

Dr. Shuheng Zhang

CINaM (Interdisciplinary Nanosciences Center in Marseille)

☎ : +33(0)6 01 09 51 16

✉ : zhang@cinam.univ-mrs.fr / shuheng.zhang@hotmail.com



Experimentalist

in Crystallization & in Microfluidics

Trilingual, 28 years old, dynamic and responsible

+ RESEARCH ACTIVITIES

Ph.D.
2012 - 2015

CINaM, Interdisciplinary Nanoscience Center of Marseille, France

Supervisors: Dr. Stéphane Veesler and Prof. Nadine Candoni

Grade: Graduated with highest honor

Developed a versatile microfluidic “plug & play” platform to crystallization

- Fundamental studies of nucleation and crystal growth
- High-throughput screening of crystallization conditions
- Optimized crystallization conditions : nucleation of a single crystal per droplet with high diffraction quality
- Validated the platform for all pharmaceutical molecules and solvents
- Hydrodynamic studies: characterized droplets generation regimes and scaling law of droplets size and frequency by experiments and simulations
- Off-line and On line characterization: optical, Absorbance UV-vis, SAXS ...

Master research project 2012

CINaM, France

Bubbles generation by Nano-electrolysis of water in a microfluidic channel

2011

IM2NP, France

(Institute of Materials in Microelectronics and Nanoscience of Provence)

Directional solidification of magnesium alloy

Graduate 's training 2008

Chongqing Changshou Chemical Co., Chongqing, China

Industrial Internship: Analysis of the mechanical properties of polymers

2007

laboratory of Professor Li Qing, Southwest University, China

Research project: Corrosion Behavior Study of Amorphous SiO_x coatings on Metal Substrates under Calcination by sol-gel Way

+ EDUCATION

Ph.D
2012-2015

Grad school of physics and material sciences, Aix-Marseille University, France

Condensed material and nanosciences

Master in research

2011-2012

Aix-Marseille University, France

Advanced Materials for Nanoscience and Energy (Ranking: 1st)

Master

2010-2011

Aix-Marseille University, France

Materials for Energy Storage and Conversion

French courses

2009-2010

Alliance Française, Beijing, China

Bachelor

2005-2009

Southwest University, China

Chemistry/Materials Science

2007, Winner of the 1st « Chem Lab Competition of SWU »

+ LANGUAGES

Chinese *Mother tongue*

English *Professional competence*

Experiences: Oral presentations in international conferences

French *Very fluent*

Experiences : Oral presentations in French-speaking conferences

Ph.D. dissertation and defense in French

+ PUBLICATIONS

Versatile Microfluidic Approach to Crystallization

Shuheng Zhang, Nathalie Ferté, Nadine Candoni, and Stéphane Veesler

Organic Process Research & Development Article ASAP DOI: 10.1021/acs.oprd.5b00122

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

Shuheng Zhang, Carine Guivier-Curien, Stéphane Veesler, Nadine Candoni,

Chemical Engineering Science, Volume 138, 22 December 2015, Pages 128-139, ISSN 0009-2509, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2015.07.046>.

Localizing and inducing primary nucleation

Zoubida Hammadi, Romain Grossier, Shuheng Zhang, Aziza Ikni, Nadine Candoni, Roger Morin and Stéphane Veesler
Faraday Discuss., 2015, 179, 489-501 DOI: 10.1039/C4FD00274A

+ CONFERENCES (as speaker)

2015 *In French, CRISTECH-Crystallization Technology Days, Autrans, France*

2014 *In English, CGOM11-11th International Workshop on Crystal Growth of Organic Materials, Nara, Japan*

2014 *In English, ISIC 19 - 19th International Symposium on Industrial Crystallization, Toulouse, France*

2013 *In French, CRISTAL 7- Crystallization and Industrial Precipitation, Toulouse, France*

+ TUTORIALS & DEMONSTRATIONS

2015 ***COST action, From molecules to crystals - how do organic molecules form crystals? Marseille, France***
Experiment demonstration in English

2015 ***EMBO practical course: High-throughput protein production and crystallization. Marseille, France***
Tutorial in English

+ TRAININGS

2011 ***2nd thematic school of micro and nano fluidics, Agay, France***

2012 ***International School on Biological Crystallization, Granada, Spain***

+ SKILLS

Technique *UV-Visible Spectrometry, SEM, XRD, SAXS, HPLC, NMR, DSC*

IT *C, C++, MATLAB, Image J, OriginLab, kaleidaGraph, Photoshop, windows movie maker, Office*

+ HOBBIES

Hiking, jogging, yoga



Dr Claude Sauter
Directeur de Recherche

Strasbourg, le 17 septembre 2015

Université Aix-Marseille
Jardin du Pharo
58 Boulevard Charles Livon
13284 Marseille cedex 07

Madame, Monsieur,

Vous trouverez ci-après mon rapport concernant le manuscrit de thèse présenté par Mademoiselle Shuheng Zhang et intitulé « Approche microfluidique polyvalente de la cristallisation ».

Je vous prie d'agréer, Madame, Monsieur, mes salutations distinguées.

Claude Sauter

Strasbourg, le 17 septembre 2015

Dans son manuscrit intitulé « approche microfluidique polyvalente de la cristallisation », Mademoiselle Shuheng Zhang présente les travaux qu'elle a réalisés sous la direction des Docteurs Nadine Candoni et Stéphane Veessler du Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM), en vue de l'obtention du titre de *Docteur de l'Université d'Aix-Marseille*. Ces travaux sont reliés à la problématique de cristallogénèse, à la compréhension du phénomène de cristallisation et à la définition des paramètres contrôlant la croissance de cristaux en solution, en particulier pour des applications pharmaceutiques (formulation de principes actifs) et en biologie structurale (détermination de structures 3D par cristallographie RX). Depuis une quinzaine d'année, la technologie microfluidique a révolutionné l'expérimentation dans ce domaine en introduisant une miniaturisation inégalée des essais de cristallisation à des volumes très inférieurs au microlitre, permettant leur multiplication et un traitement statistique du phénomène de cristallisation. Dans ce contexte, le travail de thèse de Mlle Zhang apporte des solutions expérimentales très attractives, parce que simples, versatiles, efficaces et potentiellement abordables pour de nombreux laboratoires. Le système microfluidique sur lequel s'est concentrée Mlle Zhang a été conçu au CINaM et consiste en un générateur de nanogouttes de cristallisation séparées par une huile inerte. Dans sa version la plus simple, il est constitué d'une jonction T à laquelle sont connectés deux canaux afférents (en tubes de type PEEK), l'un dans l'axe pour l'injection de l'huile, l'autre perpendiculaire pour celle du solvant ou du milieu de cristallisation complet, et un canal axial sortant dans lequel sont générées des gouttes qui forment autant de « nano-cristallisoirs ».

Après une introduction sur la cristallogénèse et l'état de l'art en matière d'outils microfluidiques appliqués à cette thématique, Mlle Zhang décline ses résultats sous trois aspects allant de la caractérisation des gouttes produites par le système microfluidique, l'augmentation de ses fonctionnalités grâce à l'ajout d'un module de mesure de concentration, à un exemple d'application à la cristallisation des protéines. Dans la première partie, elle utilise le dispositif pour générer des gouttes de solvant (l'éthanol est choisi pour mimer une solution de cristallisation) dans un flux d'huile fluorinée (FC-70) non miscible. Elle observe l'influence des flux de solvant et d'huile sur le processus de genèse des gouttes (par squeezing, dripping ou jetting) et leur forme (sphérique, allongée ou plug-like). Une simulation numérique 2D est conduite en parallèle et donne des prédictions concordantes. Dans l'ensemble, elle observe que son système à canaux de section circulaire se comporte de façon similaire à des dispositifs microstructurés en polymère à canaux de section rectangulaire. Toutefois, la gamme des débits explorés met en évidence la nécessité de tenir compte non seulement des vitesses respectives de l'huile (V_c) et du solvant (V_d), mais aussi de la vitesse totale de la solution en aval de la jonction ($V_{tot}=V_c+V_d$) pour décrire complètement l'évolution du facteur de forme (L/W) et la fréquence des gouttes générées par le système. Ces observations seront précieuses à l'avenir pour calibrer les débits opérationnels des solutions en vue d'expériences de cristallisation.

Dans la seconde partie de son travail, Mlle Zhang décrit la mise au point d'un protocole de détermination de la composition des gouttes en mesurant la concentration d'un ou plusieurs composants (colorants ou protéines) par spectrophotométrie UV. Une première solution manuelle

consiste à récolter les nanogouttes générées par le système dans une seringue, puis à les analyser individuellement à l'aide d'un spectromètre NanoDrop. Cette approche, jugée trop fastidieuse (on le comprend aisément), sera abandonnée au profit de l'ajout d'un nouveau module de mesure intégré au montage microfluidique. Celui-ci permet la quantification en ligne (on line) et *in situ* d'un constituant dans chaque goutte alors qu'elle traverse le faisceau UV. Mlle Zhang a construit et validé expérimentalement le montage qui apporte une plus-value incontestable au système dans la perspective d'une caractérisation automatisée à haut-débit de diagrammes de phase.

La dernière partie est consacrée à l'application concrète à la cristallisation d'une enzyme d'intérêt pharmacologique, l'urate oxydase, et à la mise en œuvre du système microfluidique pour étudier son diagramme de phase. Pour ce faire, Mlle Zhang teste l'effet de trois paramètres en générant des centaines de nanogouttes : les concentrations de la protéine et de l'agent cristallisant (le PEG 8000, composé rendant le milieu de cristallisation visqueux) et la température. Une étape préliminaire de cristallisation de l'enzyme en microbatch permet à Mlle Zhang de circonscrire une zone du diagramme de phase propice à la préparation d'expériences de nanogouttes de 65-100 nL, en tenant compte de la réduction de la fréquence de nucléation en milieu confiné. Au final, elle obtient l'ensemble des phases cristallines déjà connues de l'enzyme avec une bonne reproductibilité et définit des conditions expérimentales favorisant la croissance d'un cristal unique par goutte. Ce travail démontre la faisabilité et tout le potentiel de ce type de stratégie expérimentale en cristallogénèse, et son avantage dans l'acquisition rapide de données quantitatives pour une analyse statistique du phénomène de cristallisation.

Dans son ensemble, le manuscrit est clair et bien illustré. Je soulignerais que Mlle Zhang a su rendre accessible des notions d'hydrodynamique, indispensables à l'exposé de son travail expérimental, au non spécialiste que je suis. Il subsiste néanmoins un certain nombre de points à préciser qui pourront être discutés lors de la soutenance orale. Il est important de noter que les travaux présentés dans ce manuscrit ont déjà fait l'objet de deux publications que Mlle Zhang signe en première auteure dans des revues à comité de lecture, l'une dans *Organic Process Research & Development* parue en avril 2015, l'autre sous presse dans *Chemical Engineering Science*. Les articles sont accompagnés de résultats complémentaires sur l'analyse *in situ* de la composition des gouttes qui conduiront probablement à une publication supplémentaire.

Au vu de la formation pluridisciplinaire dont a bénéficié Mlle Zhang, alliant instrumentation, simulation numérique et expérimentation appliquées à la thématique de cristallogénèse chimique et biologique, et des résultats qu'elle a obtenus, je me prononce en faveur d'une présentation orale prochaine de ses travaux de thèse en vue de l'obtention du titre de *Docteur de l'Université Aix-Marseille*.



Claude Sauter



Rapport de thèse Mme SHUHENG ZHANG par le Professeur T. Leyssens.

En tant que Professeur en Ingénierie du Cristal et Cristallisation, j'ai les compétences requises pour juger les travaux de Mme Shuheng Zhang. Je confirme par le biais de ce rapport et pour les raisons mentionnées ci-dessous la recevabilité du document, et je soutiens pleinement la candidature de Mme Shuheng Zhang pour l'obtention du diplôme 'Doctorat en Matière Condensée et Nanosciences'.

Contexte :

Le but du travail de recherche effectué par Mme Zhang était de créer un montage microfluidique universel, compatible avec tout solvant et toute molécule. L'idée principale d'un montage microfluidique est de créer un grand ensemble de gouttes de volume nanométrique. Ces gouttes peuvent être assimilées à des microréacteurs isolés. Par le biais d'un appareil microfluidique, un nombre impressionnant de 'réacteurs' peut être créé en un laps de temps réduit. Pour les phénomènes stochastiques, tels que la cristallisation, il est important d'avoir un très grand nombre de données afin de tirer des conclusions scientifiques valables. Bien que dans le contexte de la cristallisation des systèmes microfluidiques sont déjà en cours d'utilisation, ceux-ci se limitent en général aux solutions aqueuses pour des raisons techniques.

Dans le cadre de ce travail, Mme Zhang a développé un montage microfluidique universel, compatible à tout solvant et toute molécule. Elle discute non seulement le montage de ce type d'outil, mais étudie en premier lieu l'hydrodynamique de ces systèmes dans le but d'obtenir des gouttes reproductibles, et d'étudier la robustesse de son montage. Dans la suite, Mme Zhang a porté le microfluidique au-delà de ce qui se fait couramment dans la littérature, en caractérisant les gouttes de manière chimique. Elle a incorporé une technique analytique dans le système (UV-Vis) afin de caractériser les gouttes en continu. Ceci lui a permis de caractériser la composition des gouttes, leur forme, ainsi que la fréquence de production des gouttes.

Finalement, elle a montré l'utilité de son travail en l'appliquant à la cristallisation de divers enzymes (Lysozyme et Rasburicase).

Le travail de Mme Zhang mènera à des nouvelles techniques de cristallisation d'intérêt quand une quantité limitée de matière seulement est disponible, ce qui est régulièrement le cas dans la recherche



pharmaceutique/biologique. En outre, la caractérisation des gouttes permettra d'avoir une vision plus claire sur les phénomènes qui contrôlent la nucléation et la croissance cristalline.

Qualité du document écrit:

Le document est très bien construit. L'introduction explique clairement le but du travail et l'approche suivie par le chercheur. Le chercheur commence en expliquant la cristallisation et le microfluidique, pour ensuite définir l'intérêt de son travail, et finaliser avec ses résultats. La candidate présente les résultats de manière structurée et le lecteur ne se sent perdu à aucun moment dans le manuscrit.

Le document est écrit en Français de manière très compréhensible. Les figures et tableaux apparaissent clairement et sont fournis d'une annotation appropriée. Les références sont adéquates. A mon avis, le document est recevable tel qu'il est présenté actuellement. Le seul point négatif est l'ampleur du document qui peut paraître excessive, avec une introduction de la cristallisation, le microfluidique et l'hydrodynamique impressionnante. Néanmoins, il est évident qu'une réduction de taille des premiers chapitres, nuira à la qualité pédagogique du document, et n'est donc pas conseillée.

Quantité de travail:

Le montage technique d'un nouvel outil ainsi que l'incorporation d'une technique d'analyse dans une technologie n'est jamais un travail aisé. La candidate réussit néanmoins à faire clairement apparaître la quantité de travail impressionnante sous-jacente à sa recherche. Elle a non seulement monté un nouvel outil micro-fluidique, mais a également adapté les paramètres d'écoulement afin d'obtenir des gouttes de manière robuste et reproductible. Une fois ce travail effectué, la candidate a étudié l'hydrodynamique de son système, pour ensuite introduire des méthodes de caractérisation des gouttes en ligne, ce qui constitue de nouveau un travail impressionnant.

J'estime que la quantité de travail dépasse la moyenne que l'on peut attendre dans le cadre d'une thèse.

Qualité des données :

Les données sont bien présentées, et illustrées par des images. Les données sont de bonnes qualités, et la candidate a introduit des répétitions de ses expériences afin de vérifier l'exactitude et la précision de ses données.

**Approche scientifique et interprétation des résultats :**

Comme mentionné plus haut, l'approche scientifique est excellente. Après installation de l'outil micro-fluidique, la candidate s'intéresse premièrement à l'hydrodynamique du système afin d'obtenir des gouttes reproductibles. Une fois un système robuste obtenu, elle s'intéresse à la composition des gouttes et la variation de cette composition au cours du temps.

Attitude scientifique et perspectives :

Lors de l'installation d'une technique d'analyse, il est important de vérifier scrupuleusement que toutes les conditions sous-jacentes pour le bon fonctionnement de la technique sont satisfaites. En agissant d'une telle manière, la candidate met en confiance le lecteur par rapport à la qualité et validité de son travail. Elle n'hésite pas à mettre en évidence les limitations de la méthode développée, et indique également les précautions à prendre par rapport aux données obtenues lors de l'étude des cristallisations d'enzymes. Le lecteur a donc une idée claire des avantages et des limitations de la technique développée.

Les perspectives du travail sont clairement indiquées à la fin du document.

Divulgateion Scientifique :

La candidate a publié deux articles dans des revues de haut niveau, et a repris ces articles à la fin des chapitres les concernant.

Conclusion du rapport :

Pour les raisons mentionnées ci-dessus, je confirme que je suis impressionné par le travail de recherche effectué par Mme S. Zhang, et je suis d'opinion qu'elle mérite amplement le titre de Docteur en Matière Condensée et Nanosciences.

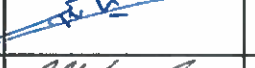
Louvain-la-Neuve, 14 Septembre 2015

Prof. Tom Leyssens
Université Catholique de Louvain
Institut IMCN / MOST
Place L. Pasteur 1, Bte L4.01.03
B-1348 Louvain-la-Neuve
Tél. +32 10 47 28 11
Fax +32 10 47 27 07

PROCES VERBAL DE SOUTENANCE DU 16/10/2015
ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015

Etudiant : Mme SHUHENG ZHANG née le : 14/09/1987
Diplôme : Doctorat Matière Condensée et Nanosciences

Membres du Jury

Nom	Qualité	Etablissement	Rôle	Signature	Président* (à cocher)
M. TOM LEYSSENS	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	UNIVERSITE CATHOLIQUE LOUVAIN (Belgique)	Rapporteur		☐
M. CLAUDE SAUTER	DIRECTEUR DE RECHERCHE	UNIVERSITE STRASBOURG	Rapporteur		☐
Mme NADINE CANDONI	MAITRE DE CONFERENCES	UNIVERSITE D'AIX- MARSEILLE	Membre		☐
Mme FABIENNE ESPITALIER	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	ECOLE DES MINES D'ALES	Membre		☐
M. MICHEAL LYNCH	INGENIEUR	Technologie Servier	Membre		☐
M. DENIS MANGIN	PROFESSEUR DES UNIVERSITES	UNIVERSITE LYON 1	Membre		☒
M. STEPHANE VEESLER	DIRECTEUR DE RECHERCHE	UNIVERSITE D'AIX- MARSEILLE	Dir. thèse		☐

* cf Arrêté ministériel du 7 août 2006 (article 19) : Les membres du jury désignent parmi eux un Président, Le Président doit être de rang A (professeur, directeur de recherche, PU-PH). Le Directeur de thèse, s'il participe au jury, ne peut être choisi comme Président du jury

Rapport de soutenance (p1/ 2)

(Arrêté ministériel du 7 août 2006 (article 20) : Le Président signe le rapport de soutenance qui est contresigné par l'ensemble des membres du jury.)

PROCES VERBAL DE SOUTENANCE DU 16/10/2015 A 14h00
ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015

Etudiant : Mme SHUHENG ZHANG née le : 14/09/1987
Diplôme : Doctorat Matière Condensée et Nanosciences
Titre des travaux : APPROCHE MICROFLUIDIQUE POLYVALENTE DE LA CRISTALLISATION
Ecole doctorale : Physique et sciences de la matière (352)
Directeur : M. STEPHANE VEESLER
Codirecteur : Mme NADINE CANDONI
Lieu de soutenance : CAMPUS DE LUMINY - CINAM
La soutenance est publique.

Résultat : ☒ ADMIS
☐ AJOURNE

Mention : ☐ HONORABLE
☐ TRES HONORABLE
☒ TRES HONORABLE avec les félicitations du jury**

** Arrêté ministériel du 7 août 2006 - article 20 : La plus haute mention, qui est réservée à des candidats aux qualités exceptionnelles démontrées par les travaux et la soutenance, ne peut être décernée qu'après un vote à bulletin secret et unanime des membres du jury. Dans ce cas, le Président du jury établit un rapport complémentaire (formulaire joint) justifiant cette distinction.

Avis de reproduction : ☒ OUI ☐ NON

PROCES VERBAL DE SOUTENANCE DU 16/10/2015 A 14h00
ANNEE UNIVERSITAIRE 2014/2015

Etudiant : Mme SHUHENG ZHANG
Diplôme : Doctorat Matière Condensée et Nanosciences

Née le : 14/09/1987

Rapport de soutenance (p 2 / 2)

Mme Shuheng Zhang a soutenu ses travaux de thèse de Doctorat, « Approche microfluidique polyvalente de la cristallisation », devant un jury pluridisciplinaire. Sa présentation a mis en évidence des qualités orales indéniables s'appuyant sur une aisance linguistique tout à fait exceptionnelle et un dynamisme remarquable. Les supports étaient d'une grande qualité graphique et témoignaient à la fois de la maturité de Mme Zhang, et de son aptitude à communiquer ses résultats sous une forme synthétique et pédagogique.

Son exposé a été représentatif de la rigueur avec laquelle Mme Zhang a mis au point son dispositif microfluidique à base de gouttes, puis l'a validé d'un point de vue hydrodynamique et d'un point de vue caractérisations chimique et physique des gouttes. Le jury a souligné que cette étape, indispensable pour l'application, était rarement aussi aboutie que dans le travail de Mme Zhang. La présentation s'est conclue par la description de l'application du système microfluidique à la cristallisation d'une molécule d'intérêt pharmaceutique. Au cours de la discussion, Mme Zhang a su répondre avec beaucoup de maîtrise à un grand nombre de questions portant sur les différents aspects du travail. Le jury a également souhaité souligner la quantité impressionnante de résultats obtenus au cours de la thèse. Ceci a permis de mettre en évidence que le succès de la thèse tenait également aux qualités de ténacité de Mme Zhang. Le jury a aussi pu noter l'autonomie de la candidate dans son travail de recherche.

Pour toutes ces raisons, le jury a décidé de lui décerner à l'unanimité le grade universitaire de docteur en Matière Condensée et Nanosciences de l'Ecole Doctorale de Physique et Sciences de la Matière d'Aix-Marseille Université, avec la mention : Très honorable avec félicitations du jury.

RAPPORT COMPLEMENTAIRE JUSTIFIANT LA DELIVRANCE DES FELICITATIONS DU JURY

Arrêté ministériel du 7 août 2006 - article 20

"La plus haute mention, qui est réservée à des candidats aux qualités exceptionnelles démontrées par les travaux et la soutenance, ne peut être décernée qu'après un vote à bulletin secret et unanime des membres du jury. Dans ce cas, le président du jury établit un rapport complémentaire justifiant cette distinction."

Après délibération, les membres du jury ont décidé à l'unanimité de délivrer la mention très honorable avec les félicitations du jury à M me Shuheng ZHANG, à l'issue de sa soutenance de thèse le 16/10/2015.

RAPPORT COMPLEMENTAIRE
(à joindre au Procès-Verbal de soutenance)

Mme Shuheng Zhang a réalisé devant notre jury une excellente présentation qui était très didactiques et complémentaire de son manuscrit. Le jury a tenu à souligner que la rédaction très bien structurée du manuscrit et la présentation orale très claire étaient en français. La thèse de Mme Zhang correspond à un travail pluridisciplinaire aboutissant à une quantité impressionnante de résultats. Mme Shuheng Zhang a également répondu avec beaucoup de maîtrise aux différents membres du jury sur des questions relevant de leurs spécialités : Biologie moléculaire, Génie des procédés, Thermodynamique, Cristallogénèse et Applications industrielles. Après discussions sur la qualité indéniable du travail et de la soutenance de Mme Zhang, le jury a voté et décidé unanimement de lui décerner la « Mention très honorable avec les Félicitations du jury ».

Fait à Marseille, le 16/10/15

Le président du Jury (signature précédée du NOM et Prénom)

MANGIN Denis

Mangin