes d'antibiotiques.

¹Collaboration soutenue par un contrat PICS (Programme International de Coopération Scientifique) du CNRS et un contrat CPFQ (Comission Permanente France-Québec) du consulat général de France à Québec. J'ai pu réaliser dans ce cadre un séjour de deux mois dans l'équipe du Professeur Lin au Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUL - voir Annexe 1).

	AspRS1 native	AspRS1 + Asp-AMS	AspRS1 + aspartol
Ligne synchrotron	ID14-1	ID14-4	ID14-1
Longueur d'onde (Å)	0,93	0,98	0,93
détecteur	ADSC Q4	ADSC Q105	ADSC Q4
Nombres d'images	719 / 640	360 / 180	270 / 50
Distance (mm)	168 / 265	285 / 540	210 / 386
Oscillation (deg ; sec)	0,5° ; 5 / 1,0° ; 5	0,5° ; 0,5 / 1° ; 0,5	0,5° ; 20 / 3° ; 15
Groupe d'espace	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Paramètres de maille a ; b ; c (Å)	60,3 ; 154,5 ; 173,9	60,3 ; 155,0 ; 173,5	60,1 ; 154,7 ; 173,6
Mosaïcité (deg)	0,19	0,14	0,17
Gamme de résolution (Å)	30–1.65	30–2,35	30–1,85
Haute résolution (Å)	1,69–1,65	2,35–2,41	1,9–1,85
Nombre d'observations	3075165	600166	661194
Nombre de réflexions uniques	184559	68544	129339
Complétudes (%)	94,5 (71,7)	99,7 (99,7)	93,2 (61,8)
R _{merge} (%)	6,5(65)	8,6 (61,4)	5,8 (54,1)
I / sig(I)	26,9 (2,9)	17,87 (3,8)	17,8 (2,2)
Wilson plot B factor (Å ²)	29,8	42,6	32,5
R _{free} et R _{work} final	0,25 - 0,23	0,24 - 0,20	0,22 - 0,19
H ₂ O	436	140	409

TAB. 3.2: Résumé des données cristallographiques

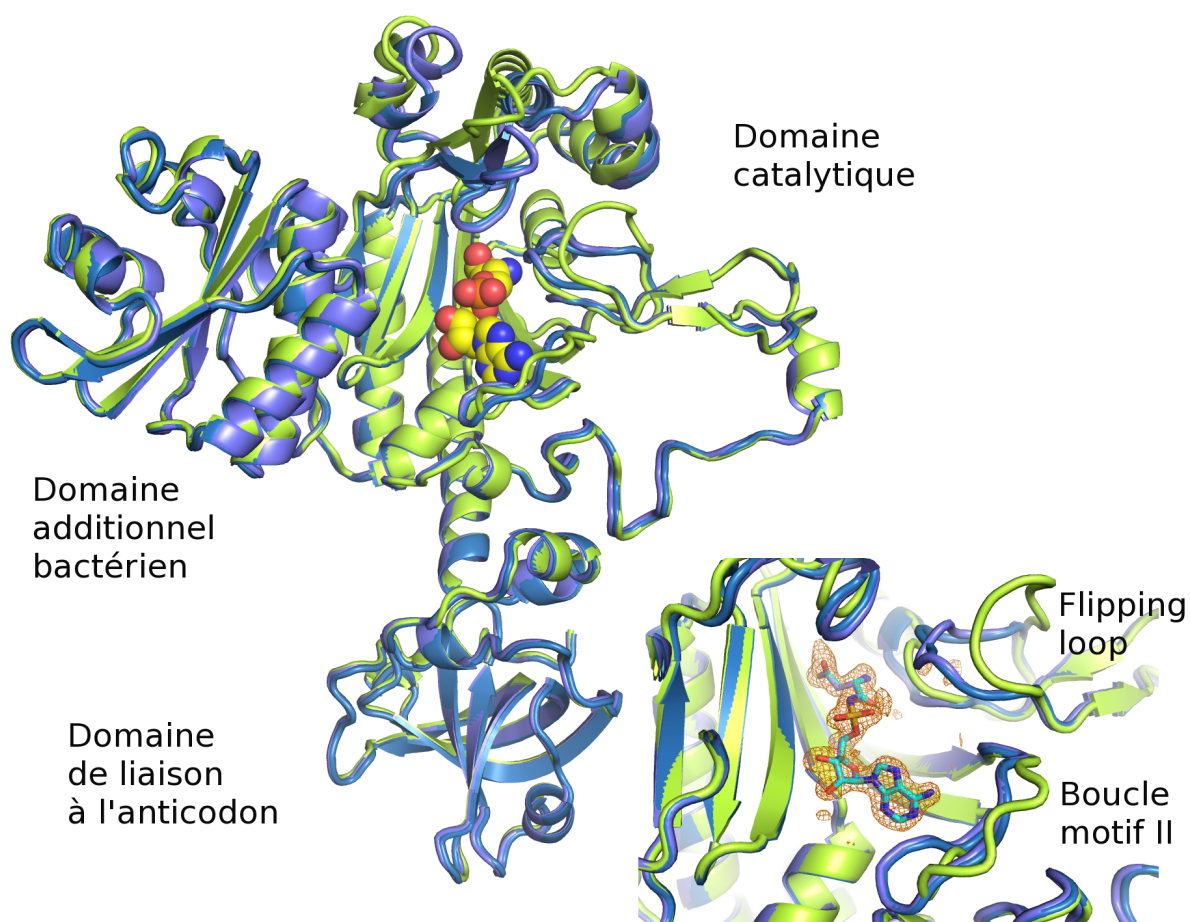


FIG. 3.2: Structures de l'AspRS1 isolée (en vert) et en présence d'Asp-AMS (bleu) ou d'aspartol (mauve) a) Vue d'ensemble des trois monomères superposés avec leurs boucles mobiles à proximité du site catalytique. b) Zoom sur le site actif de l'enzyme montrant les mouvements de la boucle dite du motif II (résidus 223-232) et de la « flipping loop » (résidus 173-180). La carte de densité différence en rouge (« omit map » contournée à 3 sigma) confirme la présence de l'Asp-ol-AMP.

4 Matériel biologique et aspects méthodologiques

4.1 De la cristallisation des macromolécules à leur structure tridimensionnelle

4.1.1 Les macromolécules biologiques

Les macromolécules utilisées pour les essais de cristallisation dans les puces sont de provenances différentes. Ce sont soit des protéines d'origine commerciale (lysozyme, thaumatine, insuline), soit des macromolécules préparées au laboratoire (virus de la mosaïque jaune de navet, protéine Clamp β d'*Escherichia coli*, aspartyl-tRNA synthétase 2 de *Thermus thermophilus*).

Lysozyme du blanc d'oeuf de poule : Le lysozyme du blanc d'oeuf de poule est composé de 129 acides aminés, 4 ponts disulfure, pour une masse moléculaire de 14,2 kDa. Son pHi est de 9,4. Le lysozyme de poule commercialisé par Seikagaku corporation (Japon) est six fois recristallisé.

Thaumatine : La thaumatine est un édulcorant naturel extrait des fruits de *Thaumatococcus daniellii*, un buisson qui pousse dans les forêts d'Afrique de l'Ouest. Les fruits étaient traditionnellement utilisés depuis des siècles comme édulcorant par plusieurs communautés locales. La protéine, qui est 2 000 fois plus sucrée que le sucre ordinaire, a été découverte par des chercheurs de l'Université d'Ifè au Nigéria. Depuis plusieurs années, la thaumatine est commercialisée comme édulcorant à faible teneur en calories, et utilisée par les industries alimentaires et de la confiserie. La thaumatine est composée de 207 acides aminés, pour une masse moléculaire de 22,2 kDa. Son pHi est de 8,4. Elle forme une

structure compacte en feuillet β rigidifiée par 8 ponts disulfure. La thaumatine utilisée est commercialisée par Sigma, lot 108F0299.

Insuline : L'insuline est une hormone hypoglycémiant protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Certaines formes de diabète, dit pour cette raison insulino-dépendants ou diabète de type 1, sont traitées par injections de cette hormone. Elle est composée de deux chaînes peptidiques : une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés reliées entre elles par trois ponts disulfures. L'insuline utilisée est d'origine bovine (sigma).

Virus de la mosaïque jaune de navet (TYMV) : ¹ Il est multiplié dans le chou chinois (Petai, *Brassica rapa*) puis purifié par précipitation isoélectrique des protéines contaminantes du jus cellulaire et par ultracentrifugation. Pratiquement, les feuilles de chou chinois sont broyées dans un mixeur, le jus résultant est filtré sur de la gaze. De l'acide acétique est ajouté au jus jusqu'à atteindre un pH de 4,8 afin de précipiter les protéines. Après 2 h à 4°C, la suspension résultante est centrifugée à basse vitesse (3000 x g). Puis le surnageant est ultracentrifugé à 100000 g pendant 1h et le culot est redissous dans du phosphate de sodium à pH 7. Après une deuxième centrifugation à basse vitesse et une ultracentrifugation le virus est repris dans un petit volume puis filtré sur une membrane de porosité 0,22 μ m. Pour vérifier la pureté de la solution, le spectre UV est étudié en mesurant la densité optique DO : pour que le virus soit pur, on sait que le rapport 260/280 doit être au moins de 1,5 (Lorber et al., 2008) .

Protéine Clamp bêta de *E. coli* : La protéine clamp β est composé de 392 acides aminés et fait environ 43 kDa. Son pHi est de 5,98. Le gène de la protéine Clamp bêta a été cloné dans un plasmide d'expression pET 15b² qui présente une origine de répllication donnant un nombre important de copies, un gène de résistance à l'ampicilline, une séquence permettant le clonage puis l'expression de la séquence clonée. Les bactéries utilisées sont des bactéries DH5 alpha. Ces bactéries sont lysogènes pour la séquence codante du gène de l'ARN polymérase T7. Ce gène est sous la dépendance du promoteur et de l'opérateur lactose³. En phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4$), 1 mM de IPTG (IsoPropyl β -D Thiogalactopyranoside) est ajouté au milieu de culture. L'IPTG va entrer dans la bac-

¹TYMV, Turnip Yellow Mosaic Virus en anglais

²<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB045.pdf>

³<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/NDIS/inno01-000.pdf>

térie, se fixer sur LacI ce qui va induire un changement de sa conformation. LacI ainsi modifié ne peut plus se fixer sur l'opérateur LacO. L'ARN polymérase d'*E. coli* pourra donc venir se fixer sur le promoteur Lac, permettant la production de l'ARN polymérase T7. L'ARN polymérase T7 peut alors venir se fixer sur le promoteur T7, permettant l'expression du gène (la séquence de la protéine Clamp β avec une queue de 6 His). Suite à la lyse au lysozyme, une chromatographie d'affinité est réalisée, elle repose sur la propriété de fixation des histidines sur des ions métalliques Ni^{++} . L'étiquette Histidine interagit fortement avec les ions métalliques. Après lavage des protéines non retenues, la protéine est ensuite éluée par un gradient de solution imidazole 1M qui déplace la protéine de l'ion métallique par compétition. La dernière étape de cette purification est un passage sur une colonne MonoQ avant concentration de la protéine (Kong et al., 1992).

Aspartyl-tRNA synthétase 2 (AspRS2) : Le gène de la protéine AspRS2 de *T. thermophilus* a été cloné dans le vecteur pET-3b et exprimé dans la souche BL21 de *E. coli*. Les cellules ont été cassées par changement de pression en utilisant la french press (1,6 Kbar) puis centrifugées pendant 2h à 105000g à 4°C. Le surnageant a été récupéré. La première étape de purification était la foculation, qui consistait à chauffer le surnageant pendant 30 min à 60 °C pour séparer les protéines de *E. coli* de l'AspRS2 de *T. thermophilus*. Les protéines de *E. coli* sont thermosensibles, elles précipitent. Après centrifugation, le surnageant est dialysé. La deuxième étape de la purification est une chromatographie sur colonne DEAE⁴-cellulose (DE52, Whatman), qui permet de séparer les protéines des acides nucléiques. L'élution de la protéine se fait par un gradient de phosphate de potassium. Pour la dernière étape de la purification, nous avons utilisé une matrice échangeuse de cations, la phosphocellulose P11⁵ (Whatman), qui retient sélectivement les protéines pourvues de domaines cationiques forts et permet d'éliminer les traces d'acides nucléiques qui n'ont pas été éliminés sur DEAE-cellulose. Cette étape permet un enrichissement important en protéine. L'AspRS2 est éluée avec un gradient de concentration en KCl et sa pureté est vérifiée par électrophorèse dénaturante SDS-PAGE (Charron et al., 2001).

⁴diéthylaminoéthyl (-OCH₂CH₂NH⁺(CH₂CH₃)₂)

⁵cellulose-OPO₃H₂

4.1.2 Détermination des concentrations

La concentration en protéine est déterminée en mesurant l'absorption des UV à 280 nm et en appliquant la loi de Beer-Lambert reliant la densité optique Do de la solution protéique à sa concentration C (mg.ml^{-1}) par l'équation : $Do = ExCxL$ avec E , le coefficient d'extinction de la protéine, et L , la longueur du trajet optique à travers la solution du protéine exprimée en cm. E est fonction du coefficient d'extinction molaire (ϵ_m) et de la masse moléculaire de la protéine (M). $E = \frac{\epsilon_m}{M}$. ϵ_m est déterminé à l'aide de la composition en aminoacides selon la formule d'Edelhoc (Edelhoc, 1967) qui tient compte des coefficients d'extinction molaires à 280 nm du tryptophane (5690) et de la tyrosine (1280) et de leur nombre respectif (X et Y) dans la protéine selon l'équation $\epsilon_m = 5690 X + 1280 Y$. Les mesures de densités optique sont effectuées par un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000, dont l'avantage premier est de nécessiter une très petite quantité d'échantillon (1 à 2 μl), mais également de posséder une zone de linéarité très large (concentration en protéine 0,1 à 50 mg/ml et en acides nucléiques 2 à 3000 $\mu\text{g/ml}$).

4.1.3 Détermination de l'homogénéité

L'analyse de la lumière diffusée par une solution de macromolécule est une technique spectroscopique qui permet d'obtenir des informations sur sa composition. Lorsqu'un faisceau de lumière traverse un liquide non absorbant, la majeure partie du rayon incident traverse directement le milieu. Une faible partie est diffusée, c'est-à-dire renvoyée dans toutes les directions par les molécules en solution. L'analyse des fluctuations de la lumière diffusée par les particules soumises au mouvement brownien renseigne sur la taille des particules et leur polydispersité. Les mesures permettant l'analyse ont été effectuées avec un appareil de diffusion de lumière selon le mode dynamique, Zeta Sizer Nano S (Malvern Instrument, Malvern, UK), sur des échantillons filtrés sur une membrane de porosité 0,25 μm puis ultracentrifugés pendant 1h à 100 000 g. Dans le cas d'une population unique de particule, la fonction d'autocorrelation donne un coefficient de diffusion translationnel. En admettant que les particules sont des sphères rigides, on peut en déduire un rayon hydrodynamique avec la formule de Stokes - Einstein qui relie ce rayon à la constante de diffusion D selon :

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta r}$$

avec K_B la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité et r le rayon. En supposant qu'elles sont des protéines, on peut estimer la masse. En général, une protéine pure et homogène est monodisperse, une protéine agrégée ou contaminée est polydisperse. La diffusion de lumière est utile pour évaluer non seulement l'homogénéité d'un échantillon mais aussi ses chances de cristalliser. Les échantillons purs et homogènes cristallisent plus facilement que ceux qui ne le sont pas (Mikol et al., 1990).

4.1.4 Cristallisation de macromolécules modèles

Tous Les produits utilisés pour préparer les solutions utilisées sont Dnase, Rnase et protease free (Tableau 4.1). La préparation des solutions est réalisée avec une eau ultrapure, pour préparation injectable, vendue par la société Cooper. Toutes ces solutions ont été filtrées en utilisant le système millipore avec des membranes de porosité de 0,22 μm .

Les cristaux sont observés sur un microscope Nikon SMZ 1500 couplé à un appareil photo. Le grossissement maximal de cet appareil est de 150 et la lumière est polarisée. Le système permet le suivi des expériences et l'archivage des images.

4.1.5 Analyse cristallographique

Les données de diffraction aux rayons X ont été enregistrées sous rayonnement X au European Synchrotron Radiation Facility (ESRF Grenoble) sur la ligne FIP (French beamline for Investigation of Proteins) BM 30. Au début de nos travaux, cette ligne était la seule équipée d'un bras robotisé capable de tenir une microplaque et de la positionner dans le faisceau de rayons X (Jacquamet et al., 2004). Cette ligne est dédiée à l'analyse cristallographique des macromolécules biologiques. Elle peut être utilisée pour collecter des données à différentes longueurs d'onde pour réaliser un phasage basé sur la diffusion anormale (MAD). La longueur d'onde utilisée dans nos travaux était fixée à 0,98 Å qui correspond au maximum de flux de la ligne. La taille du faisceau sur l'échantillon est définie par un système de fentes. Le détecteurs utilisé est un ADSC Quantum 315r (Figure 4.1).

Le détecteur disposé derrière le cristal permet d'enregistrer et de mesurer l'intensité des taches générées par la diffraction du rayon à travers le cristal. La distance cristal-détecteur est ajustée

Macromolécules	Lysozyme	Thaumatine	Insuline	Clamb β	TYMV	AspRS2
Masse moléculaire (kDa)	14,2	22,2	5,8	75	5,5.10 ⁶	48,3
Concentration (mg/ml)	50	40	20	50	15 à 25	14
Coefficients d'extinction molaires à 280 nm (M ⁻¹ cm ⁻¹)	38940	29110	5840	16180	46,2 10 ⁹ *	55900
Tampon de la solution stock	0,1 M Acétate Na pH 4,6	0,1 M ADA ^a pH 6,5	0,02 M Na ₂ HPO ₄ 0,01 M Na ₃ EDTA	20 mM Tris HCl ^b pH 7,5 0,5 mM EDTA ^c 20% glycérol	H ₂ O	20 mM Tris HCl pH 7,5 200 mM NaCl
Solution de cristallisation	4M NaCl 0,1 M Acétate Na pH 4,6	1,5 M tartarate Na 0,1 M ADA pH 6,5	0,5 M Na ₂ HPO ₄ / Na ₃ PO ₄ pH 10.2	14% PEG ^d 8000 0,1 M de cacodylate Na pH 4,6 0,05 M cacodylate Mg	1,5 M Phosphate d'ammonium 0,1 M MES ^e pH 3,9	40% PEG 0,2 M NaCl 0,1 M CHES pH 9,5
Origine	Seikagaku corporation	Sigma, lot 108F0299	Sigma, cat.no I5500	Laboratoire	Laboratoire	Laboratoire

TAB. 4.1: Macromolécules les essais de cristallisation dans les puces

* Coefficients d'extinction molaires à 260 nm (M⁻¹cm⁻¹)

^aacide N-(2-acétamido)-2-imino-diacétique

^bTris hydroxy-méthyl-aminométhane sous forme chlorhydrate

^cd'acide éthylène-diamine-tétra acétique

^dPolyéthylène glycol

^eacide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique

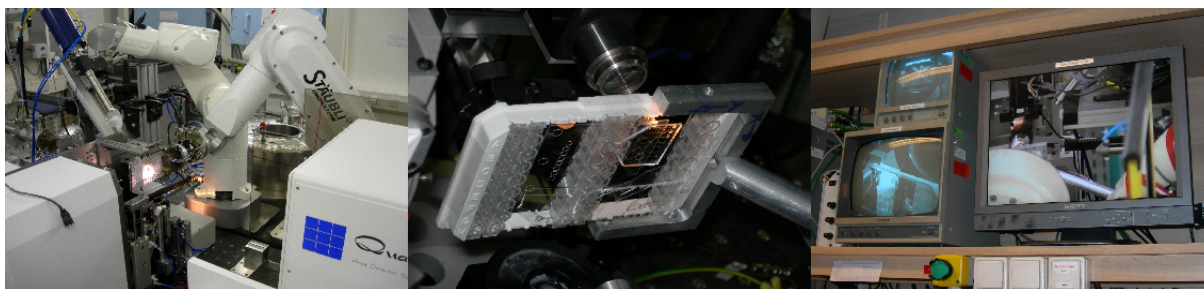


FIG. 4.1: La ligne BM30. L'image de gauche montre le bras robotisé. L'image du milieu la puce en PDMS sur un support rigide collé à une plaque de format SBS le tout tenu par le bras robotisé. L'image de droite montre le poste de commande, à partir de ces écrans, nous orientons le faisceau sur le cristal

en fonction de la limite de diffraction du cristal étudié. Pour collecter un jeu de données complet le cristal tourne dans le faisceau incident par pas d'un demi à un degré autour d'un axe perpendiculaire au faisceau incident. À chaque oscillation, un cliché de diffraction est enregistré. L'oscillation totale nécessaire pour collecter un jeu complet est définie en fonction des symétries existant dans le cristal. Tous les jeux de données ont été collectés à température ambiante. Les images obtenues ont été traitées à l'aide du programme XDS qui permet d'indexer les réflexions, moyenner les taches équivalentes, affiner les paramètres de maille du cristal à partir de l'ensemble des données, établir une analyse statistique des données (complétude, rapport signal sur bruit, R_{sym}). Le calcul des facteurs de structure (F_{hkl}) à partir des intensités (I_{hkl}) est effectué à l'aide de la suite Ccp4 (*Collaborative Computational Project*, 1994). Le remplacement moléculaire et l'affinement sont réalisés à l'aide du programme PHENIX (Adams et al., 2002). La construction est effectuée par le programme Coot (Emsley et Cowtan, 2004).

4.2 Microfluidique

La microfluidique est une technologie issue du monde des MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*) qui s'est développée à partir des techniques de microfabrications mises au point pour la microélectronique. Ce chapitre s'organisera de la façon suivante : on présentera les matériaux sélectionnés et testés pour la fabrication de la puce microfluidique, puis la deuxième partie portera sur les techniques utilisées pour fabriquer les prototypes : la lithographie, le matriçage à chaud ou « *hot embossing* », l'abrasion laser et la micro-injection (Becker et Gartner, 2008).

4.2.1 Matériaux

Dès le départ, les contraintes étaient une bonne transparence optique d'une part afin de visualiser la formation des cristaux et une excellente transparence aux rayons X afin de perturber le moins possible l'obtention du spectre de diffraction *in situ*. Il fallait de plus choisir des matériaux présentant le moins d'interactions possibles avec les macromolécules biologiques. Les composés métalliques étaient donc exclus et ce sont donc des matériaux polymères qui répondraient le mieux à nos exigences. Parmi toutes les possibilités nous avons sélectionné les polymères suivants (Figure 4.2) :

Le Poly-diméthyl-siloxane (PDMS) : Le PDMS est le polymère organique à base de silicium le plus employé pour la réalisation de prototypes microfluidiques en raison de son faible coût et de sa mise en oeuvre facile (Mata et al., 2005). Il présente aussi d'autres avantages comme sa transparence optique, utile dans les cas d'un suivi optique (mais tous les PDMS ne sont pas transparents), sa biocompatibilité intéressante pour la réalisation de dispositifs à applications biologiques et médicales. Une autre propriété qui peut être mise à profit est sa porosité qui permet le passage de petites molécules de gaz comme l'oxygène ; cette propriété permet par exemple d'oxygéner les solutions pour les cultures de cellules et peut servir également à mouvoir les fluides dans des systèmes microfluidiques (Verneuil et al., 2004; Randall et Doyle, 2005; Hansen et al., 2006; Leng et al., 2006); cela peut être aussi un désavantage à cause des problèmes d'évaporation produisant des bulles dans les microcanaux d'un dispositif microfluidique et de dessèchement des échantillons. Il existe une variété considérable de PDMS (Mata et al., 2005). Pour notre part, nous utilisons comme de nombreux groupes dans le monde, un PDMS thermoréticulable commercialisé par Dow Corning : le Sylgard 184. Il fait partie des PDMS dits RTV (*Room Temperature Vulcanized*). Il polymérise à température ambiante (25 °C) en 48 h. Une élévation de température permet de réduire ce temps (45 minutes à 100°C , 10 minutes à 150 °C). Le PDMS Sylgard 184 se présente sous la forme de deux composants : un prépolymère et un agent réticulant dont le mélange permet de créer des liaisons entre les chaînes de PDMS. La proportion d'agent réticulant permet de jouer sur le caractère élastique du PDMS. L'étape de mélange est très importante, un mélange insuffisant rendant le PDMS cassant. Il faut aussi dégazer soigneusement le mélange avant le moulage afin d'éviter la formation de bulles. L'épaisseur de PDMS peut être déterminée par la quantité versée dans le « wafer »

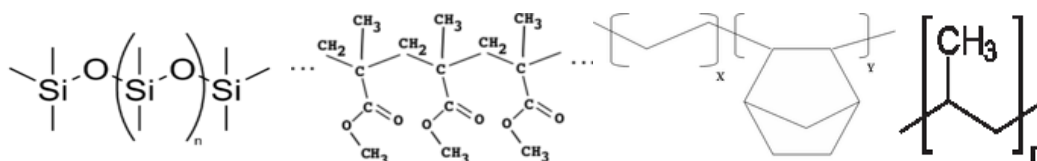


FIG. 4.2: Structures des matériaux. De gauche à droite : Le poly-dimethyl-siloxane (PDMS), le polyméthacrylate de méthyle (PMMA), le Copolymère d'oléfine cyclique (COC), le polypropylène (PP).

(récipient de taille d'une boîte de Pétri). Un facteur à prendre en compte est le rétrécissement du PDMS lors du démoulage dû aux contraintes induites par la réticulation, qui est de l'ordre de 1,5%.

Le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) : Le polyméthacrylate de méthyle, souvent abrégé en PMMA, de l'anglais *Polymethyl Methacrylate*, est un thermoplastique transparent dont le monomère est le méthacrylate de méthyle (MAM). Ce polymère est plus connu sous son premier nom commercial de Plexiglas (nom déposé). Le PMMA a de nombreux avantages dont les principaux sont qu'il est transparent et sans couleur, résistant, amorphe. Il permet une excellente transmission de la lumière (jusqu'à 92 % de la lumière visible), soit plus que le verre.⁶

Copolymère d'oléfine cyclique (COC) : Nous avons également utilisé le copolymère d'oléfine cyclique de Topas[®] ⁷ (COC 5013 et le COC 6013). Le COC est un polymère amorphe, transparent, rigide, biocompatible, résistant aux acides et aux bases, à faible birefringence, de plus en plus utilisé en microfluidique.

Le Polypropylène (PP) : Le polypropylène est un polymère thermoplastique de grande consommation.

4.2.2 Méthodes de fabrication

Le domaine de la microfabrication a trait à la réalisation d'objets dont la taille est comprise entre la fraction de micron et le millimètre. Dans ce qui suit, nous donnons une présentation simplifiée des processus mis en oeuvre.

Environnement de la microfluidique : La microfabrication s'effectue dans un environnement exempt de poussières que l'on appelle salle blanche (Figure 4.3). Les poussières standards

⁶<http://www.goodfellow.com/F/Polymethylmethacrylate.html>

⁷http://www.topas.com/topas_brochure_english.pdf

*Les droits sur cette image sont détenus par un tiers
La modification de cette partie de la thèse a été effectuée par le
Service Commun de la Documentation de l'Université de Strasbourg*

FIG. 4.3: Travail en salle blanche

ont une taille micrométrique et tendent à s'adsorber sur les surfaces ; compte tenu des échelles mises en oeuvre dans la microfabrication, et de nos besoins en tant que cristallographes pour avoir une cristallisation homogène et une bonne qualité de cristaux, il est nécessaire que le système microfluidique soit fabriqué dans un environnement dépourvu de poussière. La salle blanche est un environnement régulé en température (autour de 20 °C), en hygrométrie (degré d'humidité dans l'air), et traversé en permanence par des flux d'air filtrés permettant l'élimination ininterrompue des poussières et des gaz qui s'introduisent inévitablement dans l'espace de travail. On qualifie une salle blanche par des classes qui représentent le nombre de poussières dont la taille est inférieure à 4 µm, contenues dans un volume égal à un pouce-cube. Il est nécessaire de porter des habits spécifiques, de se recouvrir les cheveux, de se munir de gants et de sur-chaussures pour ne pas dégrader la propreté de la salle. L'entrée et la sortie se font par l'intermédiaire d'un ou plusieurs sas. En effet, le corps humain produit une quantité importante de produits contaminants comme les poils, les cheveux, les cellules de peau morte... C'est pour cela que les opérateurs qui évoluent dans la salle blanche doivent être vêtus d'un équipement plus ou moins important suivant le degré de contamination et d'empoussièrement toléré. L'équipement peut comporter une combinaison, un couvre cheveux (calotte), des gants, des chaussons, un masque... Les outils utilisés à l'intérieur sont choisis pour produire le moins de particules possible.

La lithographie : La lithographie est la technique la plus utilisée pour fabriquer des moules pour les système microfluidique. Les étapes du procédé de photolithographie commencent par l'application d'une photorésine sous forme d'un film fin à la surface d'un substrat. Elle est ensuite exposée à une radiation lumineuse. Lors de cette étape l'utilisation d'un masque, formé de zones opaques et transparentes, permet de définir le motif que

l'on souhaite reproduire sur la plaquette. Les masques ont été réalisés par impression laser sur un film transparent. L'exposition crée des réactions au sein de la résine et engendre des modifications chimiques, les zones irradiées vont voir leur solubilité évoluer suivant le type de résine (Figure 4.4). Les solvants spécifiques contenus dans le développeur vont permettre d'éliminer certaines parties du film de résine, qui couvre encore toute la surface de la plaquette, et de mettre à nu le substrat. La résine photosensible SU-8, dans notre cas du fabricant Microchem, est une résine négative. La polymérisation de la SU-8 est une photopolymérisation qui peut être induite par un acide de Lewis. Cet acide est généré lors de l'illumination UV. Il sert de catalyseur pour la polymérisation de la SU-8. Le catalyseur est présent seulement dans les zones irradiées par les UV qui, par conséquent, polymériseront. La résine SU-8 a été conçue par une insolation dans la gamme du proche UV de 350 nm à 400 nm ; la longueur d'onde pour laquelle la résine est la plus transparente est 365nm d'après le fabricant. Pour obtenir une réplique, le mélange prépolymère et agent réticulant soigneusement dégazé est versé dans le moule. Une fois le PDMS polymérisé, le tout est démoulé pour récupérer les motifs inverses du moule utilisé (Figure 4.5). Les canaux de PDMS sont fermés par un couvercle en PDMS collé par activation plasma (Owen et Smith, 1994). C'est une technique de collage irréversible. Cette technique repose sur la création d'un pont oxygène très résistant entre les deux surfaces de PDMS.

L'ablation laser : C'est une technique de micro-usinage direct du plastique. Le plastique est sublimé par l'application localisée d'un faisceau laser intense. Le micro-usinage laser permet de réaliser un motif dont les dimensions sont à l'échelles du micron. Le laser utilisé est un Nd : YAG à rayonnement infra rouge (longueur d'onde de 1064 nm), pour lequel l'interaction avec la matière est thermique donnant un usinage rapide.

Le matriçage à chaud : Le procédé de matriçage à chaud ou « hot-embossing » est une technique simple et relativement flexible de réplique qui peut être conduite sur des polymères thermoplastiques ou thermodurcissables. Dans notre cas, on utilise les polymères thermoplastiques (COC, PMMA). Ces polymères se présentent à l'état solide à température ambiante et ont la particularité de ramollir au dessus d'une certaine température que l'on appelle température de transition vitreuse (Tg). Ils deviennent ainsi malléables au dessus de la Tg et redeviennent durs lorsque l'on redescend en dessous. Tout d'abord on a une

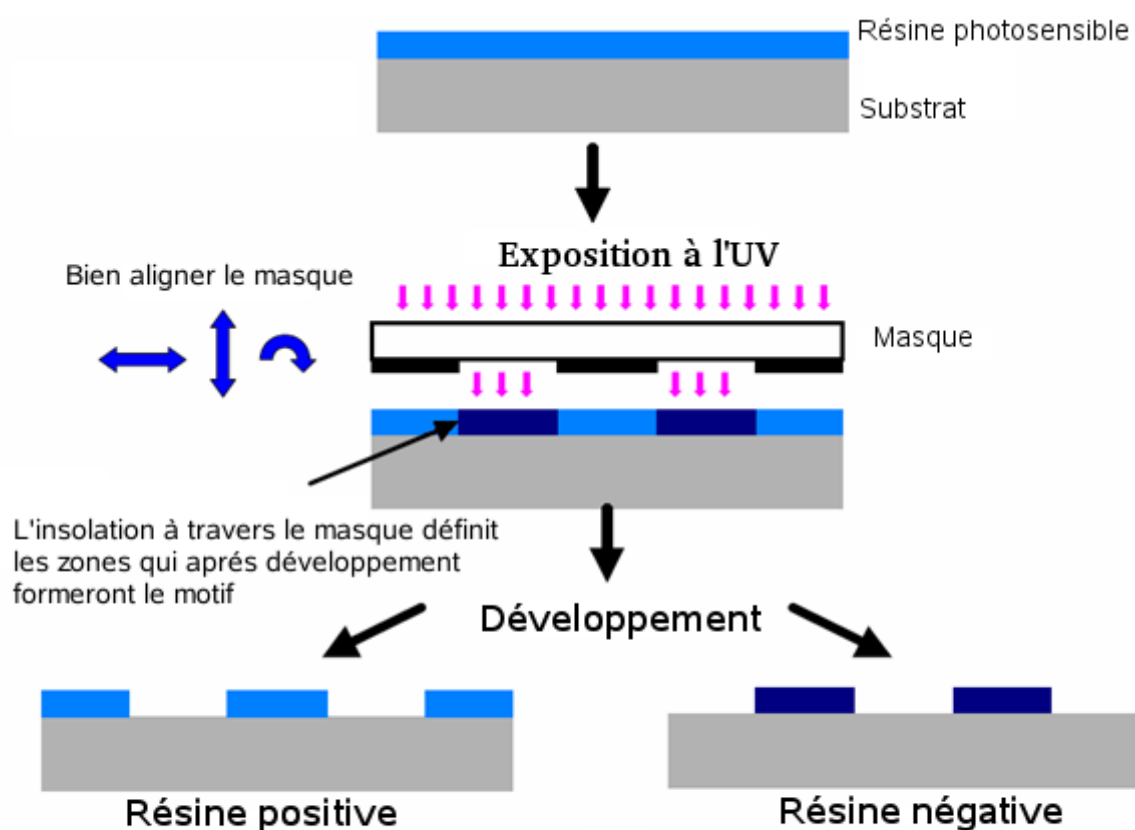


FIG. 4.4: Procédé classique de photolithographie de la résine négative SU-8

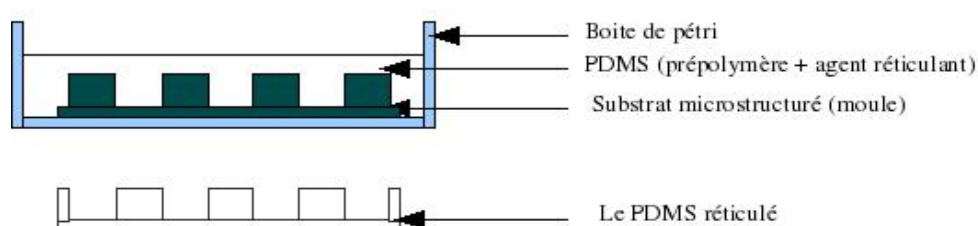


FIG. 4.5: Procédé de base de réplique du PDMS par la technique de coulage Le PDMS (prépolymère + agent réticulant) est versé sur un moule. Le PDMS réticulé est dé-moulé puis coupé.

phase de chauffage du polymère, utilisée pour l'amener au dessus de sa température de transition vitreuse afin qu'il devient mou et malléable. Ensuite, on vient presser le moule à répliquer contre le plastique en phase molle afin que le plastique flue dans les motifs du moule. On maintient la pression pendant une durée bien déterminée puis on refroidit. Le plastique va se solidifier et produire le motif inverse du moule répliqué (Figure 4.6).

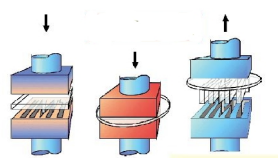


FIG. 4.6: Principe du matriçage à chaud. De gauche à droite cette figure montre le plastique dans le moule, puis le moule pressé sur le plastique en phase molle afin que le plastique flue dans les motifs du moule, et enfin, après refroidissement, le plastique solidifié reproduisant le motif inverse du moule.

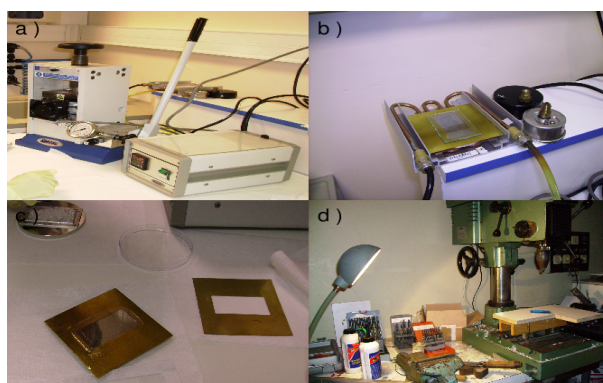


FIG. 4.7: Les outils de fabrication des plaques en COC : a) Presse à main avec contrôle de température. b) Système de refroidissement (serpentin en cuivre à circulation d'eau). c) Moule. d) Perceuse pour réaliser les ouvertures de la puce.

Le procédé de hot-embossing permet de réaliser des pièces relativement délicates avec une très bonne qualité de réplique. La variété des polymères disponibles permet de bénéficier de toute une gamme de caractéristiques différentes en températures de transition vitreuses, en coefficients d'expansion thermique, en propriétés optiques ou encore en propriétés de mouillage de surface ou en biocompatibilité. Pour notre part, on s'était orienté sur le PMMA et le COC, car les dispositifs à réaliser doivent être biocompatibles et bas coût. De plus, leurs températures de transitions visqueuses sont suffisamment basses pour que l'on puisse facilement les mettre en forme avec la presse chauffante utilisée qui est limitée à 250 °C. Le moule de nos dispositifs est réalisé par procédé UV-LIGA. Sur la figure 4.7, nous pouvons voir les outils de fabrication utilisés par nos partenaires à Lyon.

La micro-injection : La micro-injection ou le procédé de moulage par injection est utilisée pour obtenir avec une très grande reproductibilité des motifs de taille micrométrique ou sub-micrométrique. La méthode se décompose de trois phases : - Le matériau plastique est injecté sous forme liquide dans un moule, sous vide et sous pression, à température supérieure à T_g (température de transition vitreuse du plastique) - Le système est refroidi

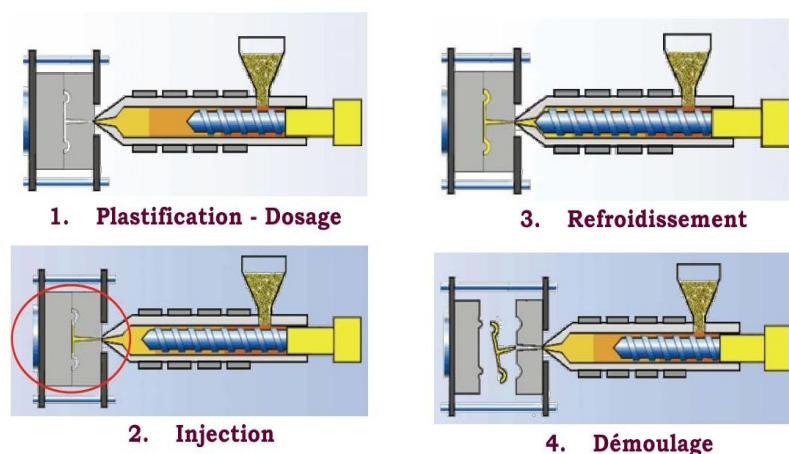


FIG. 4.8: Etapes du moulage par injection



FIG. 4.9: Presse injection Arbourg® dans la salle grise de l'ENSMM.

au-dessous de la température de transition vitreuse - Après démoulage, on obtient une structure correspondant au négatif du moule utilisé (Figure 4.8). Les moules sont délicats à réaliser, et l'optimisation est complexe. Cette technique est intéressante du point de vue industriel, pour les productions de grande série. Elle bénéficie par ailleurs d'un savoir-faire important dans le domaine de la plasturgie. Pour fabriquer les puces microfluidique, une presse d'injection de type Arbourg® a été utilisée (Figure 4.9).

5 Conclusion, perspectives et aspects économiques

Lorsque j'ai rejoint le projet en 2006, il s'agissait de passer d'une preuve de concept à une puce microfluidique de cristallisation fonctionnelle. Trois ans plus tard, nous proposons un outil microfluidique, intégrant et facilitant l'ensemble des étapes d'une étude structurale, depuis la cristallisation jusqu'à l'analyse des cristaux obtenus par diffraction X, et les objectifs sont pour la plupart atteints. Ainsi un dispositif de cristallisation autonome qui permet la collecte des données *in situ* a été mis au point.

Le remplissage des chambres de cristallisation est passif et se fait par capillarité, sans l'utilisation ni de pompe ni de vanne. Le motif de la puce est simple, il doit garantir une utilisation facile à la portée de tous. Au cours de ce projet, nous avons évolués vers l'utilisation des matériaux rigides et fins et un dispositif de canaux fermés à la fabrication. Ceci a permis d'améliorer l'ergonomie du système, de surmonter les problèmes de reproductibilité observés dans les puces en PDMS, et d'aller vers un dispositif plus étanche. Les dispositifs de dernière génération, qu'ils soient en COC ou en PP, sont simples d'utilisation à tous les niveaux : lors du remplissage des différentes solutions, de l'observation des cristaux, de leur manipulation et stockage dans un format compatible avec le standard SBS, et de l'analyse des cristaux *in situ* (« on chip ») sous rayonnement X synchrotron.

Les systèmes microfluidiques développés dans la cadre de cette thèse assurent à la fois et de façon efficace la recherche de conditions de cristallisation et leur optimisation à partir de quantités réduites de macromolécules cibles, en utilisant la contre-diffusion comme méthode de cristallisation. Ils permettent l'observation et le suivi des cristallisations par microscopie optique. Plusieurs macromolécules modèles ont été cristallisées dans ces dispositifs : le lysozyme,

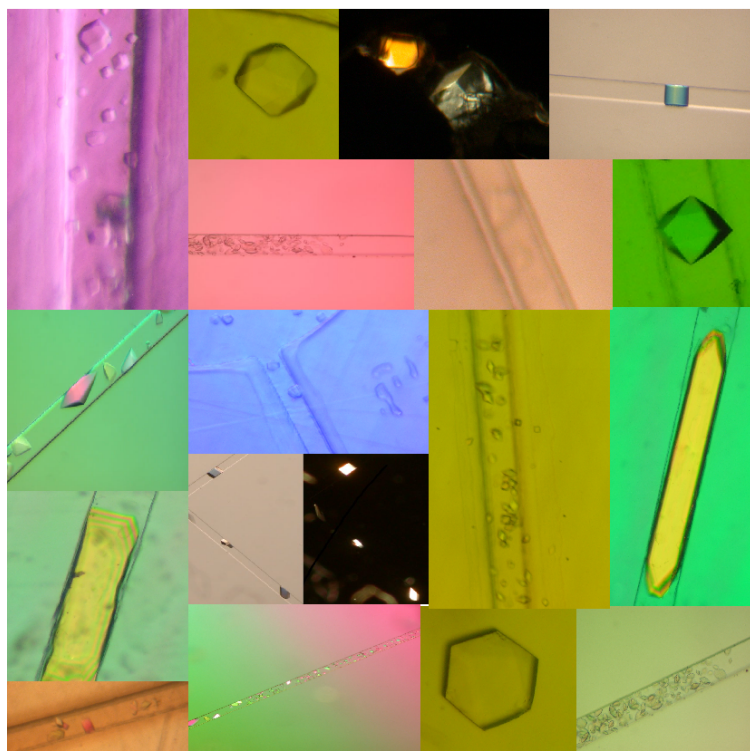


FIG. 5.1: Exemples de cristaux de macromolécules biologiques obtenus dans les différents dispositifs microfluidiques. Il s'agit de cristaux de lysozyme, de thaumatine, d'insuline, de clamp β , d'AspRS2 et du virus TYMV.

la thaumatine, l'insuline, la clamp β , l'AspRS2 et le virus TYMV (Figure 5.1). Les macromolécules testées dans les puces sont de natures diverses, ayant des propriétés différentes, et de tailles allant de 5,8 kDa pour l'insuline jusqu'à $5,5 \cdot 10^6$ kDa pour le virus. Nos dispositifs de nouvelle génération vont dans le sens de la standardisation et de l'automatisation pour une applications à haut débit pour répondre aux besoins spécifiques de la génomique structurale.

Une parti importante du travail a été consacrée à l'étude des matériaux et à l'amélioration de la géométrie de la puce pour rendre les dispositifs pleinement compatibles avec l'analyse des cristaux par diffraction des rayons X à haute résolution. Cette analyse peut se fait *in situ* à même la puce et à température ambiante. Les cristaux ainsi analysés sont conservés intacts et sans perturbation liée à leur manipulation de telle sorte que les configurations fonctionnelles des macromolécules restent préservées.

En conclusion, ces dispositifs sont idéaux pour la cristallisation des protéines membranaires dont les solutions contiennent déjà du détergent et des protéines sensibles à l'oxydation parce que la puce est fermée et que les échantillons ne sont pas en contact avec l'air. De plus, les

conditions de cristallisation trouvées dans les puces sont transposables à plus grande échelle (scale-up) dans des capillaires. Ceci est un avantages de la contre-diffusion par rapport aux autres méthodes adaptées à la microfluidique et dont les résultats sont plus difficilement reproductibles en grand volume.

Les perspectives de ce travail sont nombreux. Entre autres, nous avons commencé à explorer avec nos collaborateurs des solutions permettant de s'affranchir de l'ajout de détergent pour le remplissage des canaux. Ceci peut se faire par modification de leurs propriétés de surface pour les rendre hydrophiles par greffage de fonctions poly-éthylène-glycol (PEG) (Stachowiak et al., 2007). Un travail est en cours à l'INL qui permettra de simplifier le protocole de remplissage.

Par ailleurs, les puces permettent de cristalliser et de réaliser l'analyse cristallographique *in situ*, non plus uniquement de molécules modèles, mais de macromolécules plus complexes, incluant des collectes de données à différentes longueurs d'onde pour la détermination de structures par les techniques de phasage dites de « single ou multi-wavelength anomalous dispersion » (SAD ou MAD).

La fonctionnalité des prototypes reste à valider en situation réelle de criblage haut-débit sur de nouvelles molécules. Des tests de cristallisation avec plusieurs macromolécules présentant un fort intérêt biologique et la caractérisation des cristaux obtenus seront organisés avec des laboratoires partenaires. On s'attachera à valider la fonctionnalité de puces comportant un grand nombre de canaux pour paralléliser 32 essais, sur des cas concrets, incluant la recherche de conditions de cristallisation d'une grande variété de macromolécules, l'optimisation, puis l'enregistrement de données de diffraction sur ligne synchrotron.

Un dernier aspect doit encore être approfondi, il s'agit de la congélation des cristaux. Celle-ci est souvent nécessaire pour le préserver des dommages causés par une irradiation sous rayonnement intense synchrotron. Deux possibilités s'offrent à nous. La première est la congélation des cristaux au sein même de la puce. Ceci implique la présence d'un cryoprotectant dans la liqueur-mère (il peut être introduit par diffusion après cristallisation) et un transfert rapide du froid à travers le matériau de la puce jusqu'au cristal. Plus la couche de plastique sera mince, plus le refroidissement sera rapide. La qualité de congélation va dépendre de la sensibilité du cristal à la vitesse de congélation. Pour les échantillons sensibles, il est possible de modifier les

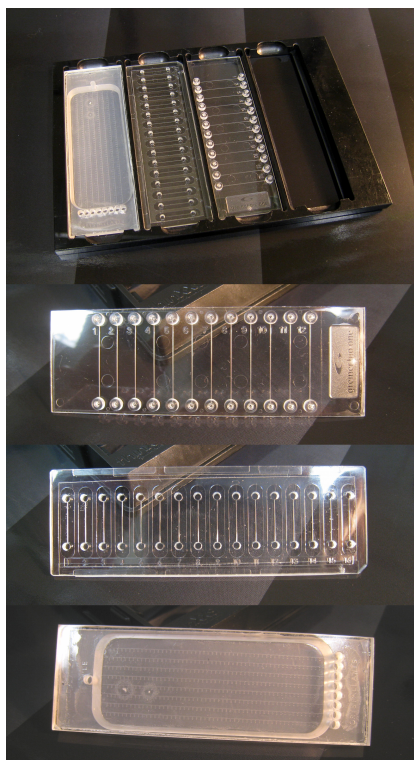


FIG. 5.2: Puces de cristallisation par contre-diffusion. De haut en bas, les trois puces réunies sur un support au format SBS, CrystalSlide de Greiner Bio-One, Crystal Former de Microlytic et ChipX 1.0 en version polypropylène (légèrement opaque). Les trois puces sont aux dimensions d'une lamelle de microscope.

dernières versions de puces pour rendre le couvercle amovible et permettre la « pêche » des cristaux et un protocole cryogénique classique.

Plusieurs systèmes microfluidiques de cristallisation ont été mis sur le marché depuis 2003. Les premiers systèmes restent très onéreux du fait de leur sophistication. Aujourd'hui, il y a d'autres systèmes apparus récemment qui ont en commun la contre-diffusion comme méthode de cristallisation, le plastique comme matériau, une utilisation simple et présentent un coût abordable qui les met à la portée de tous les laboratoires (Figure 5.2).

Le premier est développé par la multinationale Greiner Bio-one. Les canaux font 100 μm de diamètre et 2 cm de long. Dans une puce il y a 12 canaux individuels. Pour chaque essai, 0,6 μl d'échantillon sont déposés à une extrémité d'un canal pour le remplir, puis 0,45 μl de solution de cristallisation à l'autre extrémité pour débiter la cristallisation. Ces puces sont de format lame de microscope, disposent d'un porte-plaques au standard SBS et permettent l'analyse des

cristaux aux rayons X (Ng et al., 2008).

Le deuxième système est développé par la start-up Microlytic¹. Cette puce est au même format compatible SBS et contient 16 canaux non connectés. Elle se remplit de la même façon que la précédente et nécessite des quantités comparables de produits par essai. Les canaux de cette puce sont rendus hydrophiles par traitement chimique et sont fermés par un film amovible. En cas d'apparition de cristaux, il suffit de couper le film, « pêcher » un cristal et l'analyser aux rayons X.

Ces deux puces sont très proches des prototypes que nous avons développés et soulignent l'actuelle convergence d'idées en matière de systèmes de cristallisation microfluidiques. Dans ce contexte, notre puce offre néanmoins plusieurs atouts : 1) les canaux sont plus long pour optimiser la contre-diffusion, 2) les canaux sont plus fins, mieux adaptés au criblage, 3) le remplissage de l'ensemble des canaux se fait en un dépôt ce qui limite les pertes d'échantillon (seule la quantité nécessaire à l'expérience est déposée), 4) plus fine, elle est mieux adaptée au diagnostic *in situ* par diffraction des rayons X et propose un système intégré de repères facilitant le centrage. Nous avons ici un produit innovant, fonctionnel et compétitif qui trouvera sa place dans tout laboratoire utilisant la cristallographie comme méthode d'investigation, que ce soit dans une activité de recherche académique fondamentale, plus systématique et orientée vers la génomique structurale, ou dans des applications pharmaceutiques liées au développement de nouvelles molécules actives. Ce produit pourra conduire à un partenariat industriel pour une exploitation commerciale. Le travail effectué au cours de ces trois années de thèse facilitera le transfert du produit du laboratoire à une fabrication et un développement industriels. Au delà du projet lui-même, le concept de puce décrit ici pourra servir de plateforme au développement d'outils microfluidiques plus élaborés.

¹<http://www.microlytic.com>

Bibliographie

- Abola, E., Kuhn, P., Earnest, T. et Stevens, R. C. (2000). Automation of X-ray crystallography. *Nat Struct Biol* 7 Suppl :973–977.
- Adams, P., Grosse-Kunstleve, R., Hung, L.-W., Ioerger, T., McCoy, A., Moriarty, N., Read, R., Sacchettini, J., Sauter, N. et Terwilliger, T. (2002). PHENIX : building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Cryst D* 58 :1948–1954.
- Anderson, M. J., Hansen, C. L. et Quake, S. R. (2006). Phase knowledge enables rational screens for protein crystallization. *PNAS* 7 :16746–16751.
- Babine, R. et Abdel-Meguid, S. (eds.), *Protein crystallography in drug discovery* (WILEY-VCH, 2003).
- Baret, J., Miller, O. J., Taly, V., Ryckelynck, M., El-Harrak, A., Frenz, L., Rick, C., Samuels, M. L., Hutchison, J. B., Agresti, J. J., Link, D. R., Weitz, D. A. et Griffiths, A. D. (2009). Fluorescence-activated droplet sorting (FADS) : efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity. *Lab Chip* 9 :1850–1858.
- Becker, H. et Gartner, C. (2008). Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem* 390 :89–111.
- Becker, H., Roy, H., Moulinier, L., Mazauric, M. H., Keith, G. et Kern, D. (2000). *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA Synthetase. *Biochemistry* 39 :3216–3230.
- Biertumpfel, C., Basquin, J., Suck, D. et Sauter, C. (2002). Crystallization of biological macromolecules using agarose gel. *Acta Cryst D* 58 :1657–1659.
- Blow, N. (2007). Microfluidics : in search of a killer application. *Nature Methods* 4 :665–670.

- Boistelle, R. et Astier, J. P. (1988). Crystallization mechanisms in solution. *J Crystal Growth* 90 :14–30.
- Briand, C., Poterszman, A., Eiler, S., Webster, G., Thierry, J.-C. et Moras, D. (2000). An intermediate step in the recognition of tRNA(Asp) by aspartyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* 299 :1051–1060.
- Burns, M. A., Johnson, B. N., Brahmasandra, S. N., Handique, W. J. R., K., Krishnan, M., Sammarco, T. S., Man, P. M., Jones, D., Heldsinger, D., Mastrangelo, C. H. et Burke, D. T. (1998). An integrated nanoliter DNA analysis device. *Science* 282 :484–487.
- Carter, C. W. et Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem* 254 :12219–12223.
- Charles, M., Veesler, S. et Bonneté, F. (2006). MPCD : a new interactive on-line crystallization data bank for screening strategies. *Acta Cryst D* 62 :1311–1318.
- Charron, C., Roy, H., Blaise, M., Giegé, R. et Kern, D. (2003). Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *The EMBO Journal* 22 :1632 – 1643.
- Charron, C., Roy, H., Lorber, B., Kern, D. et Giegé, R. (2001). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of the second and archaebacterial-type aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Acta Cryst D* 57 :1177–1179.
- Chayen, N. E., Boggon, T. J., Cassetta, A., Deacon, A., Gleichmann, T., Habash, J., Harrop, S. J., Helliwell, J. R., Nieh, Y. P., Peterson, M. R., Raftery, J., Snell, E. H., Hadener, A., Niemann, S. D. P., A. C, Stojanoff, Y., Thomson, A. W., Ursby, T. et Wulff, M. (1996). Trends and challenges in experimental macromolecular crystallography. *Quarterly Reviews of Biophysics* 29 :227–278.
- Chayen, N. E. et Saridakis, E. (2002). Protein crystallization for genomics : towards high-throughput optimization techniques. *Acta Cryst D* 58 :921–927.
- Chayen, N. E. et Saridakis, E. (2008). Protein crystallization : from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods* 5 :147–153.
- Chen, D. L., Gerdts, C. J. et Ismagilov, R. F. (2005). Using microfluidics to observe the effect of mixing on nucleation of protein crystals. *J. Am. Chem. Soc* 127 :9672–9673.

- Craighead, H. (2006). Future lab-on-a-chip technologies for interrogating individual molecules. *Nature* 442 :387–393.
- Day, J. et McPherson, A. (1992). Macromolecular crystal growth experiments on International Microgravity Laboratory–1. *Protein Sci* 1 :1254–1268.
- Declercq, J. P., Evrard, C., Carter, D. C., Wright, B. S., Etienne, G. et Parello, J. (1999). A crystal of a typical EF-hand protein grown under microgravity diffracts X-rays beyond 0.9 Å resolution. *J Crystal Growth* 196 :595–601.
- DeLucas, L. J., Smith, C. D., Smith, H. W., Vijay-Kumar, S., Senadhi, S. E., Ealick, S. E., Carter, D. C., Snyder, R. S. et Weber, e. S. F. R., P.C. (1989). Protein crystal growth in microgravity. *Science* 246 :651–654.
- Demello, A. J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature* 442 :394–402.
- Dhouib, K., Khan-Malek, C., Pfleging, W., Gauthier-Manuel, B., Duffait, R., Thuillier, G., Ferrigno, R., Jacquamet, L., Ohana, J., Ferrer, J. L., Théobald-Dietrich, A., Giegé, R., Lorber, B. et C, S. (2009). Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. *Lab Chip* 9 :1412–1421.
- Dock, A. C., Lorber, B., Moras, D., Pixa, G., Thierry, J. C. et Giegé, R. (1984). Crystallization of transfer ribonucleic acids. *Biochimie* 66 :179–201.
- Ducruix, A. et Giegé, R. (eds.), *Crystallization of nucleic acids and proteins : a practical approach (second edition)* (IRL Press, Oxford, 1999).
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6 :1948–1954.
- El-Ali, J., Sorger, P. K. et Jensen, K. F. (2006). Cells on chips. *Nature* 442 :403–411.
- Emsley, P. et Cowtan, K. (2004). Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D* 60 :2126–2132.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. et Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347 :203–206.
- Fouillet, Y. et Achard, J. L. (2004). Microfluidique discrète et biotechnologie. *C R Physique* 5 :577–588.

- Franke, T. A. et Wixforth, A. (2008). Microfluidics for Miniaturized Laboratories on a chip. *ChemPhysChem* 9 :2140–2156.
- Frederickson, R. M. (2002). Fluidigm Biochips Get Indoor Plumbing. *Chemistry & Biology* 9 :1161–1162.
- García-Ruiz, J., Novella, M., Moreno, R. et Gavira, J. (2001). Agarose as crystallization media for proteins I : Transport process. *J Crystal Growth* 232 :165–172.
- García-Ruiz, J., Novella, M. et Otálora, F. (1999). Supersaturation patterns in counter-diffusion crystallisation methods followed by Mach-Zehnder interferometry. *J Crystal Growth* 196 :703–710.
- García-Ruiz, J. M. (2003). Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol* 368 :130–154.
- Gavira, J. A., Toh, D., López-Jaramillo, J., Garía-Ruiz, J. M. et Ng, J. D. (2002). Ab initio crystallographic structure determination of insulin from protein to electron density without crystal handling. *Acta Cryst D* 58 :1147–1154.
- Giegé, R., Dock, A., Kern, D., Lorber, B., Thierry, J. et Moras, D. (1986). The role of purification in the crystallization of proteins and nucleic acids. *J Crystal Growth* 76 :554–561.
- Giegé, R., Touzé, E., Lorber, B. et Théobald-Dietrich, C., A. and Sauter (2008). Crystallogensis trends of free and liganded aminoacyl-tRNA synthetases. *Crystal Growth Design* 8 :4297–4306.
- Gilliland, G. L., Tung, M. et Ladner, J. E. (2002). The Biological Macromolecule Crystallization Database : crystallization procedures and strategies. *Acta Cryst D* 58 :916–920.
- Hampel, A., Labanauskas, M., Connors, P. G., Kirkegard, L., RajBhandary, U. L., Sigler, P. B. et Bock, R. M. (1968). Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. *Science* 162 :1384–1387.
- Hansen, C. et Quake, S. R. (2003). Microfluidic in structural biology : smaller, faster...better. *Current Opinion in Structure Biology* 13 :538–544.
- Hansen, C. L., Classen, S., Berger, J. M. et Quake, S. R. (2006). A microfluidic device for kinetic optimization of protein crystallization and in situ structure determination. *J Am Chem Soc* 128 :3142–3143.

- Hansen, C. L., Skordalakes, E., Berger, M. J. et Quake, S. R. (2002). A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion. PNAS 99 :16531–16536.
- Hansen, C. L., Sommer, M. O. A. et Quake, S. R. (2004). Systematic investigation of protein phase behavior with a microfluidic formulator. PNAS 101 :14431–14436.
- Henisch, H. K. (ed.), *Crystals in gels and Liesegang rings* (Cambridge University Press, 1988).
- Huang, B., Wu, H., Kim, S. et Zare, R. N. (2005). Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-beta-D-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. Lab Chip 5 :1005–1007.
- Ibba, M., Cusack, S. et Franklin, C. (eds.), *The aminoacyl-tRNA synthetases* (Landes Bioscience, Georgetown, TX, USA, 2005).
- Jacquamet, L., Ohana, J., Joly, J., Borel, F., Pirocchi, M., Charraut, P., Bertoni, A., Israel-Gouy, P., Carpentier, P., Kozielski, B. D., F., Ferrer, J. et L. (2004). Automated analysis of vapor diffusion crystallization drops with an X-Ray beam. Structure 12 :1219–1225.
- Janasek, D., Franzke, J. et Manz, A. (2006). Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. Nature 442 :374–380.
- Jenner, L., Rees, B., Yusupov, M. et Yusupova, G. (2007). Messenger RNA conformations in the ribosomal E site revealed by X-ray crystallography. EMBO Rep 8 :846–850.
- Kam, Z., Shore, H. B. et Feher, G. (1978). On the crystallization of proteins. J Mol Biol 123 :539–555.
- Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M. et Kuriyan, J. (1992). Three-dimensional structure of the beta subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme : a sliding DNA clamp. Cell 69 :425–437.
- Kundrot, C. E. (2004). Which strategy for a protein crystallization project? Cell Mol Life Sci 61 :525–536.
- Leng, J., Lonetti, B. et Tabeling, P. (2006). Microevaporators for kinetics exploration of phase diagrams. Phys Rev Lett 96 :084503.
- Leng, J. et Salmon, J. B. (2009). Microfluidic crystallization. Lab Chip 9 :24–34.

- Li, L., Mustafi, D., Fu, Q., Tereshko, V., Chen, D. L., Tice, J. D. et Ismagilov, R. F. (2006). Nano-liter microfluidic hybrid method for simultaneous screening and optimization validated with crystallization of membrane proteins. *PNAS* 103 :19243–19248.
- Lin, S., McPherson, A. et Giegé, R. (2007). Good crystals, still a challenge for structural biology. *Crystal Growth Design* 7 :2124–2125.
- Lorber, B., A. Théobald-Dietrich, A., Charron, C., Sauter, C., Ng, J. D., Zhu, D. W. et Giegé, R. (2002). From conventional crystallization to better crystals from space : a review on pilot crystallogenesis studies with aspartyl-tRNA synthetases. *Acta Cryst D* 58 :1674–1680.
- Lorber, B., Adrian, M., Witz, J., Erhardt, M. et Harris, J. R. (2008). Formation of two-dimensional crystals of icosahedral RNA viruses. *micron* 39 :431–446.
- Lorber, B., Sauter, C., Ng, J. D., Zhu, D. W., Giegé, R., Vidal, O., Robert, M. C. et Capelle, B. (1999a). Characterization of protein and virus crystals by quasi-planar wave X-ray topography : a comparison between crystals grown in solution and in agarose gel. *J Crystal Growth* 204 :357–368.
- Lorber, B., Sauter, C., Robert, M. C., Capelle, B. et Giegé, R. (1999b). Crystallization within agarose gel in microgravity improves the quality of thaumatin crystals. *Acta Cryst D* 55 :1491–1494.
- Maes, D., Crabeel, M., Van de Weerd, C., Martial, J., Peeters, E., Charlier, D., Decanniere, K., Vanhee, C., Wyns, L. et Zegers, I. (2006). Crystallization of ornithine acetyltransferase from yeast by counter-diffusion and preliminary X-ray study. *Acta Cryst F* 62 :1294–1297.
- Marzi, S., Myasnikov, A. G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M. et Klaholz, B. P. (2007). Structured mRNAs regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell* 130 :1019–1031.
- Mata, A., Fleischman, A. J. et Roy, S. (2005). Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties of Biomedical Micro/Nanosystems. *Biomedical Microdevices* 7 :4 :281–293.
- McPherson, A. (ed.), *Crystallization of biological macromolecules* (Cold Spring Harbor and New York : Cold Spring Harbor Lab. Press, 1999).
- McPherson, A. et Cudney, B. (2006). Searching for silver bullets : an alternative strategy for crystallizing macromolecules. *J Struct Biol* 156 :387–406.

- Metlitskaya, A., Kazakov, T., Kommer, A., Pavlova, O., Praetorius-Ibba, M., Ibba, M., Krashennnikov, I., Kolb, V., Khmel, I. et Severinov, K. (2006). Aspartyl-tRNA synthetase is the target of peptide nucleotide antibiotic Microcin C. *J Biol Chem* 281 :18033–18042.
- Mikol, V., Hirsch, E. et Giegé, R. (1990). Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering. *J Mol Biol* 213 :187–195.
- Minc, N. et Viovy, J. L. (2004). Microfluidique et applications biologiques : enjeux et tendances. *C. R. Physique* 5 :565–575.
- Moreno, A., Théobald-Dietrich, A., Lorber, B., Sauter, C. et Giegé, R. (2005). Effects of macromolecular impurities and of crystallization method on the quality of eubacterial aspartyl-tRNA synthetase crystals. *Acta Cryst D* 61 :789–792.
- Newman, J. (2005). Expanding screening space through the use of alternative reservoirs in vapor-diffusion experiments. *Acta Cryst D* 61 :490–493.
- Newman, J., Michael, J. X. et Willis, C. (2007). Initial evaluations of the reproducibility of vapor-diffusion crystallization. *Acta Cryst D* 63 :826–832.
- Ng, D. J., Clark, P. J., Stevens, R. C. et Kuhn, P. (2008). In situ X-ray analysis of protein crystals in low-birefringent and X-ray transmissive plastic microchannels. *Acta Cryst D* 64 :189–197.
- Ng, J. D., Gavira, J. et Juan M García-Ruiz, J. M. (2003). Protein crystallization by capillary counterdiffusion for applied crystallographic structure determination. *J Struct Biol* 142 :218–231.
- Ng, J. D., Lorber, B., Giegé, R., Koszelak, S., Day, J., Greenwood, A. et McPherson, A. (1997). Comparative analysis of thaumatin crystals grown on earth and in microgravity. *Acta Cryst D* 53 :724–733.
- Ng, J. D., Sauter, C., Lorber, B., Kirkland, N., Arnez, J. et Giegé, R. (2002). Comparative analysis of space-grown and earth-grown crystals of an aminoacyl-tRNA synthetase : space-grown crystals are more useful for structural determination. *Acta Cryst D* 58 :645–652.
- Otálora, F., Capelle, B., Ducruix, A. et García-Ruiz, J. M. (1999). Mosaic spread characterization of microgravity-grown tetragonal lysozyme single crystals. *Acta Cryst D* 55 :644–649.
- Otálora, F. et García-Ruiz, J. M. (1996). Computer model of diffusion/reaction interplay in the gel acupuncture method. *J Crystal Growth* 169 :361–367.

- Owen, M. et Smith, P. (1994). Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *J Adhesion Sci Technol* 8 :1063–1075.
- Poterszman, A., Delarue, M., Thierry, J. C. et Moras, D. (1994). Synthesis and Recognition of aspartyl-adenylate by *Theumus thermophilus* aspartyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* 244 :158–167.
- Price II, W. N., Chen, Y., Handelman, S. K., Neely, H., Manor, P., Karlin, R., Nair, R., Liu, J., Baran, M., Everett, J., Tong, S. N., Forouhar, F., Swaminathan, S. S., Acton, T., Xiao, R., Luft, J. R., Lauricella, A., DeTitta, G. T., Rost, B., Montelione, G. T. et Hunt, J. F. (2009). Understanding the physical properties that control protein crystallization by analysis of large-scale experimental data. *Nature Biotechnology* 27 :51–57.
- Provost, K. et C., R. M. (1991). Application of gel growth to hanging drop technique. *Crystal Growth Design* 110 :258–264.
- Provost, K. et Robert, M. C. (1995). Crystal growth of lysozymes in media contaminated by parent molecules : influence of gelled media. *Crystal Growth Design* 156 :112–120.
- Psaltis, D., Quake, S. R. et Changhuei, Y. C. (2006). Developing optofluidic technology through the fusion of microfluidics and optics. *Nature* 442 :381–386.
- Pusey, M. L., Liu, Z. J., Tempel, W., Praissman, J., Lin, D., Wang, B. C., Gavira, J. A. et Ng, J. D. (2005). Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. *Prog Biophys Mol Biol* 88 :359–386.
- Quake, S. R. et Scherer, A. (2000). From micro- to nanofabrication with soft materials. *Science* 290 :1536–1540.
- Randall, G. C. et Doyle, P. S. (2005). Permeation-driven flow in poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. *PNAS* 102 :10813–10818.
- Robert, M. C. et Lefauchaux, F. (1988). Crystal growth in gels : principle and applications. *J Crystal Growth* 90 :358–367.
- Saridakis, E. E., Stewart, P. D., Lloyd, L. F. et Blow, D. M. (1994). Phase diagram and dilution experiments in the crystallization of carboxypeptidase G2. *Acta Cryst D* 50 :293–297.
- Sauter, C., Balg, C., Moreno, A., Dhoub, K., Théobald-Dietrich, A., Chenevert, R., Giegé, R. et Lorber, B. (2009). Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand analog. *J Appl Crystal* 42 :279–283.

- Sauter, C., Lorber, B., Kern, D., Cavarelli, J., Moras, D. et Giegé, R. (1999). Crystallogeneses studies on yeast aspartyl-tRNA synthetase : use of phase diagram to improve crystal quality. *Acta Cryst D* 55 :149–156.
- Sauter, C., Otálora, F., Gavira, J. A., Vidal, O., Giegé, R. et García-Ruiz, J. M. (2001). Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. *Acta Cryst D* 57 :1119–1126.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. et Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 :467–470.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J. C. et Moras, D. (1998). Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD : archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *EMBO J* 17 :5227–5237.
- Service, R. F. (2001). Structural biology. Robots enter the race to analyze proteins. *Science* 292 :187–188.
- Shim, J., Cristobal, G., Link, D. R., Thorsen, T., Jia, Y., Piattelli, K. et Fraden, S. (2007). Control and Measurement of the Phase Behavior of Aqueous Solutions Using Microfluidics. *J Am Chem Soc* 129 :8825–8835.
- Snell, E. H., Weisgerber, S., Helliwell, J. R., Hazer, K. et Schroer, K. (1995). Improvements in lysozyme protein crystal perfection through microgravity growth. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* 51 :1099–1102.
- Sommer, M. O. A. et Larsen, S. (2005). Crystallizing proteins on the basis of their precipitation diagram determined using a microfluidic formulator. *J Synchrotron Radiat* 12 :779–785.
- Song, H., Chen, D. L. et Ismagilov, R. F. (2006). Reactions in droplets in microfluidic channels. *Angew Chem* 45 :7336–7356.
- Squires, T. M. et Quake, S. R. (2005). Microfluidics : Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys* 77 :977–1026.
- Stachowiak, T. B., Mair, D. A., Holden, T. G., Lee, L. J., Svec, F. et Fréchet, J. M. (2007). Hydrophilic surface modification of cyclic olefin copolymer microfluidic chips using sequential photografting. *J Sep Sci* 30 :1088–1093.
- Stura, E. A., Matsumura, M., Fremont, D. H., Saito, Y., Peterson, P. A. et Wilson, I. A. (1992).

- Crystallization of murine major histocompatibility complex class I H-2Kb with single peptides. *J Mol Biol* 228 :975–982.
- Sunagawa, I. (ed.), *Crystals growth, morphology and perfection* (Cambridge University Press, 2005).
- Sung, M. T., Lai, Y. T., Huang, C. Y., Chou, L. Y., Shih, H. W., Cheng, W. C., Wong, C. H. et Ma, C. (2009). Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci U S A* 106 :8824–8829.
- Tabeling, P. (ed.), *Introduction à la microfluidique* (Belin, 2003).
- Terry, S. C., Jerman, J. H. et Angeli, J. B. (1979). A gas chromatographic air analyser fabricated on a silicon wafer. *IEEE Transactions on Electron Devices* 26 :1880–1885.
- Thorsen, T., Maerkl, S. J. et Quake, S. R. (2002). Microfluidic large-scale integration. *Science* 298 :580–584.
- Toepke, M. W. et Beebe, D. J. (2006). PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. *Lab Chip* 6 :1484–1486.
- Vahedi-Faridi, A., Lovelace, J., Bellamy, H. D., Snell, E. H. et Borgstahl, G. E. O. (2003). Physical and structure studies on the cryocooling of insulin crystals. *Acta Cryst D* 59 :2169–2182.
- van der Woerd, M., Ferree, D. et Pusey, M. (2003). The promise of macromolecular crystallization in microfluidic chips. *Journal of Structural Biology* 142 :180–187.
- Van Driessche, A. E. S., Otálora, F., Sazaki, G., Sleutel, M., Tsukamoto, K. et Gavira, J. (2008). Comparison of different experimental techniques for the measurement of crystal growth kinetics. *Crystal Growth and Design* 8 :4316–4323.
- Verneuil, E., Buguin, A. et Silberzan, P. (2004). Permeation-induced flows : Consequences for silicone-based microfluidics. *Europhysics Letters* 68 :412–418.
- Vidal, O., Robert, M. C. et Boué, F. (1998). Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering : case of agarose gel, a nucleation promotor. *J Crystal Growth* 192 :257–270.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442 :368–373.
- Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M. R. et Weigl, B. H. (2006). Microfluidic diagnostic technologies for global public health. *Nature* 442 :412–418.

- Zeppenauer, M. (1971). Formation of large crystals. *Methods Enzymol* 22 :235–266.
- Zheng, B., Gerds, C. J. et Ismagilov, R. F. (2005). Using nanoliter plugs in microfluidics to facilitates and understand protein crystallisation. *Current Opinion in Structure Biology* 15 :548–555.
- Zheng, B., Roach, L. S. et Ismagilov, R. F. (2003). Screening of protein crystallization conditions on a microfluidic chip using nanoliter-size droplets. *JACS* 125 :11170–11171.
- Zheng, B., Tice, J. D., Roach, L. S. et Ismagilov, R. F. (2004). A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction. *Angew Chem Int Ed* 43 :2508–2511.
- Zhu, D. W., Lorber, B., Sauter, C., Ng, J. D., Bénas, P., LeGrimellec, C. et Giegé, R. (2001). Growth kinetics, diffraction properties and effect of agarose on the stability of a novel crystal form of *Thermus thermophilus* aspartyl-tRNA synthetase-1. *Acta Cryst D* 57 :552–558.

Annexe I : Valorisation des compétences, un nouveau chapitre de thèse

Date : de Mars à Juin 2009

Contexte

Le *Nouveau Chapitre de la Thèse* a été introduit par l'Association Bernard Gregory² pour faire prendre conscience aux doctorants de tous les atouts qu'ils retirent de leur formation doctorale et les encourager à les valoriser auprès des employeurs. Ce Nouveau Chapitre les conduit à regarder leur thèse non plus uniquement comme un sujet et une formation scientifique, mais aussi comme une expérience personnelle et professionnelle, comme un véritable projet dont ils ont dû gérer tous les tenants et les aboutissants, et qui leur a permis de développer de nombreuses compétences.

Cadre général et enjeux de ma thèse

Présentation succincte

La cristallographie aux rayons X est une discipline qui réunit des biochimistes, des physiciens des informaticiens. Elle donne accès à l'image 3D des macromolécules biologiques (protéines,

²Association française qui oeuvre pour l'insertion des jeunes docteurs dans le monde professionnel – <http://www.abg.asso.fr/>

acides nucléiques : ADN, ARN, et des complexes macromoléculaires) et apporte des informations concernant leur aspect générale. De ce fait, elle permet de comprendre la fonction d'une macromolécule biologique et d'expliquer comment une molécule donnée interagit avec ses partenaires. En effet, les macromolécules biologiques remplissent leurs fonctions en adoptant des structures spatiales particulières qui leur permettent d'interagir avec leurs partenaires de manière coordonnée. Ces interactions sont vitales pour la cellule. L'étude cristallographique d'une molécule biologique impliquée dans une pathologie donnée peut mener à la conception d'un nouveau médicament. La cristallographie est donc une méthode d'investigation, dans une activité de recherche académique fondamentale telle que la génomique structurale, qui vise à décrire systématiquement la structure tridimensionnelle de l'ensemble des protéines codées par un génome donné, mais également dans des applications pharmaceutiques liées au développement de nouvelles molécules actives.

La cristallisation, c'est à dire l'obtention du cristal, est l'étape cruciale et incontournable de toute étude cristallographique. L'objectif d'un cristallographe est d'obtenir un cristal exploitable en un minimum de temps et avec le moins de produit possible. Le cristal est un état solide ordonné et la molécule qui le compose y est empilée de façon régulière, périodique dans les trois dimensions de l'espace. Tout ce qui perturbe l'ordre dans un cristal est néfaste.

Depuis quelques années, la microfluidique a fait son apparition dans le domaine de la cristallisation. La microfluidique est un champ scientifique et technologique qui permet de manipuler des petits volumes de fluides (liquide ou gaz) dans des systèmes de taille micrométrique (μm). La microfluidique, grâce à la miniaturisation, offre la possibilité d'obtenir des cristaux avec beaucoup moins de produit, en un temps plus court. Elle nous offre un milieu favorable à la cristallisation. La technologie microfluidique permet de développer un outil de cristallisation, simple d'utilisation, portable, bon marché, qui donnera la possibilité de faire plusieurs essais de cristallisation en même temps. Cet outil appelé puce microfluidique est pensé pour que les analyses aux rayons X des cristaux se fassent à même la puce. La manipulation des cristaux de macromolécules biologiques est délicate car ces cristaux sont fragiles (30 à 70 pourcent du cristal est de l'eau). Le fait de les analyser dans la puce est un avantage car il supprime les risques de perte des cristaux suite à leur manipulation. L'analyse aux rayons X des cristaux donnera une vue de la molécule en 3D (c'est à dire dans l'espace). Ceci permettra une meilleure compréhension des interactions entre une molécule et ses partenaires à l'échelle de

l'atome. Ainsi nous apportons des éléments de réponses sur la façon dont une macromolécule biologique remplit sa fonction au sein de la cellule.

Ma thèse dans son contexte

L'intitulé de notre équipe est « ARNt mitochondriaux et pathologies » et nous travaillons au sein de l'UPR 9002 (unité propre recherche du CNRS) « Architecture et Réactivité de l'ARN », dans le département «Machineries Traductionnelles ». L'équipe est composée de deux sous groupes. Je fais partie du groupe de biologie structurale où je profite d'une expérience d'une trentaine d'années en matière de cristallogénèse biologique, une discipline qui a pour but de comprendre et maîtriser le processus de cristallisation. Mon sujet de thèse consiste en la mise au point d'un dispositif microfluidique destiné à cristalliser les macromolécules biologiques dans des conditions optimales, ce qui ouvre de multiples perspectives tant fondamentales qu'appliquées. Pour mener à bien ce projet pluridisciplinaire, il faut en plus des compétences en matière de cristallographie des macromolécules biologiques, des compétences en microfluidique et en microfabrication. Des collaborations ont été mises en place avec des spécialistes en sciences des matériaux et en microfluidique à Lyon et à Besançon. Trois équipes travaillent sur ce projet, deux équipes de spécialistes en microfluidique pour la partie réalisation et notre équipe qui coordonne, assure les tests, et qui veille à ajuster le programme pour remplir les objectifs fixés, et répondre efficacement aux attentes des utilisateurs futurs. Lorsque j'ai intégré l'équipe, les collaborations étaient déjà en place, un premier dessin (motif) de la puce microfluidique avait été choisi, un prototypage rapide de la puce avait été réalisé, des essais de cristallisations avaient été effectués pour valider la méthode de cristallisation.

La puce microfluidique que nous développons se place sur le créneau du matériel de cristallisation. Ce marché est largement occupé par les microplaques qui permettent la miniaturisation et l'automatisation des expériences et facilitent la recherche de conditions de cristallisation par criblage à haut débit. Concernant les systèmes microfluidiques de cristallisation, nous avons des concurrents en Suisse, en Allemagne et essentiellement aux Etats-Unis où les recherches universitaires ont abouties à des dépôts de brevets, qui ont été suivis généralement par des créations d'entreprises. Notre puce microfluidique trouvera sa place dans tout laboratoire utilisant la cristallographie comme méthode d'investigation, que ce soit dans une activité

de recherche académique fondamentale ou/et dans des applications pharmaceutiques liées au développement de nouvelles molécules actives.

Moi dans ce contexte

Le projet de thèse s'inscrit parfaitement dans mon parcours universitaire qui se veut pluridisciplinaire. Après un baccalauréat scientifique obtenu en Tunisie, j'ai intégré la faculté des sciences de Strasbourg. J'ai obtenu un diplôme d'étude universitaire généralisé (DEUG) en science de la vie option Bio-physico-chimie, une licence de Biochimie, une maîtrise en Biochimie structurale, puis un Master 2 en génomique structurale et bioinformatique. J'ai effectué mon stage de Master 2 au département de biologie structurale et génomique à l'Institut de Génétique, Biologie Moléculaire et Cellulaire à Strasbourg (IGBMC, Illkirch) où j'ai travaillé sur la mise au point de protocole pour la purification des petits ARN dans le but de cristalliser un complexe protéines-ARN. Connaissant mon intérêt pour la recherche appliquée, mon maître de stage m'a mise en contact avec mon directeur de thèse qui avait obtenu le financement pour une thèse dans le but de concevoir une puce microfluidique pour la cristallisation et l'analyse aux rayons X des macromolécules biologiques. L'idée de marier la cristallographie à la microfluidique et d'exploiter les avantages que nous offre la microfluidique afin de développer un outil à la disposition des cristallographes m'a séduite. Ce projet permet en exploitant des connaissances fondamentales de différentes disciplines d'élargir la boîte à outil microfluidique d'une part, et de servir la recherche tant fondamentale qu'appliquée dans le domaine de la biologie, la biochimie, et pour la conception rationnelle de médicament, d'autre part.

Déroulement, gestion et coût de mon projet

Préparation et cadrage du projet

Pour réaliser une puce microfluidique fonctionnelle, plusieurs étapes sont à franchir :

- concevoir un motif fonctionnel
- réaliser les prototypes
- cristalliser des macromolécules biologique dans les puces microfluidiques

– analyser les cristaux obtenus aux rayons X

Une compilation préalable des connaissances sur toutes les étapes et une identification claire et précise des problèmes liés aux futures situations est nécessaire. J’ai commencé par un travail bibliographique pour être au courant de l’état de la science en cristallogénèse et en microfluidique. Ceci m’a permis de participer activement aux discussions avec nos collaborateurs, dont les connaissances et le savoir faire en matière de fabrication nous sont nécessaires. Nous collaborons avec deux équipes françaises spécialisées en microfabrication de puces microfluidiques. Le choix de mener ce projet avec deux équipes nous donne accès à des méthodes de fabrication différentes, et enrichit les discussions. Le travail avec des équipes françaises a facilité la gestion du projet et de la propriété intellectuelle. Conscients du potentiel de valorisation du projet, l’équipe dès sa germination a veillé au maintien de la confidentialité. Suite aux premiers résultats du projet initial, une demande de brevet français a été déposée par FIST SA pour le compte du CNRS. Le projet actuel se place dans la continuité et vise précisément à en consolider les revendications et faciliter le transfert de la technologie développée. Parallèlement, des contacts ont été pris avec divers acteurs industriels, dans le respect scrupuleux de la confidentialité du projet. La poursuite de ce projet se fait en contact étroit avec les structures de valorisation des organismes de tutelle pour une bonne prise en compte des aspects de propriété intellectuelle. J’ai pu mesurer l’intérêt suscité par ce projet auprès des laboratoires de recherche publics, mais aussi de différentes sociétés présentes dans le domaine de la biologie structurale lors de colloques scientifiques récents nationaux et internationaux.

Conduite du projet

Mon travail s’est déroulé en trois phases successives, les deux dernières pouvant se chevaucher en partie pour optimiser les délais liés à la conception et la réalisation des prototypes d’une part, et à leur test d’utilisation d’autre part. Première étape : Sélection des matériaux. Au début du projet, j’ai effectué des tests de matériaux pour déterminer le meilleur compromis entre transparence optique et aux rayons X, pour trouver la bonne épaisseur, c’est à dire qui permet à la puce d’être fine et rigide à la fois. Ces tests éviteront de fabriquer plusieurs puces dans différents matériaux, ce qui constitue un gain d’argent et de temps. Deuxième étape : Test de prototypes. Une fois les prototypes réalisés, j’effectue les tests de remplissage et d’étanchéité.

	Salaires	Infrastructures	Fonctionnement	Total par équipe
Equipe 1	101099,2	80879,36	39520	221498
Equipe 2	155019,8	124015,86	48880	327915
Equipe 3	140967	58773,6	43260	243000
Total	397086	263668,82	131660	792414

TABLEAU 5.1: Repartition des coûts (en euros)

Je fais des essais de cristallisation de macromolécules biologiques de différentes tailles et propriétés. Je teste la compatibilité des matériaux et des méthodes de fabrication avec la cristallisation et l'observation des cristaux. J'effectue l'analyse de diffraction. Je calcule l'image 3D des molécules. Dernière étape : Puces pour le criblage haut débit. Je fais le point avec toute l'équipe, pour proposer des solutions aux problèmes et aux difficultés d'utilisation rencontrées, et faire évoluer le prototype en gardant un regard sur ce qui se fait chez nos concurrents et ce qui est réalisable à l'état actuel de la science. La géométrie de la puce évolue pour offrir la possibilité de rendre le remplissage automatique (conformité avec les formats standards de robots de pipetage) ainsi que l'analyse aux rayons X. Les trois équipes partenaires se réunissent à la fin de chaque semestre pour faire une synthèse des résultats et s'accorder sur les adaptations à apporter au programme initial. Ceci n'empêche pas la communication et les discussions en dehors des réunions. Nous veillons à la protection des résultats nouveaux et à établir la meilleure stratégie de valorisation vu le coût du projet.

Evaluation et prise en charge du coût du projet

Le coût total du projet est de 792414 euros. La plus grande part des dépenses concerne les ressources humaines ; 3 équipes travaillent sur le projet, soit 10 personnes en tout et le coût du personnel est de 397086 euros au total. La seconde part des dépenses concerne les dépenses de l'environnement (infrastructure), de l'ordre 263668 euros pour les trois équipes. La troisième part des dépenses concerne le fonctionnement, de l'ordre de 131660 euros pour les trois équipes (Tableau 5.1).

Concernant les salaires qui présentent la plus grande part des coûts, le CNRS en a financé 61%, la Région Alsace 6,3%, l'Université de Lyon 28%, l'ANR 10%. Concernant les dépenses de fonctionnement, ils ont été pris en charge à 100% par l'ANR (programme PNANO : Emergence



FIGURE 5.3: La répartition des coûts. Le diagramme de gauche montre la répartition des coûts entre salaire, infrastructure et fonctionnement de toutes les équipes qui ont travaillé sur le projet. Le diagramme du milieu montre la répartition des salaires entre les différentes institutions qui ont financé le projet. Le dernier diagramme montre la répartition totale des frais entre les différentes institutions.

et valorisation). Au total, le CNRS a payé 50% du coût du projet, la Région 5,3%, l'Université de Lyon 18,6%, et l'ANR 25% (Figure 5.3) .

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

Compétences directes

Au cours de mes trois ans de thèse, j'ai acquis des connaissances et un savoir faire dans plusieurs domaines. En cristallogénèse, j'ai testé différentes méthodes de cristallisation, j'ai pu évaluer les avantages et les inconvénients de chacune, j'ai appris à utiliser les paramètres de la cristallisation pour obtenir des cristaux et pour optimiser les conditions de cristallisation dans le but de produire des cristaux de qualité. J'ai eu l'occasion d'assister à des conférences et à des cours donnés par les spécialistes du domaine lors d'un congrès de cristallogénèse à Cancùn en Mexique où j'ai pu approfondir mes connaissances et exposer mon travail. En cristallographie, j'ai appris à utiliser les logiciels qui nous permettent de traiter les données collectées lors de l'analyse aux rayons X, et d'obtenir des cartes de densité électronique, puis l'image en 3D de la molécule. En microfluidique, j'ai acquis des connaissances dans le champ scientifique, sur les phénomènes physiques à l'échelle micrométrique, et dans le champs technologique, sur les

matériaux et les méthodes de microfabrication. Pour mieux utiliser l'outil informatique, indispensable pour mon travail dans le cadre de ma thèse, j'ai suivi une formation sur l'utilisation du système LINUX qui permet une organisation rationnelle et une gestion simple et efficace des données. J'ai aussi suivi une formation à l'école doctorale sur l'utilisation des logiciels libres. J'ai acquis des nouvelles connaissances sur l'utilisation des outils informatiques libres à la disposition du biologiste. Ces outils permettent de travailler sur la forme de la communication scientifique (présentations, articles, posters, rédaction de la thèse) ainsi que sur le fond (utilisation des bases de donnée, alignement de séquences de macromolécules, visualisation en 3D).

Compétences transverses

Gestion de l'information et veille technologique : Comme cela a été dit plus haut, une demande de brevet a été déposée par FIST SA pour le compte du CNRS. Pour mieux comprendre la question de la propriété intellectuelle, j'ai suivi le module socioprofessionnelle proposé par l'école doctorale intelligence économique. Cette formation donnait une vue d'ensemble sur les actions coordonnées de recherche, de traitement, de distribution et de protection de l'information. Il s'agit d'anticiper en détectant les changements, de limiter les risques en détectant les menaces, de progresser en détectant les différences et les variations, d'innover en détectant des idées et des nouveautés, de se développer en détectant des opportunités. Ce travail nécessite d'être en veille concurrentielle, technologique, réglementaire et environnementale. J'ai appris à mieux connaître les outils de collecte de l'information qui sont de deux types. Les sources blanches comme Internet, les bases de données, les revues généralistes et spécialisées, les brevets. Les sources grises comme les réseaux d'experts, les relations personnelles, la participation à des manifestations. J'ai compris que la maîtrise de la technologie de l'information et de la communication est nécessaire dans notre métier et dans le monde de l'entreprise.

Communication et information : J'ai commencé ma thèse avec un travail bibliographique pour me documenter sur le domaine d'étude. C'est un travail que j'ai fait tout au long de la thèse pour me tenir informer en permanence des travaux qui peuvent nous être utiles et pour être au courant de ce que fait la concurrence. J'ai eu l'occasion d'assister à différents congrès nationaux et internationaux pendant ma thèse. À ces occasions, j'ai

pu présenter mon travail, rencontrer les spécialistes en cristallogenèse, des concurrents et des partenaires industriels éventuels, j'ai pu mettre en pratique ce que j'ai appris en intelligence économique. Ayant compris l'intérêt d'avoir une communication efficace, j'ai choisi de suivre deux modules socio-professionnels proposés par l'école doctorale qui portaient sur la gestion du trac dans le cadre de la prise de parole en public.

Adaptabilité organisation et gestion du temps : Suite à un retard dans le financement du projet, j'ai pu effectuer mon travail bibliographique, lire des ouvrages sur la cristallographie et la microfluidique, domaine que j'ai découvert entièrement, choisir et suivre des modules scientifiques et socio-professionnelle proposés par l'école doctorale qui rentraient dans le cadre de ma thèse et de mon projet professionnel, travailler sur un deuxième sujet du laboratoire. Dans ce cadre, j'ai passé deux mois au Canada où j'ai utilisé mes connaissances en cristallogenèse pour implanter des méthode de cristallisation dans le laboratoire partenaire. Dans la continuité de ce travail notre équipe a accueilli un chercheur canadien que j'ai accompagné dans son travail. J'ai participé activement à la vie de l'école doctorale « sciences de la vie et de la santé » ainsi qu'à la vie de l'Université de Strasbourg comme élue au conseil scientifique. Il a fallu m'organiser par la suite pour rattraper le retard sur mon sujet de thèse initial sans abandonner mes autres projets et mes responsabilités. Pour y arriver, il a fallu fixer des priorités, former les suppléants, déléguer des tâches.

Utilisation de concept, formulation de problème, agir et réussir : Participer aux élections de l'Université de Strasbourg a nécessité une analyse rapide de la situation, une mobilisation particulière et une organisation efficace. Pour y arriver, il a fallu utiliser les compétences acquises lors de ma thèse (outils, techniques de communication) pour réussir la campagne et atteindre les objectifs visés. L'organisation du forum Biotechno2009 (rencontre entre entreprises et doctorants) a nécessité de démarcher les entreprises, de contacter les institutions, de trouver les intervenants et les conférenciers, de gérer un budget... Pour réussir cette journée, il faut identifier les enchaînements, tenir les objectifs, se fixer une méthode de travail. J'avais utilisé tout ce que j'ai appris de mes expériences précédentes (ce qui a bien marché et ce qui peut être améliorer) pour optimiser le mode de fonctionnement et pour être efficace dans la démarche.

Vente : Durant mes trois ans de thèse, j'ai appris à écouter, à analyser, à évaluer, à rechercher

les informations utiles. J'ai appris à mobiliser un réseau, à partager les enjeux, à assumer des domaines de co-responsabilité. Pour obtenir l'adhésion d'un auditoire et défendre un projet, j'ai appris dans mon équipe de présenter les données d'une façon simple, claire, précise. Il faut garder à l'esprit que dans l'auditoire, se trouvent les futurs utilisateurs, des clients future, des partenaires éventuels.

Avoir le sens politique : J'ai la capacité de comprendre l'environnement dans lequel j'évolue et des organisations dans/avec lesquelles je travaille.

Résultats et impact de ma thèse

La mise au point de dispositifs microfluidiques pour la cristallisation des macromolécules biologique a permis d'acquérir un nouveau savoir-faire en matière de fabrication de puces microfluidiques à application biologique, de pousser plus loin les limites de la technique aux laboratoires. En plus, ce travail permettra de transférer cette technologie du laboratoire à l'industrie, une meilleure négociation avec les entreprises pour la fabrication et la commercialisation de la puce finale. La mise sur le marché de notre produit valorisera l'activité de recherche des équipes qui ont travaillé sur le projet. Au cours de mes trois ans de thèse, j'ai disposé de plusieurs formations, j'ai eu la possibilité d'exercer des fonctions diverses dans différents cadres associatifs et j'ai fait un séjour de deux mois au Canada dans le cadre de mon travail. Ces trois ans de thèse ont été une expérience enrichissante aussi bien de point de vue scientifique qu'humain. Aujourd'hui et dans la continuité de ce que j'ai déjà entamé à différents niveaux, je voudrais travailler sur la problématique du transfert de technologie à l'échelle internationale. Une opération de transfert international de technologie ne se décide pas, quelle que soit la taille de l'entreprise concernée, quel qu'en soit le domaine technologique, ni sur un coup de tête, ni simplement parce qu'une entreprise étrangère, rencontrée au hasard d'un salon ou de la consultation de pages Internet, se propose d'acquérir une licence de fabrication. Bien au contraire, souvent plus complexe qu'une opération d'exportation traditionnelle, un transfert de technologie suppose une réflexion préalable approfondie, prenant en compte de nombreux aspects de l'entreprise et de son contexte technique, commercial, financier et humain. Une phase de préparation est indispensable et nécessite :

-
- un inventaire des éléments constitutifs de la technologie (existence ou non de brevets, étendue du savoir-faire technique)
 - un examen de la solidité des titres de propriété industrielle lorsqu'ils existent - la vérification de la transférabilité de la technologie
 - une évaluation des difficultés d'approche directe du pays concerné
 - un recensement des entreprises locales du domaine concerné et une estimation de leur potentiel
 - une évaluation de la valeur financière de la technologie qui pourrait être licenciée, assortie d'un argumentaire de négociation adapté
 - la définition du profil du licencié potentiel « idéal »
 - un listage des actions à mener et des investissements à prévoir pour une approche par le transfert de technologie

Mon objectif est de me spécialiser dans le transfert de technologie Nord-Sud, dans les secteurs des biotechnologies, des biomédical et de l'agroalimentaire. Les deux termes de l'équation sont les suivants : Du côté Sud, les secteurs de la santé, l'agriculture et l'énergie, sont des secteurs prioritaires afin d'assurer l'autosuffisance et l'autonomie, et de répondre aux besoins essentiels des populations du Sud. Un transfert technologique réussi ne se limite pas à la simple transposition d'un composant matériel mais intègre un processus d'appropriation réelle de la technologie, et donc une transmission du savoir-faire et de connaissances techniques. Transférer une technologie nécessite souvent une adaptation technique au pays où cette technologie va être transférée pour qu'elle soit bénéfique aux populations et protectrice de l'environnement. Du côté Nord, le transfert de technologie se fait essentiellement par le secteur privé des pays industrialisés. Ce secteur ne peut pas investir sur des marchés non solvables, sachant que développer des nouvelles technologies coûte énormément aux entreprises qui ont tout à fait raison de vouloir protéger leur recherche et leur savoir-faire. Je pense qu'un MBA (*Master of Business Administration*), un diplôme international d'études supérieures du plus haut niveau dans le domaine de la conduite globale des affaires (stratégie, marketing, finances, ressources humaines et management) est nécessaire pour un travail efficace dans ce contexte. Je pense faire ce MBA en Amérique du Nord, pour élargir mon réseau et pour avoir une nouvelle expérience dans une autre société et une autre culture. Ajoutant ce diplôme à mon doctorat, j'aurai les éléments nécessaires pour travailler dans un cabinet de conseil spécialisé dans le transfert de

technologie internationale, ou dans un organisme gouvernemental ou non gouvernemental travaillant sur la question du transfert technologique et le développement durable. Je n'exclus pas la possibilité de monter mon propre cabinet conseil spécialisé dans le transfert de technologie Nord-Sud.

Annexe II : Formations de l'École Doctorale des sciences de la vie et de la santé

**Unités d'enseignement « scientifiques » et Unités d'enseignement
« socio-professionnelles »**

Workshop Cancun

Date : Mai 2008

Les différentes techniques de cristallisation pour macromolécules biologiques ont été abordées lors de cette formation : les techniques les plus utilisées telles que le batch, la diffusion de vapeur mais aussi des méthodes de cristallisation plus récentes telles que la contre-diffusion et la microfluidique. Dans le but d'obtenir un cristal et d'améliorer sa qualité, il est nécessaire de étudier le diagramme de phase de la molécule à cristalliser, c'est à dire l'effet de la concentration de la macromolécule en fonction de la concentration d'un agent de cristallisation donné. Les paramètres de cristallisation tels que l'influence des facteurs biochimiques et les effets physicochimiques, aussi bien que la méthode de cristallisation utilisée conditionnent l'apparition de cristaux, leur croissance et leur qualité. La cristallisation fait donc intervenir deux sortes de facteurs, les facteurs thermodynamiques et les facteurs cinétiques. La majorité des cristaux est analysée par l'utilisation des sources de rayons X. Dans certains cas la diffraction neutronique est possible et permet de visualiser les atomes d'hydrogène et d'élucider des mécanismes catalytiques qui impliquent ces atomes.

Lors de cette formation, j'ai acquis : Une meilleure compréhension concernant les facteurs thermodynamiques et cinétiques qui conditionnent l'apparition et la croissance des cristaux. Une meilleure connaissance des stratégies de cristallisation. Nous avons été sensibilisé à l'importance d'indiquer le protocole dans le détail (ce que de nombreux auteurs négligent) lors de la rédaction d'une publication pour que les expériences soient reproductibles.

Unix-essentiel

Date : Novembre 2006

UNIX est un système multi-tâches et multi-utilisateurs. Il permet une organisation rationnelle et une gestion simple et efficace des données. C'est un système écrit en langage C de façon modulaire, est ce qui en fait un système ouvert, indépendant de tout constructeur, machine ou processeur. Il permet le développement d'applications faisant appel au noyau. UNIX gère 3 types d'entités : l'utilisateur, le fichier et le processus. Le nom de « login » permet de se connecter au système UNIX. Pour demander l'exécution d'un travail spécifique, une commande est envoyée par l'utilisateur à l'interpréteur de commande appelé le shell. Celui-ci lit la commande entrée au clavier, en analyse la syntaxe, l'interprète et l'active. Après quoi le shell affiche à nouveau le caractère de sollicitation. Le shell est une interface utilisateur, interpréteur de commandes, et il offre un langage de programmation de haut niveau ainsi qu'un éventail de commandes extensible. Le système UNIX est essentiellement axé sur le travail interactif. Mais il y a différents modes de lancement et d'exécution d'un processus : le mode interactive, le mode arrière-plan et le mode batch.

Lors de cette formation, j'ai acquis une meilleure compréhension concernant :

- La gestion des utilisateurs, les droits d'accès aux fichiers et de la sécurité sous UNIX.
- Les différents shells et l'environnement utilisateur.
- Les processus : caractéristiques, création, mode de lancement des tâches.
- Les commandes, le shell et les caractères spéciaux.
- Les commandes évoluées de manipulation de fichiers.
- Les systèmes de fichiers, les inodes et les liens symboliques.
- Les outils et commandes complémentaires : commandes de contrôle de l'espace disque, commandes de manipulation de répertoires.

Boîte à outil informatique du biologiste

Date : Juin 2008

Un logiciel libre est un logiciel dont la licence est libre bien qu'il soit soumis au droit d'auteur. Ces logiciels s'imposent de plus en plus comme une solution de remplacement aux logiciels propriétaires plus coûteux. La FSF (*Free Software Foundation*) assure la promotion du logiciel libre qui se définit par quatre libertés fondamentales : La liberté 0 qui consiste à exécuter librement le programme, la liberté 1 qui permet d'étudier le fonctionnement du programme, la liberté 2 qui autorise la redistribution des copies (ainsi de vendre des copies, logiciel « libre » ne doit pas être forcément compris comme « gratuit »), et la liberté 3 qui permet aux développeurs d'améliorer le programme et de publier ses améliorations. La qualité du logiciel est souvent proportionnelle aux nombres de développeurs. Plus la communauté de développement s'étend, plus elle devient un gage de qualité et de réactivité. De la même manière, la communauté des utilisateurs a pour rôle principal de faire remonter des dysfonctionnements et des suggestions. Ces échanges entre développeurs et utilisateurs permettent d'améliorer et d'apporter des nouvelles fonctionnalités au logiciel. Ce qui permet d'innover en permanence.

Lors de cette formation, j'ai acquis des nouvelles connaissances sur l'utilisation des outils informatiques libres à la disposition du biologiste. Ces outils permettent de travailler sur la forme de la communication scientifique (présentations, articles, posters, rédaction de la thèse) ainsi que sur le fond (utilisation des bases de donnée, alignement de séquence pour une macromolécule donnée, visualisation en 3D).

Intelligence Économique

Date : Mai 2007

L'intelligence économique (IE) est apparue en France dans les années 90 bien qu'elle ait été utilisée depuis les années 60 au Japon. L'IE est l'ensemble des actions coordonnées de recherche, de traitement, de distribution et de protection de l'information. Il s'agit d' : anticiper en détectant les changements, de limiter les risques en détectant les menaces progresser en détectant les différences et les variations, d'innover en détectant des idées et des nouveautés, de se développer en détectant des opportunités.

Ceci nécessite d'être en veille concurrentielle, technologique, réglementaire et environnementale. Les outils de collecte de l'information sont de deux types :

- Sources blanches : Internet, bases de données, revues généralistes et spécialisées, brevets...
- Sources grises : réseaux d'experts, relations personnelles, participation à des manifestations...

Les informations collectées sont traitées par l'analyste pour être validées. Une note de synthèse où toute l'étude est rédigée et mise à disposition du décideur.

Lors de cette formation, j'ai acquis des nouvelles connaissances des outils de l'IE concernant :

- La collecte d'information : répertoires, moteurs, agents intelligents, aspirateurs de sites.
- Le traitement d'information : bibliométrie, classification, analyse de contenu, extraction de connaissances.
- La diffusion d'information (communiquer par l'écrit) : résumé, gestion de contenu, rapport technique international, publication.

Assistance à la création d'entreprise

Date : Mai 2007

Cette formation a porté sur les aspects suivants :

1. Maîtriser les notions fondamentales de comptabilité :

- Le bilan : équilibre entre actif et passif. L'actif immobilisé, les stocks, les créances clients, les disponibilités constituent l'actif. Le passif est constitué de capitaux propres et des dettes.
- Le compte de résultat et la mesure du résultat qui permettent d'étudier les différents sortes de charges (d'exploitation, financières, exceptionnelles et l'impôt sur le bénéfice) et de produits (d'exploitation, financiers, exceptionnels).
- Comment exploiter un bilan : Analyse des comptes sociaux d'une officine de pharmacie strasbourgeoise.

2. Bien choisir la structure d'exploitation de l'entreprise : deux formes de sociétés existent, les sociétés de capitaux et les sociétés de personne.

3. Monter un business-plan en suivant les points de passage obligés de l'itinéraire financier.

Lors de cette formation, j'ai appris :

- Les bases fondamentales de la comptabilité.
- Comment utiliser le bilan pour porter un diagnostic sur la santé financière d'une entreprise.
- Où apparaissent les indicateurs de la performance commerciale et économique.
- Où passe le bénéfice de l'entreprise.
- Quels sont les indicateurs de difficultés d'une entreprise.
- Quelle est la structure juridique adaptée à la création d'entreprise innovante.

Forum BIOTechno

Date : Juin 2008 et Juin 2009 ³

Lors de cette journée, j'ai appris que :

- Une entreprise est une structure pyramidale, dont chaque sommet représente un élément de l'entreprise ; ces éléments sont l'homme, la technologie, et l'organisation.
- Optimiser l'interaction entre ces 3 composantes permet d'obtenir le meilleur résultat.
- Une entreprise pour survivre doit anticiper, expertiser, innover.
- Études de marché faites, des cibles sont à identifier et des opportunités sont à prendre. Des docteurs sont recrutés pour une meilleur compétitivité et pour orienter la recherche en fonction du marché.
- Les chercheurs apportent à l'entreprise un regard neuf innovant et sont de plus capables de gérer les projets, les ressources et le temps. Ce sont les compétences comportementales du docteur qui sont recherchées par les entreprises, rarement les compétences dans un domaine d'expertise.
- Un docteur dans une entreprise peut être chargé d'étude, chef de projet, chargé d'affaire réglementaire, directeur scientifique, directeur technique, il peut être chargé du marketing, du management, de la communication...

J'ai acquis des clés pour valoriser ma candidature à un futur emploi et notamment à :

- Mettre en avant le savoir être dans un CV.
- Utiliser les réseaux comme outil de communication. Un réseau est un multiplicateur de force, surtout lorsque plusieurs réseaux sont interconnectés.
- Se positionner dès l'entretien comme une personne qui conduit sa carrière, car une personne qui ne défend pas ses intérêts ne saura pas mieux défendre l'intérêt de son entreprise.

³J'ai fait partie de l'équipe organisatrice du Forum BIOTechno 2009.

Gestion du trac

Date : Février 2008

Cette formation nous a permis d'analyser le trac et de développer les méthodes adéquates pour y répondre. Pour prendre du recul par rapport à cet état émotionnel qu'est le stress, l'étude de la position du corps dans l'espace, la respiration, le regard, l'usage des mains sont d'un intérêt capital. La méthodologie s'appuie sur des exercices (jeux théâtraux) qui sont fait d'une façon individuelle ou en groupe. Ces exercices développent le sens de l'observation, entraînent à analyser la façon de l'autre à gérer la situation, permettent de développer les bonnes techniques pour faire face aux situations critiques. Nous avons réalisé l'exercice demandé à tour de rôle (on s'observe faire), puis nous avons discuté de la difficulté de l'exercice et de comment la surmonter. La réalisation de l'exercice suivant devait permettre d'appliquer ce qui avait été appris antérieurement, et nous mettre face à une difficulté supplémentaire. Un aller retour constant entre exercice et théorie nous a aidé à trouver l'attitude nous permettant de dégager une tranquillité aux yeux des autres.

Lors de cette formation, j'ai appris l'importance de développer le sens de l'observation, d'avoir une meilleur conscience du corps dans l'espace (« poser » les pieds, trouver l'axe du corps, dégager une tranquillité aux yeux des autres, s'assurer d'être vu par le public, ne pas donner de dos au public), de positionner le regard dans l'espace (3 types de positionnements sont possibles : selon le message à faire passer, selon l'auditoire, et les dimensions de la salle), de respirer correctement (la respiration doit être diaphragmatique pour porter la voix), de soutenir un discours avec les mains.

La voix : prise de conscience et de confiance

Date : Janvier 2008

Dans le cadre de la prise de parole en public, il est important de savoir préserver et porter sa voix, et de prendre conscience que la voix permet de rythmer le discours. Au cours de cette formation nous avons essayé de répondre aux questions suivantes : 1) que peut-on faire avec la voix, 2) dans quel contexte peut on avoir une voix libre, 3) quels sont les moyens à mettre en oeuvre pour libérer la voix ?

La respiration diaphragmatique et l'engagement du corps dans l'espace sont les 2 éléments clés à travailler pour atteindre nos objectifs. Les techniques et les méthodes sont liées à l'exploitation d'un exercice pratique de façon individuelle et en groupe. Les exercices reposent sur un jeu théâtral (théâtre du mouvement) pour libérer le corps de ses tensions et sur le chant pour mieux comprendre le rythme et la couleur qu'un discours peut avoir.

Lors de cette formation, j'ai pris conscience de différents aspects très concrets : tout d'abord, une présentation est un ensemble de séquences visuels et sonores dont l'intérêt est de capter l'intérêt du public et la forme de la présentation à une incidence sur le fonds. Ensuite, pour sortir le bon son il faut un engagement corporelle. Enfin, le son est une version de l'espace : il faut être conscient du volume dans lequel on s'inscrit. Pour une prise de parole en public, il faut faire la répétition si c'est possible dans la salle où aura lieu la conférence.

Annexe III : Production scientifique

Publications

- Sauter C, **Dhouib K**, and Lorber B. From macrofluidics to microfluidics for the crystallization of biological macromolecules. *Cryst. Growth Des.*, 2007, **7**, 2247-2250
- **Dhouib K**, Khan Malek C, Pfleging W, Gauthier-Manuel B, Duffait R, Thuillier G, Ferrigno R, Jacquamet L, Ohana J, Ferrer J.L, Théobald-Dietrich A, Giegé R, Lorber B and Sauter C Microfluidic chips for the crystallization of biomacromolecules by counter-diffusion and on-chip crystal X-ray analysis. *Lab Chip*, 2009, **9**, 1412–1421
- Sauter C, Balg C, Moreno A, **Dhouib K**, Théobald-Dietrich A, Chênevert R, Giegé R and Lorber B Agarose gel facilitates enzyme crystal soaking with a ligand analog. *J. Appl. Cryst.*, 2009, **42**, 279-283

Communications orales

- Conception de puces microfluidique pour la cristallisation et l'analyse aux rayons X de macromolécules biologiques. *Congrès GTBIO de l'Association Française de Cristallographie*, 8-11 Octobre 2007, Lille, France
- Crystallization and crystallographic analysis in a microfluidic chip. *International Conference Crystallisation of Biological Macromolecules (ICCBM 12)*, 6-9 Mai 2008, Cancun, Mexique

Communications par posters

- **Dhouib K**, Lorber B, Ferrigno R, Gauthier-Manuel B, Thuillier G, Khan-Malek C, Théobald-Dietrich A, Giegé R & Sauter C. Crystallization and crystallographic analysis in a microfluidic chip. *3rd Soleil User Meeting*, 17-18 Janvier 2008, Saint-Aubin, France

- Sauter C, **Dhouib K**, Thuillier G, Gauthier-Manuel B, Khan-Malek C, Ferrigno R, Théobald-Dietrich A, Giegé R & Lorber B. Crystallization and crystallographic analysis in a microfluidic chip. *XXI Congress of International Union of Crystallography*, 23-31 Août 2008, Osaka, Japon
- Khan-Malek C, Gauthier-Manuel B, Morin P, Deman A.L, Château J.F , Ferrigno R, **Dhouib K**, Giegé R, Lorber B & Sauter C. ChipX : Microfluidic chips for the crystallization and the structural analysis of biomolecules. *Journées Nationales des Nanosciences et Nanotechnologies (J3N)*, 20-23 Octobre 2008, Grenoble, France