



**HAL**  
open science

# NUCLÉATION EN PRÉSENCE DE CHAMPS EXTERNÉS: Application aux principes actifs pharmaceutiques

E. Revalor

► **To cite this version:**

E. Revalor. NUCLÉATION EN PRÉSENCE DE CHAMPS EXTERNÉS: Application aux principes actifs pharmaceutiques. Physique [physics]. Université Paul Cézanne - Aix-Marseille III, 2009. Français. NNT: 2009AIX30012 . tel-00609288

**HAL Id: tel-00609288**

**<https://theses.hal.science/tel-00609288>**

Submitted on 18 Jul 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PAUL CEZANNE AIX-MARSEILLE III

N° 2009AIX30012

**THESE**

pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR en Physico-Chimie Génie des Procédés  
DE L'UNIVERSITE Paul CEZANNE  
Faculté des Sciences et Techniques**

Ecole doctorale Sciences de l'Environnement

**Nucléation en présence de champs externes :**

**Application aux principes actifs pharmaceutiques**

par **Eve REVALOR**

présentée et soutenue le 9 Juillet 2009 devant la commission :

M. Benoît HAUT (rapporteur)  
M. Frédéric GRUY (rapporteur)  
M. Eric GARCIA (codirecteur)  
M. Jean-Paul KLEIN  
M. Philippe MOULIN  
M. Stéphane VEESLER (directeur de thèse)

## Remerciements

Cette thèse a été effectuée au CINaM, centre interdisciplinaire de nanosciences de Marseille. Je remercie le professeur Claude Henry, le directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie pendant trois ans au sein de ce cadre idyllique, ainsi que Roger Morin, directeur du département Sources et Sondes Ponctuelles, au sein duquel j'ai travaillé. Je remercie aussi la société Sanofi-Aventis, pour le soutien financier, sans lequel ce travail n'aurait pas été possible.

Je remercie aussi le professeur Benoit Haut, directeur du laboratoire de Laboratoire Transferts, Interfaces et Procédés (TIPs) de l'université libre de Bruxelles, et le professeur Frédéric Gruy, maître de recherche des écoles des Mines au Laboratoire des Procédés en Milieu Granulaire (LPMG) à Saint Etienne, de me faire l'honneur d'examiner mon travail en tant que rapporteurs.

Je tiens aussi à remercier le professeur Jean-Paul Klein, du Laboratoire d'Automatisme et Génie des Procédés (LAGEP) à Lyon, le professeur Philippe Moulin, professeur responsable de l'Equipe Procédés Membranaires (EPM) au laboratoire de Mécanique, Modélisation et Procédés Propres (M2P2) à Aix en Provence et enfin M. Eric Garcia, responsable du laboratoire de cristallisation, génie des procédés, à l'usine Sanofi-Aventis d'Aramon (30) pour avoir accepté de faire partie des membres du jury d'examen de ce travail.

Mes sentiments les plus sincères vont à mon directeur de thèse, Stéphane Veessler, chargé de recherche au CNRS, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Ses qualités humaines m'ont permis d'avancer même dans les jours difficiles. Je le remercie d'avoir mis à ma disposition ses compétences scientifiques ainsi que son expérience qui m'ont guidée tout au long de ce travail. Grâce à lui j'ai pu découvrir des pays comme le Japon, les Pays Bas ou encore l'Angleterre. Ne ménageant pas son temps, il a toujours été disponible pour répondre à mes questions.

Je remercie également Jean-Pierre Astier, ingénieur de recherche au CINaM pour tous ses précieux conseils dont il n'est jamais avare, mais aussi pour sa bonne humeur et pour son sourire ! Ainsi que Nathalie Ferté pour tout son savoir-faire sur les protéines, et pour son rire qui illuminait tous les jours le laboratoire. Zoubida Hammadi pour la fabrication des pointes pour les électrodes du champ électrique. Enfin, je remercie Romain Grossier pour les nombreuses conversations sur la théorie de la nucléation.

Je remercie également Vasile Heresanu pour les clichés de diffraction des rayons X, Frédéric Bedu et Igor Ozérov pour la fabrication des moules pour le système microfluidique. Thirounavou Bactivelane ainsi que Michel Audiffren de la société Anacrismat, pour tout l'équipement électronique de prise de vue mais aussi de systèmes thermorégulés et enfin Francis Quintric pour les photos des différents montages expérimentaux.

Je remercie également tout le personnel de l'atelier du CINaM (Gilles Artaud et Brice Dailleur) pour l'usinage de pièces uniques. Ainsi que Serge Nitsche et Damien Chaudanson pour l'imagerie de microscopie électronique à balayage.

Je remercie particulièrement Jean-Baptiste Salmon du Laboratoire du Futur à Bordeaux, pour son accueil pendant trois semaines, et pour avoir mis à ma disposition les moyens de mettre en place le système microfluidique.

Je tiens à exprimer mes sentiments les plus sincères envers le professeur Tetsuo Okutsu et le docteur Kenji Furuta pour m'avoir permis de découvrir le Japon et pour les

expériences sous irradiation lumineuse. Je n'oublierai jamais ce séjour incroyable ainsi que votre dévouement et votre gentillesse.

Je remercie également Christian Hoff, ingénieur Sanofi-Aventis, pour avoir suivi ce travail dans ses débuts. Je remercie également Anne Peyron et Fabien Mazon, techniciens au laboratoire de cristallisation de l'usine Sanofi-Aventis d'Aramon, pour m'avoir aidée sur l'HPLC du sucre S. Je remercie également Laurent Lafferrère et Sylvaine Lafont pour avoir suivi de près et de loin mon travail au cours de ces trois années.

Je remercie tout particulièrement Eric Garcia, responsable du laboratoire cristallisation, génie des procédés de l'usine Sanofi-Aventis d'Aramon, pour avoir pris le temps de suivre mon travail, de m'accueillir à l'usine et pour sa patience à trouver des molécules qui correspondent aux critères imposés par cette étude.

Je remercie également Jean-Paul Klein, Denis Mangin, François Puel, Emilie Gagnière (la prochaine c'est toi) du LAGEP à Lyon et Olivier Monnier de Sanofi-Aventis à Montpellier, pour leur collaboration et leur intérêt pour mon travail au cours des réunions industrielles.

Je remercie également Manon Cirotteau, stagiaire IUT pour sa bonne humeur et son dévouement dans les expériences qui m'ont permis d'avancer plus rapidement. Je remercie aussi Arnaud Tollari et Samir Drhourhi, stagiaire IUT pour les manipulations en présence d'ultrasons.

De façon plus générale, je remercie tout le personnel permanent et non-permanent du CINaM pour cette ambiance sympathique et conviviale qui a rendu cette thèse très agréable au cours de ces trois années.

Julie et Marion, rien ne saurait remplacer le soutien moral et les pauses bonbons que vous m'avez procurés pendant ces longues heures passées dans 'le bureau des filles'.

Enfin, j'ai une attention toute particulière pour mes parents qui m'ont donnée les moyens matériels et le désir de faire de si nombreuses années d'étude. Ainsi que pour Patrice parce qu'il est lui et parce qu'il m'a donné envie d'être moi.

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>1</b>
<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>4</b>
<b>SOMMAIRE DES FIGURES .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
<b>A. CONDITIONS CLASSIQUES .....</b>	<b>18</b>
I. LES NOTIONS RELIEES A LA CRISTALLISATION .....	20
1. Généralités.....	20
a. La solubilité .....	20
b. La sursaturation.....	23
c. La séparation de phases liquide-liquide ou démixtion.....	25
d. Le polymorphisme.....	26
2. Les différentes théories de la nucléation.....	29
i. La théorie classique de nucléation.....	30
a. Nucléation primaire homogène.....	30
b. Nucléation primaire hétérogène .....	36
c. La nucléation secondaire.....	38
d. Domaines de prédominance de chaque mécanisme .....	40
e. Les différents paramètres 'classiques' influençant la nucléation .....	41
ii. La théorie de nucléation en deux étapes .....	44
II. MATERIELS ET METHODES .....	46
1. Matériel.....	46
a. Les molécules étudiées .....	46
b. Les méthodes de caractérisation.....	51
c. Les montages expérimentaux .....	53
2. Méthodes.....	60
a. Détermination de la limite de zone métastable .....	60
b. Détermination de la fréquence de nucléation dans les conditions normales .....	61
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
1. Solubilités.....	64
a. Les molécules modèles.....	64
b. Les molécules Sanofi-Aventis.....	66
2. La limite de zone métastable .....	69
3. Mesure de la fréquence de nucléation.....	70
a. Le BPTI.....	70
b. Le Lysozyme .....	72
c. Confrontation théorie/expérimentation.....	77
<b>B. CHAMPS EXTERNES .....</b>	<b>78</b>

I.	APPLICATION D'UN CHAMP EXTERNE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	80
1.	<i>Nucléation au sein d'un champ électrique</i> .....	81
a.	<i>Application d'un champ externe</i> .....	81
b.	<i>Application d'un champ interne</i> .....	82
c.	<i>Et la théorie ?</i> .....	83
2.	<i>Nucléation au sein d'un champ magnétique</i> .....	85
3.	<i>Nucléation en présence d'ultrasons</i> .....	86
a.	<i>Effets sur la nucléation primaire</i> .....	86
b.	<i>Effets sur la nucléation secondaire</i> .....	88
4.	<i>Nucléation à l'aide de rayons lumineux</i> .....	89
a.	<i>Le phénomène non-photochimique</i> .....	89
b.	<i>Le phénomène photochimique</i> .....	89
II.	MATERIEL ET METHODES .....	92
1.	<i>Matériel</i> .....	92
a.	<i>Les molécules étudiées</i> .....	92
b.	<i>Les montages expérimentaux</i> .....	92
2.	<i>Méthodes</i> .....	97
a.	<i>Le champ électrique</i> .....	97
b.	<i>L'irradiation lumineuse</i> .....	97
c.	<i>L'irradiation par ultrasons</i> .....	98
III.	RESULTATS ET DISCUSSION .....	100
1.	<i>Le champ électrique interne</i> .....	100
a.	<i>Le BPTI</i> .....	100
b.	<i>Le Lysozyme</i> .....	103
c.	<i>La Glycine</i> .....	104
2.	<i>L'irradiation lumineuse</i> .....	106
3.	<i>Les ultrasons</i> .....	109
a.	<i>La Glycine</i> .....	109
b.	<i>Le SR 142 801</i> .....	112
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>116</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>120</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>126</b>
	ANNEXE 1 : PREPARATION D'UN TAMPON ACETATE .....	126
	ANNEXE 2 : CALCUL DE NOMBRE DE REYNOLDS ET DES PERTES DE CHARGES POUR LE MONTAGE MICROFLUIDIQUE. ....	127
	<i>Le nombre de Reynolds</i> .....	127
	<i>La perte de charges</i> .....	127
	ANNEXE 3 : FABRICATION D'UN MOULE POUR PUCE MICROFLUIDIQUE EN PDMS .....	129
	ANNEXE 4 : PROCEDURE DE DECAPAGE DES TUBES 20 $\mu$ L DU MULTI-PUITS .....	130
	ANNEXE 5 : TEST D'ACTIVITE DU BPTI .....	131

## Sommaire des figures

Figure 1 : Diagramme de solubilité directe (a) et indirecte (b).....	21
Figure 2 : Diagramme de phases .....	24
Figure 3 : Diagramme de phases de démixtion et photo d'une démixtion, d'après Veessler et al. <sup>[11]</sup> .....	25
Figure 4 : Diagramme de phases, Température-Concentration, où la lacune de miscibilité est (a) au-dessous de la courbe de solubilité ; ou au-dessus (b), formant deux points triples (1 et 2) avec celle-ci. ....	26
Figure 5 : Solubilité de deux polymorphes en fonction du pH .....	27
Figure 6 : Courbes de solubilité de deux polymorphes I et II : Cas d'un système monotropique (a) et énantiotropique (b).....	28
Figure 7 : Représentation de $\ln(C_s)$ en fonction de $1/T$ pour un système (a) monotropique et (b) énantiotropique .....	29
Figure 8 : Energie libre d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du germe (r) d'après Boistelle <sup>[1]</sup> .....	31
Figure 9 : Fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation d'après Boistelle <sup>[1]</sup> .....	35
Figure 10 : Courbe de solubilité directe et zone métastable pour la nucléation primaire homogène. ....	35
Figure 11 : Différentes sphères tronquées en fonction de l'angle de contact ( $\alpha$ ) avec le support d'après Boistelle <sup>[1]</sup> .....	37
Figure 12 : Diagramme représentant les zones de nucléations différentes .....	40
Figure 13 : Exemple de courbe de solubilité directe .....	42
Figure 14 : Présentation des principes des deux théories de nucléation, en rouge la théorie classique de nucléation pour tout changement de phases (condensation, cristallisation,...) en une unique étape et en vert la théorie de Kashchiev en deux étapes.....	44
Figure 15 : (a) et (b) Représentations de la molécule de BPTI. (c) cristaux bipyramidaux, phase hexagonale. (d) cristaux en forme de plaquettes, phase monoclinique.....	47
Figure 16 : Représentation de la molécule de Lysozyme de blanc d'œuf et cristal.....	48
Figure 17 : Formule de la glycine. ....	48
Figure 18 : Formule développée du SR 142 801.....	50
Figure 19 : Equilibre tautomérique de l'Irbésartan établi en solution.....	50
Figure 20 : Formule développée du sucre S, la position du groupement OH détermine l'anomère.....	51
Figure 21 : Diffractogramme de poudre de la glycine sous la forme $\alpha$ . ....	52
Figure 22 : Photo de cristaux de SR 142 801 prise aux MEB.....	53
Figure 23 : Montage pour la mesure de solubilité en milieu agité. ....	54

Figure 24 : (a) Montage multi-puits, (b) Platine motorisée en X et Y, (c) Cellules de 100 $\mu$ L, (d) Blocs de 48 cellules chacun, (e) cellules de 1mL, (f) cellules de 150 $\mu$ L. ....	56
Figure 25 : Photo d'un Microbatch <sup>®</sup> .....	57
Figure 26 : Montage microfluidique : (a) vue d'ensemble avec l'ordinateur qui contrôle la température et permet l'acquisition séquentielle d'images, (b) la puce posée sur le module Peltier qui régule la température, (c) vue rapprochée de la puce en PDMS sur un support en verre, (d) puce en PDMS remplie avec des gouttes d'encre. ....	58
Figure 27 : (a) Moule pour puce microfluidique, (b) remplissage du moule par le mélange PDMS-réticulant encore liquide, (c) découpage de la puce et démoulage, (d) perforation des entrées et sortie de la puce en PDMS, (e) collage de la puce sur le support (wafer silicium). ....	59
Figure 28 : Schéma d'utilisation de la puce microfluidique en PDMS .....	60
Figure 29 : Principe de la méthode de double pulsion thermique : (a) concentration en fonction de la température, (b) température en fonction du temps. ....	62
Figure 30 : Courbes de solubilité mesurées pour (a) le BPTI (pH = 4,5, 1,6M de NaCl) et (b) le Lysozyme (pH = 4,5) les différentes courbes correspondent aux différentes concentrations en NaCl. (c) Suivi de la solubilité au cours du temps pour une solution de BPTI à pH = 4,5, NaCl à 1,6M et T = 30°C. ....	65
Figure 31 : Courbe de solubilité des polymorphes $\alpha$ et $\gamma$ de la glycine dans l'eau, issue de la littérature <sup>[52]</sup> , les points rouges, par-dessus les triangles, représentent les valeurs que nous avons trouvées expérimentalement. ....	66
Figure 32 : Courbe de solubilité concentration-température du sucre S, les points bleus et rouges représentent deux séries de mesures effectuées par deux personnes différentes.....	67
Figure 33 : Chromatogramme du sucre S en solution dans l'eau, (a) immédiatement après solution, (b) après une heure. ....	68
Figure 34 : Courbes de solubilité de l'Irbésartan dans l'isopropanol <sup>[56]</sup> (a) et du SR 142 801 dans un mélange (60/40) <sub>v</sub> d'éthanol/eau <sup>[8]</sup> (b). ....	69
Figure 35 : Distribution du nombre de cristaux par tube pour une solution de BPTI à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, [NaCl] = 1,6M, pH=4,5, T <sub>N</sub> = 30°C, T <sub>C</sub> = 20°C et $\Delta t$ = 3h. ....	70
Figure 36 : Goutte d'une solution de BPTI au sein d'une puce microfluidique, on voit bien que l'interface entre la solution aqueuse de BPTI et l'huile silicone forme à présent un ménisque plat. Le canal a une largeur de 500 $\mu$ m.....	71
Figure 37 : Photos de cristaux de Lysozyme dans le canal microfluidique. 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM à pH = 4,5 et 0,7M de NaCl. T <sub>N</sub> = 20°C, T <sub>C</sub> = 25°C, $\Delta t$ = 2h. Les deux dernières photos ont été prises avec un polariseur analyseur. La largeur des canaux représente 500 $\mu$ m. ....	72
Figure 38 : Distribution du nombre de cristaux de Lysozyme par goutte en fonction de la fréquence normalisée. Solution de Lysozyme à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, pH = 4,5 et 0,7M de NaCl. T <sub>N</sub> = 20°C, T <sub>C</sub> = 25°C, $\Delta t$ = 2h.....	73
Figure 39 : Nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps de nucléation $\Delta t$ .....	74

Figure 40 : Représentation de la fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation pour les expériences menées sur le Lysozyme à pH = 4,5, 0,7M de NaCl, $T_N = 20^\circ\text{C}$ et $T_C = 25^\circ\text{C}$ . .....	75
Figure 41 : Vitesse de croissance de la face [110] en fonction de la concentration, pour un pH = 4,0 et 0,85M de NaCl à une température de $22^\circ\text{C}$ d'après Nadarajah et al. <sup>[58]</sup> Schéma d'indexation des faces d'un cristal de Lysozyme.....	76
Figure 42 : Schéma de l'expérience menée par Taleb et al. <sup>[64]</sup> .....	81
Figure 43 : Cristaux de BPTI dans un champ magnétique de 1,25 T d'après Astier et al. <sup>[82]</sup> ..	85
Figure 44 : Cristallisation de l'acide acétique, par irradiation aux ultrasons.....	87
Figure 45 : Montage expérimental (a), solution sans irradiation (b) et solution irradiée (c). ..	89
Figure 46 : Mécanisme de l'irradiation du Lysozyme par une lampe au Xe. ....	90
Figure 47 : (a) Photo de la cellule en quartz vue de côté ; (b) vue d'ensemble du montage champ électrique avec le microscope à optique inversée, l'ordinateur permettant l'acquisition séquentielle d'images, ainsi que la platine de régulation de la température par effet Peltier ; (c) vue rapprochée de la cellule en quartz insérée dans la platine avec les deux électrodes qui plongent dans la solution ; (d) vue au MEB de l'extrémité pointue d'une des deux électrodes ; (e) vue rapprochée du micromanipulateur ; (f) schéma de la cellule. ....	94
Figure 48 : Montage d'irradiation lumineuse : (a) vue d'ensemble avec a la lampe au Xénon b la lentille convergente et c le miroir incliné à $45^\circ$ pour avoir une incidence verticale sur les échantillons ; (b) cheminement des rayons lumineux depuis la source jusqu'aux solutions à irradier. ....	95
Figure 49 : (a) Sonicateur Bioblock Vibra Cell 75041 de 500W prêté par l'usine Sanofi-Aventis d'Aramon ; (b) Suprasson Piezo Endo de Satelec de 10W équipé d'un embout spécialement usiné au laboratoire que l'on voit de plus près en (c).....	96
Figure 50 : Schéma du Microbatch <sup>®</sup> contenant les solutions de BPTI à différentes concentrations et pour différents temps d'irradiation. ....	98
Figure 51 : Photo d'une solution de BPTI à 20mg/mL dans un tampon acétate de 80mM, pH = 4,5 et 1,6M de NaCl. Application d'une tension directe de 0,785V. Le fil de tungstène a une largeur de 125 $\mu\text{m}$ . ....	100
Figure 52 : Solutions de BPTI nucléées en présence d'un champ électrique de quelques centaines de microAmpères. On voit l'apparition d'une phase amorphe qui enrobe l'anode. (b) est un zoom de (a) avec une inversion de la polarité. Le fil de tungstène composant l'anode fait 125 $\mu\text{m}$ de largeur. ....	101
Figure 53 : Effet de champ sur la croissance des cristaux de BPTI dans une solution à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, pH = 4,5 et 1,6M de NaCl. Application d'une tension directe de 0,785V. Le fil de tungstène composant l'anode mesure 125 $\mu\text{m}$ de large. Diagramme qualitatif des vitesses de croissance en fonction de la position des cristaux dans le milieu.....	102
Figure 54 : Identification des deux phases de la démixtion qui a lieu autour de l'électrode. La flèche bleu dans le diagramme représente le gradient de concentration. ....	103
Figure 55 : Cristallisation et démixtion de phases liquide-liquide dans une solution de Lysozyme à 25 mg/mL, pH=4,5 et 0,7M de NaCl. Pour un courant de 0,9V. Le fil de tungstène composant l'électrode a une largeur de 125 $\mu\text{m}$ . ....	104

Figure 56 : Solution de glycine à 315mg/mL dans l'eau. U = 0,95V. Le fil de tungstène composant l'électrode fait 125µm de large. ....	105
Figure 57 : Spectre d'absorption transitoire (a) du BPTI et (b) du Tryptophane. ....	107
Figure 58 : Spectre d'absorption transitoire de l'Irbésartan. ....	108
Figure 59 : Nucléation de solutions métastables de même concentration en glycine (a) sans irradiation et (b) avec irradiation au préalable par ultrasons. La hauteur de la photo représente 1,5mm. ....	109
Figure 60 : Diffractogrammes de poudre de la glycine nucléée en présence d'ultrasons (a) présente de la forme $\alpha$ pure, (b) présente de la forme $\alpha$ et de la forme $\gamma$ . Le zoom à gauche des photos montre un grossissement des diffractogrammes sur les pics caractéristiques. ....	111
Figure 61 : La relation entre la sursaturation et la fréquence de nucléation pour une solution irradiée pendant 1min et pour une solution témoin, non-irradiée. ....	112
Figure 62 : 3 solutions de SR 142 801 à $\beta = 3,6$ , la première sans irradiation, la deuxième irradiée pendant 1min et la troisième irradiée pendant 10min. ....	113
Figure 63 : Représentation graphique de la dépendance de la fréquence de nucléation en fonction du temps d'irradiation d'une solution de SR 142 801 à $\beta = 3,6$ . ....	114
Figure 64 : Schéma d'une cellule de Hele-Shaw .....	127
Figure 65 : Activité du BPTI en fonction du temps d'irradiation des solutions .....	131

## Liste des abréviations

### Par ordre d'apparition

$C_2$	Concentration en soluté
T	Température absolue (K)
P	Pression
$S_C$	Entropie du cristal
$S_2-S_C$	Entropie de dissolution, normalement positive
$\alpha_2^{\text{sat}}$	Activité du soluté à saturation (solubilité) par rapport à son état standard
$\alpha_2^{\text{solide}}$	Activité du soluté solide pur en équilibre dans une solution saturée
$\gamma_2^{\text{sat}}$	Coefficient d'activité du soluté
R	Constante des gaz ( $8,3143 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ )
$\Delta H_2$	Enthalpie molaire partielle du soluté en solution
$\Delta H_2^*$	Enthalpie molaire partielle apparente de la solution
C	Concentration de la solution
$C_S$	Concentration à saturation, solubilité
k	Constante de Boltzmann ( $1,38.10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ).
X	Fraction molaire du composé
$\Delta H_d$	Enthalpie de dissolution
$\Delta S_d$	Entropie de dissolution
$\beta$	Sursaturation
$\Delta\mu$	Force motrice de cristallisation (différence de potentiels chimiques du cristal et de la solution)
$\mu_2$	Potentiel chimique de la phase mère sursaturée
$\mu_S$	Potentiel chimique de la phase mère saturée
$S_{hkl}$	Aires des faces h, k, l (plans réticulaires) du cristal
$\gamma_{hkl}$	Energies interfaciales, ou énergies libres de surface, des faces h, k, l du cristal
$\Delta G$	Energie libre d'activation de germination
n	Nombre de molécules constituant le germe
S	Aire du germe supposé sphérique
$\gamma$ ou $\gamma_{\Delta X}$	Energie interfaciale cristal-solution
r	Rayon du germe supposé sphérique
$\Omega$	Volume d'une molécule dans le germe
$r^*$	Rayon critique du germe (correspond à $\Delta G^*$ )
$\Delta G^*$	Energie libre critique d'activation de germination (maximum)
J	Fréquence de nucléation
$D_{AB}$	Coefficient de diffusion
$C_{\text{vol}}$	Concentration en monomères dans le volume

$v$	Fréquence d'attachement de monomères
$N_A$	Nombre d'Avagadro ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ )
$C_i^S$	Concentration de la phase $i$ dans le solide, en $\text{mol/m}^3$ ( $=\rho_s/M_s$ )
$C_i^L$	Concentration de la phase $i$ à l'équilibre, solubilité en $\text{mol/m}^3$
$\rho_s$	Masse volumique du soluté solide
$M_S$	Masse molaire du soluté
$\alpha$	Angle de contact du germe avec une surface dans le cas d'une nucléation hétérogène
hom	Notion liée à la nucléation homogène
hét	Notion liée à la nucléation hétérogène
att	Notion liée à la nucléation secondaire par attrition
surf	Notion liée à la nucléation secondaire surfacique
$N_C$	Nombre de cristaux nucléés par unité de temps dans le mécanisme en deux étapes
$j_C$	Fréquence de nucléation des cristaux au sein d'une phase dense dans le mécanisme en deux étapes
$d$	Distance interréticulaire (entre deux plan cristallographiques)
$\theta$	Angle de Bragg
$n$	Ordre de diffraction (pour la diffraction aux rayons X), nombre entier
$\lambda$	Longueur d'onde des rayons X
$A_\lambda$	Absorbance de la solution à la longueur d'onde $\lambda$
$\epsilon_\lambda$	Coefficient d'extinction de la molécule à la longueur d'onde $\lambda$
$l$	Longueur de la cuve utilisée en spectrométrie UV
$C$	Concentration en soluté de la solution étudiée en spectrométrie UV
$T_N$	Température de nucléation
$T_C$	Température de croissance
$r_N^*$	Rayon critique correspondant à la température de nucléation $T_N$
$r_C^*$	Rayon critique correspondant à la température de croissance $T_C$
$P(m)$	Probabilité, selon la loi de Poisson, que l'évènement $m$ se produise
$N$	Nombre moyen de cristaux par goutte
$m$	Evènement dans notre cas, le nombre de cristaux se trouvant dans la goutte étudiée
$\Delta G_0(r)$	Energie libre en l'absence de champ électrique
$\Delta W_e(r) = W_2 - W_1$	Energie libre due au champ.
$\epsilon_c$ et $\epsilon_m$	Constantes diélectriques de la nouvelle phase et de la phase de départ
$E_c$ et $E_m$	Champs électriques à l'intérieur et à l'extérieur du germe
$\Omega_c$ et $\Omega_m$	Volumes occupés par le germe et par le système
$\sigma$	Energie de surface spécifique
$s_0$	Sursaturation sans champ

$s_E$	Sursaturation induite par le champ électrique
$\epsilon_0$	Permittivité électrique de l'air
$\chi_i$ et $\chi_j$	Sensibilités magnétiques suivant les axes i et j
$\mu_0$	Perméabilité magnétique du vide ( $4\pi \cdot 10^{-7}$ H/m)
$B$	Intensité du champ
$E_{0A}$	Energie fournie par les ultrasons
$\mu_B$	Viscosité du solvant
$r_A$	Rayon d'une molécule de soluté



## **Introduction**

La cristallisation est devenue une étape de purification importante dans l'industrie. L'industrie pharmaceutique a été une des dernières à s'intéresser à cette étape, cependant c'est la première à s'être intéresser au polymorphisme et à exiger une importante qualité de cette étape. En effet, comme toutes les étapes de purification, elle demande une grande rigueur au niveau du cahier des charges. Avec l'étude du phénomène de la cristallisation, l'industrie pharmaceutique a transformé cette simple étape de purification en étape importante, car, à l'heure actuelle, on ne cherche plus seulement à séparer le soluté du solvant, mais aussi à produire des cristaux d'une certaine forme et d'une certaine taille, pour que tous les lots produits aient les mêmes caractéristiques.

Dans le cadre de la recherche sur les conditions de cristallisation à des fins de développement de procédés (robustesse du procédé, constance des propriétés d'usage et de la phase obtenue...), le contrôle de la nucléation est une étape importante. Nous proposons ici d'étudier l'impact de nouveaux paramètres sur la nucléation.

L'objectif de cette thèse est de contrôler, maîtriser et provoquer la nucléation. On cherche à contrôler la nucléation dans le temps et dans l'espace de façon à pouvoir observer la formation du premier germe critique. En effet les outils pour parvenir à observer ce phénomène sont maintenant disponibles, mais inutiles si on ne sait pas où les pointer pour regarder au sein de la solution. A ce jour, l'observation de la formation du premier germe critique est donc impossible sauf si l'on est très chanceux.

Il y a donc deux angles d'approche de ce sujet. Le premier angle est industriel avec la mise au point de nouveaux procédés d'aide à la recherche des conditions de cristallisation, mais aussi une approche plus fondamentale avec la compréhension du mécanisme de la formation du germe critique.

Pour étudier ce sujet, nous avons la démarche d'une approche non-classique. *Pourquoi parle-t-on d'une approche non-classique ?* Tout simplement parce que classiquement lorsque l'on étudie les paramètres influençant la thermodynamique ou la cinétique de la nucléation, on se cantonne à 4 paramètres, à savoir la température, la sursaturation, l'énergie interfaciale et l'hydrodynamique. Pour parvenir à déclencher la nucléation au sein de la zone métastable, on ajoute un paramètre supplémentaire aux paramètres classiques. Ce cinquième paramètre est un champ externe, qui pourra être un champ électrique, des ultrasons ou un rayon lumineux. Bien que l'application soit

essentiellement interne à la solution, nous verrons pourquoi nous les appelons champs externes.

*Pourquoi se place-t-on au sein de la zone métastable ?* Et bien parce que dans les conditions classiques, il n'y a pas de nucléation primaire, et si on arrive à la déclencher, on arrivera mieux à la contrôler, par le biais du nombre et de la taille des cristaux, et peut être même contrôler la phase. Quoiqu'il arrive, la nucléation va démarrer de là où on applique le champ et se propager dans toute la solution, cependant les vitesses de croissance seront plus lentes et donc plus facilement contrôlables. De plus, on peut espérer qu'un champ externe aura une action locale, là où on l'applique, dont on discutera le mécanisme plus loin dans ce manuscrit. Cependant, le fait que l'action soit locale est aussi à discuter d'un point de vue de la méthodologie et de ce que l'on attend. En effet, cela rend son utilisation pertinente au laboratoire lorsque l'on recherche les conditions de cristallisation, par contre, il sera difficile d'extrapoler le procédé pour une application industrielle.

Afin de mettre en évidence un éventuel effet des champs externes sur la nucléation et d'en comprendre le mécanisme d'action, il est important d'avoir des données de référence en conditions sans champ externe. Ce travail se divise donc en deux parties, la première étant l'étude de la fréquence de nucléation dans des conditions dites classiques, afin de mieux établir la théorie, puis dans un deuxième temps, il s'agit de comprendre les effets des champs externes sur la nucléation.

En général, lorsque l'on travaille à la mise au point de nouvelles expériences, on utilise des molécules que l'on appelle 'modèles'. C'est-à-dire que l'on utilise des molécules dont on connaît très bien le diagramme de phases, ainsi que tout autre paramètre essentiel à la maîtrise parfaite de la nucléation. De plus dans notre cas, il s'agit forcément d'une molécule qui soit soluble dans l'eau afin d'éviter les complications du montage de l'expérience dues à l'évaporation d'un éventuel solvant organique et les problèmes liés à sa compatibilité avec les contenants, sans perdre de vue le développement technologique lié à l'utilisation de solvants organiques.

Ce manuscrit se divisera donc en deux parties distinctes, à l'image du déroulement de mon doctorat. Dans un premier temps, la nucléation dans les conditions classiques sera présentée, d'un point de vue théorique avec une étude bibliographique, puis d'un point de vue expérimental, avec la présentation des expériences menées. Dans un second temps, la nucléation en présence de champs externes sera étudiée, l'approche non-classique, suivant le

même plan que la première partie, nous y présenterons les champs externes étudiés, à savoir le champ électrique interne continu, l'irradiation par la lumière et enfin les ultrasons.



## **A. Conditions classiques**



# I. Les notions reliées à la cristallisation

L'apparition d'une nouvelle phase est un phénomène courant dans de nombreux domaines de la science (chimie, biologie, physique,...), ce phénomène est appelé, de façon générale, la nucléation, c'est une transition de phases du premier ordre. La nucléation est la transition d'une phase désordonnée vers un état de la matière plus ordonné. Lorsque la phase qui apparaît est solide, on parle de cristallisation au sens large, que la phase de départ soit gazeuse ou liquide. La cristallisation est donc une transition de phases définie par le passage d'une phase liquide à deux phases, l'une solide et l'autre liquide. Il existe des transitions de phases sans changement d'état, comme par exemple la démixtion, une phase liquide se transforme en deux phases liquides non miscibles, ou encore le polymorphisme qui est la transition d'une phase solide à une autre phase solide de même composition chimique mais de structures cristallines différentes, pour cela il y a dissolution puis recristallisation sous une forme différente.

Voici quelques concepts fondamentaux de la cristallisation en solution présentés par une étude bibliographique. Tout d'abord, quelques rappels sur le système cristal-solution, tels que les notions de solubilité et de sursaturation, ainsi que l'influence de la non-idéalité de la solution sur les relations entre la température et la solubilité. Puis, les différents aspects de la nucléation seront étudiés d'un point de vue thermodynamique et d'un point de vue cinétique ainsi que les domaines de prédominance de chacun. Nous verrons aussi les différents modèles cinétiques théoriques de la nucléation.

## 1. Généralités

Cette partie aborde les concepts fondamentaux de la cristallisation en solution de petites molécules<sup>[1,2]</sup>, notions qui sont aussi valables pour de plus grosses molécules telles que les protéines.

### a. *La solubilité*

- *Définition*

On définit la solubilité par la quantité maximale de solide, ou soluté, qui est capable de se dissoudre dans un solvant donné<sup>[1]</sup>. La solubilité est fonction de la composition de la solution, de sa température, ainsi que de sa pression, lorsqu'elle est en équilibre avec une phase cristalline de composition et de structure également connues. La solubilité dépend également du couple solvant-soluté considéré puisqu'elle dépend de la capacité du soluté à créer des liaisons mixtes solvant-soluté telles que ion-dipôle, dipôle-dipôle, liaison hydrogène ou encore liaison de Van der Waals.

Guggenheim en 1959<sup>[2]</sup> donne une équation générale de la solubilité en fonction de la température (eq. I-1) :

$$\left(\frac{\partial C_2}{\partial T}\right)_{P,sat} = \left(\frac{S_2 - S_C}{\partial \mu_2 / \partial C_2}\right)_{T,P} \quad \text{Eq I-1}$$

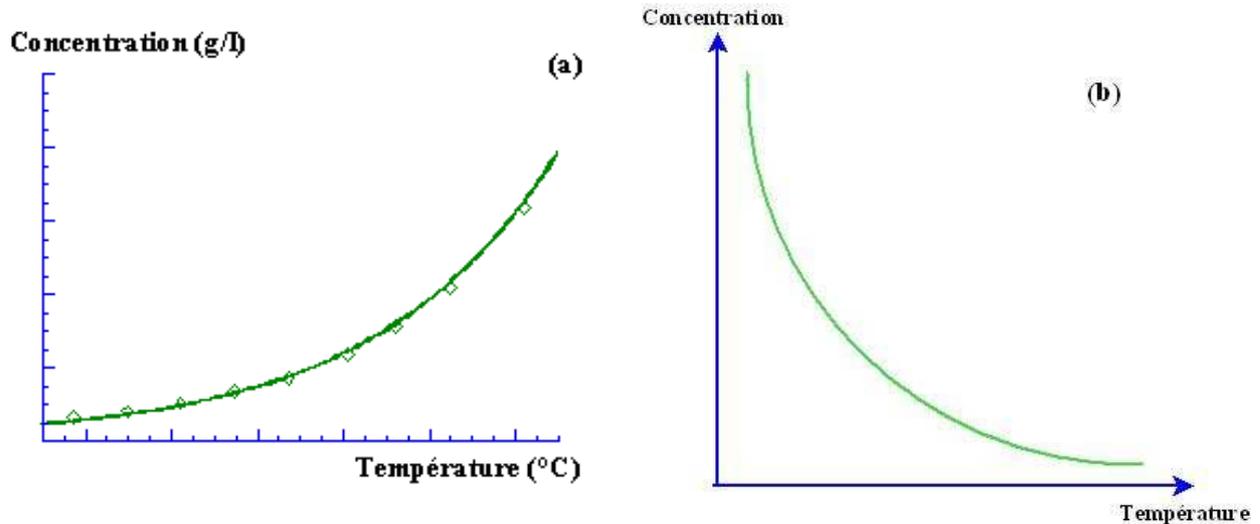
où  $C_2$  est la concentration en soluté,

T la température absolue,

P la pression,

$S_C$  l'entropie du cristal, la différence  $S_2 - S_C$  étant l'entropie de dissolution, normalement positive.

Lorsque la différence d'entropie est positive, la solubilité augmente avec la température, la solubilité est dite directe (fig.1a) ce qui est le cas de la majorité des molécules. Dans le cas contraire, on dit que la solubilité est inverse (fig.1b), on trouve des solubilités inverses pour certaines conditions de cristallisation de protéines en fonction de la phase à cristalliser, du pH ou du sel, mais aussi pour certaines petites molécules comme le  $Cr_2(SO_4)_3$ .



**Figure 1** : Diagramme de solubilité directe (a) et indirecte (b)

- *Influence de la non-idéalité de la solution sur la relation entre la température et la solubilité*

La température étant un paramètre, influençant la solubilité, assez facile et peu onéreux à faire varier, il est donc normal que l'industrie pharmaceutique l'utilise pour les études de cristallisation, mais aussi de formulation. Il est donc plutôt courant de voir des diagrammes de solubilité en fonction de la température. De plus, en pratique grâce à des extrapolations ou encore des régressions linéaires, il est possible d'obtenir une courbe à partir de seulement quelques points expérimentaux et à partir de ces courbes, des grandeurs thermodynamiques.

D'un point de vue théorique<sup>[3]</sup>, on peut exprimer la forme exacte de l'isochore de Van't Hoff (eq. I-2) :

$$\frac{d \ln \alpha_2^{sat}}{dT} = \frac{\Delta H_2}{RT^2} \quad \text{Eq I-2}$$

avec  $\alpha_2^{sat}$  : Activité du soluté à saturation (solubilité) par rapport à son état standard,

T : Température absolue (K),

R : Constante des gaz ( $8,3143 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ),

$\Delta H_2$  : Enthalpie molaire partielle du soluté en solution.

En général,

$$\alpha_2^{solide} = \alpha_2^{sat} = \gamma_2^{sat} \cdot C_S \quad \text{Eq I-3}$$

Où  $\alpha_2^{solide}$  est l'activité du soluté solide pur qui est en équilibre avec la solution saturée dans laquelle  $C_S$  est la concentration en soluté à l'équilibre (saturation ou encore solubilité) et  $\gamma_2^{sat}$  est le coefficient d'activité du soluté. On trouve souvent l'équation I-2 dans sa forme simplifiée suivante :

$$\frac{d \ln C_S}{dT} = \frac{\Delta H_2^*}{RT^2} \quad \text{Eq I-4}$$

où  $\Delta H_2^*$  est l'enthalpie molaire partielle apparente de la solution, elle est généralement égale à :

$$\Delta H_2^* = \Delta H_2 \cdot (\partial \ln C_S / \partial \ln \alpha_2)_T \quad \text{Eq I-5}$$

dans le cas d'une solution idéale  $(\partial \ln C_S / \partial \ln \alpha_2)_T = 1$ <sup>[4]</sup>.

De plus, au lieu de faire l'hypothèse habituelle que  $\Delta H_2^*$  est indépendant de la température, Grant a supposé que  $\Delta H_2^*$  varie linéairement avec la température (I-6).

$$\Delta H_2^* = a + bT \quad \text{Eq I-6}$$

avec  $T$  comme température absolue et  $a$  et  $b$  des constantes où  $b = \Delta C_{p2}^*$  qui est la variation de la chaleur spécifique de soluté à pression constante.

Des équations (I-4) et (I-6) à température constante on obtient :

$$\frac{d \ln C_S}{dT} = \frac{a}{RT^2} + \frac{b}{RT} \quad \text{Eq I-7}$$

qui devient après intégration

$$\ln C_S = -\frac{a}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{b}{R} \cdot \ln T + c \quad \text{Eq I-8}$$

L'équation (I-8) est la forme générale non linéaire de la variation de la solubilité en fonction de la température absolue dans le cas de solutions non idéales. Les analyses des régressions linéaires entre  $\ln C_S$  et  $1/T$  d'un côté et  $\ln T$  de l'autre, permettent la quantification de la variation de la solubilité. Ces analyses donnent les valeurs des 3 inconnues  $a$ ,  $b$  et  $c$ .

Ainsi, si  $b$  dans l'équation (I-6) est négligeable, cela signifie que  $\Delta H_2^*$  est considéré comme indépendant de la température, l'équation (I-8) se simplifie pour donner l'isochore de Van't Hoff<sup>[5]</sup> :

$$\ln C_S = -\frac{a}{R} \cdot \frac{1}{T} + c \quad \text{Eq I-9}$$

De l'équation de Van't Hoff, des grandeurs thermodynamiques peuvent être obtenues. Ainsi, l'évolution de la solubilité exprimée en fraction molaire  $X$  de la molécule en fonction de  $1/T$  est en principe une droite (idéalité des solutions diluées) dont la pente permet de calculer l'enthalpie de dissolution  $\Delta H_2^*$  et l'ordonnée à l'origine, l'entropie de dissolution  $\Delta S_2^*$ , avec  $a = \Delta H_2^*$  et  $c = \Delta S_2^*/R$ . Par commodité, on remplace souvent la fraction molaire par la concentration  $C_S$  (I-9). La valeur de  $\Delta H_2^*$  n'est pas affectée, mais l'ordonnée à l'origine ne correspond plus à l'entropie de dissolution.

Dans le cas où  $a$  est négligeable dans l'équation (I-6), cela implique que  $\Delta H_2^* = T \cdot \Delta C_{p2}^*$  l'équation (I-8) se simplifie pour donner l'équation de Hildebrand<sup>[6]</sup> :

$$\ln C_S = \frac{b}{R} \cdot \ln T + c \quad \text{Eq I-10}$$

où  $b$  représente  $\Delta C_{p2}^*$  qui est approximativement égal à  $\Delta S_2^*$  et  $c$  la constante d'intégration.

Les deux types de fonctions solubilité-température, (I-9) et (I-10), sont apparus comme fournissant une bonne linéarité des points dans de nombreux cas d'études. Le tracé du  $\ln C_S$  en fonction de  $1/T$ , dans le cas de l'isochore de Van't Hoff, a incontestablement la faveur de la communauté scientifique. Hildebrand a montré théoriquement que le tracé du  $\ln C_S$  en fonction de  $\ln T$  peut fournir une meilleure régression linéaire. En revanche, Yalkowsky<sup>[7]</sup> a prouvé expérimentalement que la corrélation de Van't Hoff est plus appropriée pour exprimer la solubilité en fonction de la température, dans le cas de système solide-liquide où la solution est idéale.

Dans le cas où les corrélations de Van't Hoff et Hildebrand fournissent un écart à la linéarité des données solubilité-température, on utilise l'équation générale (I-8). Cet écart à la linéarité correspond à un écart à l'idéalité de la solution. Des exemples décrits dans l'article de Grant montrent que l'équation (I-9) de Van't Hoff est clairement inappropriée (écart à l'idéalité) à l'ajustement des données solubilité-température de plusieurs molécules pharmaceutiques et d'autres molécules hydrophobes dans l'eau et dans des solvants très associés, c'est-à-dire très polaires. Cet écart à l'idéalité est particulièrement significatif pour des températures supérieures à 50°C dans le cas de molécules pharmaceutiques.

Dans le domaine pharmaceutique, la non-linéarité de la courbe de solubilité est souvent traduite par la présence de polymorphes ou de solvates que l'on définira ultérieurement. Dans certains cas, cette interprétation peut induire en erreur lorsque le comportement non-linéaire de la solubilité est la conséquence de la non-idéalité de la solution. De plus le point d'intersection des courbes ou droites (selon la représentation) des différentes phases n'est pas le même selon que l'on utilise la représentation linéaire de Van't Hoff ou bien la représentation logarithmique de Grant<sup>[8]</sup>.

### ***b. La sursaturation***

La cristallisation est un changement d'état, il y a donc une barrière énergétique à franchir pour que le soluté cristallise. Il faut donc une certaine 'force' au soluté pour arriver à sortir de la solution dans laquelle il se trouve et à cristalliser.

Cette force est appelée sursaturation, d'un point de vue thermodynamique.

Théoriquement, la force motrice  $\Delta\mu$  de la cristallisation, par molécule, est la différence des potentiels chimiques d'une molécule en solution dans les phases mères sursaturées ( $\mu_2$ ) et saturées ( $\mu_S$ ) respectivement :

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_s = kT \cdot \ln \frac{C}{C_s} \quad \text{Eq I-11}$$

avec C : Concentration de la solution,  
 $C_s$  : Concentration à saturation, solubilité,  
 T : Température absolue (K),  
 k : Constante de Boltzmann ( $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ).

On constate dans cette équation que l'on a remplacé  $\alpha_2^{\text{sat}}$ , l'activité du soluté par C, la concentration en soluté, parce qu'on considère que dans l'équation I-3, le coefficient d'activité du soluté  $\gamma_2^{\text{sat}}$  est égale à 1.

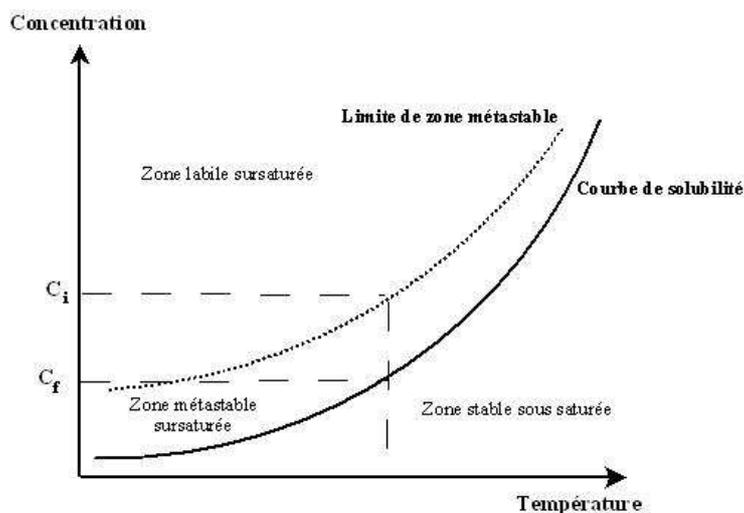
C'est en effet par sa différence de potentiels chimiques que l'on caractérise la tendance d'un constituant à sortir d'une phase. Mais la sursaturation peut être définie de différentes manières, en utilisant notamment les quantités sans dimension  $\beta$  et  $\sigma$  :

$$\beta = \frac{C}{C_s} \text{ ou } \beta - 1 = \sigma = \frac{C - C_s}{C_s} \quad \text{Eq I-12}$$

On peut noter qu'à faible sursaturation  $\ln\beta \approx \sigma$ ,  $\ln\beta = \Delta\mu/kT$ . Ces deux grandeurs,  $\beta$  et  $\sigma$ , présentent l'intérêt d'être normées par rapport à la solubilité  $C_s$ , et d'être adimensionnelles afin de faciliter les comparaisons entre différents systèmes. Une même valeur  $\beta$  peut être obtenue dans les domaines de concentration très différents si la solubilité varie beaucoup avec la température. Notons aussi que les cinétiques seront toujours plus rapides dans les milieux plus concentrés toute chose égale par ailleurs.

La sursaturation est l'état d'une solution dans laquelle la concentration en soluté est supérieure à la solubilité. Ainsi, quand on établit un diagramme de phase (fig. 2), on peut distinguer trois domaines :

- La zone sous-saturée, en dessous de la courbe de solubilité, zone dans laquelle du soluté peut encore être dissout.
- La zone sursaturée métastable, zone dans laquelle les cristaux croissent mais n'apparaissent pas.
- La zone sursaturée labile, zone dans laquelle les cristaux apparaissent et croissent.



**Figure 2 : Diagramme de phases**

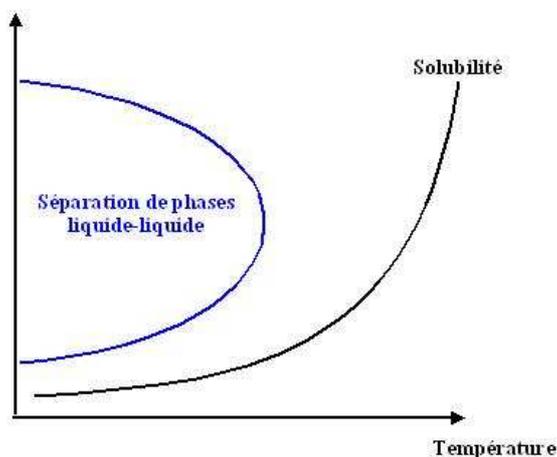
On peut obtenir la sursaturation de différentes façons<sup>[9]</sup> et c'est ce choix qui va déterminer le type de procédé de cristallisation qu'on va développer :

- Soit par évaporation du solvant, dans ce cas, la concentration en soluté augmente, le problème majeur étant que les impuretés aussi se concentrent ce qui entraîne des conditions particulières de nucléation et de croissance des cristaux.
- Soit par refroidissement ou réchauffement de la solution (en fonction de la solubilité directe ou inverse du soluté), en général il s'agit de monter en température pour dissoudre le soluté et de laisser la solution refroidir pour cristalliser.
- Soit par addition d'un co-solvant dans lequel la solubilité du soluté est très basse ou nulle, dans ce cas, on utilise un co-solvant parfaitement miscible avec le premier, mais qui ne solubilise pas le soluté.
- Soit par réaction chimique, le mélange de deux réactifs va donner un produit, qui est le soluté, de plus faible solubilité, qui donc va précipiter.
- Soit par variation de pH, on ne peut appliquer ce cas que lorsque la solubilité dépend du pH, cela est très intéressant, car on ne modifie pas la composition du milieu.

### c. La séparation de phases liquide-liquide ou démixtion

Dans le domaine pharmaceutique, on a souvent affaire à des molécules dont la cristallisation est délicate, voir difficile, celle-ci s'accompagnant souvent de phénomènes de séparation de phases liquide-liquide<sup>[8, 10]</sup>. Ce phénomène est une transition de phases, elle aussi du premier ordre, correspondant à la séparation d'une solution de concentration donnée, en deux solutions non-miscibles de concentrations différentes. Il y a une lacune de miscibilité dans le diagramme de phases. On appelle température critique, la température à partir de laquelle la démixtion apparaît. La température de séparation de phases liquide-liquide varie en fonction de la concentration, on obtient donc une courbe thermodynamique, appelée binode, sur le diagramme de phase, qui délimite la zone de démixtion du système (fig.3).

Concentration

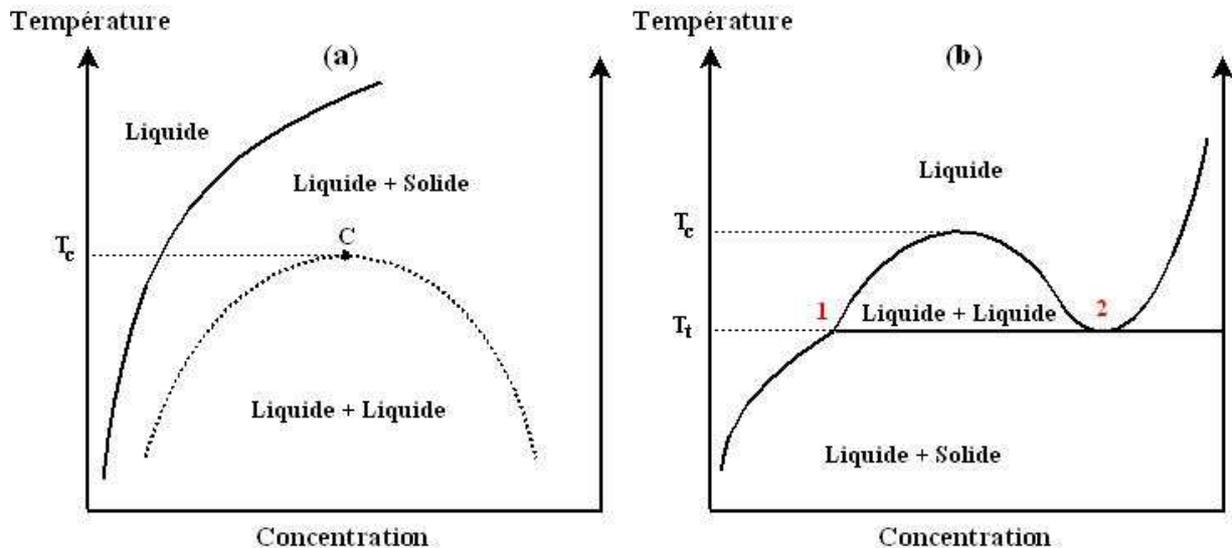


**Figure 3** : Diagramme de phases de démixtion et photo d'une démixtion, d'après Veessler et al.<sup>[11]</sup>

Physiquement, la séparation de phases liquide-liquide se manifeste par la nucléation de gouttes au sein d'une phase liquide continue. La nucléation est ralentie par d'éventuels

problèmes de diffusion entre les deux phases, la phase dense en soluté peut aussi se gélifier car elle devient trop dense. De plus, en l'absence d'agitation, ces gouttes coalescent pour finalement tomber au fond du réacteur, et ainsi former deux phases décantées.

La séparation de phases liquide-liquide peut être métastable ou elle peut être stable, dans ce cas-là, on observe deux points triples notés 1 et 2, points de concours de la binode et de la courbe de solubilité (fig.4).



**Figure 4** : Diagramme de phases, Température-Concentration, où la lacune de miscibilité est (a) au-dessous de la courbe de solubilité ; ou au-dessus (b), formant deux points triples (1 et 2) avec celle-ci.

La séparation de phases liquide-liquide est une transition de phases sans changement d'état de la matière, c'est aussi le cas du polymorphisme que nous allons voir maintenant.

#### *d. Le polymorphisme*

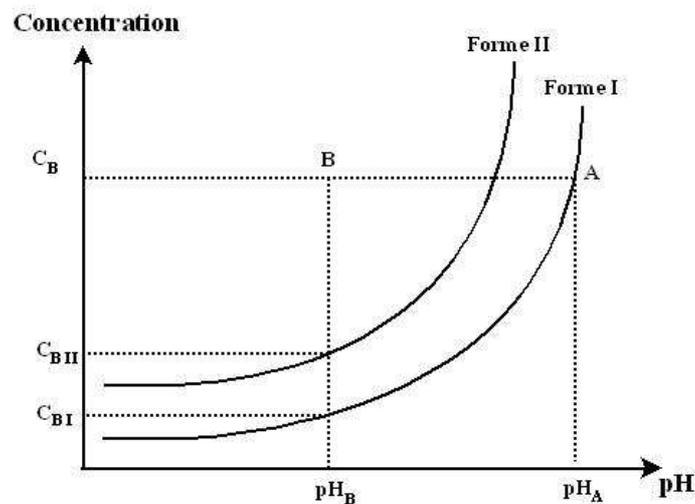
Un grand nombre de substances peuvent apparaître sous différentes phases si les conditions du milieu le permettent. Ces phases peuvent être des polymorphes, des solvates et des amorphes. Les polymorphes ont rigoureusement la même composition chimique mais des structures cristallines différentes. Ils ont aussi des énergies de réseau différentes et en conséquence des propriétés physico-chimiques différentes : température de fusion, solubilité, enthalpie de dissolution...

L'importance du phénomène de formation de ces différentes phases et de leur disparition est considérable dans de nombreux domaines. Dans l'industrie pharmaceutique par exemple, l'existence de différentes phases joue un rôle considérable puisque l'activité du médicament dépend de la variété polymorphique. L'une des propriétés fondamentales, en dehors de la stabilité de la substance, est sa cinétique de dissolution. Certaines variétés polymorphiques perdent tout leur intérêt car elles se dissolvent trop lentement ou trop rapidement ou encore deviennent de véritables poisons pour l'organisme.

D'un point de vue industriel, on peut citer les inconvénients suivants : prise en masse (mottage) des stocks, changement de propriétés des colorants, altération de la qualité des produits.

Parmi les différentes phases pouvant apparaître dans une solution, pour des conditions physico-chimiques données, une seule correspond à l'énergie libre minimale du système celle de plus faible solubilité. Pourtant ce n'est pas celle-ci qui se forme la première. En 1897, Ostwald érigeait en règle qu'un système chimique ne tend pas directement vers l'état le plus stable mais vers l'état métastable qui lui est voisin<sup>[12]</sup>. Pour illustrer cette loi, considérons une substance cristallisant sous deux formes différentes I et II.

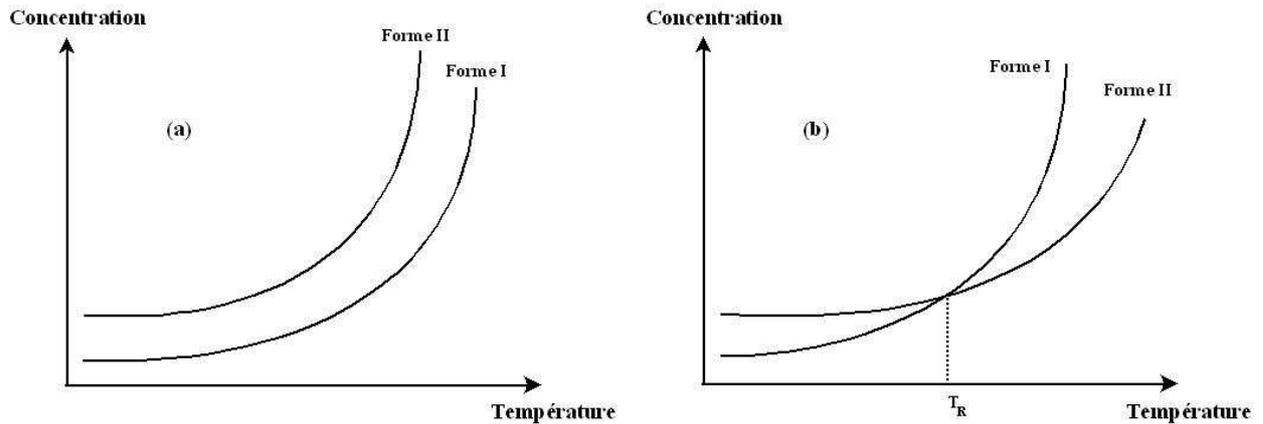
La forme I est la moins soluble dans la gamme de pH considérée donc la plus stable en solution. Si l'on se trouve sur la figure 5, au niveau du point B, la solution est sursaturée par rapport aux deux formes I et II. Les deux variétés peuvent se former. La sursaturation étant plus importante par rapport à la forme I, on s'attend à ce que ce soit celle-ci qui cristallise en premier. En fait, c'est la forme II qui cristallise dans la grande majorité des cas. Les facteurs cinétiques l'emportent donc sur les facteurs thermodynamiques qui imposent l'équilibre final.



**Figure 5 : Solubilité de deux polymorphes en fonction du pH**

Selon la position relative des courbes de solubilité des formes polymorphes, on distingue deux cas : le système peut être monotrope ou énantiotrope (figure 6a et 6b)

- Le système monotrope : La forme I est stable, et la forme II est métastable sur tout le domaine de température (fig.6a).
- Le système énantiotrope : Les courbes de solubilité des deux phases se croisent en un point, appelé point de transition de phases, à une température notée  $T_R$ . La stabilité d'un polymorphe dépend alors de la zone de température étudiée (fig.6b).



**Figure 6** : Courbes de solubilité de deux polymorphes I et II : Cas d'un système monotropique (a) et énantiotropique (b)

A partir des valeurs de la courbe de solubilité, il est possible de déterminer la présence ou non d'un polymorphe pour la molécule étudiée. En effet, en partant de l'équation de Van't Hoff, on peut tracer les courbes logarithmiques :

$$\ln(X) = \frac{-\Delta H_d}{RT} + \frac{\Delta S_d}{R} \quad \text{Eq I-13}$$

Avec X représente la fraction molaire du composé,

T la température du système en Kelvin,

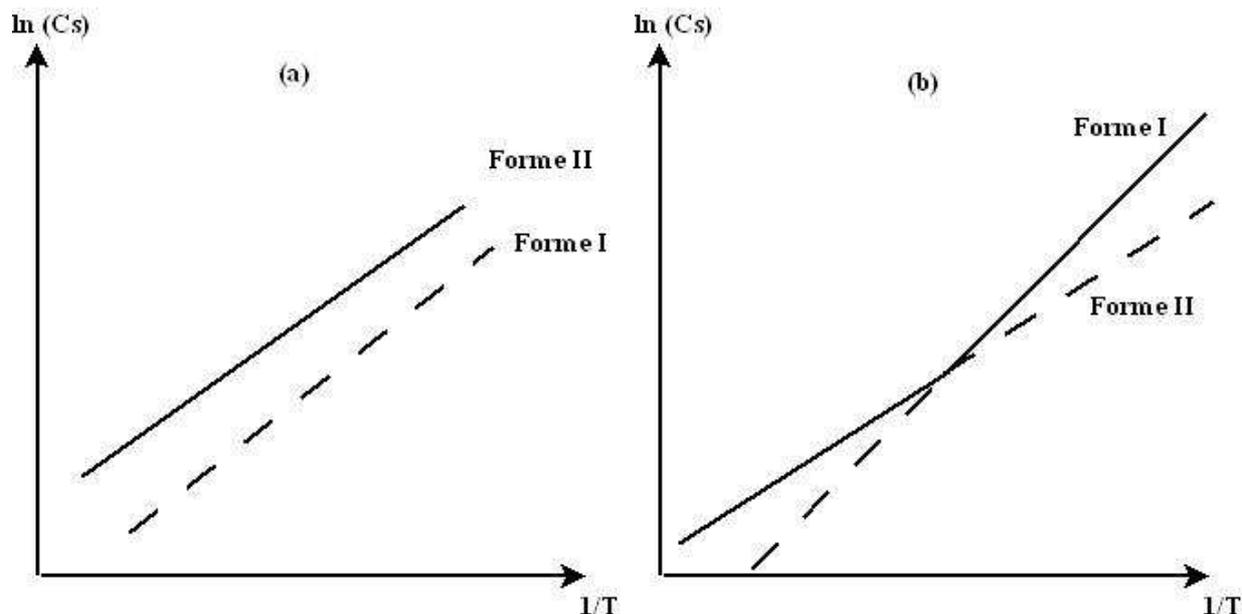
$\Delta H_d$  l'enthalpie de dissolution,

$\Delta S_d$  l'entropie de dissolution.

Si, par commodité, on remplace la fraction molaire par la concentration, l'enthalpie de dissolution n'est pas affectée, mais l'ordonnée à l'origine ne correspond plus à l'entropie de dissolution. La formule de Van't Hoff devient :

$$\ln(C_s) = \frac{-\Delta H_d}{RT} + \left( \frac{\Delta S_d}{R} + b \right) \quad \text{Eq I-14}$$

$$\ln(C_s) = \frac{-\Delta H_d}{RT} + B \quad \text{Eq I-15}$$



**Figure 7** : Représentation de  $\ln(C_s)$  en fonction de  $1/T$  pour un système (a) monotropique et (b) énantiotropique

Alors, dans le cas d'un polymorphisme, le tracé de  $\ln(C_s)$  expérimental en fonction de  $1/T$  fait apparaître une rupture de pente (fig.7b). En effet,  $\Delta H_d$  n'a pas la même valeur pour des variétés polymorphiques. Le tracé de  $\ln(C_s)$  en fonction de  $1/T$  est un moyen très fréquemment employé pour caractériser la présence de polymorphes.

N.B. : La rupture de pente lors de la représentation graphique de l'équation I-15 représente soit un écart à l'idéalité du système, soit la présence de deux phases différentes.

## **2. Les différentes théories de la nucléation**

La nucléation est le processus conduisant à la formation d'une nouvelle phase. Dans cette partie je traiterai plus spécifiquement la formation de germes cristallins.

Ces germes sont thermodynamiquement stables après avoir atteint une certaine taille, la taille critique. Le phénomène de nucléation s'arrête là, vient ensuite l'étape de croissance cristalline.

Il existe à l'heure actuelle deux théories sur la nucléation. La première est la théorie classique de nucléation qui, au départ, a été élaborée pour la nucléation d'une phase vapeur au sein d'une phase liquide, elle s'effectue en une seule étape. La deuxième théorie est beaucoup plus récente, il s'agit de la théorie en deux étapes de Kashchiev<sup>[13]</sup> que je présenterai plus tard, et qui a été élaborée pour les molécules de taille importante comme les protéines.

## *i. La théorie classique de nucléation*

Cette théorie est la plus ancienne, elle est très générale et s'applique à la nucléation de toutes sortes de phases, sans distinction selon les propriétés physiques de la phase nucléée.

La nucléation se décrit sous ses aspects thermodynamique et cinétique.

On distingue trois nucléations différentes:

- Tout d'abord la nucléation primaire homogène, qui est la formation de germes dans le volume de la solution dépourvue de cristaux de la phase à faire apparaître, c'est pour cela que l'on parle de primaire.
- La nucléation primaire hétérogène, qui est la formation de germes sur un support 'étranger' (parois, impuretés...).
- La nucléation secondaire, c'est l'apparition de germes à partir des cristaux de soluté déjà présents dans la solution, soit parce qu'ils ont été introduits (ensemencement), soit parce que des cristaux nucléés auparavant ont été cassés par l'agitation (attrition).

Lorsque, dans la solution, la sursaturation est établie par rapport à une phase, on active le processus de nucléation de celle-ci. La nucléation met en jeu une énergie, appelée  $\Delta G$ , énergie libre de germination.

### *a. Nucléation primaire homogène*

- *Thermodynamique*

Les germes se forment alors dans une solution où aucun cristal de la même phase n'existe déjà, et de plus, il s'agit d'une nucléation volumique.

Si le germe contient  $n$  molécules l'énergie libre d'activation de germination s'écrit (eq. I-16) :

$$\Delta G = -nkT(\ln \beta) + \sum_{hkl} S_{hkl} \gamma_{hkl} \quad \text{Eq I-16}$$

où la sommation est faite sur toutes les faces d'aires  $S_{hkl}$  ( $m^2$ ), d'énergie libre de surface  $\gamma_{hkl}$  ( $J.m^{-2}$ ).  $h$ ,  $k$  et  $l$  étant les indices correspondant aux plans réticulaires du cristal.

avec  $n$  : nombre de molécules constituant le germe,

$k$  : constante de Boltzmann ( $J/K$ ),

$T$  : température ( $K$ ),

$\beta$  : sursaturation.

Si on considère, pour simplifier le calcul, que toutes les faces du germe ont la même énergie interfaciale, on peut écrire l'équation I-17 comme suit :

$$\Delta G = -n\Delta\mu + S\gamma_{CL} \quad \text{Eq I-17}$$

Avec  $\Delta\mu$  est la différence des potentiels chimiques du cristal et de la solution,

$S$  l'aire du germe ( $m^2$ ) et

$\gamma_{CL}$  l'énergie interfaciale cristal-solution ( $J.m^{-2}$ ).

Dans la théorie classique de nucléation (CNT) le germe est supposé être une sphère, on obtient alors l'équation thermodynamique donnant l'énergie libre de nucléation homogène : (eq. II-18)

$$\Delta G_{\text{hom}} = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} k.T. \ln \beta + 4\pi.r^2.\gamma_{CL} \quad \text{Eq I-18}$$

avec :  $r$ , rayon du germe (m) et  
 $\Omega$ , volume d'une molécule dans le germe ( $\text{m}^3$ ).

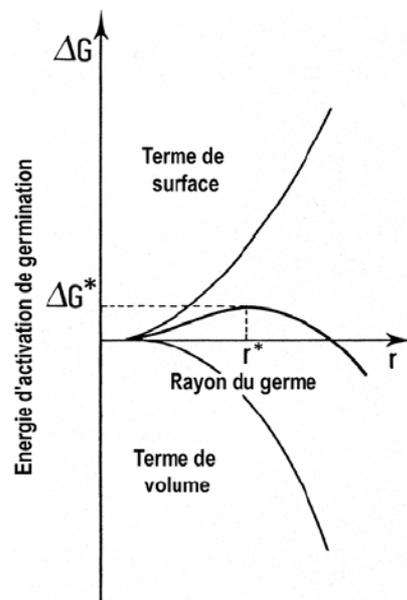
On appelle germe critique, le germe dont le rayon donne l'énergie libre de nucléation maximale, soit pour  $\frac{\partial \Delta G}{\partial r} = 0$ , on obtient, ainsi, l'équation de Gibbs-Thomson-Freundlich qui nous donne l'expression du rayon du germe critique : (eq. I-19)

$$r^* = \frac{2.\Omega.\gamma_{CL}}{kT \ln \beta} \quad \text{Eq I-19}$$

Quand on remplace cette expression dans l'équation de l'énergie libre (I-16), l'énergie libre critique devient alors : (eq. I-20)

$$\Delta G_{\text{hom}}^* = \frac{16\pi\Omega^2\gamma_{CL}^3}{3(kT \ln \beta)^2} = \frac{1}{3}(4\pi.r^{*2}.\gamma_{CL}) = \frac{1}{3}S\gamma_{CL} \quad \text{Eq I-20}$$

Cette énergie libre d'activation est un maximum donc le germe critique est instable, c'est-à-dire que si on ajoute une molécule ( $r > r^*$ ), le cristal va croître, par contre si on lui enlève une molécule ( $r < r^*$ ), le cristal va se dissoudre.



**Figure 8 :** Energie libre d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du germe ( $r$ ) d'après Boistelle<sup>[1]</sup>

On voit donc sur le graphique (fig.8) que dans les deux cas, le processus engendre une perte d'énergie ( $\Delta G$  diminue), donc quel que soit le cas, il est spontané.

Les conditions thermodynamiques de la nucléation homogène ayant été établies, il nous reste à étudier la cinétique de ce changement de phases.

- *Cinétique*

L'approche cinétique consiste à déterminer la vitesse à laquelle apparaissent les germes, c'est-à-dire la fréquence de nucléation qui représente le nombre de germes apparus par unité de temps et de volume.

Il n'existe pas beaucoup d'informations sur la fréquence de nucléation des matériaux biochimiques (molécules organiques, protéines, virus, polymères, etc...) en solution en dehors du Lysozyme qui est utilisé depuis plus de 20 ans comme molécule modèle, pourtant le contrôle de la fréquence de nucléation permet le contrôle du nombre de particules produites et aboutit ainsi à un contrôle direct sur la distribution de taille de ces particules pour un rendement donné de produit cristallisé. Dans l'industrie pharmaceutique, la distribution de taille a un rôle très important, en effet des particules trop petites seront difficiles à formuler dans la forme finale du médicament, et les particules trop grosses n'auront pas les mêmes propriétés de dissolution, elles auront tendance à se dissoudre plus lentement et peuvent même devenir toxiques, si la dissolution est trop lente. Voilà pourquoi il est important de pouvoir maîtriser la distribution de taille des cristaux au travers du contrôle de la fréquence de nucléation.

L'apparition d'un germe cristallin stable, i.e. un germe ayant déjà acquit une molécule supplémentaire lui permettant d'être stable, reste encore aujourd'hui très difficile à expliquer d'un point de vue cinétique. Que ce soit Nyvlt<sup>[14]</sup> en 1968 ou Mullin<sup>[15, 16]</sup> en 2001, les théories présentées s'appuient toujours sur les mêmes travaux, ceux de Gibbs<sup>[17]</sup>, de Volmer<sup>[18]</sup> et de Becker et Doring<sup>[19]</sup>. En effet, la seule théorie, que l'on appelle classique, se fonde sur la nucléation de gouttes de condensation en phase vapeur. Lorsqu'une gouttelette se condense sur une surface dans une atmosphère sursaturée en vapeur, cette gouttelette s'évapore quand même rapidement, pendant qu'au même moment une autre gouttelette de condensation se forme à côté et ainsi de suite jusqu'à ce qu'une des gouttelettes condensées atteigne une taille suffisante pour qu'elle ne s'évapore plus, cette taille est atteinte, soit par coalescence de deux gouttelettes de condensation, soit par croissance de la gouttelette de départ. Dans le cas de la nucléation de cristaux, il devient difficile de penser que le nucleus est formé par la collision de deux germes en solution, il s'agit donc de croissance à partir d'un germe. Donc si on prend le germe dès le début avant qu'il commence à exister, il s'agit d'abord d'une molécule à laquelle va s'ajouter une autre, puis une autre et ainsi de suite jusqu'à obtenir un germe suffisamment gros pour qu'il devienne un nucleus :



.....

.....



A partir d'une certaine taille critique les forces intermoléculaires au sein des germes vont prévaloir sur les particules au détriment des forces des particules les plus proches autour d'elles dans la solution et donc le germe devient stable, on l'appelle nucléus.

Si l'on rajoute encore un monomère à ce nucléus, il va croître pour donner un cristal, par contre si un des monomères se détache, alors le nucléus va se dissoudre.

Pour décrire la fréquence de nucléation en relation avec ce mécanisme, Becker et Doring<sup>[19]</sup> et Volmer<sup>[18]</sup> ont déduit la relation suivante :

$$\frac{dN_z}{d\tau} = k' \exp(-E/RT) \quad \text{Eq I-21}$$

avec  $dN_z$  le nombre de nucléi formés par unité de volume pendant le temps  $d\tau$ ,

$E$ , l'énergie minimum nécessaire pour qu'un germe croisse jusqu'à la taille d'un nucléus.

Ceci est égal à 1/3 du travail nécessaire pour la formation de la surface du nucléus (eq.I-20).

Appuyés sur cette idée, Becker et Doring ont déduit la relation simplifiée que l'on connaît maintenant :

$$J = k' \exp(-B/\ln^2 \beta) \quad \text{Eq I-22}$$

avec  $B$  une constante à température fixée et

$\beta = C/C_s$  la sursaturation.

En d'autres termes :

$$J = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \quad \text{Eq I-23}$$

Où  $K_0$  est un facteur cinétique qui est caractéristique du couple cristal-solution, et qui peut varier de  $1.10^{11}$  à  $1.10^{31} \text{ m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ,

$k$ , la constante de Boltzmann  $1,3805 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$

$\Delta G^*$ , est l'énergie d'activation critique définie précédemment pour la nucléation homogène.

Si on remplace  $\Delta G^*$  par son expression (eq. I-20) dans l'équation I-23 on obtient :

$$J = K_0 \exp\left(-\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3 \ln^2 \beta}\right) \quad \text{Eq I-24}$$

$K_0$ , le coefficient cinétique, regroupe la concentration en molécules dans la phase liquide,  $N_1$ , la fréquence d'attachement des molécules au germe critique,  $\nu$  et un terme  $\Gamma$  connu dans la littérature<sup>[20]</sup> comme le facteur de Zeldovich. Ce terme permet de prendre en compte le fait que les espèces chimiques de taille  $n \approx n^*$  participent de façon égale à la cinétique de nucléation. L'équation I-24 devient alors :

$$J = \Gamma \nu N_1 \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) \quad \text{Eq I-25}$$

où le facteur de Zeldovich<sup>[21]</sup>,  $\Gamma$  vaut :

$$\Gamma = \left(\frac{\Delta G^*}{3\pi kT (n^*)^2}\right)^{1/2} \quad \text{Eq I-26}$$

L'expression (I-26) reste néanmoins très formelle. Il est cependant possible de l'écrire en fonction de paramètres physico-chimiques ( $\nu$  et  $\gamma$ ) relatifs au couple solvant-soluté et de paramètres relatifs aux conditions expérimentales essentiellement la sursaturation et la température de la solution.

La fréquence d'attachement  $\nu$  de monomères dans le volume d'une solution a été calculée par Kind et Mersmann<sup>[22]</sup> :

$$\nu = \frac{3}{4} D_{AB} (C_{vol} N_A)^{2/3} \quad \text{Eq I-27}$$

Avec :  $D_{AB}$  : coefficient de diffusion en  $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  
 $C_{vol}$  : concentration molaire de monomères dans le volume,  $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$  et  
 $N_A$  : le nombre d'Avogadro.

D'une manière générale la mesure de l'énergie interfaciale  $\gamma$  est réalisée expérimentalement à partir de mesures de fréquences de nucléation primaire homogène<sup>[23-25]</sup>. Cette méthode nécessite une solution dépourvue d'impureté afin de ne pas provoquer une nucléation primaire hétérogène qui conduit à de larges erreurs. C'est pourquoi, Mersmann<sup>[26]</sup>, en se basant principalement sur le concept de Guggenheim<sup>[2]</sup> qui considère la zone interfaciale comme une phase volumique à part entière, a établi une loi phénoménologique. Il obtient pour un système binaire cristal-solution, une relation du type :

$$\gamma = akT(C_i^S N_A)^{2/3} \ln\left(\frac{C_i^S}{C_i^L}\right) \quad \text{Eq I-28}$$

avec a, un coefficient d'ajustement compris entre 0.1 et 0.6 selon les hypothèses,

$$C_i^S = \frac{\rho_s}{M_s}, \text{ la concentration de la phase i dans le solide, en } \text{mol}/\text{m}^3$$

$$C_i^L, \text{ la concentration de la phase i à l'équilibre, solubilité en } \text{mol}/\text{m}^3.$$

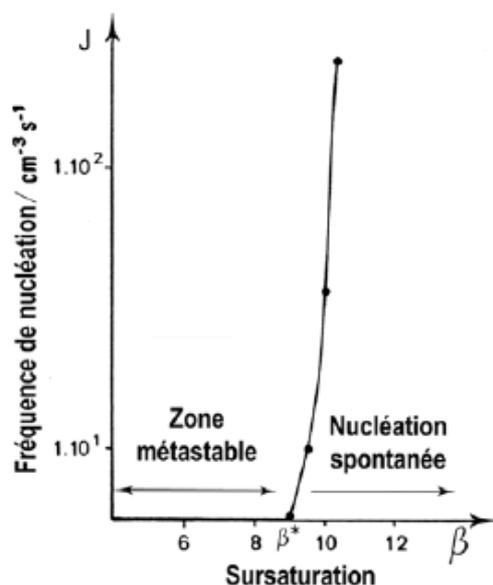
En tenant compte des deux précédentes relations, de la définition de la sursaturation  $\beta$  et de l'expression de l'énergie d'activation critique  $\Delta G^*$ , la fréquence de nucléation primaire homogène peut s'écrire :

$$J_{\text{hom}} = \frac{3}{2} D_{AB} (C_i^S N_A)^{5/3} \left(\frac{C_i^L}{C_i^S}\right)^{7/3} \sqrt{a \ln \frac{C_i^S}{C_i^L} \beta^{7/3}} \exp\left[-\frac{16\pi}{3} a^3 \frac{\ln^3\left(\frac{C_i^S}{C_i^L}\right)}{\ln^2 \beta}\right] \quad \text{Eq I-29}$$

Mais on peut aussi l'écrire en fonction de l'énergie interfaciale, afin de supprimer le coefficient a, lorsqu'il n'est pas connu :

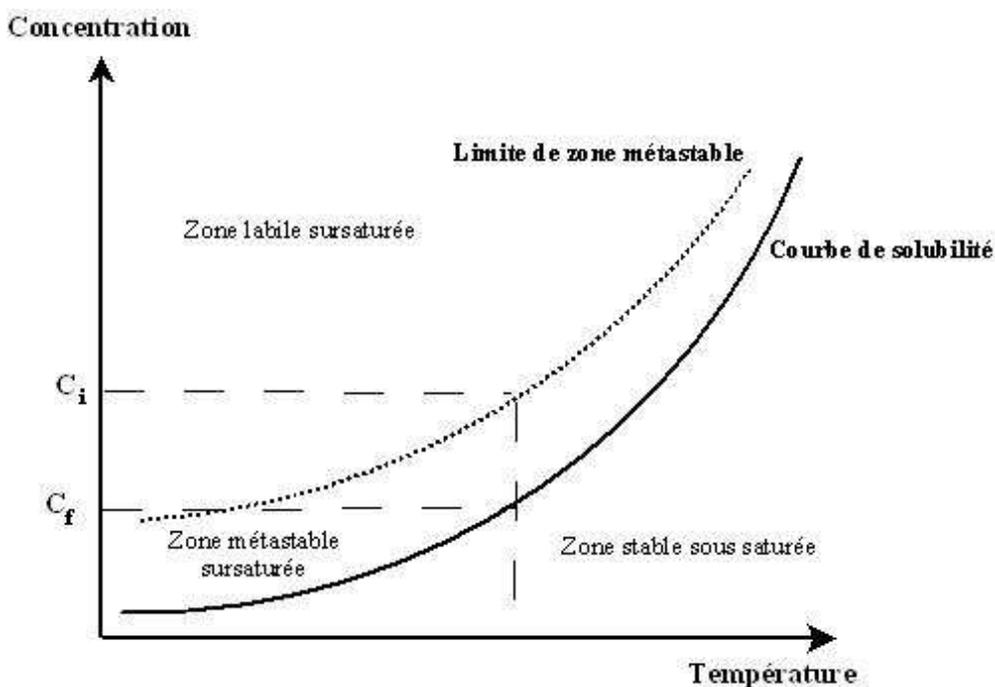
$$J_{\text{hom}} = \frac{3}{2} D_{AB} \frac{\gamma^{1/2}}{k^{1/2} T^{1/2}} (C_i^S N_A)^{4/3} \left(\frac{C_i^L}{C_i^S}\right)^{7/3} \beta^{7/3} \exp\left[-\frac{16\pi}{3} \frac{\gamma^3}{k^3 T^3 \ln^2(\beta) C_i^S{}^2 N_A^2}\right] \quad \text{Eq I-30}$$

Dans la première équation (I-24), on se rend bien compte que si la sursaturation est inférieure à  $\beta^*$  (fig.9), la sursaturation critique, la fréquence de nucléation est faible voir nulle, on se trouve alors dans une zone qu'on appelle métastable. Par contre si l'on a une sursaturation supérieure à la sursaturation critique, on observe alors que la fréquence de nucléation augmente rapidement de façon exponentielle, on se trouve alors dans le domaine de nucléation spontanée (fig.9).



**Figure 9 :** Fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation d’après Boistelle <sup>[1]</sup>.

La figure 10 montre schématiquement une solubilité directe. Lorsque la courbe de solubilité est franchie, il n’y a pas de nucléation pendant un certain temps tant que le point représentatif de la solution reste dans la zone métastable. Lorsque ce point atteint la limite de zone métastable, la nucléation primaire homogène est spontanée. Puisque la nucléation est plus facile dans le domaine des grandes concentrations, la largeur de la zone diminue. On reviendra plus tard sur les différentes limites de zones métastables existant en solution.



**Figure 10 :** Courbe de solubilité directe et zone métastable pour la nucléation primaire homogène.

Expérimentalement, il est assez difficile de mesurer la fréquence de nucléation, car souvent elle est déterminée à partir de la mesure du temps d'induction qui est inversement proportionnel à la fréquence de nucléation. Or ce temps d'induction représente à la fois le temps que les germes mettent pour se former mais aussi le temps que ces germes mettent à croître pour arriver à une taille qui soit détectable. Nous verrons dans la partie expérimentale qu'il existe une technique, la double pulsion thermique, permettant de séparer la nucléation de la croissance. De plus, le domaine de fréquence de nucléation mesurable expérimentalement est assez limité, car en augmentant très peu la sursaturation, on peut passer d'un temps de latence de  $10^5$  à  $10^{-1}$  s.

Le but de cette étude est à terme d'arriver à provoquer la nucléation primaire homogène au sein de la zone métastable, pour cela on verra dans la deuxième partie de ce manuscrit que l'on va utiliser un champ externe.

### ***b. Nucléation primaire hétérogène***

Il s'agit toujours d'une nucléation primaire, sauf que dans ce cas, le germe se forme sur un support, comme une paroi ou une impureté (qui peut être un cristal d'une autre phase ou un polymorphe) présente dans le milieu, ce qui induit que le germe n'a plus une forme sphérique complète, mais plutôt une forme sphérique tronquée<sup>[9]</sup>.

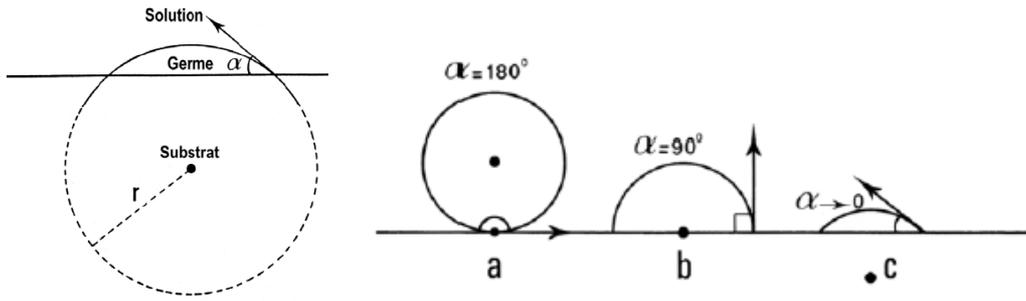
- *Thermodynamique*

Afin de déterminer l'énergie d'activation nécessaire à la formation d'un germe critique, un nucléus, il faut faire les hypothèses suivantes<sup>[18]</sup> :

- C'est une petite phase condensée isotrope : la forme du germe est une portion de sphère.
- La taille du substrat est très grande devant celle du germe : la surface du substrat est considérée comme plane au niveau de l'interface cluster-substrat.
- Le substrat est indéformable.

Bien entendu, ce modèle a été rediscuté ces dernières années avec des hypothèses moins contraignantes<sup>[27]</sup> qui n'ont pas modifié significativement le modèle.

On définit donc une taille de germe critique  $r_{\text{hét}}^*$  qui est égale à  $r_{\text{hom}}^*$ . La seule différence, est que le nombre de molécules contenues dans le germe qui se forme est moins important pour la nucléation primaire hétérogène, car il faut moins de molécules pour former une sphère tronquée qu'une sphère complète de même diamètre. De même, la nucléation sera plus facile si le soluté et le support ont une grande affinité, car dans ce cas, la calotte sphérique sera encore plus petite (fig.11).



**Figure 11** : Différentes sphères tronquées en fonction de l'angle de contact ( $\alpha$ ) avec le support d'après Boistelle<sup>[1]</sup>.

L'énergie libre critique d'activation de la nucléation hétérogène est donc le produit d'une fonction de  $\alpha$  et de l'énergie libre critique de la nucléation homogène. (eq.I-31)

$$\Delta G_{het}^* = f(\alpha) \cdot \Delta G_{hom}^* \quad \text{Eq I-31}$$

Ci-dessous, trois conditions particulières :

- $\alpha = 180^\circ$ , le germe est simplement posé sur le support, sans affinité, l'énergie d'activation doit être la même que s'il n'y avait pas de support, donc  $\Delta G_{het} = \Delta G_{hom}$
- $\alpha = 90^\circ$  la sphère est coupée en deux, l'énergie d'activation doit être divisée par deux.
- $\alpha$  tend vers  $0^\circ$ , l'énergie doit, elle aussi, tendre vers 0.

Soit : (eq. I-32 et I-33)

$$\Delta G_{het}^* = \Delta G_{hom}^* \cdot \frac{(2 + \cos \alpha)(1 - \cos \alpha)^2}{4} \quad \text{Eq I-32}$$

$$\Delta G_{het}^* = \Delta G_{hom}^* \cdot \left( \frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \alpha + \frac{1}{4} \cos^3 \alpha \right) \quad \text{Eq I-33}$$

D'un point de vue thermodynamique, la nucléation hétérogène a besoin de beaucoup moins d'énergie que la nucléation homogène, nous allons maintenant étudier cette différence d'un point de vue cinétique.

- *Cinétique*

Volmer<sup>[18]</sup> a établi la fréquence de nucléation hétérogène, mais dans un souci d'homogénéité des expressions, nous présenterons ici celle établie par Mersmann<sup>[28]</sup> similaire à la fréquence de nucléation homogène (eq. I-30) :

$$J_{hom} = \frac{3}{2} \varphi_{het} D_{AB} (C_i^S N_A)^{5/3} \left( \frac{C_i^L}{C_i^S} \right)^{7/3} \sqrt{a \ln \frac{C_i^S}{C_i^L} \beta^{7/3}} \exp \left[ -\frac{16\pi}{3} f(\alpha) a^3 \frac{\ln^3 \left( \frac{C_i^S}{C_i^L} \right)}{\ln^2 \beta} \right] \quad \text{Eq I-34}$$

On y trouve les deux termes,  $\varphi_{het}$  et  $f(\alpha)$  qui représentent l'hétérogénéité de la nucléation. Plus précisément,  $f(\alpha)$  représente l'affinité du germe pour le substrat et  $\varphi_{het}$  est un facteur multiplicatif du terme pré-exponentiel qui traduit la dépendance de la fréquence de

nucléation par rapport à la surface constituée des éléments étrangers de la phase mère (parois, poussières, particules étrangères,...)

Dans la cristallisation industrielle en continue, on rencontre simultanément de la nucléation primaire homogène et hétérogène. Par contre, Klein et al.<sup>[29]</sup>, remarquent que lors de cristallisation en batch, comme dans l'industrie pharmaceutique, la nucléation hétérogène prédomine sur la nucléation homogène. En effet, la sursaturation critique qui définit la limite de la zone métastable, est plus faible pour la nucléation primaire hétérogène que pour la nucléation primaire homogène, il est donc nécessaire de trouver un moyen d'abaisser la sursaturation critique de la nucléation primaire homogène afin de la favoriser par rapport à la nucléation primaire hétérogène, celle-ci engendrant des problèmes de récupération des cristaux, ou encore de pureté de ceux-ci.

### c. La nucléation secondaire

Contrairement à la nucléation primaire, la nucléation secondaire n'existe qu'en solution et peut se produire à de très faibles sursaturations puisqu'il s'agit de germes issus de cristaux déjà présents en solution<sup>[29]</sup>. Du point de vue du mécanisme, les choses ne sont pas clairement établies (les mécanismes proposés sont présentés plus loin). Par contre le modèle cinétique phénoménologique, avec une équation du type de l'équation I-35 décrit relativement bien le phénomène.

Parmi les différents auteurs qui se sont intéressés à la question, voilà l'expression donnée par S.J. Jancic<sup>[30]</sup> : (eq.I-35) :

$$J_s = k_s \varepsilon^h \Delta C^i M_T^j \quad \text{Eq I-35}$$

Avec  $J_s$  la fréquence de nucléation secondaire ( $m^{-3}.s^{-1}$ ),

$k_s$ , une constante dépendant de la température et de la nature de l'agitation,

$\varepsilon$  l'énergie transmise par l'agitateur, par unité de masse de suspension (W/kg),

$\Delta C = C - C_s$ , est la sursaturation ( $kg/m^3$ ) et

$M_T$  la concentration des cristaux en suspension dans la solution ( $kg/m^3$ ).

Les exposants ont des valeurs limites dépendantes de la nature des cristaux et des conditions hydrodynamiques :  $i$  est compris entre 0,5 et 3,

$j$  entre 0,5 et 2,

$h$  est compris entre 0 et 1, en général.

L'agitation joue un rôle primordial sur la cinétique de la nucléation secondaire puisqu'elle assure une homogénéité de la concentration en soluté mais aussi en cristaux de soluté.

On distingue plusieurs cas de nucléations secondaires :

- La brisure, les cristaux présents dans la solution sont brisés par l'agitation, lors d'un phénomène de macroattrition, et ces brisures sont le support pour de nouveaux microcristaux, ou bien les cristaux introduits ont des microcristaux collés en surface. On appelle cette nucléation, la nucléation secondaire apparente, elle est indépendante de la sursaturation.
- L'ensemencement, ici les cristaux sont introduits volontairement pour en former des nouveaux à leur surface. Elle est appelée nucléation secondaire vraie.

Nous allons voir à présent la cinétique de chacun des deux types de nucléation secondaire.

- *La nucléation secondaire apparente*

Elle se produit donc lorsqu'il y a des microcristaux à la surface des cristaux introduits pour l'ensemencement de la solution, ou bien par attrition par l'agitation de cristaux déjà présents dans la solution qui se brisent pour donner de nouveaux germes.

La fréquence de nucléation correspondant à ce phénomène d'attrition dépend des propriétés physiques des matériaux (dureté, module de cisaillement, résistance de fracture), elles sont représentées par le paramètre MP. Le phénomène d'attrition présente deux cas, le premier est le cas d'arrachement, il a pour équation :

$$J_{att} \approx MP \varphi \varepsilon_{eff} \sigma_{eff}^2 \quad \text{Eq I-36}$$

Avec  $\varphi$ , la concentration volumique des cristaux en suspension ( $\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$ ),

$\varepsilon_{eff}$ , la puissance spécifique de l'agitateur ( $\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),

$\sigma_{eff}$ , la sursaturation relative.

Dans le cas de pure brisure, on a la même équation mais sans  $\sigma_{eff}$ , la sursaturation relative.

- *La nucléation secondaire vraie ou surfacique*

Les faces des cristaux présentent parfois une croissance dendritique ou une certaine rugosité, d'autant plus importante que la valeur de la sursaturation est plus élevée. Dans la couche de diffusion cristal-solution se trouvent des embryons ou agrégats de molécules ordonnées. Sous l'effet des forces de cisaillement du liquide et des heurts entre cristaux et parois, ou entre cristaux, les dendrites et agrégats de molécules se détachent pour donner naissance à de nouveaux cristaux. Ce mécanisme dépend cependant beaucoup de la sursaturation, qui entraîne la croissance ou la dissolution des agrégats détachés. Ce mécanisme appelé dans la littérature internationale "collision breeding", est très répandu dans les cristallisoirs industriels.

La fréquence de nucléation correspondant au mécanisme de nucléation surfacique est principalement fonction du coefficient de diffusion  $D_{AB}$  ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et de la sursaturation  $\beta$ :

$$J_{surf} = \frac{E6\varphi D_{AB}}{L_{32} d_m^4} \exp \left[ -\frac{\pi}{9} \frac{\ln^2 \left( \frac{C_i^S}{C_i^L} \right)}{\ln \beta} \right] \quad \text{Eq I-37}$$

Avec E le facteur d'efficacité compris entre 0 et 1

$L_{32}$  le diamètre de Sauter moyen (m)

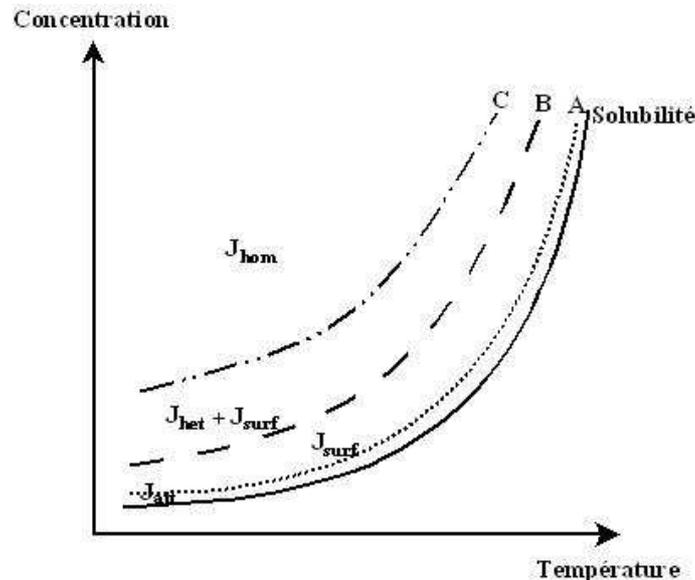
$d_m$ , le diamètre moléculaire (m)

Le diamètre de Sauter, c'est le diamètre du cristal dont le rapport volume/surface est le même que le rapport volume/surface moyen calculé sur tous les cristaux de l'échantillon.

La cinétique de nucléation semblant être la grandeur influencée par les champs externes, il s'agit donc de connaître les domaines de prédominance de chaque mécanisme de nucléation.

#### d. Domaines de prédominance de chaque mécanisme

Mersmann dresse dans son article un tableau récapitulatif<sup>[31]</sup>, regroupant les différents mécanismes de nucléation avec leur zone de domination en fonction de la sursaturation, accompagnés de leur équation cinétique. Voici le diagramme (fig.12) des quatre domaines de prédominance de chaque mécanisme de nucléation, délimités par les courbes A, B et C.



**Figure 12** : Diagramme représentant les zones de nucléations différentes

On distingue donc quatre zones :

- La zone sous la courbe A, ici on ne gardera que les commentaires liés à la nucléation et non ceux liés à la croissance. Les nucléi sont produits par l'attrition, c'est donc elle qui contrôle le domaine, avec  $J_{att}$  comme fréquence de nucléation prédominante. C'est un domaine où la nucléation est très peu influencée par la sursaturation, la nucléation est non active.
- Dès que l'on passe au-dessus de la courbe A, la nucléation devient active, la fréquence de nucléation varie très fortement en fonction de la sursaturation, c'est-à-dire qu'il se forme un nombre important de nucléi pour faire baisser rapidement la sursaturation. Dans ce domaine, on a très peu de nucléation hétérogène, même en présence de particules étrangères. Il est donc naturel que la nucléation secondaire de surface, accompagnée de la formation de clusters, soit décisive.  $J_{surf}$  paraît être la fréquence de nucléation dominante sur le domaine compris entre les courbes A et B.
- Entre les courbes B et C, les nucléi sont formés par nucléation hétérogène et nucléation de surface, celle-ci étant une nucléation provoquée par l'arrachement d'un groupe d'unités de surface, situé à la surface du cristal, et d'une taille supérieure à celle du rayon critique.  
Plus la solution est pure, plus la nucléation de surface sera dominante, par contre dans une solution où se trouvent des impuretés, dans le cas où il n'y a pas de cristaux

présents, la domination de la fréquence de nucléation hétérogène ( $J_{\text{het}}$ ) dépend de l'affinité du soluté avec le support, ie les impuretés.

- Au-dessus de la courbe C, et même proche de celle-ci, c'est la nucléation homogène,  $J_{\text{hom}}$ , qui domine.

*e. Les différents paramètres 'classiques' influençant la nucléation*

On ne fait varier, ici, qu'un seul paramètre à la fois, afin d'étudier précisément l'influence de chaque paramètre sur la nucléation.

- *La sursaturation*

En croissance cristalline, c'est le paramètre qui a le plus d'importance car c'est la force motrice de la nucléation : (eq. I-38)

$$\Delta\mu = kT \ln \beta \quad \text{Eq I-38}$$

Avec  $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ , la constante de Boltzmann et T la température (K).

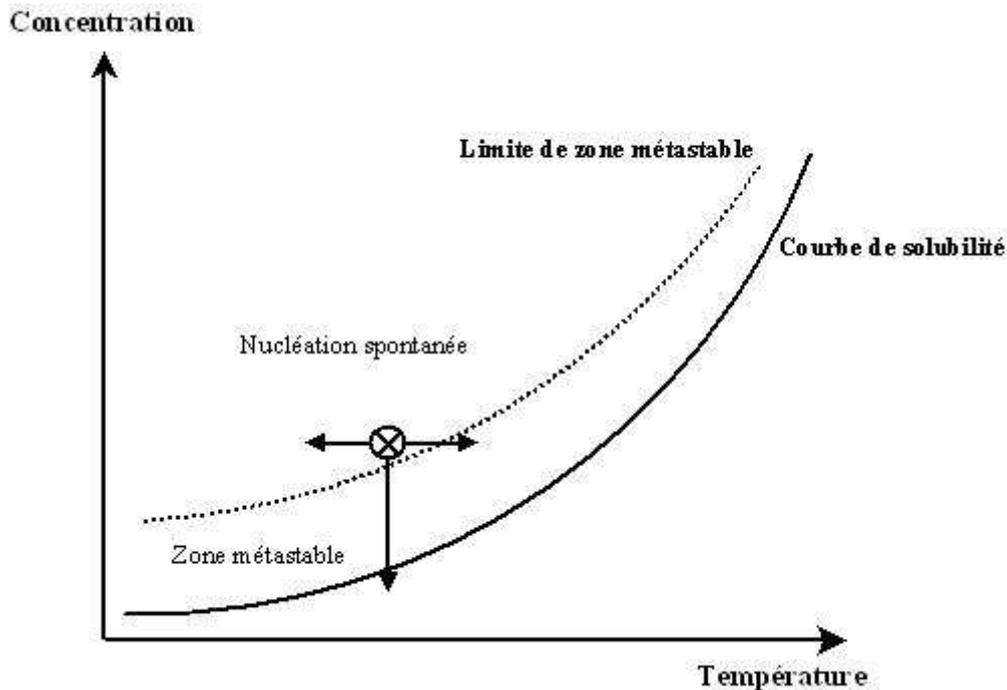
Au niveau de la thermodynamique, si on augmente  $\beta$ , l'énergie d'activation,  $\Delta G^*$  diminue ainsi que le rayon critique  $r^*$ .

En ce qui concerne la cinétique, on sait déjà qu'il faut dépasser la limite de zone métastable pour nucléer, il faut donc que la sursaturation établie dans le milieu soit supérieure à la sursaturation critique  $\beta^*$ . Pour avoir une idée bien précise de l'influence de la sursaturation sur la nucléation, il faut se reporter au diagramme suivant (fig 13).

On ne s'intéressera ici qu'aux espèces neutres qui ne se dissocient pas dans la solution. Dans le cas d'électrolytes, on les supposera totalement dissociés.

On rappelle que la sursaturation peut être exprimée comme un rapport de concentrations, si celles-ci sont faibles, soit  $\beta = C/C_S$ , il suffit donc d'agir sur la concentration de la phase considérée dans la solution, C, ou sur la concentration en équilibre dans la solution,  $C_S$ , pour faire varier  $\beta$ .

Pour faire augmenter C, ou encore  $\beta$ , il suffit de rajouter du soluté dans le milieu, ou de faire évaporer une partie du solvant.



**Figure 13** : Exemple de courbe de solubilité directe

Par contre si  $C$  reste constante, il faut agir d'une autre manière sur  $\beta$ , en faisant varier  $C_s$ , donc s'il s'agit d'une solubilité directe, on peut augmenter  $\beta$  en diminuant la température, ou en ajoutant un co-solvant dans lequel le soluté est moins soluble.

Pour diminuer  $\beta$ , toujours dans le cas d'une solubilité directe, il suffit d'augmenter la température.

Pour une solubilité inverse, c'est le contraire, diminuer  $T$  fait baisser la sursaturation.

- *L'énergie interfaciale*

Cette grandeur traduit l'affinité entre le solvant et le soluté cristallisé, donc plus l'énergie interfaciale est grande, plus la solubilité du cristal est faible, et donc la nucléation difficile.

D'un point de vue thermodynamique, grâce aux équations du rayon critique (eq. I-19) et de l'énergie d'activation critique (eq. I-20), on sait que la variation de ces deux termes est proportionnelle à l'énergie interfaciale. Donc une diminution de l'énergie interfaciale entraîne une diminution de l'énergie d'activation critique et du rayon critique, ce qui correspond à une nucléation plus facile.

Sur le plan cinétique, on peut constater que l'énergie interfaciale intervient dans plusieurs expressions de fréquences de nucléation (eq. I-30, I-34). Dans l'expression de la fréquence de nucléation primaire homogène (eq. I-30), on s'aperçoit que l'énergie interfaciale est présente à la fois dans le terme exponentiel à la puissance trois et dans le terme pré-exponentiel, sous la racine carrée. On peut donc penser que lorsqu'on diminue l'énergie interfaciale, le terme pré-exponentiel diminue mais moins que le terme exponentiel n'augmente, on augmenterait ici la fréquence de nucléation.

Pourtant, dans la réalité, ça n'est pas le cas, d'autres paramètres sont à prendre en compte, comme la cinétique.

Comme nous avons vu plus tôt, Guggenheim propose une expression de l'énergie interfaciale<sup>[21]</sup> (eq. I-28) :

$$\gamma = akT(C_i^S N_A)^{2/3} \ln\left(\frac{C_i^S}{C_i^L}\right) \quad \text{Eq I-28}$$

Avec a, un coefficient d'ajustement compris en 0,1 et 0,6 selon les hypothèses, dans le cas de Guggenheim il est de 0,414,

$C_i^S$ , la concentration de solide dans la solution,

$C_i^L$ , la concentration de soluté dans la solution, soit la solubilité,

$N_A$ , le nombre d'Avogadro,

k, la constante de Boltzmann et

T, la température.

Les différentes façons de faire varier  $\gamma$

L'énergie interfaciale dépend essentiellement de la capacité d'adsorption du solvant sur le cristal. Il s'agit donc de trouver un moyen de faire varier la quantité de solvant adsorbée.

- *Le solvant*

La nature du solvant détermine sa capacité d'adsorption sur le cristal, donc en changeant de solvant, on agit sur l'énergie interfaciale. Leci et al. montrent l'effet du solvant dans leurs travaux sur le 1,4 di(tert-butyl)benzène<sup>[32]</sup>. Le solvant est très bon lorsque la sursaturation à laquelle la nucléation a lieu est basse, de plus comme nous l'avons vu avant, plus la solubilité est élevée, plus la nucléation est facile.

- *Les additifs*

Les additifs vont s'adsorber sur les cristaux, pour permettre un meilleur contrôle de la cinétique de nucléation.

On peut donc élargir ou rétrécir la zone métastable, en ajoutant des additifs<sup>[28, 33, 34]</sup>. L'adsorption de l'additif sur le cristal diminue l'énergie interfaciale cristal-solution du système. D'un point de vue thermodynamique, cela permet d'augmenter la nucléation, mais d'un point de vue cinétique, cela risque de gêner l'attachement des molécules sur le germe et donc de ralentir la nucléation. L'effet obtenu dépend donc de la prédominance d'un domaine plutôt que l'autre. En général, la thermodynamique contrôle la nucléation car la cinétique est très rapide, mais en ajoutant des additifs, on ralentit la cinétique, c'est donc elle qui prend le pas sur la thermodynamique, elle contrôle la nucléation.

- *Le pH*

Dans ses travaux<sup>[35]</sup>, Mersmann met en évidence l'importance du pH lors de la nucléation, c'est à dire que le pH agit sur la solubilité du solide si celui-ci possède des propriétés acido-basiques à l'état dissout.

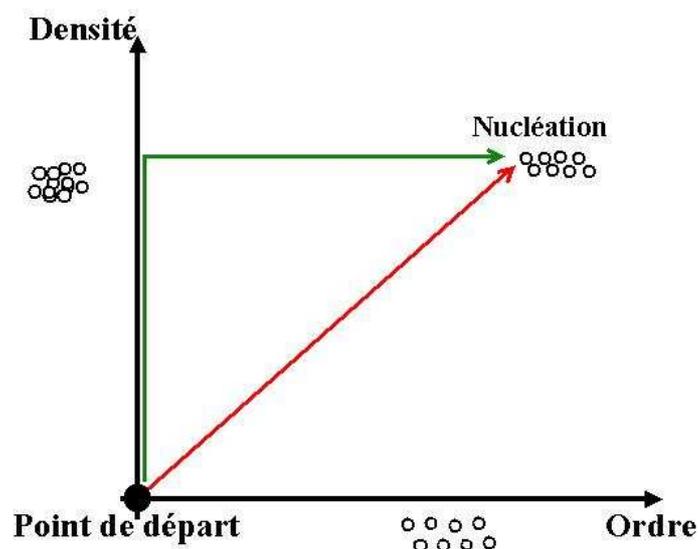
Moins connus, il existe aussi des travaux sur l'influence du pH sur la zone métastable. En effet, Ushasree et al. <sup>[36]</sup> montrent l'influence du pH sur la largeur de la zone métastable du zinc tris(thiourea)sulfate : lorsque le pH diminue, la zone métastable a tendance à se rétrécir. On vérifie, ici, que l'augmentation de la sursaturation entraîne aussi une diminution de la zone métastable.

- *L'agitation*

L'influence de l'agitation a été étudiée par Barata et al. <sup>[37]</sup>, ils ont ainsi constaté qu'à partir d'une certaine valeur, l'augmentation de la puissance d'agitation induit une diminution de la zone métastable. Klein et al. <sup>[29]</sup> se sont aussi intéressés à la cristallisation en milieu agité, mais plus d'un point de vue industriel. L'agitation dans une cuve favorise les transferts de chaleur et de matière. Cette amélioration du transfert de chaleur est utile dans le cas d'une cristallisation par refroidissement. Par contre le transfert de matière est nécessaire dans le cas de la croissance des cristaux, mais aussi dans le cas de la nucléation. C'est cette amélioration du transfert de matière qui réduit sensiblement la largeur de la zone métastable dans un milieu agité. De plus le mobile d'agitation peut devenir un support pour de la nucléation primaire hétérogène. L'agitation intervient aussi dans la nucléation secondaire, en effet elle permet d'avoir une suspension homogène des cristaux déjà nucléés, ce qui empêche le mottage, mais aussi elle favorise la nucléation secondaire par brisure des cristaux déjà présents dans le cristalliseur.

## ii. La théorie de nucléation en deux étapes

Il nous reste ici à évoquer la théorie de nucléation de Kashchiev <sup>[13]</sup> qui contrairement à la théorie classique qui postule que la nucléation a lieu en une seule étape, propose une nucléation en deux étapes où la densification des molécules a d'abord lieu puis il y a un arrangement ordonné des molécules, comme le montre la figure 14.



**Figure 14** : Présentation des principes des deux théories de nucléation, en **rouge** la théorie classique de nucléation pour tout changement de phases (condensation, cristallisation,...) en une unique étape et en **vert** la théorie de Kashchiev en deux étapes.

Pour que la nucléation de la phase cristalline ait lieu, il faut d'abord que la phase dense ait nucléé. C'est pour cela que l'équation de cinétique de la théorie en deux étapes diffère de celle de la théorie classique, car il faut y inclure la cinétique de formation de la phase dense, plus la probabilité que cette phase dense donne lieu, ou non, à la nucléation d'une phase cristalline (eq.I-39).

$$N_c(t) = N_0 \left\{ 1 - \exp \left[ - \int_0^t j_c(t') v_0 dt' \right] \right\} \quad \text{eq I-39}$$

Avec  $N_c$ , le nombre de cristaux nucléés par ce mécanisme au temps  $t$   
 $N_0$  le nombre de phases denses nucléées d'un volume constant  $v_0$  ( $\text{m}^3$ )  
 $j_c$  la fréquence de nucléation des cristaux au sein des phases denses ( $\text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Nous verrons dans la seconde partie de manuscrit pourquoi cette théorie nous semble plus plausible, du fait de l'efficacité des champs externes pour améliorer/accélérer la nucléation.

Dans cette partie, nous avons vu les différentes théories existantes sur la nucléation, ainsi que les paramètres 'classiques' qui pourraient influencer la nucléation que ce soit d'un point de vue thermodynamique ou d'un point de vue cinétique.

## II. Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les différentes molécules utilisées dans le cadre de cette étude, ainsi que le matériel nécessaire à la réalisation des expériences mais aussi à la caractérisation des produits obtenus. Et enfin, les modes opératoires des expériences menées seront décrits.

### 1. Matériel

Le choix du matériel comprend non seulement l'ensemble de l'appareillage nécessaire à notre étude, que ce soit pour réaliser les expériences ou caractériser les produits obtenus, mais aussi le choix des molécules en fonction de leurs caractéristiques. C'est pour cela que la présentation du matériel comprend une description des molécules puis une description de l'appareillage.

#### *a. Les molécules étudiées*

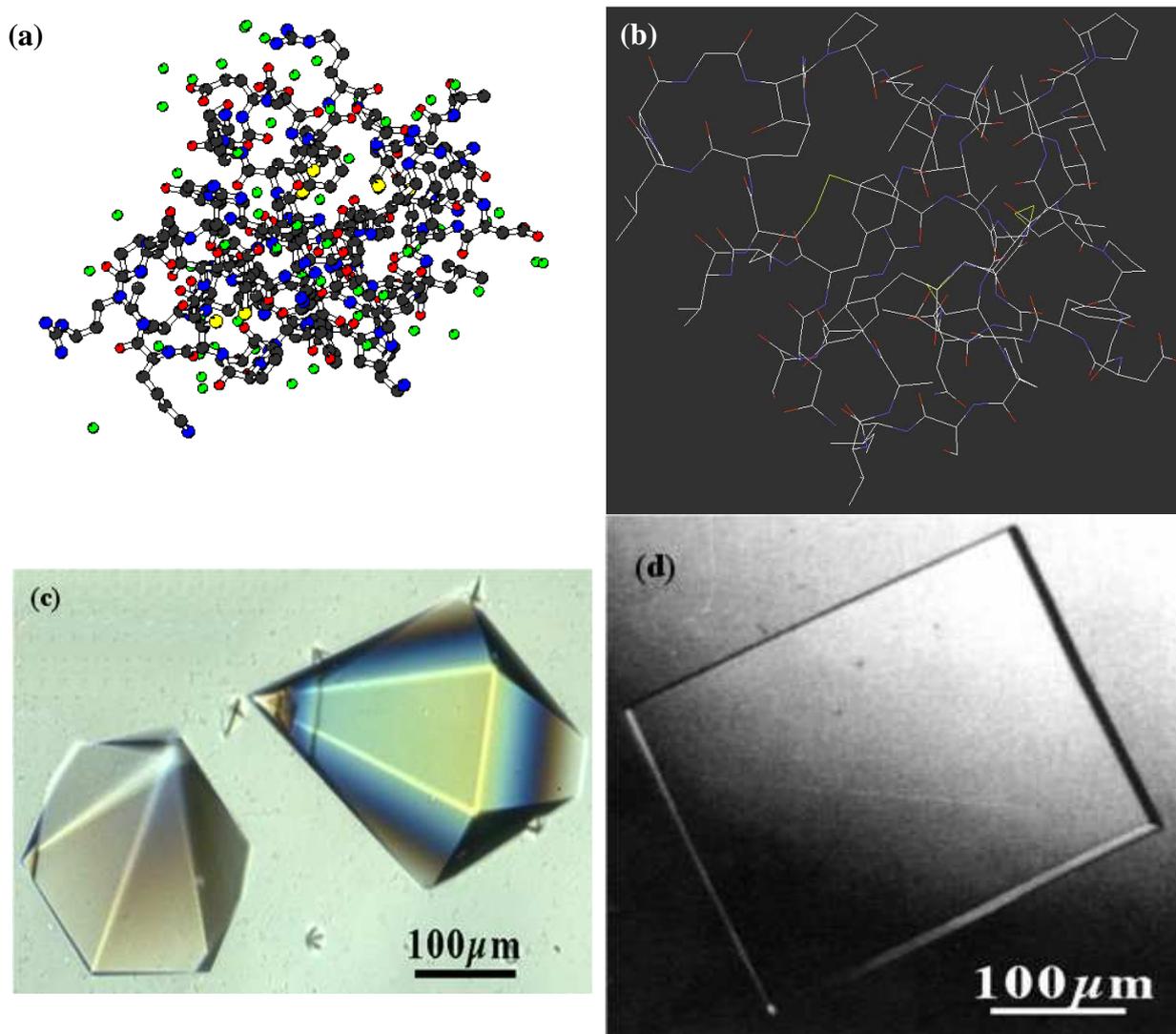
Cette étude nécessitait tout d'abord des molécules modèles, faciles d'utilisation pour mettre au point les montages expérimentaux, afin de pouvoir ensuite les appliquer aux molécules d'intérêt pharmaceutique. Nous verrons donc deux paragraphes présentant successivement les molécules modèles et les molécules pharmaceutiques.

- *Les molécules modèles*

Elles ont été choisies pour leurs propriétés, vis-à-vis de la cristallisation, bien connues et pour leur facilité de mise en œuvre. En effet, nous avons choisi des molécules dont on connaît bien le diagramme de phases et qui, de plus, sont solubles dans l'eau, afin de faciliter la mise en place des montages expérimentaux, on peut aussi préciser qu'elles sont facilement disponibles, et leur coût est faible. De plus, la présence de plusieurs polymorphes lors de la cristallisation de certaines d'entre elles nous permet d'étudier aussi la sélectivité polymorphique des montages.

#### Le BPTI

Depuis plus d'une décennie, l'Inhibiteur Pancréatique Bovin de Trypsine (BPTI), est une molécule dont la cristallisation est étudiée au laboratoire. C'est un principe actif pharmaceutique, sous forme d'une solution injectable d'aprotinine, dont le nom commercial Bayer (qui nous fournit gracieusement le BPTI) est le Trasylol®. Il est utilisé comme inhibiteur de plusieurs enzymes et en particulier, il servait à traiter les syndromes hémorragiques et à prévenir les risques hémorragiques dans le cas des chirurgies complexes comme la chirurgie cardiaque ou hépatique. Il s'agit d'une petite protéine de masse  $M_w = 6511$  Da composée d'une seule chaîne de 58 acides aminés repliée en forme de poire. Son site actif se trouve sur le sommet de la boucle ce qui le rend particulièrement facile d'accès. De plus, trois ponts di-sulfure rendent la molécule très stable seul un des trois est exposé au solvant, ce qui le rend facilement et sélectivement réductible.



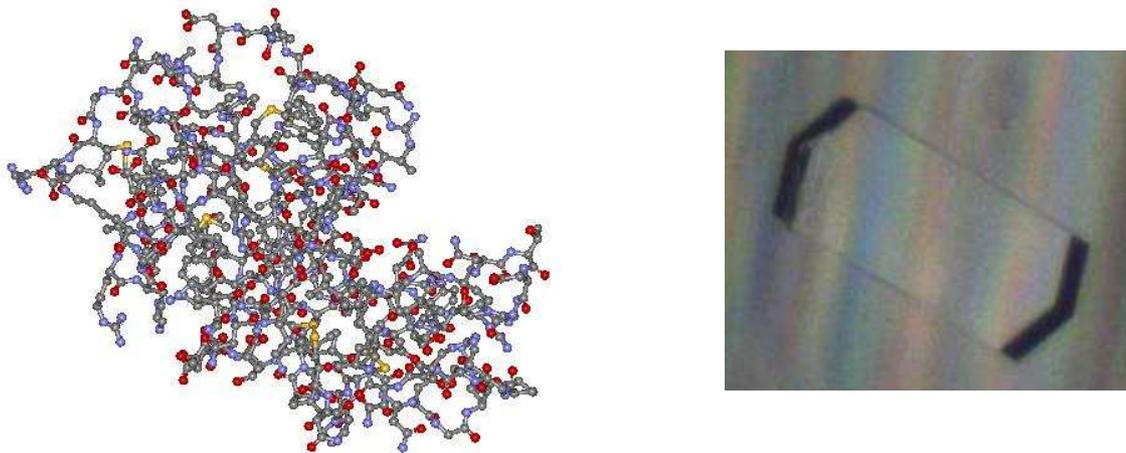
**Figure 15 :** (a) et (b) Représentations de la molécule de BPTI. (c) cristaux bipyramidaux, phase hexagonale. (d) cristaux en forme de plaquettes, phase monoclinique.

Son comportement en cristallisation est très intéressant car à  $\text{pH} = 4,5$  et en présence de 1,4 à 2,3M de NaCl, cette protéine a une solubilité inverse. En effet, en fonction du milieu (sel, tampon,  $\text{pH}$ ,...), le BPTI présente différents polymorphes, par exemple, en présence de NaCl allant de 1,4 à 2,3M, la phase hexagonale (fig.15c) a une solubilité inverse par rapport à la température, alors qu'en présence de KSCN, allant de 250 à 350mM, la phase monoclinique (fig.15d) a une solubilité directe avec la température.

A  $\text{pH}$  acide, le BPTI est présent en solution sous formes de monomères et de décimères, à ce  $\text{pH}$  l'unité de croissance des cristaux de BPTI est le décimère. Par contre pour un  $\text{pH}$  basique, le monomère seul est présent en solution et l'unité de croissance des cristaux de BPTI est le monomère<sup>[38]</sup>. En ce qui nous concerne, notre  $\text{pH}$  de travail étant 4,5 avec une concentration en NaCl de 1,6M, nous savons qu'en solution monomère et décimère sont présents, et que seul le décimère cristallise (pour la préparation du tampon, voir annexe 1). De plus, au  $\text{pH}$  auquel on travaille, le BPTI est chargé positivement puisque son point isoélectrique ( $\text{pH}$  pour lequel la protéine est électriquement neutre) est de 10,5, ce qui est cohérent avec la présence de 10 résidus basiques (lysines et arginines) au sein de la séquence.

## Le Lysozyme

Le Lysozyme de blanc d'œuf est une protéine qui a une masse de 14,6 kDa. C'est une protéine globulaire formée d'une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés. Il s'agit de l'antibiotique et antibactérien le plus puissant actuellement<sup>[39-41]</sup>, et il est présent naturellement en forte concentration dans les larmes, la salive et le sérum des vertébrés, cependant celui qu'on trouve chez les vertébrés est formé d'une chaîne polypeptidique de 130 acides aminés.

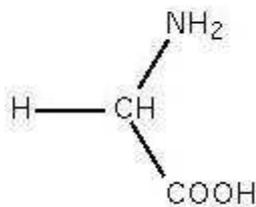


**Figure 16** : Représentation de la molécule de Lysozyme de blanc d'œuf et cristal.

Il est présent en solution sous forme de monomères. A pH = 4,5, le Lysozyme est électriquement chargé positivement puisqu'il contient de 10 à 12 charges positives, son pI étant de 11,2. C'est une protéine intéressante à étudier car elle est petite et pas très exigeante sur les conditions de cristallisation.

## La glycine

La glycine est une petite molécule organique, c'est le plus petit des acides aminés, dont la formule est donnée en figure 17, qui est soluble et stable dans l'eau.



**Figure 17** : Formule de la glycine.

Elle présente plusieurs polymorphes,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>[42]</sup> qui cristallisent sous différentes conditions expérimentales. Le polymorphe  $\gamma$  est le plus stable, quelles que soient les conditions pour des températures assez faibles, il présente la plus faible énergie libre et donc la solubilité la plus basse, on l'obtient à partir de solutions aqueuses de glycine dans lesquelles on ajoute un acide ou une base<sup>[43]</sup>. La forme  $\beta$  est, de toutes façons, la plus instable quels que soient la température et le solvant<sup>[44]</sup> (c'est un vrai polymorphe, car son ordre de

stabilité ne change pas avec le solvant), elle est monotropique par rapport aux deux autres formes, le seul moyen de l'obtenir est en ajoutant de l'éthanol à une solution aqueuse de glycine. La forme  $\alpha$  est énantiotropique par rapport à la forme  $\gamma$ , elle devient plus stable pour des températures élevées. A température ambiante, la transformation de la forme  $\alpha$  à la forme  $\gamma$  ne se fait pas spontanément<sup>[45]</sup>, il faut être en présence d'humidité et surtout travailler à des températures de l'ordre de 40°C. Récemment, il a été découvert deux autres formes solides,  $\delta$  et  $\epsilon$ , cristallisées sous hautes pressions<sup>[46]</sup>.

Elle est donc une excellente molécule modèle, puisqu'elle est soluble et stable dans l'eau et présente plusieurs polymorphes. La glycine a deux pKa, dus à ses groupements acide et basique de 2,4 et 9,7 de pH chacun. Son point isoélectrique est de 6,15.

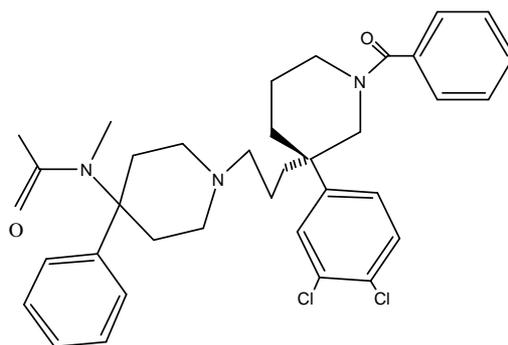
Pour l'instant son utilisation se limite à un pouvoir sucrant. La glycine est un acide aminé non essentiel utilisé par l'organisme dans la synthèse de protéines. On la trouve dans les aliments comme le poisson, la viande et les produits laitiers. Récemment des études menées par des chercheurs espagnols<sup>[47]</sup> ont montré que des apports en glycine pouvaient soulager les patients atteints d'arthrose. Une entreprise Japonaise en partenariat avec un laboratoire de recherche de l'école de médecine de l'Université de Jikei ont mené des recherches sur les effets bénéfiques de la prise de glycine dans le cadre de troubles du sommeil.

- *Les molécules Sanofi-Aventis*

Les molécules Sanofi-Aventis, utilisées dans cette étude, sont principalement solubles dans des solvants organiques, ce qui pose des problèmes d'un point de vue expérimental. En effet, les solvants organiques étant plus volatils que les solvants aqueux, des problèmes d'évaporation viennent s'ajouter aux difficultés expérimentales. De plus, pour certaines expériences, pour éviter l'évaporation nous utilisons de l'huile de paraffine que l'on dépose sur la surface de la solution, or dans le cas de solvants organiques, l'huile de paraffine se trouve être plus dense, elle tombe donc en dessous de la solution. Enfin en ce qui concerne la microfluidique, les solvants organiques ont plus ou moins d'affinité avec l'huile silicone, ce qui rend les gouttes 'carrées' au lieu d'être bien rondes, ce qui change la nature du solvant au sein de la goutte, ainsi que la concentration en soluté étant donné qu'une partie du solvant se mélange avec l'huile.

#### Le SR 142 801

La molécule SR 142 801 (fig.18) est utilisée dans le cadre d'une activité pharmacologique, comme produit pharmaceutique actif en tant qu'antagoniste des récepteurs NK3 (récepteurs à la Neurokinine). L'utilisation de cette molécule est prévue dans le traitement de la schizophrénie. Ce principe actif est le *(R) (N)-[1-[3-[1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl) piperidin-3-yl] propyl]-4-phenylpiperidin-4-yl]-N-methylacetamide* de formule brute  $C_{35}H_{41}Cl_2N_3O_2$  et de masse molaire 606,6 g/mol.



**Figure 18** : Formule développée du SR 142 801.

Cette molécule cristallise sous deux formes solides distinctes (deux polymorphes). La forme I est la forme utilisée dans la formulation du médicament, il s'agit d'une forme qui cristallise en plaquettes, on parle de faciès tabulaire. Alors que la forme II cristallise en forme d'aiguilles, on parle de faciès aciculaire.

### L'Irbésartan

L'Irbésartan est un principe actif commercialisé par la société Sanofi-Aventis pour le traitement de l'hypertension. Son activité antihypertensive, résulte du blocage spécifique et compétitif des récepteurs angiotenseurs II AT1.

Sa formule brute est  $C_{25}H_{28}N_6O$  (fig.19) *2-butyl-3-[4-[2-(1H-tétrazol-5-yl)phényl]benzyl]-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-èn-4-one*. Elle possède une masse moléculaire de 428,54 g/mol.

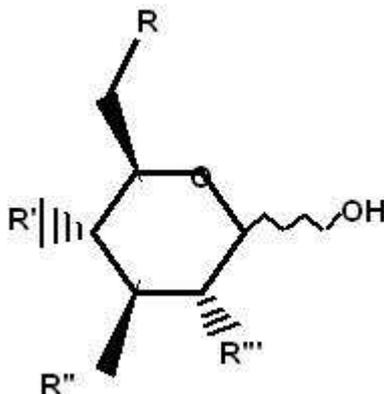


**Figure 19** : Equilibre tautomérique de l'Irbésartan établi en solution.

La molécule d'Irbésartan possède divers groupements fonctionnels et notamment un cycle tétrazole avec un hydrogène monosubstitué ce qui donne lieu à un équilibre tautomérique en solution. Chacun des deux tautomères peut être isolé sous forme solide. Il s'agit dans ce cas de pseudo-polymorphisme, car les deux formes cristallines sont issues de formes tautomériques différentes, on parle alors de desmotropie.

## Le sucre S

Le sucre S est un intermédiaire réactionnel dans la production d'un principe actif pharmaceutique. Il appartient à la famille des sucres. Sa formule brute est  $C_{10}H_{17}N_3O_6$  (fig.20). Il présente un équilibre anomérique en solution.



**Figure 20** : Formule développée du sucre S, la position du groupement OH détermine l'anomère.

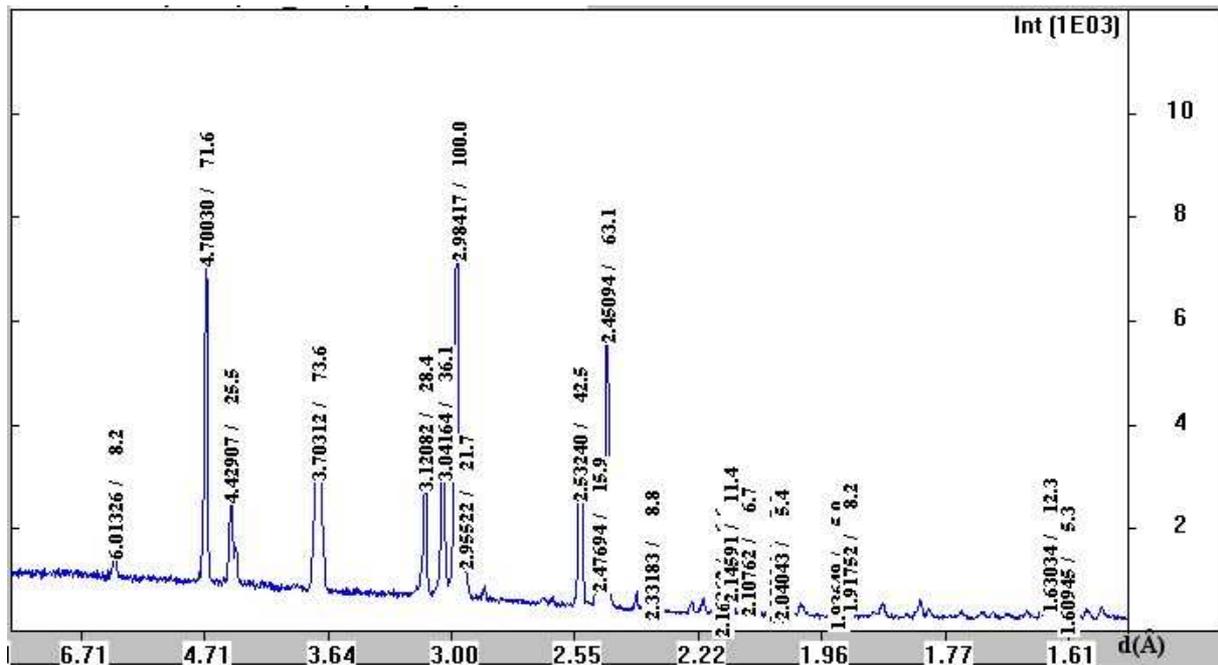
L'anomère  $\alpha$ , i.e. l'anomère dextrogyre, est le seul à cristalliser. La position du groupement OH dans l'anomère  $\alpha$  engendre moins de gêne stérique, il a donc naturellement plus de facilités à cristalliser.

### *b. Les méthodes de caractérisation*

Toutes les molécules présentées ci-dessus doivent être caractérisées que se soit sous leur forme dissoute ou sous leur forme cristalline. Pour cela, nous allons voir dans ce paragraphe, les différentes méthodes de caractérisation que nous avons utilisées.

- *La diffraction des rayons X*

La diffraction des rayons X est une technique de caractérisation du solide qui est tout aussi bien utilisée sur des poudres cristallines que sur des monocristaux. L'utilisation sur des poudres permet une identification de la substance cristalline (fig.21) alors que l'utilisation sur des monocristaux permet sa résolution structurale : groupe d'espace, position et conformation de la molécule dans la maille.



**Figure 21 : Diffractogramme de poudre de la glycine sous la forme  $\alpha$ .**

Dans la technique de poudre, les cristaux sont considérés comme parfaitement désorientés les uns par rapport aux autres, entraînant la diffraction du faisceau incident suivant tous les plans réticulaires. Les faisceaux diffractés sont alors recueillis soit sur des films photographiques, soit à l'aide de compteurs électroniques linéaires ou courbes. Dans ce dernier cas, un ordinateur analyse directement les données et fournit en quelques minutes soit les angles de diffraction, soit les distances entre plans réticulaires, grâce à la loi de Bragg :

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Eq II-1}$$

avec,  $d$  la distance interréticulaire (distance entre deux plans cristallographiques)

$\theta$  l'angle de Bragg = moitié de l'angle de déviation

$n$  l'ordre de diffraction qui est toujours un nombre entier

et  $\lambda$  la longueur d'onde des rayons X.

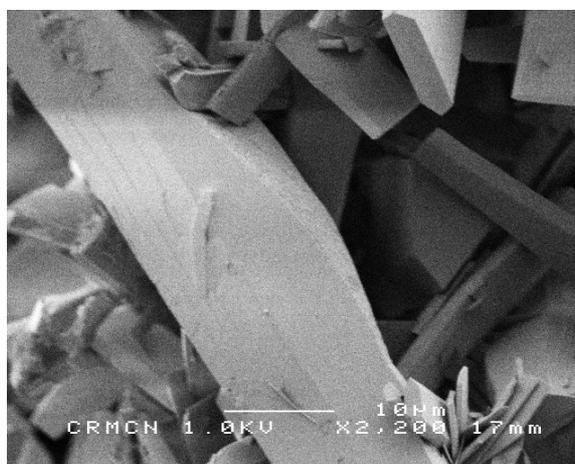
De façon pratique, le diffractogramme, ou cliché de poudre selon l'ancienne terminologie, se présente comme un enregistrement continu où, à partir d'une ligne de base, émerge un certain nombre de pics. Ces pics sont d'autant plus nombreux que la symétrie du cristal est faible. Chacun de ces pics a, théoriquement, une intensité caractéristique qui correspond à un facteur de structure relié à la densité électronique des plans cristallins, mais l'orientation préférentielle que peuvent prendre les cristaux à cause de leur faciès, peut induire des variations d'intensité très importantes. Chaque phase ou polymorphe a un diffractogramme propre. Les pics de diffraction sont caractéristiques du composé et de sa phase cristalline.

Le diffractomètre utilisé dans cette étude est de type Debye Scherrer, comprenant un générateur de rayons X à anode de cuivre ( $\lambda=1,54 \text{ \AA}$ ), un monochromateur de quartz courbe, un collimateur et un détecteur courbe Inel à ionisation de gaz. On rappelle que dans cette technique les cristaux sous forme de poudre fine sont introduits dans un capillaire en verre de Lindemann de 0,5 mm de diamètre. Toutes les réflexions sont enregistrées simultanément et

en continu durant 1800 secondes. Les diffractogrammes sont ensuite traités par le logiciel WinInel.

- *Le microscope électronique à balayage (MEB)*

La microscopie électronique à balayage (MEB) a servi à observer l'aspect extérieur des cristaux ainsi que leur agglomération (fig.22). Dans le cadre de ce travail, un microscope électronique à balayage à effet de champs (JEOL 6320F) pouvant grossir une image jusqu'à 650 000 fois a été utilisé. Ce microscope, disponible au laboratoire, permet de travailler si nécessaire à basse tension, 1 à 4 kV au lieu de 15 kV habituellement, afin d'éviter de charger la surface des cristaux et de les dégrader, on a donc la possibilité d'observer des cristaux isolants sans métallisation. Dans le cas de cristaux organiques, non conducteurs, la métallisation de leur surface par une couche d'or ou de carbone est nécessaire pour leur observation. Cette couche est déposée par sublimation du métal puis dépôt de celui-ci sur l'échantillon. Cette étape permet, lors de l'observation, d'évacuer les charges électroniques produites par le canon à électrons du microscope.



**Figure 22** : Photo de cristaux de SR 142 801 prise aux MEB.

### *c. Les montages expérimentaux*

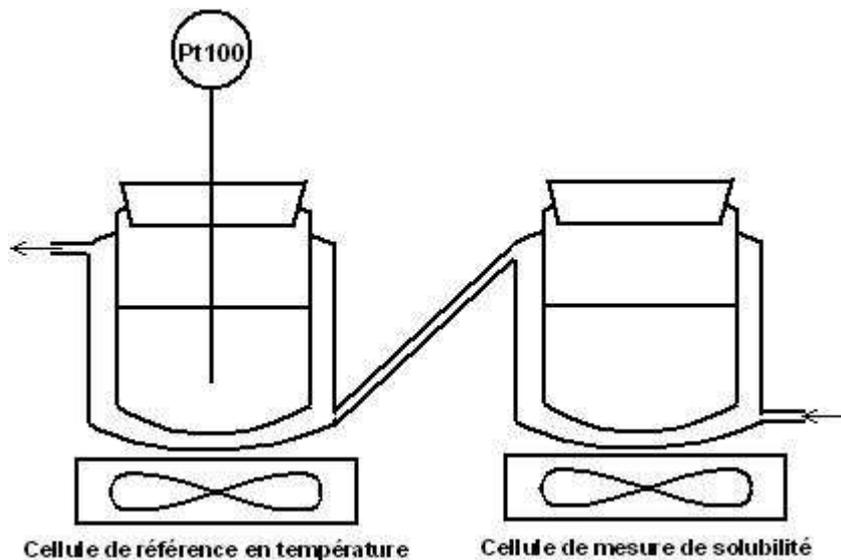
Ce paragraphe présente les différents montages expérimentaux utilisés dans cette étude. Que ce soit pour déterminer des données nécessaires à l'utilisation des molécules (comme par exemple la solubilité) ou que ce soit pour travailler à proprement parler sur les molécules.

- *Détermination des diagrammes de phases des molécules étudiées*

Le montage de mesure de la solubilité en milieu agité par ajouts successifs pesés.

La solubilité d'une population de cristaux en milieu agité est déterminée dans des cellules à double enveloppe de 10 ml (fig.23). Deux cellules placées en série, sont régulées par un bain thermostaté. L'agitation assurée par un barreau aimanté permet de maintenir l'homogénéité du milieu. La première cellule sert de cellule témoin et permet de contrôler la température grâce à une sonde de type PT 100, l'autre est la cellule de travail. On remplit d'abord les cellules avec une même quantité de solvant, puis on ajoute un poids connu de

cristaux dans la cellule de travail pour avoir une solution légèrement en dessous de la solubilité (si on a une idée de sa valeur). On règle ensuite à la température pour laquelle on veut connaître la solubilité, puis lorsque la totalité des cristaux est dissoute, on ajoute une petite quantité de cristaux supplémentaire, dont on connaît parfaitement le poids. On attend à nouveau que cette quantité soit dissoute, et on recommence à en ajouter, ainsi de suite jusqu'à ce que la dernière quantité de cristaux ajoutée ne se dissolve plus, on a alors atteint la solubilité.



**Figure 23** : Montage pour la mesure de solubilité en milieu agité.

#### La solubilité en milieu stagnant, par mise à l'équilibre d'une suspension de cristaux.

Pour les molécules qui ont un pic d'absorption en lumière UV, on peut mesurer la concentration de la solution en soluté. En effet, connaissant le coefficient d'extinction de la molécule de soluté, on peut obtenir la concentration de la solution à partir de la valeur de l'absorbance pour une longueur d'onde donnée, en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C \quad \text{eq II-2}$$

Avec,  $A_{\lambda}$  l'absorbance de la solution à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  
 $\varepsilon_{\lambda}$ , le coefficient d'extinction de la molécule à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  
 $l$ , la longueur de la cuve utilisée et  
 $C$ , la concentration de la solution en soluté.

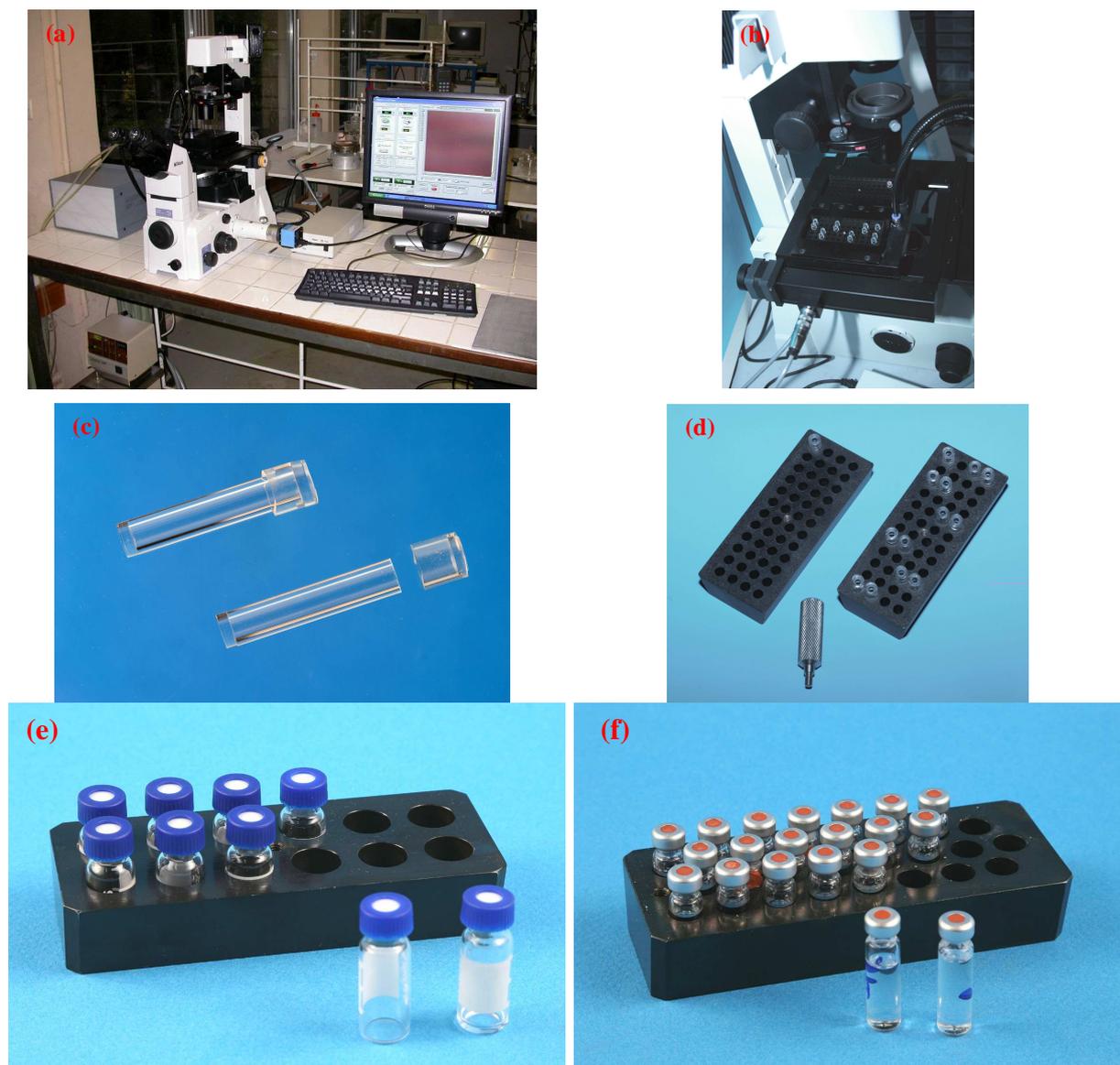
Pour mesurer la solubilité, on prépare des solutions sursaturées en les dissolvant à chaud, puis on les place dans une étuve thermostatée. On sursature suffisamment les solutions pour être en dehors de la zone métastable, les solutions vont donc nucléer à la température de mesure. Au fur et à mesure que les cristaux nucléés vont croître, ils vont appauvrir la solution, et lorsque la concentration de celle-ci cessera de diminuer, elle aura atteint la solubilité. Dans la pratique, on suit l'évolution de la concentration de la solution en prélevant le surnageant de la solution et en le passant au spectroscope UV régulièrement. On peut aussi procéder par ensemencement, en ajoutant des cristaux dans une solution métastable sursaturée. Dans le cas de petits volumes ( $V < 1\text{mL}$ ), on est en milieu stagnant (cas de protéines), mais cette méthode peut, bien sûr, être adaptée aux milieux agités, il faut cependant arrêter l'agitation et même,

éventuellement, centrifuger le prélèvement avant de le passer au spectroscope UV, afin d'être sûr de n'avoir aucun cristal dans le prélèvement.

Afin d'avoir la certitude que la concentration mesurée dans le surnageant est effectivement la valeur de la solubilité, normalement on effectue le même genre de mesure mais par dissolution de cristaux, c'est-à-dire qu'on prépare une solution sous-saturée dans laquelle on place des cristaux, et on mesure la concentration en surnageant, dans le cas là, la concentration augmente avec le temps jusqu'à atteindre l'équilibre. On peut aussi simplement prendre un ou deux points de la courbe obtenue et vérifier la solubilité par la méthode d'encadrement<sup>[48]</sup>. En fait, on place des cristaux dans une solution à l'équilibre, et on augmente la température jusqu'à observer la dissolution des cristaux, puis on abaisse la température jusqu'à observation de la croissance des cristaux.

- *Le montage multi-puits*

Le montage multi-puits est constitué d'une platine motorisée en X et en Y montée sur un microscope à optique inverse équipée d'une caméra numérique pilotée par un ordinateur. Deux blocs de 12, 24 ou 48 puits s'insèrent dans la platine motorisée. L'ordinateur permet de contrôler la température du montage, ainsi que la fréquence de prise des photos de chaque puits. Ce montage permet donc de réaliser jusqu'à 96 expériences simultanément dans les mêmes conditions (fig.24).



**Figure 24 :** (a) Montage multi-puits, (b) Platine motorisée en X et Y, (c) Cellules de 100 $\mu$ L, (d) Blocs de 48 cellules chacun, (e) cellules de 1mL, (f) cellules de 150 $\mu$ L.

On peut, au choix, se servir des blocs de 12 cellules de diamètre 12mm, type Millipore pour la chromatographie, fermées par un bouchon vissé, qui contiennent jusqu'à 1mL (fig.24e). Ou bien des blocs de 24 qui accueillent des vials de 8mm de diamètre, fermés par des bouchons sertis qui peuvent contenir jusqu'à 150 $\mu$ L (fig.24f) ; et enfin les blocs de 48 puits (fig. 24d) dans lesquels on insère des tubes, d'un diamètre de 6mm, contenant une vingtaine de  $\mu$ L (fig.24c) que l'on rend étanche en déposant de l'huile à la surface de la solution pour éviter l'évaporation.

On insère ensuite les blocs dans la platine motorisée en X et Y (fig. 24b) qui est régulée en température par un module Peltier. Celui-ci est contrôlé par un boîtier électronique relié à l'ordinateur sur lequel on entre les consignes de température (fig. 24a). L'ordinateur contrôle aussi la prise séquentielle d'images au moyen de la caméra numérique qui est adaptée sur le microscope à optique inversée. On peut régler la fréquence de la prise des

images, le nombre d'images que l'on souhaite prendre ainsi que les cellules que l'on veut prendre en photo, i.e. uniquement le premier bloc, uniquement le second ou bien les deux.

Ce montage a beaucoup d'applications potentielles tels que l'estimation de la limite de zone métastable, l'estimation des solubilités ou encore la mesure de la fréquence de nucléation, comme dans notre cas.

- *Le Microbatch<sup>®</sup>*

Le Microbatch<sup>®</sup> est un support en polypropylène qui comporte 72 puits (fig.25) pouvant accueillir jusqu'à 1 $\mu$ L de solution.



**Figure 25** : Photo d'un Microbatch<sup>®</sup>.

Le Microbatch<sup>®</sup> est, tout d'abord, entièrement recouvert d'une huile de paraffine, ce qui évite que les solutions ne s'évaporent lorsqu'elles sont placées dans les puits. On injecte ensuite les solutions directement dans les puits, au travers de l'huile de paraffine.

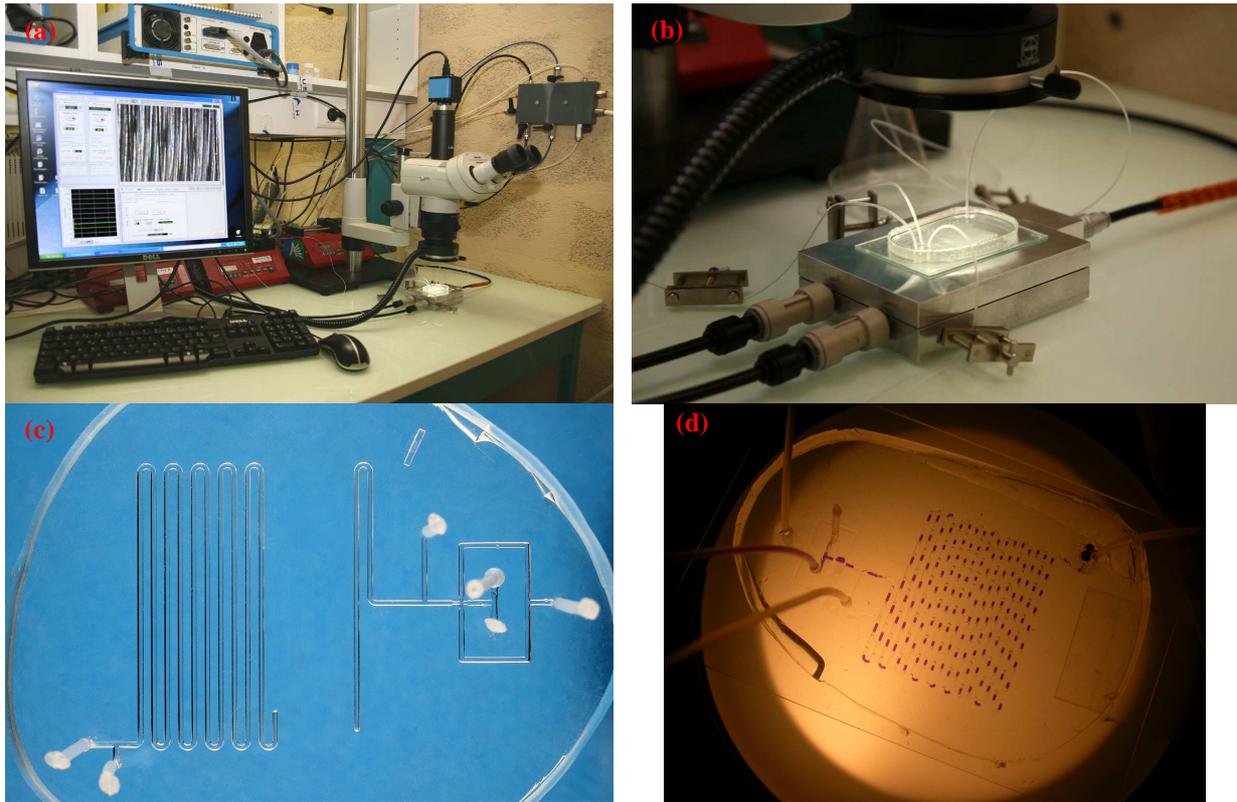
C'est une échelle intermédiaire entre le volume du multi-puits, ci-dessus, et le volume de la microfluidique, ci-dessous. Cela nous a servi aussi bien dans la mesure de la fréquence de nucléation que pour l'établissement de la limite de zone métastable, mais principalement nous nous en sommes servi pour les expériences d'irradiation lumineuse.

- *Le montage microfluidique*

La microfluidique est un système de circulation de liquides dans des canaux d'une dimension de l'ordre du  $\mu$ m. Dans notre cas, il s'agit d'injecter deux phases non-miscibles à l'intérieur d'une puce en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) de façon à former des nanoréacteurs de cristallisation grâce aux gouttes créées. La microfluidique comporte un écoulement laminaire et les pertes de charges sont très faibles par rapport à la pression que peut supporter la puce PDMS (calculs de nombre de Reynolds et des pertes de charges présentés en annexe 2). Ce système a été mis au point au Laboratoire du Futur à Bordeaux par Philippe Laval<sup>[49]</sup>.

Le montage microfluidique est constitué d'une puce en PDMS qui est alimentée en solutions grâce à des pousse-seringues. Cette puce en PDMS est régulée en température par un module Peltier piloté par ordinateur (fig.26a).

On peut stocker jusqu'à environ 200 gouttes de 250 nL chacune dans la puce pour une même expérience dans les mêmes conditions.



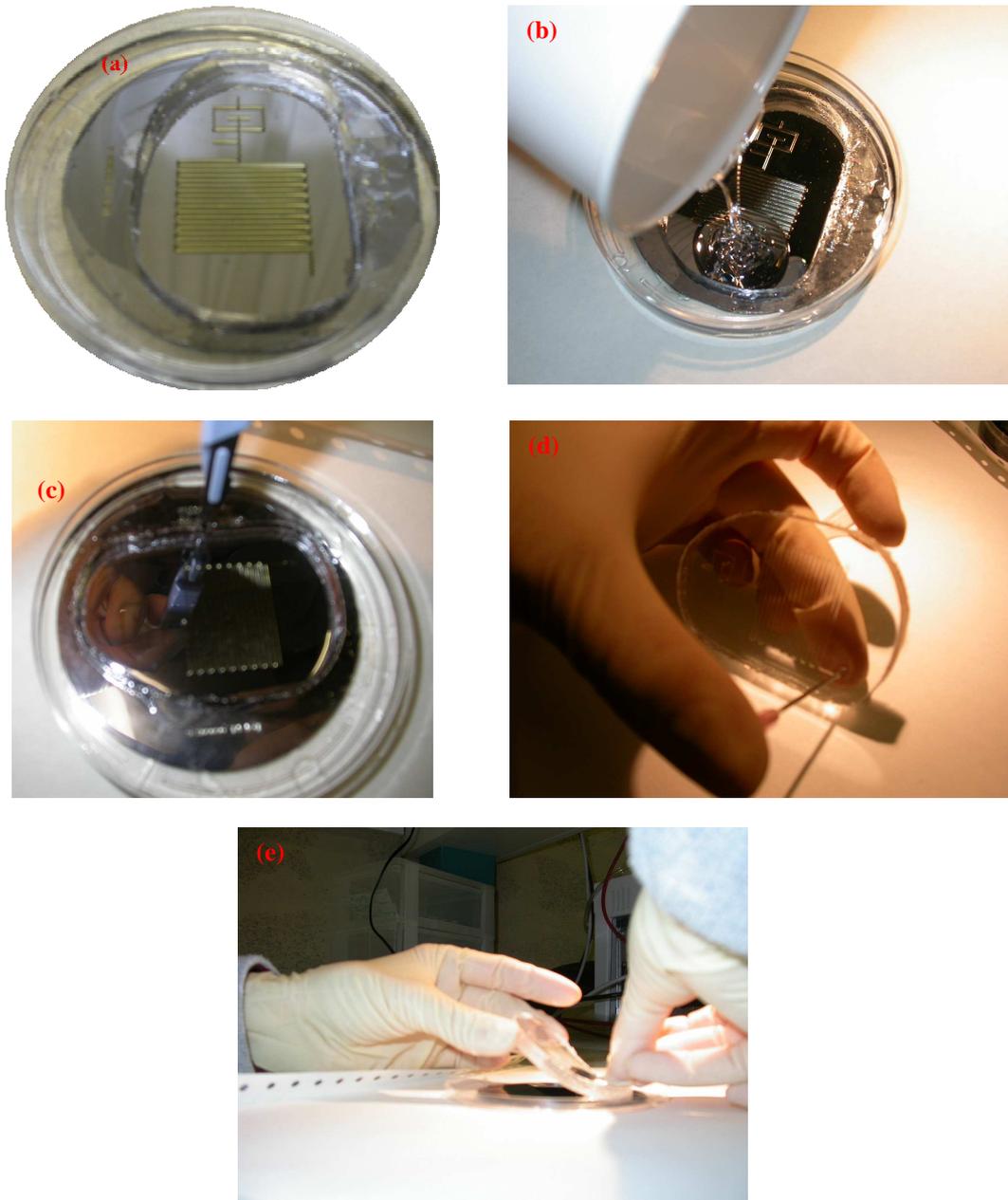
**Figure 26** : Montage microfluidique : (a) vue d'ensemble avec l'ordinateur qui contrôle la température et permet l'acquisition séquentielle d'images, (b) la puce posée sur le module Peltier qui régule la température, (c) vue rapprochée de la puce en PDMS sur un support en verre, (d) puce en PDMS remplie avec des gouttes d'encre.

#### □ Fabrication d'une puce microfluidique en PDMS

Un mélange de 10g de PDMS (Sylgard 184 de Dow Corning) pour 1g de son agent réticulant est préparé manuellement puis placé dans une cloche à vide pour supprimer les bulles d'air qui se forment pendant le mélange.

On coule ensuite ce mélange dans un moule (fig 27a et b, voir annexe 3 pour la fabrication du moule) et on le place dans une étuve à 60°C pendant 45min. Pendant ce temps, le même mélange est déposé sur une plaque de verre ou un wafer silicium, on utilise ensuite une tournette pour répartir ce mélange en couche uniforme sur le support. Une fois le support entièrement recouvert uniformément de PDMS on place le support à 60°C pendant 7min, de façon à ce que le PDMS soit partiellement réticulé.

On démoule la puce au bout de 45min à 60°C (fig.27c), on perce les entrées et la sortie à l'aide d'un poinçon à la bonne taille (fig.27d), avant de coller la puce au support (fig.27e). On replace le système ainsi collé à 60°C pendant toute une nuit.



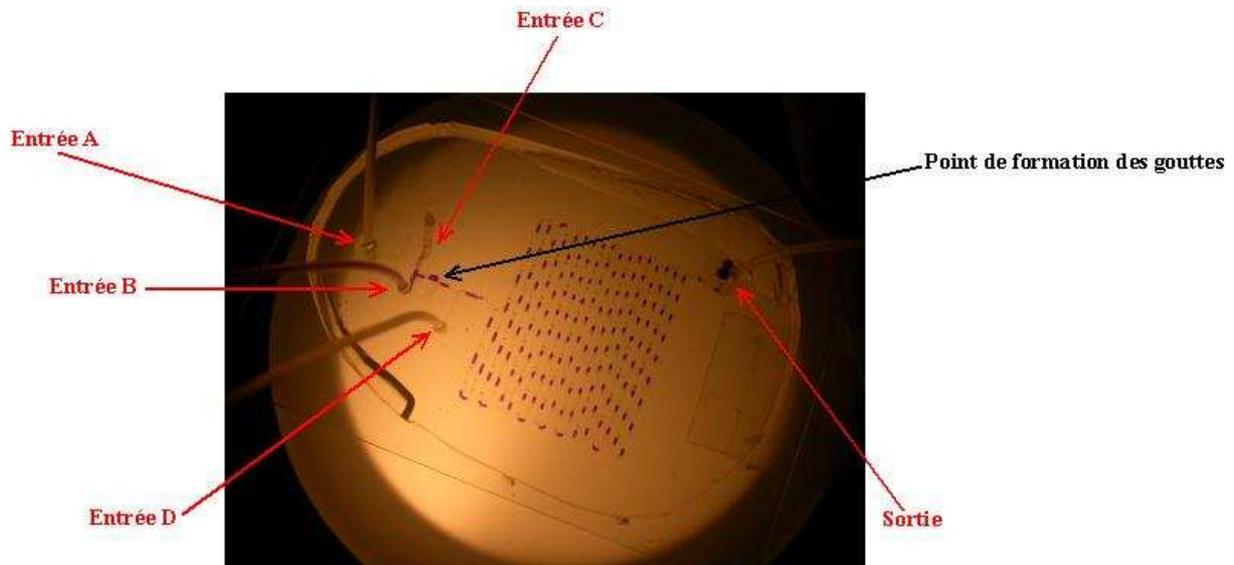
**Figure 27 :** (a) Moule pour puce microfluidique, (b) remplissage du moule par le mélange PDMS-réticulant encore liquide, (c) découpage de la puce et démoulage, (d) perforation des entrées et sortie de la puce en PDMS, (e) collage de la puce sur le support (wafer silicium).

#### □ Principe du montage microfluidique

On injecte de l'huile silicone par l'entrée A (fig.28) au moyen d'un pousse seringue. Cette huile vient 'pincer' la phase aqueuse qui est injectée par les entrées B et C toujours à l'aide d'un pousse seringue. Ce qui forme des gouttes de phase aqueuse dans une phase continue d'huile silicone.

Si l'on souhaite éviter la coalescence des gouttes de phase aqueuse on peut intercaler des gouttes d'huile fluorée, entre les gouttes de phase aqueuse, par l'entrée D. L'huile fluorée n'est miscible ni avec l'eau ni avec l'huile silicone, cela permet de séparer chaque goutte de phase aqueuse de ses voisines.

Enfin, après avoir circulé dans l'intégralité du canal, les gouttes sont évacuées par la sortie de la puce. On peut suspendre l'écoulement pour stocker des gouttes à l'intérieur de la puce, en arrêtant les pousse-seringues et en fermant la sortie, par un système de pincement du tuyau.



**Figure 28** : Schéma d'utilisation de la puce microfluidique en PDMS

## 2. Méthodes

Ce paragraphe présente les modes opératoires des expériences menées au cours de cette étude.

### *a. Détermination de la limite de zone métastable*

Le but de cette méthode est de déterminer la limite de zone métastable, afin de connaître les bonnes conditions de mesure de la fréquence de nucléation dont nous verrons la méthode dans la deuxième partie de ce paragraphe méthodes.

Pour cela on prépare des solutions de soluté pour différentes sursaturations et on observe le temps qu'il faut pour que les cristaux apparaissent. On se place dans un milieu stagnant puisque ce sera le cas lorsque nous chercherons à mesurer la fréquence de nucléation, car l'hydrodynamique du milieu influence énormément la largeur de la zone métastable, tout comme le pH et d'autres paramètres<sup>[36]</sup>. On utilise des solutions de 1mL pour éviter d'utiliser trop de produit et pour être proche des conditions dans lesquelles se passera la suite des expériences.

On considère que l'on est plus dans la zone métastable lorsque les cristaux mettent quelques heures pour être observables.

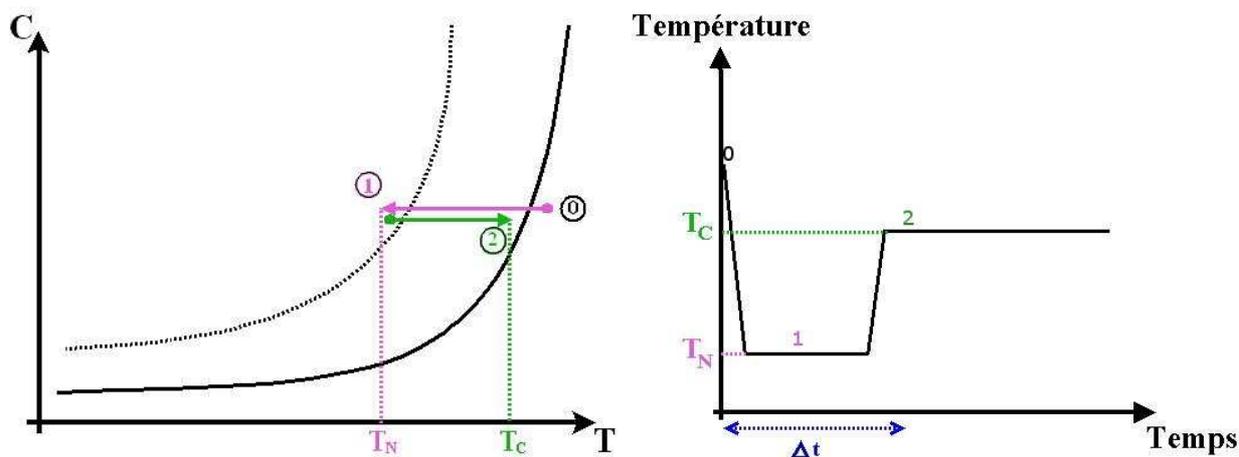
### ***b. Détermination de la fréquence de nucléation dans les conditions normales***

Il est essentiel, avant d'ajouter un paramètre supplémentaire, de connaître précisément les équations cinétique et thermodynamique de la nucléation, dans les conditions normales, de la molécule étudiée. Dans notre cas, l'étude la cinétique suffit dans un premier temps. Le paramètre représentant le mieux la cinétique de nucléation est la fréquence de nucléation. En effet ce paramètre nous permet de savoir combien de germes se sont créés par unité de temps et unité de volume. Cela nous permettra par la suite de savoir si les champs externes ont une influence positive sur la nucléation, c'est-à-dire si le nombre de germes qui se créent augmente en présence d'un champ externe ; ou si, en agissant localement, le champ externe est capable de provoquer la nucléation dans la zone métastable déterminée au préalable.

La littérature propose deux méthodes de mesure de la fréquence de nucléation. La première, la plus classique car la plus simple à mettre en œuvre, consiste à mesurer le temps d'induction, qui est le temps que les cristaux mettent pour apparaître. On prend ensuite l'inverse de ce temps que l'on ramène à l'unité de volume, pour obtenir la fréquence de nucléation. Cette méthode est limitée par son principe même, c'est-à-dire que le temps d'induction comprend à la fois le temps de nucléation mais aussi le temps de croissance pour que les cristaux atteignent une taille suffisante qui soit observable. Donc cette méthode implique une grande incertitude sur la mesure de la fréquence de nucléation, car elle dépend des outils d'observation utilisés mais aussi de l'endroit d'observation de la solution, en effet les cristaux n'apparaissent pas forcément là où on observe.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'utiliser la méthode de mesure de la fréquence de nucléation que l'on appelle méthode de la double pulsion thermique <sup>[50]</sup>. Le principe de la double pulsion thermique (DPT) est de compter le nombre de cristaux qui nucléent durant un temps déterminé à une température donnée.

Pour cela on prépare une solution de soluté à cristalliser, on démarre à une température supérieure à la température de solubilité (point 0, fig.29a). Puis on abaisse la température jusqu'à une température qu'on appelle température de nucléation (point 1, fig. 29a), qui se situe autour de la limite de la zone métastable. On laisse la solution à cette température pendant un temps précis déterminé ( $\Delta t$  fig.29b), puis on augmente la température, jusqu'à une température qu'on appelle température de croissance (point 2, fig.29a) qui se situe au sein de la zone métastable, proche de la courbe de solubilité. A cette température, il n'y a plus de nucléation, mais par contre les cristaux qui ont nucléé à la température de nucléation croissent. On maintient la solution à cette température jusqu'à ce que les cristaux aient suffisamment cru pour qu'on puisse les observer.



**Figure 29** : Principe de la méthode de double pulsion thermique : (a) concentration en fonction de la température, (b) température en fonction du temps.

Cette méthode présente l'avantage de séparer la nucléation de la croissance, cela nous permet d'avoir une mesure fiable de la fréquence de nucléation qui ne dépend pas des outils de mesure ou d'observation utilisés. Par contre elle sous-estime le nombre de cristaux nucléés à la température  $T_N$ . En effet, Dixit <sup>[51]</sup> montre dans un papier récent qu'une partie des cristaux nucléés à  $T_N$  se dissolvent lorsqu'on augmente la température jusqu'à  $T_C$ . Plus précisément, lorsque que l'on se trouve à  $T_N$ , le rayon critique,  $r_N^*$ , qui détermine le passage d'un amas de molécules à l'état de cristal, est inférieur à  $r_C^*$  le rayon critique à la température de croissance  $T_C$ . Donc lorsqu'on passe de  $T_N$  à  $T_C$  il est possible que des germes critiques apparus à  $T_N$  se dissolvent en passant à  $T_C$ , car ils n'ont pas suffisamment cru pour que leur rayon soit supérieur à  $r_C^*$  (puisque  $r_N^* < r_C^*$ , tous les germes n'ayant pas eu le temps de croître de  $\Delta r = r_C^* - r_N^*$  vont disparaître). Cependant ce nombre peut être estimé en fonction de la molécule utilisée, et surtout de sa solubilité. En particulier, si la molécule a une solubilité inverse avec la température, comme par exemple le BPTI, cette différence de nombre de germes critiques devient négligeable. Nous verrons dans la partie 'III. Résultats' l'ordre de grandeur de ce nombre de germes qui se dissolvent.

Pour déterminer la fréquence de nucléation, nous avons utilisé les montages multipuits, microfluidique, mais aussi plus simplement des Microbatch<sup>®</sup>, afin de comparer les résultats pour différents volumes utilisés (de 250nL à 20 $\mu$ L).



### III. Résultats et discussion

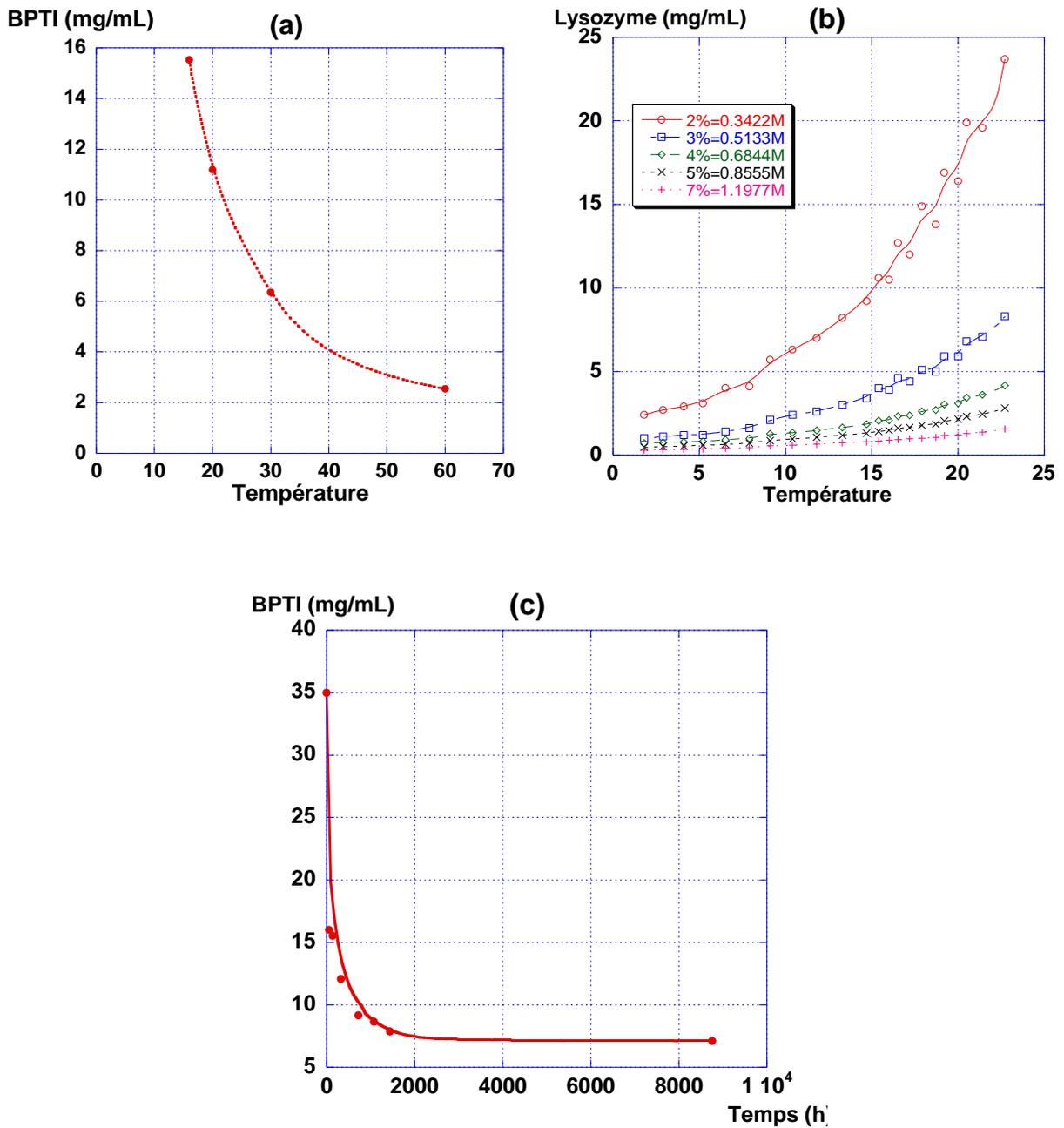
Dans ce chapitre, nous aborderons les problèmes liés à la nucléation primaire hétérogène, souvent gênante dans les mesures de limite de zone métastable, ou de fréquence de nucléation. Mais avant de pouvoir déterminer la largeur de la zone métastable ou encore la fréquence de nucléation, il faut tout d'abord connaître la solubilité de la molécule étudiée dans le solvant choisi, à savoir ici l'eau. Notre étude étant centrée sur une plage de température allant de 15 à 30°C, nous avons étudié la solubilité des molécules dans cet intervalle de température. Nous verrons aussi que vérifier des données que l'on possède déjà peut révéler d'autres problèmes que l'on ne soupçonnait pas.

#### 1. Solubilités

##### *a. Les molécules modèles*

- Les protéines

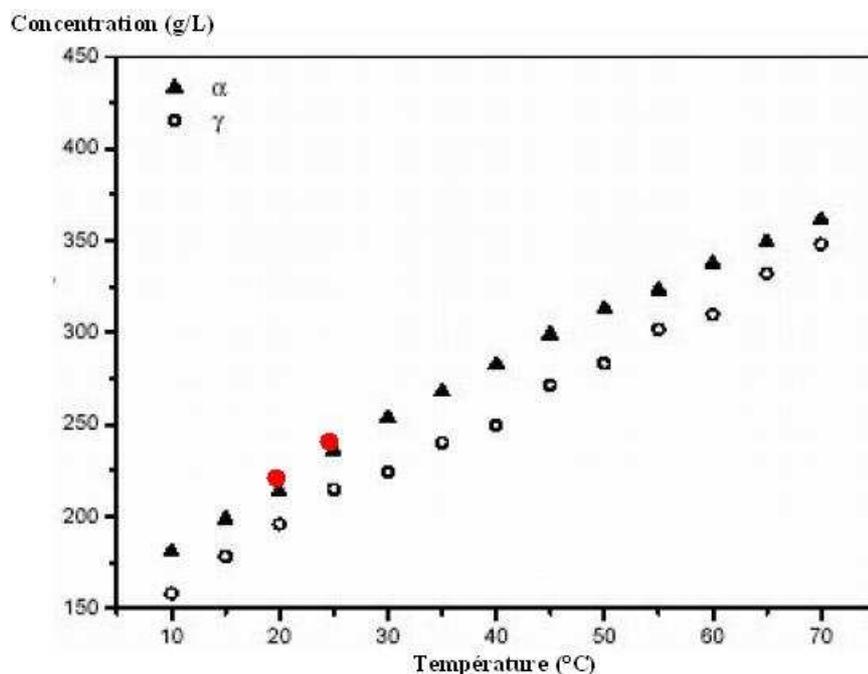
Comme nous avons pu le voir dans la partie 'II. Matériel et méthodes', nous avons utilisé différentes techniques de détermination de la solubilité. Dans le cas des protéines, le BPTI et le Lysozyme, les molécules étant détectables au spectromètre UV, nous avons simplement mesuré la concentration du surnageant dans une solution cristallisée, par spectroscopie. Les résultats sont présentés figure 30 pour le BPTI et le Lysozyme dans NaCl à pH = 4,5.



**Figure 30** : Courbes de solubilité mesurées pour (a) le BPTI (pH = 4,5, 1,6M de NaCl) et (b) le Lysozyme (pH = 4,5) les différentes courbes correspondent aux différentes concentrations en NaCl. (c) Suivi de la solubilité au cours du temps pour une solution de BPTI à pH = 4,5, NaCl à 1,6M et T = 30°C.

- La glycine

Pour la glycine, nous avons trouvé des valeurs de solubilité des différents polymorphes dans l'eau, dans la littérature<sup>[52, 53]</sup> (fig.31), et nous avons vérifié les valeurs pour les températures auxquelles on a travaillé. Ces valeurs sont représentées par des points rouges recouvrant partiellement les triangles sur la figure 31.



**Figure 31** : Courbe de solubilité des polymorphes  $\alpha$  et  $\gamma$  de la glycine dans l'eau, issue de la littérature<sup>[52]</sup>, les points rouges, par-dessus les triangles, représentent les valeurs que nous avons trouvées expérimentalement.

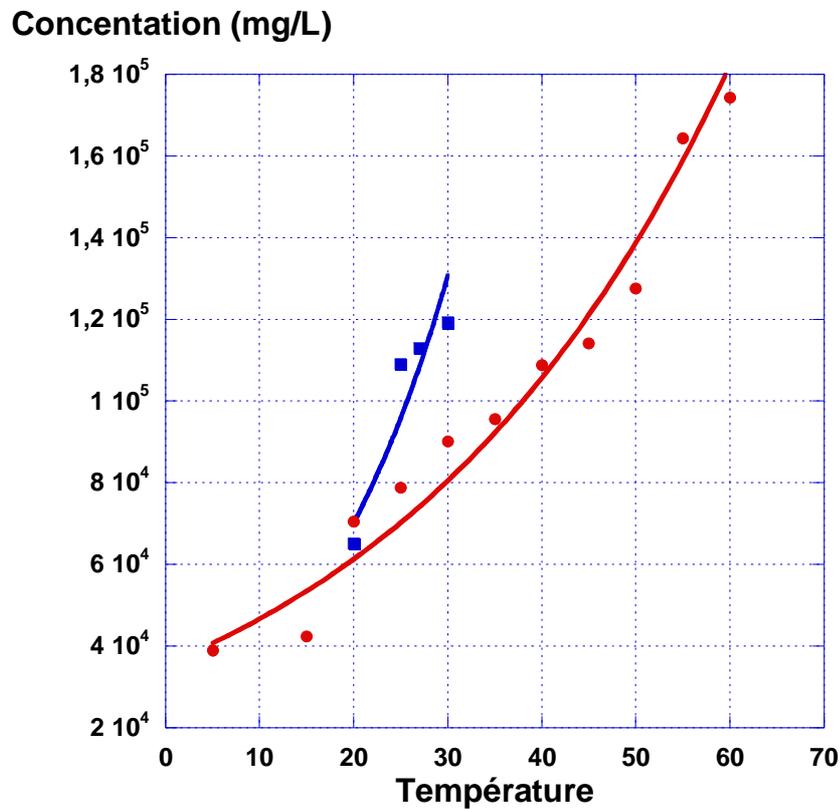
En utilisant de la forme  $\alpha$  au départ, la forme recristallisée obtenue était aussi de la forme  $\alpha$ , ce qui correspond à ce qu'on trouve la littérature, à savoir lorsqu'on dissout de la forme  $\alpha$  on recristallise préférentiellement la forme  $\alpha$ <sup>[54]</sup>.

### *b. Les molécules Sanofi-Aventis*

- Le sucre S

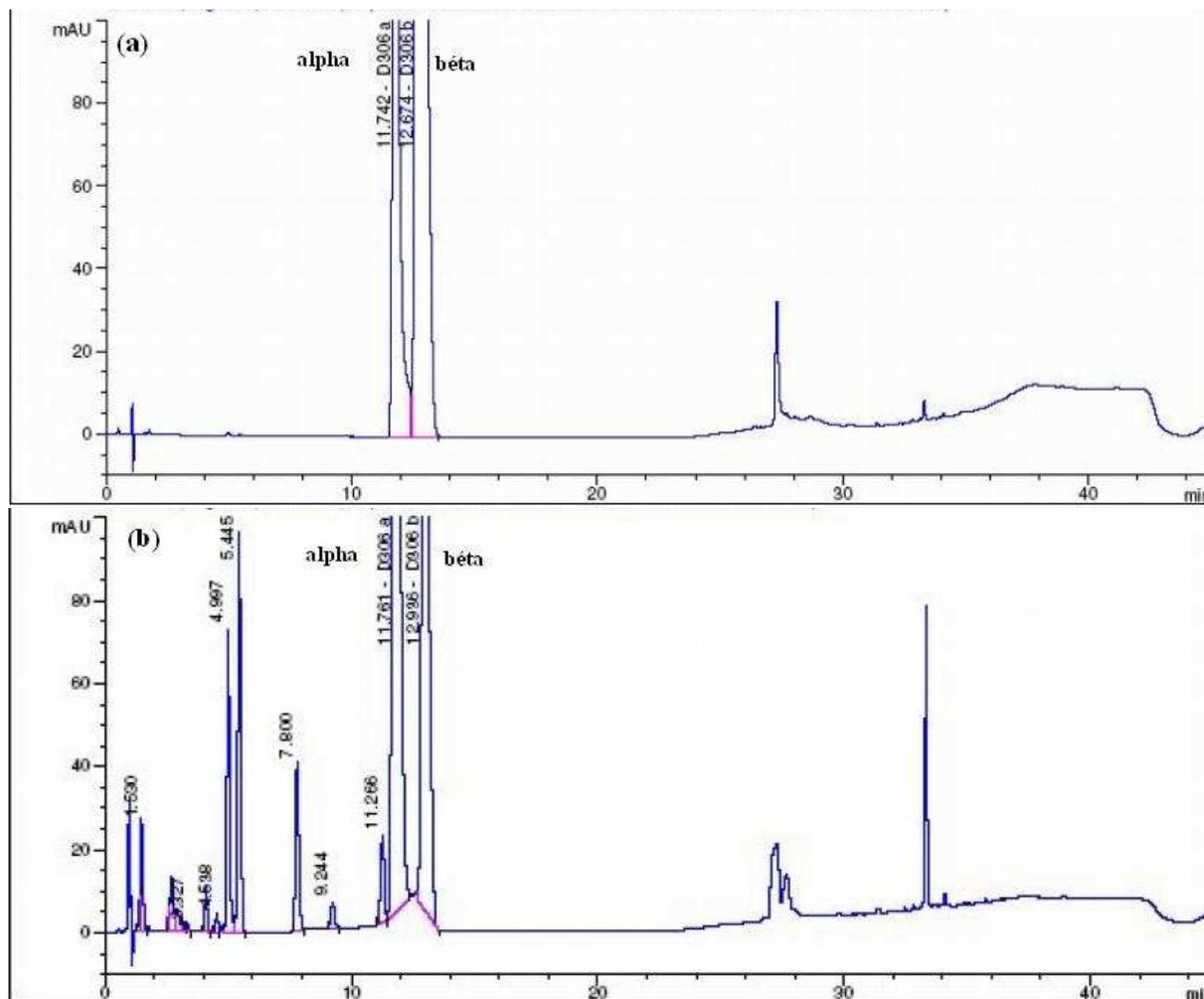
En ce qui concerne le sucre S, nous avons utilisé la technique des ajouts pesés successifs, à l'aide du montage présenté dans le chapitre précédent. Cependant nous avons obtenu des courbes qui ne suivaient pas la loi de Van't Hoff (fig.32). Dans un premier temps, nous n'avions que les points expérimentaux rouges (●), on voit bien qu'ils ne suivent pas vraiment une loi exponentielle (tracée sur la figure 32). En effet, les points sont assez dispersés autour de la courbe. Nous avons pensé à un changement de phases, mais il n'y a pas de rupture franche de la droite  $\ln(\beta) = f(1/T)$ . Nous avons donc refait les mesures, avec la même technique, et nous avons trouvé les points expérimentaux bleus (■). Puis nous avons pensé que cela était dû à l'équilibre anomérique que présente le sucre S en solution, donc nous avons décidé de passer le surnageant des solutions cristallisées sur une colonne HPLC, pour déterminer la concentration à l'équilibre, mais aussi pour connaître la proportion

d'anomère  $\alpha$  et  $\beta$  en solution, afin de tracer la courbe de solubilité en fonction de la fraction massique en anomère  $\alpha$  puisque uniquement celui-ci cristallise.



**Figure 32** : Courbe de solubilité concentration-température du sucre S, les points bleus et rouges représentent deux séries de mesures effectuées par deux personnes différentes.

Nous avons découvert grâce à ces expériences que le sucre S n'est pas stable dans l'eau, en effet comme le montrent les chromatogrammes (fig.33), les pics caractérisant les deux anomères se déplacent légèrement, mais surtout on voit apparaître d'autres pics avant ces signaux, correspondants à la dégradation de la molécule.



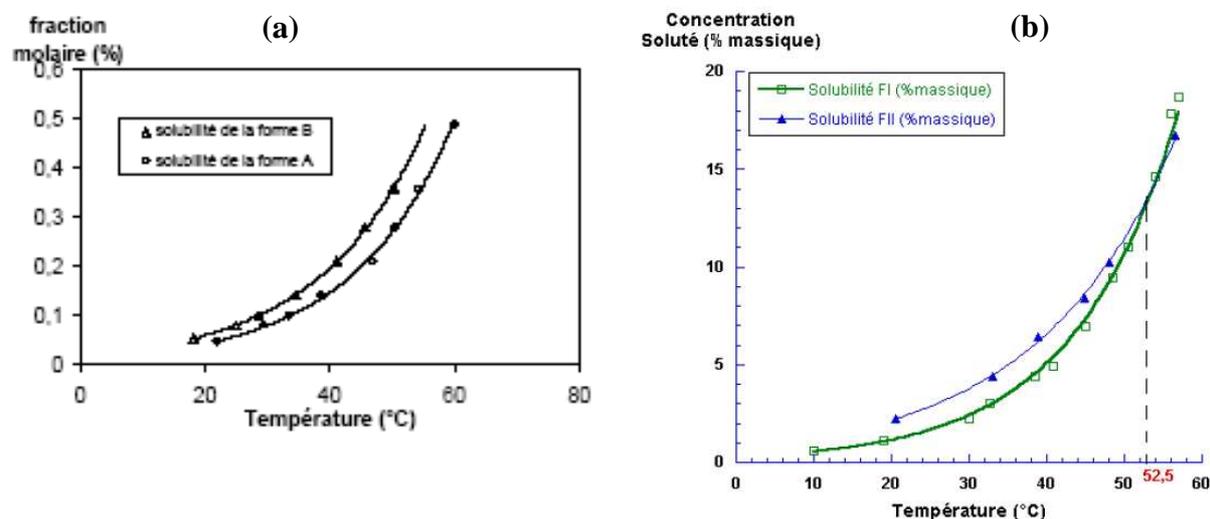
**Figure 33 : Chromatogramme du sucre S en solution dans l'eau, (a) immédiatement après solution, (b) après une heure.**

Cette dégradation de la molécule de sucre S lorsqu'elle se trouve en solution dans l'eau nous empêche de poursuivre les expériences. En effet, nous cherchions une molécule pharmaceutique qui soit soluble dans l'eau afin de pouvoir tester nos procédés sans avoir à gérer le problème de l'évaporation du solvant organique. Or la molécule se dégradant au cours du temps dans l'eau, il nous est impossible de mener à bien des expériences de plusieurs heures et d'étudier les résultats obtenus.

Nous n'avons pas d'information concernant cette dégradation car le procédé de fabrication du sucre S ne se fait pas dans l'eau, donc l'étude de cette dégradation n'était pas une priorité pour Sanofi-Aventis.

- L'Irbésartan et le SR 142 801

En ce qui concerne les autres molécules Sanofi-Aventis, nous avons déjà les courbes de solubilité de l'Irbésartan dans l'isopropanol (fig.34a) et du SR 142 801 dans un mélange (60/40)<sub>v</sub> d'éthanol/eau (fig.34b), qui ont été déterminées au cours des thèses de E. Garcia<sup>[55]</sup> et L. Lafferrere<sup>[8]</sup>.



**Figure 34** : Courbes de solubilité de l'Irbésartan dans l'isopropanol<sup>[56]</sup> (a) et du SR 142 801 dans un mélange (60/40)<sub>v</sub> d'éthanol/eau<sup>[8]</sup> (b).

## 2. La limite de zone métastable

Nous avons déterminé la limite de la zone métastable uniquement pour la glycine, nous connaissons déjà celles des autres molécules. Nous rappelons qu'il s'agit ici de la zone métastable en milieu stagnant.

Le principe est simple, il suffit d'observer le temps que met une solution sursaturée pour nucléer. Si le temps est inférieur à quelques heures, on considèrera que la concentration de la solution est supérieure à la limite de zone métastable, on diminue la concentration et on recommence jusqu'à ce que la solution sursaturée ne nuclée pas avant plusieurs jours voire même des semaines. Dans le cas de la glycine, les résultats obtenus ne sont pas reproductibles. En effet, sur six essais à la même sursaturation et dans les mêmes conditions, seulement trois d'entre eux ont nucléé dans les heures suivantes alors que les trois autres n'avaient toujours pas nucléé au bout de six mois. De plus à l'occasion de ces expériences, nous nous sommes rendus compte que la glycine avait une affinité particulière pour le polypropylène qui compose les tubes Eppendorf<sup>®</sup>, ainsi que les embouts de pipettes. Comme la limite de zone métastable nous intéresse uniquement pour la nucléation primaire homogène, nous avons donc choisi des cristallisoirs en verre ou en quartz. Mais même lorsque l'on a enfin résolu les problèmes liés à la nucléation hétérogène, il s'est avéré très difficile de trouver la limite de la zone métastable de la glycine. En effet, nous sommes allés jusqu'à des concentrations de 350mg/mL et nous n'avons aucune nucléation, nous ne sommes pas allés au-delà de ces concentrations.

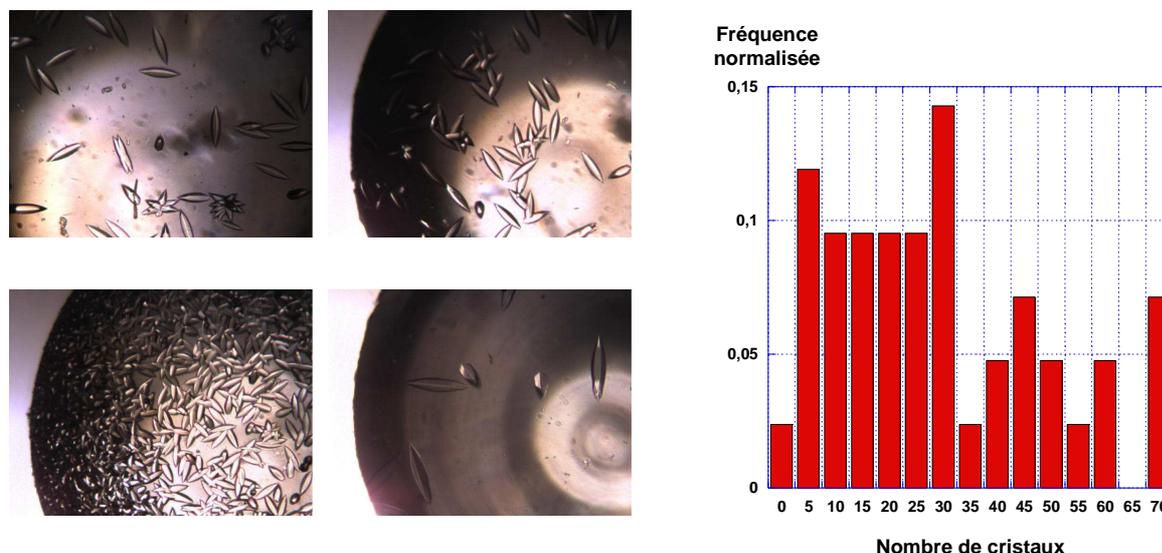
Il est donc très difficile de mesurer la largeur de la zone métastable, et en particulier pour certaines molécules comme la glycine qui peuvent avoir des affinités particulières avec les parois du cristalliseur, il faut être attentif à la nucléation primaire hétérogène.

### 3. Mesure de la fréquence de nucléation

#### a. *Le BPTI*

Rappelons ici que nous mesurons la fréquence de nucléation des molécules dans les conditions dites classiques, i.e. sans champ externe pour comparer cette valeur expérimentale avec la valeur théorique issue de l'équation I-23 de la cinétique de nucléation de la théorie classique de nucléation. Cela nous permettra de confronter la théorie classique (CNT) à l'expérience. Ainsi, en fonction des disparités qualitatives-quantitatives, on aura une idée de la validité de ce modèle. Cela nous permettra aussi de comparer les valeurs de la fréquence de nucléation d'une même molécule en présence et en absence d'un champ externe pour déterminer l'influence du champ sur celle-ci, à savoir positive ou négative, mais aussi de quelle manière la fréquence de nucléation varie avec l'intensité du champ.

Dans un premier temps, nous avons utilisé le montage multi-puits pour mesurer les fréquences de nucléation du BPTI, mais nous avons rapidement vu que les résultats obtenus sur une même série de 96 essais ne donnaient pas de résultats cohérents les uns avec les autres, la distribution du nombre de cristaux par tube était trop large (fig.35).



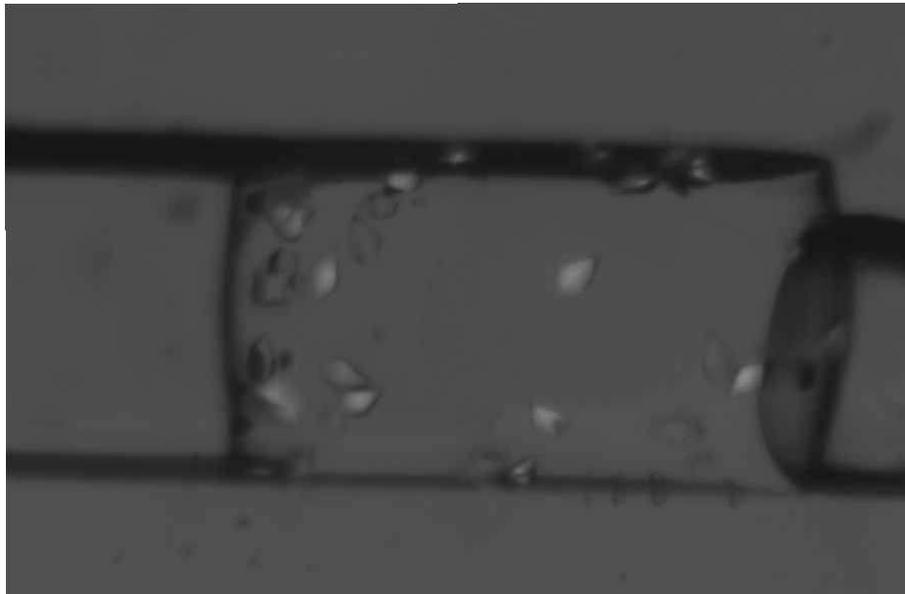
**Figure 35** : Distribution du nombre de cristaux par tube pour une solution de BPTI à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, [NaCl] = 1,6M, pH=4,5,  $T_N = 30^\circ\text{C}$ ,  $T_C = 20^\circ\text{C}$  et  $\Delta t = 3\text{h}$ .

Après avoir mis au point une technique de décapage (voir annexe 4) des tubes accueillant les solutions de BPTI, afin d'éliminer une potentielle nucléation hétérogène due aux poussières, impuretés...etc, les résultats restaient inutilisables pour une analyse statistique. Nous avons observé que le BPTI avaient des propriétés tensioactives qui le faisaient nucléer à l'interface entre la solution aqueuse et l'huile de paraffine utilisée pour

éviter l'évaporation pendant la durée de l'expérience. Ce qui explique pourquoi le décapage des tubes avant chaque expérience ne suffisait pas non plus à éliminer la nucléation hétérogène. Celle-ci étant trop présente pour pouvoir déterminer la fréquence de nucléation primaire homogène, il nous fallait trouver un autre montage pour limiter au maximum les impuretés dans le système, sites de nucléation primaire hétérogène. D'autant plus que supprimer l'huile de paraffine n'était pas possible non plus, car le volume mort dans les tubes était trop grand ce qui permettait une évaporation importante même si le tube restait fermé.

Nous avons donc utilisé une puce microfluidique en PDMS.

La microfluidique nous a aussi permis d'identifier le caractère tensioactif du BPTI, en effet, les gouttes de BPTI devenaient carrées dans le temps (fig.36), ce qui prouvait un échange ou une affinité entre la phase aqueuse et l'huile silicone. Après des expériences complémentaires de simple mélange de solution de BPTI avec de l'huile silicone, nous avons pu confirmer le caractère tensioactif du BPTI. Nous avons essayé avec une huile d'un autre type, une huile fluorée, dans ce cas, l'huile n'ayant pas d'affinité avec le PDMS, elle ne mouillait pas suffisamment les parois pour empêcher le contact des gouttes avec celles-ci, ce qui amenait aussi une nucléation hétérogène mais par contact avec les parois.

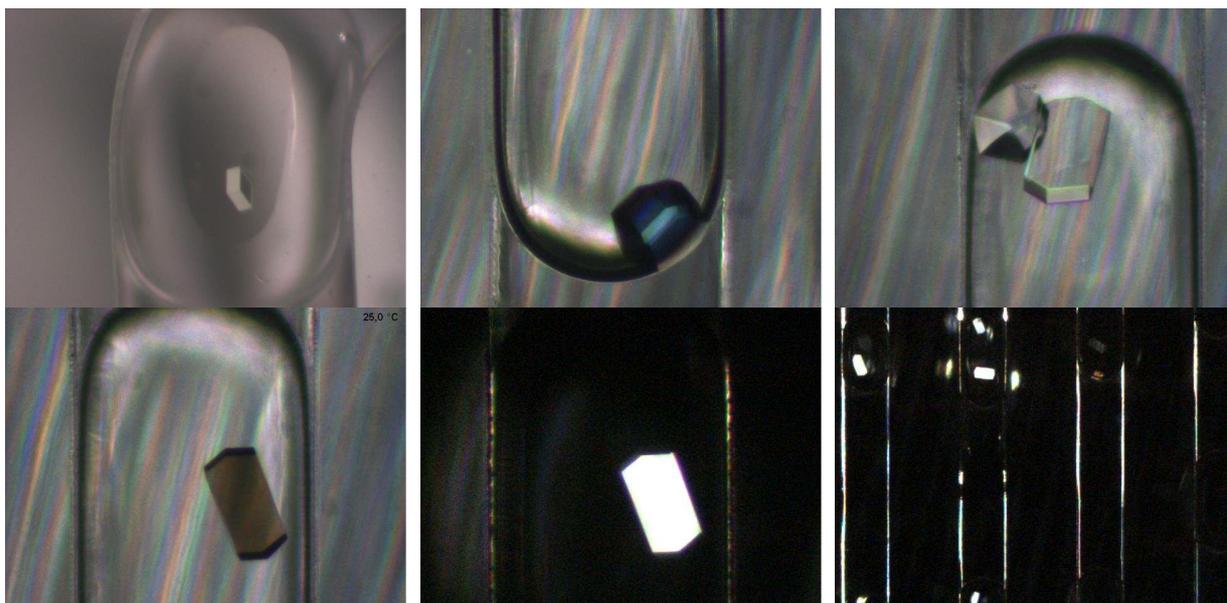


**Figure 36** : Goutte d'une solution de BPTI au sein d'une puce microfluidique, on voit bien que l'interface entre la solution aqueuse de BPTI et l'huile silicone forme à présent un ménisque plat. Le canal a une largeur de 500 $\mu$ m.

Le BPTI était une molécule très intéressante pour la technique de la double pulsion thermique, puisqu'il présente une solubilité inverse dans un tampon acétate à 80mM avec NaCl comme agent précipitant. Ce qui nous permettait d'avoir une température de nucléation plus haute que la température de croissance. Cependant les problèmes qu'il engendre sont plus importants que ses avantages, ce qui est dommage, mais nous nous sommes donc intéressés au Lysozyme, à la place.

## *b. Le Lysozyme*

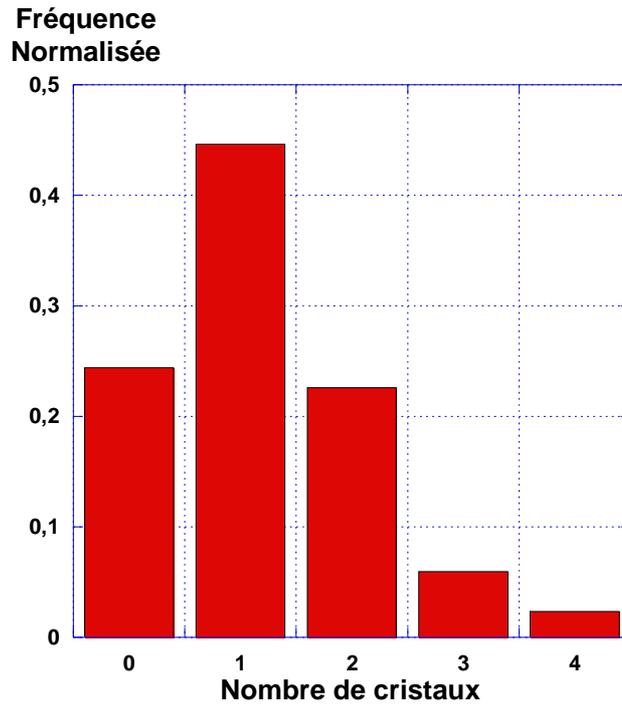
Afin de mettre au point cette technique de mesure de la fréquence de nucléation par la méthode de la double pulsion thermique en microfluidique, il nous fallait une molécule que l'on connaisse bien, nous avons donc choisi le Lysozyme. En effet, cette protéine est facile à manipuler, elle est soluble dans l'eau, elle est très étudiée au laboratoire pour d'autres expériences, donc nous connaissons bien son diagramme de phases et de plus elle n'est pas trop chère. Nous avons obtenu des cristaux au sein de gouttes (fig.37) sans modification de la forme de celles-ci même après 24h de croissance à 25°C. Les expériences ne durent jamais plus de 24h car au-delà, l'évaporation de l'eau au travers du PDMS ne peut plus être considérée comme négligeable.



**Figure 37** : Photos de cristaux de Lysozyme dans le canal microfluidique. 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM à pH = 4,5 et 0,7M de NaCl.  $T_N = 20^\circ\text{C}$ ,  $T_C = 25^\circ\text{C}$ ,  $\Delta t = 2\text{h}$ . Les deux dernières photos ont été prises avec un polariseur analyseur. La largeur des canaux représente 500 $\mu\text{m}$ .

Sur ces photos on voit bien la différence entre la forme des gouttes de Lysozyme (fig.37) et celle des gouttes de BPTI (fig.36), dans la même huile, on met bien ici en évidence le caractère tensioactif du BPTI.

Après une expérience, on compte le nombre de cristaux présents par goutte, pour pouvoir établir la distribution statistique du nombre de cristaux présents par goutte en fonction de la fréquence à laquelle on rencontre ce nombre de cristaux dans une goutte (fig.38).



**Figure 38** : Distribution du nombre de cristaux de Lysozyme par goutte en fonction de la fréquence normalisée. Solution de Lysozyme à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, pH = 4,5 et 0,7M de NaCl.  $T_N = 20^\circ\text{C}$ ,  $T_C = 25^\circ\text{C}$ ,  $\Delta t = 2\text{h}$ .

La fréquence normalisée est le rapport entre le nombre de gouttes contenant  $i$  cristaux et le nombre total de gouttes :

$$\text{Fréquence normalisée} = (\text{nb de gouttes contenant } i \text{ cristaux}) / (\text{nb total de gouttes}) \quad \text{Eq III-1}$$

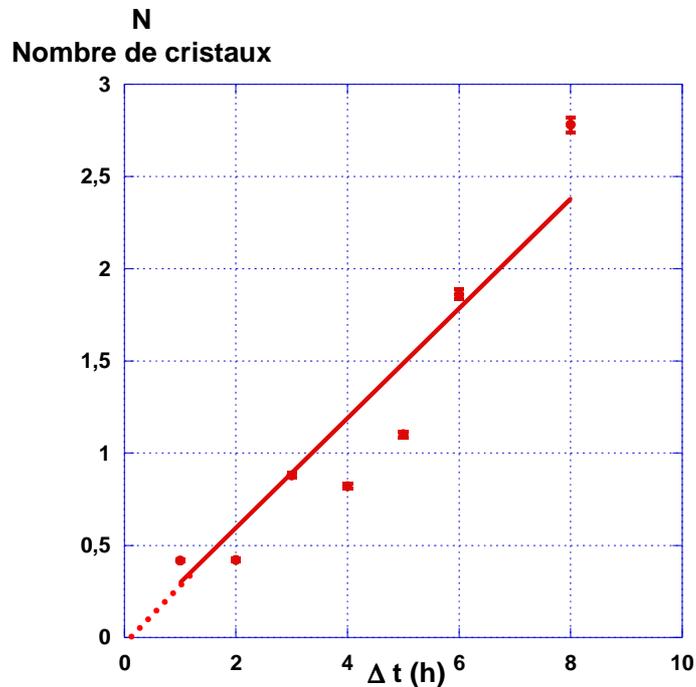
On calcule ensuite simplement la moyenne algébrique du nombre de cristaux par goutte. Et on applique la loi de Poisson (eq. III-2) pour avoir les barres d'erreur sur cette moyenne (tableau1).

$$P(m) = \frac{N^m}{m!} \exp(-N) \quad \text{Eq III-2}$$

**Tableau 1** : Calcul des valeurs moyennes du nombre de cristaux par goutte pour différents  $\Delta t$  ainsi que les barres d'erreur à l'aide de la loi de Poisson pour une sursaturation de  $\beta = 6,45$

$\Delta t$ (h)	N valeur moyenne du nombre de cristaux par gouttes	Ecart à la loi de Poisson (%)
1	0,41799	3,18
2	0,42105	0,01
3	0,87913	0,09
4	0,82162	0,07
5	1,1016	1,46
6	1,8617	0,38
8	2,7810	0,26

On peut ensuite tracer le nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps  $\Delta t$ , temps pendant lequel la nucléation a eu lieu à la température de nucléation  $T_N$  (fig.39).



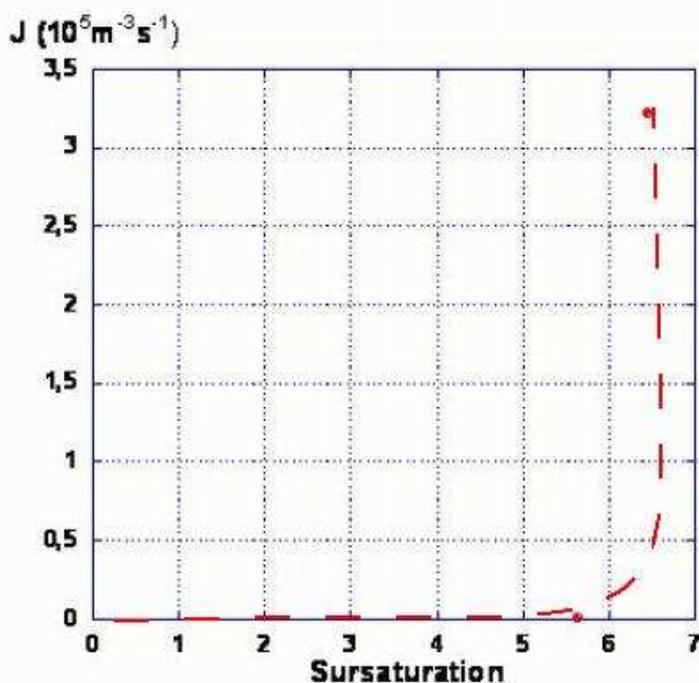
**Figure 39** : Nombre moyen de cristaux par goutte en fonction du temps de nucléation  $\Delta t$

La pente de la droite représente la fréquence de nucléation pour 250nL de solution, et l'ordonnée à l'origine représente l'impact de la nucléation hétérogène. Ici l'ordonnée à l'origine étant nulle, il n'y a donc, apparemment, pas de nucléation hétérogène. Sur les photos (fig.37), on voit bien que très peu de cristaux ont nucléé à l'interface eau/huile, et de plus ici, les solutions sont filtrées et contiennent donc très peu de poussières, impuretés etc... Ajoutons à cela que, le volume étant de l'ordre de la centaine de nanolitres, la probabilité d'avoir une poussière au sein d'une goutte n'est pas égale à 1 et par conséquent, sur l'ensemble de gouttes utilisées pour une expérience, seules quelques unes contiennent une poussière ou impureté, qui est un site de nucléation hétérogène.

Dans notre cas, la pente de la droite est de 0,29 pour 250nL, si on ramène cette valeur aux unités SI, cela nous donne une fréquence de nucléation de  $J = 3,22.10^5 \text{ m}^{-3}\text{s}^{-1}$ , pour une sursaturation de  $\beta = 6,45$ .

Nous avons effectué une série d'expériences, dans des conditions exactement identiques (tampon, pH, concentration en sel et températures) mais pour une concentration de 17,5 mg/mL ( $\beta = 5,65$ ), et nous n'avons constaté aucune nucléation.

Cela nous permet de construire la courbe représentant la fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation (fig.40) correspondant au schéma de la figure 9 de la partie 'I. Les notions reliées à la cristallisation'.



**Figure 40** : Représentation de la fréquence de nucléation en fonction de la sursaturation pour les expériences menées sur le Lysozyme à pH = 4,5, 0,7M de NaCl,  $T_N = 20^\circ\text{C}$  et  $T_C = 25^\circ\text{C}$ .

Les mesures étant longues à effectuer, nous avons seulement deux points, la priorité ayant ensuite été donnée aux expériences en présence de champ externe.

Nous travaillons dans des conditions telles, que nous avons un peu plus d'un cristal par seconde pour des volumes de  $1\mu\text{L}$ , soit  $3,22.10^5$  cristaux par seconde pour des volumes de  $1\text{m}^3$ , l'intérêt de diminuer le volume est donc de pouvoir mesurer la fréquence de nucléation et même d'atteindre des sursaturations plus élevées que pour un gros volume. Cela nous permet de mesurer des fréquences de nucléation y compris dans la zone de la courbe (fig.9) où elle augmente rapidement avec la sursaturation. L'intervalle de mesure est donc plus étendu pour les petits volumes que pour les gros, ce qui permet plus de précision sur le tracé de cette courbe.

En ce qui concerne ces expériences, Dixit<sup>[51]</sup> a récemment remis en cause cette méthode de détermination de la fréquence de nucléation. En effet, le rayon critique à partir duquel le germe est considéré comme un cristal est plus faible à la température de nucléation

qu'à la température de croissance. Il est donc possible que certains germes aient atteint la taille critique ( $r_N^*$ ) à la température de nucléation ( $T_N$ ) mais se retrouvent avec une taille inférieure à la taille critique ( $r_C^*$ ) lorsqu'on augmente la température jusqu'à la température de croissance ( $T_C$ ) (eq.III-4). Et donc il est possible qu'on dissolve quelques germes nucléés à  $T_N$  lorsqu'on passe à  $T_C$ .

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT \ln \beta} \quad \text{Eq III-3}$$

$$r_N^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT_N \ln \frac{C}{C_N^*}} < r_C^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT_C \ln \frac{C}{C_C^*}} \quad \text{Eq III-4}$$

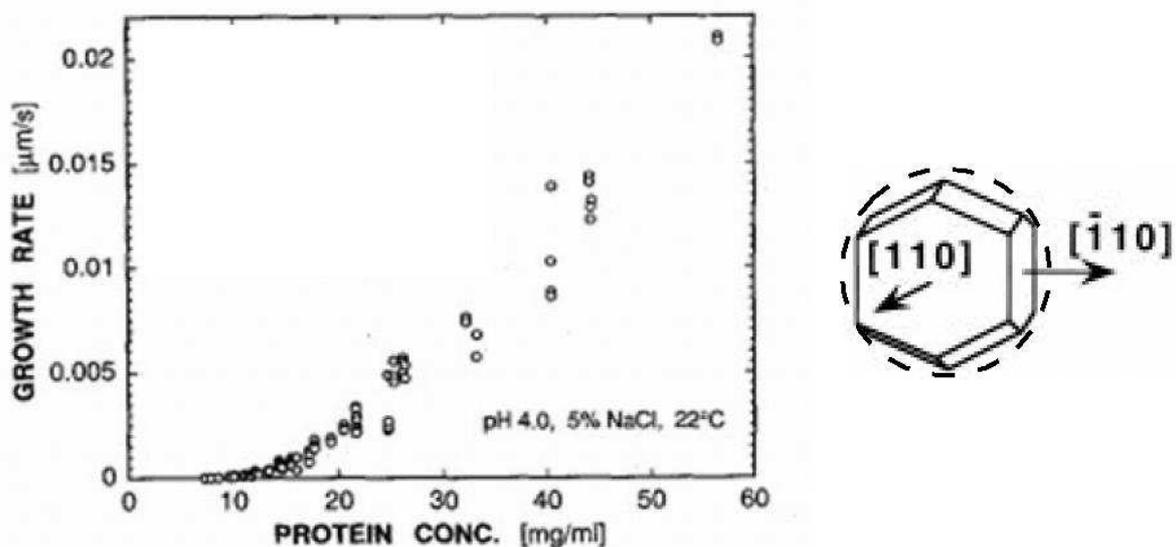
Avec  $r_i^*$  le rayon critique à la température  $T_i$

$C_i^*$  la solubilité à la température  $T_i$

Pour une concentration en solution de Lysozyme de 20mg/mL,  $\Omega = 29,7\text{nm}^3$  et un  $\gamma = 1\text{mJ.m}^{-2}$  [57], pour  $T_N = 20^\circ\text{C}$ ,  $C_N^* = 3,1\text{mg/mL}$ , on a  $r_N^* = 7,8721\text{nm}$ , pour  $T_C = 25^\circ\text{C}$ ,  $C_C^* = 4,68\text{mg/mL}$ , alors  $r_C^* = 9,9351\text{nm}$ .

Ce qui fait 69 molécules de Lysozyme dans le germe critique à la température de nucléation et 138 molécules dans le germe critique à la température de croissance.

Considérons maintenant la vitesse de croissance d'une face d'un cristal de Lysozyme (fig.41).



**Figure 41** : Vitesse de croissance de la face [110] en fonction de la concentration, pour un pH = 4,0 et 0,85M de NaCl à une température de 22°C d'après Nadarajah et al. [58] Schéma d'indexation des faces d'un cristal de Lysozyme.

Il s'agit ici de la vitesse de croissance de la face [110], mais on voit sur le schéma représentant les faces d'un cristal de Lysozyme que l'on peut assimiler la vitesse de croissance de cette face à la vitesse de croissance des autres faces. Sachant de plus, que nous ne cherchons ici qu'un ordre de grandeur du temps qu'il faut pour que le cristal de Lysozyme

croisse de 7,87nm à 9,93nm, on peut considérer que la vitesse de croissance de la face [110] est comparable à la vitesse de croissance du rayon du cristal de Lysozyme.

On voit sur le graphique (fig.41) que pour une concentration de 20mg/mL on a une vitesse de croissance de 0,002 $\mu$ m/s, soit 2nm/s, il faut donc une seconde pour que le cristal nucléé à 20°C atteigne la taille du germe critique de la température 25°C. Or pour augmenter la température de 20°C à 25°C, il faut plus d'une seconde, on peut donc en conclure que tous les cristaux nucléés à la température de nucléation,  $T_N = 20^\circ\text{C}$ , ont cru jusqu'à pouvoir être observés à la température de croissance,  $T_C = 25^\circ\text{C}$ .

### c. Confrontation théorie/expérimentation

On peut à présent comparer la valeur de la fréquence de nucléation donnée par l'équation (eq.I-30) de la théorie classique de nucléation par Mersmann et la valeur expérimentale trouvée avec la technique de la double pulsion thermique (tableau2).

Pour le Lysozyme, la littérature<sup>[57, 59, 60]</sup> nous donne comme valeurs :  $D_{AB} = 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ,  $\gamma = 10^{-3} \text{ J}/\text{m}^2$ ,  $C_i^S = 10^{24} \text{ m}^{-3}$ .

La première colonne du tableau 2 présente les valeurs calculées avec l'équation de la théorie classique de nucléation. La valeur de la fréquence de nucléation obtenue étant très éloignée de la valeur trouvée expérimentalement, nous avons voulu voir l'influence de chacun des paramètres de cette équation. Pour cela nous avons pris la valeur expérimentale de la fréquence de nucléation et nous avons calculé de combien aurait du être le facteur pré-exponentiel dans le cas où la valeur calculée de  $\Delta G$  serait correcte, et la valeur de l'énergie d'activation de germination qu'il faudrait dans le cas où la valeur de  $K_0$  serait correcte.

**Tableau 2 : Etude de l'influence de différents termes de l'équation de la théorie classique de nucléation sur la fréquence de nucléation.**

	Valeurs calculées	J mesurée expérimentalement, $K_0$ calculée, $\Delta G$ ?	J mesurée expérimentalement, $\Delta G$ calculée, $K_0$ ?
$\Delta G$	$4,13.10^{-19}$	$1,16.10^{-19}$	$4,13.10^{-19}$
$K_0$	$10^{18}$	$10^{18}$	$6,99.10^{49}$
J	$4,6010^{-27}$	$3,22.10^5$	$3,22.10^5$

Cet écart entre les expériences et la théorie a déjà été observé et commenté dans la littérature<sup>[61]</sup>.

On voit qu'une faible erreur sur  $\Delta G^*$  change complètement J. Le facteur  $K_0$  semble bien approché par Mersmann (modèle semi-empirique), on peut raisonnablement penser qu'il n'y a pas plus que quelques ordres de grandeurs d'erreur.

Donc  $\Delta G^*$  est très mal appréhendé par la théorie classique de nucléation, ce qui paraît logique du fait des hypothèses simplificatrices qui fonctionnent très bien avec les petites molécules, mais deviennent gênantes pour les molécules plus grosses, qui ont donc un rayon de germe critique beaucoup plus important.

## **B. Champs externes**



## I. Application d'un champ externe : étude bibliographique

Nous avons vu dans la première partie de ce manuscrit que la nucléation est un phénomène très complexe qui ne se produit pas souvent là où on l'attend. Étant donné l'importance de cette étape dans l'industrie pharmaceutique, il est important de trouver un moyen de la contrôler aussi bien dans le temps que dans l'espace. Afin d'éventuellement mettre au point de nouveaux procédés de cristallisation. De plus, en provoquant la nucléation dans une zone de sursaturation où elle n'a pas lieu naturellement, on peut éventuellement trouver de nouvelles phases, ce qui est encore plus intéressant pour l'industrie pharmaceutique. En effet, lorsqu'un principe actif est breveté et mis sur le marché, il est important de connaître ses polymorphes et leurs domaines de prédominance. Les différents polymorphes d'un principe actif n'ayant pas les mêmes propriétés physico-chimiques, on comprend aisément l'importance de connaître les différents polymorphes d'un principe actif pour prévenir les éventuelles apparitions de nouvelles phases inconnues. Il nous faut donc un procédé très robuste sur lequel on puisse s'appuyer pour contrôler les phases que l'on veut obtenir. La mise au point d'une méthodologie permettrait une aide à la recherche des conditions de cristallisation, des polymorphes, mais aussi un contrôle des propriétés d'usage via le contrôle de la taille et de la phase cristallisée.

D'un point de vue plus fondamental, dans cette deuxième partie de manuscrit, nous chercherons à avoir un contrôle à la fois spatial et temporel de la nucléation. En effet, nous avons les outils pour observer la nucléation (microscope,...), mais ne sachant pas quand ni où regarder au sein de la solution, il est quasiment impossible d'observer la nucléation d'un germe cristallin, sauf si l'on a beaucoup de chance, expérimentalement cela a été reporté une seule fois dans la littérature<sup>[62]</sup>. Pour cela nous appliquons un champ externe à une solution métastable qui, dans les conditions dites classiques i.e. sans champ externe, ne nucléé pas. Notre idée étant de déclencher la nucléation soit par l'apport d'énergie au système pour l'aider à franchir la barrière énergétique  $\Delta G^*$  menant à la nucléation, soit par la création d'une sursaturation localement plus élevée que dans le reste de la solution, soit enfin peut être par orientation des molécules dans la solution, facilitant ainsi l'arrangement ordonné. Les deux premières hypothèses étant reliées à la théorie classique de nucléation, par contre la dernière s'appuie sur la théorie de la nucléation en deux étapes. En effet l'hypothèse de la densification locale amplifierait la première phase de la nucléation, l'alignement des molécules dans la solution agirait sur la deuxième étape de la nucléation.

Nous verrons tout d'abord les études présentes dans la littérature, qui ont été menées sur l'application d'un champ électrique, qu'il soit externe ou interne à la solution. Ensuite viendra une étude de l'influence que peut avoir un champ magnétique sur la nucléation. Le troisième champ externe que nous avons étudié est l'irradiation d'une solution par des ultrasons. Enfin, nous verrons qu'une irradiation lumineuse peut avoir deux effets différents sur la nucléation en fonction de la longueur d'onde de la lampe utilisée et de son énergie.

Notons ici que nous parlons de champs externes même dans le cas d'une application interne du champ à la solution, car le champ agit comme un travail externe sur l'équation thermodynamique de la nucléation (voir la partie théorique 1c 'et la théorie ?' selon Kashchiev<sup>[63]</sup>).

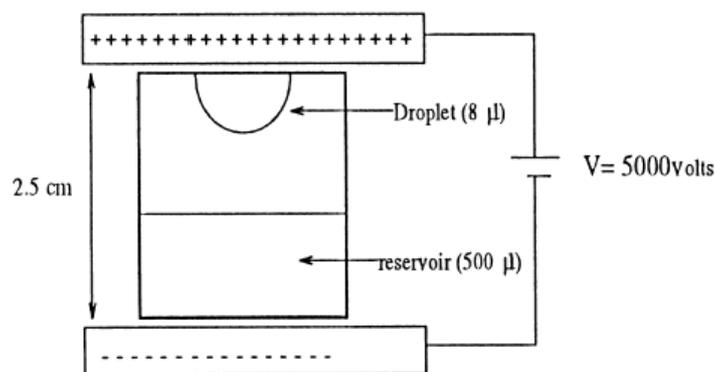
## 1. Nucléation au sein d'un champ électrique

Il y a plusieurs façons d'appliquer un champ électrique à une solution. En effet, on peut simplement placer la cellule au sein d'un champ électrique, sans contact direct avec le courant, dans ce cas, il s'agit d'un champ électrique externe. Ou bien, on peut appliquer un courant directement à la solution, en plongeant, par exemple, deux électrodes au sein de la solution. Il faut aussi s'intéresser à la nature du courant, le courant continu n'a pas la même influence sur la nucléation que le courant alternatif, et en particulier le courant alternatif fait intervenir un paramètre supplémentaire, à savoir la fréquence du courant. Ici, on ne s'intéresse pas à l'électrolyse.

### *a. Application d'un champ externe*

Pour le champ externe, il s'agit de tensions continues très élevées, de plusieurs milliers de volts, au sein desquelles on place une cellule contenant la solution à cristalliser, avec bien souvent une couche d'air entre les électrodes fournissant l'électricité et la cellule contenant la solution à cristalliser.

Taleb et al.<sup>[64]</sup> se sont intéressés à la cristallisation de protéines, telles que le Lysozyme, sous l'application d'un champ électrique externe de 5000V (fig.42). Il se forme un gradient de concentration en protéine, qui va de la cathode à l'anode. L'influence du champ électrique réduit le nombre de cristaux, et par conséquent leur taille augmente. Le champ électrique aurait donc un effet en taille et en nombre sur les cristaux, probablement indirectement via un gradient de concentration induit par le champ, il se pourrait qu'il y ait aussi un effet sur la qualité cristalline.



**Figure 42** : Schéma de l'expérience menée par Taleb et al.<sup>[64]</sup>

Dans une deuxième publication, Taleb et al.<sup>[65]</sup> se sont intéressés à la cristallisation du Lysozyme, au sein d'un champ électrique externe, tout en observant les variations de concentration en protéine dues au champ et les cinétiques de cristallisation. Il semble que le champ électrique fasse diminuer le temps d'induction. De plus, il a été observé que les effets du champ électrique étaient plus importants lorsque le pH de la solution se trouvait très éloigné du point isoélectrique de la protéine.

Nanev et al.<sup>[66]</sup>, se sont intéressés au fait que la nucléation du Lysozyme ait préférentiellement lieu à la cathode. D'après leurs travaux, en solution la protéine s'entoure d'ions Cl<sup>-</sup>, ce qui a pour effet de donner à la protéine une charge apparente négative et donc la

fait migrer jusqu'à l'anode, d'où le gradient de concentration qui part de la cathode. De plus, ils se sont intéressés à l'effet du champ en fonction de la température, ils sont arrivés à la conclusion que la température joue un rôle important sur l'influence du champ électrique. En effet, le champ a beaucoup plus d'influence sur la nucléation, le temps d'induction, la taille et le nombre de cristaux, à 0°C qu'à 18°C, par exemple. A 0°C, quasiment la totalité des cristaux se trouvent sur la paroi derrière laquelle est placée la cathode, et ils semblent s'orienter suivant leur axe C.

On voit ici que l'influence d'un champ électrique externe sur la nucléation est positive. Cependant, Al-Haq et al.<sup>[67]</sup> montrent dans un récent papier qu'un champ électrique externe peut aussi avoir un effet négatif sur la fréquence de nucléation, en effet, dans une goutte placée au sein d'un champ électrique continu intense, le nombre de cristaux de Lysozyme nucléés en présence du champ est plus faible que le nombre de cristaux nucléés sans champ électrique, respectivement de 1 à 6 et 8 cristaux dans les conditions normales (une douzaine d'expériences a été effectuée).

En ce qui concerne le champ électrique alternatif, très récemment, Koizumi et al.<sup>[68]</sup> ont observé une variation de l'effet du champ électrique alternatif en fonction de la fréquence de ce dernier. Pour une fréquence de courant alternatif de 1MHz, le nombre de cristaux nucléés en présence du champ électrique est supérieur à l'échantillon témoin, sans champ. Pour une fréquence de 500kHz, la distribution du nombre de cristaux par goutte est similaire avec et sans champ électrique. Et pour une fréquence de 10kHz, la fréquence de nucléation est plus faible pour une goutte soumise au champ électrique alternatif. Il semblerait qu'ils contrôlent la fréquence de nucléation du Lysozyme en fonction de la fréquence du champ électrique, c'est ce point qui est discuté théoriquement dans cette publication à partir des rapports des constantes diélectriques, pour cela ils se réfèrent aux travaux de Kashchiev présentés plus loin.

### *b. Application d'un champ interne*

Les travaux menés sur l'application d'un champ interne ne présentent pas tous les mêmes résultats.

Moreno et al.<sup>[69]</sup> trouvent une influence négative sur le nombre de cristaux, il y a moins de cristaux, cependant leur taille est plus importante, et le temps d'induction est plus faible. Plus les électrodes sont proches l'une de l'autre, plus les premiers cristaux apparaissent rapidement. Mirkin et al.<sup>[70]</sup> arrivent à la même conclusion à la suite de leurs travaux sur le Lysozyme et la thaumatine, ils ajoutent aussi que le champ électrique n'a aucun effet sur la qualité des cristaux, ou même leur structure. Ils se posent plusieurs questions à la suite de ces travaux, la solubilité est-elle influencée par le champ ? On peut aussi se demander si le champ a la même influence sur d'autres protéines, ou seulement sur celles-ci ?

Penkova et al.<sup>[71]</sup> se sont intéressés à la ferritine et l'apoferritine, tous deux semblent sensibles au champ électrique, mais seulement à partir d'une certaine valeur de l'ordre de 5 kV.cm<sup>-1</sup>, alors que le Lysozyme est sensible dès l'application du champ, quelle que soit sa force. De plus ils ont aussi constaté une orientation des cristaux pour le Lysozyme, qui n'a pas lieu avec la ferritine ou l'apoferritine.

Dans ces deux études <sup>[69, 71]</sup>, on retrouve la précipitation d'une phase ou d'un gel que les auteurs qualifient d'amorphe, près de la cathode, qui peut être due à la présence d'ions Cl<sup>-</sup> dans la solution d'après ces mêmes auteurs.

L'application d'un champ électrique interne peut être à l'origine de nouvelles techniques de formation d'agrégats<sup>[72]</sup>, ou encore, l'électrophorèse peut être utilisée pour cristalliser l'estradiol 17β-dehydrogénase<sup>[73]</sup>.

### c. Et la théorie ?

D'un point de vue théorique, en 1972 Kashchiev<sup>[63]</sup> proposait une façon de calculer l'effet d'un champ électrique sur l'équation thermodynamique d'une nucléation, en prenant la nucléation d'une phase liquide au sein d'une phase vapeur, à savoir la théorie classique de nucléation. Il ajoute un terme relatif au champ électrique dans l'équation de l'énergie libre de nucléation :

$$\Delta G(r) = \Delta G_0(r) + \Delta W_E(r) \quad \text{eq I-1}$$

Avec  $\Delta G_0(r)$  l'énergie libre en l'absence de champ électrique et  $\Delta W_e(r) = W_2 - W_1$  l'énergie libre due au champ.

$$W_1 = \frac{\epsilon_m}{8\pi} \int_{\Omega_m} E^2 dv \quad \text{eq I-2}$$

$$W_2 = \frac{\epsilon_c}{8\pi} \int_{\Omega_c} E_c^2 dv + \frac{\epsilon_m}{8\pi} \int_{\Omega_m - \Omega_c} E_m^2 dv \quad \text{eq I-3}$$

$W_1$  et  $W_2$  représentant respectivement le travail thermodynamique avant et après nucléation d'une nouvelle phase.

Avec  $\epsilon_c$  et  $\epsilon_m$  les constantes diélectriques de la nouvelle phase et de la phase de départ,  $E_c$  et  $E_m$  les champs électriques à l'intérieur et à l'extérieur du germe et  $\Omega_c$  et  $\Omega_m$  les volumes occupés par le germe et par le système.

Après avoir considéré que le germe et le système étaient des sphères et après avoir considéré que le rayon du volume du système est très grand devant celui du germe, on obtient :

$$\Delta W_E = -k_B T c E^2 n \quad \text{eq I-4}$$

Avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,

$n$ , le nombre de molécules dans le germe et

$c = \epsilon_m f(\lambda) v_c / 8\pi k_B T$  est une constante avec  $f(\lambda) = (1-\lambda)/(2+\lambda)$ ,  $\lambda = \epsilon_c / \epsilon_m$ .

Si on considère que l'équation de l'énergie libre  $\Delta G(r)$  en présence d'un champ électrique est analogue à son expression sans champ :

$$\Delta G(n) = -k_B T s n + a \sigma n^{2/3} \quad \text{eq I-5}$$

Avec  $\sigma$  l'énergie de surface spécifique et

$a = (4\pi)^{1/3} (3v_0)^{2/3}$  est une constante.

Cela revient à considérer que la sursaturation en présence d'un champ électrique est égale à :

$$s = s_0 + s_E \quad \text{eq I-6}$$

Avec  $s_0 = \ln(p/p_e)$ ,  $p_e$  étant la pression à l'équilibre, est la sursaturation sans champ et  $s_E$  est la sursaturation induite par le champ électrique.

Donc lorsque  $s > 0$ , il existe un maximum pour  $\Delta G(r) = \Delta G^*$  qui est donné par l'expression :

$$\Delta G^* = \left[ \frac{2a\sigma}{k_B T (s_0 + cE^2)} \right]^3 \quad \text{eq I-7}$$

Grâce à l'équation de définition de la fréquence de nucléation :

$$J = \left[ \frac{\left( \frac{-d^2 \Delta G}{dn^2} \right)_{n=n^*}}{2\pi k_B T} \right]^{1/2} D_k N \exp\left( \frac{-\Delta G^*}{k_B T} \right) \quad \text{eq I-8}$$

Avec N le nombre total de molécules dans le système et

$D_k$  est donné par :  $D_k = \alpha n^{2/3}$ .

Donc on obtient l'expression de J la suivante :

$$J = A \exp\left[ \frac{-B}{(s_0 + cE^2)^2} \right] \quad \text{eq I-9}$$

Avec A le facteur pré-exponentiel de l'équation I-8 et

$B = 4a^3 \sigma^3 / (3k_B T)^3$  une constante.

Donc si c est positif (i.e. pour  $\epsilon_c < \epsilon_m$ ), le champ électrique aura une influence positive sur la nucléation, donc elle sera augmentée par la présence d'un champ électrique. Par contre si  $\epsilon_c > \epsilon_m$  le champ électrique aura une action inhibitrice sur la nucléation.

Il aura fallu attendre 2002 avec Saban et al.<sup>[74]</sup> pour trouver une étude théorique de l'influence d'un champ électrique sur la cristallisation elle-même. Leur étude a montré que le coefficient c de Kashchiev, pour une nucléation de cristal dans une goutte sphérique en présence d'un champ électrique externe dont les électrodes sont séparées de la goutte par une couche d'air, était égale à :

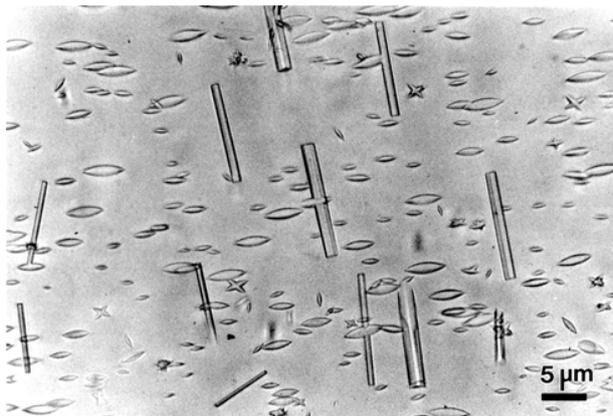
$$c = \frac{9\epsilon_0 \Omega_c \epsilon_m (\epsilon_m - \epsilon_c)}{2k_B T (\epsilon_c + 2\epsilon_m)(2 + \epsilon_m)^2} \quad \text{eq I-10}$$

Avec  $\epsilon_0$  la permittivité électrique de l'air.

En comparant le nombre de molécules nécessaires à la formation du nucléus en absence et en présence d'un champ électrique externe, ils arrivent à la conclusion que plus la différence entre les constantes diélectriques de la solution et du cristal est grande et plus l'effet du champ électrique sur la nucléation sera important. C'est aussi la conclusion de Koizumi et al. en 2009<sup>[68]</sup>.

## 2. Nucléation au sein d'un champ magnétique

Depuis ces dernières années, beaucoup de travaux ont été menés sur l'influence d'un champ magnétique, plus ou moins intense, sur la nucléation et la croissance des cristaux.<sup>[75-85]</sup> La plupart des chercheurs se sont intéressés à l'orientation et la qualité des cristaux nucléés dans un champ magnétique. Il faut rappeler ici que les protéines ont des propriétés diamagnétiques dues aux liaisons peptidiques et aux empilements des cycles aromatiques, de plus elles présentent une anisotropie qui donne la différence de sensibilités magnétiques suivant deux axes  $i$  et  $j$ ,  $\Delta\chi$  dans l'équation I-11.



**Figure 43** : Cristaux de BPTI dans un champ magnétique de 1,25 T d'après Astier et al.<sup>[82]</sup>

Dans le domaine de la biologie, le champ magnétique est très utilisé pour orienter les macromolécules<sup>[81-85]</sup>, voire même les chaînes de polymères<sup>[86]</sup>. Astier et al.<sup>[82]</sup> proposent une condition limite à partir de laquelle l'orientation des cristaux a lieu (fig.43), il faut que le nombre de molécules alignées au sein du cristal soit suffisamment grand pour que l'énergie du champ magnétique ait plus d'influence que l'énergie thermique qui, elle, agit aussi bien sur les molécules alignées que non-alignées. Katsuki et al.<sup>[83]</sup>, eux, donnent une valeur limite de la différence des énergies libres de Gibbs, à partir de laquelle l'orientation a lieu : (eq. I-11)

$$\Delta(\Delta G) = \frac{n}{2\mu_0} (\chi_i - \chi_j) B^2 \geq kT \quad \text{eq I-11}$$

avec  $n$ , le nombre de molécules,

$\chi_i$  et  $\chi_j$  les sensibilités magnétiques suivant les axes  $i$  et  $j$ ,

$\mu_0$  la perméabilité magnétique du vide ( $4\pi \cdot 10^{-7}$  H/m) et

$B$  l'intensité du champ.

L'orientation a lieu pour  $\Delta(\Delta G)$  supérieure ou égale à l'énergie thermique  $kT$ .

Or, à l'heure actuelle, les expériences menées utilisaient seulement un champ de quelques Teslas<sup>[82]</sup>. Ataka et al.<sup>[79]</sup>, en déduisent une taille critique, pour que les cristaux puissent s'orienter dans un champ magnétique de 0,3T, de 1 à 2  $\mu\text{m}$  pour le Lysozyme, ce qui correspond à un cristal de  $10^8$  molécules ( $\Delta\chi = 5 \cdot 10^{-27}$  J/T<sup>2</sup>).

Pour agir à l'échelle de la molécule, c'est-à-dire sur la nucléation et non sur la croissance des cristaux, il faudrait un champ magnétique continu homogène de l'ordre de  $10^4$ T, ce qui est impossible à réaliser pour l'instant. Dans l'avenir, on peut penser à un champ magnétique pulsé qui permettrait d'atteindre de telles valeurs mais seulement pendant un

temps de l'ordre de la femtoseconde. Ce type de pulsion se rapprocherait, dans l'effet, d'un laser d'une puissance de l'ordre du gigawatt avec une fréquence de pulsation de l'ordre de la femtoseconde, dans le sens où on aurait une orientation des molécules par un effet Kerr.

Ce qui est confirmé par d'autres travaux montrant que les cristaux ne s'orientent pas pendant la nucléation ou la croissance, mais seulement pendant le temps de sédimentation<sup>[75]</sup>. Ces résultats fournissent aussi une façon de déterminer le temps de sédimentation, en appliquant de façon discontinue le champ magnétique.

Sakurazawa et al.<sup>[77]</sup>, résumant les conditions d'orientation des cristaux. Il faut que :

- Les molécules aient des propriétés diamagnétiques anisotropiques assez importantes.
- Un nombre assez important de molécules soient alignées sur une rangée du cristal (effet coopératif).
- Les cristaux soient en suspension dans la solution, en effet, dans le cas de la nucléation hétérogène de l' $\alpha$ -amylase, Astier et al.<sup>[82]</sup> n'observent pas d'orientation, alors que les mêmes cristaux introduits dans la solution pour l'ensemencer s'orientent dans le champ magnétique.

L'influence du champ magnétique sur d'autres paramètres a aussi été étudiée. Ainsi, pour certains<sup>[76]</sup>, le champ magnétique diminue de 10 à 60 % le taux de croissance, et diminuerait la dissolution des cristaux.

En ce qui concerne le nombre de cristaux, les études ne sont pas toutes d'accord entre elles, pour la plupart, le nombre de cristaux n'est pas influencé par le champ magnétique<sup>[78]</sup>, mais par la gravité. Cependant, pour certains<sup>[80]</sup>, le nombre de cristaux semble être réduit par l'application du champ magnétique, ils avancent aussi que les propriétés du cristal soient changées par ce milieu. Alors que par opposition, Katsuki et al.<sup>[87]</sup> n'observent pas de changement dans la structure des cristaux.

Le champ magnétique n'est pas intéressant pour notre étude, dans le sens où il agit sur le cristal une fois qu'il est formé, alors que l'on veut agir sur la formation du cristal.

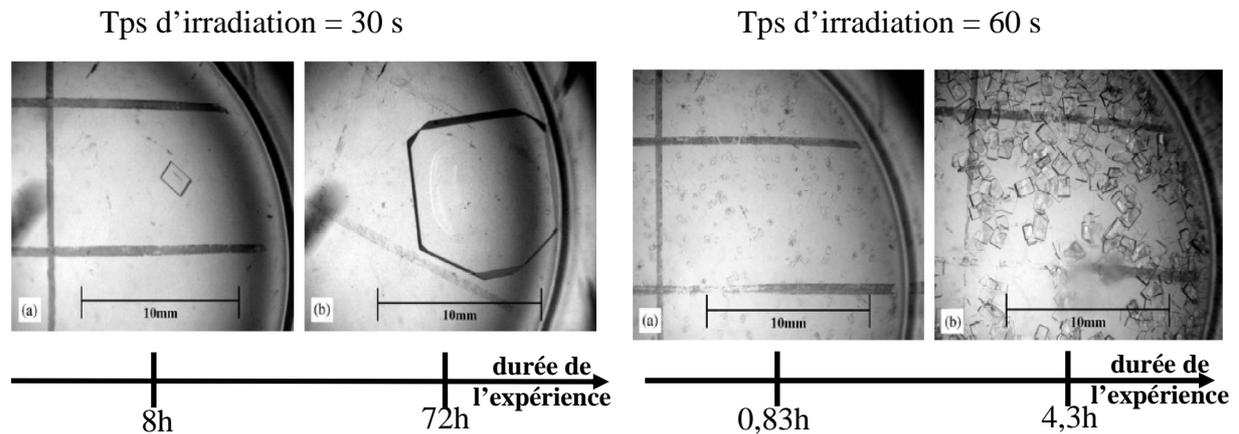
### **3. Nucléation en présence d'ultrasons**

Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées sur l'influence des ultrasons sur la nucléation, et plus généralement sur la cristallisation, en effet, Ueno et al.<sup>[88]</sup> ont montré que les ultrasons agissaient sur le polymorphisme de la tripalmitine ainsi que sur celui de la trilaurine. Dans la littérature, on ne trouve que des travaux menés avec des ultrasons suffisamment puissants pour former des bulles de cavitation.

#### ***a. Effets sur la nucléation primaire***

Depuis plusieurs années, on sait que les ultrasons ont un effet sur la nucléation primaire homogène. Les dernières études sur le sujet tendent à montrer que le temps d'induction est réduit par la présence d'ultrasons<sup>[88, 89]</sup>. Il semblerait donc, que le temps d'induction est inversement proportionnel à la puissance des ultrasons, ces derniers permettent de réduire le temps d'induction, y compris pour des sursaturations très basses, ils permettent donc de nucléer à des sursaturations auxquelles on n'aurait jamais pu avoir de nucléation.

Etant donné l'influence des ultrasons sur la nucléation primaire homogène, Miyasaki et al.<sup>[90]</sup> ont travaillé sur l'influence des ultrasons sur la taille des cristaux. En effet, comme les ultrasons influencent la nucléation primaire homogène, ils contrôlent donc le nombre de germes formés, et comme la taille est liée au nombre de cristaux présents (plus il y a de cristaux plus ils sont petits, moins il y en a plus ils sont gros) il est donc normal d'avoir de plus petits cristaux lorsqu'ils sont plus nombreux. De plus il est confirmé ici que les ultrasons permettent une nucléation primaire homogène dans des zones où elle n'a pas lieu normalement (fig.44).



**Figure 44** : Crystallisation de l'acide acétique, par irradiation aux ultrasons.

La figure 44 montre que la durée de l'application des ultrasons a aussi une influence sur le nombre de cristaux nucléés. On peut donc se demander si au-delà d'un certain temps d'application les ultrasons n'ont pas aussi un effet sur la nucléation secondaire.

Cependant, il est précisé qu'il y a une valeur limite de puissance des ultrasons en dessous de laquelle les ultrasons n'ont aucun effet. Il existe aussi certains cas pour lesquels la nucléation semble être inhibée par la présence d'ultrasons.

Plusieurs théories pour comprendre l'influence des ultrasons sur la nucléation ont été avancées. Tout d'abord, Ohsaka et al.<sup>[91]</sup> ont travaillé sur l'apparition des cristaux dans les bulles de cavitation, y a-t-il un germe à l'intérieur de la bulle, qui en grandissant la fait éclater ? Ou le germe apparaît-il spontanément lorsque la bulle éclate ?

Guo et al.<sup>[92]</sup> proposent une approche théorique de l'influence des ultrasons sur le coefficient de diffusion  $D_{AB}$ .

L'expression du coefficient de diffusion dans un champ ultrasonique est : (eq.I-12)

$$D_{AB} = \frac{\left( kT + C_A \frac{dE_{0A}}{dC_A} \right)}{6\pi\mu_B r_A} \quad \text{eq I-12}$$

Avec  $E_{0A}$  l'énergie fournie par les ultrasons,

A le soluté,

B le solvant,

$\mu_B$ , la viscosité du solvant et

$r_A$ , le rayon d'une molécule de soluté.

Donc le coefficient de diffusion, que l'on retrouve dans l'équation de la fréquence de nucléation (eq.I-30) de la partie 'A. Conditions classiques', augmente avec l'énergie fournie par les ultrasons. La diffusion étant meilleure, le temps d'induction est donc réduit. Cependant, il semble qu'en ce qui concerne BaSO<sub>4</sub>, le coefficient de diffusion ne soit pas sensible à la présence ou non d'ultrasons.

Il reste encore bien des questions en suspens telles que :

- Les ultrasons augmentent-ils l'hétérogénéité du milieu, ou créent-ils simplement de nouveaux sites de nucléation ?
- Les ondes présentes dans le milieu facilitent-elles le rapprochement des molécules, facilitant ainsi la nucléation ?

### *b. Effets sur la nucléation secondaire*

En nucléation secondaire, les ultrasons permettent une nucléation plus rapide<sup>[93]</sup> et donc une désaturation prématurée pour une solutionensemencée. Ici aussi, les ultrasons semblent contrôler la taille des cristaux.

Chow et al.<sup>[94]</sup>, eux aussi, se sont intéressés à la nucléation secondaire, et il reste encore quelques points à éclaircir, en particulier, est-ce que les ultrasons forment plus de germes, ou bien y a-t-il brisure par attrition ?

Ici encore, les ultrasons semblent avoir une influence plutôt mécanique sur la nucléation, en effet, dans le cas de la nucléation primaire, la cavitation favorise l'agitation de la solution et donc la 'rencontre' des molécules entre elles, et donc cela favorise la nucléation. Pour la nucléation secondaire, il s'agit vraiment d'un phénomène physique, puisqu'il y a, très probablement, brisure des cristaux, ce qui forme plus de germes.

L'étude de l'influence de la puissance des ultrasons sur la fréquence de nucléation reste encore très succincte. En effet, on trouve quelques études où les auteurs se sont intéressés à la relation entre la puissance des ultrasons et la croissance des cristaux<sup>[95, 96]</sup>, et montrent que la puissance des ultrasons a un effet sur la croissance dans le sens où plus les ultrasons sont puissants, plus les cristaux sont petits. Ce dernier point est en accord avec le fait que les ultrasons sont aussi utilisés pour réduire en poudre les cristaux, et avec le fait qu'il y a une nucléation secondaire si on applique les ultrasons pendant trop longtemps. En ce qui concerne la nucléation à proprement parler, seuls Amara et al.<sup>[96]</sup> ont étudié la température à laquelle a lieu la nucléation, lors d'une cristallisation par refroidissement, en fonction de la puissance des ultrasons, et constatent une différence de 1°C au niveau de la température de nucléation pour une puissance d'ultrasons augmentant de 10W à 100W. Selon eux, il n'y a donc pas d'influence de la puissance des ultrasons sur la nucléation, leur simple présence a beaucoup plus d'influence que la valeur de leur puissance.

#### 4. Nucléation à l'aide de rayons lumineux

Il s'agit ici d'une piste très intéressante dans le cadre de cette étude, en effet, il existe deux types de rayons lumineux agissant tous deux sur la molécule directement, que ce soit par un phénomène non-photochimique<sup>[97-99]</sup>, dit photophysique, ou par un phénomène photochimique<sup>[100, 101]</sup>.

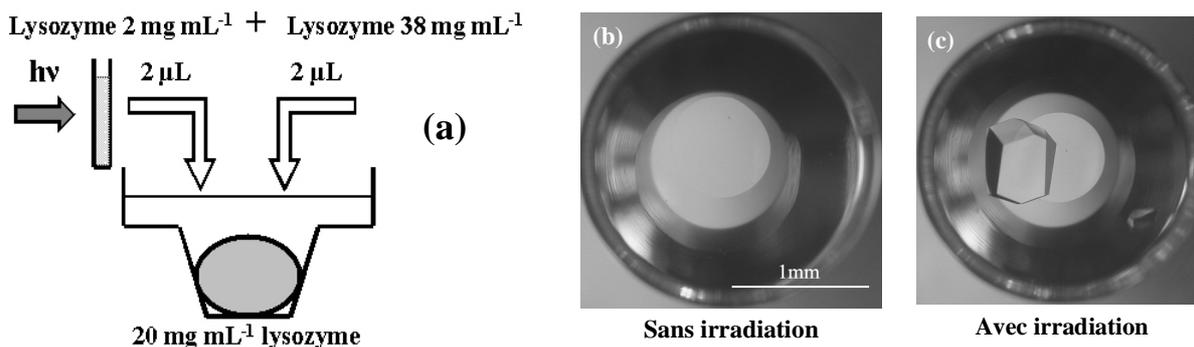
##### *a. Le phénomène non-photochimique*

Il s'agit d'illuminer la solution à l'aide d'un laser pulsé très puissant (de l'ordre du GW), avec une durée de 9 ns. Oxtoby<sup>[98]</sup>, s'appuyant sur les travaux de Garetz et al.<sup>[97]</sup>, évoque le champ électrique intense induit par le laser, celui-ci provoquerait un alignement des molécules, ce qui favoriserait la formation d'un cluster qui pourrait donner naissance à un nucléus. En effet, la fréquence de nucléation augmente avec l'intensité du laser, mais pas de façon linéaire. Ce phénomène reste encore peu compris, Oxtoby<sup>[98]</sup> pense que le facteur pré-exponentiel de la fréquence de nucléation joue un rôle important ici, puisque pour la plus forte intensité du laser, seule la moitié de la solution nucléée, et non pas toute la solution comme on pourrait s'y attendre par propagation de la nucléation.

Cependant, cela reste une piste très intéressante, puisque Zaccaro et al.<sup>[102]</sup> semblent avoir réussi à privilégier la formation d'une forme polymorphique de la glycine, par rapport à l'autre. D'après eux, en utilisant un laser, et en jouant sur la polarisation de la lumière, on peut agir sur le polymorphisme suivant les propriétés anisotropiques des polymorphes. En effet, l'empilement cristallin et les groupes d'espaces avec ou sans centre de symétrie peuvent favoriser la cristallisation d'un polymorphe par rapport à un autre suivant la polarisation de la lumière.

##### *b. Le phénomène photochimique*

Okutsu et al.<sup>[100, 101]</sup> utilisent ici une lampe au xénon, afin d'irradier la solution à cristalliser.

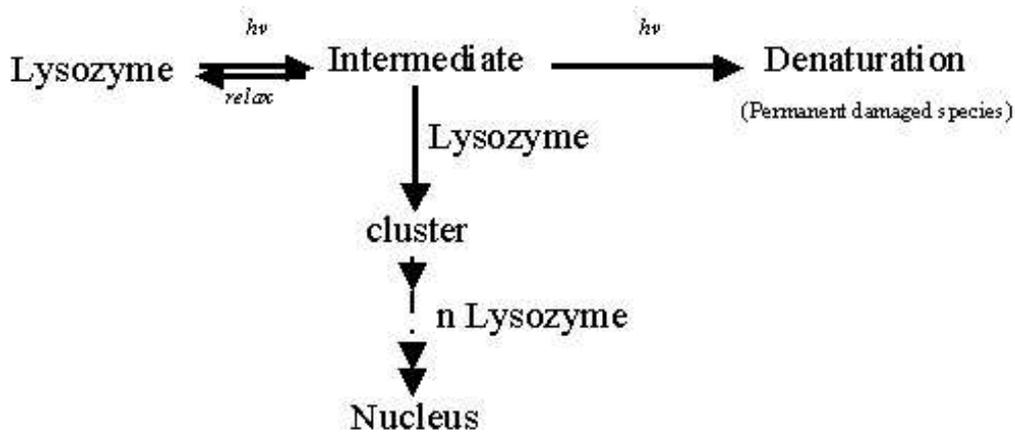


**Figure 45** : Montage expérimental (a), solution sans irradiation (b) et solution irradiée (c).

Le principe est assez simple, on irradie la solution avec une lampe au xénon pendant un temps de 10 à 30 s, afin de déclencher la nucléation.

L'irradiation ne semble pas affecter les propriétés de l'enzyme, ni la structure du cristal. Cependant, Veesler et al.<sup>[101]</sup>, ont constaté qu'une irradiation trop importante dénature

la protéine (fig.46). Ils ont donc procédé à l'ajout d'une faible quantité de protéines irradiées à une solution 'saine' (fig.45a), et ont observé qu'avec l'irradiation, on avait nucléation (fig.45c), alors que sans il ne se passait rien (fig.45b).



**Figure 46 : Mécanisme de l'irradiation du Lysozyme par une lampe au Xe.**

Les auteurs proposent un mécanisme photochimique où un radical se formerait, sur le tryptophane pour le Lysozyme, et aurait pour conséquence une augmentation des interactions attractives entre les molécules, donnant lieu à la création d'un germe.

Il est à noter qu'aucun des auteurs ne propose le développement de procédés industriels de cristallisation en utilisant des champs externes. Les raisons sont principalement la localisation de l'effet d'un champ, les difficultés du changement d'échelle (du laboratoire à la production industrielle), la connaissance et la maîtrise du phénomène engendré. Mais quelques compagnies proposent du matériel pour pilote, principalement pour les ultrasons.

Je rappellerais, enfin, que dans le cadre de cette étude, c'est vers la compréhension des effets et l'aide à la recherche des conditions de cristallisation que nous nous sommes dirigés.



## II. Matériel et méthodes

### 1. Matériel

#### *a. Les molécules étudiées*

Les molécules étudiées dans cette partie sont les mêmes que celles étudiées dans la première partie. Le but étant de comparer le comportement des molécules au cours de la cristallisation, dans les conditions classiques et en présence de champs externes. Dans ce chapitre, selon les champs externes étudiés, les molécules utilisées seront précisées au fur et à mesure. En effet, étant donné les problèmes d'évaporation selon les solvants des molécules, certaines expériences n'ont pas pu être menées sur l'ensemble des molécules.

Rappelons simplement ici que les trois molécules utilisées pour l'expérience du champ électrique, à savoir le BPTI, le Lysozyme et la Glycine ont un point isoélectrique ; si le pH est inférieur au pI, alors la molécule est chargée positivement, si il est supérieur, alors la molécule est chargée négativement.

#### *b. Les montages expérimentaux*

Ici sont présentés les montages expérimentaux liés aux champs externes, les molécules utilisées pour chaque montage seront données dans la partie '2. Méthodes'.

- *Le montage champ électrique*

Le montage champ électrique permet d'appliquer un courant précis à une solution qui est thermostatée et observée par microscopie vidéo. Une cellule en quartz est placée dans une platine de contrôle en température par effet Peltier (fig.47c). Cette platine est placée sur un microscope à optique inversée (Nikon Diaphot) équipé d'une caméra numérique (fig.47b).

Pour réaliser la pointe ultrafine (fig.47d) qui servira d'électrode, on utilise une attaque électrolytique sur un fil de tungstène<sup>[103, 104]</sup>. Pour cela on utilise un fil de tungstène orienté (111) de 125µm de diamètre que l'on plonge dans une solution d'électrolyte, dans notre cas une solution concentrée de NaOH, dans laquelle plonge déjà une contre électrode qui est constituée d'un fil de molybdène (fig.47a). Il faut que le fil de tungstène vienne plonger bien verticalement dans la solution afin que l'attaque donne une pointe qui soit bien symétrique, pour cela on s'aide d'un micromanipulateur. Lorsque le fil de tungstène plonge bien verticalement au milieu du ménisque de la solution de soude concentrée, on applique un courant aux deux électrodes, à savoir le fil de tungstène et le fil de molybdène.

Dans un premier temps on applique un courant alternatif pendant quelques dizaines de secondes, pour 'décaper' le fil de tungstène.

On passe ensuite en courant continu dont la tension est de 4V et le courant de 4mA. Une plaque de verre sépare les deux électrodes dans la solution, en effet, les bulles qui se forment à la contre électrode de molybdène pourraient gêner l'attaque électrolytique du fil de tungstène et donner une pointe déformée. L'attaque électrolytique a lieu à l'interface air/solution et le fil de tungstène prend rapidement une forme de sablier dans cette zone là, jusqu'à ce que le bas du 'sablier' finisse par se détacher entièrement du reste du fil, la brusque

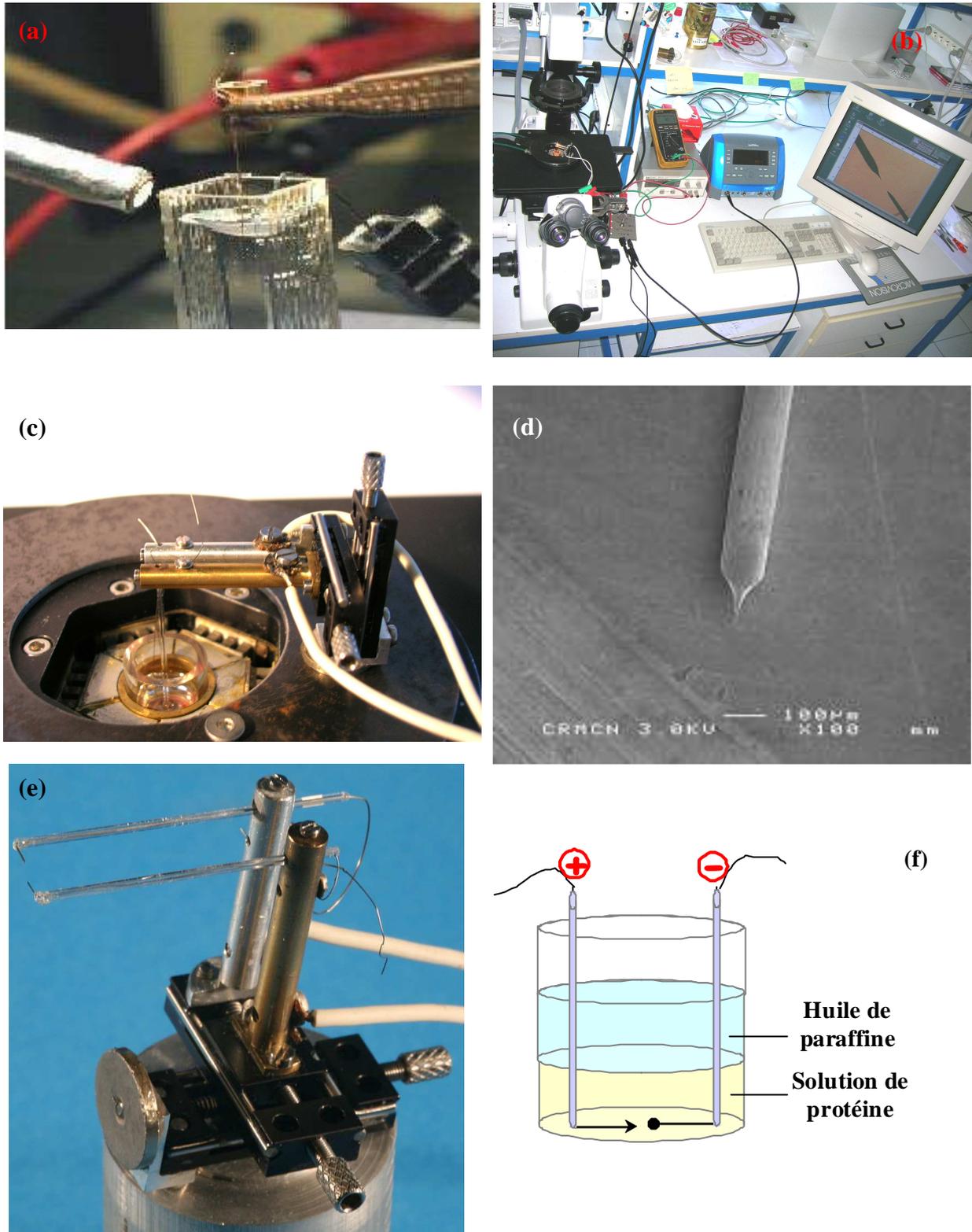
variation du courant dans l'électrolyte interrompt simultanément la source de tension. Toute la fabrication de la pointe est suivie au moyen d'une loupe binoculaire.

Ce fil de tungstène est glissé à l'intérieur d'un tube en quartz de façon à laisser dépasser environ entre 3 et 5 mm de fil du côté de la pointe. On plie ensuite la pointe à 90° par rapport au prolongement du tube puis on colle le fil de tungstène et le tube de quartz avec de la colle Araldite®. On place le montage à l'abri de la poussière sous une cloche pendant toute une nuit pour être sûr du séchage de la colle.

Il ne reste plus qu'à placer le tube de quartz sur le micromanipulateur (fig.47e) équipé de deux électrodes dans lesquelles on a percé un trou pour faire passer les tubes de quartz. On relie ensuite le fil de tungstène à l'électrode.

Pour la contre électrode, on procède de la même façon sauf que le fil de tungstène est plus épais et on ne fait que le nettoyage du fil par un courant alternatif. On ne cherche pas à rendre la contre électrode pointue, on ne cherche à avoir 'un effet de pointe' qu'à une électrode car on provoque ainsi une plus forte anisotropie locale du champ électrique dans la solution. Pour la suite, elle est aussi placée dans un tube de quartz, pliée à 90°, collée au tube de quartz puis placée et reliée à l'électrode sur le micromanipulateur.

Le micromanipulateur est ensuite placé sur la platine Peltier, pour plus de stabilité, le micromanipulateur est équipé d'un aimant qui vient se placer sur une plaque métallique sur la platine Peltier. On le raccorde ensuite à un générateur de tension Metrix (mtx 3240) (fig.47b). On place ensuite 600µL de solution dans la cellule en quartz, que l'on recouvre d'huile de paraffine (fig.47f) afin d'éviter l'évaporation.

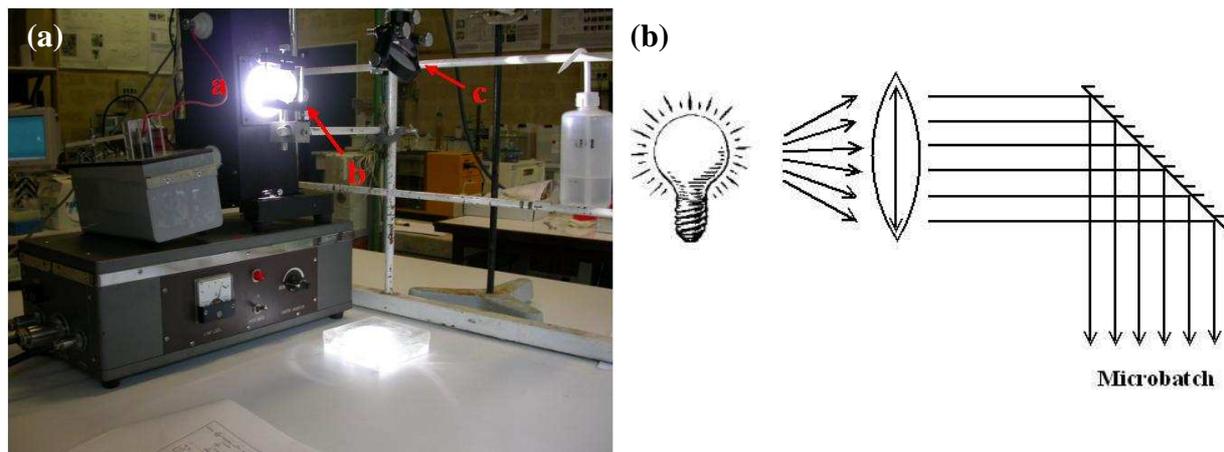


**Figure 47 :** (a) Photo de la cellule en quartz vue de côté ; (b) vue d'ensemble du montage champ électrique avec le microscope à optique inversée, l'ordinateur permettant l'acquisition séquentielle d'images, ainsi que la platine de régulation de la température par effet Peltier ; (c) vue rapprochée de la cellule en quartz insérée dans la platine avec les deux électrodes qui plongent dans la solution ; (d) vue au MEB de l'extrémité pointue d'une des deux électrodes ; (e) vue rapprochée du micromanipulateur ; (f) schéma de la cellule.

- *Le montage irradiation lumineuse*

Le montage de l'irradiation lumineuse est constitué d'une lampe au Xénon blanche ( $\lambda > 355\text{nm}$ ), d'une lentille convergente et d'un miroir (fig.48a).

Il s'agit d'une lampe au Xénon de 150W en continu dont les rayons sont rendus parallèles grâce à une lentille convergente placée à sa distance focale de la lampe, soit 10 cm. Les rayons parallèles sont ensuite réfléchis sur un miroir incliné à  $45^\circ$ , ce qui permet d'avoir une incidence verticale sur les échantillons que l'on veut irradier (fig.48b). Les échantillons que l'on ne souhaite pas irradier sont masqués par des caches noirs ne laissant passer aucun rayon.



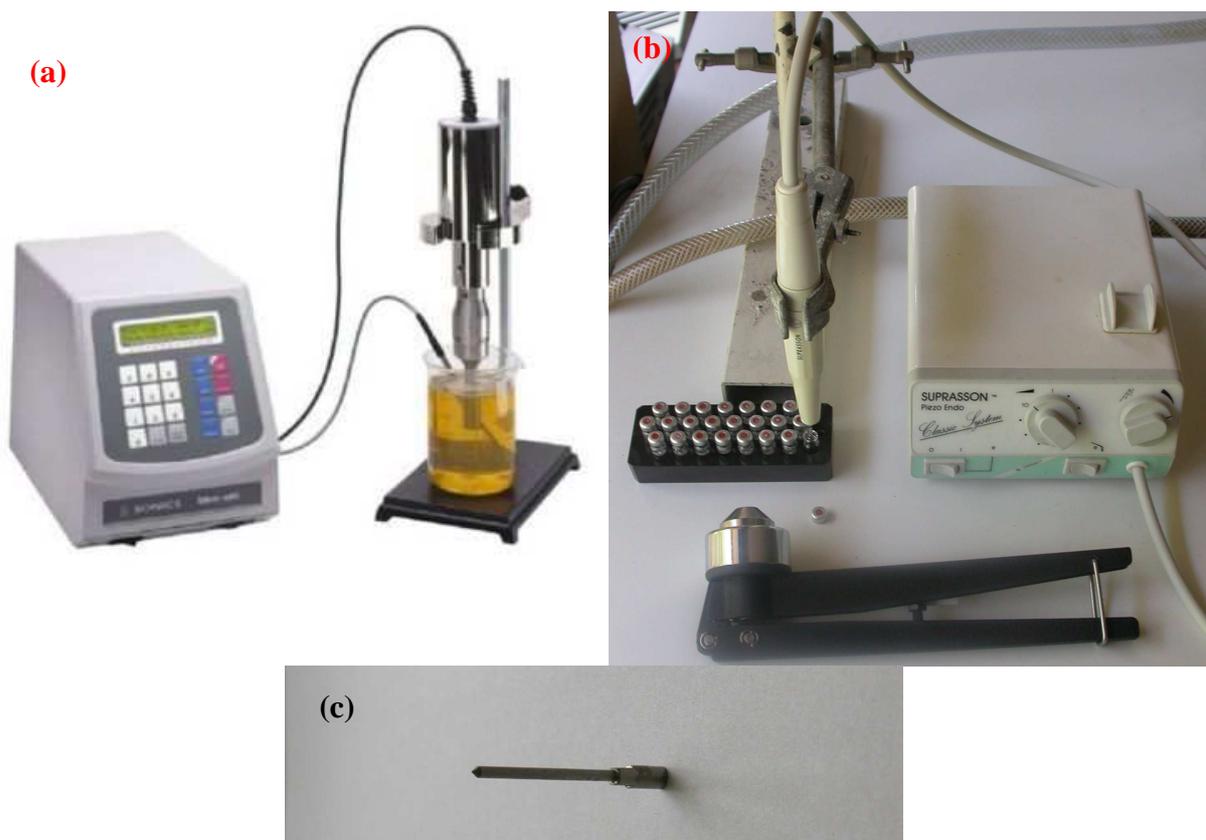
**Figure 48** : Montage d'irradiation lumineuse : (a) vue d'ensemble avec **a** la lampe au Xénon **b** la lentille convergente et **c** le miroir incliné à  $45^\circ$  pour avoir une incidence verticale sur les échantillons ; (b) cheminement des rayons lumineux depuis la source jusqu'aux solutions à irradier.

On utilise aussi un montage permettant d'effectuer le spectre d'absorption transitif. C'est-à-dire qu'on irradie une solution avec le flash d'un laser et on effectue son spectre d'absorption de lumière blanche à intervalles réguliers de quelques  $\mu\text{s}$ , après irradiation. Cela permet de déterminer si les molécules présentes dans la solution sont sensibles à la lumière et parviennent à un état excité, temporaire, pour ensuite redescendre à leur énergie normale. Les spectres effectués à intervalles réguliers montrent la diminution de l'énergie des molécules irradiées lors de leur retour à l'état normal.

Pour effectuer ces mesures, on utilise un Laser  $\text{Nd}^{3+}$  : YAG (Quanta-Ray GCR-130, 30 ns FWHM, 10 mJ pulse-1, 10 Hz) comme source lumineuse d'excitation. Les échantillons sont irradiés au travers de cellules en quartz avec un flux de CA de 40mL/min. Les signaux transitifs sont détectés par un tube photomultiplicateur. Les signaux de sortie sont mesurés par un oscilloscope digital (Sony Tektronix TDS380P) et transmis à un ordinateur. Le montage de ce spectre transitif d'absorption est décrit avec plus de détails dans la littérature par Okutsu et al.<sup>[99]</sup>.

Ce montage met en évidence la présence d'espèces transitoires telles que les radicaux libres.

- *Le montage d'irradiation par ultrasons*



**Figure 49** : (a) Sonicateur Bioblock Vibra Cell 75041 de 500W prêté par l'usine Sanofi-Aventis d'Aramon ; (b) Suprasson Piezo Endo de Satelec de 10W équipé d'un embout spécialement usiné au laboratoire que l'on voit de plus près en (c).

Pour les ultrasons nous avons utilisé deux sonicateurs, le sonicateur Bioblock Vibra Cell 75041 (fig.49a) d'une puissance de 500W qui nous a été prêté par le site de production Sanofi-Aventis d'Aramon pour des études sur l'influence de la puissance sur la nucléation. Nous avons aussi utilisé le générateur d'ultrasons Suprasson Piezo Endo de Satelec (fig.49b) d'une puissance maximale de 10W. Pour l'utilisation de ce sonicateur, nous avons fait usiner au laboratoire un embout qui soit adapté aux vials utilisés pour les expériences, cet embout est de forme cylindrique avec l'extrémité pointue, d'un diamètre de 2mm et de 25 mm de longueur (fig.49c).

On utilise des vials de 600 $\mu$ L qui sont sertis de façon étanche avec des bouchons équipés de septum en caoutchouc. Ces vials sont ensuite insérés dans un bloc du multi-puits, le bloc contient 24 vials, ce qui nous permet avec deux blocs, de mener 48 expériences en même temps. Le multi-puits nous permet à la fois de suivre les expériences par acquisition séquentielle d'images mais aussi de réguler la température des vials, les deux blocs ayant des régulations indépendantes, on peut leur appliquer des consignes différentes.

Pour l'application des ultrasons aux solutions, les vials sont dessertis à l'aide d'une pince, mais ils sont laissés dans le bloc du multi-puits, afin que la température reste constante lors de l'application des ultrasons, car ils provoquent une légère hausse de la température de la solution.

## 2. Méthodes

### *a. Le champ électrique*

Ces expériences ont été menées sur le BPTI, le Lysozyme et la glycine. Pour chacune de ces molécules le protocole est le même. On prépare une solution dont la concentration se trouve au sein de la zone métastable à la température de l'expérience, c'est-à-dire que dans les conditions classiques, il n'y a pas de nucléation spontanée à la température de travail. Après avoir réglé la hauteur des électrodes de façon à ce qu'elles soient proches du fond de la cellule, on injecte 600 $\mu$ L de solution, en faisant bien attention à ne pas faire de bulles d'air. On ajoute ensuite de l'huile de paraffine, non miscible avec la solution à cristalliser, de façon à recouvrir la surface de la solution qui est au contact de l'air pour éviter l'évaporation. Les électrodes sont ensuite reliées au générateur au travers d'un interrupteur permettant d'inverser la polarité. On place aussi un ampèremètre en série. Dans un premier temps, l'interrupteur est laissé sur le zéro, aucun courant ne passe. On allume le générateur de tension, on vérifie qu'il est bien à zéro avant de commuter l'interrupteur. L'interrupteur est ensuite placé dans la position qui nous intéresse, c'est-à-dire de façon à ce que l'électrode pointue ait la polarité qu'il faut pour que la molécule qui se trouve en solution soit préférentiellement attirée par elle. Nous verrons dans la partie III 'Résultats' où se dirige chacune des molécules étudiées. Puis on commence à appliquer doucement une tension tout en surveillant la valeur du courant sur l'ampèremètre. En effet, il ne faut pas que le courant dépasse 1 $\mu$ A, et la tension ne doit pas dépasser 1V, afin d'éviter l'électrolyse de l'eau qui fausserait l'expérience par l'apparition de bulles sur l'électrode. La relation entre la tension et le courant dépend de la forme de la pointe, donc pour chaque pointe la valeur du courant et la valeur de la tension sont différentes, mais restent du même ordre, c'est la valeur du courant qui assure la reproductibilité des expériences.

Une fois la valeur de la tension atteinte, on note la valeur du courant et on effectue un relevé de cette valeur régulièrement car elle décroît au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur limite au bout de plusieurs heures.

Toute l'expérience est menée à 20°C, dans le cas de la glycine pour éviter la nucléation spontanée due à l'injection de la solution dans la cellule, on place la cellule à 50°C au moment de l'injection de la solution, puis on baisse la température jusqu'à 20°C avant d'appliquer la tension.

Les expériences sont suivies par acquisition séquentielle d'images par intervalles de 15min à l'aide de la caméra numérique avec un objectif x4 et un adaptateur x0,45.

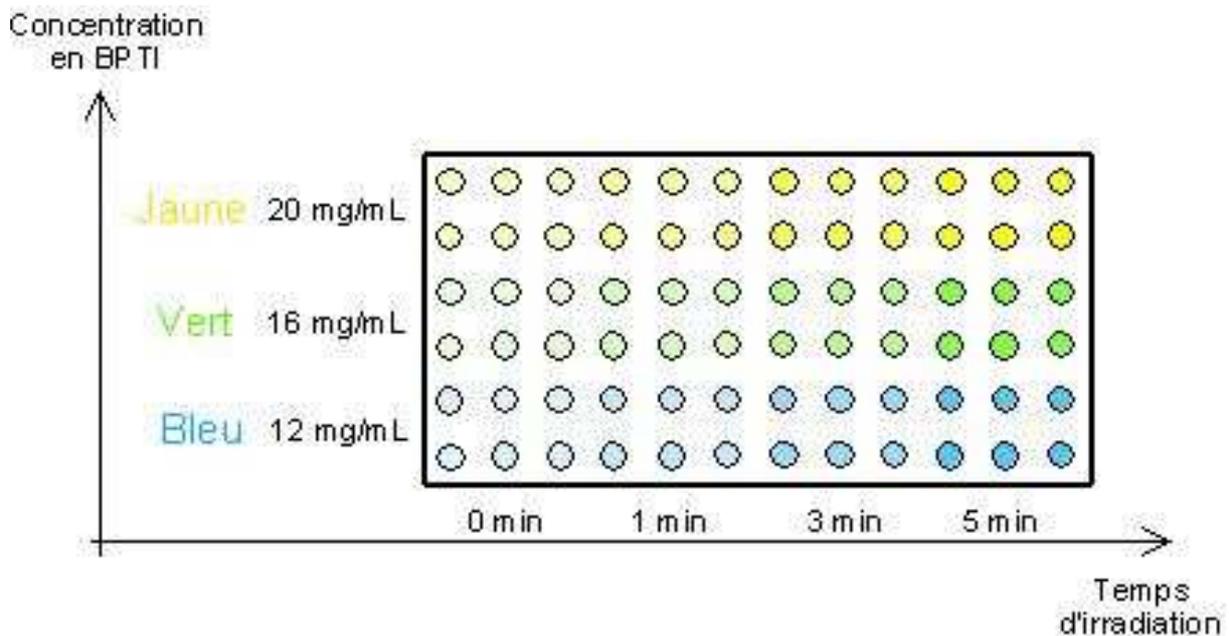
### *b. L'irradiation lumineuse*

Pour l'irradiation lumineuse, nous avons utilisé le Lysozyme, le BPTI, la glycine et l'Irbésartan. Dans cette partie, nous avons utilisé deux modes opératoires différents, la nucléation provoquée par irradiation directe des solutions et l'ensemencement de solutions par des gouttes d'une solution irradiée.

Le mode opératoire de l'irradiation directe est très simple c'est celui que l'on a utilisé pour l'ensemble des molécules : on irradie simplement la solution directement dans le contenant, à savoir une plaque Microbatch<sup>®</sup>, que l'on a recouvert d'huile de paraffine transparente pour éviter l'évaporation, une cellule adaptable sur une platine Peltier dont le bouchon est en quartz, ou encore directement au travers de la puce en PDMS, celui-ci étant transparent pour les longueurs d'ondes de la lampe au Xénon. Dans le cas de la puce

microfluidique ou de la plaque Microbatch<sup>®</sup> (fig.50) on utilise un cache noir opaque aux rayons de la lampe au Xénon, pour masquer les solutions que l'on ne veut pas irradier.

L'ensemencement de solutions par des gouttes de solutions irradiées a été utilisé pour les protéines, soient le BPTI et le Lysozyme, car les protéines sont plus sensibles à l'irradiation lumineuse (nous verrons cela dans la partie résultats). Nous avons utilisé une solution de BPTI à 4 mg/ml dans un tampon NaAc à 80 mM, pH = 4,5 et 3,2 M de NaCl, comme solution d'ensemencement. C'est-à-dire que 3 échantillons de 300 $\mu$ L, chacun, de cette solution sont irradiés pendant, respectivement 1, 3 et 5 min. Puis 3  $\mu$ L de chacune de ces solutions sont ajoutés à 3  $\mu$ L de solutions de BPTI à, respectivement, 36, 28 et 20 mg/mL, dans un tampon NaAc 80mM, pH = 4,5. On obtient les solutions aux concentrations de 20, 16 et 12 mg/mL respectivement comme montré sur le schéma de Microbatch<sup>®</sup> décrit en figure 50, avec une concentration finale en NaCl de 1,6M.



**Figure 50** : Schéma du Microbatch<sup>®</sup> contenant les solutions de BPTI à différentes concentrations et pour différents temps d'irradiation.

Après irradiation, les solutions sont placées à 20°C pendant 24h avec observation par acquisition séquentielle d'images. Pour toutes les solutions irradiées, on fait une solution témoin, c'est-à-dire qu'on prépare deux solutions pour chaque condition, et seule une des deux est irradiée l'autre est directement placée à 20°C.

### c. L'irradiation par ultrasons

Ces expériences d'irradiation ont été menées sur le SR 142 801 et sur la glycine. Le mode opératoire reste le même pour les deux molécules étudiées.

On prépare des solutions métastables par pesée du soluté solide directement dans les vials. On ajoute ensuite 600 $\mu$ L de solvant, dans notre cas de l'eau pour la glycine ou un mélange (60/40)<sub>v</sub> éthanol/eau pour le SR 142 801. Les vials sont ensuite sertis avec des bouchons étanches contenant un septum puis placés dans un bloc 24 puits du multi-puits. Après avoir placé les blocs dans la platine motorisée, on augmente la température afin de dissoudre le solide. Lorsque le solide est dissout, on abaisse la température jusqu'à la

température de travail, soit 20°C. Dans un premier temps, on perçait le septum du vial avec la buse du sonicateur, mais on s'est rendu compte qu'il y avait des particules du septum qui tombaient dans la solution, donc nous avons amélioré le mode opératoire, en dessertissant les bouchons pour l'irradiation, et en les sertissant à nouveau juste après l'irradiation. Les vials sont ainsi irradiés pendant différents temps allant de 30s à 30min par le sonicateur Suprasson Piezo-Endo de Satelec. Pendant toute la durée de l'irradiation, les vials sont thermostatés par effet Peltier. Les solutions sont ensuite placées à 20°C pendant 24h pour observation par acquisition séquentielle d'images.

Le sonicateur Bioblock Vibra Cell 75041 de 500W nous a servi pour le SR 142 801, pour étudier l'influence de la durée et de la puissance de l'irradiation sur la nucléation. Pour cela nous avons irradié des solutions métastables de SR 142 801 d'une sursaturation  $\beta = 3,5$ , puis les solutions ont été placées à 20°C comme dans le mode opératoire de l'irradiation avec le sonicateur Suprasson.

Il faut ajouter que nous nous sommes beaucoup intéressés au SR 142 801 car celui-ci ne nucléé pas dans les conditions classiques en raison d'une démixtion se produisant dans la zone métastable et empêchant la nucléation d'avoir lieu pour des sursaturations supérieures à la zone métastable.

### III. Résultats et discussion

Nous allons voir dans cette dernière partie les résultats relatifs aux expériences menées sur la fréquence de nucléation en présence de champs externes. Nous verrons aussi quelles sont les possibilités d'action du champ externe sur la nucléation que ce soit d'un point de vue thermodynamique ou cinétique. Les expériences de ce chapitre ont toutes été menées de façon isotherme à 20°C, et toutes les solutions se situaient dans la zone métastable pour les conditions expérimentales. Bien sûr, étant donné que le champ magnétique n'agit que sur la sédimentation des cristaux après croissance, nous ne nous sommes pas intéressés à ce champ d'un point de vue expérimental, nous verrons donc ici uniquement les résultats concernant le champ électrique interne, l'irradiation lumineuse et enfin l'irradiation par ultrasons. Les observations des solutions n'ont été effectuées qu'après 24h passées à 20°C à la suite des irradiations pour la lumière et pour les ultrasons. En ce qui concerne le champ électrique, l'application est continue tout au long de la durée de l'expérience.

#### 1. Le champ électrique interne

##### a. *Le BPTI*

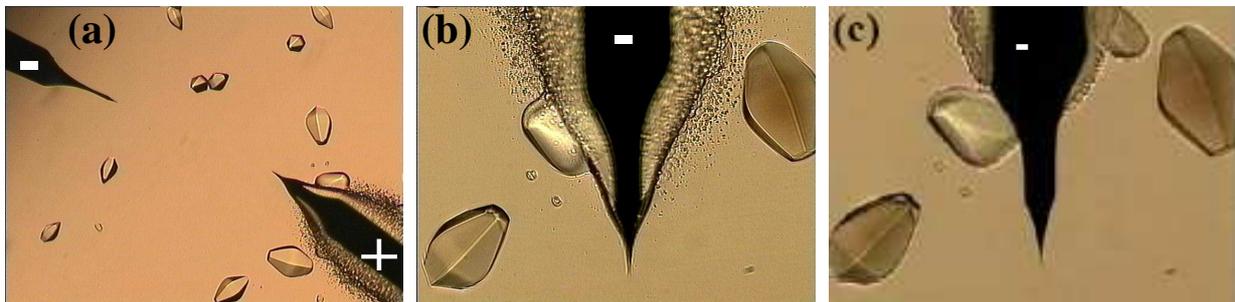
La première molécule étudiée a été le BPTI et nous avons effectivement observé un effet de champ. Les cristaux sont apparus préférentiellement à l'anode (fig.51).



**Figure 51** : Photo d'une solution de BPTI à 20mg/mL dans un tampon acétate de 80mM, pH = 4,5 et 1,6M de NaCl. Application d'une tension directe de 0, 785V. Le fil de tungstène a une largeur de 125µm.

Cette cristallisation préférentielle s'accompagne, pour des tensions supérieures, de l'apparition d'une phase ou d'un gel sur l'anode (fig.52). Un prélèvement a permis un dosage

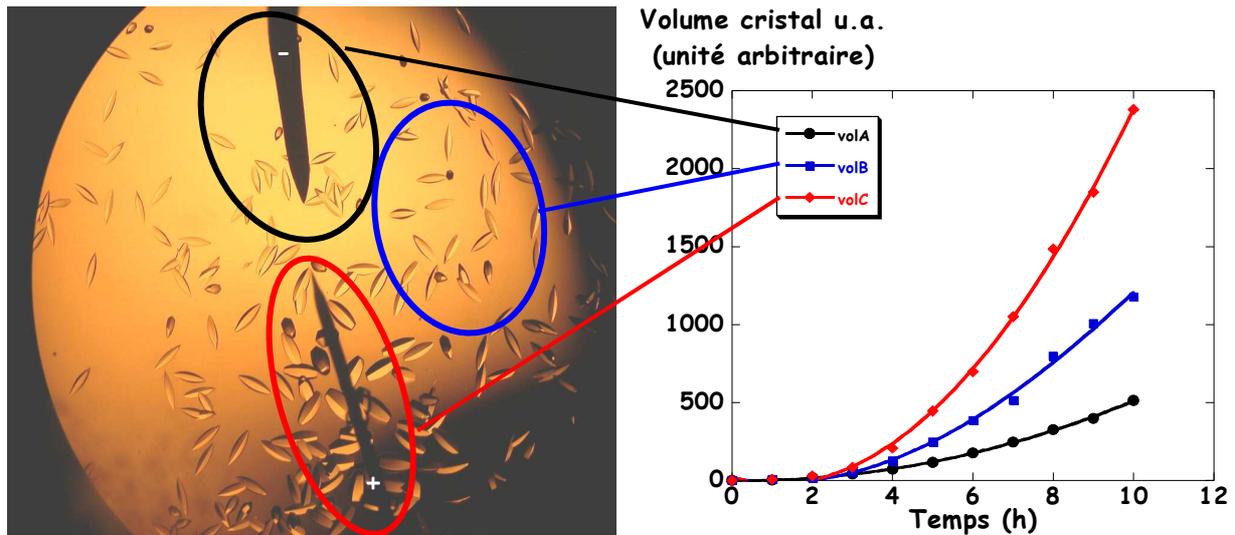
de cette phase, qui s'est avérée très concentrée en protéine (~900mg/mL). Si on applique une tension encore plus forte, alors les cristaux ne nucléent pas, seule la phase dense apparaît à l'anode.



**Figure 52** : Solutions de BPTI nucléées en présence d'un champ électrique de quelques centaines de microAmpères. On voit l'apparition d'une phase amorphe qui enrobe l'anode. (b) est un zoom de (a) avec une inversion de la polarité. Le fil de tungstène composant l'anode fait 125µm de largeur.

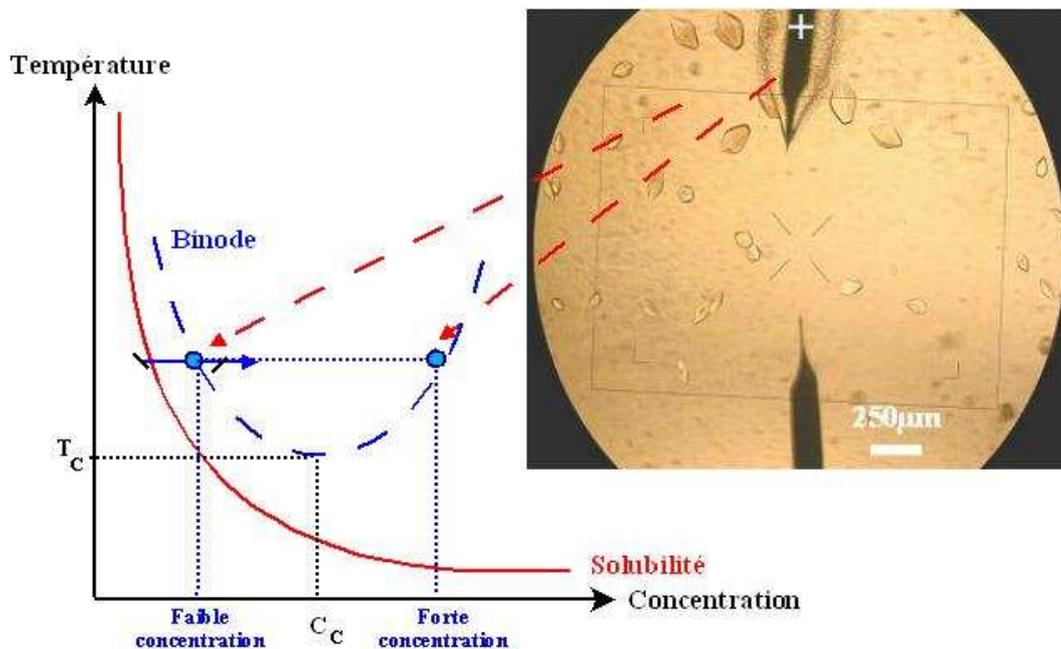
Il semblerait que le champ appliqué génère un gradient de concentration dans la solution.

Indirectement confirmé par la mesure des vitesses de croissance qui montre trois domaines (fig.53) : le premier autour de la cathode, le second au milieu de la solution entre les deux électrodes, et le troisième à l'anode. On voit sur le graphique à droite de la figure 53, que les vitesses de croissance de ces trois domaines ne sont pas les mêmes. En effet, les cristaux proches de la cathode ont une croissance qui est inhibée par le champ électrique, alors que ceux proches de l'anode ont une croissance favorisée par la présence du champ, les cristaux se situant au milieu ont une vitesse de croissance de référence, c'est-à-dire qu'ils croissent avec une vitesse moyenne proche de celle qu'ils auraient si il n'y avait pas de champ.



**Figure 53** : Effet de champ sur la croissance des cristaux de BPTI dans une solution à 20mg/mL dans un tampon acétate à 80mM, pH = 4,5 et 1,6M de NaCl. Application d'une tension directe de 0,785V. Le fil de tungstène composant l'anode mesure 125 $\mu$ m de large. Diagramme qualitatif des vitesses de croissance en fonction de la position des cristaux dans le milieu.

De plus, une inversion de la polarité, comme le montre la figure 52b et c, engendre une dissolution de la phase dense, mais une croissance des cristaux. Ce qui veut dire qu'on est toujours sursaturé par rapport aux cristaux, ce qui explique leur croissance, mais on se retrouve sous-saturé par rapport à la phase dense autour de l'anode, qui se dissout. Ce qui peut s'expliquer à l'aide du diagramme de phases du BPTI dans NaCl (fig.54). Cette phase dense correspond à une démixtion. En effet il y a formation de deux phases de concentrations différentes. La phase amorphe autour de l'anode est une phase à forte concentration alors que le reste de la solution est de faible concentration. On voit bien sur le diagramme de phases (fig.54) que même si l'une des deux phases à une concentration faible, elle reste au dessus de la solubilité, ce qui explique que même lors de l'inversion de polarité on a croissance des cristaux.

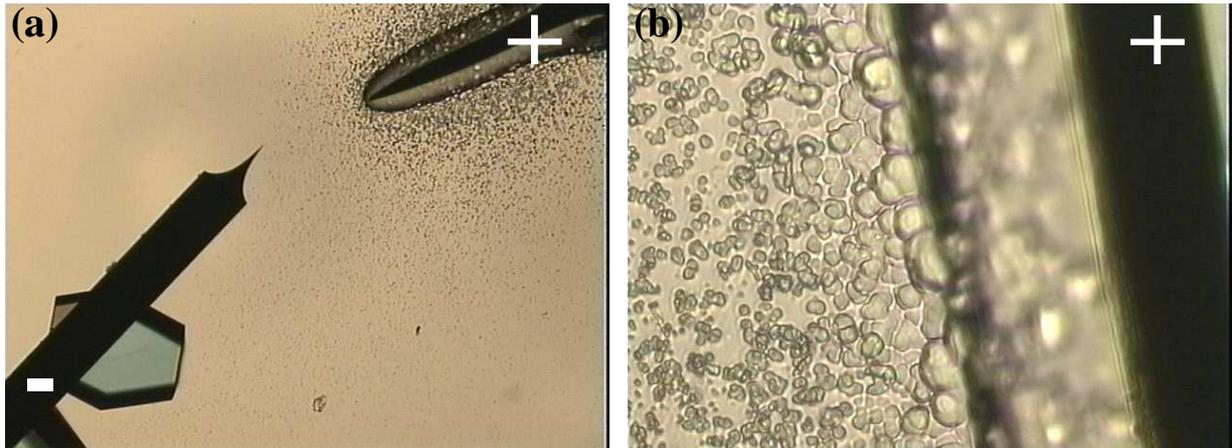


**Figure 54** : Identification des deux phases de la démixtion qui a lieu autour de l'électrode. La flèche bleu dans le diagramme représente le gradient de concentration.

On voit bien que dans le cas du BPTI, la démixtion a lieu du même côté que la cristallisation, à savoir l'anode chargée donc positivement. Pourtant en solution, le monomère du BPTI est chargé positivement (8 charges +)<sup>[105]</sup> et la charge des décimères est différente de 10x8, mais présente quand même 13 charges positives. En l'état actuel de nos connaissances, il est dur de donner une explication à ce phénomène mais on peut penser à un écrantage des sites cationiques de la molécule et plus particulièrement du décimère puisque le rapport entre sa surface et son nombre de charges est beaucoup plus faible que pour le monomère, ce qui pourrait expliquer que le décimère, qui cristallise, se dirige vers l'anode.

### *b. Le Lysozyme*

Par contre, le phénomène est légèrement différent pour le Lysozyme, puisque cristallisation et démixtion de phases liquide-liquide n'ont pas lieu à la même électrode. Comme on peut le voir sur la figure 55a, la cristallisation a lieu à la cathode alors que la démixtion a lieu à l'anode. Le zoom sur la démixtion de la figure 55b nous confirme la nature de cette phase amorphe.



**Figure 55** : Cristallisation et démixtion de phases liquide-liquide dans une solution de Lysozyme à 25 mg/mL, pH=4,5 et 0,7M de NaCl. Pour un courant de 0,9V. Le fil de tungstène composant l'électrode a une largeur de 125 $\mu$ m.

Grâce à ces deux exemples, on peut clairement affirmer que le champ électrique a un effet sur la densification des molécules qui conduit à la nucléation de deux nouvelles phases concentrées en protéine, l'une liquide entourant l'électrode et l'autre solide favorisée par la proximité avec l'électrode. De plus l'effet du champ diminue le temps d'induction de la nucléation car ce sont des solutions métastables qui ne nucléent pas dans les conditions normales.

Si on compare les résultats de ces expériences pour le BPTI et pour le Lysozyme, on remarque que la formation de la phase amorphe a lieu, pour les deux protéines, à l'anode, cependant les cristaux de BPTI se forment à l'anode alors que ceux de Lysozyme se forment à la cathode. On peut se demander si les phases amorphes ont les mêmes propriétés physico-chimiques que les protéines, mais surtout entre elles, c'est-à-dire est-ce que la phase amorphe du BPTI a les mêmes propriétés physico-chimiques que la phase amorphe du Lysozyme ?

### *c. La Glycine*

On peut aussi s'interroger sur l'action que peut avoir le champ électrique sur les petites molécules organiques. En effet, l'une des possibilités sera une migration des molécules due aux lignes de champ. Or si les molécules sont plus petites, seront-elles aussi sensibles à la convection induite par les lignes de champ ?

Pour cela, nous avons appliqué un champ électrique à une solution de glycine métastable. Nous obtenons le même genre d'effet sur la cristallisation (fig.56), par contre jusqu'à présent, nous n'avons jamais obtenu de démixtion de phases liquide-liquide.



**Figure 56** : Solution de glycine à 315mg/mL dans l'eau.  $U = 0,95V$ . Le fil de tungstène composant l'électrode fait 125 $\mu$ m de large.

On voit qu'il y a un cristal qui a nucléé près de la cathode, ce qui, encore une fois, ne correspond pas à la charge de la glycine en solution dans l'eau. Le pI de la glycine est à 5,9 et une solution aqueuse de glycine a un pH de 6,4, donc la glycine a une charge négative. Il serait à présent intéressant de travailler à différents pH pour voir si lorsque la charge de la glycine change, l'électrode où elle cristallise change aussi.

#### Conclusion sur la partie champ électrique

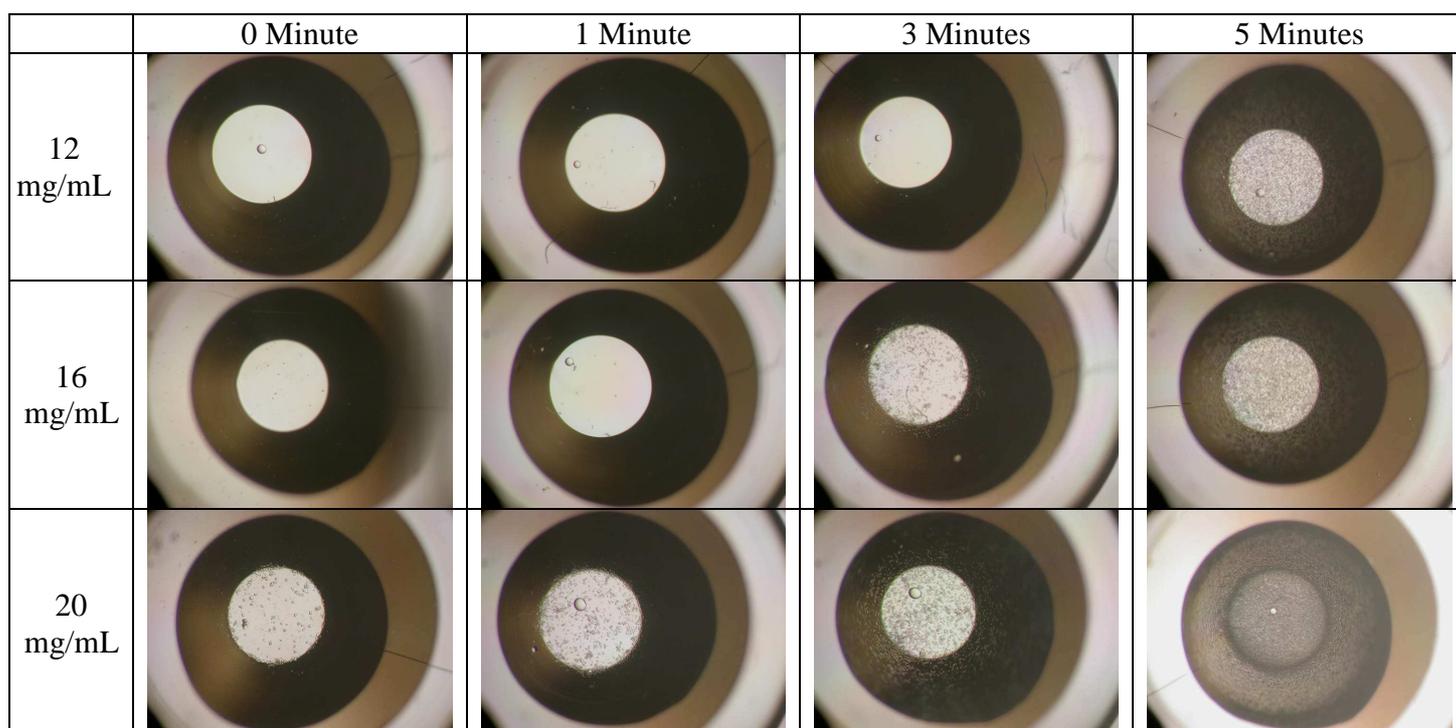
Dans le cas des protéines comme dans le cas d'une petite molécule organique, la glycine, le champ électrique continu appliqué au sein même de la solution a un effet positif sur la fréquence de nucléation, puisqu'il diminue le temps d'induction, probablement en abaissant l'énergie libre nécessaire à la formation d'un germe, si l'on considère la théorie classique de nucléation. Si on regarde la théorie en deux étapes de Kashchiev, on peut clairement dire que le champ électrique agit sur la densification des molécules qui a lieu avant l'arrangement ordonné de celles-ci, probablement en agissant sur la différence de potentiels chimiques en solution. Il y a une migration qui crée un gradient de concentration qui est d'autant plus important avec l'anisotropie du champ dans la solution, due à l'effet de pointe. Le problème étant maintenant de savoir comment le champ agit sur les molécules pour qu'elles se dirigent vers l'électrode ayant la même charge qu'elles. Il faudrait essayer de limiter la convection des molécules, pour étudier leur déplacement, par gélification de la solution, ce qui aurait pour but d'amplifier l'effet de gradient. En effet, le gel supprime la convection qui a tendance à réhomogénéiser la solution.

Le deuxième effet du champ électrique sur la nucléation est spatial. En effet, cela ne se voit pas sur les photos, mais la nucléation a lieu dans le plan défini par les électrodes au lieu d'avoir lieu dans tout le volume de la solution. Le champ électrique a donc un effet à la fois spatial et temporel sur la nucléation. Il faut à présent trouver un moyen de réduire encore plus l'action du champ, en limitant la création du champ à l'extrémité de la pointe, pour cela on peut penser à un gainage de l'électrode pointue par une cire, ou bien encore par un bain de verre fondu. On pourrait aussi essayer de visualiser les lignes de champ en utilisant un marqueur de protéine fluorescent.

## 2. L'irradiation lumineuse

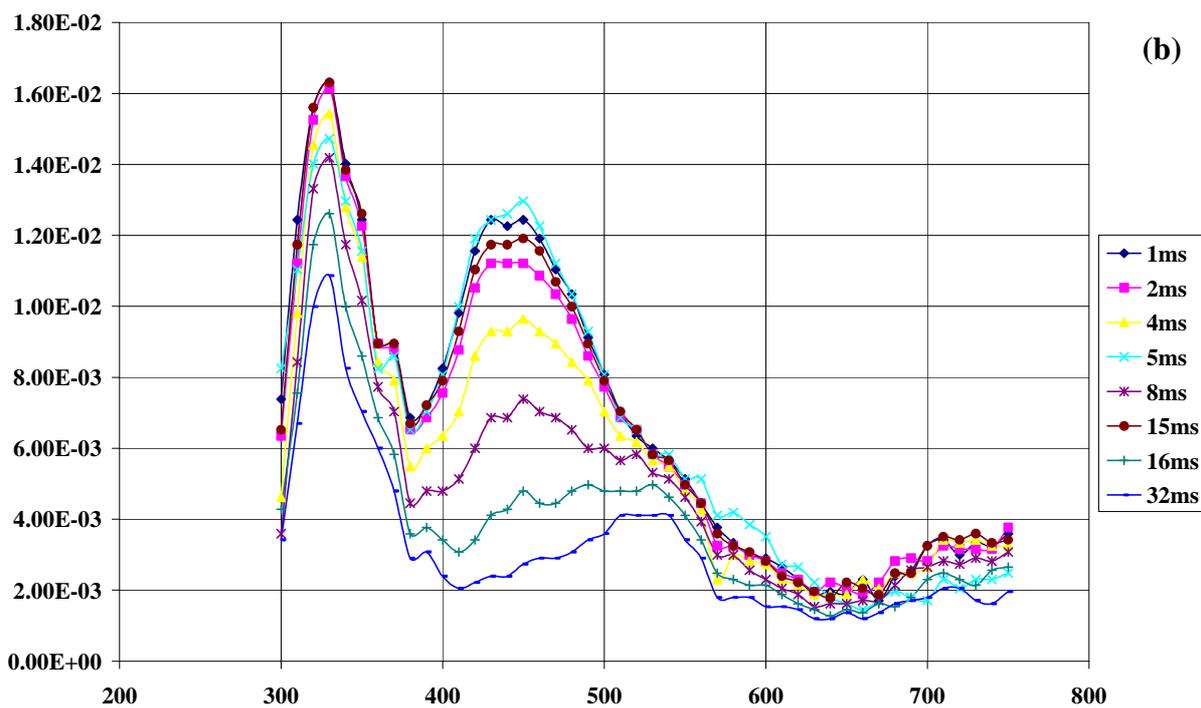
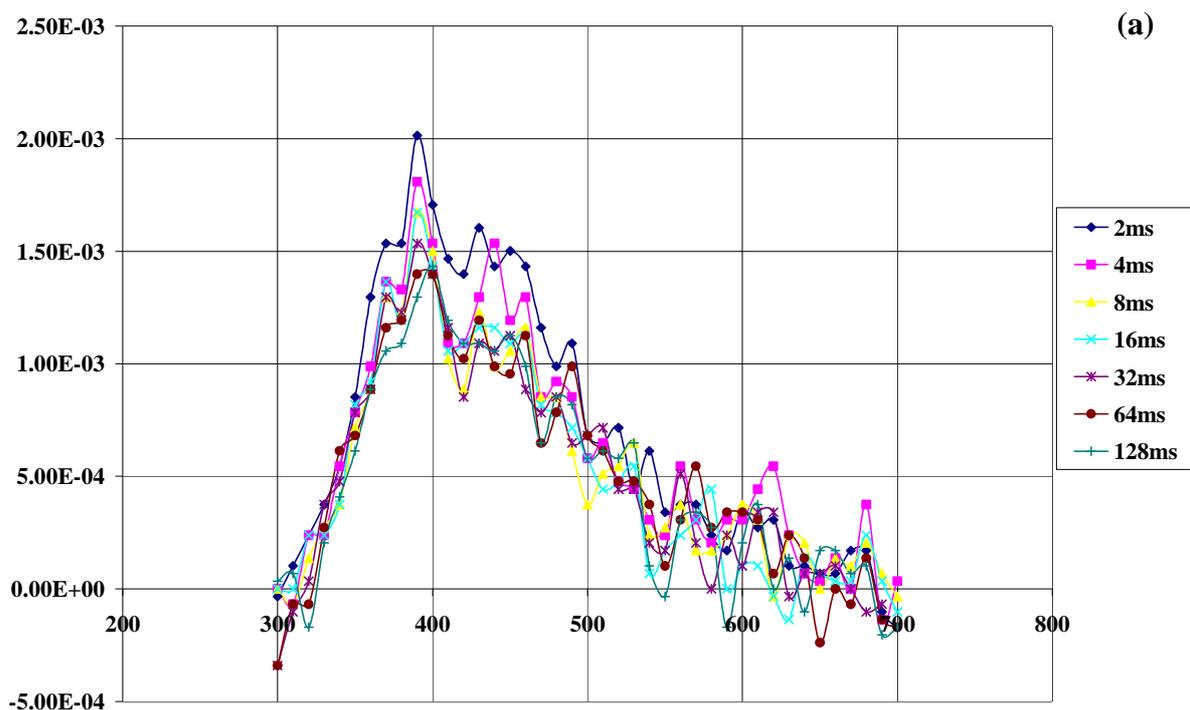
Les travaux menés sur le Lysozyme par Okutsu et Veessler ont montré une influence sur la nucléation d'une protéine photosensible<sup>[100]</sup>. Nous avons voulu essayer de voir si cela pouvait aussi avoir de l'effet sur la nucléation du BPTI. Nous avons donc procédé de la même façon que pour le Lysozyme et nous avons observé un effet de l'irradiation lumineuse (tableau 3).

**Tableau 3** : Photos des résultats obtenus pour différents temps d'irradiation de solutions de BPTI à différentes concentrations dans un tampon acétate à pH = 4,5 et 1,6M de NaCl. Photos prises après 24h passées à 20°C à la suite de l'irradiation.



On voit que pour une concentration de 16mg/mL l'irradiation lumineuse a le plus d'effet sur la fréquence de nucléation, puisque la solution témoin n'a pas donné de cristaux, alors que la solution irradiée pendant 5 minutes a très fortement nucléé.

Nous avons cherché à savoir si le mécanisme d'action de l'irradiation était le même que pour le Lysozyme, à savoir les créations de radicaux. Pour cela nous avons effectué un spectre d'absorption transitoire. Il s'agit d'irradier la solution avec un laser pendant quelques secondes, puis d'effectuer un spectre d'absorption toutes les quelques  $\mu$ s pour voir si la molécule a atteint un état excité grâce à l'irradiation, et si peu à peu elle revient à son état stable. Les résultats sont présentés dans la figure 57a.



**Figure 57** : Spectre d'absorption transitoire (a) du BPTI et (b) du Tryptophane.

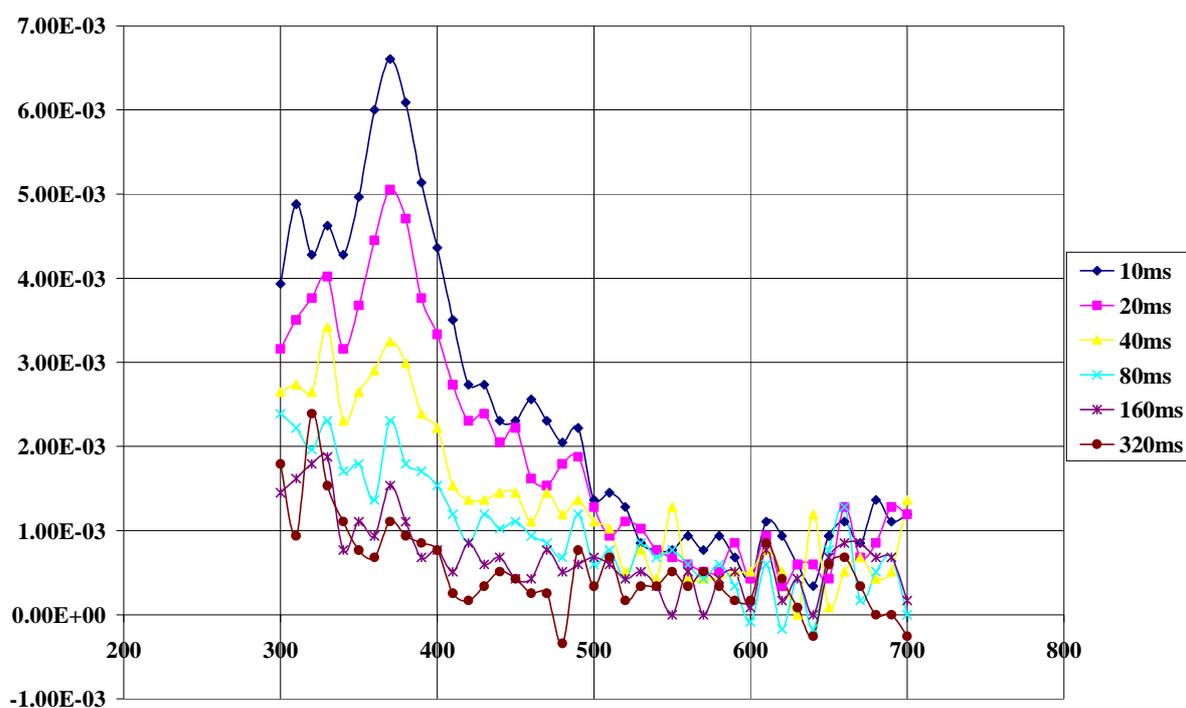
On utilise le tryptophane comme référence, car il a été montré que c'était lui qui formait le radical dans le cas du Lysozyme<sup>[100, 101]</sup>.

On constate, si on compare avec le spectre transitoire du Tryptophane (fig.57b), que dans le cas du BPTI il n'y a pas de retour à un état énergétique inférieur, il n'y a donc pas

excitation de la molécule de BPTI par l'irradiation lumineuse. Le mécanisme n'est donc pas totalement déterminé en ce qui concerne le BPTI.

Les travaux menés sur le Lysozyme ont montré qu'il existe un temps limite d'irradiation au-delà duquel le Lysozyme est trop dénaturé par la lumière, qu'il n'a plus d'activité. Ce temps limite est très facilement détectable, en effet la solution précipite violemment au bout d'un certain temps d'irradiation, quelques minutes pour le Lysozyme. Nous avons essayé de trouver le temps limite d'irradiation du BPTI au-delà duquel il serait dénaturé. Nous avons atteint une heure d'irradiation, et nous n'avons toujours aucun changement de l'activité du BPTI (voir annexe 5 pour le test d'activité). Ce qui confirme l'absence de formation de radicaux déjà montrée par le spectre d'absorption transitoire.

En ce qui concerne les molécules Sanofi-Aventis à disposition, nous avons pu constater un effet de l'irradiation lumineuse sur l'Irbésartan grâce au spectre d'absorption transitoire (fig.58), cependant en raison des problèmes liés à l'évaporation du solvant (l'isopropanol), nous n'avons pas encore pu mettre au point une façon d'adapter cette expérience, de façon reproductible, à l'Irbésartan. De plus, nous savons d'après la thèse d'Eric Garcia<sup>[55]</sup>, que l'Irbésartan est photosensible en présence d'Iodure de potassium et une irradiation lumineuse mène à sa dénaturation.



**Figure 58** : Spectre d'absorption transitoire de l'Irbésartan.

## Conclusion sur la partie irradiation lumineuse

Il est expérimentalement prouvé que l'irradiation lumineuse a une action positive sur la nucléation. Effectivement les solutions métastables peuvent être cristallisées par irradiation lumineuse. Cependant, le mécanisme demeure encore bien complexe et surtout semble différent selon la molécule utilisée.

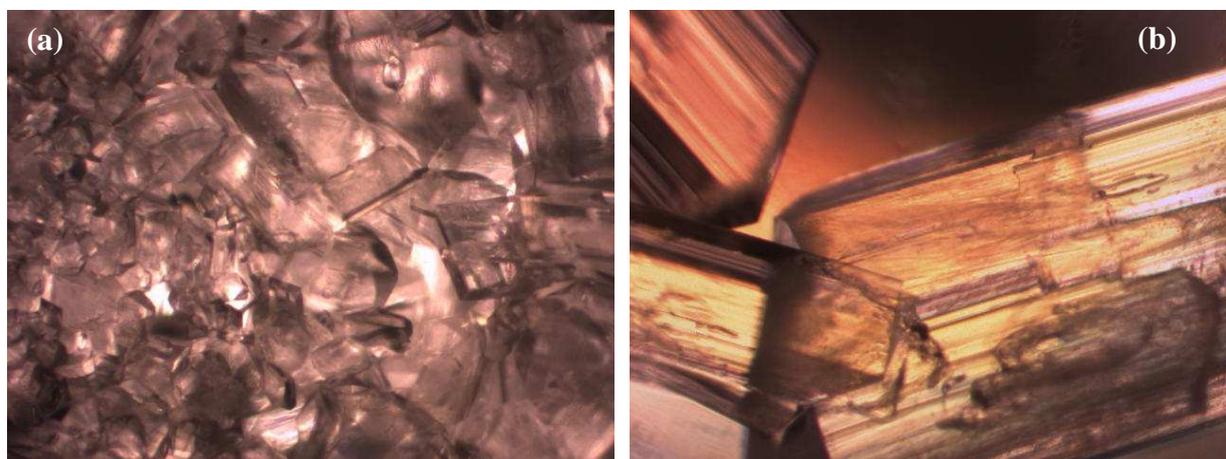
En effet, on peut déjà constater l'existence d'au moins trois mécanismes d'action de l'irradiation lumineuse sur la nucléation dont deux sont dépendants de la longueur d'onde et de la nature de la lumière utilisée :

- Un mécanisme photophysique, qui a lieu lors de l'irradiation d'une solution par un laser très puissant. Ici la lampe utilisée n'est pas assez puissante.
- Un mécanisme photochimique, l'irradiation de la solution crée des radicaux, c'est le cas du Lysozyme et peut être aussi de l'Irbésartan.
- Et enfin un mécanisme qui reste pour l'instant inconnu.

### **3. Les ultrasons**

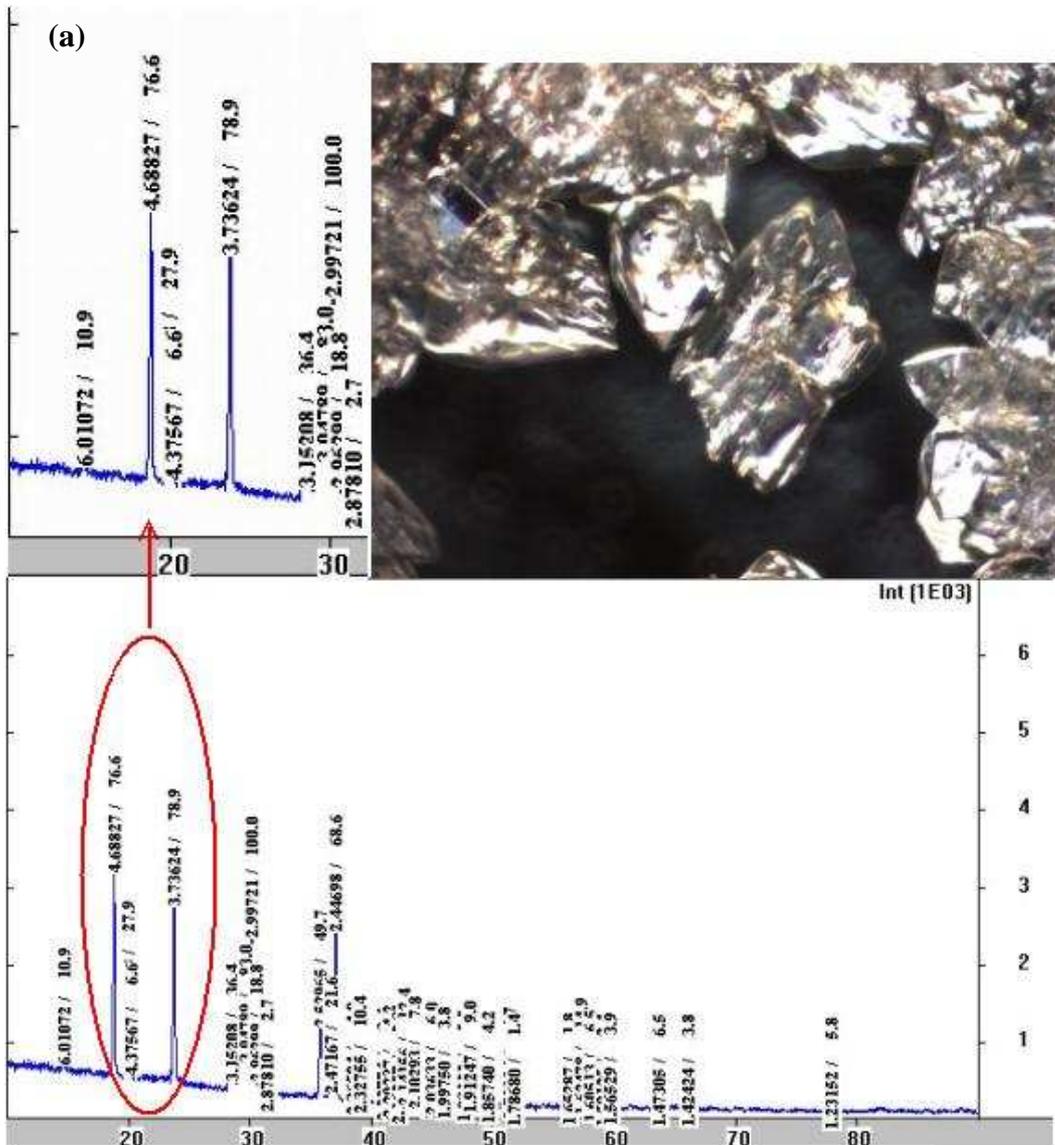
#### *a. La Glycine*

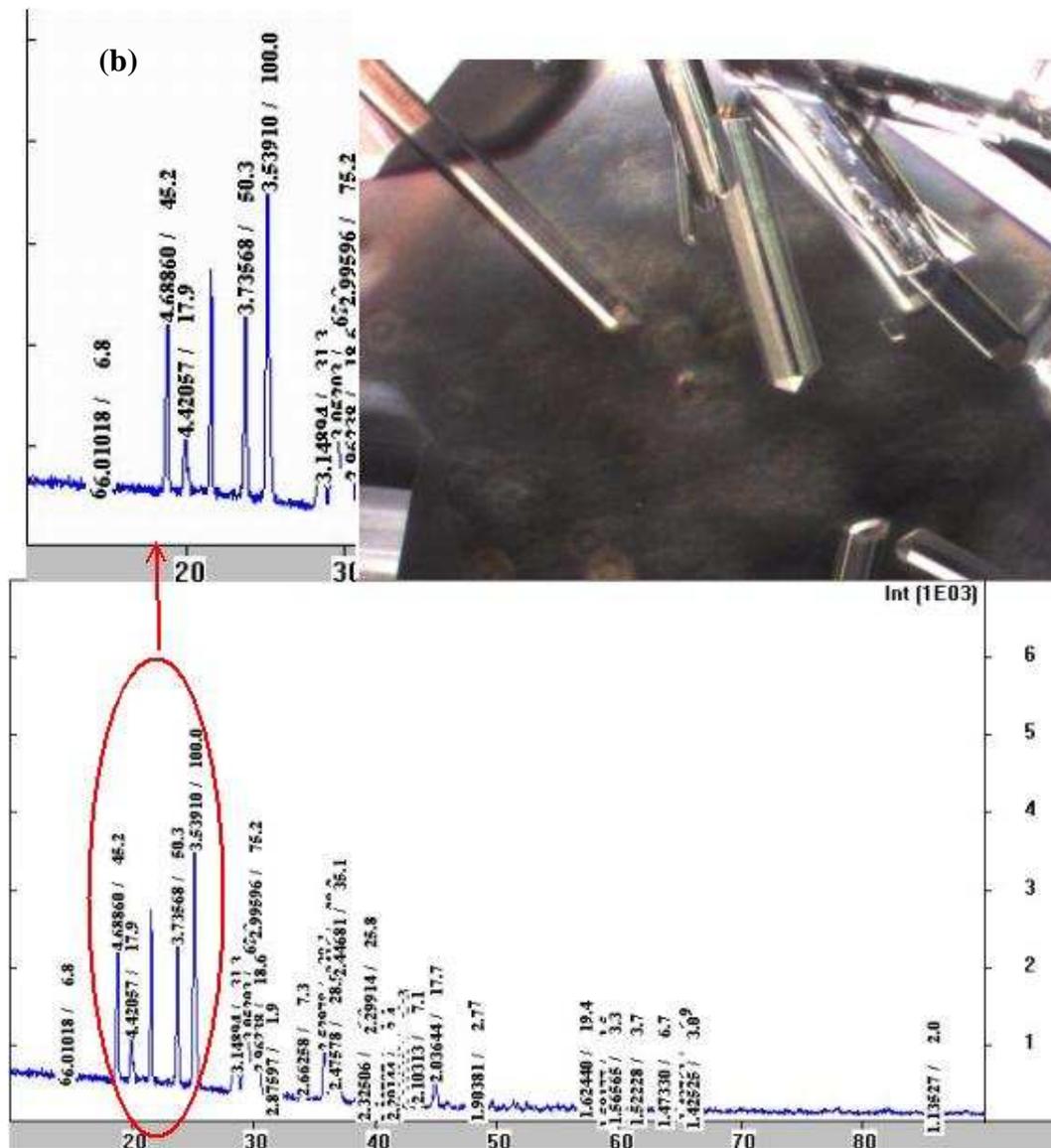
Afin d'avoir des expériences de référence sans champ et de les comparer avec la fréquence de nucléation en présence de champ, nous avons effectué des expériences de nucléation en présence d'ultrasons sur la glycine (fig.59).



**Figure 59** : Nucléation de solutions métastables de même concentration en glycine (a) sans irradiation et (b) avec irradiation au préalable par ultrasons. La hauteur de la photo représente 1,5mm.

Ici on peut constater une augmentation de la fréquence de nucléation grâce à l'action des ultrasons dans la solution. En effet, tout d'abord, la sursaturation à partir de laquelle on a nucléation de cristaux est plus faible en présence d'ultrasons que lorsqu'on se trouve dans les conditions normales. Cependant comme on peut le voir sur les photos, il y a des formes de cristaux bien distinctes (fig.59). L'étude des diffractogrammes de poudre est donnée en figure 60.





**Figure 60** : Diffractogrammes de poudre de la glycine nucléée en présence d’ultrasons (a) présente de la forme  $\alpha$  pure, (b) présente de la forme  $\alpha$  et de la forme  $\gamma$ . Le zoom à gauche des photos montre un grossissement des diffractogrammes sur les pics caractéristiques.

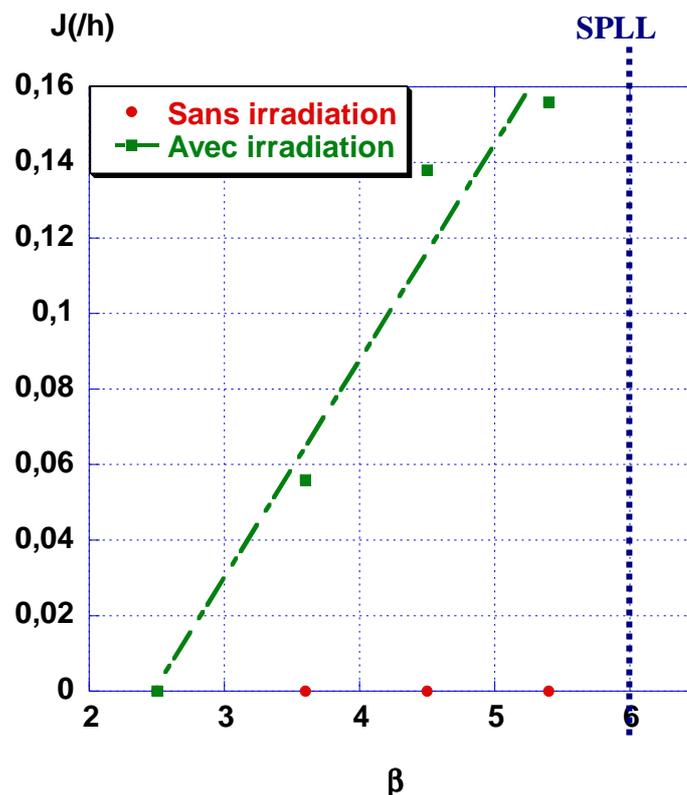
La forme  $\gamma$  donne des cristaux qui ont un faciès plutôt aciculaire (fig.60b), alors que la forme  $\alpha$  donne des cristaux massifs plutôt tabulaires (fig.59 et 60a). Ce qui est intéressant ici, c’est que la forme  $\gamma$ , qui est la plus stable, ne nucléée pas dans les conditions normales de cristallisation, et on n’est pas à l’abri d’avoir un changement de polymorphe lors du stockage des cristaux. Or ici, on arrive à nucléer directement le polymorphe le plus stable en présence d’ultrasons, donc il n’y a plus de problème de changement de polymorphe lors du stockage, puisque celui qu’on cristallise est directement le plus stable.

### b. Le SR 142 801

Les ultrasons sont connus dans l'industrie pharmaceutique pour le broyage des cristaux ou pour l'ensemencement d'une solution. C'est un champ externe très facile à mettre en œuvre d'un point de vue industriel, d'autant plus qu'il est déjà utilisé pour d'autres tâches que la nucléation primaire.

Ce qui nous intéresse ici, c'est de provoquer la nucléation au sein de la zone métastable. Nous avons donc utilisé des solutions métastables de SR 142 801 en solution dans un mélange éthanol/eau (60/40)<sub>v</sub>.

Dans un premier temps, en utilisant le sonicateur Bioblock Vibra Cell 75041 de 500W, nous avons étudié l'effet de l'irradiation pendant 1 min d'une solution ayant une sursaturation comprise entre 2,5 et 5,5 (fig.61). La fréquence de nucléation a été calculée en prenant l'inverse du temps d'apparition des premiers cristaux. Nous n'avons pas choisi la même technique de mesure de la fréquence de nucléation que pour la première partie, sans champ, tout simplement parce que la technique utilisée dans la première partie fait intervenir la zone métastable pour la croissance des cristaux, or ici, on se place au sein de la zone métastable pour provoquer la nucléation, donc les cristaux qui apparaissent sont uniquement dus à la présence du champ.



**Figure 61** : La relation entre la sursaturation et la fréquence de nucléation pour une solution irradiée pendant 1min et pour une solution témoin, non-irradiée.

Ici, on voit que la nucléation est engendrée par l'irradiation aux ultrasons de la solution. Nous rappelons que pour une sursaturation supérieure ou égale à 6, la solution de SR 142 801 présente une démixtion qui inhibe la nucléation.

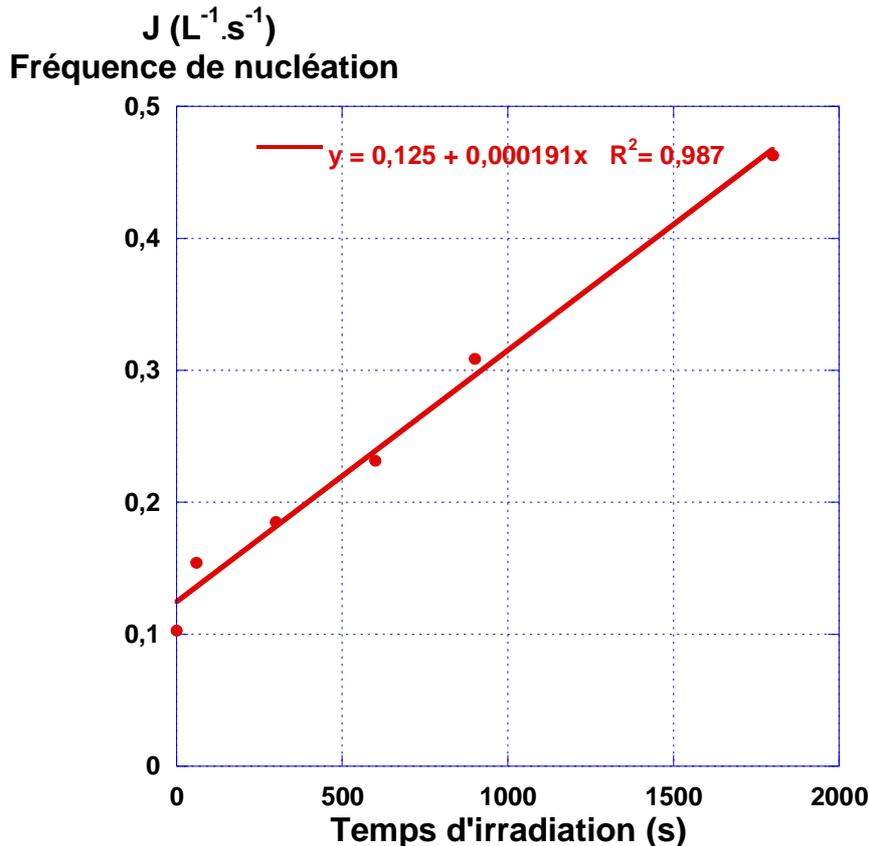
On arrive donc à nucléer au sein de la zone métastable ce qui nous permet d'éviter la séparation de phases liquide-liquide qui a lieu lorsqu'on augmente la sursaturation pour sortir de la zone métastable. Ce système est très prometteur pour les molécules qu'on appelle paresseuses, c'est-à-dire les molécules qui ne cristallisent pas dans les conditions classiques.

Nous avons ensuite voulu savoir s'il existait un temps limite d'irradiation, au-delà duquel la fréquence de nucléation atteint un palier (fig.62 et 63).



**Figure 62** : 3 solutions de SR 142 801 à  $\beta = 3,6$ , la première sans irradiation, la deuxième irradiée pendant 1min et la troisième irradiée pendant 10min.

La figure 62 nous montre l'efficacité de l'irradiation par ultrasons sur la nucléation primaire. Cependant, on voit que dès que l'on passe la minute d'irradiation de la solution, il y a un phénomène d'attrition des cristaux déjà nucléés qui donne lieu à une deuxième vague de nucléation. L'influence des ultrasons sur la nucléation secondaire est donc prouvée ici pour des temps d'irradiation supérieurs à 1 minute.



**Figure 63** : Représentation graphique de la dépendance de la fréquence de nucléation en fonction du temps d'irradiation d'une solution de SR 142 801 à  $\beta = 3,6$ .

Sur ce deuxième graphique (fig.63), on voit bien la dépendance linéaire de la fréquence de nucléation en fonction du temps d'irradiation, cependant nous n'avons pas atteint de régime limitant après 30min d'irradiation. L'appareil chauffant trop, nous n'avons pas pu essayer de plus longs temps d'irradiation. Il est clair que cette augmentation de la fréquence de nucléation est due à l'application des ultrasons qui, dans un premier temps, augmentent la nucléation primaire puis, déclenchent une nucléation secondaire qui donne une fréquence de nucléation apparente, regroupant la nucléation primaire et la nucléation secondaire, qui augmente linéairement, ce qui est purement une coïncidence.

### Conclusion sur la partie ultrasons

Les ultrasons ont donc un effet positif évident sur la nucléation que ce soit au niveau de la nucléation primaire homogène ou sur la nucléation secondaire. En effet, on constate une réduction du temps d'induction lorsque la solution métastable a été irradiée avec des ultrasons pendant plusieurs secondes, ce qui a pour effet d'augmenter la fréquence de nucléation.

Dans la littérature, plusieurs théories sur le mécanisme d'action des ultrasons sur la fréquence de nucléation ont été proposées. La première met en jeu la pression qui augmente au moment de l'éclatement de la bulle de cavitation. La seconde, elle, parle de la température qui augmente au moment de l'éclatement, cependant une hausse de température ne devrait engendrer la nucléation que pour des molécules qui ont une solubilité inverse avec la

température. La troisième théorie met, encore une fois, en jeu la bulle de cavitation, mais cette fois-ci, avant son éclatement, puisqu'elle est considérée comme site de nucléation hétérogène avant qu'elle ne disparaisse.

Or, en utilisant la diffraction de la lumière nous n'avons pas constaté de changement dans le faisceau, lors de l'application des ultrasons, ceci nous prouve qu'il n'y a pas d'événement, comme la création de bulles de cavitation, au sein de la solution qui engendrerait une déviation du rayon lumineux. Les ultrasons que nous utilisons n'ont pas une puissance suffisante pour créer des bulles de cavitation.

Ce qui implique un autre effet des ultrasons sur la nucléation que ceux qui ont été proposés jusqu'ici dans la littérature. On peut penser à une augmentation de la convection par les ondes ultrasons, cependant ce sont des ondes de contact et non de propagation, c'est-à-dire qu'elles sont transmises par contact entre les objets, et non par déplacements de ceux-là. Il faudrait effectuer des expériences dans une solution de gel de saccharose, afin de stopper la convection et voir si les ultrasons ont toujours cet effet positif sur la nucléation, ce qui nous permettrait de déterminer si les ultrasons agissent sur la convection ou sur la diffusion des molécules dans la solution.

## **Conclusion et perspectives**

Le but de cette thèse étant d'étudier l'influence des champs externes sur la nucléation afin de déclencher la cristallisation d'une solution métastable, il a été partiellement atteint. En effet, que ce soit le champ électrique, les ultrasons ou encore l'irradiation lumineuse, dans les trois cas étudiés l'application du champ a provoqué la nucléation de cristaux dans une solution métastable, qu'il s'agisse d'une solution de protéines ou d'une solution de molécules organiques tels que des principes actifs pharmaceutiques ou bien encore la glycine. Seul le champ magnétique n'a pas d'effet sur la nucléation, puisque sa puissance n'est pas suffisante pour atteindre la molécule, et il n'agit que sur l'orientation et la croissance des cristaux déjà nucléés.

La mise en place d'un montage permettant de mesurer la fréquence de nucléation dans les conditions normales, en séparant la nucléation des cristaux de leur croissance a révélé que les problèmes d'échelle s'appliquaient aussi pour passer du nanolitre au microlitre. La nucléation hétérogène étant à l'origine de la différence importante du nombre de cristaux nucléés qui n'est pas uniquement linéairement proportionnelle au changement de volume. La glycine nous a aussi révélé qu'un champ externe n'est pas uniquement cantonné à l'application d'un paramètre externe qui n'existe pas dans les conditions normales. En effet, la glycine est très sensible au matériau constituant le récipient de la solution à cristalliser, le paramètre externe au milieu venant encourager la nucléation sont les parois en polypropylène des tubes contenant la solution, cependant dans ce cas là, c'est par un changement de mécanisme de nucléation que l'on augmente  $J$ . Par contre, l'agitation est un champ externe incontestable, surtout en ce qui concerne la glycine, la zone métastable est au minimum deux fois plus large en milieu stationnaire qu'en milieu agité, et cela n'a rien à voir avec le matériau composant le mobile d'agitation. D'ailleurs, l'irradiation par ultrasons peut être considérée comme une forme d'agitation, pour cela il faudrait comparer les résultats obtenus sur la fréquence de nucléation, lors d'une agitation avec un mobile 'simple', puis lors d'une agitation à l'aide d'un Ultraturax<sup>®</sup> et enfin lorsque l'on applique des ultrasons, ainsi que l'influence de la puissance des ultrasons.

- Le champ électrique

On peut même arriver à localiser la formation du premier germe critique dans un plan en appliquant un champ électrique interne à la solution. Reste que la localisation n'est, pour

l'instant, pas réduite à un seul point au sein de la solution. Mais l'amélioration de la pointe de l'électrode émettrice du champ pourrait nous conduire à la localisation bien plus précise de la formation du germe critique. On pense par exemple au gainage de l'ensemble de l'électrode, hormis la pointe, par de la cire ou bien encore du verre fondu, afin de limiter les lignes de champ uniquement à la pointe de l'électrode. Elles seraient donc plus intenses en cet endroit-là et pourraient donner naissance à la nucléation.

- L'irradiation lumineuse

Dans le cas de l'irradiation lumineuse, nous avons bien un effet positif sur la nucléation primaire, cependant, le mécanisme d'action semble bien plus complexe que ce qu'on ne le pensait lors des expériences sur le Lysozyme. En effet, le seul mécanisme de photochimie ne suffit pas à expliquer l'action de l'irradiation sur la nucléation d'une solution métastable de BPTI. Cependant, ce champ externe semble très prometteur pour l'industrie, car à part l'investissement de départ dans la lampe au Xénon, il reste très peu coûteux à mettre en place, et on peut même imaginer une mise en œuvre d'un tel montage sur un procédé en continu. En effet, il suffirait d'une fenêtre en quartz dans un tuyau contenant la solution à cristalliser, et le simple temps de passage de la solution devant cette fenêtre suffirait à déclencher la nucléation. L'adaptation de ce procédé d'irradiation à un procédé industriel déjà en place ne demanderait pas beaucoup de modification. D'autant plus que l'irradiation lumineuse n'a, pour l'instant, pas donné de phases différentes que celles obtenues dans les conditions normales.

- Les ultrasons

L'application d'ultrasons semblait le champ externe le plus intéressant pour l'industrie pharmaceutique car déjà utilisé pour d'autres applications que le déclenchement de la nucléation primaire. Cependant, l'étude de son action sur la glycine a révélé la formation du polymorphe le plus stable dans l'eau qui ne cristallise pas dans les conditions normales. La formation d'un autre polymorphe est très problématique dans l'industrie pharmaceutique. Ce montage peut être intéressant dans le cadre de la recherche des différentes phases existantes pour une nouvelle molécule, mais pour la production d'un principe actif, l'irradiation par ultrasons semble complexe, même si l'on cherche à cristalliser la phase la plus stable, car il reste quand même une portion de l'autre phase.

Le dernier champ externe qu'il serait intéressant d'étudier est l'irradiation par un laser femtoseconde car il allie l'effet photophysique de l'irradiation au laser, à savoir un effet Kerr

sur les molécules qui les alignent toutes les unes derrière les autres, à l'effet de bulles de cavitation, le principal inconvénient est le coût du montage.

Il serait vraiment intéressant à présent de comprendre d'un point de vue théorique comment agissent ces champs externes, il semblerait que le champ électrique ou encore l'irradiation lumineuse agisse sur la densification des molécules, confirmant ainsi la théorie de nucléation en deux étapes de Kashchiev. Les ultrasons eux, ont plutôt l'air de s'apparenter à une agitation donc agissant plutôt sur le facteur hydrodynamique du milieu. Par contre dans le cas d'une irradiation lumineuse par un laser, on a création d'un champ électrique intense très localisé qui a un effet Kerr sur les molécules provoquant ainsi leur alignement, ce qui aurait donc plutôt un effet sur l'arrangement ordonné des molécules de la deuxième étape de la théorie de Kashchiev.

L'application d'un champ externe, quelque soit le champ externe agissant sur la nucléation, semble confirmer la théorie de nucléation en deux étapes proposée par Kashchiev, reste à déterminer les équations thermodynamique et cinétique de ces deux étapes, pour pouvoir étudier l'influence de ces champs sur les différentes équations.

On dispose à présent de trois champs externes pour provoquer la nucléation au sein de la zone métastable, ce qui pourrait s'avérer très utile pour la recherche des conditions de cristallisation et de nouvelles phases.



## Bibliographie

1. Boistelle, R., *Concepts de la cristallisation en solution*. Actualités Néphrologiques, Flammarion Médecine-Science Paris, 1985: p. 159-202.
2. Guggenheim, E.A., *Thermodynamics. An advanced treatment for chemists and physicists*. North Holland Publishing Compagny Amsterdam, 1959.
3. Grant, D.J.W., et al., *Non-linear van't Hoff solubility-temperature plots and their pharmaceutical interpretation*. International Journal of Pharmaceutics, 1984. **18**(1-2): p. 25-38.
4. Hollenbeck, R.G., *Determination of differential heat of solution in real solutions from variation in solubility with temperature*. Journal of pharmaceutical sciences, 1980. **69**(10): p. 1241-1242.
5. Van'tHoff, J.H., *L'équilibre chimique dans les systèmes gazeux ou dissous à l'état dilué*. Arch. Néerl. Sci. Exact. Natur, 1886. **20**: p. 239-302.
6. Hildebrand, J.H., *The Temperature Dependence of the Solubility of Solid Nonelectrolytes*. The Journal of Chemical Physics, 1952. **20**(1): p. 190-191.
7. Yalkowsky, S.H., *Solubility and partitioning V: Dependence of solubility on melting point*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1981. **70**(8): p. 971-973.
8. Lafferrère, L., *Nucléation et transitions de phases en chimie pharmaceutique*, in *Thèse de la faculté de l'économie de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille III*. 2002.
9. J.P. Klein, R.B., J. Dugua, *Cristallisation industrielle : Aspects pratiques*. Sciences Fondamentales des Techniques de l'Ingénieur, traité Génie et Procédés Chimiques, 1994. **J-2788**.
10. Lupis, C.H.P., *Chemical Thermodynamics of Materials*. 1983: New York, Elsevier Science.
11. Veessler, S., et al., *Crystallization in the Presence of a Liquid-Liquid Phase Separation*. Org. Process Res. Dev., 2006. **10**(4): p. 841-845.
12. Bauer, M., *Le polymorphisme, son origine, ses caractéristiques, ses conséquences dans le domaine pharmaceutique*. STP Pharma Pratiques, 1999. **9**(5): p. 354-362.
13. Kashchiev, D., P.G. Vekilov, and A.B. Kolomeisky, *Kinetics of two-step nucleation of crystals*. The Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(24): p. 244706.
14. Nyvlt, J., *Kinetics of nucleation in solutions*. Journal of Crystal Growth, 1968. **3-4**: p. 377-383.
15. Mullin, J.W., *Solutions and solubility, Crystallization (Fourth Edition)*. 2001, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 86-134.
16. Mullin, J.W., *Nucleation, Crystallization (Fourth Edition)*. 2001, Butterworth-Heinemann: Oxford. p. 181-215.
17. Gibbs, J.W., *Collected Works of J.W. Gibbs vol 1 : Thermodynamics*. 1948. **Vol. I**.
18. Volmer, M., *Kinetik der Phasenbildung*. 1939.
19. Becker R. , D.W., *Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen*. Annalen der Physik, 1935. **416**(8): p. 719-752.
20. Zettlemoyer, A.C., *Nucleation*. M. Dekker Inc., New York, 1969: p. 606 pages.
21. Chernov, A.A., *Modern crystallography III, Part I*. 1984.
22. Kind M. , M.A., *Methode zur Berechnung der homogenen Keimbildung aus wässrigen Lösungen*. Chemie Ingenieur Technik, 1983. **55**(9): p. 720-721.
23. Nielsen, A.E. and O. Söhnel, *Interfacial tensions electrolyte crystal-aqueous solution, from nucleation data*. Journal of Crystal Growth, 1971. **11**(3): p. 233-242.

24. Söhnel, O., *Estimation of electrolyte-crystal-aqueous-solution interfacial tension*. Journal of Crystal Growth, 1983. **63**(1): p. 174-176.
25. Amathieu, L., Boistelle, R., *Crystallization kinetics of gypsum from dense suspension of hemihydrate in water*. Journal of Crystal Growth, 1988. **88**(2): p. 183-192.
26. Mersmann, A., *Calculation of interfacial tensions*. Journal of Crystal Growth, 1990. **102**(4): p. 841-847.
27. Liu, X.Y., *Generic Progressive Heterogeneous Processes in Nucleation*. Langmuir, 2000. **16**(18): p. 7337-7345.
28. Mersmann, H.S.A., *Determination of heterogeneous nucleation rates*. Chemical engineering research and design, 1996. **74**(7): p. 821-827.
29. Klein J.P., R.B., J. Dugua, *Cristallisation industrielle : Aspects pratiques*. Sciences Fondamentales des Techniques de l'Ingénieur, traité Génie et Procédés Chimiques, 1994. **J-2788**.
30. S.J. Jancic, E.J.d.J., *Proceedings 9th Symposium on Industrial Crystallisation*. Elsevier, 1984. **498 pages**: p. 177-184.
31. Mersmann, A., *Supersaturation and nucleation*. Trans i chem E, 1996. **74A**: p. 812-820.
32. Leci, C.L., N. Garti, and S. Sarig, *The maximum attainable undercooling and solubility in solutions of 1,4-di-t-butylbenzene*. Journal of Crystal Growth, 1981. **51**(1): p. 85-88.
33. Boistelle, R., *Impurity effects in crystal growth from solution*. In interfacial aspects of phase transformations (B. Mutaftschiev, Ed), Erice, Sicily, 1982: p. 621-638.
34. Zawacki, G.H.N.S.V., *Inhibitors of crystallization and dissolution*. Industrial crystallization (S.J. Jancic and E.J. De Jong Ed), Elsevier Science Publishers., 1984: p. 51-59.
35. A. Eble, A.M., *Interaction of kinetics governing the precipitation of monoparticules*. Industrial crystallization, 1999.
36. Ushasree, P.M., et al., *Metastable zonewidth, induction period and interfacial energy of zinc tris(thiourea) sulfate*. Journal of Crystal Growth, 2000. **210**(4): p. 741-745.
37. Barata, P.A. and M.L. Serrano, *Salting-out precipitation of potassium dihydrogen phosphate (KDP) II. Influence of agitation intensity*. Journal of Crystal Growth, 1996. **163**(4): p. 426-433.
38. Grouazel, S., *Interaction en solution et cristallisation du BPTI : influence de la transition de phase liquide-liquide*. Thèse de l'Université de la Méditerranée, Marseille, 2005.
39. A. Pellegrini, U.T., R. Fellenberg, P. Wild., *Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character*. Journal of Applied Microbiology, 1992. **72**(3): p. 180-187.
40. H. Jentsch, R.P., G. Kundt, R. Göcke., *Treatment of gingivitis with hyaluronan*. Journal Of Clinical Periodontology, 2003. **30**(2): p. 159-164.
41. Erlandsen, S.L., J.A. Parsons, and T.D. Taylor, *Ultrastructural immunocytochemical localization of Lysozyme in the paneth cells of man*. J. Histochem. Cytochem., 1974. **22**(6): p. 401-413.
42. Albrecht, G. and R.B. Corey, *The Crystal Structure of Glycine*. Journal of the American Chemical Society, 1939. **61**(5): p. 1087-1103.
43. Iitaka, Y., *The crystal structure of [gamma]-glycine*. Acta Crystallographica, 1961. **14**(1): p. 1-10.
44. Marsh, R.E., *A refinement of the crystal structure of glycine*. Acta Crystallographica, 1958. **11**(9): p. 654-663.

45. Sakai, H., et al., *Transformation of [ $\alpha$ ληα]-glycine to [ $\gamma$ μμα]-glycine*. Journal of Crystal Growth, 1992. **116**(3-4): p. 421-426.
46. Dawson, A., et al., *Effect of High Pressure on the Crystal Structures of Polymorphs of Glycine*. Crystal Growth & Design, 2005. **5**(4): p. 1415-1427.
47. De Paz-Lugo, P., et al., *Effect of the glycine supplement in the treatment of arthrosis*. 29th Congress of the Spanish Society of Biochemistry and Molecular Biology. Elche, 7-10 September 2006, 2006.
48. Beckmann, W., R. Boistelle, and K. Sato, *Solubility of the A, B, and C polymorphs of stearic acid in decane, methanol, and butanone*. Journal of Chemical & Engineering Data, 1984. **29**(2): p. 211-214.
49. Laval, P., *Outils microfluidiques pour l'étude des processus de cristallisation : solubilité, polymorphisme et fréquence de nucléation*. Thèse de l'université de Bordeaux, 2007.
50. Tsekova, D., S. Dimitrova, and C.N. Nanev, *Heterogeneous nucleation (and adhesion) of lysozyme crystals*. Journal of Crystal Growth, 1999. **196**(2-4): p. 226-233.
51. Dixit, N.M., A.M. Kulkarni, and C.F. Zukoski, *Comparison of experimental estimates and model predictions of protein crystal nucleation rates*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **190**(1-2): p. 47-60.
52. Yang X., C.B.C., X. J. Wang, J. Lu, *Polymorphism in the crystallization of glycine*. AIChE annual meeting, San Francisco, CA, Nov. 12-17 2006, 2006.
53. Dunn, M.S., F.J. Ross, and L.S. Read, *THE SOLUBILITY OF THE AMINO ACIDS IN WATER*. J. Biol. Chem., 1933. **103**(2): p. 579-595.
54. Boldyreva, E., et al., *Polymorphism of glycine, Part I*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 2003. **73**(2): p. 409-418.
55. Garcia, E., *Etude la dissolution et de la croissance de principes actifs*, in *Thèse de la faculté de l'économie de droit, d'économie et des sciences d'Aix-Marseille III*. 2000, Université Aix-Marseille III: Marseille.
56. Taulelle, P., Thèse de l'Université de Provence, 2007.
57. Grossier, R.V., S., *Reaching One Single and Stable Critical Cluster through Finite-Sized Systems*. Crystal Growth & Design, 2009. **9**(4): p. 1917-1922.
58. Nadarajah, A., E.L. Forsythe, and M.L. Pusey, *The averaged face growth rates of lysozyme crystals: the effect of temperature*. Journal of Crystal Growth, 1995. **151**(1-2): p. 163-172.
59. Chernov, A.A., *Crystals built of biological macromolecules*. Physics Reports, I.M. Lifshitz and Condensed Matter Theory, 1997. **288**(1-6): p. 61-75.
60. Sear, R.P., *Nucleation: theory and applications to protein solutions and colloidal suspensions*. Journal of Physics: Condensed Matter, 2007. **19**: p. 033101.
61. Selimovic, S., Y. Jia, and S. Fraden, *Measuring the Nucleation Rate of Lysozyme using Microfluidics*. Crystal Growth & Design, 2009. **9**(4): p. 1806-1810.
62. Yau, S.-T., B.R. Thomas, and P.G. Vekilov, *Real time, in-situ, monitoring of apoferritin crystallization and defect formation with molecular resolution*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1-4): p. 188-194.
63. Kashchiev, D., *Nucleation in external electric field*. Journal of Crystal Growth, Third International Conference on Crystal Growth, 1972. **13-14**: p. 128-130.
64. Taleb, M., et al., *Crystallization of proteins under an external electric field*. Journal of Crystal Growth, 1999. **200**(3-4): p. 575-582.
65. Taleb, M., et al., *Equilibrium kinetics of lysozyme crystallization under an external electric field*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1-4): p. 250-255.

66. Nanev, C.N. and A. Penkova, *Nucleation of lysozyme crystals under external electric and ultrasonic fields*. Journal of Crystal Growth, 2001. **232**(1-4): p. 285-293.
67. Al-Haq, M.I., et al., *An apparatus for electric-field-induced protein crystallization*. Journal of Applied Crystallography, 2007. **40**(1): p. 199-201.
68. Koizumi, H., K. Fujiwara, and S. Uda, *Control of Nucleation Rate for Tetragonal Hen-Egg White Lysozyme Crystals by Application of an Electric Field with Variable Frequencies*. Crystal Growth & Design, 2009. **0**(0).
69. Moreno, A. and G. Sazaki, *The use of a new ad hoc growth cell with parallel electrodes for the nucleation control of lysozyme*. Journal of Crystal Growth, 2004. **264**(1-3): p. 438-444.
70. Mirkin, N., et al., *The influence of an internal electric field upon protein crystallization using the gel-acupuncture method*. Acta Crystallographica Section D, 2003. **59**(9): p. 1533-1538.
71. Penkova, A., et al., *Enhancement and suppression of protein crystal nucleation due to electrically driven convection*. Journal of Crystal Growth, 2005. **275**(1-2): p. e1527-e1532.
72. S.R. YEH , M.S., B. I. SHRAIMAN, *Assembly of ordered colloidal aggregates by electric-field-induced fluid flow*. Letters to Nature, 1997. **386**(6620): p. 57-59.
73. Chin, C.C., J.B. Dence, and J.C. Warren, *Crystallization of human placental estradiol 17beta-dehydrogenase. A new method for crystallizing labile enzymes*. J. Biol. Chem., 1976. **251**(12): p. 3700-3705.
74. Saban K.V., J.T., P. A. Varughese, G. Varghese., *Thermodynamics of Crystal Nucleation in an External Electric Field*. Crystal Research and Technology, 2002. **37**(11): p. 1188-1199.
75. Yanagiya, S.-i., et al., *Effect of a magnetic field on the orientation of hen egg-white lysozyme crystals*. Journal of Crystal Growth, 1999. **196**(2-4): p. 319-324.
76. Yanagiya, S.-i., et al., *Effects of a magnetic field on the growth rate of tetragonal lysozyme crystals*. Journal of Crystal Growth, 2000. **208**(1-4): p. 645-650.
77. Sakurazawa, S., T. Kubota, and M. Ataka, *Orientation of protein crystals grown in a magnetic field*. Journal of Crystal Growth, 1999. **196**(2-4): p. 325-331.
78. Wakayama, N.I., M. Ataka, and H. Abe, *Effect of a magnetic field gradient on the crystallization of hen lysozyme*. Journal of Crystal Growth, 1997. **178**(4): p. 653-656.
79. Ataka, M., E. Katoh, and N.I. Wakayama, *Magnetic orientation as a tool to study the initial stage of crystallization of lysozyme*. Journal of Crystal Growth, 1997. **173**(3-4): p. 592-596.
80. Sazaki, G., et al., *Effects of a magnetic field on the nucleation and growth of protein crystals*. Journal of Crystal Growth, 1997. **173**(1-2): p. 231-234.
81. Neugebauer, D.-C., A.E. Blaurock, and D.L. Worcester, *Magnetic orientation of purple membranes demonstrated by optical measurements and neutron scattering*. FEBS Letters, 1977. **78**(1): p. 31-35.
82. Astier, J.P., S. Veesler, and R. Boistelle, *Protein crystals orientation in a magnetic field*. Acta Crystallographica Section D, 1998. **54**(4): p. 703-706.
83. Katsuki A. , T.R., Watanabe S.I and Tanimoto Y., *The effect of high magnetic on the crystal growth of benzophenone*. Chemistry Letters, 1996: p. 607-608.
84. Torbet J., F.J.M., Hudry-Clergeon G., *Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields*. Nature, 1981. **289**: p. 91-93.
85. Yamigishi, A., *Biological systems in high magnetic fields*. JOURNAL OF MAGNETISM AND MAGNETIC MATERIALS, 1990. **90&91**: p. 43-46.

86. Torbet, J., J.-M. Freyssinet, and G. Hudry-Clergeon, *Oriented fibrin gels formed by polymerization in strong magnetic fields*. 1981. **289**(5793): p. 91-93.
87. Akio Katsuki, R.T., Shin-ichi Watanabe and Yoshifumi Tanimoto, *The Effect of High Magnetic Field on the Crystal Growth of Benzophenone*. Chemistry Letters, 1996. **25**(8): p. 607-608.
88. Ueno, S., et al., *In Situ Studies of Ultrasound-Stimulated Fat Crystallization Using Synchrotron Radiation*. J. Phys. Chem. B, 2003. **107**(21): p. 4927-4935.
89. Lyczko, N., et al., *Effect of ultrasound on the induction time and the metastable zone widths of potassium sulphate*. Chemical Engineering Journal, 2002. **86**(3): p. 233-241.
90. Miyasaka, E., et al., *Effect of ultrasonic irradiation on the number of acetylsalicylic acid crystals produced under the supersaturated condition and the ability of controlling the final crystal size via primary nucleation*. Journal of Crystal Growth, 2006. **289**(1): p. 324-330.
91. Ohsaka, K. and E.H. Trinh, *Dynamic nucleation of ice induced by a single stable cavitation bubble*. Applied Physics Letters, 1998. **73**(1): p. 129-131.
92. Guo, Z., A.G. Jones, and N. Li, *The effect of ultrasound on the homogeneous nucleation of BaSO<sub>4</sub> during reactive crystallization*. Chemical Engineering Science, 2006. **61**(5): p. 1617-1626.
93. Devarakonda, S., J.M.B. Evans, and A.S. Myerson, *Impact of Ultrasonic Energy on the Crystallization of Dextrose Monohydrate*. Crystal Growth & Design, 2003. **3**(5): p. 741-746.
94. Chow, R., et al., *A study on the primary and secondary nucleation of ice by power ultrasound*. Ultrasonics, 2005. **43**(4): p. 227-230.
95. Le Bras, A., *Action des ultrasons sur les processus physico-chimiques*. Revue de chimie minérale 4, 1967. **4**: p. 283-315.
96. Amara, N., et al., *Crystallization of potash alum: effect of power ultrasound*. Ultrasonics Sonochemistry, 2001. **8**(3): p. 265-270.
97. Garetz, B.A., et al., *Nonphotochemical, Polarization-Dependent, Laser-Induced Nucleation in Supersaturated Aqueous Urea Solutions*. Physical Review Letters, 1996. **77**(16): p. 3475 LP - 3476.
98. Oxtoby, D.W., *Crystals in a flash*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 277-278.
99. Okutsu, T., et al., *Laser-Induced Crystal Growth and Morphology Control of Benzopinacol Produced from Benzophenone in Ethanol/Water Mixed Solution*. Crystal Growth & Design, 2004. **4**(1): p. 113-115.
100. Okutsu, T., et al., *Light-Induced Nucleation of Metastable Hen Egg-White Lysozyme Solutions*. Crystal Growth & Design, 2005. **5**(4): p. 1393-1398.
101. Veessler, S., et al., *Crystals from Light: Photochemically Induced Nucleation of Hen Egg-White Lysozyme*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(7): p. 1631-1635.
102. Zaccaro, J., et al., *Nonphotochemical, Laser-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous Glycine Produces Unexpected*. Crystal Growth & Design, 2001. **1**(1): p. 5-8.
103. Hammadi, Z., M. Gauch, and R. Morin, *Microelectron gun integrating a point-source cathode*. Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures, 1999. **17**(4): p. 1390-1394.
104. Muller, E.W., *Field Ion Microscopy*. The Physics Teacher, 1966. **4**(2): p. 53-56.
105. Hammadi Z., A.J.-P., Morin R., Veessler S., *Protein crystallization induced by a localized voltage*. Journal of Crystal Growth, 2007. **306**.



## Annexes

### Annexe 1 : Préparation d'un tampon acétate

Afin de préparer 1L de tampon acétate, on utilise 5mL d'acide acétique à 100% que l'on dilue dans 800mL d'eau distillée, on ajuste ensuite le pH de la solution avec une solution de soude (NaOH), par ajout de petits volumes. Lorsque le pH souhaité est atteint, on ajuste le volume du tampon à 1L avec de l'eau distillée.

On vérifie le pH final avant de se servir du tampon.

Ce tampon doit être conservé au frigo pour éviter la prolifération des bactéries, et avant chaque utilisation, on revérifie le pH.

## Annexe 2 : Calcul de nombre de Reynolds et des pertes de charges pour le montage microfluidique.

### Le nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds nous est donné par l'équation suivante :

$$Re = \frac{VL}{\nu} = \frac{\rho VL}{\mu}$$

Avec  $V$  la vitesse d'écoulement (m/s) qui est égale au rapport du débit  $Q$  sur la surface d'écoulement  $S$ .

$L$ , le diamètre du tuyau

$\nu$ , la viscosité cinématique qui est égale au rapport de la viscosité dynamique  $\mu$  et de la masse volumique  $\rho$ .

Sachant que le diamètre interne du tube est de 0,38mm et que le diamètre interne du canal de la puce est de 0,5mm, que le débit de la phase aqueuse est de 0,3mL/h dans le tube et 0,6mL/h dans la puce, celui de l'huile est de 1,4mL/h, et enfin que  $\mu_{\text{eau}} = 1,002 \cdot 10^{-3}$  Pa.s,  $\mu_{\text{huile}} = 0,1$  Pa.s,  $\rho_{\text{eau}} = 1000$  kg/m<sup>3</sup> et  $\rho_{\text{huile}} = 1102$  kg/m<sup>3</sup>.

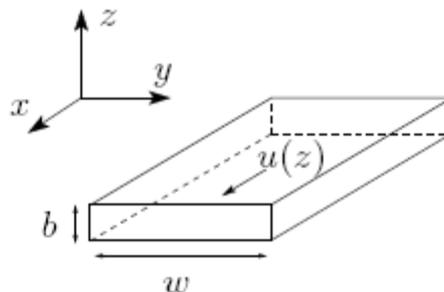
Voici les valeurs de  $Re$  obtenues pour l'écoulement de la phase aqueuse dans les tubes et dans la puce microfluidique et l'écoulement de l'huile silicone dans le tube et dans la puce :

Re	Eau	Huile
Tube	0,28	0,014
Canal puce	0,42	0,011

On voit bien qu'avec des valeurs de  $Re < 1$ , on a un écoulement laminaire que ce soit dans le tube d'alimentation de la puce ou bien dans la puce elle-même.

### La perte de charges

On se place dans le cas d'une cellule de Hele-Shaw, i.e. la largeur de la cellule est très grande devant sa hauteur (fig.64). Ce qui n'est pas vraiment notre cas, mais nous donne une idée de l'ordre de grandeur de la perte de charges.



**Figure 64** : Schéma d'une cellule de Hele-Shaw

La perte de charges,  $\Delta P$ , nous est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta P = \frac{12L\mu Q}{b^3 w}$$

Avec, L la longueur du canal  
 $\mu$ , la viscosité dynamique  
 Q le débit  
 b la hauteur du canal  
 et w la largeur du canal, dans notre cas, b = w = diamètre cité plus haut.  
 Voici les valeurs qu'on obtient :

$\Delta P$ ( Pa)	Eau	Huile
Tube	19,22	4476,13
Canal puce	0,80	186,67

Les pertes de charges sont peu importantes en ce qui concerne l'eau, par contre pour l'huile, la perte de charges est assez importante dans le tube. Cependant la perte de charges dans le canal de la puce est suffisamment faible pour que la pression exercée par le pousse-seringue, afin de la compenser, soit supportée par la puce en PDMS.

### **Annexe 3 : Fabrication d'un moule pour puce microfluidique en PDMS**

Il faut avant tout sécher et déshydrater le wafer silicium 3 qui va accueillir le moule pour la puce microfluidique en PDMS.

En suite on dégaze la résine SU-8 2100 de Microchem, car elle est très visqueuse et il ne faut aucune bulle d'air lors du dépôt sur le wafer.

On dépose ensuite une couche de résine sur le wafer, avec une épaisseur de 250 $\mu$ m, à l'aide d'un spin-coater (tournette) ayant une vitesse de 1000tr/min.

On cuit une première fois la résine, on appelle cette cuisson avant réticulation le soft-bake, à 65°C pendant 10min puis à 95°C pendant 60min.

On effectue ensuite un deuxième dépôt de résine identique au premier, de 250 $\mu$ m à 1000tr/min au spin-coater.

Et on cuit une deuxième fois la résine à 65°C pendant 10min et 95°C pendant 60min.

Une fois la résine pré-cuite, on doit l'exposer, au travers d'un masque représentant la forme désirée, sous une lampe UV (365nm) pour une énergie totale de 600mJ/cm<sup>2</sup>, ce qui donne un temps d'exposition de l'ordre de 6min.

Il faut ensuite cuire la résine, le post-exposure bake, pendant 1 min à 65°C et 30min à 95°C.

La dernière étape est l'étape de révélation, pour cela on plonge le wafer dans un bain de révélateur de Microchem, que l'on peut remplacer par du lactate d'éthyle ou de l'alcool diacétone. Il faut agiter pendant environ 30min, jusqu'à ce que toute la résine non réticulée soit partie.

Il faut faire un dernier rinçage dans un bain de développeur propre, avant de rincer à l'isopropanol et de sécher sous un flux d'azote.

## **Annexe 4 : Procédure de décapage des tubes 20 $\mu$ L du multi-puits**

Il faut commencer par rincer chaque tube avec de l'eau chaude, pour dissoudre les cristaux qui auraient pu se former au sein des solutions présentes dans les tubes.

Ensuite, on fait un rinçage au chloroforme pour enlever toute trace d'huile de paraffine.

Puis on met les tubes à tremper dans un bain de mélange sulfo-chromique, pour supprimer les traces organiques dues aux protéines présentes en solutions. On laisse les tubes dans le bain pendant toute une nuit.

Le lendemain, on sort les tubes du mélange sulfo-chromique et on les rince à l'eau distillée. Il faut faire attention à bien vider les tubes du mélange sulfo-chromique avant de les rincer à l'eau distillée, car le mélange sulfo-chromique réagit de façon très exothermique avec l'eau.

Enfin on place els tubes dans une céramique que l'on insère dans un four haute température, pour les chauffer jusqu'à 900°C afin de sublimer toutes éventuelle trace restante dans les tubes.

On les laisse une heure dans le four, puis on les laisse refroidir avant de la manipuler pour les ranger !

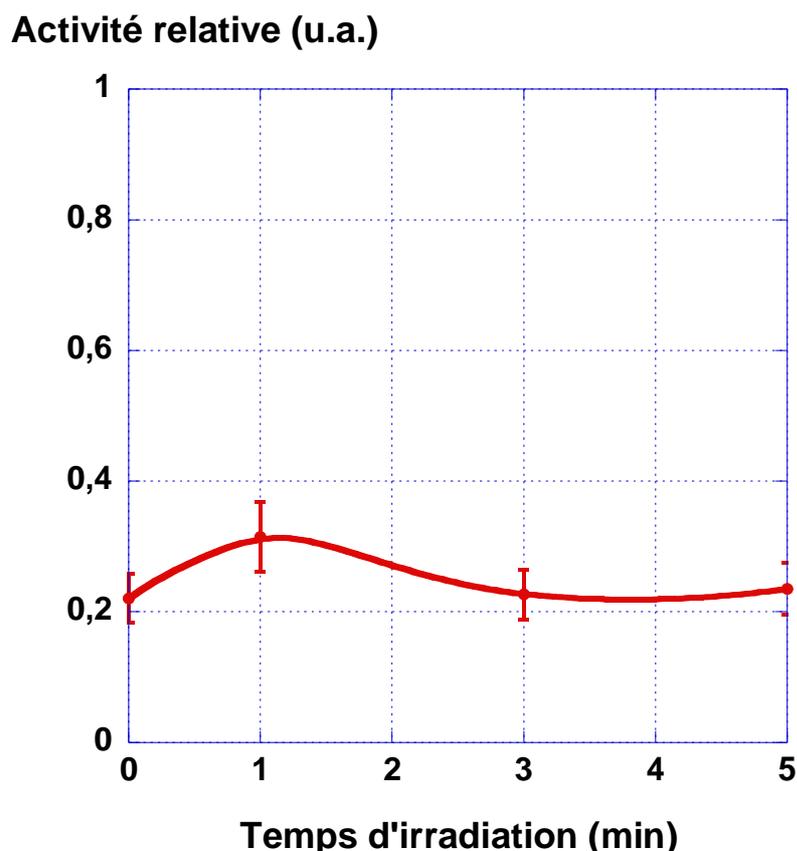
## Annexe 5 : Test d'activité du BPTI

Le BPTI étant une molécule inhibitrice, pour tester son activité, il faut donc tester l'activité de la protéine qu'il inhibe, en fonction de la concentration en BPTI. On teste donc l'activité d'une solution de Trypsine en fonction de la concentration en BPTI présent dans cette solution.

La trypsine a une activité sur la BAEE (*N<sub>α</sub>-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*, C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) qui en présence d'eau donne la N<sub>α</sub>-Benzoyl-L-arginine et de l'éthanol. :



On teste ensuite la présence de N<sub>α</sub>-Benzoyl-L-arginine par spectroscopie UV. Sa concentration nous indique la fraction de trypsine qui lui a permis d'exister. Donc par soustraction de la concentration en trypsine de départ et la concentration qui a réagi pour donner la N<sub>α</sub>-Benzoyl-L-arginine, on sait quelle est la proportion de trypsine qui a été inhibée par le BPTI et donc la proportion de BPTI qui a une activité.



**Figure 65** : Activité du BPTI en fonction du temps d'irradiation des solutions

## Résumé

Dans le domaine de la chimie pharmaceutique la cristallisation des principes actifs ou intermédiaires est une étape importante, c'est elle qui va contrôler les propriétés physico-chimiques du solide obtenu. La première étape de la cristallisation, la nucléation, peut être lente, difficile ou perturbée par l'apparition d'une autre phase, solide ou liquide, indésirable. L'obtention du premier cristal et la recherche de nouveaux polymorphes nécessitent de longues et onéreuses études.

Avec pour objectif de rationaliser ces recherches de conditions de cristallisation nous proposons, dans le cadre de cette thèse, l'étude et le développement de nouvelles techniques de cristallisation sur de faibles volumes (du nL au mL) en présence d'un champ externe. Par champ externe, on entend en présence d'un champ électrique, d'un faisceau lumineux ou d'ultrasons. Il s'agira d'être capable de provoquer la nucléation de manière localisée dans le temps et l'espace au sein de solutions métastables, afin de pouvoir l'observer et de mieux comprendre le mécanisme d'apparition du premier cristal.

Mots clé : Nucléation, Germination, Champ externe, Principe actif pharmaceutique, Champ électrique, Irradiation lumineuse, Ultrasons.

## **Abstract: Nucleation under external fields**

In the field of pharmaceutical chemistry the crystallization of the active ingredient or intermediate is an important stage, it is going to control the physico-chemical properties of the solid obtained. The first stage of the crystallization, the nucleation, can be slow, difficult or disturbed by the appearance of another unwanted phase, solid or liquid. The obtaining of the first crystal and the research for new polymorphs need long and expensive studies.

Our aim is to rationalise these researches on crystallization conditions, for that we propose, in this PhD thesis, the study and the development of new crystallization techniques on small volumes (from nL to mL) under an external field. As external fields we mean under an electric field, a light or ultrasounds irradiation. We will be able to enhance nucleation. We want to control spatial and temporal localisation of the nucleation event in metastable solutions, in order to observe and better understand the mechanism of the first nucleus appearing.

Key words: Nucleation, External field, Active pharmaceutical ingredient, Electric field, Light irradiation, Ultrasounds.