

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 24.10.97.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 30.04.99 Bulletin 99/17.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE ETABLISSEMENT DE CARACT SCIENT TECH ET
INDUST — FR.

⑦② Inventeur(s) : PARAYRE CLAUDE, BANCILLON
JACKY, PIRAS CLAUDINE et FONTECILLA JUAN.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : BREVATOME.

⑤④ DISPOSITIF ET PROCEDE D'ELABORATION DE CRISTAUX PAR SUSTENTATION SUR FILM DE GAZ.

⑤⑦ L'invention concerne un procédé d'élaboration de cris-
taux par sustentation sur film de gaz ainsi qu'un dispositif
pour la mise en oeuvre de ce procédé. Le but de l'invention
est essentiellement d'obtenir des cristaux présentant une
taille, une forme et une qualité suffisantes, afin notamment
de permettre l'étude de leurs structure. Ce but est atteint,
selon l'invention par un procédé d'élaboration d'au moins un
cristal caractérisé en ce que ledit cristal est élaboré dans un
milieu tel qu'une goutte de solution mis en sustentation sur
un film de gaz.

Le procédé peut être notamment appliqué à l'étude de la
structure de molécules organiques et/ ou biologiques ou
peut être utilisé comme technique séparative par cristallisa-
tion fractionnée.



DISPOSITIF ET PROCEDE D'ELABORATION DE CRISTAUX PAR
SUSTENTATION SUR FILM DE GAZ

La présente invention a pour objet un
5 dispositif et un procédé d'élaboration de cristaux et
en particulier de cristaux organiques et/ou biologiques
par sustentation sur des films de gaz.

De manière plus précise, l'invention est
relative à un dispositif et à un procédé d'élaboration
10 de cristaux dans des milieux ou gouttes mis en
sustentation sur des films de gaz dans lequel il est
possible de sustenter plusieurs milieux ou gouttes et
de déplacer ceux-ci ou celles-ci afin de permettre leur
observation et/ou leur manipulation et/ou leur
15 contrôle.

Le domaine technique de l'invention peut
être défini comme étant celui de l'élaboration de
cristaux par sustentation, lévitation sur un film de
gaz.

20 Il est nécessaire, dans le cadre notamment
de la détermination de la structure tridimensionnelle
des macromolécules biologiques et/ou organiques par des
méthodes d'analyse diffractométriques telles que rayons
X, neutrons... de parvenir à faire croître des cristaux
25 de taille, de forme et de qualité suffisantes.

Les méthodes courantes de cristallogénèse
des molécules biologiques et/ou organiques et en
particulier des protéines sont décrites de manière
détaillée dans le document de DUCRUIX A., GIEGE R
30 "Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins. A
practical approach", chapter 4, "Methods of
crystallization", p. 73-98. The practical approach
series. IRL Press, (Oxford University Press), 1992.

Toutes ces méthodes ont en commun le fait
35 que l'on cherche à amener la solution de molécules ou

de macromolécules biologiques dans un état de sursaturation, en effet, pour qu'il y ait croissance des cristaux, il faut d'une part que la limite de solubilité soit dépassée, c'est-à-dire qu'il y ait
5 sursaturation : c'est l'aspect thermodynamique ; il faut ensuite que le temps de latence, c'est-à-dire le temps d'apparition des cristaux, ne soit pas trop long : c'est l'aspect cinétique. Le phénomène de nucléation est la création des premiers germes solides
10 appelés "nucléi", c'est-à-dire germes en Français dans une solution sursaturée ; c'est la première étape de la formation d'une nouvelle phase cristallisée. On distingue deux sortes de nucléation, la nucléation homogène et la nucléation hétérogène.

15 La nucléation est dite homogène lorsqu'il y a formation de nucléi exclusivement entre les espèces et les ions libres en solution ; la nucléation est dite hétérogène lorsqu'il y a formation de nucléi au contact d'une interface telle que parois, cristaux déjà formés,
20 poussières, etc.

L'interface peut participer aux échanges énergétiques, ce qui a généralement pour effet de diminuer l'enthalpie libre de formation d'un germe.

Il existe une taille critique en dessous de
25 laquelle un nucleus est instable et tendra à se redissoudre. Au-delà, le nucleus pourra croître. Ceci correspond donc à une sursaturation à dépasser pour avoir une nucléation. C'est ce qu'on appelle zone de métastabilité. Le temps de latence appelé aussi temps
30 de germination est le temps nécessaire pour qu'un nombre suffisant de molécules se rassemblent et s'assemblent pour former des germes élémentaires stables (nucléi).

Lorsque les embryons ont atteint la taille
35 du nucleus critique, la croissance cristalline a lieu

puisque la solution sursaturée tend vers l'état d'équilibre par précipitation.

Les procédés de cristallogénèse basés sur le principe ci-dessus, peuvent donc être classés en
5 deux grandes catégories : à savoir d'une part les procédés avec contact, d'autre part les procédés sans contact.

Les procédés avec contact comprennent par exemple les procédés de cristallisation par dialyse,
10 notamment par double dialyse et les procédés de cristallisation par diffusion de vapeur.

Ces derniers procédés sont parmi les procédés les plus utilisés, ils ont été par exemple utilisés pour la première fois pour la cristallisation
15 de l'ARNt et comprennent la cristallisation en goutte suspendue, la cristallisation en goutte posée et la cristallisation en goutte sandwich qui sont représentées respectivement sur les figures 1A, 1B, 1C dans lesquelles les solutions de macromolécule (1) et
20 les réservoirs d'agent précipitant (2) sont indiqués.

Parmi ces variantes du procédé de cristallisation par diffusion de vapeur, le plus répandu que nous prenons comme référence ci-dessous est le procédé qui est schématisé sur la Figure 2, il
25 s'agit du procédé de cristallisation en goutte suspendue, encore dénommé "hanging drop method" dans les ouvrages en langue anglaise.

Le schéma de fonctionnement de ce procédé est le suivant, il est indiqué sur les figures 1A et 2.

30 La goutte suspendue (22) au couvercle (21) du récipient contient par exemple une macromolécule biologique telle qu'une protéine en solution, un tampon de réglage du pH, un agent précipitant à une concentration initiale C_i . Le récipient contient par
35 ailleurs dans sa partie réservoir (24) une solution du

même agent précipitant à une concentration C_r . Le réservoir et la goutte sont séparés par un espace rempli d'air (23). Le volume de solution dans le réservoir est très supérieur à celui de la goutte de telle sorte que C_r reste constant pendant toute la durée de la cristallisation. FOWLIS W.W., De LUCAS L.J. dans "Experimental and theoretical analysis of the rate of solvent equilibration in the hanging drop method of protein crystal growth" ; Second International. Conf. Strasbourg, France, July 1987 ; Journal of Crystal Growth. Vol. 90, (1988) n° 1-3, pp. 117-129 ont montré que la diffusion moléculaire contrôle le processus. La tension de vapeur d'eau à la surface (25) de la goutte est supérieure à celle régnant à la surface de la solution (26) dans le réservoir. Il y a donc transfert d'eau dans le sens de la goutte vers le réservoir. La concentration en sel précipitant augmente donc progressivement au cours du temps. La température est maintenue constante pendant toute la durée de l'expérience.

Les figures 3, 4A et 4B extraites du document de Ducruix et Giégé déjà mentionné ci-dessus, donnent l'allure du diagramme de phases dans le plan : concentration en protéine en fonction de la concentration en sel précipitant.

On a représenté les courbes de solubilité (31, 41) et les courbes de précipitation (32, 42) ainsi que la zone de précipitation (33, 43). Les concentrations initiales et finales en agent précipitant et en protéine sont représentées respectivement par C_i , C_f et C_{ip} , C_{fp} .

La chronologie est la suivante :

La concentration du composé précipitant (dans ce cas un sel) augmentant, la solution de protéine devient sursaturée ; puis le taux de

sursaturation continuant à croître, la solution atteint le domaine de nucléation spontanée situé au-delà de la courbe de solubilité (31,41), c'est-à-dire que le point figuratif passe de A à B sur la figure 4A. Le ou les
5 germes qui apparaissent grossissent et, de ce fait, épuisent la solution. Le point figuratif passe donc de B à C (figure 4B). Les cristaux cessent de croître quand la limite de saturation est atteinte au point C.

Dans le cas de la cristallogénèse des
10 protéines par les procédés courants cités ci-dessus tels que ceux du type goutte posée dénommé "sitting drop method" ou goutte suspendue, encore dénommé "hanging drop method", on ne peut éviter la nucléation hétérogène au contact des parois du récipient ainsi que
15 les problèmes de contamination liés au support.

La gamme des moyens de contrôle de la concentration des réactifs dans la goutte est très limitée et il en est donc de même du contrôle de la nucléation et de la vitesse de croissance liées à cette
20 concentration.

C'est la raison pour laquelle ont été développés les procédés d'élaboration dits "sans contact" qui présentent, par rapport aux procédés courants tels que ceux du type goutte posée ou
25 suspendue, l'avantage de supprimer ces problèmes de nucléation hétérogène et de contaminations liées au support, ainsi que d'offrir la possibilité de suivre aisément la composition dans la goutte.

Il existe de nombreux procédés et
30 dispositifs d'élaboration sans contact de cristaux tels que des cristaux de protéine ; il s'agit par exemple du procédé dit de cristallisation par "pression de radiation optique" mettant en oeuvre un laser qui est décrit dans le document de A. ASHKIN : "Application of
35 Laser Radiation Pressure" ; Science, 5 December 1980,

Vol. 210, N°4474, p 1081-1088 où est évoquée l'application éventuelle de la pression de radiation à l'étude de processus fondamentaux tels que la sursaturation de gouttes ou leur cristallisation.

5 Un autre procédé est le procédé dit de cristallisation par lévitation électrostatique qui est décrit dans le document de RHIM W.K., CHUNG S.K., HYSON M. T., ELLEMAN D. D. "Charged drop levitators and their applications" ; Material Processing in the reduced
10 gravity environment of space. Symposium tenu du 1 au 3 Décembre 1986, Boston, Mass., U.S.A. Material Research Society Symposia Proceedings. Volume 87. 1987, p. 103-112.

 Ce procédé réalisable en l'absence de
15 pesanteur, dans l'espace, ou au sol consiste à mettre en lévitation entre deux électrodes une goutte d'eau chargée d'un diamètre de 3 mm, et à y faire croître par exemple un cristal de NaCl.

 Le document de RHIM W.K., CHUNG S.K.
20 "Containerless protein crystal growth method". Crystal growth of Biological Macromolecules. Third International. Conf. Washington, U.S.A. Août 1989, Journal of Crystal Growth. Vol. 110, (1991) n° 1-2, p. 293-301, est également relatif à un procédé de
25 lévitation électrostatique, dans lequel on fait croître des cristaux de protéines, par exemple de lysozyme de blanc d'oeuf de poule à partir de gouttes placées en lévitation électrostatique dans des laboratoires spatiaux en microgravité ou dans des laboratoires au
30 sol à gravité normale de 1 g. Il est indiqué que la taille de la goutte d'eau que l'on peut placer en lévitation ne peut excéder environ 86 µl et en pratique ne dépasse pas 30 µl.

 Un autre procédé est le procédé de
35 lévitation acoustique qui est notamment décrit dans le

document de TRINH E.H. "Compact acoustic levitation device for studies in fluid dynamics and material science in the laboratory and microgravity". Review of Scientific Instruments. Vol. 56(11), November 1985, p. 2059-2065, et le document de TRINH E.H., ROBEY J., ARCE A., GASPAR M. "Experimental studies in fluid mechanics and material science using acoustic levitation". Material Processing in the reduced gravity environment of space. Symposium tenu du 1 au 3 Décembre 1986, Boston, Mass., U.S.A., Material Research Society Symposia Proceedings. Volume 87. 1987, p. 57-69.

Ce procédé, applicable dans des conditions de gravité normale et de microgravité, a permis la lévitation de gouttes de 2 mm de diamètre, et la cristallisation, notamment de O-terphényle. Les deux derniers procédés décrits ci-dessus ont été associés dans un procédé hybride acoustique et électrostatique dans le document de RHIM W.K., CHUNG S.K., TRINH E. H., ELLEMAND D.D. : "Charged drop dynamics experiment using an electrostatic-acoustic hybrid system" ; Material Processing in the reduced gravity environment of space ; Symposium tenu du 1 au 3 Décembre 1986, Boston, Mass., U.S.A., Material Research Society Symposia Proceedings. Volume 87. 1987, pp 329-337 ou des gouttes chargées des gouttes de 3 mm de diamètre ont été placées électrostatiquement en lévitation puis mises acoustiquement en rotation et en oscillation.

Les documents de COUTURES J.P., RIFFLET J.C., BILLARD D., COUTURES P. "Contactless treatment of liquids in a large temperature range by an aerodynamic levitation device and laser heating" ; Proc. of the 6th European Symposium on Material Sciences under microgravity conditions, Bordeaux, 2-5 Décembre 1986, ESA SP-256, 1987, p. 427-430, et de WEBER J.K.R., SCHIFFMAN R.A., KRISHNAN S., NORDINE P.C.

"Containerless processing and property measurements of high temperature liquids and solids" ; Proc. of the 7th European Symposium on Material Sciences under microgravity conditions, Oxford, RU 10-15 Septembre 5 1989, ESA SP-295, 1990, p. 639-643 ont trait à un procédé associant un dispositif aérodynamique et un chauffage avec un laser à CO₂ pour étudier à haute température la solidification de liquides, sans contact, afin d'obtenir des matériaux amorphes, 10 vitreux.

Enfin les documents de

- WEBER J.K.R., NORDINE P.C. : "Containerless Liquid phase Processing of Ceramic Materials", Microgravity Science and Technology, Vol. VII/4, 15 Février 1995, p. 279-282, et de

- WEBER J.K.R., et de HAMPTON D.S., MERKLEY D.R. REY C.A., ZATARSKY M. M., NORDINE P.C. : "Aero-acoustic levitation : A method for containerless liquid-phase processing at high temperature" ; Review 20 of Scientific Instruments. Vol. 65 (2), Février 1994, p. 456-465, décrivent-ils dans un environnement de microgravité, l'association de procédés de lévitation aéro-acoustique et aérodynamiques avec un chauffage et une fusion par laser pour étudier le traitement, et en 25 particulier la solidification, de céramiques et de verres.

Tous les procédés d'élaboration sans contact décrits ci-dessus, s'ils permettent de surmonter certains des inconvénients des procédés 30 classiques avec contact, ne permettent de traiter que de très faibles volumes de solution, à titre d'exemple, les ordres de grandeur des capacités maximum actuelles des procédés d'élaboration sans contact vont de 10⁻⁶ ml pour le procédé à pression de radiation jusqu'à 10⁻¹ ml 35 pour les autres procédés, ce qui est notoirement

insuffisant notamment pour faire croître des cristaux de dimension suffisante aux fins d'analyse radiocristallographiques.

Par ailleurs, le document FR-A-2 509 637
5 décrit le procédé de sustentation sur film de gaz qui permet la sustentation, le positionnement et le moulage d'une masse liquide, sans contact avec une paroi. La masse liquide est séparée de la paroi par une couche sous pression d'un gaz chimiquement inerte vis-à-vis de
10 la masse liquide et du matériau constitutif de la paroi. Ce procédé permettrait de sustenter un volume de solution très supérieur à ceux des procédés mentionnés ci-dessus et pourrait être utilisé pour des volumes jusqu'à 10 ml et pouvant atteindre 100 ml.

15 Ce document décrit également l'application de ce procédé à la sustentation de gouttes liquides sur une paroi poreuse plane et horizontale, à la mise en forme d'une masse liquide à l'intérieur d'un récipient cylindrique dont le fond et les parois sont poreux,
20 afin de permettre le passage d'un gaz, à la fusion de zone sur des pièces de dimensions importantes, à la mise en forme d'une pièce cylindrique liquide en micro-gravité, à la coulée continue, et à la réalisation de monocristaux par traction verticale.

25 Toutes ces opérations sont donc des opérations réalisées en milieu homogène, et à l'origine, monophasique, concernant en particulier des changements d'état d'un seul et même composé. Il s'agit par exemple de la fusion, de la solidification d'un
30 lingot homogène. Il ne se produit pas au sein de la masse une quelconque réaction chimique, ou une cristallisation ou autre, impliquant la présence de plusieurs réactifs ou d'un couple solvant-soluté(s).

Ce procédé a été mis en oeuvre jusqu'à
35 présent exclusivement dans le domaine limité de la

métallurgie et a été confiné à des applications spécifiques en milieu homogène, et n'a pas été appliqué à la réalisation d'une réaction dans un milieu liquide hétérogène comprenant une pluralité de réactifs, par exemple à une cristallisation ou cristalogénèse en solution impliquant un ou des solvant(s) et un ou plusieurs soluté(s).

Le document FR-A-2 742 771 est relatif à un dispositif et à un procédé d'élaboration de cristaux et en particulier de cristaux organiques et/ou biologiques par sustentation sur un film de gaz.

La structure du dispositif décrit dans ce document est reproduite sur la figure 6 jointe qui correspond également à la figure 6 du document FR-A-2 742 771 auquel on pourra se reporter.

Le dispositif représenté sur la figure 6 reprend essentiellement une enceinte (61) à double paroi réalisée par exemple sous la forme de deux demi-enceintes dont l'une d'entre-elles forme couvercle.

Cette enceinte est pourvue de moyens permettant de réguler la température intérieure qui se présentent en particulier sous la forme d'une double paroi dans laquelle circule un liquide thermostaté (62) en provenance de la boucle de thermostatage. De plus l'enceinte est de préférence doublée par un matériau calorifuge (63).

L'expérience en cours à l'intérieur de l'enceinte peut être suivie par l'intermédiaire d'un hublot apical unique (64) prévu dans la double paroi.

L'enceinte est munie de plusieurs connecteurs (65, 66) ou d'autres moyens permettant de faire traverser cette enceinte aux différents câblages et alimentations reliés aux divers moyens et dispositifs de mesure, sondes, par exemple sonde

d'hygrométrie, et capteurs disposés à l'intérieur de l'enceinte.

Ainsi, sur la figure 6, le dispositif comprend-il un premier connecteur (65) pour le passage
5 des fils reliés aux moyens de mesure de la température tels que des sondes (67, 68) à résistance de platine "Pt 100" de mesure de la température; et un second connecteur (67) pour le support et la connexion d'une sonde d'hygrométrie (618).

10 L'enceinte comprend aussi des moyens tels qu'un piquage pour l'alimentation en gaz de balayage (69) tel que de l'air ou de l'azote.

L'enceinte comprend également des moyens tels qu'un perçage (620) pour réaliser l'évacuation des
15 gaz de l'enceinte.

La partie essentielle du dispositif selon l'invention est constituée par les moyens permettant de mettre le milieu en sustentation qui prennent sur la Fig.6 la forme d'un diffuseur (610) dont la partie
20 utile est, par exemple, un secteur sphérique qui est monté sur une chambre de pressurisation (611) comportant des moyens de régulation de la température qui consistent de préférence, comme montré sur la figure 6 en un serpentín (612) alimenté par un fluide
25 de thermostatage par le tube (613).

Le diffuseur comporte également des moyens de mesure de la température constitué par exemple par une sonde de température, par exemple de type à résistance de platine "Pt 100" (614) dont le câble de
30 connexion (615) passe par le piquage d'alimentation en gaz de sustentation (616).

Par ailleurs, la figure 7 du document FR-A-
2 742 771 représente l'installation complète de sustentation, notamment pour la sustentation de
35 solutions aqueuses sur film de gaz, permettant en

particulier de réaliser la cristallogénèse de protéines. Cette installation comprend en particulier des moyens d'observation du liquide placé en sustentation.

5 Ces moyens d'observation comprennent par exemple un microscope stéréoscopique, grâce auquel on peut observer la goutte, soit directement à l'oculaire, soit sur un moniteur de télévision via une caméra.

10 Le dispositif décrit dans le document FR-A-2 742 771 en particulier sur la figure 6 de ce document présente l'inconvénient de ne pouvoir traiter qu'une seule goutte ou milieu de sustentation à la fois.

15 En effet, bien qu'il soit indiqué dans ce document qu'il serait éventuellement possible de concevoir un appareil permettant la sustentation simultanée de plusieurs milieux ou gouttes, aucun exemple de réalisation n'est donné.

20 Le fait de ne pouvoir traiter qu'une seule goutte à la fois est extrêmement préjudiciable, car alors le résultat de l'expérience unique est fortement influencée par de nombreux paramètres peu ou pas contrôlés qui nuisent au bon aboutissement de la cristallogénèse et qui « brisent » le résultat de l'expérience.

25 Dans les procédés courants tels que le procédé de référence à goutte suspendue, il est possible au contraire de réaliser de nombreux essais en parallèle ce qui permet de ce fait de s'affranchir de l'influence de ces paramètres.

30 La durée d'une expérience de cristallogénèse est importante, généralement de 10 à 100 heures. Si donc la goutte présente un problème conduisant à l'échec de l'expérience, un temps important est perdu. Avec une expérience mettant en jeu

plusieurs gouttes, il est rare que toutes les gouttes aient un problème avant le terme programmé.

Enfin, le système d'observation décrit sur la figure 7 du document FR-A-2 742 771 se limite comme
5 on l'a indiqué plus haut, à une mesure de la variation de la taille de la goutte en fonction du temps grâce à une caméra vidéo. Le seul accès optique à l'échantillon est constitué par l'unique hublot à apical.

Même si l'on essayait de faire croître
10 plusieurs milieux dans le dispositif du FR-A-2 742 771, leur observation, leur contrôle ou leur manipulation ne serait pas possible.

Il existe donc un besoin pour un dispositif d'élaboration de cristaux dans des milieux mis en
15 sustentation sur un film de gaz, qui permette notamment la mise en sustentation simultanée de plusieurs milieux d'élaboration de cristaux, ou gouttes, tout en assurant l'observation, et/ou la manipulation et/ou le contrôle de chaque milieu d'élaboration de cristaux sans
20 perturber le processus de cristallisation et la continuité et la qualité de la sustentation.

L'invention a pour but de fournir un dispositif d'élaboration de cristaux dans des milieux mis en sustentation sur des films de gaz, qui réponde,
25 entre autres aux besoins indiqués ci-dessus, qui ne présente pas les inconvénients, désavantages, et limitations des dispositifs de l'art antérieur, et qui résolve les problèmes posés par les dispositifs de l'art antérieur.

30 Ce but et d'autres encore sont atteints conformément à l'invention par un dispositif d'élaboration de cristaux dans des milieux mis en sustentation sur des films de gaz, comprenant une enceinte de traitement, des moyens ou diffuseurs pour
35 mettre lesdits milieux simultanément en sustentation

sur des films de gaz, et des moyens d'observation et/ou de contrôle, et/ou de manipulation desdits milieux mis en sustentation, dans lequel ledit dispositif comprend au moins deux diffuseurs, et des moyens pour déplacer
5 lesdits diffuseurs à l'intérieur de ladite enceinte de traitement, maintenir en permanence lesdits milieux en sustentation, et permettre la manipulation et/ou l'observation et/ou le contrôle desdits milieux mis en sustentation par lesdits moyens de manipulation et/ou
10 d'observation et/ou de contrôle.

Du fait que le dispositif selon l'invention comporte plusieurs diffuseurs, autrement dit, au moins deux diffuseurs, le traitement simultané de plusieurs milieux d'élaboration, tels que des gouttes est
15 possible, et il n'y a en fait pas de limite physique au nombre de gouttes qui peuvent être sustentées.

En conséquence, le dispositif selon l'invention associe de manière surprenante les avantages inhérents au dispositif d'élaboration de
20 cristaux mettant en oeuvre la sustentation sur films de gaz aux avantages liés à la réalisation simultanée de plusieurs cristaux.

Selon une caractéristique essentielle du dispositif selon l'invention celui-ci est pourvu de
25 moyens pour déplacer les diffuseurs à l'intérieur de l'enceinte de traitement et permettre leur manipulation et/ou leur observation et/ou leur contrôle par les moyens de manipulation et/ou d'observation et/ou de contrôle.

30 Ces moyens pour déplacer les diffuseurs peuvent par exemple être désigné sous le nom général de porte-diffuseurs et peuvent se présenter sous différentes formes selon le déplacement que l'on souhaite voir effectuer aux diffuseurs.

Ledit déplacement peut être un déplacement quelconque.

Ce déplacement est par exemple un déplacement alternatif ou séquentiel.

5 Ledit déplacement peut être encore un déplacement linéaire selon un axe unique ou bien un déplacement selon deux axes, par exemple orthogonaux, ou encore un déplacement curviligne, par exemple circulaire.

10 Grâce au dispositif de l'invention qui comporte des moyens pour déplacer les diffuseurs, et du fait que ces moyens ou porte-diffuseurs sont mobiles à l'intérieur de l'enceinte de traitement, et qu'ils permettent en outre de maintenir les milieux en
15 sustentation en permanence et en particulier tout au long du déplacement, il est possible de faire « défiler » par exemple successivement et/ou alternativement tous les milieux mis en sustentation, par exemple toutes les gouttes sustentées à
20 l'emplacement ou aux emplacement prévus pour leur observation et/ou leur contrôle et/ou leur manipulation. Il est possible de positionner précisément les milieux mis en sustentation dans le champ d'action des moyens d'observation et/ou de
25 contrôle et/ou de manipulation, par exemple des moyens d'observation, sans que la qualité de la sustentation et donc de la cristallogénèse se voit en aucune façon affectée.

De préférence, selon une forme de
30 réalisation particulièrement avantageuse de l'invention, on fait « défiler » les milieux mis en sustentation tels que les gouttes sustentées, par exemple successivement, au même endroit, ce qui permet de ne mettre en place qu'un seul dispositif
35 d'observation et/ou de contrôle et/ou de manipulation.

Cela simplifie grandement le dispositif selon l'invention, car le nombre de moyens d'observation et/ou de contrôle et/ou de manipulation tels que des appareils de diagnostic et/ou de
5 téléopération se trouve fortement réduit, ce qui se répercute de manière positive sur le coût global du dispositif selon l'invention, en égard au caractère onéreux de ce type d'appareils.

Dans une première forme de réalisation du
10 dispositif selon l'invention, lesdits moyens pour déplacer les diffuseurs comprennent un barillet tournant supportant lesdits diffuseurs.

Dans une deuxième forme de réalisation du dispositif selon l'invention lesdits moyens comprennent
15 une plaque support sur laquelle les diffuseurs sont disposés selon une matrice pouvant être déplacée par exemple de manière linéaire et orthogonale.

Dans une troisième forme de réalisation du dispositif selon l'invention lesdits moyens comprennent
20 une bande support sur laquelle est disposée une rangée de diffuseurs et pouvant être déplacée de manière linéaire et alternative.

Afin de maintenir en permanence les milieux en sustentation c'est-à-dire en particulier au cours de
25 leur déplacement les moyens pour déplacer les diffuseurs à l'intérieur de l'enceinte comprennent en outre des moyens d'alimentation en gaz de sustentation, généralement sous la forme d'une chambre unique d'alimentation en gaz de sustentation alimentant
30 l'ensemble des diffuseurs et recevant une canalisation d'alimentation en gaz de sustentation.

Les moyens pour déplacer les diffuseurs, comprennent en outre des moyens d'entraînement généralement sous la forme d'un axe ou arbre actionné
35 par un moteur.

Ces moyens d'entraînement sont adaptés au mode de réalisation indiqué plus haut, ainsi, dans le cas où les moyens pour déplacer les diffuseurs comprennent un barillet tournant, lesdits moyens
5 d'entraînement comprennent un axe rotatif supportant ladite chambre unique d'alimentation, ledit axe étant entraîné, actionné par un moteur.

De préférence, l'axe est creux et joue également en outre le rôle de canalisation
10 d'alimentation.

Selon l'invention et de nouveau afin de maintenir les milieux en sustentation au cours de leur déplacement, les moyens d'alimentation en gaz de sustentation sont pourvus de moyens de connection
15 permettant de les adapter aux moyens d'entraînement.

Ainsi, dans le cas où les moyens d'alimentation comprennent une canalisation d'alimentation confondue avec l'axe des moyens d'entraînement, l'alimentation en gaz de sustentation
20 est réalisée par l'intermédiaire de moyens de connection comprenant un joint tournant ou glissant.

Les moyens d'observation comprennent généralement au moins un hublot, selon l'invention l'enceinte de traitement comprend au moins un hublot
25 latéral par exemple de 1 à 10 hublots latéraux qui permettent une observation optimale des milieux mis en sustentation.

Les moyens de manipulation et/ou de contrôle comprennent des moyens choisis parmi des
30 moyens de diagnostic in situ, les moyens de télémanipulation, etc...

L'invention a également trait à un procédé d'élaboration de cristaux dans des milieux mis simultanément en sustentation sur des films de gaz dans
35 une enceinte de traitement dans lequel lesdits milieux

mis en sustentation sont au nombre d'au moins 2 et sont déplacés à l'intérieur de ladite enceinte de traitement tout en les maintenant en permanence en sustentation, afin de permettre leur observation et/ou leur contrôle
5 et/ou leur manipulation.

L'invention apparaîtra plus clairement à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple illustratif et nullement limitatif, en référence aux dessins joints dans lesquels :

10 - les figures 1A, 1B et 1C sont des représentations schématiques des procédés de l'art antérieur les plus courants, à savoir goutte suspendue : fig. 1A, goutte posée : fig. 1B, et goutte sandwich : fig. 1C;

15 - la figure 2 est une représentation schématique de la cristallisation par le procédé en goutte suspendue "hanging drop method";

- les figures 3, 4A et 4B donnent une représentation schématique du diagramme de
20 cristallisation dans les procédés mettant en oeuvre la diffusion de vapeur. La concentration en protéine est représentée en ordonnée et la concentration en agent de cristallisation ou de précipitation est représentée en abscisse;

25 - la figure 5 représente schématiquement le principe d'un dispositif selon l'invention et sert de référence pour définir les différents paramètres qui influencent la cristallisation et les notations utilisées;

30 - la figure 6 illustre la structure de l'enceinte de traitement décrite dans le document FR-A-2 742 771;

- la figure 7 est une vue en coupe schématique d'un dispositif selon l'invention dans une

forme de réalisation où le défilement des gouttes est réalisé par un barillet tournant;

- la figure 8 est le tableau synoptique général d'une installation de cristallogénèse de protéines par sustentation sur film de gaz, incluant le
5 dispositif selon l'invention;

Le dispositif selon l'invention qui comporte plusieurs diffuseurs, permet la sustentation simultanée de plusieurs milieux mis en sustentation.

10 De préférence chacun des diffuseurs sustente un seul milieu ce qui permet d'une part une séparation physique des milieux mis en sustentation, d'autre part le découplage des milieux en cas de mouillage de l'un d'entre eux et enfin une maintenance,
15 un nettoyage et un reconditionnement facile des diffuseurs entre deux expériences.

Le nombre des diffuseurs peut aller par exemple de 2 à 12 de préférence de 4 à 6.

Selon l'invention, chacun des milieux mis
20 en sustentation a de préférence la forme d'une goutte, cette forme étant dictée entre autres par les caractéristiques inhérentes au procédé

Chaque milieu peut être tout milieu pouvant être mis en sustentation de manière adéquate, mais il
25 s'agit de préférence d'une masse fluide, liquide ou gélifiée.

Chaque milieu est encore de préférence une solution, de préférence une solution aqueuse, mais il est bien évident que d'autres solvants ou mélanges de
30 solvants peuvent être envisagés tels que alcools, polymères, fluorocarbones, sels, laitiers,...

La solution peut comprendre un seul des composés indiqués ci-dessus comme solvant, mais peut aussi comprendre un mélange de deux ou plus de ces
35 solvants.

L'eau est le solvant préféré, en particulier lorsqu'on désire élaborer des cristaux organiques et/ou biologiques tels que des cristaux de macromolécules organiques et/ou biologiques, par
5 exemple de protéine(s).

Le solvant peut également contenir un composé appelé « sel précipitant ».

Il peut s'agir d'un composé organique, ou inorganique par exemple minéral tel que le sulfate
10 d'ammonium, le chlorure de sodium, ou bien un polymère, un alcool tel que le polyéthylène glycol ou le méthyl-pentanediol.

Le ou les composé(s) à cristalliser est(sont) quelconque et peuvent être un(des) composé(s)
15 organique(s) ou minéral(minéraux).

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée du procédé selon l'invention, le(les) composé(s) à cristalliser est(sont) une(des) macromolécule(s) organique(s) et en particulier
20 une(des) macromolécule(s) biologique(s) telles que les acides nucléiques et en particulier des protéines telles que les enzymes, les hormones, les récepteurs, etc.

Le dispositif selon l'invention est en
25 effet particulièrement avantageux pour la cristallogénèse des macromolécules biologiques car du fait du meilleur contrôle, de la meilleure observation de la cristallisation qu'il permet, une meilleure connaissance des paramètres de germination croissance
30 est ainsi possible.

Il en découle une meilleure maîtrise de la cristallogénèse, en particulier des macromolécules biologiques. Les connaissances acquises par la caractérisation du cristal permettant ensuite une
35 meilleure maîtrise du génie bio-moléculaire.

Le composé à cristalliser est généralement présent à une concentration initiale dans le milieu comprise entre 1 et 30 mg/ml.

On peut faire croître dans chacun des milieux, par exemple gouttes, mis en sustentation, un ou plusieurs cristaux selon l'application que l'on fait du procédé selon l'invention.

Par exemple, si l'on souhaite obtenir un cristal de taille, de forme et de qualité suffisantes pour pouvoir effectuer l'étude de sa structure, il sera préférable de ne faire croître qu'un cristal par milieu ou goutte ; le dispositif selon l'invention où l'on peut mettre plusieurs milieux simultanément en sustentation pour élaborer simultanément plusieurs cristaux s'avère alors particulièrement avantageux.

Si le procédé selon l'invention est utilisé comme technique séparative, par exemple par cristallisation fractionnée, il sera alors préférable de faire croître plusieurs cristaux par milieu ou goutte.

Tous les milieux mis en sustentation dans le dispositif selon l'invention peuvent être identiques, mais un ou plusieurs de ces milieux peuvent également avoir une composition différente des autres.

Comme on l'a déjà mentionné plus haut, l'application du dispositif selon l'invention en vue en particulier de l'obtention d'un cristal de dimension satisfaisante peut s'opérer de deux manières.

Soit, dans une première variante, on part d'une solution limpide contenant le composé à cristalliser et l'on provoque la nucléation d'un germe, puis sa croissance. Soit on introduit un germe exogène d'une taille par exemple de quelques microns à quelques dizaines de microns dans la solution, c'est ce que l'on appelle l'ensemencement, puis on le fait croître.

Chaque milieu mis en sustentation peut également comprendre un composé par exemple un sel précipitant, cité plus haut, tel que le NaCl ou le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à une concentration initiale comprise entre 5
5 et 50 % (poids ou volume).

Un tampon de réglage du pH peut également être présent dans chaque milieu : ce tampon peut être choisi parmi les systèmes tampons connus de l'homme du métier. Il peut s'agir par exemple d'un tampon TRIS
10 permettant de tamponner le milieu (aqueux) à un pH de 8,5 à 7 ou encore d'un tampon cacodylate permettant de tamponner le milieu à un pH de 6 à 5.

On a vu ci-dessus que le volume initial de chaque milieu, c'est-à-dire par exemple de chaque
15 goutte est, de préférence, conformément à l'une des caractéristiques avantageuses de l'invention compris entre 30 et 100 μl , et mieux encore entre 50 et 60 μl , ce qui est un volume sensiblement plus important que les volumes initiaux des milieux des dispositifs de
20 l'art antérieur sans contact.

Le gaz utilisé pour la mise en sustentation doit de préférence être chimiquement neutre vis-à-vis du milieu mis en sustentation ; on utilisera de préférence un gaz tel que l'hélium, l'argon, l'azote ou
25 bien encore l'air filtré.

Le débit de gaz de sustentation doit être suffisant pour maintenir le milieu en sustentation ; il doit également être constant et peut être déterminé aisément par l'homme du métier dans ce domaine de la
30 technique ; il sera compris de préférence entre 1 et 100 ml/mn.

Le dispositif selon l'invention peut être mis en oeuvre dans des conditions de gravité normale, par exemple au sol, ou bien dans des conditions de

gravité réduite ou de microgravité, par exemple dans un vaisseau spatial.

Le dispositif selon l'invention selon l'une de ses caractéristiques particulièrement avantageuse permet de maîtriser, de réguler, de contrôler le processus d'élaboration par l'intermédiaire d'un certain nombre de paramètres.

La figure 5 illustre de manière schématique le principe général d'un dispositif selon l'invention, et effectue l'inventaire des paramètres influents et des notations utilisées dans le cas général de la sustentation sur film de gaz d'une masse fluide ou gélifiée.

Le principe du dispositif selon l'invention qui est un perfectionnement du dispositif selon le document FR-A- 2 742 771 est analogue à celui du dispositif décrit dans ce document, de ce fait la figure 5 est analogue à la figure 5 du document FR-A-2 742 771.

Ce dispositif comprend essentiellement des moyens permettant de mettre le milieu en sustentation sous la forme par exemple de plusieurs diffuseurs ; par souci de clarté, on a représenté sur la figure 5 seulement l'un de ces diffuseurs. Ce diffuseur, désigné généralement par la référence (51), est placé dans une enceinte (52).

Le gaz de sustentation (53) alimente le diffuseur (51) représenté, par l'intermédiaire de moyens d'alimentation sous la forme par exemple, d'une canalisation d'alimentation (54) traversant l'enceinte (52). Le gaz en excès est évacué par l'intermédiaire de moyens d'évacuation sous la forme par exemple d'un orifice d'échappement (512).

Les diffuseurs peuvent être notamment du type de celui décrit dans le document FR-A-2 509 637

déjà mentionné ci-dessus, c'est-à-dire que la masse du milieu à supporter, qui peut être par exemple une goutte (55) d'une masse fluide ou gélifiée, est supportée au-dessus d'une paroi (56) à l'aide d'un film
5 de gaz (57).

La plaque (56) est poreuse et constitue la paroi diffusante d'une chambre permettant la mise en pression et en température du gaz employé.

On force le gaz, tel que l'hélium, ou autre
10 à travers cette paroi qui peut être par exemple constituée de graphite, ou céramique, ou matériau synthétique et avoir une épaisseur, par exemple de 1 à 5 mm.

A l'aide d'un dispositif d'injection
15 constitué par exemple, par une seringue munie d'une aiguille, on forme une goutte pendante que l'on approche progressivement de la paroi diffusante de manière à favoriser la formation du film de gaz entre la goutte et ladite paroi.

20 Quand la goutte sustente sur le filtre on augmente progressivement son volume puis on rompt le menisque de liaison à l'aiguille par éloignement de celle-ci.

Afin de maintenir la goutte (55) au même
25 endroit de la surface externe de la plaque (56), on a donné à celle-ci sur la figure 5 une forme légèrement concave.

En effet, le poids de la goutte étant équilibré par la pression du film de gaz, si aucune
30 force de rappel ne la maintient, elle acquiert une grande mobilité sous l'effet de forces minimales non contrôlées. C'est pourquoi l'on prévoit de préférence une telle forme de paroi légèrement concave afin d'éviter un déplacement accidentel de la goutte.

On a vu dans ce qui précède que dans le cas du procédé courant dit de la goutte suspendue de nombreux auteurs ont étudié le mécanisme des transferts de masse, à savoir essentiellement de la vapeur d'eau entre la goutte et le réservoir. La diffusion moléculaire de la vapeur d'eau dans l'air explique assez bien la cinétique de variation de la concentration en sel précipitant en fonction du temps. Le temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre est de l'ordre de la centaine d'heures.

Dans le cas de la sustentation sur film de gaz, du fait du débit de gaz, de préférence d'air nécessaire à la sustentation, on a un système ouvert. La convection forcée autour du milieu mis en sustentation par exemple de la goutte "balaye" la couche limite, et on a une évacuation permanente par exemple d'eau qui doit être compensée par ailleurs.

La figure 5 donne l'inventaire des paramètres influents et les notations utilisées :

- Q_g désigne le débit de gaz de sustentation arrivant par la canalisation (54),

- Rh_g , T_g désignent l'hygrométrie relative et la température ($^{\circ}C$) du gaz de sustentation (53).

- T_d désigne la température du diffuseur prise en (58) à l'aide de moyens de mesure de la température T_d , par exemple à l'aide d'une sonde de température sous forme de sonde à résistance de platine ou thermistance.

- T_a et Rh_a désignent la température de la goutte, supposée isotherme, et l'hygrométrie relative à sa surface en (59),

- T_{∞} et RH_{∞} désignent la température et l'hygrométrie relative dans l'enceinte, loin de la goutte, par exemple en (510) et peuvent être mesurées

par des moyens de mesure, par exemple par des capteurs et sondes, adéquats,

- T_p désigne la température de la paroi de l'enceinte prise par exemple en (511) à l'aide de
5 moyens de mesure, par exemple à l'aide d'un ou de plusieurs sonde(s) ou capteur(s), adéquat(s), tels que sonde(s) à résistance de platine (Pt) ou thermistance.

En première approximation T_p est égal à T_g qui est voisin de T_d , à savoir par exemple de 0 à 40°C.

10 Les flux surfaciques par exemple de vapeur d'eau sont proportionnels au gradient de concentration dans la couche limite de la phase gazeuse à la surface de la goutte.

Compte tenu des contraintes géométriques
15 liées au procédé de sustentation, le volume de l'enceinte est supérieur à celui du procédé, pris comme procédé de référence à savoir le procédé dit "goutte suspendue", par exemple le volume de l'enceinte est de deux ordres de grandeur supérieurs à celui du procédé
20 de référence.

Un circuit de gaz humide additionnel tel que de l'air permet d'une part de diminuer la constante de temps d'établissement du degré hygrométrique souhaité dans l'enceinte après ouverture, et d'autre
25 part de le maintenir pendant toute la durée de l'expérience.

Le dispositif selon l'invention permet de maîtriser et de contrôler la nucléation, puis la vitesse de croissance des faces des cristaux par
30 l'intermédiaire de l'un ou de plusieurs des paramètres énumérés ci-dessus : par exemple, on pourra réaliser une évaporation de la goutte à T_∞ constante et RH_∞ variable ou une évaporation de la goutte à T_∞ variable, ou bien une évaporation de la goutte par variation de
35 Rh_g et/ou T_g , ou on peut faire varier les concentrations

par injection de solvant ou de réactifs dans la goutte, ou enfin on peut faire varier la concentration en sel précipitant dans le réservoir à l'image de ce qui se fait dans le procédé de référence à goutte suspendue.

5 La figure 7 est une vue en coupe schématique du dispositif selon l'invention dans une forme de réalisation où le défilement des gouttes est réalisé par un barillet tournant.

10 Le dispositif selon l'invention peut être défini comme un perfectionnement au dispositif de l'art antérieur tel que décrit dans le document FR-A-2 742 771 et sur la figure 6.

15 Le dispositif de la figure 7, selon l'invention, se différencie essentiellement du dispositif de la figure 6 par le fait qu'il comporte plusieurs diffuseurs, des moyens pour déplacer ces diffuseurs sous la forme d'un barillet tournant, ainsi que des moyens d'alimentation en gaz de sustentation adaptés à la présence d'une pluralité de diffuseurs.

20 De ce fait, la description qui suit, faite en référence à la figure 7, portera essentiellement sur les éléments du dispositif selon l'invention qui sont différents du dispositif de l'art antérieur selon la figure 6 et/ou qui sont ajoutés à celui-ci.

25 Le reste du dispositif est pour l'essentiel analogue au dispositif de la figure 6 et n'est pas généralement décrit de manière plus approfondie, on pourra donc se reporter à la figure 6, déjà décrite, ou au document FR-A-2 742 771.

30 Le dispositif selon l'invention comprend essentiellement une enceinte (71) qui est une enceinte à double paroi.

Selon la figure 7, l'enceinte est réalisée sous la forme de deux demi-enceintes, l'une d'entre

elles formant un couvercle à double-paroi (72) et l'autre formant un fond à double-paroi (73).

Entre les deux demi-enceintes (72,73) est prévu par exemple un joint d'étanchéité (74). Cette
5 enceinte est pourvue de moyens permettant de réguler la température intérieure c'est-à-dire la température de la goutte et de l'atmosphère de l'enceinte. Ces moyens se présentent en particulier sous la forme d'une circulation de liquide thermostaté (75), par exemple de
10 l'eau, ou un mélange d'eau et d'éthylène glycol, en provenance de la boucle de thermostatage décrite à la figure 8.

Le liquide thermostaté est introduit dans la double paroi par les tubes (76) (77) et en ressort
15 par les tubes (78) (79).

Ces moyens de régulation de la température ne constituent qu'une exemple de réalisation. On peut également concevoir un système de régulation et de contrôle de la température de la goutte faisant appel
20 par exemple à un chauffage par micro-ondes dans le cas de fluides diélectriques tels que l'eau, les solvants organiques etc...; à un chauffage par induction haute fréquence dans le cas de fluides conducteurs électriques; ou à un chauffage radiatif dans les deux
25 cas.

L'enceinte est de préférence doublée par un matériau calorifuge (701) tel que du liège ou une mousse synthétique ce qui permet de maintenir à l'intérieur de l'enceinte une température de préférence
30 de 0 à 40°C de préférence encore supérieure à 0°C et sensiblement constante c'est-à-dire de préférence avec une variation ne dépassant pas $\pm 0,05^\circ\text{C}$.

Le dispositif de la figure 7 comporte conformément à l'invention des moyens d'observation
35 sous la forme de hublots (702, 703, 704), disposés dans

des traversées pratiquées dans la double paroi de l'enceinte, par exemple, dans le couvercle et dans les parois latérales.

Selon une caractéristique particulièrement
5 avantageuse du dispositif selon l'invention; celui-ci, en plus du hublot apical (702) unique analogue à celui dont est pourvu le dispositif de l'art antérieur comporte un certain nombre de hublots latéraux.

Ainsi, le dispositif de la figure 7,
10 comprend-il quatre hublots latéraux qui permettent l'éclairage et l'observation radiale des gouttes. Seuls deux de ces hublots (703, 704) ont été représentés.

Les traversées de paroi peuvent également être pourvues de moyens de contrôle et/ou de
15 manipulation tel que des moyens de diagnostic in-situ non invasif (par exemple un éclairage latéral, par nappe de lumière, du plan équatorial de la goutte, permettant un examen en fond noir et, par suite, la détection du passage des germes cristallins entraînés
20 par les courants de convection dans la goutte), des moyens de téléopération ou de télémanipulation (par exemple un système d'aiguille d'injection/prélèvement permettant soit de modifier la composition de la solution soit de déposer un germe cristallin pour
25 ensemençer la solution mère).

Il est possible grâce aux caractéristiques du dispositif selon l'invention d'effectuer des opérations de télémanipulation sans risquer de modifier la qualité de l'atmosphère de traitement des gouttes.
30 Les moyens de manipulation peuvent par exemple permettre le dépôt et le prélèvement des gouttes, des ajouts divers permettant de modifier la composition de la solution, etc.

En particulier, le dépôt des gouttes peut
35 être réalisé à l'aide d'une aiguille d'injection dans

une configuration où l'enceinte est fermée, par exemple en montant une membrane perforable à la place d'un hublot.

Ceci permet d'attendre la mise en équilibre
5 hygrométrique de l'atmosphère de l'enceinte durant le dépôt des gouttes, et ainsi de raccourcir la durée d'une opération de cristallogénèse.

L'enceinte est également munie de plusieurs connecteurs ou d'autres moyens permettant de faire
10 traverser la double paroi de l'enceinte aux différents cablages, alimentations, etc... reliés aux divers moyens et dispositifs de mesure, sondes capteurs disposés à l'intérieur de l'enceinte. On se reportera à ce propos à la figure 6.

15 L'enceinte comprend par exemple des moyens sous la forme de piquages et de canalisations (705, 706), pour l'alimentation d'un injecteur annulaire (707) de gaz de balayage.

Le gaz peut être par exemple de l'air ou de
20 l'azote, et il est bien entendu choisi pour être compatible avec les réactifs mis en oeuvre ainsi qu'avec les matériaux formant le diffuseur, l'enceinte, les moyens de mesure etc...

Ce gaz est généralement le même que le gaz
25 de sustentation, et il s'agit généralement d'un gaz dont l'humidité est contrôlée afin de réguler l'hygrométrie dans l'atmosphère de l'enceinte.

Selon l'invention, le dispositif comporte plusieurs diffuseurs, ainsi le dispositif représenté
30 sur la figure 7 comporte-t-il quatre diffuseurs dont deux sont visibles (708, 709), mais ce nombre n'est absolument pas limitatif.

Ces quatre diffuseurs dont la partie utile est par exemple un secteur sphérique (710, 711) sont
35 montés sur un barillet tournant (712) qui permet

d'assurer le défilement des gouttes avec une grande précision notamment devant le hublot apical (702).

Sur la figure 7, chaque diffuseur supporte une goutte (713, 714), une telle disposition permet, d'une part le découplage des gouttes en cas de mouillage de l'une d'entre elles, d'autre part un nettoyage, reconditionnement des diffuseurs entre deux expériences.

Les quatre diffuseurs, portant chacun une goutte de solution mère, sont placés sur le barillet tournant disposé sur la chambre unique commune haute pression d'alimentation en gaz de sustentation, dite encore chambre de pressurisation (715).

La chambre de pressurisation peut également comprendre des moyens de régulation de la température, comme sur la figure 6.

Le porte diffuseur, c'est-à-dire l'ensemble constitué par le barillet tournant et la chambre de pressurisation est porté par un axe ou arbre rotatif (716).

Cet axe, entraîné par un moteur (717), est de préférence creux et joue également le rôle de canalisation d'alimentation faisant partie des moyens d'alimentation en gaz de sustentation.

Selon l'invention les moyens d'alimentation en gaz de sustentation sont conçus de manière à maintenir les gouttes en sustentation en permanence et en particulier pendant leur déplacement, par exemple ces moyens comportent des moyens de connection tel qu'un système de joint tournant (718) comme représenté sur la figure 7 ou bien encore dans une autre forme de réalisation un système de joint glissant, ce qui permet d'assurer une alimentation constante en gaz de sustentation de ne pas perturber la cristallogénèse.

La figure 8 représente l'installation complète de sustentation notamment de solutions aqueuses sur film de gaz permettant notamment de réaliser la cristallogénèse de protéines.

5 Dans cette installation, l'enceinte décrite ci-dessus sur la figure 7 est représentée schématiquement en (81). La double paroi de cette enceinte est reliée à la boucle de thermostatage (82) comprenant un appareil de contrôle de la température
10 (83) tel qu'un thermostat par les tubes d'arrivée (84) et de sortie (85) acheminant un liquide thermostaté tel que de l'eau ou l'éthylène glycol qui permet de réguler la température à l'intérieur de l'enceinte (81) à une température comprise de préférence entre 0 et 40°C, de
15 préférence encore supérieure à 0°C, avec de préférence une variation ne dépassant pas plus ou moins 0,05°C.

Le gaz de sustentation par exemple de l'air ou de l'azote, alimentant le diffuseur à un débit de préférence de 1 à 100 ml/mn, provient de la baie de
20 contrôle et de régulation (86) de l'alimentation en gaz, munie d'un débitmètre (87) et d'une vanne de réglage (88) du débit.

Ce gaz passe tout d'abord, avant d'être envoyé dans la canalisation (89) aboutissant dans
25 l'enceinte, et plus précisément dans le diffuseur, dans un appareil barboteur, constitué par exemple d'un bain thermostaté (810), qui permet de régler son hygrométrie relative à une valeur comprise entre 90 et 100 % RH et sa température à une valeur de préférence comprise
30 entre 0 40°C, de préférence encore supérieure à 0°C.

Un deuxième circuit d'alimentation en gaz permet le balayage de la chambre avec un débit de préférence de 0,1 à 5 l/mn, beaucoup plus important que celui du circuit de sustentation : ce débit est encore
35 de préférence compris entre 0,2 et 2 l/min.

De manière analogue au gaz de sustentation, le gaz de balayage qui est de préférence le même que le gaz de sustentation provient de l'arrivée commune de gaz par l'intermédiaire de la baie de contrôle et de régulation de l'alimentation en gaz qui est munie de moyens de contrôle, de régulation et de mesure du débit sous la forme par exemple d'un débitmètre (812) et d'une vanne de réglage (813) du débit et passe tout d'abord, avant d'être envoyé dans l'enceinte par l'orifice d'entrée (814), dans un appareil barboteur constitué d'un bain thermostaté (815) qui permet de régler son humidité relative à une valeur comprise entre 90 et 100 % RH et sa température à une valeur de préférence comprise entre 0 et 40°C, de préférence encore supérieure à 0°C. Les gaz de sustentation et de balayage en excès peuvent être évacués de l'enceinte par l'orifice d'échappement (816) et recyclés.

Le circuit d'alimentation en gaz de balayage permet, après une opération d'ouverture et de fermeture de l'enceinte de rétablir l'hygrométrie relative de l'atmosphère de l'enceinte avec une constante de temps beaucoup plus faible.

L'installation comprend également selon l'invention des moyens d'observation et/ou de contrôle et/ou de manipulation du liquide placé en sustentation. Les moyens d'observation comprennent outre les hublots décrits plus hauts et éventuellement en association avec un ou plusieurs de ces hublots, par exemple un microscope stéréoscopique (817), grâce auquel on peut observer chaque goutte, soit directement à l'oculaire, soit sur un moniteur de télévision (818) via une caméra (819) lorsqu'elle est exactement positionnée grâce au barillet tournant face au hublot apical. D'autres moyens d'observation ont été par exemple cités plus haut.

Selon l'invention, le dispositif comprend également des hublots latéraux pouvant être pourvus de multiples moyens d'observation et/ou de manipulation, et/ou de contrôle par exemple de diagnostic etc... qui
5 ont déjà été par exemple cités plus haut.

Le signal vidéo cité ci-dessus est éventuellement enregistré sur des moyens d'enregistrement tels qu'un magnétoscope.

Les mesures recueillies dans l'enceinte par
10 les divers moyens de mesure de température et d'hygrométrie sont transmises par la ligne (820) à des moyens d'acquisition et de traitement comprenant par exemple une centrale de mesure (821) et un micro-ordinateur (825) par exemple du type HP 3852
15 commercialisé par la Société HEWLETT-PACKARD couplé à des moyens d'impression tels qu'une imprimante (723) qui permet donc l'acquisition des mesures, la commande périodique de l'éclairage et la sortie d'un cliché papier sur l'imprimante vidéo (822) grâce auquel on
20 peut a posteriori mesurer le diamètre de la goutte et le calcul de son volume ouvert. Les signaux analogiques sont enregistrés sur papier (824) en tracé continu.

Les moyens de contrôle de régulation et de mesure de l'hygrométrie de l'enceinte et du gaz de
25 sustentation décrits dans ce qui précède ne sont donnés qu'à titre indicatif. Il est bien évident que d'autres moyens de contrôle de régulation et de mesure peuvent être mis en oeuvre, en particulier dans le cadre d'une réalisation à l'échelle industrielle de l'installation.

30 Il en est de même pour les moyens de contrôle, de régulation et de mesure de la température ; pour les moyens de contrôle, de régulation et de mesure des différents débits ; pour les moyens de mise en sustentation ; pour les moyens
35 d'alimentation et d'évacuation des différents gaz et

autres fluides ; pour l'enceinte elle-même ; pour les
moyens d'observation et/ou de contrôle et/ou de
manipulation des milieux mis en sustentation dont elle
est pourvue ; pour les moyens d'acquisition de
5 traitement, de reproduction et d'impression et pour
tous les autres moyens prévus dans le dispositif et
l'installation de l'invention et en particulier pour
les moyens pour déplacer les diffuseurs à l'intérieur
de l'enceinte, pour les moyens d'entraînement, pour les
10 moyens de connection etc...

REVENDICATIONS

1. Dispositif d'élaboration de cristaux dans des milieux mis en sustentation sur des films de gaz, 5 comprenant une enceinte (71) de traitement, des moyens ou diffuseurs (708, 709) pour mettre lesdits milieux simultanément en sustentation sur des films de gaz et des moyens d'observation (702, 703, 704) et/ou de 10 contrôle et/ou de manipulation desdits milieux mis en sustentation, dans lequel ledit dispositif comprend au moins deux diffuseurs (708, 709), et des moyens (712) pour déplacer lesdits diffuseurs à l'intérieur de ladite enceinte de traitement, maintenir en permanence 15 lesdits milieux en sustentation, et permettre l'observation et/ou le contrôle et/ou la manipulation desdits milieux mis en sustentation par lesdits moyens d'observation et/ou de contrôle et/ou de manipulation.

2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le déplacement des diffuseurs est 20 un déplacement alternatif.

3. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le déplacement des diffuseurs est un déplacement séquentiel.

4. Dispositif selon l'une quelconque des 25 revendications 2 et 3 caractérisé en ce que ledit déplacement est un déplacement linéaire selon un axe unique.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 caractérisé en ce que ledit 30 déplacement est un déplacement selon deux axes orthogonaux.

6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 2 et 3 caractérisé en ce que ledit déplacement est un déplacement circulaire.

7. Dispositif selon la revendication 6 caractérisé en ce que les moyens pour déplacer lesdits diffuseurs comprennent un barillet tournant (712) supportant lesdits diffuseurs.

5 8. Dispositif selon la revendication 5 caractérisé en ce que les moyens pour déplacer lesdits diffuseurs comprennent une plaque support sur laquelle les diffuseurs sont disposés selon une matrice.

10 9. Dispositif selon la revendication 4 caractérisé en ce que les moyens pour déplacer lesdits diffuseurs comprennent une bande support sur laquelle est disposée une rangée de diffuseurs.

15 10. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que les moyens pour déplacer les diffuseurs et maintenir en permanence lesdits milieux en sustentation comprennent des moyens d'alimentation en gaz de sustentation (715) et des moyens d'entraînement (716, 717).

20 11. Dispositif selon la revendication 10 caractérisé en ce que lesdits moyens d'alimentation en gaz de sustentation comprennent une chambre unique d'alimentation en gaz de sustentation (715) alimentant l'ensemble des diffuseurs, et recevant une canalisation (716) d'alimentation en gaz de sustentation.

25 12. Dispositif selon la revendication 10 ou 11 caractérisé en ce que lesdits moyens d'entraînement comprennent un axe ou arbre (716) actionné par un moteur (717).

30 13. Dispositif selon la revendication 12 caractérisé en ce que ledit axe (716) est creux et joue également le rôle de canalisation d'alimentation en gaz de sustentation.

35 14. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 10 à 13 caractérisé en ce que les moyens d'alimentation en gaz de sustentation sont pourvus de

moyens de connexion (718) permettant de les adapter aux moyens d'entraînement.

15 15. Dispositif selon la revendication 14 caractérisé en ce que lesdits moyens de connexion comprennent un joint tournant (718) ou un joint glissant.

10 16. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15 caractérisé en ce que les moyens d'observation comprennent au moins un hublot latéral (703, 704).

15 17. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 caractérisé en ce que les moyens de manipulation et/ou de contrôle sont choisis parmi les moyens de diagnostic in situ, et les moyens de télémanipulation.

18. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce que les milieux mis en sustentation sont des masses fluides ou gélifiées.

20 19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que les milieux sont des solutions.

20. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce que les milieux ont la forme de gouttes.

25 21. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que le(les) composé(s) à cristalliser est(sont) un(des) composé(s) organique(s) ou minéral(minéraux).

30 22. Dispositif selon la revendication 21, caractérisé en ce que le(les)dits composé(s) est(sont) une(des) macromolécule(s) organique(s) et/ou biologique(s).

35 23. Dispositif selon la revendication 22, caractérisé en ce que le(les)dit(s) composé(s) est(sont) une(des) protéine(s).

24. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 caractérisé en ce qu'il comprend de 2 à 12 diffuseurs.

25. Procédé d'élaboration de cristaux dans des
5 milieux mis simultanément en sustentation sur des films
de gaz dans une enceinte de traitement, dans lequel
lesdits milieux mis en sustentation sont au nombre d'au
moins 2 et sont déplacés à l'intérieur de ladite
enceinte de traitement tout en les maintenant en
10 permanence en sustentation, afin de permettre leur
observation et/ou leur contrôle et/ou leur
manipulation.

15

20

25

30

1/5

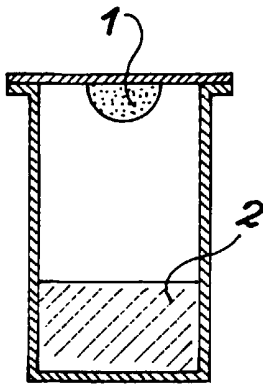


FIG. 1A

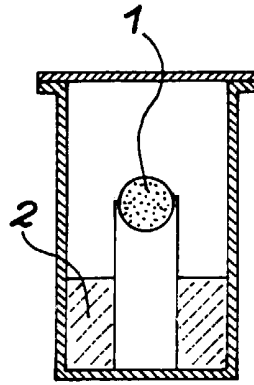


FIG. 1B

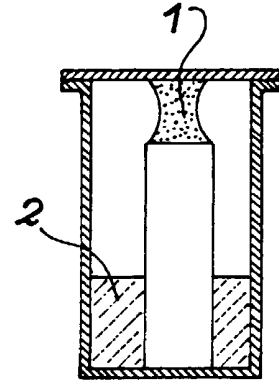


FIG. 1C

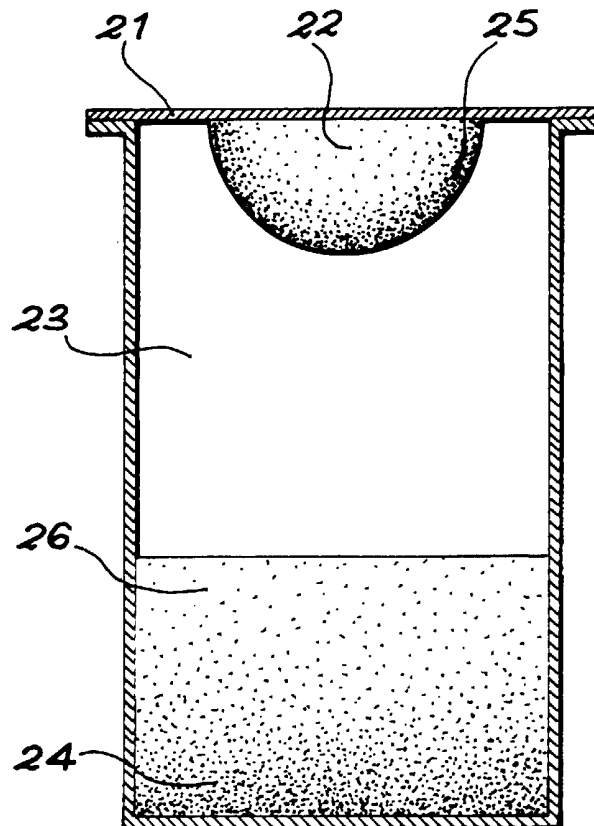


FIG. 2

2/5

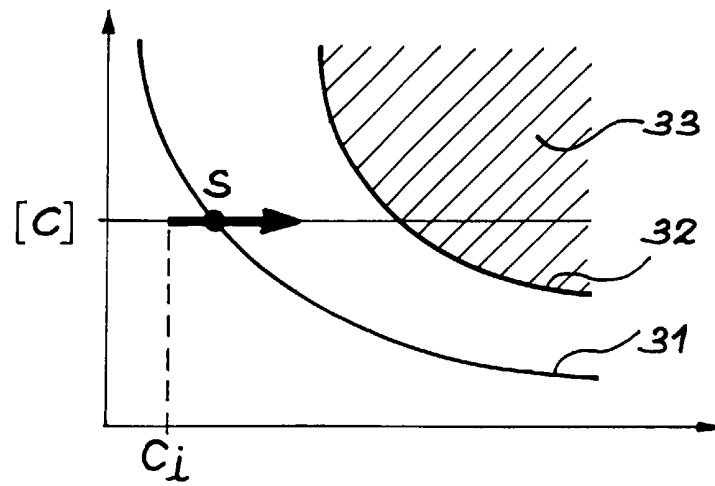


FIG. 3

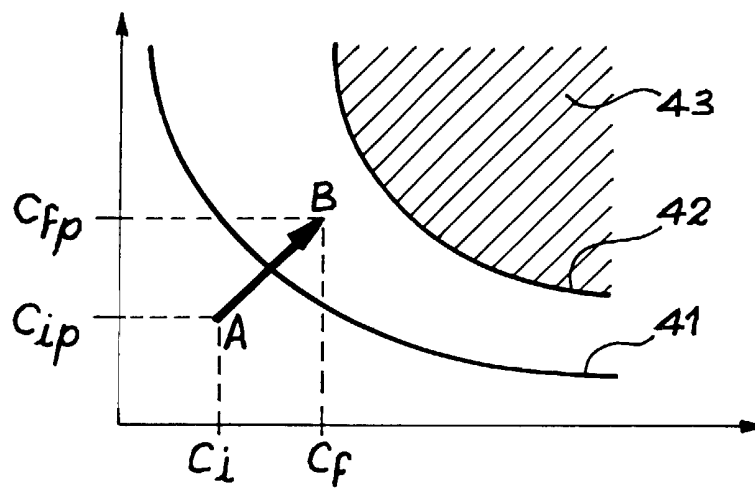


FIG. 4A

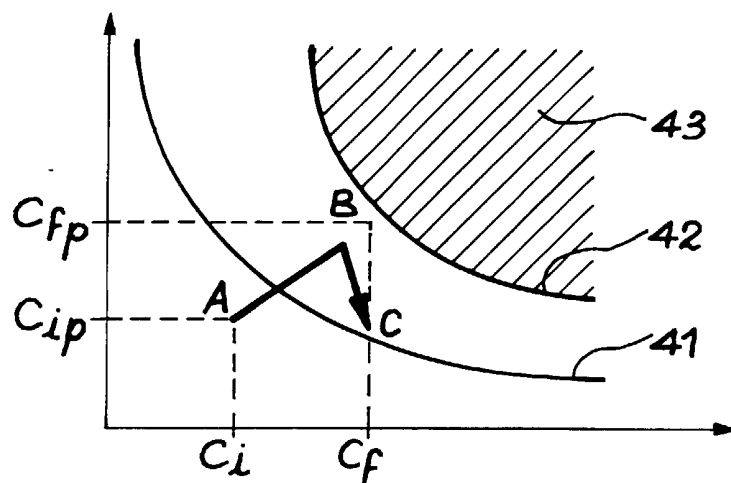


FIG. 4B

3/5

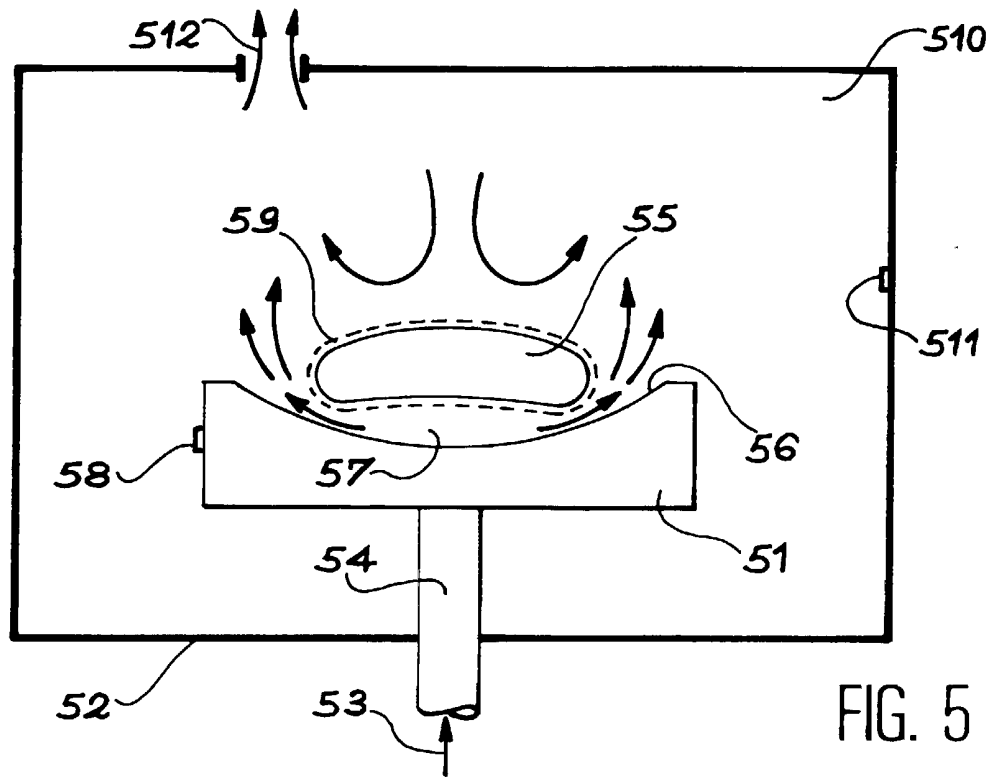
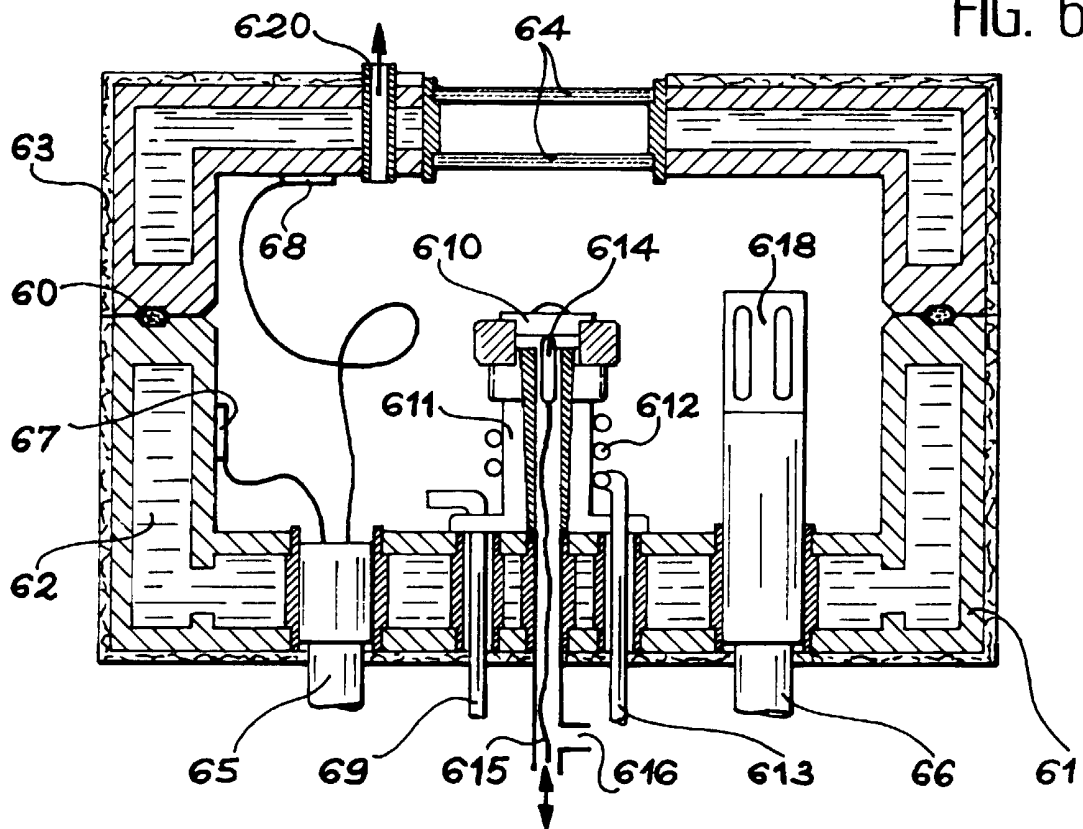


FIG. 5

FIG. 6



4 / 5

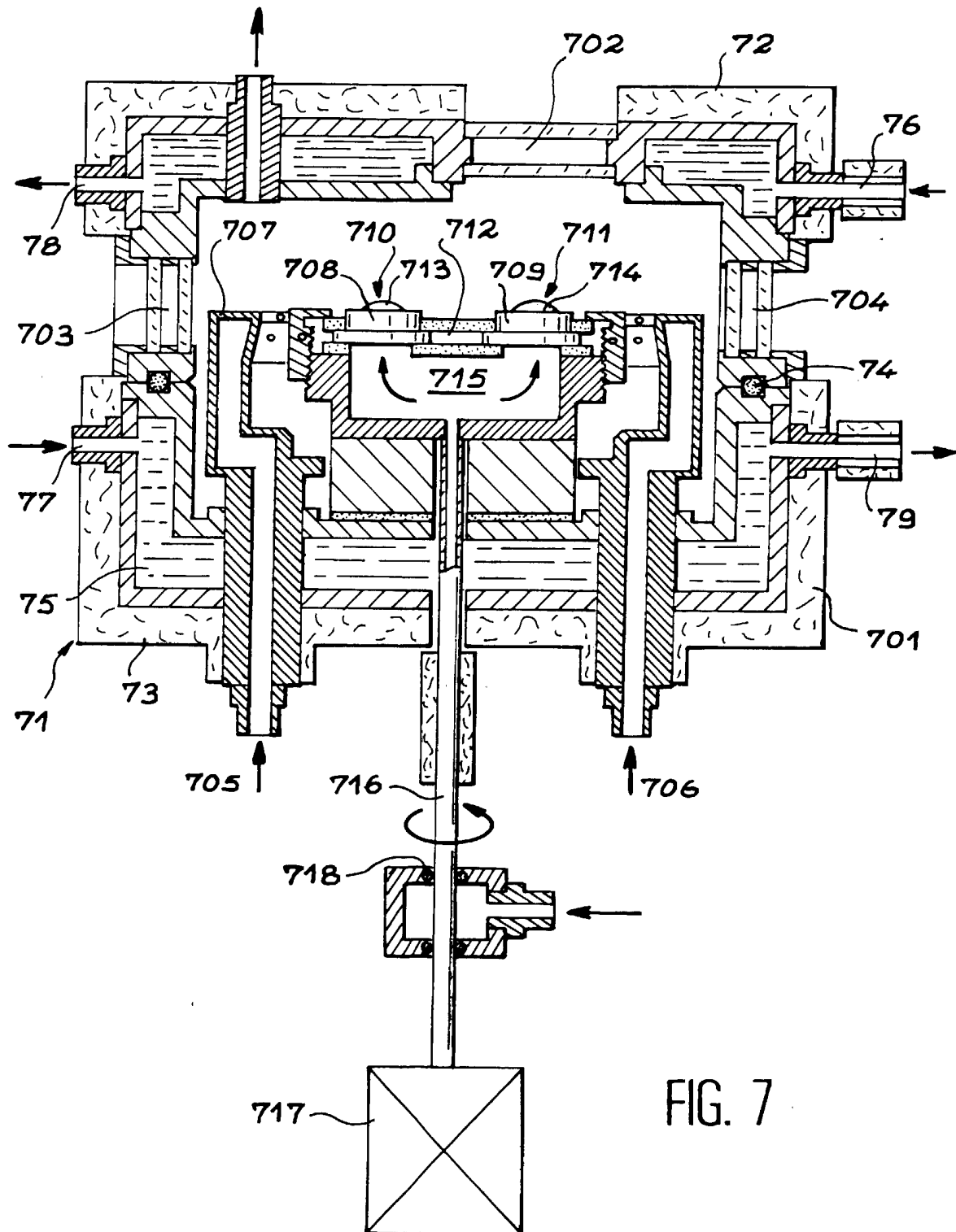


FIG. 7

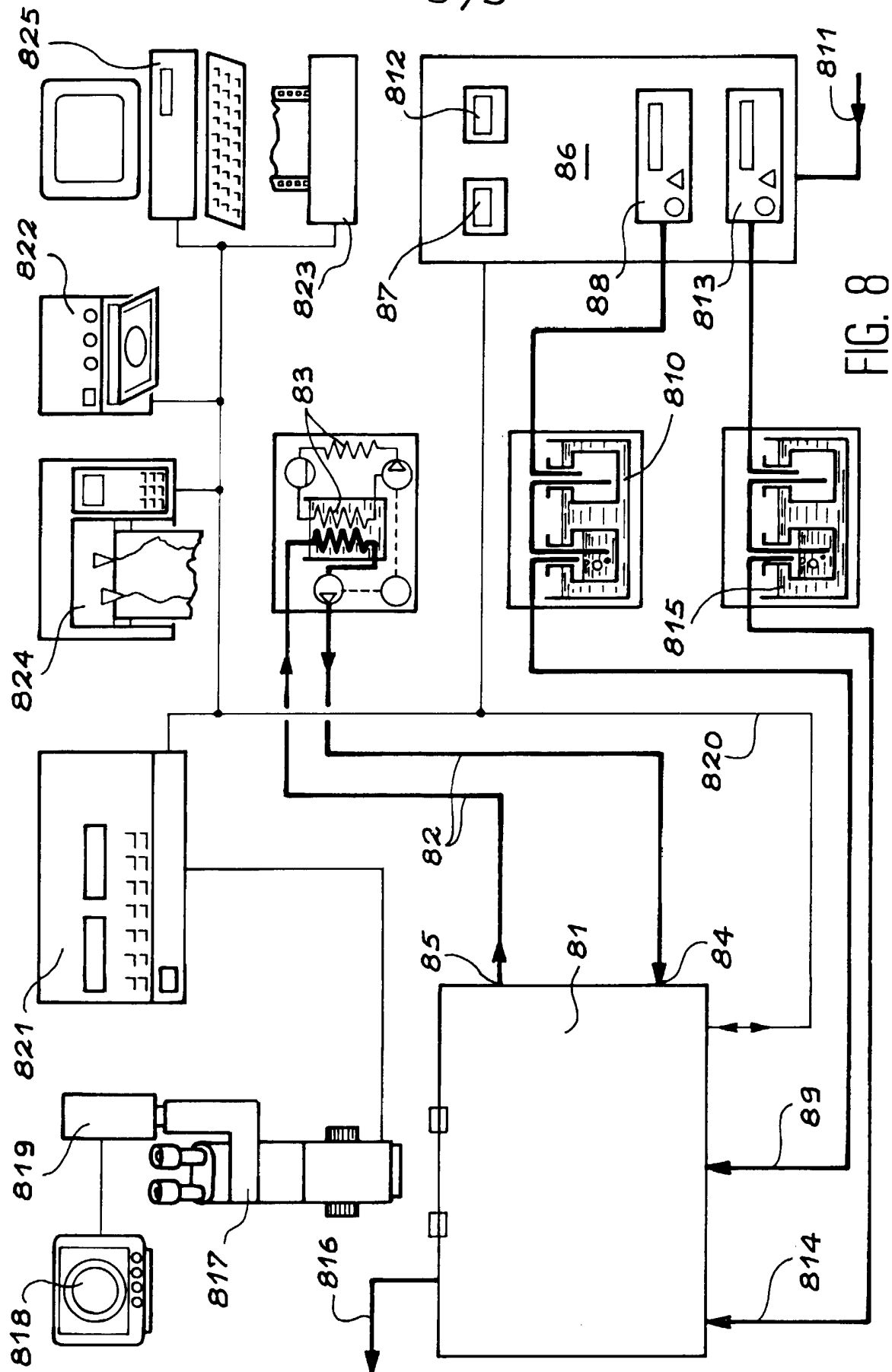


FIG. 8

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE**
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 550253
FR 9713374

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	EP 0 780 497 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 25 juin 1997 * le document en entier *	1,10, 18-25
D	& FR 2 742 771 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) ---	
Y	EP 0 070 760 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) 26 janvier 1983 * page 5, ligne 8 - ligne 28; figure 2 *	1,10, 18-25
D	& FR 70 760 A (COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE) ---	
A	DE 91 09 446 U (DORNIER GMBH) 17 octobre 1991 * page 10, ligne 7 - ligne 14; figures 18,19 *	1
A	EP 0 225 050 A (FUJITSU LTD) 10 juin 1987 ---	
A	US 5 078 975 A (RHODES ET AL) 7 janvier 1992 -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C30B
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
9 juin 1998		Cook, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intermédiaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		