



HAL
open science

Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique

Eni Bogdani

► **To cite this version:**

Eni Bogdani. Étude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10225 . tel-00838568

HAL Id: tel-00838568

<https://theses.hal.science/tel-00838568>

Submitted on 26 Jun 2013

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.



N° d'ordre 225-2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le (8 novembre 2011)

par

M. BOGDANI Eni

Master Recherche Génie des Procédés

TITRE :

Etude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique.

Directeur de thèse : Séverine VESSOT, Professeur

Co-encadrant : Julien ANDRIEU, Professeur

JURY : M. Edouard PLASARI, Rapporteur
M. Patrick GERVAIS, Rapporteur
Mme. Séverine VESSOT, Examineur
M. Julien ANDRIEU, Examineur
M. Jacques JOSE, Examineur
M. Jean-Paul KLEIN, Examineur
M. Bertrand WOINET, Examineur
M. Olivier MONNIER, Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'automatique et de génie des procédés (LAGEP) de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Je tiens à remercier le directeur du LAGEP Mr Hatem FESSI pour son bon accueil.

J'exprime ma gratitude envers Mr Edouard PLASARI et Mr Patrick GERVAIS de me faire l'honneur d'examiner ce travail en tant que rapporteurs. J'exprime tous mes remerciements à Mr Jean-Paul KLEIN, Mr Jacques JOSE, Mr Bertrand WOINET et Mr Olivier MONNIER, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse adorable Mme Séverine VESSOT-CRASTES pour m'avoir soutenu aussi bien scientifiquement que moralement durant ces trois années de thèse. Je la remercie par ailleurs pour ses précieux conseils qui m'ont permis d'attendre la venue au monde de mon fils Téo en pleine sérénité.

Je tiens bien sur à remercier Mr Julien ANDRIEU, co-directeur de thèse, de m'avoir soutenu et guidé aussi bien scientifiquement que moralement durant mes travaux de thèse. Je remercie Mr ANDRIEU de m'avoir transmis son inestimable savoir sur le procédé de lyophilisation et de m'avoir permis d'acquérir en tant que son élève puis son doctorant une grande expertise du procédé de lyophilisation.

Je remercie Mme Rim DAOUSSI de m'avoir aidé à prendre rapidement en main toutes les nombreuses techniques et les nombreux appareils du LAGEP utilisés tout au long de ce travail.

Je remercie Mr Jacques JOSE pour sa disponibilité et pour son aide précieuse dans la détermination des valeurs des pressions de vapeurs par la méthode statique mise au point et validée dans son laboratoire.

J'exprime mes sincères remerciements à Mme Ghania DEGOBERT pour son aide scientifique et notamment de m'avoir transmis ses connaissances précieuses en formulation, à Mr Denis MANGIN pour ses discussions et ses conseils concernant la thermodynamique et la cristallisation et à Mr Roman PECEALSKI pour ses conseils fructueux sur la modélisation de l'étape de sublimation avec Comsol.

Je remercie également tous les thésards, membres permanents et les personnels du service technique et informatique du LAGEP pour leur aide et leur amitié.

Je remercie mes parents, Edmond et Margarita, mon frère, Nea, pour leur soutien permanent et leurs nombreux encouragements durant ces trois années de thèse.

Enfin, je remercie ma femme Orieta pour l'amour qu'elle me porte depuis 9 ans et d'avoir amené au monde mon plus beau cadeau : mon fils Téo.

Nomenclature

| | | |
|-------------------------------------|--|--------------------------------|
| ac | Coefficient d'accommodation | (-) |
| An | Constante de vitesse de nucléation (section interne) | n/s/m ³ |
| As | Surface totale de sublimation d'un flacon | m ² |
| Av | Surface externe de la section droite d'un flacon | m ² |
| aw | Activité de l'eau d'un produit | adimensionnel |
| B | Contante de la vitesse de croissance des nucléi | °C ⁵ |
| b ₀ | Constante de Boltzmann | J/K |
| C | Concentration en soluté | kmol/m ³ ou kmol/kg |
| C | constante de l'équation de B.E.T | (-) |
| Cp _{cs} | Capacité calorifique apparente de la couche sèche | J/kg/K |
| Cp _{eau} | Capacité calorifique de l'eau | J/kg/K |
| Cp _g ou Cp _{cg} | Capacité calorifique de la glace | J/kg/K |
| Cp _{MS} | Capacité calorifique intrinsèque de la couche sèche | J/kg/K |
| Cp _{flacon} | Capacité calorifique du flacon | J/kg/K |
| C _{sonde} | Constante de la sonde à choc | m ⁻¹ |
| D _f | Diffusivité massique de Fick | m ² /s |
| De | Diffusivité effective de l'eau d'insertion dans la matière sèche | m ² /s |
| D _k | Diffusivité de Knudsen de la vapeur d'eau | m ² /s |
| D _{k,e} | Diffusivité moléculaire effective de la vapeur d'eau | m ² /s |
| \overline{d}_p | Diamètre des pores de la matière sèche | M |
| D _v | Diffusivité moyenne pondérée | m ² /s |
| D _{v,e} | Diffusivité moyenne effective pondérée | m ² /s |
| Ea | Energie d'activation | J/mol |
| E _{air} | Epaisseur de la couche d'air sous le flacon | M |
| e _{cs} | Epaisseur de la couche sèche | M |
| e _{cs} _{max} | Epaisseur de la couche sèche à sa valeur maximale | M |
| e _{cg} | Epaisseur de la couche congelée | M |
| e' _{cg} | Epaisseur critique de la couche congelée | M |
| e _s | Emissivité de la surface de l'étagère | (-) |
| e _v | Emissivité du flacon | (-) |
| F | Facteur de forme (radiation) | (-) |
| F | Facteur de forme (diffusion) | (-) |
| F _{fuite} | Taux de fuite intrinsèque du lyophilisateur | Pa/s |
| H | Coefficient thermique de convection | W/m ² /K |
| H | Enthalpie | J/kg |
| HRR | Humidité résiduelle requise (base humide) | % |
| K | Constante de l'équation de Taylor Gordon | (-) |

| | | |
|----------------------------|--|------------------------|
| k (ATG) | Constante de calibration | J |
| k | Conductivité thermique de la couche congelée | W/m/K |
| K_g | Coefficient de transfert de chaleur par conduction à travers la couche de gaz | W/m ² /K |
| K_c | Coefficient de transfert de chaleur par contact direct flacon étagère | W/m ² /K |
| K_r | Coefficient de transfert de chaleur par rayonnement | W/m ² /K |
| K_d | Composante du coefficient global de transfert de chaleur K_v | Pa ⁻¹ |
| Kn | Nombre de Knudsen | (-) |
| K_p | Composante du coefficient global de transfert de chaleur K_v | W/m ² /K/Pa |
| K_{rad} | Coefficient de transfert de chaleur par rayonnement | W/m ² /K |
| K_v | Coefficient de transfert de chaleur global | W/m ² /K |
| k_w | Constante cryoscopique de l'eau | K.kg de solvant/kmole |
| \bar{l} | Libre parcours moyen des molécules de gaz | M |
| L_{cong} | Epaisseur de la couche congelée | M |
| ℓ_v | Distance équivalente moyenne séparant l'étagère du flacon | M |
| L_0 | Epaisseur initiale de la couche congelée | M |
| l_{sep} | Longueur équivalente moyenne de la couche d'air entre le fond du flacon et l'étagère | M |
| \dot{m} | Débit massique de sublimation | kg/s |
| $M_{H_2O} / M_{eau} / M_s$ | Masse molaire de l'eau ou du soluté | kg/kmol |
| M (ATG) | Masse molaire de la vapeur | kg/kmol |
| N | Nombre de flacons utilisés lors de la lyophilisation | (-) |
| N_a | Nombre d'avogadro | |
| P_c ou P_t | Pression totale dans la chambre de lyophilisation | Pa |
| P_{cd} | Pression de vapeur d'équilibre de la glace au niveau du condenseur | Pa |
| $P_{experimental}$ | Pression totale dans l'enceinte de lyophilisation obtenue expérimentalement | Pa |
| P_{Hg} | Pression d'intrusion du mercure | Pa |
| $P_i/P_0(T_i)$ | Pression partielle d'eau à l'interface | Pa |
| P_{i0} | Pression partielle d'eau à l'interface avant fermeture de la vanne de séparation | Pa |
| P_{inerte} | Pression partielle des gaz inertes dans l'enceinte de lyophilisation | Pa |
| P' | Pression partielle d'eau dans l'enceinte de lyophilisation | Pa |
| P'_i | Pression partielle de la vapeur d'eau à l'interface | Pa |
| P_v | Pression totale dans le flacon | Pa |
| P'_{vap} | pression partielle de vapeur d'eau mesurée par l'hygromètre | Pa |
| $p_{v,sat}$ | pression de vapeur saturante | Pa |
| P_o | Pression de vapeur d'équilibre de la glace à l'interface de sublimation | Pa |

| | | |
|--|---|---------------------------------------|
| Po (ATG) | Pression de vapeur d'équilibre solide/vapeur ou liquide/vapeur | Pa |
| Q | Flux de chaleur | W/m ² |
| Qr | Flux transmit par rayonnement | W/m ² |
| Q_{vol}° | flux de chaleur volumique | W/m ³ |
| q _{ads} | quantité de gaz adsorbée en g par masse d'échantillon | (-) |
| R | Rayon interne du flacon | M |
| R | Constante des gaz parfaits | J/kmole/K |
| Rc | Résistance au transfert de matière à travers le lyophilisateur | Pa.s.kg ⁻¹ |
| Rp | Résistance au transfert de matière de la couche sèche | Pa.s.kg ⁻¹ |
| Rp0 | Résistance au transfert de matière à e _{cs} =0 | Pa.s.kg ⁻¹ |
| \hat{R}_p | Résistance au transfert de matière de la couche sèche normalisée | Pa.m ² .s.kg ⁻¹ |
| Rs | Résistance au transfert de matière due au bouchon | Pa.s.kg ⁻¹ |
| R _T | Résistance totale au transfert de matière | Pa.s.kg ⁻¹ |
| T _b | Température du produit au fond du flacon | K ou °C |
| Tcs | Température maximale de solidification complète | K ou °C |
| Tc/T _{collapse} | Température de collapse | K ou °C |
| T _{condenseur} | Température du condenseur | K ou °C |
| Te ou T _{eut} | Température eutectique | K ou °C |
| Td | Température maximale pour le lyophilisat | K ou °C |
| T _{étagère} ou T _{shelf} | Température du fluide circulant dans les étagères | K ou °C |
| T _f ou T _m | Température de fusion | K ou °C |
| T _{gmél} | Transition vitreuse d'un mélange | K ou °C |
| T'g ou Tg' | Transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum | K ou °C |
| T _i /T _{éq} | Température du front de sublimation | K ou °C |
| | | |
| Ti ₀ | Température du front de sublimation avant fermeture de la vanne de séparation | K ou °C |
| Tim | Température minimale de fusion commençante | K ou °C |
| T'im | Limite absolue de la température | K ou °C |
| T _∞ | Température du milieu extérieur au flacon | K ou °C |
| Tm | Température de fusion | K ou °C |
| Tn | Température du nucléation | K ou °C |
| | | |
| T _{shelf} | Température du fluide circulant dans les étagères | K ou °C |
| TsN | Température de nucléation spontanée | K ou °C |
| Tss | Température à la surface de la couche sèche | K ou °C |
| T _{Trans} | température du produit lors du changement de phase pendant la congélation | K ou °C |
| Tv | Température du mélange gazeux dans la chambre de lyophilisation | K ou °C |
| Tg | Température de transition vitreuse | K ou °C |
| V | Volume de la chambre de lyophilisation | m ³ |
| V | vitesse de rampe de chauffe | (°C/min) |

| | | |
|----------|--|------------------------------|
| V_s | Vitesse de déplacement du front de sublimation | m/s |
| x_i^v | Fraction molaire de vapeur d'eau dans le flacon | - |
| $X_g(T)$ | Fraction massique de la glace | kg/kg |
| X_{gl} | Fraction massique de la glace au maximum, base sèche | kg/kg |
| $X(t)$ | Fraction massique d'eau en base sèche | kg/kg |
| X_m | Teneur en eau de la monocouche de l'équation de GAB | kg d'eau/kg de matière sèche |

Nomenclature grecque

| | | |
|--|---|-----------------------------------|
| α | Coefficient d'efficacité pour le transfert de chaleur | (-) |
| α_{Hg} | Angle de contact mercure/produit | (-) |
| ΔH_f | Enthalpie de fusion | J/kg |
| ΔH_s | enthalpie de sublimation | J/kg |
| ΔT | Gradient de température entre le fond du produit congelé et le front de sublimation ou degré de surfusion | K ou °C |
| ΔT_f | abaissement cryoscopique | K ou °C |
| Δt | Temps écoulé entre deux prélèvements d'échantillon | s |
| Δt_{acq} | Temps écoulé entre deux tests PRA | s |
| Δz | Épaisseur de l'interface de sublimation | m |
| ε | Porosité de la zone sèche | (-) |
| ε_{flacon} | Emissivité thermique du flacon | (-) |
| ε_g | Fraction de glace/masse totale | (-) |
| ε_{sc} | Emissivité thermique d'une source chaude | (-) |
| γ | Tension superficielle | (N/m) |
| λ | Conductivité thermique globale de la formulation | W/m/K |
| λ_{air} | Conductivité thermique du gaz sous le flacon | W/m/K |
| λ_{cg} | Conductivité thermique de la couche congelée | W/m/K |
| λ_{cs} ou $\lambda_{lyophilisat}$ | Conductivité thermique de la couche sèche | W/m/K |
| λ_{eau} | Conductivité thermique de l'eau | W/m/K |
| λ_{gaz} | Conductivité thermique de la vapeur d'eau sous vide | W/m/K |
| λ_o | Conductivité thermique de la vapeur d'eau à pression atmosphérique | W/m/K |
| λ_s | Conductivité thermique apparente de la matière sèche | W/m/K |
| Λ_0 | conductivité thermique moléculaire de la vapeur d'eau | W/m ² /Pa/K |
| ρ_{gaz} | Masse volumique du gaz environnant les flacons | kg/m ³ |
| ρ_g ou ρ_{cong} | Masse volumique de la glace | kg/m ³ |
| ρ_s | Masse volumique apparente de la couche sèche | kg/m ³ |
| ρ_{si} | Masse volumique intrinsèque de la matière sèche | kg/m ³ |
| ω_g' | Concentration de la phase cryo-concentrée au maximum (base humide) | kg/kg |
| ω_s | fraction massique de matière sèche (base humide) | kg/kg |
| σ | Constante de Boltzmann | W/ m ² /K ⁴ |
| τ | Tortuosité de la matrice poreuse | (-) |
| μ_v | Viscosité de la vapeur d'eau sous pression réduite | Pa.s |

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 12 |
| 1. Bibliographie..... | 15 |
| 1.1 Principe de la lyophilisation..... | 15 |
| 1.2 Le lyophilisateur..... | 18 |
| 1.3 Les étapes de lyophilisation..... | 19 |
| 1.3.1. La congélation..... | 19 |
| 1.3.1.1 Cristallisation de la glace. Notion de surfusion..... | 19 |
| 1.3.1.2 Etat cristallin ou amorphe..... | 20 |
| 1.3.1.3 Intérêt de l'état amorphe pour la lyophilisation..... | 21 |
| 1.3.1.4 Cristallisation des excipients..... | 21 |
| 1.3.2. La Sublimation..... | 22 |
| 1.3.2.1 Importance de la température de transition vitreuse, T'g..... | 22 |
| 1.3.2.2 La température de collapse Tc..... | 24 |
| 1.3.2.3 Transfert de masse pendant la phase de sublimation..... | 24 |
| a. Résistance de la couche sèche Rp..... | 25 |
| b. Résistance globale au transfert de matière, R _T | 27 |
| 1.3.2.4 Transfert de chaleur pendant la phase de sublimation..... | 28 |
| 1.3.3. La dessiccation secondaire (désorption)..... | 34 |
| 1.4 Paramètres clés du procédé de lyophilisation..... | 35 |
| 1.4.1. La transition vitreuse..... | 35 |
| 1.4.1.1 Détermination expérimentale des valeurs de T'g..... | 35 |
| 1.4.1.2 Importance de la transition vitreuse pour le contrôle du procédé de lyophilisation..... | 36 |
| 1.4.2. La température de collapse..... | 38 |
| 1.4.3. Les isothermes de sorption..... | 39 |
| 1.4.4. Qualité finale du lyophilisat..... | 40 |
| 1.4.4.1 Propriétés physiques du lyophilisat..... | 40 |
| 1.4.4.2 L'humidité résiduelle du lyophilisat..... | 41 |
| 1.4.4.3 Mesure de l'humidité résiduelle du lyophilisat :..... | 41 |
| 1.5 Suivi de la lyophilisation..... | 43 |
| 1.5.1. Suivi de la température du produit..... | 43 |
| 1.5.2. Suivi par capteur de pression à conductivité thermique : jauge Pirani..... | 43 |
| 1.5.3. Cinétiques de sublimation obtenues avec la microbalance Christ..... | 44 |
| 1.5.4. Test de montée en pression PRA (Pressure Rise Analysis)..... | 45 |
| 1.5.5. Suivi par sonde proche infra-rouge (NIR)..... | 49 |
| 1.6 Importance de la formulation en lyophilisation..... | 49 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1.6.1. | Introduction..... | 49 |
| 1.6.2. | Le principe actif..... | 50 |
| 1.6.3. | La formulation appropriée..... | 50 |
| 1.7 | Lyophilisation en milieu non aqueux..... | 53 |
| 1.7.1. | Préparation de la solution..... | 55 |
| 1.7.2. | Stabilité de la solution..... | 55 |
| 1.7.3. | Influence de la nature des co-solvants sur le procédé de lyophilisation..... | 56 |
| 1.7.3.1 | Effet sur la congélation..... | 56 |
| 1.7.3.2 | Influence sur l'étape de sublimation..... | 58 |
| 1.7.4. | Stabilité du produit lyophilisé..... | 60 |
| 1.7.5. | Influence sur les propriétés de reconstitution..... | 61 |
| 1.7.6. | Amélioration de la stérilité..... | 61 |
| 1.7.7. | Classification toxicologique des solvants organiques..... | 62 |
| 1.7.8. | Limites d'explosivités..... | 63 |
| 2. | Détermination expérimentale des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur et des enthalpies de sublimation du tert-butanol pur et du mélange eutectique 90% TBA + 10% eau (massique) par deux méthodes différentes : la méthode Thermogravimétrique et la méthode Statique..... | 65 |
| 2.1 | Résumé des travaux de thèse de Rim Daoussi..... | 65 |
| 2.2 | Données bibliographiques du système TBA + eau..... | 66 |
| 2.2.1. | Diagramme de phase du système TBA + eau..... | 66 |
| 2.2.2. | Enthalpies de changement d'états..... | 67 |
| 2.2.3. | Pressions de vapeur d'équilibre liquide/vapeur..... | 68 |
| 2.3 | Caractérisation expérimentale du système TBA + eau..... | 68 |
| 2.3.1. | Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)..... | 68 |
| 2.3.2. | Températures et enthalpies de fusion du TBA pur et du mélange eutectique B.70 | |
| 2.3.3. | La méthode Statique de détermination des pressions de vapeur d'équilibre liquide/vapeur et solide/vapeur..... | 71 |
| 2.3.4. | Analyse Thermogravimétrique (ATG)..... | 72 |
| 2.3.4.1 | Appareillage..... | 72 |
| 2.3.4.2 | Détermination des pressions de vapeur et de l'enthalpie de sublimation du tert-butanol pur..... | 73 |
| 2.3.4.3 | Détermination des pressions de vapeur et de l'enthalpie de sublimation du mélange eutectique B, à 90 % de TBA + 10% d'eau (% massique)..... | 82 |
| 2.4 | Analyse des résultats des travaux de thèse de Rim Daoussi..... | 85 |
| 2.4.1. | Influence des caractéristiques thermodynamiques du TBA pur sur les cinétiques de séchage..... | 86 |
| 2.4.1.1 | Influence des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur sur les cinétiques de séchage..... | 86 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.1.2 | Influence de l'enthalpie de sublimation sur les cinétiques de séchage. | 87 |
| 2.4.2. | Influence des caractéristiques thermodynamiques de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage. | 87 |
| 2.4.2.1 | Influence des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage. | 87 |
| 2.4.2.2 | Influence de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage. | 88 |
| 2.4.3. | Comparaison des courbes cinétiques pour les formulations à 100% de TBA et à 90% de TBA +10% d'eau (% massique). | 89 |
| 2.5 | Conclusion. | 90 |
| 3. | Etude comparative de la lyophilisation en milieu aqueux et organique d'un principe actif modèle : L'Ibuprofène. | 93 |
| 3.1 | Introduction. | 93 |
| 3.2 | Caractéristiques physico-chimiques de l'ibuprofène. | 94 |
| 3.3 | Formulation de l'ibuprofène à partir du mélange organique ter-butanol + eau. | 95 |
| 3.4 | Caractéristiques thermodynamiques. | 96 |
| 3.4.1. | Caractérisation thermodynamique des produits purs. | 97 |
| 3.4.2. | Caractérisation thermodynamique de la formulation à base aqueuse. | 97 |
| 3.4.3. | Caractérisation thermodynamique de la formulation à base de co-solvant organique. | 99 |
| 3.4.4. | Comparaison des données thermodynamiques de la formulation à base aqueuse et de la formulation à base organique. | 103 |
| 3.5 | Etude de la congélation. | 103 |
| 3.5.1. | Microscopie en chambre froide. | 104 |
| 3.5.1.1 | Principe. | 104 |
| 3.5.1.2 | La chambre froide. | 105 |
| 3.5.1.3 | Le microtome et le microscope. | 105 |
| 3.5.2. | Protocoles de congélation et préparation des échantillons. | 106 |
| 3.5.3. | Observation des cristaux de glaces et d'eutectique A. | 107 |
| 3.5.4. | Traitement des images et mesure de la taille moyenne des cristaux de glace et d'eutectique A. | 108 |
| 3.5.5. | Morphologie des cristaux de glace de la formulation d'ibuprofène à base aqueuse. | 109 |
| 3.5.6. | Morphologie des cristaux d'eutectique A de la formulation d'ibuprofène à base organique. | 111 |
| 3.5.7. | Comparaison morphologique des cristaux de solvant de la formulation à base aqueuse avec la formulation à base organique. | 113 |
| 3.6 | Etude de la sublimation. | 114 |
| 3.6.1. | Définition du Quality by Design (QbD) et du Design Space. | 115 |
| 3.6.2. | Forme générale du Design Space du procédé de lyophilisation. | 115 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.6.3. | Design Space de l'étape de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base organique..... | 117 |
| 3.6.3.1 | Détermination du coefficient global de transfert de chaleur externe, K_v . | 117 |
| 3.6.3.2 | Détermination des valeurs de la résistance normalisée de la vapeur de solvant à travers la couche sèche (\hat{R}_p). | 122 |
| 3.6.3.3 | Tracé des isothermes du produit T_b . | 127 |
| 3.6.3.4 | Finalisation du Design Space : introduction des attributs critiques de qualité CQA (Critical Quality Attributes). | 128 |
| 3.6.4. | Comparaison des cinétiques de sublimation de la formulation à base aqueuse et de la formulation à base organique. | 129 |
| 3.7 | Etude de la dessiccation secondaire : Désorption. | 131 |
| 3.8 | Caractérisation du lyophilisat final et étude des critères de qualité | 133 |
| 3.8.1. | Aspect visuel des lyophilisats. | 134 |
| 3.8.1.1 | Echelle macroscopique. | 134 |
| 3.8.1.2 | Echelle microscopique : caractérisation des lyophilisats par MEB (microscopie électronique à balayage). | 134 |
| 3.8.2. | Caractérisation du lyophilisat final par DRX. | 136 |
| 3.8.2.1 | Principe de la DRX. | 136 |
| 3.8.2.2 | Méthodologie des mesures par DRX et résultats. | 137 |
| 3.8.3. | Caractérisation thermodynamique du lyophilisat final par DSC. | 138 |
| 3.8.3.1 | Caractérisation thermodynamique du lyophilisat correspondant à la formulation à base aqueuse. | 139 |
| 3.8.3.2 | Caractérisation thermodynamique du lyophilisat correspondant à la formulation à base organique. | 140 |
| 3.8.4. | Humidité résiduelle finale. | 141 |
| 3.8.4.1 | Principe de la détermination de la teneur résiduel en TBA par CPG. | 142 |
| 3.8.4.2 | Taux de solvant résiduel final. | 144 |
| 3.9 | Conclusions. | 145 |
| 4. | Modélisation de l'étape de sublimation avec Comsol Multiphysics. | 148 |
| 4.1 | Modèles existants. | 148 |
| 4.2 | Modélisation sous Comsol. | 149 |
| 4.2.1. | Comsol en quelques mots. | 149 |
| 4.2.2. | Méthode de résolution générale sous Comsol. | 150 |
| 4.2.3. | Implémentation du modèle de sublimation sous Comsol. | 151 |
| 4.2.3.1 | Définition du modèle. | 151 |
| 4.2.3.2 | Construction de la géométrie. | 154 |
| 4.2.3.3 | Maillage de la géométrie. | 154 |
| 4.2.3.4 | Propriétés du sous-domaine 1 et des frontières. | 155 |

| | | |
|----------------------------------|--|------------|
| 4.2.3.5 | Résolution numérique du problème..... | 156 |
| 4.2.4. | Résultats de la modélisation..... | 156 |
| 4.2.5. | Validation du modèle de sublimation pour $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c=6 \text{ Pa}$ | 159 |
| 4.2.6. | Validation du modèle pour le Design Space de l'eutectique A..... | 160 |
| 4.2.6.1 | Validation du modèle pour $P_c=6 \text{ Pa}=\text{cte}$ et différentes valeurs de T_{shelf} . | 161 |
| 4.2.6.2 | Validation du modèle pour $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et différentes valeurs de P_c | 164 |
| 4.2.6.3 | Influence de la valeur de l'écart de température initial ΔT sur la vitesse du front de sublimation. | 166 |
| 4.3 | Conclusions | 166 |
| CONCLUSION GENERALE | | 168 |

INTRODUCTION

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer principalement par sublimation, la majeure partie du solvant contenu dans un produit. Par abaissement de l'activité du solvant, les vitesses de réactions chimiques ou biochimiques peuvent alors être fortement ralenties et, par conséquent, une conservation à long terme du produit est possible. Dans leur grande majorité, les formulations pharmaceutiques destinées à être lyophilisées sont des solutions aqueuses. Dans ce cas, l'eau est typiquement le seul solvant qui doit être éliminé par sublimation puis par désorption. Cependant, il existe des cas où la lyophilisation à partir d'un solvant organique ou d'un mélange d'eau et de co-solvant organique présente de nombreux avantages par rapport à la lyophilisation à partir d'un milieu aqueux, notamment lorsque le principe actif (PA) destiné à être stabilisé est quasi insoluble dans l'eau. Le système de co-solvant organique qui a été le plus largement étudié est certainement le système tert-butanol + eau. Teagarden et Baker (2002) ont passé en revue les différents travaux de recherches qui ont utilisé ce mélange (tert-butanol + eau) en présentant en détails ses différents avantages et ses inconvénients. Les principaux avantages à l'utilisation du système tert-butanol + eau sont l'augmentation de la solubilité du produit, l'augmentation de la vitesse de sublimation et, par conséquent, la diminution du temps de séchage et une amélioration des propriétés de reconstitution.

La première partie de la thèse fait suite aux travaux de thèse de Rim Daoussi et al. (2009) qui ont étudié la lyophilisation d'un principe actif pharmaceutique fourni par Sanofi Montpellier à l'aide du mélange eutectique à 90% de TBA (co-solvant) + 10% d'eau (% massique). Pour cette composition eutectique, ces auteurs ont observé des cinétiques de séchage très rapides et, par conséquent, une forte diminution de la durée de l'étape de sublimation. Afin d'expliquer la diminution des temps de séchage, les données thermodynamiques telles que les pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur et l'enthalpie de sublimation ont été déterminées expérimentalement par ces mêmes auteurs [Bogdani et al., 2011]. Ces données thermodynamiques absentes dans la littérature sont des données clef pour la modélisation des vitesses de sublimation et donc des temps de séchage. La détermination expérimentale de ces données thermodynamiques a été effectuée par deux méthodes différentes. Une méthode de détermination classique appelée la méthode Statique et une **nouvelle méthode originale : la méthode Thermogravimétrique**. L'utilisation de la méthode Thermogravimétrique, comme technique rapide de détermination de ces données thermodynamiques a été implémentée pour des corps liquides et solides purs. De plus, cette méthode a aussi été validée pour les mélanges particuliers qui présentent une composition azéotropique/eutectique comme c'est le cas du système à 90% de TBA +10 % d'eau [Bogdani et al., 2011].

Dans toutes les études utilisant le TBA comme co-solvant, seule la formulation organique a pu être étudiée, puisque, du fait de la faible solubilité des PA dans l'eau la formulation aqueuse n'a pas pu être réalisée. Ainsi la deuxième partie de notre travail de recherche a consisté, dans un premier temps, à choisir un principe actif modèle insoluble dans l'eau qui a

pu être formulé avec une solution à base aqueuse. Ce **principe actif modèle est l'ibuprofène** (solubilité dans l'eau < 1mg/ml). Le produit commercial lyophilisé à partir d'une **base aqueuse** (CALDOLOR) est utilisé par les hôpitaux et administré par injection intraveineuse. La formulation aqueuse (1g) comporte 100 mg d'ibuprofène et de l'arginine avec un ratio molaire ibuprofène/arginine 1/1. L'ajout d'arginine augmente drastiquement la solubilité de l'ibuprofène dans l'eau et rend ainsi possible la lyophilisation avec une formulation à base aqueuse. Dans un deuxième temps, une formulation organique (tert-butanol + eau) de l'ibuprofène a été réalisée. Cette **formulation organique** respecte le ratio molaire ibuprofène/arginine 1/1 et a été réalisée à partir du mélange à 20% de tert-butanol + 80% d'eau (% massique). Une étude comparative approfondie a pu être effectuée à différents stades de la fabrication de l'ibuprofène lyophilisé pour les deux formulations étudiées. Ainsi **l'étude comparative** a été menée sur l'étape de **formulation**, sur **le procédé de lyophilisation** (congélation, sublimation, désorption) et sur les **propriétés finales** du produit (humidité, réhydratabilité, aspect, couleur). Par ailleurs, l'optimisation des paramètres opératoires de l'étape de sublimation de l'ibuprofène à base organique a été aussi effectuée par la méthodologie du **Design Space**.

Dans le procédé de lyophilisation, l'étape de sublimation est l'étape la plus longue et la plus consommatrice d'énergie. On peut rencontrer dans l'industrie pharmaceutique des cycles de lyophilisation de l'ordre de 130 heures ce qui représente un coût énorme en énergie et, de plus ceci limite surtout la productivité du site. Ainsi une des solutions pour augmenter cette productivité et ainsi répondre à la demande croissante de produits pharmaceutiques lyophilisés, est d'investir dans l'achat de nouveaux lyophilisateurs afin d'augmenter la capacité de production. Cependant ces investissements sont lourds et viennent augmenter le coût du procédé de lyophilisation. La deuxième solution pour augmenter cette productivité est d'optimiser la durée du cycle de sublimation, durée qui n'est pas souvent optimisée dans l'industrie. En effet, l'optimisation de l'étape de sublimation demande une étude approfondie de tous les facteurs qui peuvent influencer la durée de ce cycle. Il paraît donc évident que la l'étude expérimentale et la modélisation de l'étape de sublimation représente un enjeu majeur pour les industriels en vue de l'augmentation de la productivité tout en maintenant les nombreux facteurs de qualité du lyophilisat final. Afin de réduire les coûts souvent importants de recherche et développement au stade du pilote, dans la dernière partie de la thèse nous avons simulé et **modélisé** sous **Comsol cette étape essentielle de sublimation**. Cette modélisation physique basée principalement sur l'hypothèse d'une sublimation limitée par le transfert thermique a permis d'estimer et de visualiser, pour des conditions opératoires T_{shelf} et P_c fixées, l'avancement du front de sublimation en fonction du temps et la durée totale de cette étape clef.

CHAPITRE 1

BIBLIOGRAPHIE

1. Bibliographie.

Ce travail bibliographique permet de poser les bases de la lyophilisation des produits pharmaceutiques. Après un rappel des principes de la lyophilisation, nous présenterons les paramètres clés du procédé ainsi que les mécanismes de transferts de matière et chaleur, habituellement retenus pour l'analyse et la compréhension des nombreux processus élémentaires rencontrés. Une grande partie de ce travail bibliographique est consacrée à la lyophilisation des produits pharmaceutiques en milieu organique qui est le sujet même de la thèse.

1.1 Principe de la lyophilisation.

La lyophilisation appelée autrefois cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer principalement par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit. Par abaissement de l'activité de l'eau, les vitesses de réactions chimiques ou biochimiques peuvent alors être fortement ralenties. Par conséquent, une conservation à long terme du produit est possible.

Cette technique s'avère la plus adaptée, et parfois la seule possible, pour les produits sensibles à la chaleur tels que les produits pharmaceutiques (le plasma, les vaccins, les sérums, les antibiotiques, les hormones, les vitamines, les préparations enzymatiques, etc.). De plus, cette technologie conduit à un lyophilisat (produit sec) sous forme de poudre microporeuse et hygroscopique dont la réhydratation est quasi-instantanée. La lyophilisation s'est largement développée pendant et après la seconde guerre mondiale dans le domaine des produits sanguins ainsi que dans l'industrie alimentaire (café). Elle s'est ensuite étendue aux produits pharmaceutiques car c'est le plus souvent la meilleure méthode - voire la seule - pour stabiliser et conserver les produits chimiques ou biologiques thermolabiles qui présentent des risques de détérioration à la chaleur. Les lyophilisats peuvent être d'usage parentéral (injecté à l'homme), oral, ophtalmologique ou encore à la base des réactifs utilisés dans les kits de diagnostic de certaines maladies.

Le procédé de lyophilisation est composé de 3 étapes principales, successives et indissociables [Wang 2000] :

- La congélation qui transforme l'eau libre en cristaux de glaces ;
- La dessiccation primaire (sublimation) qui permet de sublimer les cristaux de glace formés ;
- La dessiccation secondaire (désorption) qui élimine l'eau liée et non congelée adsorbée à la surface des pores de la matière sèche ou incluse dans la masse du lyophilisat.

La figure 1.1 ci-dessous schématise le procédé de lyophilisation dans le diagramme d'état de l'eau pure. A partir de l'étape de congélation (trajet A) qui se déroule généralement à pression atmosphérique, il sera donc nécessaire en premier lieu d'abaisser la pression de vapeur d'eau dans l'enceinte au-dessous du point triple (trajet B). Puis la glace est sublimée en maintenant la température de celle-ci inférieure à sa température de fusion (trajet C).

La zone de sublimation correspond donc à la zone des basses pressions de vapeur d'eau et des faibles températures, en dessous du point triple de l'eau (610 Pa ; 0,01°C). Dans le cas où un soluté est dissous dans l'eau, les courbes délimitant chacune des phases dans le diagramme d'état (lnP, T) sont légèrement décalées [Marin et René 2008]. En effet, les solutés induisent un abaissement cryoscopique qui correspond à une diminution de la température de congélation commençante ce qui déplace les coordonnées du point triple (P, T) par rapport à celle du solvant pur (eau pure).

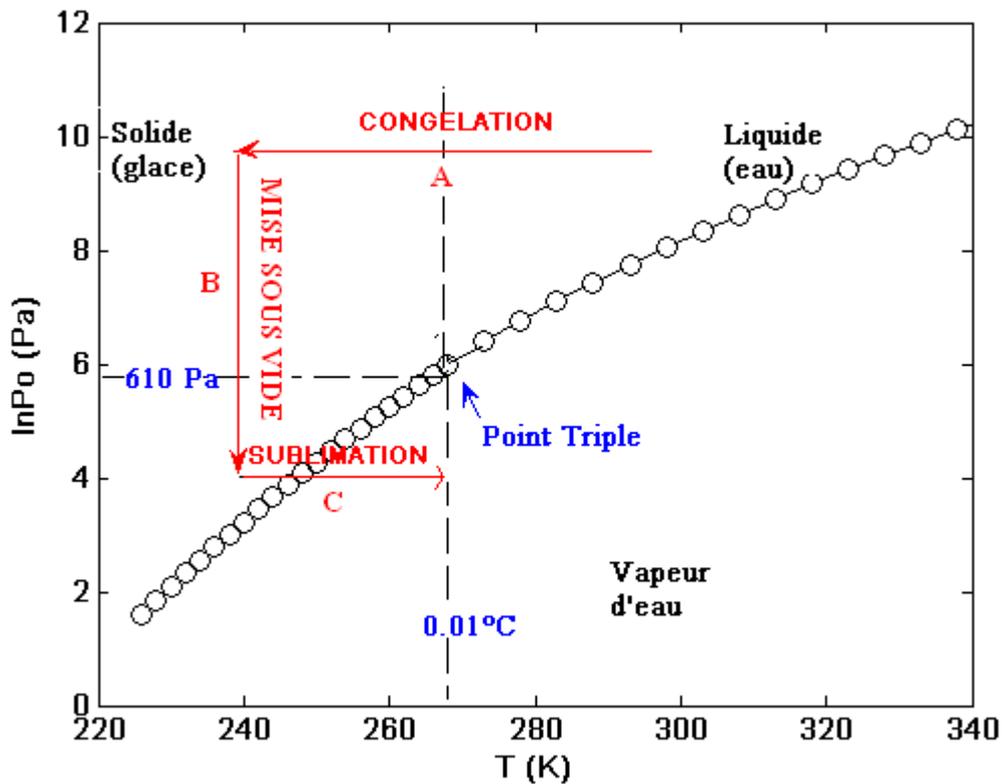


Figure 1.1 : Diagramme d'état de l'eau pure.

L'abaissement cryoscopique pour une solution très diluée est défini selon la loi de Raoult [Franks 1985] :

$$\Delta T_f = \frac{k_w C}{M_s} \quad (\text{Eq 1-1})$$

- ΔT_f : abaissement cryoscopique (K)
- k_w : constante cryoscopique de l'eau (K.kg de solvant/ kmol)
- C : concentration (kg de soluté/kg de solvant)
- M_s : masse molaire du soluté (kg/kmol)

Le schéma ci-dessous illustre l'évolution des températures et de la teneur en eau lors des 3 étapes de lyophilisation.

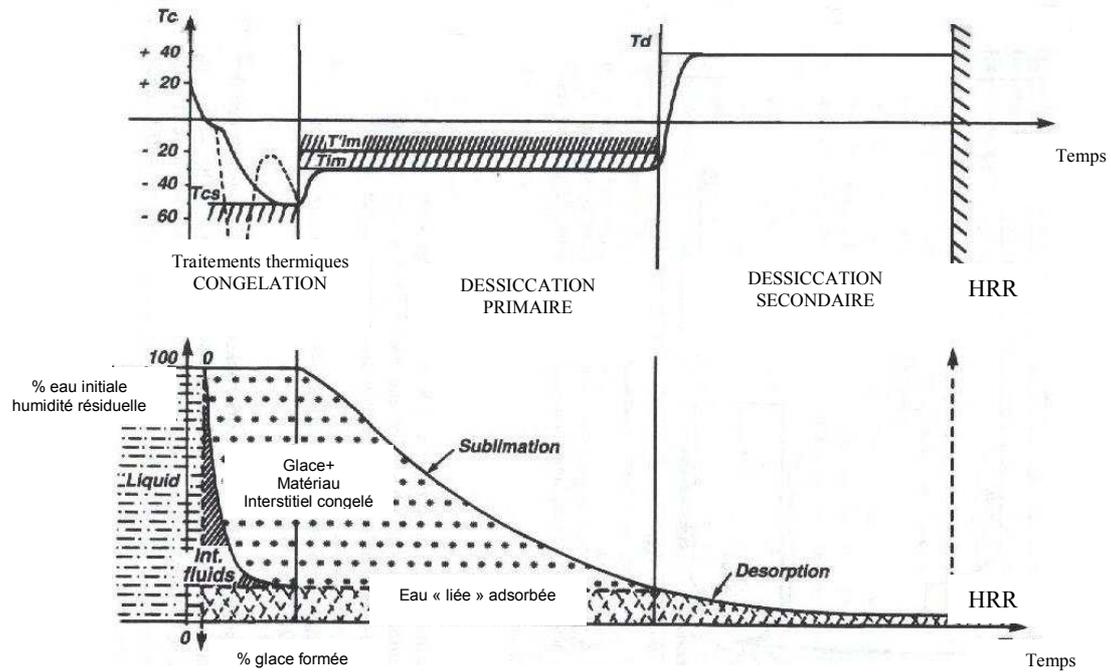


Figure 1.2 : Evolution schématique de la température et de la teneur en eau au cours du procédé de lyophilisation selon [REY 1999]

- Tcs : température maximale de solidification complète (°C)
- Tim : température minimale de fusion commençante (°C)
- T'im : limite absolue de la température (°C)
- Td : température maximale pour le lyophilisat (°C)
- HRR : humidité résiduelle requise (%)

1.2 Le lyophilisateur.

En général, un lyophilisateur est composé de deux parties [Oetjen et Haseley 2004, Pikal 2002] : une chambre de lyophilisation avec des étagères à température contrôlée par le fluide caloporteur (sublimation) ou réfrigérant (congélation) et un condenseur pour séparer la vapeur d'eau à des températures très basses variant entre -50°C et -80°C (cf. figure 1.3). Les deux chambres sont reliées par un tube de gros diamètre pour assurer le passage de la vapeur d'eau, tube parfois équipé d'une vanne à fermeture rapide. Une pompe à vide ou plusieurs en série sont présentes afin d'assurer le vide dans tout le système. Le produit à lyophiliser (principe actif) est introduit sous forme de solution aqueuse dans des flacons spécialement conçus pour la lyophilisation. Les flacons sont posés sur les différentes étagères et sont munis de bouchons qui permettent le passage de la vapeur d'eau de l'intérieur du flacon vers la chambre de lyophilisation. Puis, l'eau qui est sublimée durant la phase de dessiccation primaire, est condensée sur les parois froides du condenseur dans la chambre de condensation.

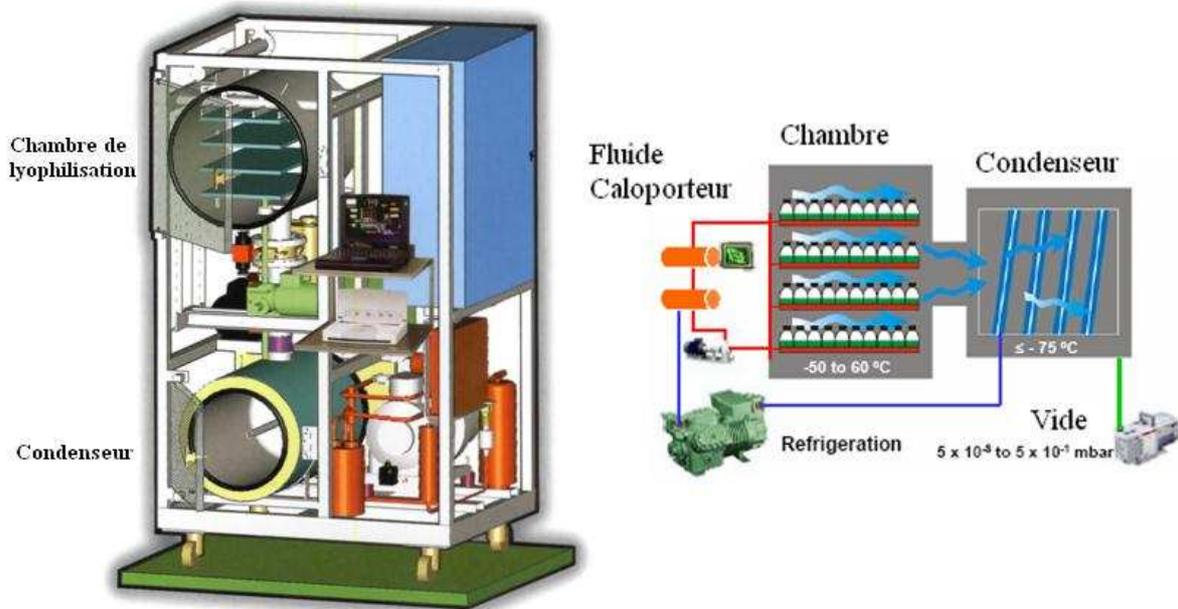


Figure 1.3 : Lyophilisateur pilote SMH 45 USIFROID (Lagep).

Plusieurs variables opératoires (température d'étagère, pression de la chambre, vitesse de congélation) sont à déterminer précisément afin d'assurer les bonnes propriétés d'usage du produit lyophilisé appelé lyophilisat (porosité, aspect, couleur, etc). Cet aspect sera développé en détail dans la suite de la partie bibliographique.

1.3 Les étapes de lyophilisation.

1.3.1. La congélation.

1.3.1.1 Cristallisation de la glace. Notion de surfusion.

La congélation représente la première étape de la lyophilisation. En pratique, lors du refroidissement d'une solution aqueuse, l'eau reste à l'état liquide jusqu'à des températures bien inférieures à la température d'équilibre thermodynamique de cristallisation de l'eau, jusqu'à des valeurs avoisinant les -15 °C . Ce phénomène est appelé surfusion et le degré de surfusion est défini comme l'écart entre la température de fusion à l'équilibre thermodynamique (T_f) et la température à laquelle il y a apparition spontanée des premiers cristaux de glace (nucléus), notée T_{sN} (figure 1.4).

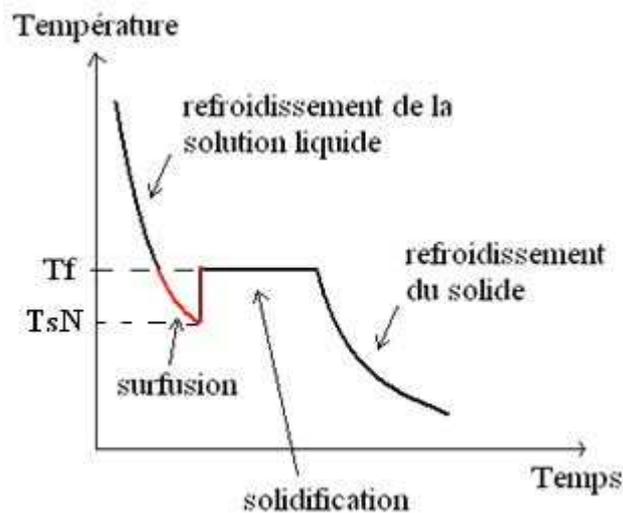


Figure 1.4 : Mise en évidence du phénomène de surfusion

La cristallisation de la glace est un phénomène fortement exothermique, qui s'accompagne d'une remontée en température du produit (figure 1.4). Dans la solution aqueuse, la formation des premiers cristaux de glace induit la cryoconcentration des solutés au sein d'une phase de plus en plus visqueuse, jusqu'à la solidification totale (cristalline ou amorphe) de cette phase, aussi appelée 'matrice'. Le degré de surfusion est très important car il détermine la morphologie des cristaux de glace (forme, taille, nombre) et, par conséquent, la texture (taille, forme) des pores du lyophilisat. Un grand degré de surfusion (congélation rapide) aura pour conséquence la formation d'un grand nombre de cristaux de petite taille [Pikal 2002]. Ceci a une conséquence directe sur l'étape de sublimation. En effet, une faible porosité de la matrice amènera une limitation du transfert de masse de la vapeur d'eau et donc conduira à des temps de sublimation très importants. Pikal (2002) préconise une surfusion modérée et uniforme dans l'ensemble de la solution sous-refroidie ainsi qu'une vitesse de croissance rapide des cristaux. Ainsi le protocole optimal de congélation consiste tout d'abord à refroidir la solution à -5 °C puis de la laisser reposer pendant 15 à 30 minutes, avant de la soumettre enfin à une

rampe de refroidissement dite modérée de 1°C/min jusqu'à -45 °C. De manière générale, la taille des cristaux est inversement proportionnelle au degré de surfusion [Searles et al., 2001]. Un trop faible degré de surfusion peut conduire à la formation de gros cristaux de glace. Ceci aura pour conséquence une diminution de la surface spécifique des pores du lyophilisat donc à une diminution de la vitesse de réhydratation de ce dernier. Il faut donc trouver un compromis entre un temps de sublimation le plus court possible (coûts opératoires) et une réhydratation rapide du produit lyophilisé.

1.3.1.2 Etat cristallin ou amorphe.

Lors de la l'étape de congélation, la croissance des cristaux de glace de proche en proche, épuise le liquide de la phase interstitielle avoisinante (cryoconcentrat) qui devient de plus en plus concentrée en soluté et pauvre en eau [Daoussi 2008]. L'augmentation de la concentration des solutés a pour conséquence une augmentation rapide de la viscosité, freinant ainsi le phénomène de cristallisation de la glace jusqu'à l'empêcher complètement [Chouvenc 2004]. Cette solution viscoélastique peut alors se transformer soit en un solide cristallin soit en un solide amorphe. Dans le premier cas, le composé cristallin, ayant la solubilité la plus faible, forme avec les cristaux de glace un mélange solide. La température augmente jusqu'à la température de cristallisation de l'eutectique (T_{eut}) comme le montre la figure 1.5 pour le système chlorure de sodium/eau. L'eutectique est défini comme étant un mélange de deux ou plusieurs composés cristallins solides présentant certaines propriétés physiques identiques à celles d'un corps pur, [Nail et Gatlin 1993, Gieseler 2004].

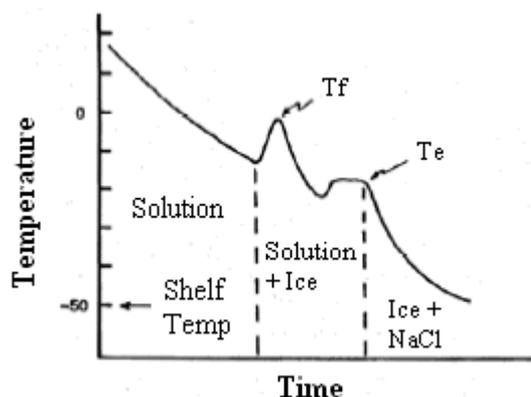


Figure 1.5 : Profil thermique lors de la congélation d'un système cristallin eau/chlorure de sodium [Nail et Gatlin 1993].

Lorsque la solution concentrée atteint des viscosités de l'ordre de 10^{12} à 10^{14} Pa.s, elle est alors à l'état vitreux [Roos et Karel 1993, Roos 1995]. Cette transition progressive intervient autour d'une température dite 'température de transition vitreuse' notée T_g . La structure amorphe obtenue appelée verre se situe sur le plan microscopique entre l'état liquide et l'état cristallin car elle correspond à la prise en masse d'un liquide, sans changement d'état au sens

thermodynamique du terme ou au niveau de l'organisation moléculaire (sans formation de cristaux)

La figure 1.6 décrit le profil thermique lors de la congélation d'un système amorphe.

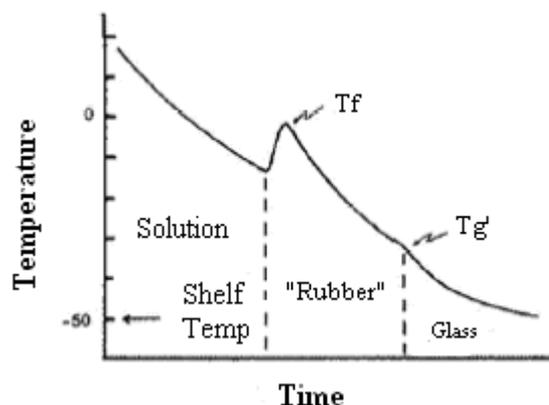


Figure 1.6 : Profil thermique lors de la congélation d'un système amorphe [Nail et Gatlin 1993].

1.3.1.3 Intérêt de l'état amorphe pour la lyophilisation.

De nombreuses études de solubilité menées avec différents principes actifs pharmaceutiques (PA) ont mis en évidence la potentialité de la phase amorphe en terme d'amélioration de la vitesse de dissolution [Daoussi 2008]. L'une des premières études rapportée dans la littérature en 1960 concerne la novobiocine. Cet antibiotique destiné à traiter les staphylocoques est insoluble dans l'eau à l'état cristallin. Mullins et Macek (1960) ont pu montrer que l'absorption est bien meilleure lorsque la novobiocine est amorphe car sa solubilité est alors multipliée par un facteur 10. Des études comparatives de solubilité des phases amorphes et des phases cristallines correspondantes ont été effectuées également pour l'indométacine [Imaizumi et al., 1980], la céfalexine [Egawa et al., 1992]. Dans chaque cas, ces études ont permis d'observer une meilleure solubilité de la phase amorphe vis-à-vis de la phase cristalline.

L'autre grand intérêt de l'état amorphe est que sur le plan cinétique le 'verre' est considérée comme une structure stable sur des périodes de temps de l'ordre de grandeur de la durée du procédé [Papon et Leblond 1990]. Les mouvements moléculaires et toute réaction chimique ou biologique sont stoppés ou du moins considérablement ralentis, empêchant ainsi la dégradation du produit.

1.3.1.4 Cristallisation des excipients.

Les excipients sont les composés de la formulation du médicament autres que le principe actif (PA). Ils sont utilisés comme stabilisateur, comme tampon, ou pour donner des caractéristiques spécifiques au médicament comme le goût ou la couleur [Pikal 2002]. Les agents stabilisateurs intervenant lors de l'étape de congélation sont appelés 'cryoprotecteurs' tandis que ceux qui interviennent pendant l'étape de dessiccation sont appelés lyoprotecteurs.

En général, les grosses molécules telles que les protéines (soluté) ont tendance à rester à l'état amorphe, mais d'autres composés de la formulation (excipients) peuvent cristalliser. Cette cristallisation est favorisée par une concentration élevée et par une faible vitesse de congélation [Tang et Pikal 2004]. Etant donné que les protéines sont assez sensibles aux changements de pH et qu'elles ne sont stables que dans des domaines relativement étroits, il est important d'éviter la cristallisation des tampons au cours de l'étape de congélation.

Le phosphate de sodium est un tampon qui montre des changements de pH pendant la congélation [Gomez et al., 2001], tandis que le citrate maintient un pH constant. Anchordoquy et Carpenter (1996) ont observé des changements de pH variant entre 7,5 et 4,5 lors de la congélation d'une solution de la protéine LDH due à une cristallisation sélective du Na_2HPO_4 (le tampon), conduisant à une agrégation massive de la protéine. Sarciaux et al. 1998 ont observé que les solutions de l'IgG d'origine humaine et bovine, congelées en présence de phosphate de potassium s'agrègent moins qu'en présence de phosphate de sodium. Il est donc indispensable que les tampons restent sous forme amorphe pendant la congélation des protéines sensibles aux variations de pH, ce qui peut être atteint avec des vitesses de congélation rapide [Wang 2000]. L'étape de congélation influence également la cristallisation et le polymorphisme du produit à lyophiliser tel que le mannitol [Hsu et al., 1996]. La cristallisation de la formulation est favorisée par l'ajout de mannitol en tant qu'excipient [Pikal 2002]. Cet excipient n'est pas utilisé pour stabiliser la protéine mais en raison d'autres avantages notamment l'augmentation de la température eutectique et, par conséquent la possibilité d'une sublimation à une température plus élevée conduisant à des temps de séchage plus courts.

La température de transition vitreuse de la formulation, notée T'_g , peut être déterminée de manière empirique par la relation de Fox [Pikal 2002] :

$$\frac{1}{Tg_{mél}} = \frac{w_1}{Tg_1} + \frac{w_2}{Tg_2} \quad (\text{Eq 1-2})$$

Où w_1 et w_2 représentent respectivement les fractions massiques du soluté (PA) et de l'excipient.

La température de transition vitreuse (T'_g) peut être déterminée expérimentalement par une méthode calorimétrique telle que l'analyse thermique différentielle en mesurant la variation de la chaleur spécifique, ou par analyse thermomécanique en suivant la variation de viscosité du milieu [Marin et René 2008].

1.3.2. La Sublimation.

1.3.2.1 Importance de la température de transition vitreuse, T'_g .

La température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée maximale, notée T'_g , est un paramètre très important dans l'optimisation du procédé de lyophilisation [Franks 1990], [Pikal 2002]. Elle correspond au point de transition de phase entre un état liquide

(viscoélastique) et une phase solide amorphe (verre), au maximum de concentration en soluté (figure 1.7). On utilise la notation T_g pour représenter la température de transition vitreuse d'un produit en l'absence de glace et la notation T'_g pour désigner la température de transition vitreuse d'une phase amorphe coexistant avec de la glace [Chouvenc 2004].

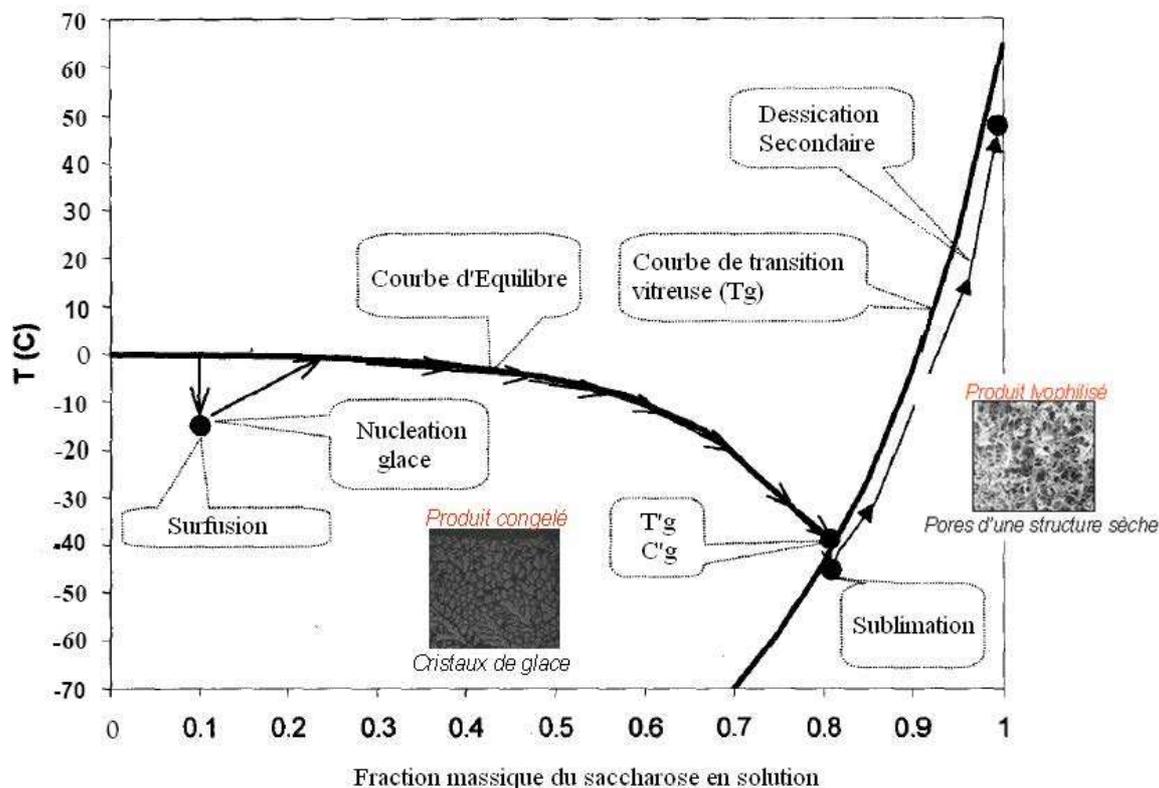


Figure 1.7 : Lyophilisation d'une solution aqueuse de saccharose 10% (massique).

La figure 1.7 ci-dessus met en évidence que par refroidissement de la solution, lorsque la température de nucléation spontanée de la glace est atteinte, les premiers nucléi apparaissent. Puis la croissance des cristaux de glace se déroule de proche en proche ce qui conduit à l'appauvrissement du milieu en eau. La phase interstitielle atteint sa concentration maximale en soluté (C'_g) et à la température T'_g , et cette phase se vitrifie. Seule la fraction d'eau qui a cristallisé subira l'étape de sublimation. Cette étape consiste à placer le produit dans une atmosphère dans laquelle la pression partielle de vapeur d'eau est inférieure à la pression de vapeur saturante de la glace, tout en lui apportant suffisamment d'énergie (contact avec l'étagère, rayonnement) pour entretenir la sublimation de la glace. Pour que le produit ne subisse pas de dégradation, il faut maintenir la température de celui-ci en dessous de la température T eutectique pour un système cristallin ou de T'_g (figure 1.7) pour un système amorphe. Pour maintenir une température constante de sublimation, on doit fournir une quantité d'énergie égale à la chaleur latente de sublimation de la glace soit 2809J/g de glace [Pikal 2002]. La température moyenne du produit et en particulier celle du front de sublimation résultera d'un équilibre entre les transferts couplés d'énergie et de matière au sein du produit. Nous détaillerons ces aspects dans les paragraphes suivants.

1.3.2.2 La température de collapse T_c .

Le collapse ou effondrement de la structure de la zone sèche se produit pendant l'étape de dessiccation primaire (sublimation) lorsque la température du produit est suffisamment élevée pour induire un écoulement visqueux au sein de la matrice sèche. N'étant plus maintenue et rigidifiée par les cristaux de glaces, la couche sèche poreuse perd sa structure mécanique indispensable pour obtenir de bonnes propriétés de réhydratation et de stockage (teneur final en solvant). On observe ce phénomène lorsque la température du produit dépasse une certaine valeur critique appelé température de collapse notée T_c [Pikal 2002]. La température de transition vitreuse T'_g et la température de collapse T_c sont généralement très proches [Pikal et Shah 1990, Wang 2000], la valeur T'_g étant légèrement inférieure à T_c pour les petites molécules de carbohydrates [Sun 1997] et les polysaccharides [Roos et Karel 1991]. Afin d'éviter le collapse, Pikal (2002) préconise de toujours se maintenir, pendant l'étape de sublimation, à une température du produit inférieure à T'_g .

1.3.2.3 Transfert de masse pendant la phase de sublimation.

Le front de sublimation se déplace de haut en bas du flacon. Le transfert de la vapeur d'eau à partir du front de sublimation jusqu'au condenseur appelé aussi transfert de masse est limité par plusieurs résistances en séries qui sont [Pikal 2002] :

- la résistance de la couche sèche, notée (R_p)
- la résistance du goulot du flacon et du bouchon partiellement fermé, notée (R_s)
- La résistance liée à la distance parcourue par les molécules d'eau ou de solvant à travers, la chambre de lyophilisation, le tube de connexion et la chambre de condensation [Nail et Gatlin 1993, Pikal 2002], notée R_c .

Les différentes résistances sont schématisées sur la figure 1.8. La plus grande résistance et celle due à la couche de matière sèche, que les molécules de vapeur d'eau traversent après sublimation des cristaux de glace pour venir se piéger au condenseur [Nail et Gatlin 1993]

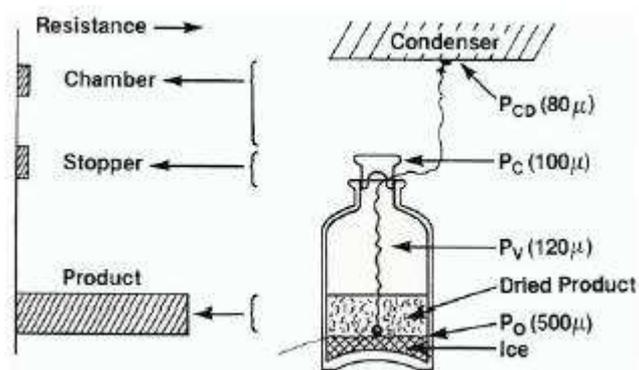


Figure 1.8 : Transfert de masse durant la phase de sublimation. Schématisation des résistances au transfert de chaleur (en $\mu\text{m Hg}$), [Pikal 1985].

a. Résistance de la couche sèche R_p .

Deux forces motrices président pour l'essentiel au transport de la vapeur d'eau au travers de la couche sèche poreuse, depuis le front de sublimation où elle est générée jusqu'à la surface supérieure de la couche sèche du produit : une différence de pression totale et une différence de pression partielle de vapeur d'eau [Marin et René 2008]. Le régime d'écoulement de la vapeur d'eau à travers la couche sèche du produit est caractérisé par le nombre de Knudsen, noté Kn. Ce nombre traduit l'importance relative du choc des molécules entre elles devant les chocs molécules-paroi des pores. Kn peut être déterminé par la relation

suivante $Kn = \frac{\bar{l}}{\bar{d}_p}$ ou \bar{l} et \bar{d}_p représentent respectivement le libre parcours moyen d'une

molécule de gaz et le diamètre équivalent moyen des pores.

Pour les conditions standard de lyophilisation des produits pharmaceutiques thermosensibles c'est-à-dire pour des pressions opératoires comprises entre 5 et 50 Pa et des diamètres de pores de la matrice sèche entre 30 et 100 μm , Kn est généralement supérieur à 10 [Obert 2001] si bien que le transfert de matière de la vapeur d'eau se fait en régime de Knudsen ($Kn > 2$).

La théorie cinétique des gaz permet alors d'estimer la diffusivité de la vapeur d'eau à travers la couche sèche de la matrice, diffusivité dite de Knudsen et noté D_K (m^2/s) (Chouvenec 2004) :

$$D_K = \frac{1}{3} \cdot \bar{d}_p \cdot \sqrt{\frac{8RT}{\pi M_{H_2O}}} \quad (\text{Eq 1-3})$$

La diffusivité effective en milieu poreux notée $D_{K,e}$ s'obtient à l'aide d'un facteur de forme correspondant au rapport de la porosité (ϵ) sur la tortuosité (τ) de la matrice poreuse :

$$D_{K,e} = D_K \times f \quad (\text{Eq 1-4})$$

avec f égal à ϵ/τ .

On peut exprimer la résistance R_p en fonction du débit massique de vapeur d'eau par l'équation (1-5), [Pikal et al., 1983]. (Voir figure 1.7).

$$R_p = \frac{P_0 - x_l^v P_v}{\dot{m}} \quad (\text{Eq 1-5})$$

R_p résistance de la couche sèche (Pa.s/kg)

P_v pression totale dans le flacon (Pa)

\dot{m} débit massique de sublimation (kg/s)

P_0 pression de vapeur d'équilibre de la glace à l'interface de sublimation (Pa)

x_l^v fraction molaire de vapeur d'eau dans le flacon. Généralement l'eau étant le solvant majoritaire on considère $=1$.

En combinant les équations, (1-3), (1-4) et (1-5) il est possible alors d'exprimer la valeur de R_p en fonction de la diffusivité effective du solvant dans les pores, notée $D_{K,e}$, par l'équation (1-6) :

$$R_p = \frac{e_{c,s} \times RT}{D_{k,e} \times A_s \times M_{H_2O}} \quad (\text{Eq 1-6})$$

R_p résistance de la couche sèche (Pa.s/kg)
 A_s surface de sublimation d'un flacon égale à la surface de la section droite interne de ce dernier (m²)
 $e_{c,s}$ épaisseur de la couche sèche (m)
 M_{H_2O} masse molaire de l'eau (kg/mol)
 T température du produit (K)

Note : On peut utiliser dans les différentes équations une résistance normalisée $\hat{R}_p = A_s \cdot R_p$
 Avec \hat{R}_p en (Pa.m².s/kg)

Pikal et al. (1983) ont observé que la résistance du produit augmente avec l'épaisseur de la couche sèche, mais pas toujours de façon proportionnelle, comme indiqué sur la figure 1.9

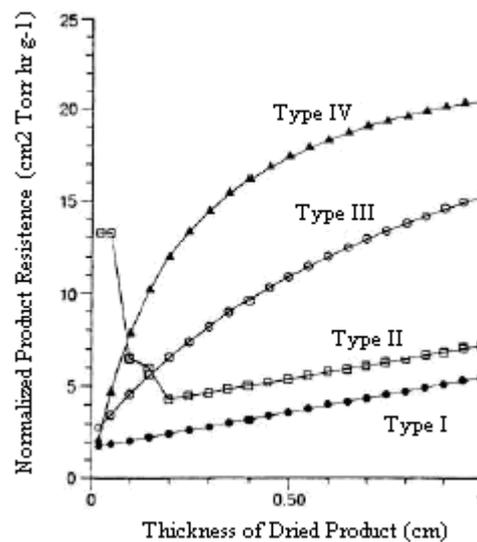


Figure 1.9 : Variation de la résistance normalisée de la couche sèche avec l'épaisseur du produit sec pour différents systèmes : Type I (5% povidone à -26°C), type II (22.8% povidone - 26°C), type III (5% chlorure de potassium à -30°C), type IV (10% chlorure de potassium à -30°C), [Pikal 2002].

Pikal (2003) a identifié un exemple d'hétérogénéité extrême sur la structure du gâteau (type II) dans le cas d'un système amorphe. On distingue dans ce cas une résistance initiale élevée due à la formation à la surface de la couche sèche d'une croûte relativement imperméable, qui après désorption de l'eau non congelée, produit des fissures, et, par conséquent, une diminution effective de la résistance au transfert de masse de la vapeur d'eau. Cette résistance

de la couche sèche augmente aussi comme le montre la figure 1.9 avec la concentration en soluté et diminue généralement lorsque la température du produit s'approche de la température eutectique ou de la température de transition vitreuse de la phase cryoconcentrée au maximum, notée T'_g .

b. Résistance globale au transfert de matière, R_T .

La résistance globale au transfert de matière (R_T) est exprimée comme la somme des 3 résistances en série allant du front de sublimation jusqu'au condenseur (cf. figure 1.7).

$$R_T = R_p + R_s + R_c \quad (\text{Eq 1-8})$$

Avec R_s (Pa.s/kg) la résistance du bouchon définie par l'équation (1-9), [Pikal et al., 1983].

$$R_s = \frac{P_v - P_c}{\dot{m}} \quad (\text{Eq 1-9})$$

Et R_c la résistance due au passage des vapeurs de la chambre au condenseur exprimé par la relation :

$$R_c = \frac{P_c - P_{cd}}{\dot{m}} \quad (\text{Eq 1-10})$$

P_c pression totale de la chambre de lyophilisation (Pa)
 P_{cd} pression de vapeur d'équilibre de la glace au niveau du condenseur (Pa)

Ainsi le transfert de matière est relié à la résistance globale par l'équation (1-11) :

$$\dot{m} = \frac{P_0 - P_{cd}}{R_T} \quad (\text{Eq 1-11})$$

Cependant, dans la majorité des cas, les résistances R_s et R_c peuvent être négligées devant R_p . Ce qui a pour conséquence d'admettre que la valeur de la résistance globale sera quasi égale à la résistance de la couche sèche. De plus, en considérant que la pression de la vapeur d'eau dans le flacon est sensiblement égale à la pression de la chambre de lyophilisation, le débit massique de sublimation peut s'exprimer par l'équation (1-12) :

$$\dot{m} = \frac{P_0 - P_c}{R_p} \quad (\text{Eq 1-12})$$

\dot{m} débit massique de sublimation (kg/s)
 P_0 pression de vapeur d'équilibre de la glace à l'interface de sublimation (Pa)
 P_c la pression totale dans chambre de lyophilisation (Pa)
 R_p résistance de la couche sèche (Pa.s/kg)

1.3.2.4 Transfert de chaleur pendant la phase de sublimation.

a. Transfert de chaleur externe.

La chaleur transmise au produit à travers le flacon par l'extérieur de celui-ci résulte de plusieurs mécanismes élémentaires de transfert de chaleur. Le flacon est entreposé entre deux étagères. Le fond du flacon est en contact direct avec l'étagère comme le montre la figure 1.10. Une partie du flux est transmise par conduction, par contact direct entre l'étagère et le fond du flacon. La majorité des flacons utilisés pour la lyophilisation présentent un fond incurvé vers l'intérieur. Il existe alors une couche de gaz entre l'étagère et le fond du flacon qui est le siège d'un gradient de température. Le transfert de chaleur se fait par conduction par l'intermédiaire des molécules de gaz entre l'étagère et le fond du flacon. L'autre mode de transfert est le rayonnement. Le produit subit à la fois le rayonnement de l'étagère supérieure, de l'étagère inférieure et des paroi de la chambre de sublimation [Pikal et al.,1983]. Une description fine et détaillée de ces trois modes de transfert a été proposée par Sheehan et Liapsis (1998).

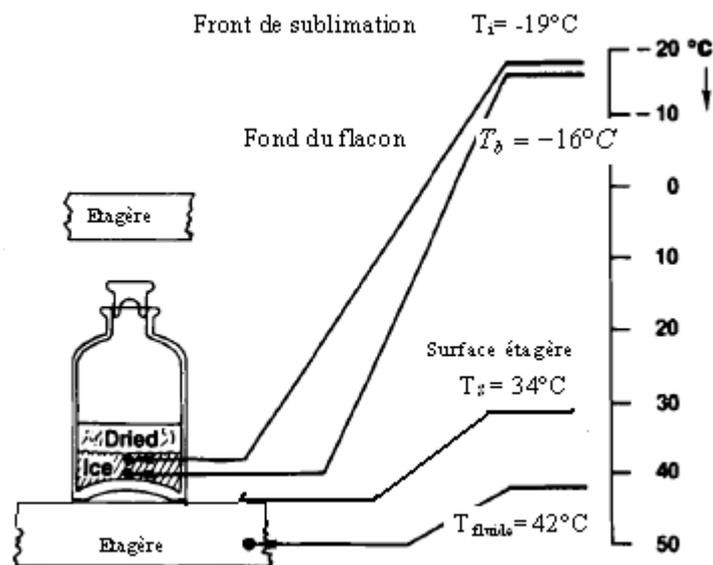


Figure 1.10 : Profil thermique type rencontré lors de la phase de sublimation [Pikal et al 1983]

Une modélisation simplifiée et globale des différents mécanismes de transfert consiste à admettre que le flux global de chaleur reçu par l'échantillon s'exprime à l'aide de la différence de température entre l'étagère et le produit au fond du flacon, et d'un coefficient global de transfert de chaleur, noté K_v ($W/m^2 K$), par la relation suivante : [Pikal et al.,1983, Kuu et al.,2006],

$$Q = A_v K_v (T_{shelf} - T_b) \quad (\text{Eq 1-13})$$

Où Q représente le flux de chaleur externe totale (W) transmis, A_v l'aire de la section du flacon calculée à partir du diamètre externe (m^2), T_{shelf} la température de l'étagère et T_b la température du produit au fond du flacon.

La résistance globale au transfert de chaleur, notée K_v , est fonction de nombreux paramètres expérimentaux, tels que la pression totale dans l'enceinte de lyophilisation, la vitesse de sublimation, le type (nature, taille et forme) du flacon ainsi que des caractéristiques géométriques et technologiques de la chambre de lyophilisation [Pikal et al.,1983, Kuu et al.,2006]. En première approximation K_v ($W/ m^2 K$) peut être décomposé en trois termes correspondant à chacun des trois mécanismes élémentaires impliquées [Pikal et al.,1983, Chouvenec 2004, Daoussi 2008], à savoir :

$$K_v = K_c + K_r + K_g \quad (\text{Eq 1-14})$$

Conduction
Contact
physique

Radiation

Conduction gaz

Où K_c représente le coefficient de transfert de chaleur par contact direct du flacon avec l'étagère, K_r le coefficient de transfert de chaleur par rayonnement entre l'ambiance et le flacon et K_g le coefficient de transfert de chaleur dû à la conduction à travers la couche de gaz présente entre l'étagère et le fond du flacon.

i. Conduction à travers la couche gazeuse entre l'étagère et le flacon

La majorité de l'énergie qui est apportée au flacon au cours de la phase de sublimation est due à l'énergie transférée par conduction à travers la couche gazeuse présente entre l'étagère et le fond du flacon. La conductivité thermique de la couche gazeuse est un paramètre important qui va déterminer la valeur de ce flux. D'après Le Neindre (2008), dans le domaine des pressions de notre étude - basses pressions comprises entre 10 et 100 Pa - la conductivité thermique de tous les gaz augmente proportionnellement à la pression. Pikal et al. (1983) définissent le coefficient K_g par la relation suivante :

$$K_g = \frac{\alpha \Lambda_0 P_c}{1 + \ell_v (\alpha \Lambda_0 / \lambda_o) P_c} \quad (\text{Eq 1-15})$$

- | P_c pression totale de la chambre de lyophilisation (Pa)
- | Λ_0 Conductivité thermique moléculaire du gaz à 0°C en ($W/m^2.Pa.K$)
- | λ_o Conductivité thermique du gaz à la température ambiante et à P_{atm} ($W/m K$)
- | ℓ_v Distance équivalente moyenne séparant l'étagère du flacon (m)

α est un coefficient adimensionnel représentant l'efficacité du transfert de chaleur. Kuu et al. (2006) expriment α par la relation suivante :

$$\alpha = \frac{a_c}{2 - a_c} \left(\frac{273,2}{T} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq 1-16})$$

Où a_c représente l'énergie d'accommodation du gaz et T la température du gaz.

L'équation (1-15) a été réécrite par Pikal (1985) et simplifiée sous la forme suivante :

$$K_g = \frac{K_p P_c}{1 + K_d P_c} \quad (\text{Eq 1-17})$$

avec $K_p = \alpha \Lambda_0$ et $K_d = \ell_v (\alpha \Lambda_0 / \lambda_o)$

ii. Transfert de chaleur par rayonnement.

Le flacon subit le rayonnement par le haut (étagère supérieure) et par le bas (étagère inférieure). Le flux de chaleur total Q_r (W) transmis par rayonnement est le résultat de la somme du flux de chaleur transmis par le haut du flacon et celui transmis par le bas du flacon.

$$Q_r = Q_r \text{ bas} + Q_r \text{ haut} \quad (\text{Eq 1-18})$$

Pikal (1983) et Kuu (2006) ont montré que l'on pouvait déterminer par approximation la valeur de K_r , si la température moyenne du produit varie de plus de 60°C, par la relation suivante :

$$K_r = 4\sigma \bar{T}^3 (e_s + e_v) \quad (\text{Eq 1-19})$$

Où σ représente la constante de Stefan, e_s et e_v représentent respectivement l'émissivité de la surface de l'étagère et l'émissivité du flacon. \bar{T} est la température moyenne du produit en Kelvin.

Il est à noter que K_r dépend de la pression totale mais il dépend surtout de la température des parois (émissivités du flacon et des parois de la chambre) et du produit, et, également de la géométrie de flacon et de la chambre.

Le flux transmis par rayonnement, notée Q_r , peut être aussi décrit de manière générale par la loi de Boltzman :

$$Q_r = \sigma \cdot A_{SC} \cdot F \cdot (T_{paroi}^4 - T_{flacon}^4) \quad (\text{Eq 1-20})$$

Où le facteur de forme F, s'exprime par la relation :

$$F = \frac{1}{1 + \left(\frac{1}{\varepsilon_{flacon}} - 1 \right) + \left(\frac{1}{\varepsilon_{sc}} - 1 \right)} \quad (\text{Eq 1-21})$$

σ : constante de Stefan-Boltzman égale à $5,7 \cdot 10^{-8}$ (W/m² K)

A_{SC} : surface du corps émetteur (m²)

ε_{flacon} : émissivité thermique du verre du flacon (0,94)

ε_{sc} : émissivité thermique du corps émetteur (0,28 pour l'acier inoxydable) des étagères et des parois de la chambre de lyophilisation

T_{paroi} : température de la paroi du lyophilisateur

T_{flacon} : température moyenne du produit

Le flux de chaleur émis par rayonnement et reçu par le dessus du flacon $Q_{r, haut}$ s'exprime par la relation suivante :

$$Q_{r, haut} = A_{flacon} \cdot \varepsilon_{flacon} \cdot \sigma (T_{paroi}^4 - T_{flacon}^4) \quad (\text{Eq 1-22})$$

Le flux de chaleur émis par rayonnement et reçu par le fond du flacon $Q_{r, bas}$ s'exprime par la relation suivante :

$$Q_{r, bas} = A_{flacon} \cdot \varepsilon_{étagère} \cdot \sigma (T_{paroi}^4 - T_{fond, flacon}^4) \quad (\text{Eq 1-23})$$

Le flux radiatif global reçu par l'ensemble du flacon est la somme des deux flux décrits ci-dessus et peut se linéariser sous la forme suivante (Obert 2001) :

$$Q_r = 4 \cdot A_{flacon} \cdot (\varepsilon_{étagère} + \varepsilon_{flacon}) \cdot \sigma \cdot T_{moyen}^3 \cdot (T_{paroi} - T_{fond, flacon}) \approx Kr \cdot A_{flacon} (T_{paroi} - T_{fond, flacon}) \quad (\text{Eq 1-24})$$

avec T_{moyen} égale à la température moyenne entre la paroi du lyophilisateur et le produit.

iii. Transfert de chaleur par contact direct entre le flacon et l'étagère.

La modélisation simple pour déterminer la valeur de K_c repose sur l'hypothèse d'un contact idéal reparté sur tout le pourtour du flacon [Brulls et Rasmuson 2002]. Le coefficient de transfert par contact direct dépend essentiellement de la géométrie du flacon tandis que la pression totale n'a pas du tout d'influence sur celui-ci.

Pour une valeur de K_r connue, il est possible d'obtenir K_c par extrapolation du coefficient global à pression totale nulle, notée $K_v^{P \rightarrow 0}$ [Chouvenc 2004].

$$K_c = K_v^{P \rightarrow 0} + K_r \quad (\text{Eq 1-25})$$

b. Transfert de chaleur à l'intérieur du produit

L'énergie apportée sert à la sublimation et à l'échauffement de la masse totale du flacon. Le transfert de masse interne s'effectue essentiellement par conduction [Marin et René 2008]. Le front de sublimation se déplace de haut en bas du flacon délimitant deux couches : la couche sèche et la couche congelée (cf figure 1.11). Cette configuration du produit en deux zones conduit à exprimer un transfert de chaleur par conduction au sein de la couche sèche et un transfert de chaleur par conduction au sein de la couche congelée. En toute rigueur, l'énergie apportée au front de sublimation provient principalement, d'une part, par conduction du fond du flacon et de la couche sèche, et, d'autre part, par rayonnement de l'étagère supérieure et des parois de la chambre de lyophilisation.

i. Transfert de chaleur au sein de la couche sèche.

Les transferts thermiques par convection (faible pression) et par rayonnement (faible température) demeurent négligeables au regard du transfert de chaleur par conduction au sein de la couche sèche. La figure 1.11 représente les deux couches ainsi que le front de sublimation qui se déplace vers le bas.

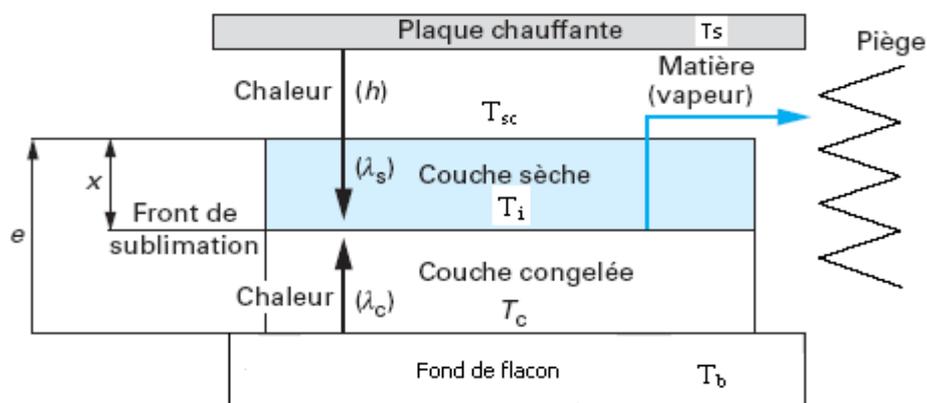


Figure 1.11 : Représentation schématique des couplages de transferts de chaleur et de matière.

Le flux de chaleur traversant la couche sèche peut être décrit tout simplement par la loi de Fourier :

$$Q = \frac{A\lambda_s(T_i - T_{sc})}{x} \quad (\text{Eq 1-26})$$

Le front de sublimation est à la température T_i et à une distance x de la face supérieure de la couche sèche qui est à une température T_{sc} . La conductivité thermique λ_s dépend non seulement du milieu poreux (nature de la matière sèche, porosité) mais également du gaz occupant les pores (pression totale). Mellor (1978) exprime λ_s par la relation :

$$\lambda_s(P) = (1 - \varepsilon)\lambda_{p \rightarrow 0} + \frac{\lambda_0^{gaz}}{1 + \frac{C_\lambda}{P}} \quad (\text{Eq 1-27})$$

ε représentant la porosité de la couche sèche, $\lambda_{p \rightarrow 0}$ la conductivité thermique à pression nulle, P la pression totale dans l'enceinte de lyophilisation et C_λ une constante caractérisant le mode de transfert.

Dans le cas de la conduction à travers la couche sèche, le terme d'accumulation dans cette couche est négligeable devant la quantité de chaleur nécessaire à la sublimation.

ii. Transfert de chaleur au sein de la couche congelée.

Le flux de chaleur par conduction dans la couche congelée obéit également à la loi de Fourier :

$$Q = \frac{A\lambda_c(T_c - T_i)}{e - x} \quad (\text{Eq 1-28})$$

Avec λ_c la conductivité thermique de la couche congelée. T_c la température de la couche congelée et T_i la température à l'interface de sublimation.

c. Couplage entre transfert de matière et transfert de chaleur.

La loi de conservation de l'énergie relie à tout instant t les flux élémentaires de chaleur et de matière au front de sublimation [Chouvenc 2004]. Cette loi conduit à la relation suivante :

$$Q = \dot{m} \Delta H_s + m C_p \frac{\delta T}{\delta t} \quad (\text{Eq 1-29})$$

En régime quasi-stationnaire, le terme d'accumulation $m C_p \frac{\delta T}{\delta t}$ devient négligeable ce qui signifie que la quasi-totalité de la chaleur apporté sert uniquement à la sublimation.

Un réarrangement de l'équation (1-13) avec l'équation (1-29) permet d'exprimer le débit massique de sublimation en fonction du coefficient global de transfert (K_v) par la relation suivante :

$$\dot{m} = A_v K_v (T_{shelf} - T_b) / \Delta H_s \quad (\text{Eq 1-30})$$

Puis l'égalisation des équations (1-30) et (1-12) permet d'exprimer la force motrice due au gradient de pression ($P_0 - P_c$) en fonction du gradient de température ($T_s - T_b$) :

$$\frac{A_s \Delta H_s (P_0 - P_c)}{\hat{R}_p} = A_v K_v (T_{shelf} - T_b) \quad (\text{Eq 1-31})$$

A_s surface de sublimation d'un flacon rapporté à la surface interne de ce dernier (m^2)

P_0 pression de vapeur d'équilibre de la glace à l'interface de sublimation (Pa)

P_c pression de la chambre de lyophilisation (Pa)

ΔH_s enthalpie massique de sublimation de la glace (J/kg)

\hat{R}_p résistance normalisée de la couche sèche ($\text{Pa} \cdot m^2 \cdot s / \text{kg}$)

A_v aire de la section du flacon calculée à partir du diamètre externe (m^2)

T_{shelf} température de l'étagère (K)

T_b température du produit au fond du flacon (K)

K_v coefficient global de transfert de chaleur externe ($\text{W}/(m^2 \text{K})$)

1.3.3. La dessiccation secondaire (désorption).

Le principal objectif de l'étape de dessiccation secondaire est la désorption et la diffusion de l'humidité résiduelle, correspondant à l'eau non congelée/adsorbée à la surface des pores ou insérée dans la phase cryoconcentrée. L'eau adsorbée sur la surface de la matrice poreuse n'a pas cristallisé pendant la congélation et elle est souvent appelée eau liée [Pikal 2002]. La fixation des molécules d'adsorbat sur la surface des pores résulte essentiellement des forces de Van der Waals et des forces dues aux interactions électrostatiques de polarisation, dipôle et quadripôle pour les adsorbants ayant une structure ionique. L'adsorption physique se fait sans modification de la structure moléculaire de l'adsorbat et est parfaitement réversible ; c'est le processus de physisorption. L'eau peut être liée à la surface des cristaux du produit cristallin, ou piégée dans la matrice très visqueuse amorphe [Oetejen 1999]. Dans les deux cas elle doit être éliminée jusqu'à un niveau optimal (normes) garantissant la stabilité du produit pendant le stockage, ce qui correspond souvent à des teneurs inférieures à 3% [Tang 2004]. L'étape de dessiccation secondaire dans le cas d'un produit cristallin peut être courte, puisque une température plus élevée et une rampe de vitesse de chauffe modérée [0,3 °C/min à 0,4°C/min] peuvent être appliquées sans risque d'effondrement de la structure ou collapse [Nail 1993, Tang 2004]. Au contraire, dans le cas d'un produit amorphe, la désorption de l'eau liée demande plus de temps, à cause, d'une part, des mécanismes de diffusion moléculaire très lents au sein de la matrice amorphe visqueuse [Pikal 1990] et, d'autre part, en raison des

concentrations élevées en eau liée à la fin de l'étape de sublimation, entre 10 et 40 % [Nail et Gatlin 1993]. Par ailleurs, il faut maintenir la température du produit en dessous de la température de collapse pour éviter la déformation du gâteau et son effondrement [Pikal 2002]. Ainsi, la température de l'étagère dans le cas des produits amorphes doit être augmentée modérément avec une faible rampe de vitesse de chauffe (0,10°C/min à 0,15°C/min), juste après la fin de l'étape de sublimation quand l'humidité résiduelle est très élevée [Tang et Pikal 2004]. Cependant Pikal et Shah (1990) ont montré que si l'on maintient la température des étagères pendant les premières heures au même niveau qu'en fin de sublimation, la température de transition vitreuse augmente beaucoup plus rapidement que la température du produit. Cette même étude montre que le niveau d'humidité résiduelle diminue rapidement pendant les premières heures - par conséquent la température de transition vitreuse augmente - puis atteint un palier qui ne dépend que de la température de séchage. La température des étagères pendant l'étape de dessiccation secondaire doit être la plus élevée possible, typiquement comprise entre 25°C et 50 °C [Pikal 2002, Tang et Pikal 2004].

1.4 Paramètres clés du procédé de lyophilisation

1.4.1. La transition vitreuse.

1.4.1.1 Détermination expérimentale des valeurs de T_g .

Le passage de l'état viscoélastique à l'état amorphe peut s'observer par mesure des variations de différentes propriétés du système considéré, à savoir [Hottot 2002] :

- *Propriétés rhéologiques* : variation de la viscosité dynamique en fonction de la température avec forte diminution lors de la transition vitreuse à l'approche de la valeur de T_g ;
- *Propriétés thermodynamiques* : variation du volume spécifique par dilatométrie ou par variation d'enthalpie, i.e par analyse enthalpique différentielle (DSC) ;
- *Propriétés électriques* : diminution sensible de l'impédance électrique au passage de la transition vitreuse mais cette variation reste beaucoup moins sensible que celle obtenue avec les mesures enthalpiques ou calorimétriques.

Dans la majorité des cas, la température de transition vitreuse, notée T_g , est mesurée par DSC modulée en température, technique la plus utilisée dans notre domaine pour ses nombreux avantages. En effet, cette technique consiste à mesurer la différence de quantité de chaleur libérée ou consommée par l'échantillon analysé par rapport à une référence subissant le même traitement thermique. Les changements de phase comme la fusion ou la cristallisation sont dites du premier ordre et se traduisent par des pics endothermiques ou exothermiques tandis que la transition vitreuse est une transition du second ordre. La valeur de T_g est habituellement obtenue au point dit ' T_g -midpoint' qui correspond au point d'inflexion du flux thermique dans l'intervalle [T_g - onset, T_g - offset]. Ce point correspond à la diminution de 50% de la valeur du C_p . Les valeurs de T_g sont plus facilement

identifiables en DSC modulée car cette technique détecte de faibles transitions thermiques. En effet, cette technique de DSC modulée permet de séparer le flux de chaleur lié à des phénomènes provoquant le changement de capacité calorifique : « reversing heat flow » (transition vitreuse) de ceux liés à des phénomènes cinétiques : « non-reversing heat flow » (cristallisation, relaxation enthalpique...). Toutefois, cette méthode est beaucoup plus longue que la DSC standard à cause d'une vitesse moyenne de chauffage plus lente qu'en DSC standard et du fait de la nécessité d'optimiser la régulation des paramètres d'oscillations (période et amplitude) [Verdonck et al., 1999].

En outre, 2 transitions vitreuses sont souvent observées avant la fusion : la première transition correspond à la préfusion (ou l'antemelting) 'T'g'₁' tandis que la seconde correspond à la fusion commençante (l'incipient melting), 'T'g'₂'.

Au point Tg'₁-offset, pour une solution de saccharose, commence le début du collapse [Knopp et Nail 1998]. Cette tendance devrait être vérifiée avec d'autres solutés. En plus de ces transitions vitreuses, des phénomènes de dévitrification peuvent aussi s'ajouter ce qui se traduit par un pic exothermique entre la valeur de T'g et l'endotherme de fusion. Ce phénomène peut se produire quand la congélation a été trop rapide ce qui conduit à une recristallisation de la partie vitrifiée lors du balayage de montée en température.

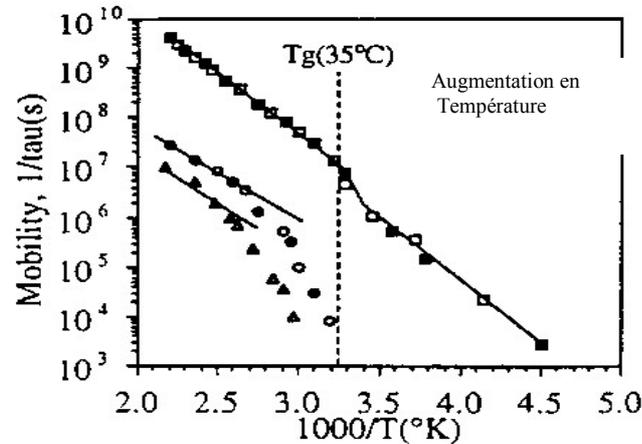
Selon Fonseca et al. (2001) ce phénomène peut disparaître si la première congélation est suivie par un chauffage (recuit ou annealing) au dessus de la valeur de T'g ou dans le domaine compris entre T'g₁ et T'g₂, après une seconde congélation. Ce traitement thermique de recuit permet de cryoconcentrer au maximum la solution. Suivant la durée de ce recuit, la dévitrification disparaît et les 2 transitions vitreuses se rejoignent pour n'en former plus qu'une seule. Si les 2 transitions persistent, même après un recuit assez long, le phénomène résulte alors de la grande complexité du milieu avec notamment une possible cristallisation des sels et/ou des acides organiques présents. La détermination de la valeur de T'g devient alors plus complexe. De plus, selon Karel et al. (1994), la température de dévitrification augmente avec la vitesse de chauffe. Cependant, l'utilisation de la notion de T'g sous-entend que les changements dans la phase amorphe cryoconcentrée soient contrôlés par des phénomènes cinétiques et non par des modifications des propriétés thermodynamiques [Blond 2000]. Ainsi, la notion de T'g n'est pas forcément la seule valeur thermodynamique de référence mais d'autres paramètres tels que la viscosité, la relaxation, le pH, la force ionique et la mobilité moléculaire doivent aussi être pris en compte pour analyser et expliquer les différentes transitions observées lors des étapes de lyophilisation des solutions pharmaceutiques.

1.4.1.2 Importance de la transition vitreuse pour le contrôle du procédé de lyophilisation.

Le concept de température de transition vitreuse est utilisé pour évaluer la stabilité physique de la structure amorphe, d'abord pendant toute la durée de la lyophilisation - i.e pendant la sublimation de la glace et la désorption de l'eau non congelée - puis ensuite pendant la période de stockage. Au-dessus de cette température, cette structure amorphe devient viscoélastique et la mobilité de toutes les molécules en présence au sein de cette phase vitreuse augmente. Slade et Levine (1995) définissent deux zones de stabilité en fonction de la différence entre la température du produit, notée T_p, et la température de transition vitreuse :

- pour $T_p - T_g < 0$, le matériau est stable
- pour $T_p - T_g > 0$, le matériau est instable et les réactions de dégradations (couleur, résistance mécanique, activité biologique) sont accélérées.

La figure ci-dessous présente la variation de la mobilité de l'eau en fonction de la température du système. La mobilité est l'inverse du temps de relaxation structurale entraînant des changements physiques ou chimiques de la molécule entière considérée. Ce temps de relaxation, noté τ , est mesuré par R.M.N.



- : déplacement de 180° des noyaux aromatiques
- : rotation autour de l'axe des chaînes
- △ : réorientation ou fluctuation de l'axe des chaînes

Figure 1.12 : Couplage entre la mobilité et la transition vitreuse dans un système de polymère [Pikal, 1999 a]

Par conséquent, plus les valeurs de la courbe d'isoviscosité seront élevées, plus les dessiccations primaire et secondaire pourront être effectuées à haute température et conduiront donc à des temps de séchage courts. Selon Rahman (2001) et Rahman et Sablani (2002), si la température du produit est inférieure à la valeur de T_g , la vitesse de dégradation est diminuée mais non annulée de sorte que cette condition est insuffisante pour garantir l'intégrité totale du produit. Cependant, ce concept n'est pas vérifié pour tous les produits. En effet, d'autres paramètres comme la tension de surface, les forces capillaires, la structure rhéologique, la morphologie des pores, la génération de la pression interne du produit et les mécanismes de transport de l'eau au sein du produit doivent parfois être pris en compte pour optimiser le cycle global de la lyophilisation. On admet généralement que **la température du produit pendant toute la dessiccation primaire doit rester inférieure de 2 à 5 °C à la température T_g - ou à la température eutectique dans le cas d'un système avec soluté cristallin - et inférieure de 2 à 5°C en dessous de la valeur de la T_g pendant la période de dessiccation secondaire.**

1.4.2. La température de collapse.

Comme mentionné au paragraphe 1.3.2.2 le ‘collapse’, importé du vocabulaire anglais, désigne l’effondrement de la structure mécanique de la matrice constituée par la matière sèche et se produisant au cours des étapes de sublimation ou de désorption, ou, par la suite, pendant le stockage. Il résulte d’un accroissement de la mobilité au sein de la phase amorphe qui conduit à un écoulement visqueux entraînant cette perte de structure. Cet effondrement survient à partir d’une température dénommée température de collapse, notée T_c .

La température de collapse est étroitement liée à la valeur de T_g . En effet, Sun (1997) a observé l’existence d’une relation linéaire entre les valeurs de T_c et de T_g pour les sucres en solution aqueuse. La valeur des températures de collapse des solutions aqueuses de sucres à bas poids moléculaire est plus élevée de 2°C à 12°C par rapport à la valeur de T_g correspondante. Ces valeurs se déterminent soit par DSC soit par observation en microscopie à platine réfrigérée (figure 1.13) ou encore par analyse thermomécanique différentielle (DMTA).

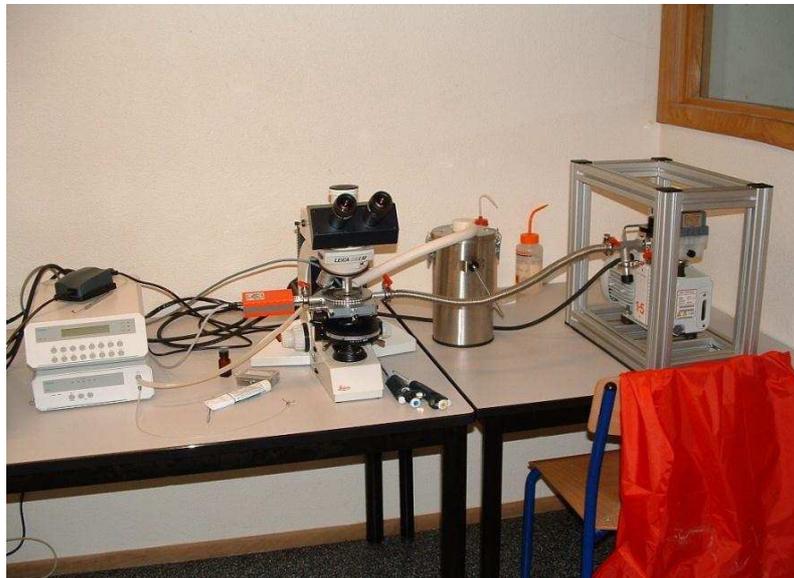


Figure 1.13 : Microscopie à platine réfrigérée (Linkam et Leica)

Toutefois, l’observation directe de l’échantillon par microscopie optique à l’aide d’une platine réfrigérée semble la méthode la plus pertinente et la plus utilisée par les auteurs.

Knopp et Nail (1998) proposent la méthode de détermination suivante : l’échantillon est tout d’abord refroidi à la vitesse de $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu’à -45°C puis le vide est appliqué dans la platine du mini - lyophilisateur (entre 3 et 13 Pa). Ensuite, la cellule est lentement chauffée (environ $1^\circ\text{C}/\text{min}$) jusqu’à voir apparaître une altération de la matière sèche qui se traduit par l’apparition d’un craquellement de la matière sèche et la formation de « trous » à travers lesquels passe la lumière transmise. Plus on se rapproche de la température de collapse, T_c , plus la vitesse de chauffe doit être lente pour cerner avec exactitude cette température de collapse. L’utilisation d’une rampe de chauffe serait plus appropriée qu’une remontée par paliers en raison de la dépendance cinétique du mécanisme d’effondrement. Cette méthode donne de meilleurs résultats par rapport à la DSC mais elle repose sur l’appréciation visuelle personnelle et donc parfois subjective de l’observateur. Une première approche consiste à chauffer assez rapidement l’échantillon pour repérer la zone de la température de collapse puis à recommencer l’opération, à vitesse plus lente, quand on approche du domaine

déterminé lors de l'expérience préliminaire de collapse. Quelques valeurs de températures de collapse, T_c , et de températures de transitions vitreuse à cryo-concentration maximale, T'_g , sont données dans le tableau ci-dessous [Wang 2000]:

| Excipients | T_c (°C) | T'_g (°C) |
|------------------|------------|-------------|
| Glucose | -41 | -43 |
| Lactose | -30,5 | -28 |
| Raffinose | -26 | -27 |
| Sorbitol | -45 | -43,5 |
| Saccharose | -31 | -32 |
| Tréhalose | -29 ; -40 | -29,5 |
| Dextran (10 kDa) | -10 | -11 |
| HES | -5 | - |
| PEG (6 kDa) | -13 | - |
| PVP (40 kDa) | -24 | -20 |
| HSA | -9,5 | - |
| Ovalbumine | -10 | -12 |

Tableau 1.1 : Températures de collapse pour quelques excipients (Wang 2000).

Cette température dépend des propriétés et des liaisons chimiques présentes au sein de la matrice contenant les solutés, donc des constituants de la formulation, de leur masse moléculaire ainsi que de leur proportion relative. Ainsi pour les sucres, plus le poids moléculaire est élevé, plus la température de collapse est élevée.

1.4.3. Les isothermes de sorption.

L'activité a_w de l'eau dans un produit dépend principalement de sa teneur en eau X (base sèche) et de la température T à laquelle se trouve le produit. Les courbes qui représentent, pour une température T donnée, la teneur en eau d'équilibre du produit, X_m , en fonction de la valeur de l'activité de l'eau a_w (encore égale à l'humidité relative de l'air en équilibre, notée HR), sont appelées isothermes de sorption :

- Isotherme d'**adsorption** déterminée expérimentalement à partir d'un produit sec ;
- Isotherme de **désorption** déterminée expérimentalement en partant d'un produit saturé en eau.

Les deux courbes sont en général différentes car le séchage d'un produit (passage de $a_w = 1$ à $a_w < 0,6$) entraîne des modifications irréversibles de la structure et de la porosité du matériau. Dans le cas de produits hygroscopiques comme les lyophilisats, ces courbes peuvent présenter un phénomène d'hystérésis.

Les isothermes d'adsorption ou de désorption permettent de connaître le type et la quantité d'eau liée à la matière sèche du lyophilisat pour des conditions données (T , HR). De nombreuses équations de corrélation ont été proposées. Pour les produits biologiques lyophilisés, de nombreux auteurs ont représenté cette isotherme par l'équation suivante à 3 paramètres proposée par Guggenheim - Anderson de Boer (équation de GAB) [Guggenheim 1966].

$$\frac{X}{X_m} = \frac{C.K.aw}{(1 - K.aw).(1 + (C - 1).K.aw)} \quad (\text{Eq 1-32})$$

X : fraction massique d'eau en base sèche (kg/kg)

X_m : fraction massique d'eau en base sèche correspondant à la monocouche (kg/kg)

K et C : constantes adimensionnelles caractéristiques du système étudié (kg/kg)

Ces isothermes servent à déterminer la teneur en eau dans le produit en équilibre avec une atmosphère donnée. Cette mesure d'activité peut-être déterminée à l'aide de l'activimètre Gbx dont le principe consiste à mesurer le point de rosée à la surface du produit dans des conditions parfaitement contrôlées.

Les échantillons sont placés à l'équilibre à une température donnée en présence d'atmosphère de solutions salines saturées qui permettent de maintenir une pression partielle d'eau parfaitement connue et constante au cours de cette mise en équilibre. Pour ce qui est de la détermination complète des isothermes de sorption, les échantillons sont équilibrés sous différentes pressions partielles d'eau puis pesés successivement. L'équilibre est considéré atteint quand aucune variation de masse n'est observée au bout de 48 h.

1.4.4. *Qualité finale du lyophilisat.*

En fin d'opération, le lyophilisat sec, sous forme d'une poudre microporeuse, doit être facilement réhydratable. La porosité et la texture du lyophilisat conditionnent donc cette dissolution lors de la reconstitution de la solution. Il est donc important de parvenir à certains critères de qualité du lyophilisat et de rappeler les caractéristiques physiques et chimiques principales pour sa bonne conservation tout au long du stockage.

De plus, d'autres paramètres importants qui suivent la lyophilisation sont aussi à contrôler comme la température de stockage, l'humidité finale du lyophilisat, la nature de la solution de reconstitution (tamponnée ou non, temps de reconstitution, etc.).

1.4.4.1 *Propriétés physiques du lyophilisat.*

Différentes propriétés physico-chimiques du lyophilisat fournissent des informations capitales sur sa conservation à moyen et à long terme, notamment sur le maintien de l'activité biologique et thérapeutique dans le cas des produits pharmaceutiques (vaccins, sérums, vitamines, hormones, enzymes, etc.).

Parmi ces propriétés, la température de transition vitreuse à partir de laquelle le lyophilisat se déforme mécaniquement (collapse) ou passe à l'état visco-élastique est la plus importante. Cette température est liée bien évidemment à la teneur en eau dans le lyophilisat, teneur fixée par les conditions opératoires du procédé et par la composition de la formulation.

De plus, la morphologie du lyophilisat, sa couleur ainsi que sa texture font partie intégrale des critères de qualité recherchés. Le terme de texture regroupe l'ensemble des paramètres morphologiques tels que la porosité, la surface spécifique, la taille moyenne et la distribution de taille des pores du produit. Ils sont directement liés aux conditions opératoires du procédé. Par exemple, si la congélation n'a pas été achevée (ou encore si la solidification n'a pas été terminée), le lyophilisat peut présenter une zone « expansée » à sa surface ou encore appelée « puffing » à cause d'une congélation incomplète et d'une descente en pression trop précoce. Cette congélation partielle peut aussi provoquer la formation d'une croûte à la surface du

lyophilisat, formation liée à l'hétérogénéité de la structure congelée. Dans certains cas, cette croûte est générée par la formation de gros cristaux de glace qui tendent à concentrer la phase non congelée et à la pousser vers la surface (dans le cas d'une congélation lente). Cette croûte constituera une barrière plus ou moins perméable au flux de la vapeur d'eau pendant la phase de sublimation. Dawson et Hockley (1990) ont étudié ce phénomène par observation du lyophilisat au Microscope Electronique à Balayage. Ils ont observé que pour une formulation à 1 % de tréhalose et 5 mg/ml de protéine congelée à 1°C/min, les protéines ne sont pas uniformément distribuées au sein du lyophilisat et que la majorité de celles-ci étaient concentrées sur environ 20 % de la partie supérieure. Ces auteurs avancent l'hypothèse que ces gradients de concentration pourraient être évités en pratiquant une congélation plus rapide. Par ailleurs, une fusion partielle peut se produire quand la température des étagères est augmentée trop tôt en début de dessiccation secondaire car la teneur en eau de la matrice est alors trop importante et la durée de l'étape de dessiccation secondaire, alors fixée, ne suffira pas à éliminer toute cette eau (congelée et liée).

Dans certains cas, le lyophilisat peut aussi présenter une structure très poreuse de type mousse à sa surface. Ce phénomène est généralement indésirable car il peut conduire à de forts gradients de concentration et il peut provoquer l'agrégation des protéines. Le moussage peut provenir soit des conditions de remplissage du flacon soit des conditions de congélation. En effet, pendant la congélation, les gaz non dissous en quantité significative dans la formulation tendent à se concentrer dans les régions interstitielles jusqu'à saturation. Si la région interstitielle est encore liquide, la pression du gaz augmente, déformant ainsi la matrice avec libération du gaz et formation d'une morphologie de type mousse.

1.4.4.2 L'humidité résiduelle du lyophilisat.

L'humidité résiduelle du lyophilisat est aussi un facteur de qualité très important. En effet, si la teneur en eau est trop élevée, l'eau résiduelle peut donner des réactions chimiques impliquant les groupes amino - acides des saccharides tels que le glucose. Cette quantité d'eau résiduelle et la surface spécifique du lyophilisat étant liées, il est nécessaire de rechercher une surface spécifique optimale pour la sublimation et le stockage. Par ailleurs, une surface spécifique trop faible conduit à une reconstitution difficile de l'échantillon, la reconstitution pouvant être instantanée ou atteindre 1 heure.

Dans certains cas, la teneur en eau d'un échantillon peut augmenter très rapidement pendant le stockage surtout à cause de la perméabilité du bouchon. Ainsi, c'est l'humidité de l'air extérieur entrant dans le flacon qui provoque l'augmentation de la teneur en eau et non l'eau résiduelle contenue dans le lyophilisat à la fin de la dessiccation secondaire.

1.4.4.3 Mesure de l'humidité résiduelle du lyophilisat :

La mesure de l'humidité résiduelle la plus ancienne consiste à peser l'échantillon après lyophilisation et à le déshydrater dans une boîte étanche en présence de desséchant (P_2O_5) à

une température fixe à pression atmosphérique ou sous vide. L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que, même si le poids reste constant, après une certaine période de dessiccation en présence de substance desséchante, cela ne signifie pas forcément que le matériau soit totalement sec [Rey 1962].

La méthode recommandée pour mesurer la teneur résiduelle en eau est la méthode de dosage de l'eau de Karl Fisher qui consiste à faire réagir l'eau résiduelle du lyophilisat avec un réactif iodo-sulfureux en présence de pyridine et de méthanol (solvants de la réaction) suivant une réaction d'oxydo-réduction. Un faible courant polarisé constant (50 μA) traverse alors les électrodes immergées dans le milieu réactionnel. La différence de potentiel est mesurée de façon continue et la mesure est considérée terminée quand une chute de tension apparaît en raison de l'excès d'iodure dans la solution.

En général, le lyophilisat est dissous dans le solvant de réaction qui lui-même est à très faible teneur en eau. Si le produit se dissout mal, un mélange de méthanol et de formamide est recommandé. Le mélange est alors dosé ainsi que le solvant ayant servi à la dissolution. En fait, la méthode est pratiquée avec un seul flacon mais si la teneur en eau est trop faible (à moins que l'appareil ne soit assez sensible pour la mesure), il est nécessaire de rassembler plusieurs flacons afin d'obtenir un résultat plus fiable et plus précis. Ces manipulations doivent s'effectuer en boîte étanche et dans des conditions d'atmosphères inertes, ni trop humides ni trop sèches, à l'intérieur d'une boîte à gants étanche.

D'autres méthodes existent : l'analyse thermogravimétrie (ATG). L'appareil est enfermé dans une boîte à gants contenant du P_2O_5 pour maintenir une humidité relative très faible ; 7 à 19 mg d'échantillon sont placés dans une capsule et 2 cycles thermiques différents peuvent être réalisés. Soit l'échantillon est chauffé avec une vitesse de chauffe fixe, soit l'échantillon est maintenu à 60°C jusqu'à ce que son poids se stabilise [May et al., 1982].

Une autre méthode plus complète consiste à ajouter un spectromètre de masse en sortie de l'ATG ; le spectromètre sert alors d'analyseur et indique les différences d'intensité des pics provenant de l'eau et du dioxyde de carbone. Cela permet de détecter le début des réactions de dégradation et de calculer précisément la teneur en eau correspondante. Ces auteurs ont comparé toutes les méthodes citées ci-dessus et ont obtenu un accord satisfaisant entre les résultats des méthodes de Karl Fisher et d'ATG pour des niveaux d'humidités inférieurs à 3 %. Les méthodes par pesée donnent une teneur en eau inférieure par rapport aux autres méthodes. L'avantage de l'ATG par rapport à la méthode de Karl Fisher est que la masse d'échantillon nécessaire à l'analyse est plus faible. De plus, pour la méthode chimique, l'échantillon a besoin d'être solubilisé ce qui n'est pas possible avec certains types de lyophilisat pour lesquels la méthode doit être adaptée.

1.5 Suivi de la lyophilisation.

Le contrôle de la lyophilisation est important car il doit assurer les standards de la qualité finale du produit pour des coûts opératoires minimaux. Les principaux paramètres opératoires à contrôler sont la température des étagères et la pression de la chambre. Ainsi, il est important de détecter avec précision la fin de la sublimation pour éviter tout effondrement du produit si la température des étagères est augmentée trop tôt.

En raison de la forte hétérogénéité des durées des étapes de séchage directement liée à la congélation et à l'emplacement de chaque flacon à l'intérieur de la chambre, une marge de sécurité est appliquée pour s'assurer de bien terminer la sublimation. De ce fait, plusieurs techniques en sus de la méthode classique par sonde de température ou par thermocouple doivent être utilisées pour détecter avec une bonne précision la fin de la période de sublimation.

1.5.1. Suivi de la température du produit.

La température moyenne du produit est généralement le paramètre clé de lyophilisation car cette variable influe sur tous les mécanismes de lyophilisation, notamment les transferts de masse et de chaleur. Elle est suivie et enregistrée grâce à des thermocouples ou avec des sondes en platine. Quand la totalité de la glace d'un flacon est sublimée, la température du produit augmente brusquement jusqu'à atteindre la température de l'étagère. Avant de passer en phase de dessiccation secondaire, une marge de sécurité est adoptée, égale à + 10% du temps de sublimation estimé par les thermocouples. Cette démarche assure que la totalité des cristaux de glace est bien sublimée dans tous les flacons du lot. En effet, les flacons contenant des thermocouples voient leurs conditions de congélation modifiées puisque le capteur est le siège d'une nucléation hétérogène ce qui se traduit par un degré de surfusion moins important par rapport aux flacons sans thermocouples. De plus, le thermocouple induit des passages préférentiels de la vapeur d'eau ce qui accélère le transfert de la vapeur d'eau produite au niveau du front de sublimation. Ainsi, ces flacons, contrôlés par des thermocouples ou des sondes Pt 100 internes au produit, ont des temps de sublimation plus faibles que les autres flacons non instrumentés.

1.5.2. Suivi par capteur de pression à conductivité thermique : jauge Pirani.

Le principe du capteur de conductivité thermique ou encore jauge/manomètre à vide de Pirani repose sur la mesure de la quantité d'énergie nécessaire au maintien en température d'un filament de platine. Le capteur est composé de 2 filaments, dont l'un sert de référence et l'autre sert à la mesure. Au lieu de mesurer directement la température des filaments, la jauge Pirani mesure la variation de résistance des filaments par l'intermédiaire d'un pont de Wheastone. Le flux de chaleur, perdu par conduction à travers le mélange de gaz, est directement proportionnel à la pression de la chambre mais est dépendant de la composition du gaz [Nail 1991]. Quand la sublimation commence, la pression partielle en eau augmente et la pression donnée par la jauge de Pirani augmente tandis que pour un manomètre à capacitance, la pression totale reste constante car elle est insensible à la composition du gaz. En effet, ce type de capteur étant étalonné généralement à l'air, le signal est plus élevé

pendant la sublimation étant donné l'augmentation de la conductivité thermique du gaz, la vapeur d'eau ayant une conductivité thermique intrinsèque 1,5 fois supérieure à celle de l'air sec. Par conséquent, la valeur de la pression indiquée par la jauge Pirani est 1,5 fois plus élevée que la pression totale du gaz.

A la fin de la sublimation, le gaz de l'enceinte est majoritairement composé d'air (à cause de la diminution de la teneur en vapeur d'eau dans la phase gazeuse due à la fin de la sublimation) et la réponse de la jauge Pirani diminue ce qui permet de détecter la fin de la période de sublimation. Cependant, cette méthode est relativement attractive puisque le capteur est stérilisable et utilisable en milieu pharmaceutique mais sa sensibilité reste à vérifier et son utilisation est restreinte à la fin de la période de sublimation [Bardat et al. 1993].

1.5.3. Cinétiques de sublimation obtenues avec la microbalance Christ.

La microbalance du type MTC-ZER (Christ, D-Osterode) est utilisée pour suivre la cinétique de sublimation de la glace pendant la phase de dessiccation primaire. De par sa petite taille, la microbalance est introduite dans la chambre de lyophilisation et est posée sur l'étagère.

Un seul flacon contenant la solution à étudier est entreposé sur l'étagère à portée du bras articulé de pesée de la microbalance (figure 1.14), puis à des intervalles de temps programmés, le bras de pesée automatique soulève le flacon pour le peser. Les différentes valeurs des points de pesées sont collectées en direct par un logiciel approprié. Ainsi, la variation de masse du flacon pendant la dessiccation primaire correspondra à la masse de glace sublimée pendant la durée de la phase de sublimation. Le tracé des courbes de séchage permet de déterminer la vitesse moyenne de sublimation et surtout d'identifier la fin de l'étape de sublimation.



Figure 1.14 : Microbalance Christ.

L'opération de pesée dure en moyenne 10 s, pendant lesquelles le flacon n'est plus au contact avec l'étagère car il est soulevé. Pendant ce temps le flacon ne subit plus de transfert de

chaleur en raison de l'interruption du contact avec l'étagère. La durée totale de cette interruption d'apport de chaleur est négligeable par rapport au temps total de la sublimation. La microbalance a une portée de 0,005 g à 50 g et fonctionne dans une gamme de température comprise entre -25°C et 40°C avec une très haute résolution (0,1 µg) de mesure.

1.5.4. Test de montée en pression PRA (Pressure Rise Analysis).

Cette technique consiste à isoler la chambre de lyophilisation du condenseur pendant quelques secondes à l'aide d'une vanne à fermeture rapide et à mesurer la remontée de pression correspondante. Elle nécessite un condenseur externe à la chambre de lyophilisation et, de plus, un taux de fuite du lyophilisateur le plus faible possible. La vitesse de la remontée en pression dans la chambre après une courte interruption du flux de vapeur d'eau dépend essentiellement de la vitesse de sublimation donc de la température moyenne du front de sublimation et de la pression de vapeur d'eau dans l'enceinte. Ainsi, selon Nail (1991) pour une température étagère de 40 °C, la pression totale augmente de 53 à 101 Pa en 3 secondes. Cette technique est intéressante car elle est rapide, non-invasive, utilisable in situ, mais elle peut provoquer une légère augmentation de la température du produit (environ 1 °C au cours de la sublimation, voire davantage, en fin de sublimation) pouvant, dans des cas limites, entraîner le collapse pour certaines conditions de remontée de pression en fin de sublimation. Un exemple de montée de pression est donné ci-dessous [Pikal et al., 1999 b]:

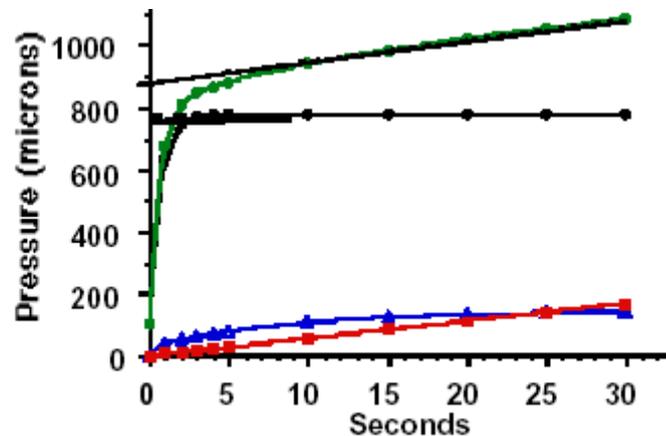


Figure 1.15 : Courbe en vert montée de pression totale, en noir : pression à l'équilibre à l'interface due à la sublimation, en rouge apport de chaleur de l'étagère vers le produit, en bleu dissipation du gradient de température à travers la couche congelée augmentant la température à l'interface. $T_i = -20\text{ °C}$ $P_{\text{initiale}} = 26\text{ Pa}$

Le principe de la méthode initialement proposé par Milton et al. (1997) repose sur le modèle MTM qui décrit la cinétique de montée en pression à l'aide de l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
 & \text{Terme 1} \\
 & P(t) = P_0(T_i) - (P_0(T_i) - P_c) \cdot \exp\left(-\frac{N \cdot A_v \cdot R \cdot T_v}{M_{H_2O} \cdot V \cdot R_p} \cdot t\right) + \\
 & \text{Terme 2} \\
 & \frac{P_0(T_i) \cdot \Delta H_s \cdot M_{H_2O}}{R \cdot T_i^2} \cdot \frac{\Delta T}{2} \left(1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\kappa \cdot \pi^2}{L_{cong}^2} \cdot t\right)\right) + \\
 & \text{Terme 3} \qquad \qquad \qquad \text{Terme 4} \\
 & + \frac{P_0(T_i) \Delta H_s \cdot M_{H_2O}}{R \cdot T_i^2} \cdot \frac{1}{Cp_g \cdot L_{cong} \cdot \rho_{cg}} \cdot Kv \cdot (T_{shelf} - T_b) + F_{fuite} \cdot t
 \end{aligned}$$

(Eq. 1-33)

Le terme 1 correspond à la sublimation de la glace au front de sublimation (terme principal), le terme 2 représente la mise en équilibre du gradient thermique dans la couche congelée, le terme 3 exprime le réchauffement du produit dû à l'accumulation de chaleur dans la couche congelée pendant la durée du test et, enfin, le terme 4 représente le taux de fuite intrinsèque du lyophilisateur qui contribue aussi à la montée de pression.

Les différentes notations des variables de cette équation sont décrites ci-dessous :

- A_v : surface de sublimation d'un flacon (m^2)
- F_{fuite} : taux de fuite du lyophilisateur (Pa/s)
- Kv : coefficient global de transfert de chaleur d'un flacon ($W/m^2/K$)
- L_{cong} : épaisseur de la couche congelée (m)
- M_{H_2O} : masse molaire de l'eau (18 kg/kmole)
- N : nombre de flacons utilisés
- $P_0(T_i)$: pression de vapeur d'eau à l'équilibre thermodynamique avec la glace à la température T_i au front de sublimation (Pa)
- P_c : pression initiale totale de la chambre (Pa)
- R : constante des gaz parfaits (8314 J/kmole/K)
- R_p : résistance normalisé au transfert de matière ($Pa \cdot m^2 \cdot s \cdot kg^{-1}$)
- t : temps de la mesure (s)
- T_v : température du mélange gazeux dans le lyophilisateur (K)
- T_{shelf} : température des étagères (K)
- T_b : température au fond du flacon (K)
- V : volume de la chambre de lyophilisation (m^3)
- ΔH_s : enthalpie de sublimation (J/Kg)
- Cp_{gl} : capacité thermique spécifique de la glace (J/kg/K)
- ρ_{cg} : masse volumique de la glace (kg/m^3)
- $\kappa = \lambda_c / (\rho_g \cdot L_{cong} \cdot Cp_g)$ où λ_c est la conductivité de la glace ($W/m/K$)

Les auteurs de la méthode MTM préconisent une valeur du rapport, volume de chambre/surface totale de sublimation, au moins égale à 1,28 m pour parvenir à une sensibilité convenable de la méthode (montée de pression suffisante).

Récemment, Obert (2001) a modifié ce modèle en tenant compte:

- de la désorption de l'eau liée pendant la sublimation : $dP/dt = D_{des}$ où D_{des} représente la constante cinétique de désorption de l'eau liée dans la couche sèche (Pa/s)
- de l'inertie thermique du flacon, introduite par le terme 3.

De plus, le coefficient global de transfert de chaleur K_v est calculé, à l'aide de la relation ci-après, en faisant les hypothèses :

- de l'état stationnaire des transferts de masse et de chaleur ;
- que la pression partielle de la vapeur d'eau dans le flacon est égale à la pression totale de la chambre ;
- que les surfaces de sublimation A_s et A_v respectivement calculées par rapport à la surface interne et externe du flacon sont sensiblement égales.

$$K_v = \frac{(P_0(T_i) - P_c)\Delta H_s}{\hat{R}_p(T_s - T_b)} \quad (\text{Eq. 1-34})$$

En remplaçant le terme K_v (Eq 1-34) dans l'équation (Eq 1-33), l'expression de la montée en pression s'écrit (l'inertie thermique du flacon et la désorption sont prises en compte) :

$$P(t) = P_0(T_i) - (P_0(T_i) - P_c) \cdot \exp\left(-\frac{N \cdot A_s \cdot R \cdot T_v}{M_{H_2O} \cdot \hat{V} \cdot R \cdot p} \cdot t\right) + \frac{P_0(T_i) \cdot \Delta H_s \cdot M_{H_2O}}{R \cdot T_i^2} \cdot \frac{(P_0(T_i) - P_c) \cdot \Delta H_s}{(C_{pg} \cdot L_{cong} \cdot \rho_{cg} + \frac{m_{flacon} \cdot C_p \cdot \hat{V}}{A_s}) \cdot R \cdot p} \cdot t + F_{fuite} \cdot t + D_{des} \cdot t$$

$$(\text{Eq. 1-35})$$

Dans le cas d'un système avec une vanne à fermeture rapide, une approche plus rigoureuse a été proposée par Chouvenec et al. (2004). Ces auteurs ont proposé et validé un modèle physique plus cohérent, dénommé modèle PRA, basé sur les équations élémentaires de transferts de masse et de chaleur du système ainsi que sur les équations constitutives (modèle PRA : Pressure Rise Analysis). Ainsi, deux gaz contribuent à la montée de la pression totale : la vapeur d'eau produite par la sublimation et le gaz inerte provenant uniquement de la fuite de l'appareil. Le terme principal correspond à la vapeur d'eau générée par la sublimation de la glace et, dans une plus faible proportion, à la désorption de l'eau non congelable de la matière sèche :

$$\frac{dP_{eau}}{dt} = \frac{N \cdot A_s \cdot R \cdot T_v}{M_{H_2O} \cdot \hat{V} \cdot R \cdot p} (P_0(T_i) - P_{eau}(t)) + D_{des} \quad (\text{Eq. 1-36})$$

où P_{eau} représente la pression partielle de vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation. La loi d'Antoine a été utilisée pour exprimer la pression d'équilibre de la vapeur d'eau, P_0 , en fonction de T_i au front de sublimation [Perry 1973] :

$$\ln(P_0) = \frac{-6320,15}{T_i} + 29,56 \quad (\text{Eq. 1-37})$$

La pression totale du gaz est calculée en sommant les pressions partielles de l'air et de la vapeur d'eau :

$$P(t) = P'_{eau} + P_{inert} \quad (\text{Eq. 1-38})$$

où P_{inert} représente la pression partielle du gaz inerte provenant de la fuite de l'appareil. Par ailleurs, le bilan thermique pour un flacon, s'écrit sous la forme suivante :

$$\frac{dQ}{dt} = A_v K_v (T_s - T_b) = (\rho_{cg} C_{p,cg} L_{cong} A_v + m_{flacon} C_{p,flacon}) \frac{dT_i(t)}{dt} + \frac{A_s \Delta H_s}{R_p} (P_0(T_i) - P'_{eau}(t)) + \frac{VM_{H_2O} \Delta H_{des}}{NRT_v} D_{des} \quad (\text{Eq. 1-39})$$

Après réarrangement, la vitesse de montée de température au niveau du front de sublimation s'exprime comme suit :

$$\frac{dT_i(t)}{dt} = \frac{1}{\rho_{cg} C_{p,cg} L_{cong} + \frac{m_{flacon} C_{p,flacon}}{A_v}} \left[K_v(P) (T_s - T_b) - \frac{\Delta H_s}{R_p} \left(\exp\left(\frac{-6320,16517}{T_i(t)} + 29,5578\right) - P'_{eau}(t) \right) - \frac{VM_{H_2O} \Delta H_{des}}{NA_v RT_v} D_{des} \right] \quad (\text{Eq. 1-40})$$

A la différence du modèle MTM précédent, il est à noter que ce modèle tient compte, au cours du test PRA, d'une part, de la variation de la température au niveau du front, T_i , et, d'autre part, de la variation de K_v en fonction de la pression totale par la relation suivante :

$$\frac{dK_v(P)}{dP} = \frac{\alpha \Lambda_0}{\left(1 + \frac{\alpha \Lambda_0 l_{sep}}{\lambda_0} P\right)^2} \quad (\text{Eq. 1-41})$$

où l_{sep} représente la distance moyenne équivalente de séparation entre le flacon et l'étagère (m).

La température de la couche congelée au fond du flacon est supposée constante pendant la durée de la mesure et est calculée à partir de l'équation de transfert de chaleur à l'état stationnaire à travers la couche congelée, à savoir :

$$T_b = \left(\frac{e_{flacon}}{\lambda_{flacon}} + \frac{L_{cong}}{\lambda_{cg}} \right) (P_{0_{initial}} - P_c) \frac{\Delta H_s}{R_p} + T_{i_{initial}} \quad (\text{Eq. 1-42})$$

$P_{0_{initial}}$: pression de la vapeur d'eau au front de sublimation avant la fermeture de la vanne (Pa)
 $T_{i_{initial}}$: température au front de sublimation avant la fermeture de la vanne (K)

De plus, ces auteurs ont validé ce modèle et comparent, d'une part, les températures estimées par la méthode PRA et les mesures expérimentales fournies par thermocouples, et d'autre part, les valeurs de K_v . En outre, elle présente l'avantage d'une meilleure stabilité numérique et conduit à des temps de calcul plus courts.

Par ailleurs, le modèle PRA a été étendu au cas des lyophilisateurs équipés de vannes à fermeture lente, cas rencontrés sur les lyophilisateurs industriels. Il a été aussi démontré que la méthode PRA conduit à des valeurs de K_v à peu près constantes pendant la durée de la mesure et que la désorption peut être négligée pendant la durée de la sublimation. Cette méthode a permis une bonne estimation de la température du front de sublimation ainsi que des coefficients globaux de transfert de chaleur, K_v , et de la résistance normalisée au transfert de masse de vapeur d'eau à travers la couche sèche, \hat{R}_p .

1.5.5. Suivi par sonde proche infra-rouge (NIR)

En lyophilisation, la spectroscopie du proche infra-rouge a été utilisée, tout d'abord, pour déterminer la teneur en eau finale du lyophilisat [Jones et al. 1993], méthode non invasive, ni destructive en mesurant quantitativement la bande correspondante à la fonction hydroxyle de l'eau. Les tests en proche infra-rouge se font directement à travers la paroi du flacon avec seulement 50 mg d'échantillon. Cette méthode permet de minimiser le temps d'analyse par sa facilité de mise en œuvre et son coût d'utilisation. C'est pourquoi par sa simplicité, ce capteur a été adapté au suivi de la lyophilisation [Brulls et al. 2003]. Les spectres sont calibrés à l'aide d'étalons en eau, qui sont titrés par la méthode Karl Fisher afin de convertir le signal de réflectance en teneur en eau. Le capteur est directement plongé dans la solution et le spectre est enregistré avec 128 balayages durant toute la lyophilisation. Ainsi, le point final de congélation totale de l'eau libre en glace et les fins des deux périodes de dessiccation sont détectables. En outre, cette méthode permet de suivre les dommages sur les structures secondaires (hélice α et feuillet β) des protéines [Bai et al. 2004] ainsi que les changements conformationnels.

1.6 Importance de la formulation en lyophilisation.

1.6.1. Introduction.

Selon Jennings (1999) la formulation est à la lyophilisation ce que le soleil est au système solaire. Cette phrase traduit l'importance de la formulation pour la lyophilisation.

Une formulation est composée de plusieurs constituants, tels que : un ou plusieurs solutés (principe actif, protéines), un solvant (généralement l'eau), de nombreux excipients qui sont des composés qui vont intervenir dans le bon déroulement du procédé de lyophilisation.

L'art de la formulation est d'associer les bons composants qui permettront de satisfaire aux nombreux critères de qualité et de stabilité du produit lors du procédé de lyophilisation et ensuite au cours du stockage du lyophilisat. La formulation déterminera l'état physique et thermique du lyophilisat, d'où son importance majeure pour le procédé de lyophilisation.

1.6.2. *Le principe actif.*

a. Les principes actifs synthétiques.

Les principes actifs synthétiques sont obtenus à partir de réactions chimiques organiques ou inorganiques. Le grand avantage de l'utilisation des PA synthétiques est qu'ils peuvent avoir un degré de pureté très grand. L'élimination des impuretés permettra d'avoir un produit lyophilisé sous forme cristalline. L'état cristallin étant plus stable que l'état amorphe, l'utilisation dans certain cas de PA synthétique sera préféré au PA naturel.

b. Les principes actifs naturels.

Les principes actifs naturels sont obtenus à partir de procédés naturels comme par exemple la fermentation. Citons les deux principes actifs les plus importants qui sont les vaccins et les protéines. Les procédés qui permettent de produire les principes actifs naturels sont très lents, contrairement à ceux permettant de produire des principes actifs synthétiques. S'il est possible que pour un même principe actif (exemple protéine naturelle) d'avoir son homologue synthétique, l'utilisation du PA synthétique sera préférée.

1.6.3. *La formulation appropriée.*

Une formulation adéquate tout comme les conditions opératoires du procédé de lyophilisation sont nécessaires à une bonne stabilité du principe actif. Les excipients doivent exercer leur protection pendant la congélation, la déshydratation, le stockage, diminuer la tension de surface, et éviter l'oxydation et/ou l'agrégation. Les sucres et les polyols sont des stabilisateurs universels mais, s'ils sont utilisés en quantité inappropriée, ils peuvent déstabiliser le principe actif. Pour la lyophilisation, il faut au minimum 2% en matière sèche dans la solution de départ et de 2 à 10% de principe actif par rapport à la matière sèche soit 0,002% à 0,04% par rapport à la masse totale du flacon. De plus, la sélection du type et de la nature des bouchons entrent de façon extrinsèque dans la formulation [Corveleyn 1997]. En effet, le verre peut interagir avec la formulation si cette dernière possède des valeurs de pH élevées. De plus, la désorption d'humidité provenant du bouchon dépend de la matière dont il a été traité : application de silicone ou encore la stérilisation. Il a été observé que la désorption de traces incluse dans sa masse, se faisait plutôt pendant l'étape de remise à pression atmosphériques à la fin de la lyophilisation, que pendant la lyophilisation elle-même.

Les cryoprotecteurs peuvent être des polymères comme le BSA(Bovin Serum Albumin), le ficoll, le dextran ou encore du HES (amidon hydroxyéthylé). Certains cryoprotecteurs comme les sucres protègent aussi bien pendant la congélation que pendant les étapes de séchage et sont appelés lyoprotecteurs. Ces lyoprotecteurs se regroupent en 4 familles :

- les sucres : tréhalose, lactose, saccharose, glucose, galactose, maltose, fructose, mannose...
- les polyalcools : mannitol, sorbitol, insitol...

- les acides aminés: glucine, alanine, proline, lysine...
- les méthylamines : triméthylamine-N-oxide, bétaine, sarcosine...

Pendant la congélation, les concentrations des différents solutés augmentent en raison de la cryo-concentration ce qui peut produire une dégradation des principes actifs.

Les sucres et les polyols en solution sont de remarquables lyoprotecteurs pour stabiliser le principe actif durant la congélation et la lyophilisation. Arakawa et al. (1993) suggèrent qu'une concentration en sucre de 0,3 M est le minimum (environ 1% de matière sèche) pour obtenir une stabilité suffisante. Nema et Avis (1993) ont montré que l'ajout de saccharose (de 2% jusqu'à 34%) diminuerait ou voire ferait disparaître la perte d'activité. D'autres sucres ou polyols ont un effet protecteur comme le glycérol, le lactose, le sorbitol et le mannitol entre 0,5 et 1M. Au contraire, de faibles concentrations en saccharides de l'ordre de 5 à 100mM ne peuvent avoir aucun effet, comme par exemple le glucose ou le tréhalose qui n'ont aucun effet protecteur sur la LDH (lactate déshydrogénase) [Carpenter et al., 1993].

Tanaka et al. (1991) ont montré que la concentration en saccharides doit être suffisante pour former une monocouche à la surface de la protéine (ou principe actif) ce qui permet de maximiser sa stabilisation. Un compromis sur le ratio excipient/PA est à trouver car soit ce ratio est suffisant pour la stabilisation soit il est trop important et aucune stabilisation ne sera alors observée. Pratiquement, le ratio massique stabilisant/PA varie entre 1/1 et 10/1 mais il faut bien s'assurer que le PA est bien inclus dans une matrice stabilisante. Pour les systèmes de PA dilués, il est préférable d'utiliser à la fois un agent structurant comme la glycine et le mannitol et un stabilisant. Ainsi, cette association permet d'obtenir à la fois une structure adéquate du lyophilisat et une stabilité optimale sans atteindre de trop fortes concentrations de soluté qui ralentirait la sublimation.

Parmi les disaccharides, le tréhalose et le saccharose sont les plus utilisés. Green et Angell (1989) ont étudié les anomalies du tréhalose pour sa relative efficacité de protection ; ils ont conclu que l'absence de liaisons hydrogène intermoléculaires dans le dihydrate cristallin favoriserait sa capacité à interagir avec la protéine. En milieu acide (pH=5), il serait beaucoup plus efficace que le saccharose et le raffinose. Ces derniers s'hydrolysent plus rapidement que le tréhalose en sucres réducteurs à l'état solide. En revanche, l'inefficacité de certains sucres pourrait dépendre de la longueur de la chaîne glucosidique. Ainsi, une chaîne trop longue pourrait réagir de façon intermoléculaire par liaison hydrogène.

Les polymères sont aussi utilisés, en particulier, pour stabiliser les protéines en solution, pendant la phase de congélation et de déshydratation. Ils peuvent aussi améliorer la stabilité à long terme pendant le stockage en réduisant l'agrégation. Les polymères lyoprotecteurs les plus utilisés sont l'albumine du serum bovin (BSA) ou encore la HSA (human serum albumine), le PVA (polyvinylalcool) et la gélatine.

Les polymères comme le dextran stabilisent la protéine en augmentant la valeur de Tg et en inhibant la cristallisation du saccharose [Skrabanja 1994], en raison de l'augmentation de la viscosité induite par l'ajout de polymère. Cependant, d'autres polymères peuvent déstabiliser la protéine à cause de leur encombrement stérique et ainsi empêcher les liaisons hydrogène

avec la protéine. Comme par exemple, le dextran qui ne s'avère pas un bon protecteur du lysozyme en raison de son incapacité à se lier à la protéine.

Les tensio-actifs abaissent la tension de surface de la protéine en solution et réduisent la force motrice d'adsorption de la protéine et/ou l'agrégation à leur interface. Une faible concentration de détergents non ioniques est souvent plus efficace grâce à leur faible concentration micellaire critique (C.M.C). Le tween 80 est le protecteur le plus utilisé pour protéger le LDH à des concentrations variant entre 0,0005 et 0,01%. Les détergents servent aussi pour stabiliser les protéines pendant la reconstitution.

L'acide ascorbique est fréquemment utilisé comme anti-oxydant, dans le cas où l'oxygène est très fortement absorbé dans la phase cryo-concentré pour limiter la dégradation des protéines.

Les sels stabilisent peu la protéine mais ils sont nécessaires pour parvenir à l'isotonie de la formulation [Hottot et al., 2005] quand il s'agit de produits parentéraux. Dans le cas de la ribonucléase, NaCl et KCl n'ont aucun effet tandis que les sels comme CaCl₂ et KSCN, avec un degré supérieur, ont un effet déstabilisant tout comme les sels bromhydriques.

Des agents structurants sont parfois nécessaires pour apporter un renfort mécanique à la formulation ou lorsque le pourcentage en matière sèche est inférieur à 2%. Citons à titre d'exemple, la glycine, le mannitol, le PVP (polyvinyl pyrrolidone) et certains acides aminés.

Cependant, les excipients peuvent déstabiliser la protéine quand les concentrations ne sont pas adaptées.

Les tampons servent à maintenir le pH optimal d'activité de la protéine pendant tout le procédé de la lyophilisation et aussi pendant le stockage. Ainsi, pour la congélation, il est conseillé de minimiser la concentration en tampon pour éviter sa cristallisation mais cette concentration peut être plus importante pour stabiliser la protéine pendant le stockage [Wang 2000]. Des études ont montré qu'en général le phosphate de potassium maintient la valeur du pH initial de la formulation au cours de la congélation. Cependant, l'étude de l'ensemble tampon-formulation est toujours nécessaire pour éviter des fausses conclusions car un tampon n'interagit pas de la même manière selon l'excipient ou/et la protéine présents dans la formulation. De plus, le lyoprotecteur doit permettre d'éviter les variations de pH très souvent néfastes à l'efficacité thérapeutique et à la stabilité du principe actif après lyophilisation.

1.7 Lyophilisation en milieu non aqueux.

Comme vu dans les paragraphes précédents, dans leur grande majorité, les formulations pharmaceutiques destinées à être lyophilisées sont des solutions aqueuses. Dans ce cas l'eau est typiquement le seul solvant qui va être éliminé par sublimation ensuite par désorption. Cependant, il existe des cas où la lyophilisation à partir d'un solvant organique ou d'un mélange d'eau et de co-solvant organique présente une formulation plus avantageuse par rapport à la lyophilisation à partir d'un milieu aqueux. On peut citer l'exemple du CAVARJECT, qui est un produit pharmaceutique commercial obtenu par lyophilisation à partir d'un système avec co-solvant organique: 20% (v/v) ter-butanol/eau.

L'utilisation de solvants ou de co-solvants organiques est favorable aussi bien pour les facteurs de qualité du produit fini que pour les coûts opératoires du procédé. Parmi ces avantages, on peut citer : l'augmentation de la vitesse de sublimation et, par conséquent, une diminution du temps de séchage, l'amélioration de la stabilité chimique de la solution à lyophiliser, l'augmentation de la stabilité chimique du produit sec, la facilité de préparation de la solution grâce à l'augmentation de la mouillabilité et de la solubilité du produit. Ainsi l'utilisation de tels systèmes permet d'améliorer les propriétés de reconstitution (exemple: diminution du temps de reconstitution) et d'assurer la stabilité de la solution à lyophiliser [Teagarden et Baker 2001]. Cependant, on doit être conscient de la multitude des problèmes que peut engendrer l'utilisation des solvants organiques: toxicité due aux solvants, problèmes de sécurité liées à l'utilisation de produits inflammables et/ou explosifs (ce qui peut nécessiter des équipements spéciaux ATEX), les solvants utilisés doivent avoir une grande pureté, la nature et la teneur en impuretés doivent être connues avec exactitude et, souvent, un très faible niveau résiduel du solvant est imposé par une réglementation stricte (toxicité).

On doit garder toujours à l'esprit qu'une formulation adéquate nécessite de connaître les relations entre la formulation, les conditions opératoires de lyophilisation et de stockage ainsi que les nombreux attributs du lyophilisat. Ces mêmes principes sont applicables dans le cas de l'utilisation des solvants organiques. Les avantages et les inconvénients de leur utilisation doivent être soigneusement examinés avant leur sélection éventuelle pour la production de produits pharmaceutiques lyophilisés, particulièrement lorsqu'il s'agit d'une forme injectable. Le tableau 1.2 représente les principaux solvants organiques utilisés pour la lyophilisation de produits pharmaceutiques. Dans ce tableau on a aussi reporté quelques propriétés physiques et physico-chimiques de chacun de ces solvants. Plusieurs produits pharmaceutiques ou médicaments sont obtenus par lyophilisation en milieu non aqueux. Le système de solvant est choisi sur la base des informations citées ci-dessus. Le tableau 1.3 regroupe quelques exemples de médicaments préparés avec des co-solvants organiques. En plus de l'utilisation de la lyophilisation à partir de co-solvants organiques pour la production de poudre pharmaceutique, cette technique est aussi utilisée dans la préparation de spécimens biologiques ou pour l'isolation de la lécithine. La lyophilisation de spécimens biologiques à partir de co-solvants organiques améliore la préservation du spécimen pour l'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB). Le ter-butanol semble être le principal solvant organique choisi pour cette utilisation. La structure de la surface de l'échantillon reste intacte lorsqu'il est congelé rapidement puis lyophilisé à partir d'un solvant organique approprié tel que le ter-butanol.

| Solvent | Solubility in water (%) ^a | Vapor pressure (mm Hg at 20°C) | Freezing point (0C) | Boiling point (0C) | Flammability | | | |
|------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------------|---|---|
| | | | | | Flash point (OFR) | Autoignition temperature (OFR) | Lower flamm. limit (in air vol, %) | Upper flamm. limit (in air vol, %) |
| Tert-butanol | 100 | 26.8 | 24.0 | 82 | 52/11 | 892/478 | 20 ⁴ | 8.0 |
| Ethanol | 100 | 41,0 | -114 | 78.5 | 62/16 | 793/423 | 3.3 | 19 |
| n-propanol | 100 | 14.5 | -127 | 97.1 | 59/15 | 760/404 | 2.1 | 13.5 |
| n-butanol | 7.7 | 5.6 | -90 | 117.5 | 95/35 | 689/365 | 1 ^A | 11,2 |
| Isopropanol | 100 | 31,0 | -89.5 | 81 | 53.6/12 | 750/398 | 2.5 | 12 |
| Ethyl acetate | 8.7 | 64.7 | -84 | 77,1 | 24/-4 | 800/426 | 2.2 | 11,5 |
| Dimethyl carbonate | 9.5 | 72 | 2 | 90 | 65/18 | — | 4.2 | 12.9 |
| Acetonitrile | 100 | 69.8 | -48 | 80.1 | 45/8 | 975/524 | 40 ⁴ | 16.0 |
| Dichloromethane | 1,3 | 343.9 | -97 | 40 | none | 1033/536 | 14 | 22 |
| Methyl ethyl ketone | 27 | 76.2 | -87 | 79.6 | 26/-3 | 885/474 | 1,7 | 10.1 |
| Methyl isobutyl ketone | 2.0 | 5.1 | -80 | 117 | 56/13 | 860/460 | 1,2 | 8 |

Tableau 1.2 : Propriétés physiques de quelques solvants organiques utilisés en lyophilisation [Teagarden et Baker 2001]

| Drug | Co-solvent system |
|--|---|
| Alprostadil (CAVERJECT S.Po.) | 20% v/v tert-butanol/water |
| Aplidine | 40% v/v tert-butanol/water |
| Amoxicillin sodium | 20% v/v tert-butanol/water |
| Tobramycin sulfate | Tert-butanol/water |
| Gentamicin sulfate | Tert-butanol/water |
| N-cyclodexyl- N-methyl-4-(2-oxo-1,2,3,5-tetrahydroimidazo-[2, 1-b]quinazolin-7-yl)oxybutyramide with ascorbic acid | 50% v/v tert-butanol/water |
| Cyclohexane-1,2-diamine Pt(II) complex | Tert-butanol |
| Annamycin | Tert-butanol/ dimethyl sulfoxide/water |
| Cephalothin sodium | 5% w/w isopropyl alcohol/water |
| Cephalothin sodium | 4% ethanol, 4% methanol, or 4% acetone/water |
| Prednisolone acetate/ polyglycolic acid | Carbon tetrachloride/ hexafluoroacetone sesquihydrate |
| Gabexate mesylate | Ethanol/water |
| Piraridin hydrochloride | Ethanol/water |
| Progesterone, coronene, fluasterone, phenytoin | Chlorobutanol hemihydrate/ dimethyl sulfone |
| Fructose-1,6-diphosphate | Tert-butanol/water |
| Poly(lactide-co-glycolide) | Acetic acid |
| Dioleoylphosphatidylcholine and dioleoylphosphatidylglycerol | Cyclohexane |
| Vecuroniumbromide | Acetonitrile |
| Bovine pancreatic trypsin inhibitor | Dimethyl sulfoxide/ 1% water |

Tableau 1.3 : Exemples de produits pharmaceutiques lyophilisés à partir de co-solvants organiques [Teagarden et Baker 2001]

1.7.1. Préparation de la solution.

La première étape dans la fabrication de tous les produits lyophilisés est la préparation d'une solution liquide. Ces solutions sont typiquement aseptisées, filtrées, introduites dans des flacons stériles et enfin lyophilisées. Certains composés hydrophobes (médicaments ou excipients) sont difficiles à solubiliser ou demandent une grande quantité d'eau pour parvenir à une dissolution adéquate. Dans ce cas, l'utilisation de co-solvants organiques permet d'augmenter la solubilité [Elgindy et al., 2010], de faciliter le mouillage des substances hydrophobes, de diminuer le temps de formation d'une solution ou d'une dispersion homogène et de réduire la quantité de solvant à éliminer pendant l'étape de dessiccation. Toutes ces caractéristiques peuvent avoir un effet particulièrement positif sur la consistance et la facilité de fabrication du produit. On peut citer deux exemples de médicaments solubles dans des co-solvants organiques: l'Alprostadil formulé à l'aide d'un mélange tert-butanol/eau et Phosphodiesterase complexé avec des vitamines et formulé dans une solution ter-butanol/eau. D'autres alcools tels que l'éthanol, le n-propanol, ou l'isopropanol sont recommandés pour augmenter la solubilité de certains principes actifs. Le mélange eau+tert-butanol (co-solvant) à 40% (v/v) de tert-butanol sélectionné pour solubiliser et lyophiliser l'Aplidine, augmente de 40 fois la solubilité du produit par rapport à une solution aqueuse.

1.7.2. Stabilité de la solution.

Le déficit majeur dans le développement de produits stériles injectables est sa durée de vie limitée en solution. Pour surmonter ce problème d'instabilité, la majorité de ces produits sont développés sous forme solide par lyophilisation. Nous savons que l'élaboration d'un produit lyophilisé nécessite d'abord la préparation d'une solution, la filtration pour la stérilisation, le remplissage dans les flacons, et finalement la lyophilisation pour éliminer le solvant. Toutes ces opérations se font par manipulation du produit sous forme liquide pendant une période donnée. Toutefois, une fois en solution, le produit peut atteindre différents états de dégradation qui dépendent des cinétiques des mécanismes de dégradation. La présence de solvants organiques à différents teneurs peut aussi avoir un effet important sur la stabilité chimique et biologique [Zhang et al., 2009] de la solution. Les médicaments instables en solution aqueuse demandent une stabilité supplémentaire pour atteindre un niveau de dégradation acceptable pendant la fabrication. Le (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) est un agent antinéoplasique (substance qui détruit les cellules cancéreuses ou qui empêche leur prolifération) dont les formulations aqueuses sont rapidement dégradables ; une étude a été menée sur la lyophilisation de ce produit à partir d'un mélange éthanol/eau pour améliorer sa stabilité en solution [Flamberg et al., 1970]. Cependant, les résultats obtenus étaient insatisfaisants à cause d'un aspect inacceptable du lyophilisat et d'une perte importante de produit. L'Alprostadil a été lyophilisé avec succès à partir d'un mélange co-solvant tert-butanol/ eau. La cinétique de premier ordre de la réaction de dégradation de l'Alprostadil dans un mélange ter-butanol 20 % (v/v) /eau 80 % ($k=0.0011/\text{jour}$ à 25°C) a été nettement réduite comparativement à celle observée avec une solution purement aqueuse à la même valeur de pH ($k=0.0041/\text{jour}$ à 25°C). La diminution de la vitesse de dégradation a permis de réaliser les opérations de préparation de la solution à température ambiante et sans refroidir la solution.

En plus, une flexibilité supplémentaire dans la planification de ces différentes opérations a été obtenue puisque les réactions de dégradation en solution étaient minimisées. Le Trecetilide fumarate est un principe actif injectable contre l'arythmie (altération du rythme normal d'un organe, arythmie cardiaque, arythmie respiratoire) stabilisé par lyophilisation à partir d'un système à co-solvant organique ter-butanol/eau [Baker 1998]. Les analyses cinétiques montrent que la dégradation en solution survient selon un mécanisme de substitution SN 1 et une élimination EI. Les facteurs tels que la force ionique, le type de tampon, le pH de la solution, la concentration du produit et des tampons n'affectent pas la vitesse de dégradation; la déstabilisation du groupement fluorure est l'une des rares méthodes pour contrôler cette réaction. L'utilisation du co-solvant ter-butanol/eau diminue la vitesse de dégradation en solution d'un facteur allant de 4 à 5 ce qui permet de mieux conduire le procédé et de contrôler le niveau de dégradation. La vitesse de dégradation est d'autant plus faible que la teneur en ter-butanol est plus importante. L'expérience a montré que la difficulté de déplacement du groupement fluorure est le principal facteur pour améliorer la stabilité du Trecetilide fumarate. L'aptitude du ter-butanol à solvater et à stabiliser les deux ions apparaît comme un facteur important. L'utilisation du ter-butanol permet la solubilisation du Trecetilide fumarate et le remplissage dans les flacons pendant une période supérieure à 24 heures. Le lyophilisat résultant peut avoir une durée de vie acceptable d'au moins deux ans à température ambiante. Cela présente un avantage très significatif par rapport à la solution aqueuse congelée qui doit être maintenues à -80°C et qui possède une durée d'utilisation de 3 heures (après décongélation). Ce type de résultat est certainement transposable à beaucoup d'autres produits susceptibles de se dégrader en solution.

1.7.3. Influence de la nature des co-solvants sur le procédé de lyophilisation

1.7.3.1 Effet sur la congélation.

La première étape de la lyophilisation implique la congélation de la solution pour extraire le solvant du principe actif et des excipients à travers la formation de cristaux de solvant, le plus souvent de glace. C'est pourquoi le système est d'abord refroidi pour faire passer tous les composés à l'état solide. Ce refroidissement s'accompagne très souvent d'une surfusion puisque la nucléation commence à une température inférieure à la température d'équilibre thermodynamique de la solution donnée par le diagramme d'état (liquidus). Par conséquent, lors de la congélation, la croissance des cristaux tend à être rapide et conduit à un mélange complexe avec différentes phases sous forme cristalline, amorphe et métastable. L'impact des solvants organiques sur les différentes phases de lyophilisation a été largement discuté [Seager et al., 1978,1985; Seager 1978, 1979a,b]. Comme prévu, la nature et la concentration du solvant affectent les caractéristiques de la solution congelée avant séchage (sublimation), à savoir: la taille et la morphologie des cristaux de glace ou de solvant, la vitesse de sublimation, la température de collapse, l'apparence du produit sec ou 'gâteau', la surface spécifique de ce gâteau, les propriétés de reconstitution, etc. Le solvant peut aussi affecter le degré de cristallinité du produit. Il a été montré que l'incorporation d'alcool isopropylique donne facilement du Cefazolin sodium hautement cristallin [Koyama et al., 1988]. Pour améliorer ce procédé, un traitement thermique (ou recuit) est parfois recommandé, ce traitement assurant une recristallisation plus au moins poussée du produit congelé. Inversement, l'utilisation de co-solvants peut avoir dans certains cas un effet négatif sur la morphologie pendant la congélation. L'utilisation de solvants organiques volatils, tels que le

tert-butanol peut provoquer la précipitation du produit lors de la dernière phase de la congélation à cause de l'évaporation du solvant. Ce phénomène peut alors entraîner une augmentation de la concentration du produit jusqu'à atteindre son niveau de saturation [Seager 1979b]. Une attention particulière doit aussi être accordée aux changements de concentration des excipients et des tampons de façon à ce qu'ils n'excèdent jamais leur niveau de saturation. Cette précaution est particulièrement nécessaire pour les tampons phosphatés puisqu'ils ont une faible solubilité en présence de certains cations tels que l'aluminium, le calcium ou le fer [Hasegawa et al., 1982a, b, c, 1983]. La précipitation des sels donne une solution trouble après reconstitution. La taille et la morphologie des cristaux de glace peuvent alors varier selon la nature des solvants organiques choisis. La présence de solvants organiques possédant un point de fusion élevé tel que le ter-butanol ($T_f=25^\circ\text{C}$) entraîne la cristallisation du solvant dans la matrice de glace au fur et à mesure que la température diminue [Rey 2004].

La présence de ter-butanol altère la morphologie des cristaux de glace lors de leur formation. La taille des cristaux de glace change avec la quantité de ter-butanol dans le système. Des analyses thermiques (DSC, cryomicroscopie) ont été faites pour évaluer les différents états stables et métastables qui se forment pendant la congélation [Kasraian et Deluca 1995a]. Ces données suggèrent qu'une concentration en ter-butanol entre 3 et 20% w/w conduit à la formation de cristaux de glace de forme dendritique. Lorsqu'ils sont sublimés, ces gros cristaux créent de gros pores et une matrice plus perméable à la vapeur d'eau ce qui favorise l'étape de sublimation. D'autres solvants tel que le di méthyle carbonate conduisent après congélation à un eutectique, constitué d'un solvant organique solide mélangé avec la glace, le principe actif et les excipients. Néanmoins, la plupart des solvants organiques étudiés [Seager et al., 1985] tel que le méthanol, l'éthanol, n-propanol, n-butanol, acetonitrile, méthyle éthyle ketone, dichloromethane, le méthyle isobutyle ketone ne congèlent pas dans les lyophilisateurs classiques mais ils restent sous forme de résidus liquides dans la matrice congelée. Des solutions contenant 8% d'éthyle acétate, 10% diméthyle carbonate ou 10% n-butanol subliment rapidement. Des solutions contenant une quantité d'éthanol supérieure à 20% sont presque impossible à sécher et conduisent un gâteau collapsé [Seager et al., 1985].

Certains solvants plus hydrophiles tels l'éthanol ou le méthanol retiennent une quantité significative d'eau qui congèle partiellement lorsque la température diminue. Dans le cas des systèmes qui congèlent complètement (exemple tert-butanol/eau), les cristaux de glace se développent verticalement vers le haut du flacon jusqu'à atteindre la surface du lyophilisat en y formant une couche d'eutectique. Les solvants hydrophiles susceptibles de retenir une grande quantité d'eau forment des couches liquides épaisses contenant des cristaux. Les solvants moins hydrophiles forment des couches plus fines avec moins de cristaux.

Les échantillons à sécher doivent être protégés des flux radiatifs pour prévenir les fluctuations de température et un séchage hétérogène. Ceci est particulièrement important dans le cas des co-solvants organiques, puisque la chaleur de sublimation est nettement plus faible que celle de la glace [Willemer 1975]. Il est également intéressant de noter que le temps de remplissage et la congélation de la solution doivent être attentivement contrôlés. Le caractère volatil de la fraction organique de la solution peut provoquer une perte partielle du solvant organique par évaporation lors de la préparation des échantillons avant lyophilisation. Il faut également être attentif aux phénomènes de reflux lors de l'utilisation de solvants très volatils tel que le ter-

butanol. Cette situation peut se produire lorsque le ter-butanol se condense et ruisselle sur les parois du col du flacon et retourne ainsi dans la solution. Après lyophilisation, le flacon peut présenter des taches de poudre au niveau du col. Cet aspect est indésirable à cause de sa mauvaise apparence et d'un possible effet de contamination au contact avec le bouchon en caoutchouc. Ce problème peut alors être minimisé en écourtant la période entre le remplissage et la congélation de la solution.

1.7.3.2 Influence sur l'étape de sublimation.

L'utilisation des co-solvants organiques a un impact direct sur la vitesse de sublimation. Les équations (1-12) et (1-30) ci-dessous restent applicables dans les cas des formulations préparées à partir des co-solvants organiques.

$$\dot{m} = \frac{P_0 - P_c}{R_p} \quad (\text{Eq 1-12})$$

$$\dot{m} = A_v K_v (T_{shelf} - T_b) / \Delta H_s \quad (\text{Eq 1-30})$$

D'après ces équations le débit de sublimation \dot{m} est directement dépendant des deux principales données thermodynamiques du mélange de co-solvants qui sont la pression de vapeur à l'équilibre solide vapeur P_0 et l'enthalpie de sublimation ΔH_s . Ces valeurs sont à déterminer avec précision car elles sont indispensables à la bonne compréhension de l'évolution de la vitesse de sublimation. L'autre facteur qui agit directement sur le débit de sublimation est la résistance de la couche sèche. Cette résistance est directement liée à la taille des cristaux de co-solvants qui ont été formés pendant la phase de congélation. Ainsi une caractérisation de la taille des cristaux est nécessaire pour mettre en évidence son influence sur la vitesse de sublimation.

Teagarden et Baker (2001) expliquent que beaucoup de co-solvants utilisés en lyophilisation augmentent la vitesse de sublimation car ils ont une pression de vapeur plus élevée que celle de l'eau et, par conséquent, présentent une plus grande force motrice de transfert. Nous allons dans notre étude nous intéresser au cas du mélange TBA/eau et vérifier si la pression de vapeur du TBA solide est supérieure à celle de la glace, ce qui expliquerait l'augmentation de la vitesse de sublimation. Deluca et al. (1989b) remarquent dans leur étude une accélération considérable de la vitesse de sublimation de deux matrices congelées de lactose et de sucrose avec des concentrations en ter-butanol de 5 et 10 % massiques. Ces auteurs ont observé que le lactose et le sucrose sont lyophilisés avec succès en présence de ter-butanol à une température d'étagère considérablement plus élevée que celle correspondant à une formulation purement aqueuse, la vitesse de sublimation étant nettement augmentée en utilisant le ter-butanol comme co-solvant. La lyophilisation de sucrose en présence de ter-butanol réduit de moitié la durée de sublimation, et avec une température de collapse largement augmentée. Le ter-butanol congèle rapidement et reste à l'état congelé durant la phase de dessiccation primaire. L'ajout de ter-butanol permet de former une matrice poreuse très perméable et avec une

surface spécifique plus importante ce qui facilite le transfert de masse de la vapeur grâce à la faible résistance du gâteau. La lyophilisation de formulations semblables à base de carbohydrates tels que le lactose, formulées à partir du mélange ter-butanol/eau (exemple: CAVERJECT) conduit à des structures poreuses comme illustré par microscopie électronique à balayage (MEB) sur la figure 1.16. Cependant, il a été également observé que l'utilisation en lyophilisation d'autres solvants susceptibles de ne pas congeler dans les lyophilisateurs classiques, avec des concentrations de l'ordre de 5% (exemples: méthanol, éthanol, isopropanol, acétone, n-butanol ou dioxane) conduit à des gâteaux de lactose et de sucrose collapsés.



Figure 1.16 : Image obtenue par MEB d'un produit pharmaceutique lyophilisé à partir de co-solvants organiques [Teagarden et Baker 2001]

Une étude plus approfondie a été menée sur la lyophilisation d'une solution à 5% en sucrose à partir de ter-butanol, considéré comme un "accélérateur" des phénomènes de transfert [Kasraian 1994 ; Kasraian et Deluca 1995b]. Il a été à nouveau observé que la phase de dessiccation primaire est beaucoup plus rapide lorsqu'on utilise un mélange TBA/eau (5% en ter-butanol) par réduction du temps de séchage d'un facteur 10 et la surface spécifique du gâteau sec augmente à peu près d'un facteur 13. De plus, la présence du ter-butanol n'affecte pas la température de collapse et cette sublimation rapide empêche le produit d'atteindre la température de collapse.

Le mélange ter-butanol a été utilisé également pour augmenter la vitesse de lyophilisation d'un médicament modèle, le gentamicin sulfate [Baldi et al., 1994]. Le système de co-solvant étudié n'a toutefois pas permis d'obtenir un lyophilisat acceptable. Tous les composés de la formulation étudiée, c'est-à-dire le principe actif, la fraction ter-butanol/eau, la quantité de maltose ajoutée (utilisée comme matrice pharmaceutique susceptible d'assembler les différents composés) ont été optimisés ce qui a permis de réduire le temps de séchage de 40 % et d'obtenir un lyophilisat avec une porosité acceptable vis-à-vis de sa vitesse de réhydratation. L'ajout de maltose est apparu comme le paramètre clé dans le cas particulier de cette formulation.

1.7.4. Stabilité du produit lyophilisé.

Il est intéressant de noter que la stabilité chimique du produit sec peut être influencée par le type de solvant avec lequel il a été lyophilisé. La poudre du Caverject obtenue par lyophilisation à partir d'un système eau co-solvant (20 % v/v ter-butanol) est beaucoup plus stable que celle obtenue à partir d'une simple solution aqueuse. L'amélioration de la stabilité du produit semble liée à une nette augmentation de la surface spécifique du produit sec (à peu près 5 fois) obtenue en utilisant ce système à base de tert-butanol. La figure 1.17 montre que la constante de la vitesse de dégradation est reliée aux surfaces spécifiques correspondantes.

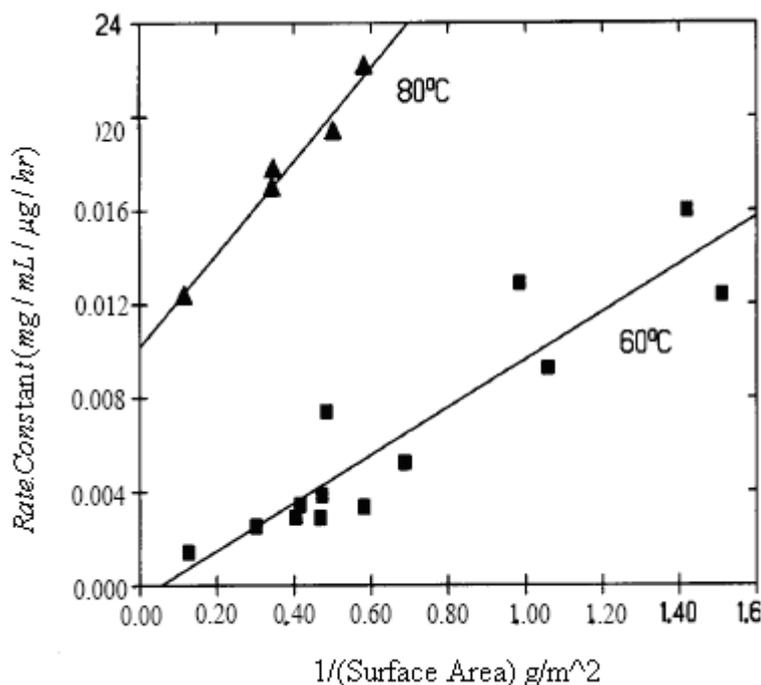


Figure 1.17 : Influence de la surface spécifique de la poudre stérile du Caverject lyophilisé à partir d'un co-solvant sur la vitesse de dégradation [Teagarden et Baker 2001].

Pour le principe actif, Alprostadil, les cinétiques de dégradation expérimentales mesurées (c'est-à-dire la vitesse de formation du principal produit des dégradations, noté PGA1), suivent un mécanisme de dégradation de second ordre. L'augmentation de la stabilité chimique semble due à une surface spécifique du lyophilisat plus importante, ce qui augmenterait la distance entre les molécules d'Alprostadil, diminuerait ainsi leurs interactions. Le Cefazolin sodium est un autre exemple de produit lyophilisé à partir d'un système avec co-solvant (mélange d'alcool isopropylique/eau) et pour lequel le lyophilisat obtenu présente une stabilité chimique plus importante [Koyama et al., 1988].

En présence d'alcool propylique, le Cefazolin sodium initialement amorphe, cristallise pendant la congélation. La lyophilisation à partir d'alcool isopropylique couplée à un traitement thermique (recuit) favorise la formation de la phase cristalline du produit, phase qui présente une meilleure stabilité. L'utilisation de co-solvants organiques s'avère doublement bénéfique, d'une part, en raison de temps de lyophilisation plus courts, et, d'autre part, du fait que l'on obtient un lyophilisat moins collapsé. D'autres alcools à courte chaîne de carbone tels

que le méthanol, l'éthanol et le n-propanol sont également connus pour avoir le même effet sur le cefazolin sodium [Cise et Roy 1981]. Par contre, dans certains cas, la lyophilisation à partir de co-solvants organiques peut donner des systèmes moins stables, par exemple lors de la lyophilisation d'une protéine bovine à partir d'un mélange 1 % eau/diméthyle sulfoxyde [Desai et Klibanov 1995]. Les résultats expérimentaux ont montré que la protéine dissoute est suffisamment dénaturée au point de réduire son activité enzymatique après reconstitution.

1.7.5. Influence sur les propriétés de reconstitution.

L'aptitude du lyophilisat à se reconstituer rapidement après ajout d'un solvant pharmaceutique approprié dépend de plusieurs facteurs. La morphologie (surface spécifique, porosité) du produit sec, le degré du collapse du gâteau ou de fonte qui peut apparaître au cours du séchage, la présence de couches hydrophobes et l'homogénéité de la matrice sèche sont des facteurs qui peuvent tous influencer les propriétés de reconstitution du produit sec. Selon la nature du co-solvant utilisé et les conditions opératoires du procédé (température, pression, vitesse de congélation), le lyophilisat peut ou ne peut pas se reconstituer entièrement. Donc, on aura besoin d'évaluer ces propriétés au cas par cas. Néanmoins, il existe des exemples tels que le sucrose et le lactose lyophilisés à partir d'une solution de tert-butanol/ eau ; le lyophilisat obtenu étant amorphe et présentant une grande surface spécifique, on a constaté que ces matrices tendent à se dissoudre extrêmement rapidement après ajout du solvant [Deluca et al., 1989b; Teagarden et al., 1998 a]. Il est également important de discerner les conséquences du mode d'extraction à partir des systèmes de remplissage et de stockage (c'est-à-dire les flacons, les bouchons, les filtres et les tubes) utilisés pour la filtration et le remplissage de la solution à lyophiliser. En particulier, l'utilisation de flacons et de bouchons silicatés peut engendrer des problèmes lors de l'utilisation des solvants organiques car ces derniers peuvent dissoudre ou extraire l'huile de silicone du flaconnage (flacon+bouchon). En effet, l'huile de silicone extraite peut alors empêcher un bon mouillage de certaines parties du gâteau au moment de la réhydratation et il en résulte un produit difficile à reconstituer et une solution trouble après réhydratation.

1.7.6. Amélioration de la stérilité

Etant donné que beaucoup de produits lyophilisés sont injectables, il est recommandé de travailler dans des conditions garantissant des produits stériles. Beaucoup de solvants organiques utilisés en lyophilisation possèdent des propriétés antibactériennes [Olsen 1997]. L'éthanol et l'isopropanol à une concentration supérieure à 20 % ont une excellente activité microbicide contre les bactéries Gram-positives (les bactéries qui résistent à la coloration à l'alcool) et les bactéries Gram-négatives (les bactéries décolorées à l'alcool), les mycètes (décomposition des matières organiques par les germes microbiens et les mycètes saprophytes avec production de gaz), ou les levures [Wallhausser 1984]. De plus, l'éthanol pur est moins bactéricide que le mélange éthanol/eau, car ce dernier contribue à la dégradation des membranes biologiques, le solvant altérant les protéines constituant la membrane. Le tert-butanol révèle des propriétés antibactériennes excellentes contre *P.aeruginosa*, *E.coli*,

S.aureus et S.epidermidis. Il existe aussi plusieurs organismes résistants aux solvants organiques [Inoue et Horikoshi 1989 ; Pinazo et al., 1993]. Cependant, les solvants organiques ne garantissent pas toujours les propriétés antiseptiques requises de la solution. Chaque formulation doit être évaluée selon sa nature pour déterminer l'antiseptique le plus approprié.

1.7.7. Classification toxicologique des solvants organiques.

Il est possible qu'en fin de lyophilisation des traces de solvants persistent. Étant donné que dans la majorité des cas les solvants résiduels n'ont aucun apport thérapeutique, il est souhaitable que la quantité résiduelle de ceux-ci soit très faible en accord avec le cahier des charges. Un des critères qui limite la quantité de solvants résiduels est leur toxicité aiguë. Ainsi la DL₅₀ de plusieurs solvants organiques utilisée en lyophilisation a été étudiée par [Teagarden et Baker 2001]. Hubbard (1997) fournit une liste exhaustive de solvants pouvant être utilisés en lyophilisation ainsi que leur quantité résiduelle limite. De manière générale, les solvants sont classés par classes. La classe 1 comporte les solvants dit CMR qui sont considérés comme cancérigènes, mutagènes et dangereux pour l'environnement. Ceux-ci sont à éviter. La classe 2 comporte les solvants carcinogènes non génotoxiques pour les animaux ou agents provoquant d'autres effets toxiques irréversibles, comme des effets neurotoxiques ou tératogènes. Leur utilisation doit être limitée. Cependant il existe des solvants de classe 2 utilisés pour la lyophilisation des produits pharmaceutiques rassemblés dans le tableau 1.4 ci-dessous :

| Class 2 Solvents in Pharmaceutical Products | | |
|---|-----------------------------------|---------------------------|
| Solvent | Permitted daily exposure (mg/day) | Concentration limit (ppm) |
| Acetonitrile ^a | 4.1 | 410 |
| Chlorobenzene | 3.6 | 360 |
| Chloroform | 0.6 | 60 |
| Cyclohexane ^a | 38.8 | 3880 |
| 1,2-dichloroethene | 18.7 | 1870 |
| Dichloromethane ^a | 6.0 | 600 |
| 1,2-dimethoxyethane | 1.0 | 100 |
| N,N-dimethylacetamide | 10.9 | 1090 |
| N,N-dimethylformamide | 8.8 | 880 |
| 1,4-dioxane | 3.8 | 380 |
| 2-ethoxyethanol | 1.6 | 160 |
| Ethylene glycol | 6.2 | 620 |
| Formamide | 2.2 | 220 |
| Hexane | 2.9 | 290 |
| Methanol ^a | 30.0 | 3000 |
| 2-methoxyethanol | 0.5 | 50 |
| Methylbutyl ketone | 0.5 | 50 |
| Methylcyclohexane | 11.8 | 1180 |
| N-methylpyrrolidone | 48.4 | 4840 |
| Nitromethane | 0.5 | 50 |
| Pyridine | 2.0 | 200 |
| Sulfolane | 1.6 | 160 |
| Tetralin | 1.0 | 100 |
| Toluene | 8.9 | 890 |
| 1,1,2-trichloroethene | 0.8 | 80 |
| Xylene | 21.7 | 2170 |

^aOrganic solvent evaluated in freeze-drying.

Tableau 1.4 : Solvants de classe 2 utilisée pour la lyophilisation des produits pharmaceutiques. [Teagarden et Baker 2001]

Ce même tableau indique les limites d'exposition quotidiennes admissibles permises. On admet que la quantité de solvants résiduels ne doit pas dépasser la concentration maximale tolérée.

La dernière classe de solvants (classe 3) comporte les solvants peu toxiques pour l'homme. Une liste de ces solvants utilisés en lyophilisation est donnée par le tableau 1.5.

| Class 3 Solvents Which Should Be Limited by GMP or Other Quality-Based Requirements | |
|--|------------------------|
| Acetic acid" | Heptane |
| Acetone" | Isobutyl acetate |
| Anisole | Isopropyl acetate |
| 1-butanol" | Methyl acetate" |
| 2-butanol" | 3-methyl-1-butanol |
| Butyl acetate | Methylethyl ketone" |
| Tert-butylmethyl ether | Methylisobutyl ketone" |
| Cumene | 2-methyl-1-propanol |
| Dimethyl sulfoxide" | Pentane |
| Ethanol" | 1-pentanol" |
| Ethyl acetate" | 1-propanol" |
| Ethyl ether | 2-propanol" |
| Ethyl formate | Propyl acetate |
| Formic acid | Tetrahydrofuran |

Tableau 1.5 : Solvants de classe 3 utilisée pour la lyophilisation des produits pharmaceutiques. [Teagarden et Baker 2001]

1.7.8. Limites d'explosivités.

La majeure partie des solvants utilisés pour la lyophilisation sont facilement inflammables. Ainsi le travail sous atmosphère non explosive est de rigueur. Une connaissance des limites inférieures et supérieures d'inflammabilité est obligatoire. Ainsi le ter-butanol présente des limites d'inflammabilité dans l'air de 2,4% et 8% en volume. Afin d'éviter tout risque d'explosion, il est nécessaire de rester en dehors de cet intervalle. Une autre façon de limiter les risques d'inflammabilité est de réduire la quantité de comburant (air) présente dans le lyophilisateur. Ainsi, d'après l'article 3 des directives de l'ATEX, on peut considérer que l'inflammation est impossible lorsque la pression dans le lyophilisateur est maintenue inférieure à 60 mbar (6000 Pascal). Concernant le ter-butanol, cette limite a été déterminée expérimentalement par Fauske et Associates. La valeur à ne pas dépasser pour prévenir tout risque d'inflammation du ter-butanol est de 75 mbar (7500 Pascal). Ces limites sont tout à fait rassurantes puisque les pressions de travail pendant l'étape de sublimation et celle de dessiccation secondaire dépassent rarement les 500 Pascal.

CHAPITRE 2

IMPLEMENTATION DE LA METHODE THERMOGRAVIMETRIQUE COMME OUTIL DE DETERMINATION DE DONNEES THERMODYNAMIQUES D'EQUILIBRES.

2. Détermination expérimentale des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur et des enthalpies de sublimation du tert-butanol pur et du mélange eutectique 90% TBA + 10% eau (massique) par deux méthodes différentes : la méthode Thermogravimétrique et la méthode Statique.

Cette partie de la thèse fait suite aux travaux de thèse de Rim Daoussi et al. (2009) qui ont avantageusement lyophilisé un principe actif pharmaceutique fourni par Sanofi Montpellier à partir du mélange eutectique à 90% de TBA (co-solvant) + 10% d'eau (% massique). Pour cette composition eutectique, ces auteurs ont observé des cinétiques de séchage très rapides et, par conséquent, une forte diminution de la durée de l'étape de sublimation. Afin d'expliquer la diminution des temps de séchage, les données thermodynamiques telles que les pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur et l'enthalpie de sublimation ont été déterminées expérimentalement par ces mêmes auteurs [Daoussi et al., 2011]. Ces données thermodynamiques absentes dans la littérature, sont des données clef pour la modélisation des vitesses de sublimation et donc des temps de séchage. La détermination expérimentale de ces données thermodynamiques a été effectuée par deux méthodes différentes. Une méthode de détermination classique nommée la méthode Statique et une **nouvelle méthode originale : la méthode Thermogravimétrique**. L'utilisation de la méthode Thermogravimétrique, comme technique rapide de détermination de ces données thermodynamiques a été implémentée pour des corps liquides et solides purs. De plus, cette méthode a aussi été validée pour les mélanges particuliers qui présentent une composition azéotropique/eutectique comme est le cas du système à 90% de TBA + 10 % d'eau [Bogdani et al., 2011].

2.1 Résumé des travaux de thèse de Rim Daoussi.

Au cours de ses travaux de thèse, Rim Daoussi (2008) a étudié la lyophilisation d'un principe actif pharmaceutique hydrophobe fourni par Sanofi Montpellier à l'aide de mélanges de co-solvant organique (tert-butanol + eau). Le principe actif a été avantageusement lyophilisé pour trois mélanges dans les proportions suivantes : 100% TBA, 80% TBA + 20% eau et le mélange eutectique 90% TBA + 10% eau (% massiques). Une étude complète de formulation et d'optimisation du procédé a été effectuée par Rim Daoussi (2008). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux résultats concernant les cinétiques de sublimation déterminées expérimentalement par Daoussi et al. (2009) à l'aide de la microbalance Christ. Ces études ont montré que l'utilisation du TBA en tant que co-solvant diminue les temps de séchage d'un facteur 10 par comparaison avec ce que l'on observe dans la littérature pour les formulations à base aqueuse lyophilisées dans les mêmes conditions opératoires [Roth et al 2001]. Au cours de cette étude, les influences de la température des étagères, de la pression de la chambre de lyophilisation et de la concentration initiale en TBA sur les cinétiques de sublimation ont été minutieusement étudiées [Daoussi et al., 2009]. La figure 2.1 présente les cinétiques de sublimation obtenues pour une température d'étagère de -20°C et une pression totale de la chambre de lyophilisation de 6 Pa pour les trois formulations étudiées. Ces cinétiques de sublimation sont présentées en fonction de la concentration totale en solvant de la formulation en base sèche, notée X. D'après Teagarden et Baker (2001), les cinétiques de sublimation

augmentent avec la teneur en TBA puisque ce solvant présente des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur plus élevées que l'eau et, par conséquent, devrait présenter des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur plus élevées que la glace. Mais d'après la figure 2.1, on constate que la formulation au point eutectique 90% TBA + 10 % eau présente des cinétiques de sublimation plus élevées que la formulation à 100% de TBA. Ce qui est en contradiction avec les hypothèses de Teagarden et Baker (2001). Ainsi la détermination des valeurs des pressions d'équilibre solide/vapeur du TBA pur puis de celles de l'eutectique B ainsi que les valeurs des enthalpies de sublimations pourront expliquer les résultats présentés sur la figure 2.1.

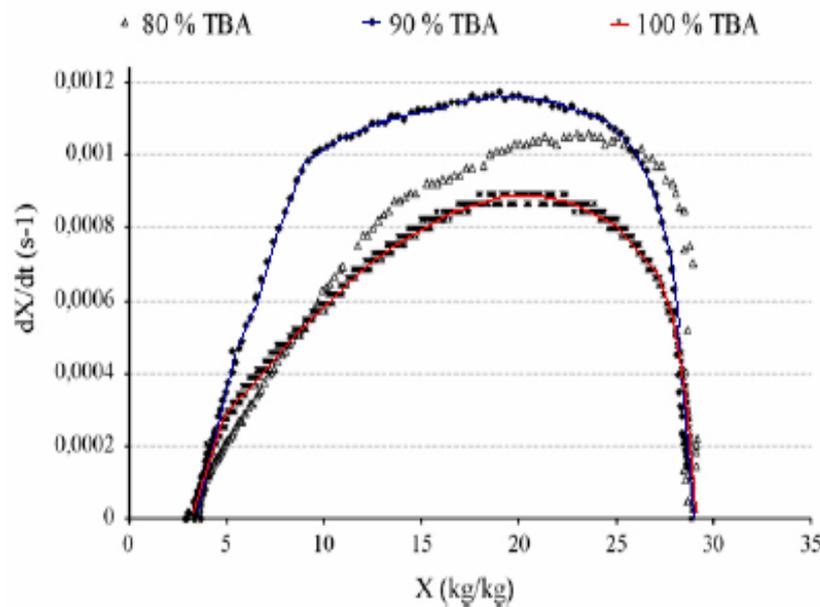


Figure 2.1 : Cinétique de sublimation pour différentes concentration en TBA [Daoussi et al., 2009]. $T_{\text{étagère}} = -20^{\circ}\text{C}$, $P_c = 6\text{Pa}$.

2.2 Données bibliographiques du système TBA + eau.

Cette partie présente les résultats d'une recherche bibliographique qui a consisté à relever toutes les données de la littérature qui permettent de décrire les états thermodynamiques d'équilibre du système TBA + eau. Ainsi, ces données de la littérature nous ont permis de tracer précisément le diagramme de phase du système TBA + eau.

2.2.1. Diagramme de phase du système TBA + eau.

Le diagramme de phase du système TBA + eau a été retracé à partir des données trouvées dans la littérature [Mootz et Satben 1993 ; Kasraian et Deluca 1994]. Les données des graphiques représentant le diagramme de phase du système TBA + eau ont été extraites grâce au logiciel Plot Digitizer. La figure 2.2 représente le diagramme de phase de ce mélange TBA + eau dont la composition est exprimée en fraction massique de TBA. Ce diagramme est complexe et présente plusieurs points caractéristiques. On constate que le système TBA + eau

comporte deux eutectiques et deux composés définis. Un premier eutectique apparaît à la température de $-8,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ et pour un mélange de 20% de TBA + 80% d'eau (% massique). Le deuxième eutectique apparaît à la température de $-3,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ et pour une composition de 90% de TBA + 10 % d'eau (% massique). L'autre caractéristique du système est qu'il comporte deux composés définis. Un premier composé défini qui correspond à l'heptahydrate de TBA lequel apparaît vers $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une composition de 38% de TBA + 62% d'eau (% massique); cet heptahydrate est un composé à point de fusion **non congruent**. L'autre composé défini qui est le dihydrate de TBA apparaît pour un mélange massique de 70% en TBA à une température de $0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ et correspond à un composé à point de fusion **congruent**.

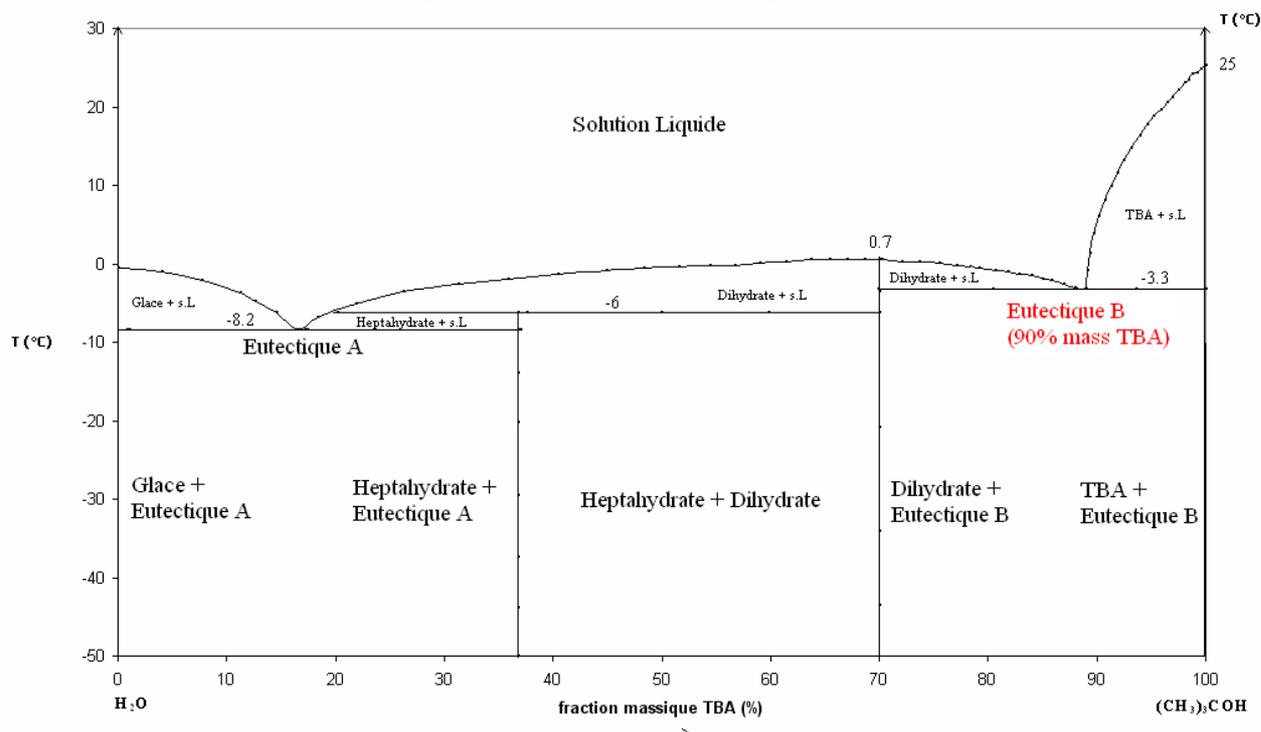


Figure 2.2 : Diagramme de phase du système TBA + eau retracé à partir des données de la littérature [Mootz et Satben 1993 ; Kasraian et Deluca 1994]

Ainsi, d'après le diagramme de phase précédent nous pouvons affirmer qu'au cours des travaux de thèse de Daoussi (2008), le solide susceptible de se sublimer pour une solution de départ à 90% de TBA + 10% d'eau était l'eutectique B. Ce mélange eutectique B contient 90 % de TBA solide pur et 10 % de dihydrate solide. A cette composition, l'eutectique présente les mêmes propriétés physiques qu'un corps pur, [Nail et Gatlin 1993, Gieseler 2004].

2.2.2. Enthalpies de changement d'états.

La connaissance des propriétés thermodynamiques telles que l'enthalpie de sublimation, notée ΔH_s , l'enthalpie de fusion, ΔH_f , et l'enthalpie de vaporisation, ΔH_{vap} , est nécessaire pour la caractérisation du système étudié. Dans le cas du système tert-butanol + eau, seules les valeurs des enthalpies de changements d'état du TBA pur sont répertoriées dans la littérature [Knoval 2008b] et sont reportées dans le tableau 2.1. Malheureusement les données du

mélange comme par exemple celle de l'eutectique B sont totalement absentes de la littérature, d'où la nécessité d'une détermination expérimentale.

| | ΔH_f | ΔH_{vap} | ΔH_s |
|--------|--------------|------------------|--------------|
| kJ/mol | 6.7 | 46 | - |
| kJ/kg | 90.4 | 620 | - |

Tableau 2.1 : Enthalpies de changements d'état du TBA pur [Knovel 2008b]

2.2.3. Pressions de vapeur d'équilibre liquide/vapeur.

Lors de notre recherche bibliographique seules les pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur du TBA pur ont pu être trouvées dans la littérature (Knovel 2008a). La relation ci-dessous, dite de Kirchoff et Riedel modifiée permet de calculer ces pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur, à savoir :

$$P_0 = (\exp(A + B/T + DT^F)) / T^C \quad (\text{Eq 2-1})$$

avec les valeurs suivantes des constantes (unités S.I) :

A = 172,3 ; B = -11590 ; D = 1,37 · 10⁻⁵; F = 2; C = 22,118;

P₀ représente la pression de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur (Pa) et T température en Kelvin.

2.3 Caractérisation expérimentale du système TBA + eau.

Au cours de notre travail, nous avons, dans un premier temps, déterminé expérimentalement par DSC les valeurs des températures et des enthalpies de fusion du TBA pur puis celles du mélange eutectique B à 90% de TBA + 10 % d'eau (% massique). Par la suite, la détermination des valeurs des pressions de vapeur aux équilibres liquide/vapeur et solide/vapeur du TBA pur a été effectuée **par deux méthodes différentes : la méthode Thermogravimétrique et la méthode Statique**. Cette détermination a permis de valider l'utilisation de la méthode Thermogravimétrique comme un outil rapide et précis de détermination des pressions de vapeurs (systèmes liquide/vapeur et solide/vapeur) des corps purs utilisés comme solvant dans le procédé de lyophilisation. Puis cette méthode a été étendue aux systèmes eutectiques ce qui a aussi permis la détermination des pressions de vapeur de l'eutectique B [Bogdani et al., 2011].

2.3.1. Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC)

De façon générale, l'analyse thermique consiste à mesurer les évolutions d'une propriété physique d'un échantillon lorsqu'il est soumis à une variation programmée (linéaire ou modulée) de température dans le temps et sous atmosphère contrôlée. La calorimétrie

différentielle à balayage appelée couramment DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) concerne l'étude de la température de l'échantillon et des échanges thermiques entre celui-ci et le milieu extérieur [Grenet et Legendre 2010]. Les domaines d'application de la DSC sont très nombreux : mesure de la pureté d'un produit, mesure de la capacité thermique, étude des solides non cristallins (verres, polymères et caoutchouc), étude du polymorphisme, étude des diagrammes de phases binaires et ternaires de produits minéraux et organiques, étude de la stabilité thermique des composés organiques, étude des réactions d'oxydation, de réduction, de réticulation, étude **des températures de fusion, de cristallisation spontanée et de transition vitreuse ainsi que des enthalpies de fusion et de cristallisation.**

Dans notre laboratoire, nous disposons d'un appareil de DSC modulée (MDSC) de type 2920CE de TA Instruments. En imposant une variation de température, non pas constante, comme en DSC conventionnelle (standard), mais de forme sinusoïdale autour d'une valeur imposée, la DSC modulée permet de séparer les phénomènes thermiques réversibles, comme la transition vitreuse, - détermination de T_g - des phénomènes non réversibles, comme l'évaporation, la cristallisation ou encore la relaxation enthalpique [Grenet et Legendre 2011]. La DSC modulée sera préférentiellement utilisée pour déterminer avec précision la température de transition vitreuse des formulations pharmaceutiques destinées à être lyophilisées. De manière générale, l'appareillage de DSC comporte, une tête de mesure et est constitué de façon schématisée d'une enceinte E dans laquelle la température T_E , la plus homogène possible, peut varier de façon programmée (croissante, décroissante, constante et modulée). Un creuset (ou capsule) fermé ou non selon les cas, contient l'échantillon à étudier. Dans nos mesures différentielles, un second creuset vide sert de référence. Enfin, un dispositif (thermocouple, résistance de platine...) permet d'enregistrer les températures T_e et T_r (ou leur différence) en fonction du temps ou de la température du four. L'ensemble du montage doit être parfaitement symétrique pour que l'échantillon et la référence reçoivent la même quantité d'énergie thermique (cf figure 2.3).

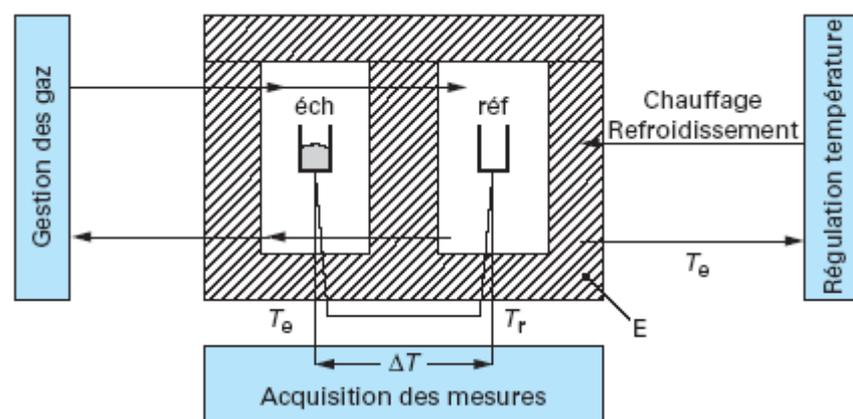


Figure 2.3 : Montage d'un appareil d'analyse calorimétrique différentielle (DSC) [Grenet et Legendre 2010]

2.3.2. Températures et enthalpies de fusion du TBA pur et du mélange eutectique B.

Les essais de DSC ont été réalisés en mode standard sous atmosphère d'azote (50ml/min). Les creusets en aluminium ont été remplis d'environ 10mg d'échantillons liquide. De manière générale, l'échantillon est dans un premier temps solidifié par refroidissement puis liquéfié par réchauffement. La vitesse de refroidissement et de chauffe de l'échantillon était de 5°C/min dans la plage de température étudiée. Nous avons observé (cf figure 2.4) une température de fusion du TBA pur égale à 23°C et une enthalpie de fusion (aire du pic endothermique) égale à $\Delta H_f \text{ experimental} = 86,70 \text{ kJ/kg}$. Ces valeurs sont en bon accord avec les données de la littérature (cf. Tableau 2.1, figure 2.2), [Knovel 2008b].

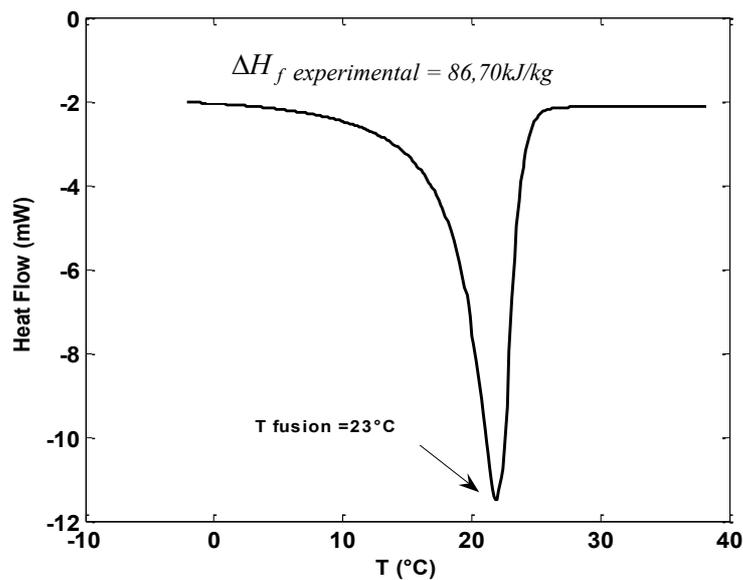


Figure 2.4 : Thermogramme de chauffe du TBA pur. DSC standard, vitesse de chauffe 5°C/min.

Les valeurs expérimentales de la température de fusion du mélange eutectique B et de l'enthalpie de fusion ont été trouvées respectivement égales à -5,07°C et à 135,3 kJ/kg (cf figure 2.5)

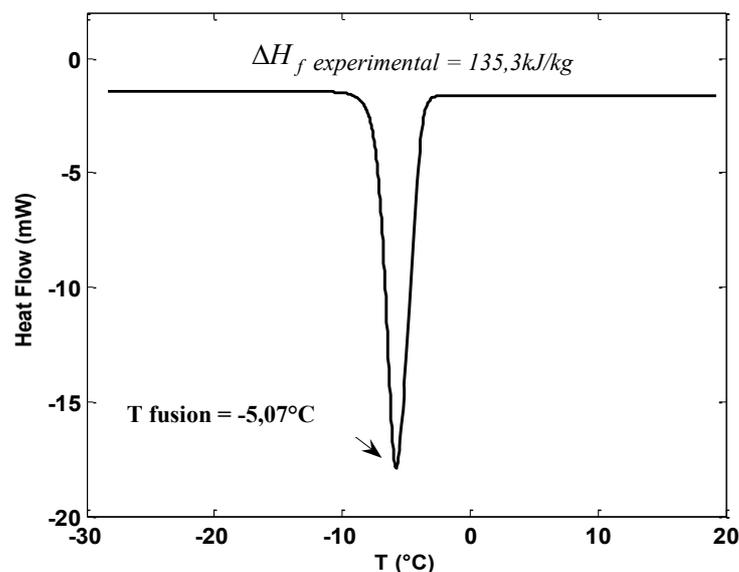


Figure 2.5 : Thermogramme de chauffe du mélange à 90% de TBA +10% d'eau (% massique). DSC standard, vitesse de chauffe 5°C/min.

2.3.3. La méthode Statique de détermination des pressions de vapeur d'équilibre liquide/vapeur et solide/vapeur

La méthode de détermination des pressions de vapeur en mode statique a été mise en place par le laboratoire des Sciences Analytiques de L'UCBL Lyon 1 et plus précisément par le professeur Jaques Jose (2006, 2008, 2009). La figure 2.6 représente le schéma détaillé de l'installation.

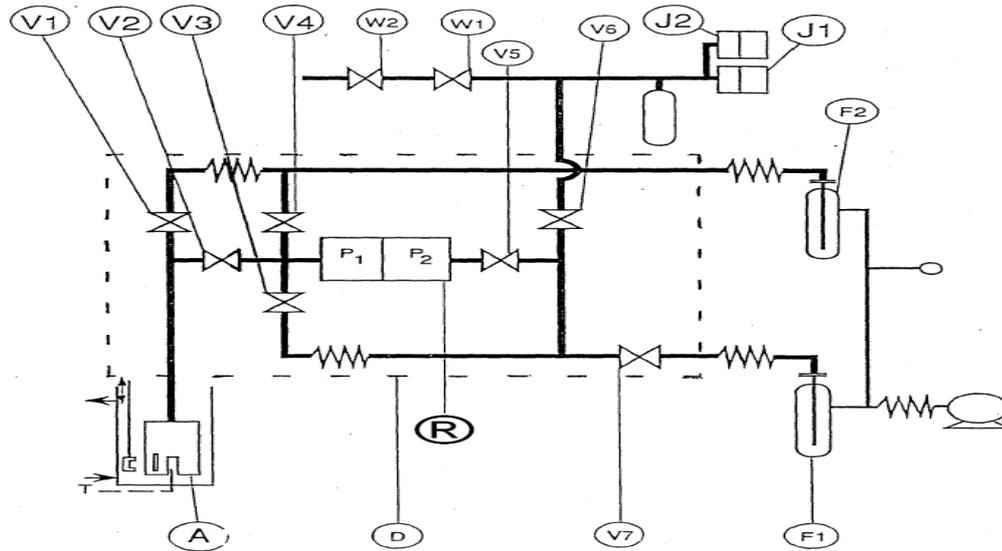


Figure 2.6 : Technique de détermination des pressions de vapeur en mode statique. V1 : vanne de purge, V2 : vanne de mesure, V3 : by pass, V4 : vanne d'évacuation A : cellule, D : enceinte étanche, P₁, P₂ : capteurs de pressions, T : thermocouple, F₁, F₂ : pièges.

L'appareil comporte une cellule (A) en acier étanche d'une capacité de 100mL. Dans cette cellule de mesure on introduit un barreau magnétique qui permet d'agiter le contenu de la cellule lorsque celui-ci est liquide. Un piquage spécial au fond de la cellule permet l'introduction d'un thermocouple (type K) relié à un millivoltmètre de marque Keithley 196 System DMM qui permet de suivre la température de la cellule en temps réel avec une incertitude sur la mesure, $\Delta T = \pm 0,02 K$. La cellule étanche est plongée dans un tube vertical dans lequel circule un fluide caloporteur, le tube lui-même étant directement relié à un groupe froid. La température minimale qui pouvait en principe être atteinte par le groupe froid était de $-80^{\circ}C$. Cependant, le fluide caloporteur dont nous disposions, limitait l'utilisation du groupe froid à une température minimale de $-20^{\circ}C$, température à partir de laquelle le fluide caloporteur gèle. Une pompe à vide permet de faire un vide de $1,33 \cdot 10^{-4}$ Pascal. Un capteur de pression type MKS Type 670 permet de lire la pression régnant dans la cellule de mesure, pression qui correspond à la pression de vapeur de l'échantillon étudié. L'incertitude sur la mesure de la pression est de $\frac{\Delta P}{P} = 1\%$ pour $P \leq 1300 Pa$ et de $\frac{\Delta P}{P} = 0,3\%$ pour $1,3 \leq P \leq 200 kPa$. Typiquement, un essai standard se déroule dans les conditions suivantes. La cellule est remplie d'environ 50 mL de produit à étudier. Le produit a été préalablement dégazé afin d'éliminer l'air dissous dans l'échantillon. Le vide est fait dans l'enceinte étanche

et le capteur P_2 , qui sert de référence, indique la pression de vide atteint. Le groupe froid permet d'imposer à la cellule une température constante afin que l'ensemble cellule + produit soit dans des conditions isothermes. Lorsque toutes les variables (températures et pressions) sont stabilisées, par ouverture de la vanne V_2 , le capteur de pression P_1 permet de déterminer directement la pression de vapeur $P = P_1 - P_2$ de l'échantillon étudié. La mesure doit être relevée après ouverture de la vanne V_2 , lorsque la température de la cellule et la pression ne varient plus. Ainsi, nous avons déterminé par cette méthode directe les valeurs des pressions de vapeur d'équilibre solide/vapeur du TBA pur et de l'eutectique B ainsi que les pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur de l'eutectique B. Ces résultats sont présentés dans les paragraphes suivants et comparés aux résultats obtenus par la méthode Thermogravimétrie.

2.3.4. Analyse Thermogravimétrique (ATG).

2.3.4.1 Appareillage.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) - en anglais thermogravimetric analysis (TGA) - est une technique d'analyse qui consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon lorsque celui-ci est exposé à une variation de température programmée. Dans notre laboratoire, nous disposons d'un appareil d'ATG commercialisé par NETZSCH (ATG 209 F1). Le schéma détaillé de cet appareil est représenté par la figure 2.7 ci-dessous [Daudon 2001].

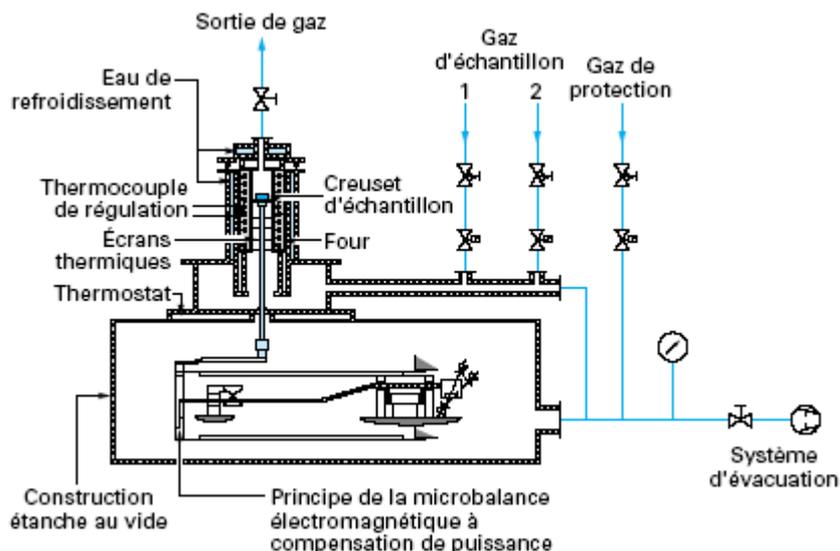


Figure 2.7 : Schéma de principe de l'ATG 209 F1 de Netzsch [Daudon 2001]

Typiquement, l'appareil se compose d'une enceinte étanche permettant de contrôler l'atmosphère de l'échantillon, d'un four permettant de contrôler la température, d'un module de pesée (microbalance), d'un thermocouple pour mesurer la température et d'un ordinateur permettant de contrôler l'ensemble et d'enregistrer les données. La microbalance est normalement sous atmosphère inerte (par exemple sous azote ou sous argon). L'appareil dispose d'un système de refroidissement, habituellement à circulation d'eau, afin de limiter les

points chauds. Cet appareil d'ATG permet d'imposer à l'échantillon une température isotherme ou variable (rampe de température) sur une plage allant de 10 à 1000°C. Les vitesses de chauffe sont comparables à celles utilisées en DSC à savoir comprises dans la gamme entre 0,5°C/min et 20 °C/min. Le circuit de refroidissement permet une descente de température à 10°C/min. La balance supporte une masse totale de 2000 mg et la masse du creuset vide (alumine) dépasse rarement 100 mg. La masse de l'échantillon liquide ou solide à étudier avoisine généralement 50mg.

2.3.4.2 Détermination des pressions de vapeur et de l'enthalpie de sublimation du tert-butanol pur.

a) Relation de Langmuir (1913).

Plusieurs études ont montré que l'ATG est une technique qui permet de déterminer aisément et avec une bonne précision les pressions de vapeur (solide/vapeur ou liquide/vapeur) de certains corps purs qui présentent de faibles pressions de vapeur. Ainsi, à l'aide de cette technique, Guckel et al. (1995) et Krohl et al. (1998) ont déterminé les valeurs des pressions de vapeur de certains pesticides. Edler (1997) a déterminé ces pressions de vapeur aux températures ambiantes pour un composé pharmaceutique solide, Price (1998, 2001) pour des crèmes solaires et Sorokina et al., (2001) pour certains parfums. Les premières études [Price 1998, 2001] ont utilisé l'ATG en mode isotherme, c'est-à-dire en imposant à l'échantillon plusieurs paliers isothermes et en mesurant la perte de masse en fonction du temps pour chaque palier isotherme. Mais récemment de nouvelles études [Phang et al., 2001 ; Surov 2008] ont utilisée l'ATG en mode dynamique c'est-à-dire avec une rampe de température. Ce mode de fonctionnement permet d'avoir une précision de mesure équivalente au mode isotherme tout en réduisant considérablement le temps de mesure et la masse d'échantillon à étudier.

Le fondement théorique de la détermination des pressions de vapeur par utilisation de l'ATG est basé sur l'équation de Langmuir (1913). Cette équation décrit le phénomène évaporation libre d'une surface solide ou liquide en fonction de la température de l'échantillon et s'écrit :

$$\left(\frac{1}{a}\right) \frac{dm}{dt} = P_0 \alpha \sqrt{\frac{M}{2\pi RT}} \quad (\text{Eq 2-2})$$

avec les notations suivantes :

$\left(\frac{1}{a}\right) \frac{dm}{dt}$ perte de masse par unité de surface ($\text{kg} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$)

P_0 pression de vapeur à l'équilibre solide/vapeur ou liquide/vapeur (Pa)

M masse molaire de la vapeur (kg/mol)

R constante des gaz parfait (J/Kmol)

T température de l'échantillon (K)

α coefficient de vaporisation

Dans le vide, la valeur du coefficient de vaporisation α est prise égale à 1. Cependant les expériences en ATG sont généralement réalisées à la pression atmosphérique. Ainsi, afin d'éliminer α de l'équation (2.2), Price (2001), Wright et al. (2004) et Surov (2008) ont réécrit l'équation de Languir de la manière suivante :

$$P = k\nu \quad (\text{Eq 2-3})$$

dans laquelle $k = \sqrt{2\pi R} / \alpha$ représente une constante de calibration et $\nu = (1/a)(dm/dt)\sqrt{T/M}$.

La constante de calibration est généralement considérée comme indépendante des conditions opératoires (flux d'azote, température du four). Généralement, cette calibration s'effectue souvent avec l'acide benzoïque solide. Celui-ci est stable et présente des pressions de vapeur faibles. Le tracé de la courbe P_0 (valeurs données par la littérature) pour l'acide benzoïque en fonction de ν (déterminé expérimentalement) permet alors de déterminer la valeur de cette constante de calibration, k . Ainsi, Wright et al. (2004) ont déterminé les valeurs des pressions de vapeur de l'acide adipique solide dans une gamme de température allant de 145°C à 189°C avec une erreur inférieure à 2% par rapport aux valeurs théoriques de la littérature.

Nous avons déterminé à partir de cette première approche de la méthode Thermogravimétrique, les valeurs des pressions de vapeur du TBA liquide pur. Dans un premiers temps, la détermination de la constante k a été effectuée en utilisant l'acide benzoïque solide comme composé de référence. Les pressions de vapeur de l'acide benzoïque solide ont été calculées par l'équation modifiée de Kirchhoff et Riedel (Eq 2-1) avec les valeurs suivantes des paramètres [Knovel 2008c]: (unités SI)

$$| A = 88,513 ; B = -11829 ; D = 2,3348 \cdot 10^{-5} ; F = 6 ; C = 8,6826 ;$$

Afin d'avoir une surface d'évaporation constante pour chaque essai, l'acide benzoïque a été dans un premier temps liquéfié puis solidifié dans le creuset de mesure, alors que pour le TBA liquide pur cette précaution n'est pas nécessaire. Les échantillons (50mg) ont été soumis à une rampe de température de 5°C/min sur une plage allant de 25°C à 80°C et sous un flux de balayage d'azote à la surface de l'échantillon égal à 80ml/min. Sur cette plage de température, les deux produits ont un comportement stable sans changement d'état thermodynamique.

Dans ces conditions opératoires, la constante de calibration k a été trouvée égale à :

$$k = 1,029 \cdot 10^5 J^{0.5} K^{-0.5} mol^{-0.5}$$

Puis les pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur du TBA pur ont été calculées à partir de l'équation 2-3 en utilisant la constante de calibration préalablement déterminée. Ces valeurs sont reportées sur la figure 2.8 ci-dessous.

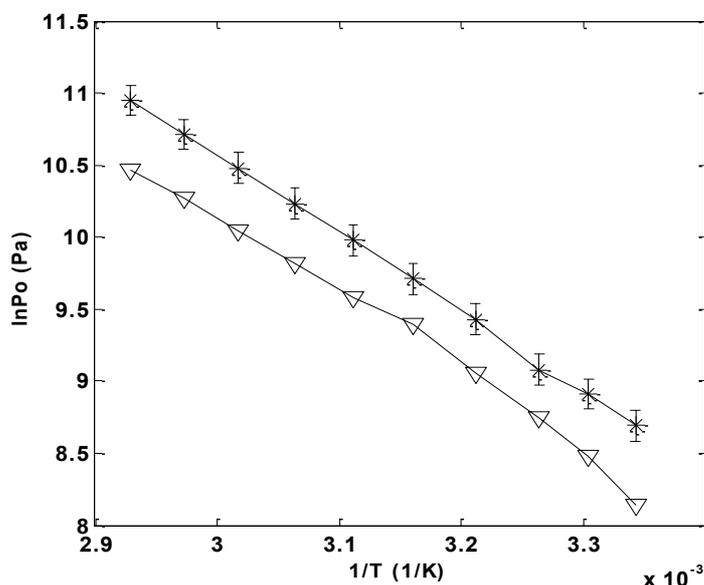


Figure 2.8 : Pression de vapeur du TBA pur à l'équilibre liquide/vapeur : calculées (Eq 2-3) (Δ), de la littérature [Knovel 2008a] (*). Réf : acide benzoïque. (⊥ : écart 2%)

D'après cette figure, les pressions de vapeur du TBA liquide pur calculées à partir de l'équation 2-3 et de nos résultats expérimentaux (Δ) montrent un écart supérieur à 5% avec les valeurs présentes dans la littérature (*), ce qui n'est pas acceptable. Une étude bibliographique, nous a montré que Phang et al. 2001 ont aussi étudié la possibilité d'utiliser la méthode thermogravimétrique pour déterminer les pressions de vapeur de l'éthylparaben. La valeur de la constante de calibration k utilisée par ces auteurs a été déterminée en prenant comme référence l'acide benzoïque. Comme dans notre cas, ces auteurs ont constaté une grande différence entre leurs valeurs expérimentales de pression de vapeur du système liquide/vapeur de l'éthylparaben et celles trouvées dans la littérature. Ces auteurs ont alors examiné le choix du constituant de référence et ils ont conclu que le composé de référence doit présenter des similitudes structurales avec l'échantillon à étudier. Ainsi, ils ont choisi comme composé de référence le méthylparaben qui est de la même famille que l'éthylparaben. Ils ont alors obtenu des valeurs de pression de vapeur à l'équilibre calculées à partir de l'équation 2-3 en parfait accord avec les valeurs données par la littérature. Sur ce même principe de similitude structurale, nous avons donc choisi une autre substance de référence pour calculer une nouvelle valeur de la constante de calibration, k . La référence choisie était le 2-propanol (cf. annexe 1) qui est de la même famille que le tert-butanol. La valeur de cette nouvelle constante d'étalonnage déterminée avec le 2-propanol a été trouvée égale à :

$$k = 1,355 \cdot 10^5 J^{0.5} K^{-0.5} mol^{-0.5}$$

Avec cette nouvelle constante, les valeurs des pressions de vapeur du TBA liquide pur présentent un écart de 2 % avec les valeurs de la littérature, ce qui est tout à fait convenable (cf figure 2.9).

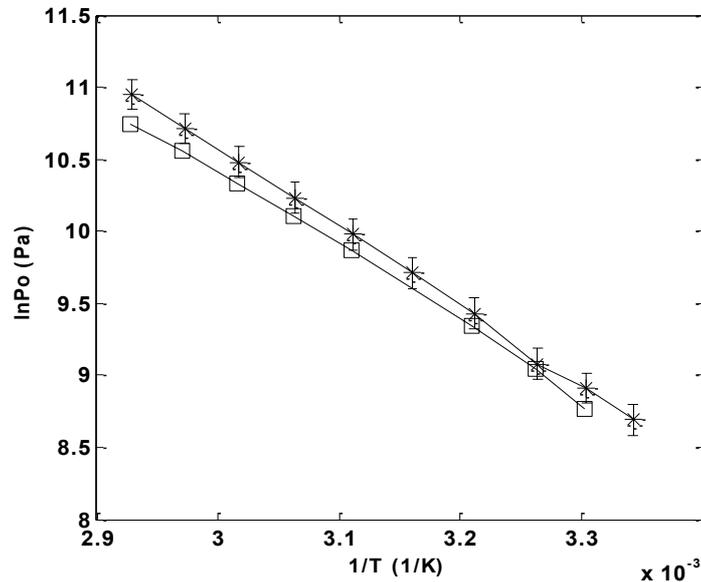


Figure 2.9 : Pression de vapeur du TBA pur à l'équilibre liquide/vapeur calculées (Eq 2-3) (□), de la littérature [Knovel 2008a] (*). Réf : 2-propanol. (± : écart 2%)

Le choix de la référence adéquate sur des critères de similitude structurale semble donc être la clé qui permet d'obtenir une bonne fiabilité des résultats fournis par la méthode thermogravimétrique.

b) Relation de Langmuir modifiée par Phang et al., (2001) et Focke (2003).

Dans leur étude, Phang et al. (2001) ont aussi étudié la possibilité d'augmenter la précision des mesures de pression de vapeur en éliminant de la relation de Langmuir (Eq 2-2) la constante de calibration k ainsi que le coefficient de vaporisation α , en minimisant ainsi l'incertitude sur la détermination des valeurs de k et α . Après le choix d'un composé de référence sur les critères de structure similaire, le rapport des équations 2-4 et 2-5 permet d'obtenir l'équation 2-6 ci-dessous de laquelle les termes k et α ont disparu :

$$\left(\frac{dm}{dt}\right)_R T^{1/2} = \alpha M_R^{1/2} \left[\frac{1}{2\pi R}\right]^{1/2} P_R \quad (\text{Eq 2-4})$$

$$\left(\frac{dm}{dt}\right)_S T^{1/2} = \alpha M_S^{1/2} \left[\frac{1}{2\pi R}\right]^{1/2} P_S \quad (\text{Eq 2-5})$$

$$P_S = \left(\frac{M_R}{M_S}\right)^{1/2} P_R \left[\frac{(dm/dt)_S}{(dm/dt)_R}\right] \quad (\text{Eq 2-6})$$

| R indice du composé de référence
| S indice de l'échantillon

où P_R désigne la pression de vapeur du constituant de référence (connue), M_R la masse molaire de la référence (kg/mol), et $(dm/dt)_R$ et $(dm/dt)_S$ respectivement la perte de masse (kg/s) du constituant de référence et de l'échantillon obtenues expérimentalement par ATG.

S'appuyant sur la relation 2-6 proposée par Phang et al. (2001), Focke (2003) a présenté une nouvelle relation de Langmuir modifiée qui introduit la diffusivité du constituant étudié en phase vapeur au sein du gaz vecteur qui est très souvent en ATG l'azote. Ainsi, pour un corps pur, il propose la relation suivante :

$$P_S = \left(\frac{D_{RB}}{D_{SB}} \right) \left(\frac{M_R}{M_S} \right) P_R \left[\frac{(dm/dt)_S}{(dm/dt)_R} \right] \quad (2-7)$$

dans laquelle D_{RB} (m^2/s) et D_{SB} (m^2/s) représentent respectivement la diffusivité du constituant de référence et celle de l'échantillon dans le gaz vecteur B, typiquement le plus souvent l'azote. Par ailleurs, les valeurs des diffusivités peuvent être estimées par la relation de Fuller [Millat et al., 1996] qui dérive de la relation de Chapman. Cette relation de Fuller s'écrit :

$$D_{AB} = \frac{0.00143 \cdot T^{7/4}}{P(M_{AB})^{1/2} \left[(\sum v)_A^{1/3} + (\sum v)_B^{1/3} \right]^2} \quad (2-8)$$

avec :

D_{AB} diffusivité du constituant A dans l'inerte B en (cm^2/s)

P la pression de travail (bar)

T température en (K)

$\sum v$ somme des contributions atomiques dont les valeurs sont regroupées dans le tableau 2.2

M_{AB} masse molaire moyenne définie par la relation : $M_{AB} = (M_A \cdot M_B) / (M_A + M_B)$

13.3. Atomic diffusion contributions for $\sum v$ in equation (13.10).

| Atomic and structural diffusion volume increments | | | |
|---|-------|------------------|------|
| C | 15.9 | F | 14.7 |
| H | 2.31 | Cl | 21.0 |
| O | 6.11 | Br | 21.9 |
| N | 4.54 | I | 29.8 |
| Aromatic ring | -18.3 | S | 22.9 |
| Heterocyclic ring | -18.3 | | |
| Diffusion volumes of simple molecules | | | |
| He | 2.67 | CO | 18.0 |
| Ne | 5.98 | CO ₂ | 26.9 |
| Ar | 16.2 | N ₂ O | 35.9 |
| Kr | 24.5 | NH ₃ | 20.7 |
| Xe | 32.7 | H ₂ O | 13.1 |
| H ₂ | 6.12 | SF ₆ | 71.3 |
| D ₂ | 6.84 | Cl ₂ | 38.4 |
| N ₂ | 18.5 | Br ₂ | 69.0 |
| O ₂ | 16.3 | SO ₂ | 41.8 |
| Air | 19.7 | | |

Tableau 2.2 : Somme des contributions atomiques [Millat et al.,1996]

Avec cette nouvelle approche, nous avons calculé les valeurs des pressions de vapeur du TBA pur à l'équilibre liquide/vapeur en utilisant l'équation 2-7 proposée par Focke (2003).

De plus, les données expérimentales de dm/dt en fonction de la température obtenues par ATG pour une expérience standard sont reportées sur la figure 2.10.

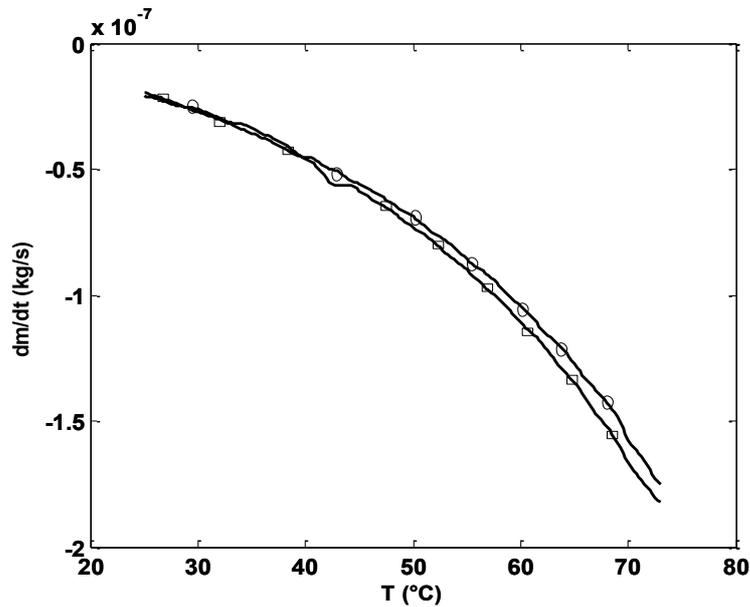


Figure 2.10 : dm/dt en fonction de la température : TBA pur (□), 2-propanol pur (○), ATG rampe de chauffe 5°C/min, flux d'azote 80ml/min.

Dans un premier temps, les valeurs des diffusivités du TBA pur et du 2-propanol dans le gaz vecteur (azote) ont été estimées à partir de la relation de Fuller et rapportées sur la figure 2.11 ci-contre :

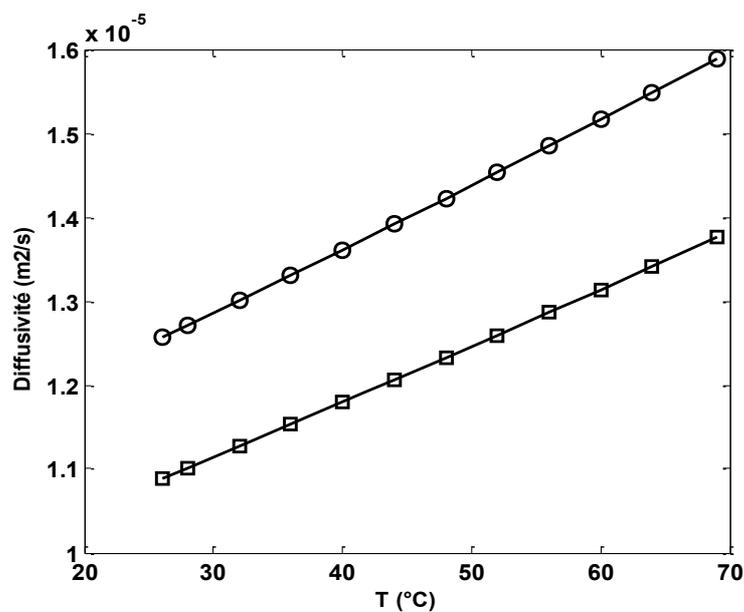


Figure 2.11 : Diffusivités des vapeurs de TBA pur (□), du 2-propanol pur (○), dans l'azote estimées par la relation de Fuller [Millat et al., 1996]

Il est à noter que pour les deux substances (TBA pur et 2-propanol pur) les valeurs de la diffusivité augmentent avec la température et leur ordre de grandeur ($10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$) est proche de des ordres de grandeurs des valeurs de la littérature pour les diffusivités en phase gaz.

Ensuite, ces valeurs de diffusivité ont été utilisées pour le calcul des valeurs des pressions de vapeur d'équilibre du TBA pur en utilisant l'équation de Focke (2003) (Eq 2-7). Les valeurs des pressions de vapeur obtenues sont reportées sur la figure 2.12 ci-contre et comparés aux valeurs de la littérature [Knoel 2008a].

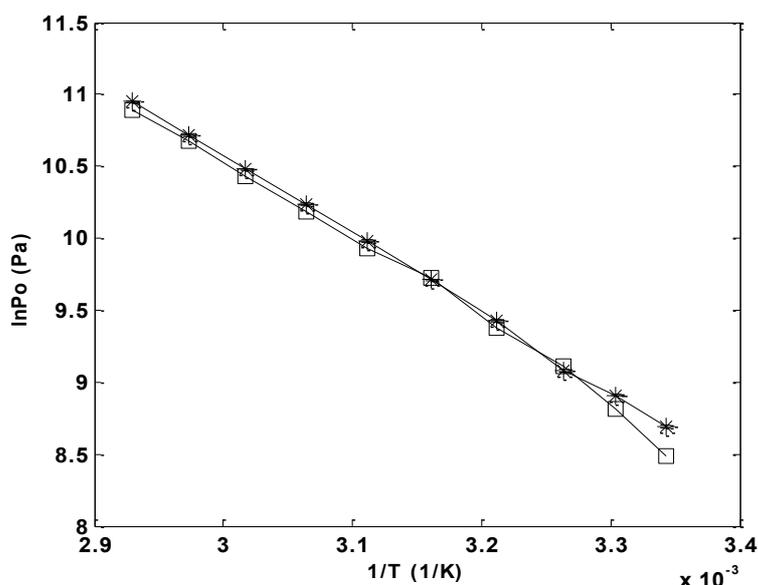


Figure 2.12 : Pression de vapeur du TBA pur à l'équilibre liquide/vapeur calculées (Eq 2-7) (□), de la littérature [Knoel 2008a] (*). Réf : 2-propanol.

D'après cette figure, on constate un écart inférieur à 1% entre nos valeurs des pressions de vapeur du TBA liquide pur calculées à partir de (Eq 2-7) et celles du TBA liquide pur extraites de la littérature. Nous pouvons en conclure que l'approche qui consiste à prendre en compte la diffusivité des vapeurs de l'échantillon et de la référence dans le gaz vecteur (azote) est l'approche la plus adéquate car elle permet d'aboutir à des valeurs de pression de vapeur très précises. Ainsi la méthode thermogravimétrique semble être une méthode rapide et précise de détermination des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur des corps organiques purs tel que le tert-butanol.

c) Pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur et enthalpie de sublimation du TBA solide pur.

La dépendance des pressions de vapeur d'équilibre des systèmes solide/vapeur et liquide/vapeur avec la température est décrite par la relation de Clausius-Clapeyron [Price 2001] :

$$\ln P = -\frac{\Delta H}{RT} + B \quad (\text{Eq 2-9})$$

Dans le cas d'un système solide/vapeur, l'enthalpie de changement d'état correspond à l'enthalpie de sublimation (ΔH_{sub}) et dans le cas d'un système liquide/vapeur à l'enthalpie de vaporisation (ΔH_{vap}). Cette relation très classique montre que le tracé de $\ln P$ en fonction de l'inverse de la température en Kelvin doit conduire à une droite de pente égale à $\frac{\Delta H}{R}$, à partir de laquelle la valeur de l'enthalpie de changement d'état pourra facilement être extraite.

Par ailleurs, Price (2001) présente une équation de Clausius-Clapeyron modifiée qui permet, par extrapolation des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur, de déduire les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur. Cette relation s'écrit :

$$\ln P_{0solide} = \ln P_{0liquide} - \frac{\Delta H_f}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) \quad (\text{Eq 2-10})$$

avec :

$P_{0solide}$ pression de vapeur à l'équilibre solide/vapeur (Pa) ;
 $P_{0liquide}$ pression de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur (Pa), donnée par la littérature ou calculée dans la gamme de température $T < T_m$;
 ΔH_f enthalpie de fusion (J/kmol) ;
 T température de sublimation (K) ;
 T_m température de fusion (K) ;

Dans un premier temps, nous avons déterminé les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur du TBA pur en utilisant l'équation (2-10) et les données thermodynamiques ($P_{0liquide}$, ΔH_f , T , T_m) obtenues par la littérature [Knovel 2008a ; 2008b]. Puis, cette même équation (2-10) a été utilisée pour déterminer les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur (sublimation) du TBA pur par utilisation des valeurs de $P_{0liquide}$ déterminées précédemment par la méthode thermogravimétrique ainsi que les valeurs de ΔH_f et le T_m obtenues expérimentalement par DSC. Afin de comparer et de valider l'exactitude des valeurs des pressions de vapeur d'équilibre du TBA solide, la méthode Statique a été aussi utilisée pour cette détermination. Les résultats des valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur du TBA pur utilisés pour modéliser la sublimation sont présentés sur la figure 2.13. D'après cette figure, on peut conclure que l'équation 2-10 permet une détermination précise et juste des valeurs **des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur des corps organiques purs**. En effet, les valeurs de ces pressions du TBA pur obtenues par cette équation et par la méthode Statique montrent un écart inférieur à 2% ce qui est tout à fait satisfaisant. On peut ainsi en conclure que la méthode thermogravimétrique **permet de déterminer directement les valeurs des pressions de vapeur d'équilibre liquide/vapeur et indirectement les pressions de vapeurs d'équilibre solide/vapeur des corps organiques purs (TBA) avec une grande rapidité et une très bonne précision (2%)**.

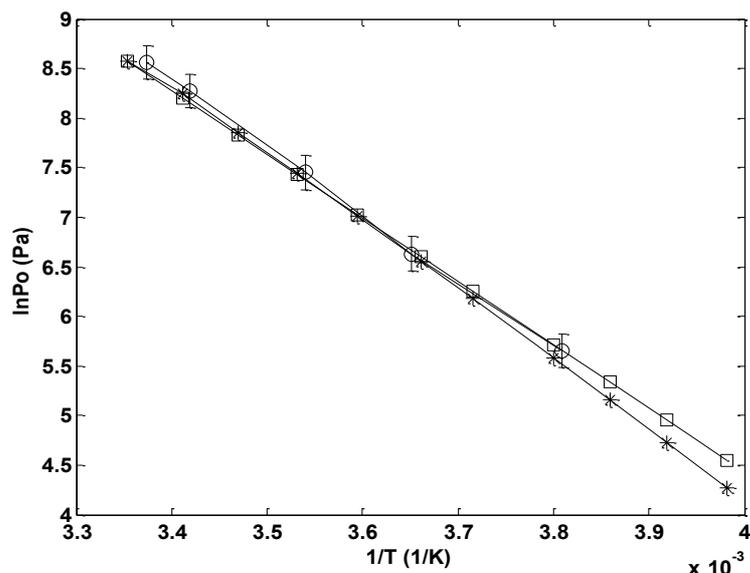


Figure 2.13 : Pression de vapeur du TBA pur à l'équilibre solide/vapeur calculées (Eq 2-10) avec les données : de la littérature [Knoel 2008a, 2008b] (*); expérimentales par ATG et par DSC (\square); expérimentales par la méthode Statique (o). (\perp : écart 2%)

De plus, à partir des tracés de $\ln P_0$ (liquide et solide) en fonction de $1/T$ des données fournies par l'ATG, nous avons déterminé en utilisant l'équation (2-9) les enthalpies de vaporisation et de sublimation du TBA pur. Ces valeurs sont reportées sur le Tableau 2.3 et sont comparées aux valeurs de la littérature.

| | T_m °C | ΔH_f kJ/mol | ΔH_{vap} kJ/mol | $\frac{\Delta H_s}{\text{kJ/mol}}$ kJ/kg | |
|---------------|-------------|------------------------|----------------------------|---|-----|
| Littérature | 24-25 | 6,7 | 46 | - | |
| Expérimentale | 23 | 6,42 | 45,03 | 51,45 | 732 |

Tableau 2.3 : Données thermodynamiques du TBA pur (liquide et solide) : littérature [Knoel 2008b], expérimentales T_m et ΔH_f (DSC), ΔH_{vap} et ΔH_s (ATG).

D'après cette comparaison du Tableau 2.3, les données thermodynamiques sont en parfait accord avec celles de la littérature ce qui permet de conclure que l'ATG est **aussi une technique rapide et précise de détermination des enthalpies de fusion et de sublimation des corps organiques purs congelés.**

2.3.4.3 Détermination des pressions de vapeur et de l'enthalpie de sublimation du mélange eutectique B, à 90 % de TBA + 10% d'eau (% massique).

Dans cette partie, nous avons étendu l'utilisation de la méthode thermogravimétrique au mélange eutectique 90% de TBA + 10% d'eau (% massique). Les essais en ATG n'ont pu être effectués qu'à des températures supérieures à 10°C à cause de la limitation technologique du groupe froid. Dans notre plage de mesure allant de 25° à 80°C, le mélange eutectique B se présente sous forme d'une solution liquide. Ainsi, dans un premier temps, nous avons étendu l'utilisation des équations (2-2) à (2-7) aux mélanges liquides. Puis, l'hypothèse de la validité de l'équation (2-10) pour le mélange eutectique B a été adoptée car cet eutectique B solide se comporte comme un corps pur.

a) Pressions de vapeur à l'équilibre **liquide/vapeur** du mélange 90% de TBA +10% d'eau.

La série des équations (2-2) à (2-7) a été proposée exclusivement pour les corps purs, pour lesquels la masse molaire du liquide est égale à la masse molaire de la vapeur en équilibre avec le liquide. Cette masse molaire reste bien évidemment inchangée en fonction de la température. Cependant, avec les mélanges de co-solvant liquides, la masse molaire du liquide n'est pas égale à la masse molaire de la vapeur puisque la composition du liquide change pendant l'évaporation du mélange. Le liquide le plus volatil va s'évaporer plus rapidement modifiant ainsi la fraction massique du mélange liquide et donc la masse molaire de celui-ci. Nous nous sommes donc intéressés à la variation de la composition du mélange (phases liquide et vapeur) à 90% de TBA + 10% d'eau pendant les essais en ATG, en fonction de la température (25°C à 80°C). Pour ceci, nous avons utilisé un logiciel de simulation des données d'équilibre (Simulis Thermodynamics ProSim Software). Ainsi sur la figure 2.14 on présente les valeurs simulées des fractions massiques d'équilibre du TBA, entre la vapeur (y) et le liquide (x), dans notre plage de température des essais effectués en ATG. Ces résultats définissent la courbe d'équilibre y versus x très connue en rectification. Les équations utilisées par le logiciel (ProSim) pour déterminer ces données portent la référence : SRK-MHV2-UNIFAC. Ces données simulées ont aussi été validés par comparaison avec les données existantes dans la littérature [Gmehling et al.,1991]. Mais, dans le but de ne pas surcharger la figure 2.14, ces données n'ont pas été portées sur cette figure. D'après Gmehling et al (1991), le mélange liquide à 87% TBA + 13% d'eau (% massique) présente, un azéotrope, à 1 atmosphère et 80°C. A la composition azéotropique, la fraction massique en TBA (ou en eau) du mélange liquide est la même que la fraction massique de la vapeur en équilibre avec le liquide. Ainsi, **un mélange azéotropique va se comporter pendant son évaporation comme un corps pur**. Si l'on s'intéresse à notre mélange à 90% de TBA + 10% d'eau (% massique) il en résulte d'après la figure 2.14 et le tableau 2.4 que ce mélange présente un comportement azéotropique. En effet, sur la plage de température étudiée (25°C à 80°C) la fraction massique (x) de TBA liquide reste inchangée et sensiblement égale à sa fraction massique (y) de la vapeur de TBA (variation de 3%). Ainsi nous pouvons adopter l'hypothèse que le mélange liquide à 90% de TBA +10% d'eau se comporte comme un azéotrope dont la composition varie très peu en fonction de la température. Ainsi la masse

molaire moyenne du mélange liquide sera considérée comme constante et égale la masse molaire moyenne du mélange azéotropique. Avec ces hypothèses, l'utilisation des équations (2-2) à (2-7) est tout à fait possible et justifiée.

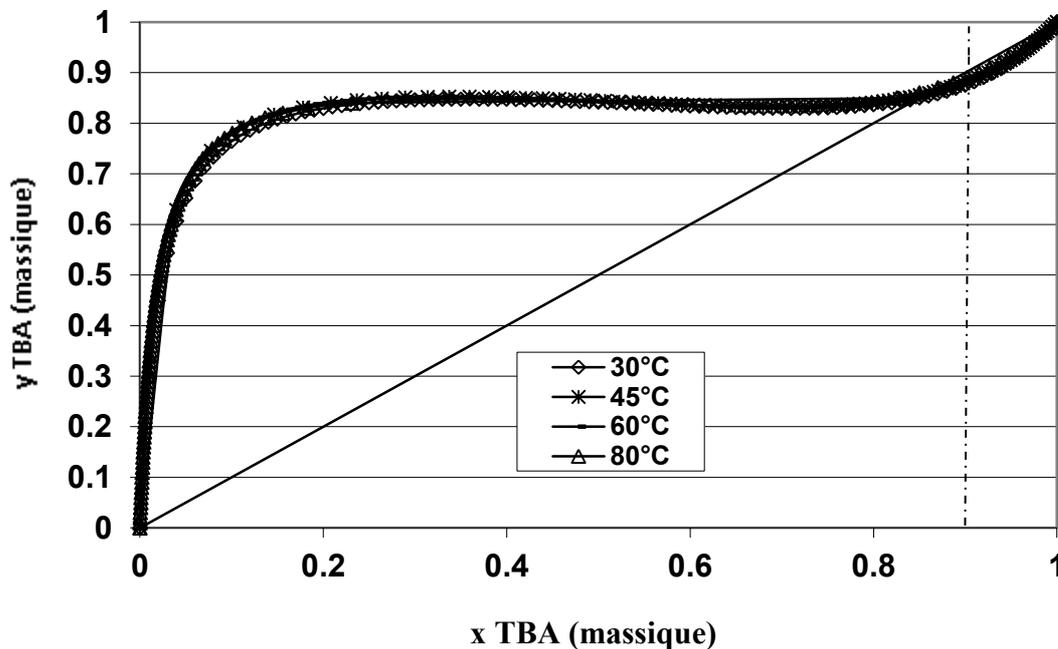


Figure 2.14 : Fractions massiques du TBA dans le mélange TBA + eau. ((x) liquide ; (y) vapeur) pour quelques températures. (Simulis Thermodynamics ProSim Software) Pt=1atm

| T (°C) | x (massique) | y (massique) |
|--------|--------------|--------------|
| 80 | 0,9 | 0,889 |
| 60 | 0,9 | 0,885 |
| 45 | 0,9 | 0,884 |
| 30 | 0,9 | 0,875 |

Tableau 2.4 : Variation des fractions massiques x (liquide), y (vapeurs) du mélange 90% TBA +10% eau en fonction de la température. (Simulis Thermodynamics ProSim Software)

Adoptant le critère de similitude structurale du composé de référence discuté précédemment (cf § 2.3.4.2), le TBA pur a été utilisé comme nouvelle référence lors des essais en ATG. L'équation (2-6) de Phang et al. (2001) a été utilisée en lieu et place de l'équation (2-7) de Focke (2003) car il nous a été impossible d'estimer la diffusivité moléculaire des vapeurs de TBA et d'eau dans l'azote. Les valeurs des pressions de vapeur du mélange à 90% de TBA +10% d'eau (% massique) à l'équilibre liquide/vapeur calculées par l'équation (2-6) sont reportées sur la figure 2.15. Sur cette même figure (2.15) sont aussi présentés les valeurs des pressions de vapeur expérimentales obtenues par la méthode statique ainsi que les valeurs trouvées dans la littérature [Wang et al., 1994]. Il en résulte un écart inférieur à 2% entre les valeurs des pressions de vapeur obtenues par la méthode thermogravimétrique et par la

méthode Statique. Ainsi, cet accord valide parfaitement les résultats obtenus par la méthode thermogravimétrique. De plus, on peut en conclure que pour les mélanges azéotropiques la méthode thermogravimétrique peut également être utilisée et s'avère un outil fiable et précis de détermination rapide des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur.

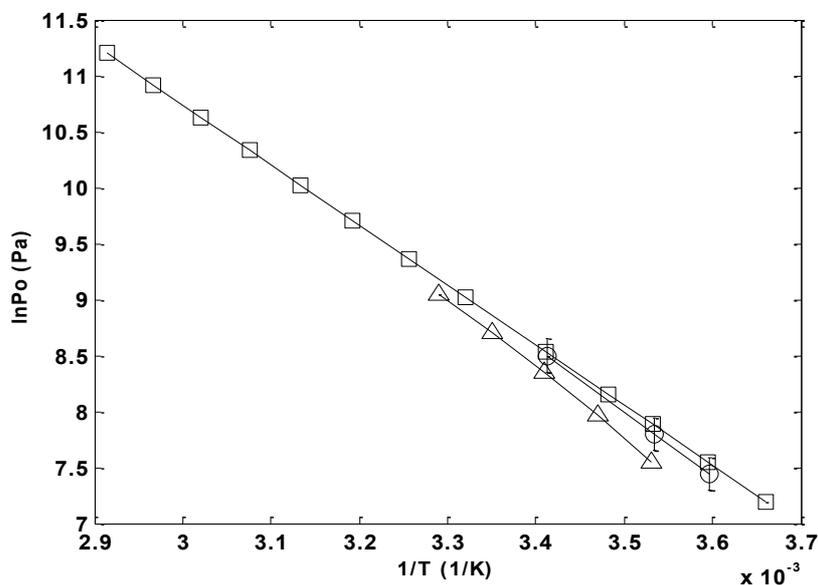


Figure 2.15 : Pression de vapeur du mélange à 90% de TBA +10 % d'eau à l'équilibre liquide/vapeur ; ATG (Eq 2-6) (□) ; méthode Statique (o) ; littérature(Δ). (Wang et al., 1994). Ref : TBA pur, (⊥ : écart 2%)

b) Pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur du mélange eutectique B, 90% de TBA +10% d'eau (%massique).

Etant donné que le mélange eutectique B présente des propriétés physiques et thermodynamiques analogues à celles des corps purs, l'équation 2-10 a été utilisée pour le calcul des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur. Les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur du mélange à 90% de TBA +10% d'eau nécessaires à ce calcul sont celles déterminées par ATG. Les valeurs de la température et de l'enthalpie de fusion utilisées dans le calcul sont celles qui ont été déterminées expérimentalement par DSC (cf. figure 2.5). Les valeurs des pressions de sublimation du mélange eutectique B calculées (Eq 2-10) ainsi que celles déterminées par la méthode Statique sont reportées sur la figure 2.16. On observe un écart inférieur à 2% entre les valeurs des pressions de vapeur d'équilibre solide/vapeur obtenues par la méthode thermogravimétrique et par la méthode Statique, méthode totalement différente, de par son principe, de la méthode thermogravimétrique. Pour cette composition particulière correspondant à l'eutectique, la méthode thermogravimétrique se révèle donc être une méthode rapide et précise de détermination des pressions de vapeur des mélanges avec co-solvant utilisés dans la formulation des produits pharmaceutiques destinés à être lyophilisés.

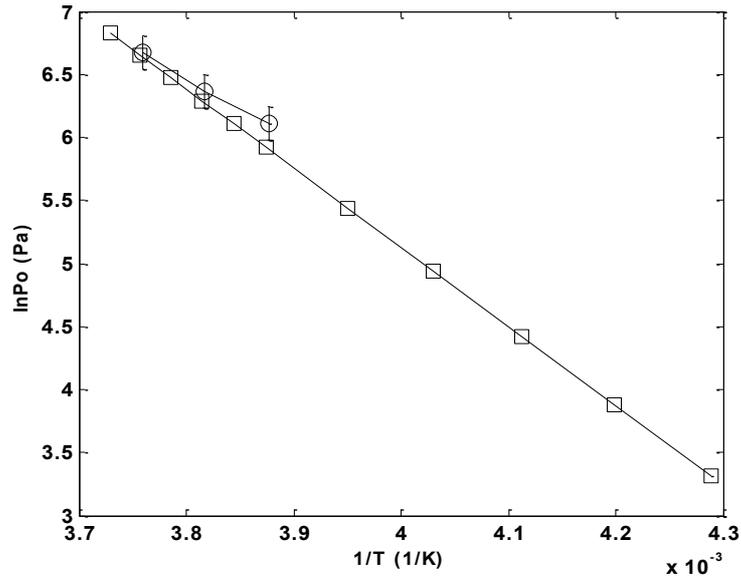


Figure 2.16 : Pression de vapeur du mélange à 90% de TBA +10 % d'eau à l'équilibre solide/vapeur ; ATG (Eq 2-10) (□) ; méthode Statique (o). (± : écart 2%)

c) Enthalpie de sublimation du mélange à 90% de TBA + 10% d'eau.

Comme indiqué au paragraphe 2.3.4.2 c, le coefficient directeur de la courbe $\ln P_0$ (équilibre solide/vapeur) en fonction de $1/T$ correspond au terme $\frac{\Delta H_s}{R}$. La valeur du coefficient directeur de la courbe représentée sur la figure 2.16 a été trouvée égale à $-6276,5$ K. Il en résulte alors une enthalpie de sublimation de l'eutectique B égale à $\Delta H_s = 1027$ kJ/kg.

2.4 Analyse des résultats des travaux de thèse de Rim Daoussi.

Comme déjà indiqué au paragraphe 1.7.3.2, le débit de sublimation \dot{m} est directement dépendant de deux données thermodynamiques clefs du mélange de co-solvant qui sont la pression de vapeur à l'équilibre solide vapeur P_0 et l'enthalpie de sublimation ΔH_s . Dans le cas où le débit de sublimation est déterminé par le gradient de pression ($P_0 - P_c$), la valeur de la pression de vapeur au front de sublimation déterminera principalement le transfert de masse (flux de sublimation). Ainsi, une valeur de P_0 plus élevée va avoir pour conséquence une accélération de la vitesse de sublimation et conduira à des temps de séchage plus courts.

A contrario, si la vitesse de sublimation est gouvernée par le transfert de chaleur, alors, une valeur de cette enthalpie de sublimation, ΔH_s , plus faible, permettra une augmentation certaine de la vitesse de sublimation et, par conséquent, conduira à une forte diminution des temps de séchage. Un autre cas est aussi possible, celui-ci où le débit de sublimation est limité à la fois par le transfert de masse et par le transfert de chaleur. Dans ce régime intermédiaire, des valeurs élevées de P_0 et de faibles valeurs de l'enthalpie de sublimation auront un effet bénéfique sur les cinétiques de séchage. Ainsi, la comparaison de ces nouvelles données thermodynamiques (P_0 et ΔH_s) du TBA pur, de l'eutectique B et de l'eau nous permettent

maintenant de donner une explication cohérente et juste des cinétiques expérimentales de sublimation très rapides observées avec le mélange eutectique B, ainsi que la position relative des autres courbes de cinétique de sublimation avec les mélanges à 80% et 100% de TBA et, de compléter et d'infirmer certaines explications données par Teagarden et Baker (2001) (cf. § 2.1).

2.4.1. Influence des caractéristiques thermodynamiques du TBA pur sur les cinétiques de séchage.

2.4.1.1 Influence des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur sur les cinétiques de séchage.

La figure 2.17 compare les pressions de vapeur d'équilibre du TBA pur et de l'eau pure. Dans le domaine liquide/vapeur, on constate que le TBA pur présente des pressions de vapeur largement supérieures à celle de l'eau pure ce qui confirme les hypothèses de Teagarden et Baker (2001). Par contre, dans le domaine solide/vapeur, on constate que les pressions d'équilibre du TBA solide pur et de la glace pure sont quasi égales voire même, pour une température du front de sublimation inférieure à -25°C , les pressions de sublimation de la glace deviennent supérieures à celle du TBA solide pur. Ainsi, l'explication de Teagarden et Baker (2001), qui avaient avancé que, l'augmentation des cinétiques de sublimation avec le TBA pur, résultait de valeur des pressions de sublimation supérieures pour le TBA pur à celles de la glace, s'avère fausse. On peut donc en conclure que, dans les travaux de thèse de Rim Daoussi, les faibles temps de séchage obtenus avec la formulation à base de 100% de TBA pur, ne sont pas dus aux valeurs des pressions de vapeur plus élevées du TBA solide pur par rapport à l'eau (glace) pure.

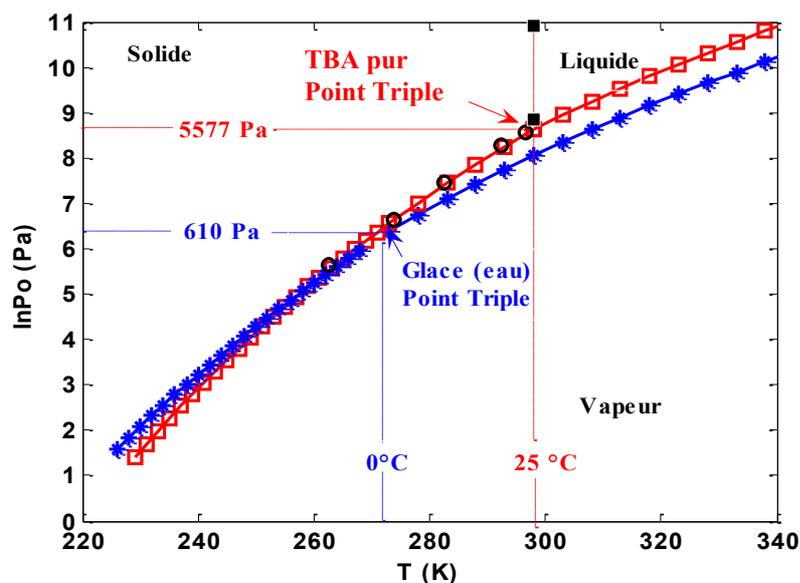


Figure 2.17 : Pression de vapeur d'équilibre du TBA pur, ATG (\square) ; méthode Statique (\circ) ; de l'eau pure (*).

2.4.1.2 Influence de l'enthalpie de sublimation sur les cinétiques de séchage.

Sur le tableau 2.4 ci-dessous nous avons comparé les valeurs de l'enthalpie de sublimation du TBA pur, déterminée expérimentalement par la méthode thermogravimétrique avec la valeur de l'enthalpie de sublimation de la glace pure. On constate que la valeur de l'enthalpie de sublimation du TBA pur est plus faible d'un **facteur 3,8 par rapport à l'enthalpie de sublimation de la glace pure**. Ainsi, l'énergie à fournir pour sublimer 1 kg de TBA sera 3,8 fois plus faible que l'énergie à fournir pour sublimer 1 kg de glace. Cette énergie qui doit être transportée jusqu'au front de sublimation est déterminée par les conditions opératoires principales, à savoir la température des étagères et la pression dans la chambre de sublimation notées respectivement, $T_{\text{étagère}}$ et P_c . Dans les mêmes conditions opératoires, la formulation à base de TBA pur va donc se sublimer 3,8 fois plus vite qu'une solution à base aqueuse si le processus de sublimation est contrôlé par le transfert de chaleur – ce qui était le cas dans les conditions expérimentales de Rim Daoussi (2008).

| | TBA pur | Glace |
|--------------------------------------|---------|-------|
| ΔH_s (kJ/kg) | 732 | 2809 |
| $\Delta H_s/\Delta H_{\text{glace}}$ | 3,8 | 1 |

Tableau 2.4 : Comparaison de l'enthalpie de sublimation du TBA et de la glace pure.

On peut donc en conclure que pour la formulation à base de 100% de TBA, la **diminution des temps de séchage est due essentiellement à la faible valeur de l'enthalpie de sublimation du TBA pur** comparée à la valeur de l'enthalpie de sublimation de la glace pure.

2.4.2. Influence des caractéristiques thermodynamiques de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage.

2.4.2.1 Influence des pressions de vapeur à l'équilibre solide/vapeur de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage.

La figure 2.18 compare les valeurs des pressions de vapeur d'équilibre du mélange dit eutectique B à 90% de TBA + 10% d'eau avec celle de l'eau pure. D'après cette figure, on constate que les valeurs des pressions de sublimation de l'eutectique B sont plus élevées **que celles de la glace pure d'un facteur 2**. Ainsi, si on se trouve dans le cas où les cinétiques de séchage sont limitées par le transfert de matière, les fortes valeurs des pressions de sublimation de l'eutectique B permettront un accroissement très significatif de la vitesse de sublimation.

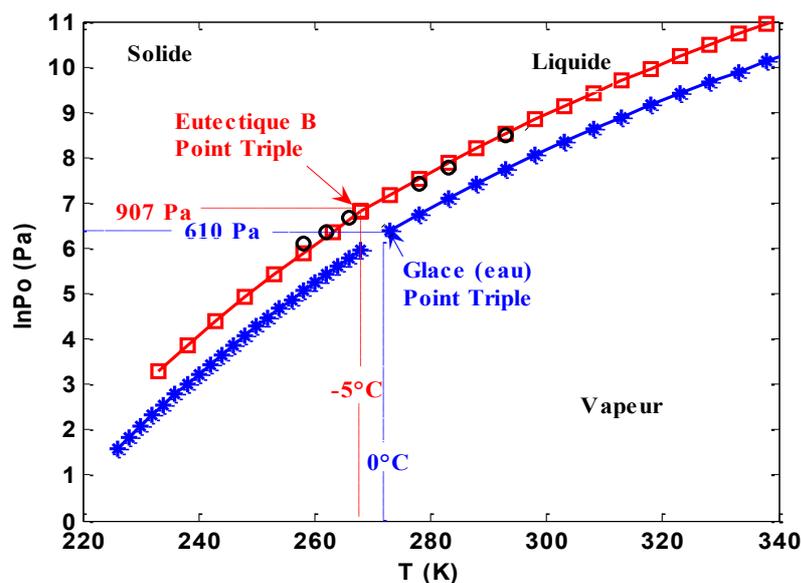


Figure 2.18 : Pression de vapeur d'équilibre du mélange massique à 90% de TBA +10% d'eau (% massique), ATG (□); méthode Statique (o); de l'eau pure (*).

Ainsi, dans les travaux de thèse de Rim Daoussi, l'un des facteurs qui explique les faibles temps de sublimation est que l'eutectique B présente des pressions de sublimation très grandes et supérieures d'un facteur 2 par rapport aux pressions de sublimation de la glace pure. Ces conditions ne sont pas les conditions les plus fréquentes dans les travaux de Rim Daoussi (2008) mais on ne peut pas totalement exclure l'importance de ce facteur dans certaines conditions opératoires – transfert de masse limitant- pour expliquer l'accélération des cinétiques de sublimation à la composition de l'eutectique B.

2.4.2.2 Influence de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique B sur les cinétiques de séchage

Le tableau 2.5, compare les valeurs des enthalpies de sublimation de l'eutectique B et de la glace pure. On constate que la valeur de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique B est plus faible que celle de la glace d'un facteur 2,7. Comme pour le TBA pur, ce facteur explique largement la diminution des temps de séchage lorsque cette formulation (eutectique B) est utilisée comme co-solvant, par comparaison avec une formulation purement aqueuse sublimée dans les mêmes conditions opératoires. En conclusion, les faibles temps de séchage pour la formulation eutectique rapporté par Daoussi et al.(2009) résultent principalement des faibles valeurs de l'enthalpie de sublimation - contrôle du processus de sublimation par le transfert de chaleur – et à un degré variable en fonction des conditions opératoires du procédé (P_{chambre} , $T_{\text{étagère}}$) de l'augmentation de la pression de vapeur d'équilibre solide/vapeur de la formulation.

| | Eutectique B | Glace |
|-------------------------------|--------------|-------|
| ΔH_s (kJ/kg) | 1027 | 2809 |
| $\Delta H_s/\Delta H_{glace}$ | 2,7 | 1 |

Tableau 2.5 : Comparaison de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique B et de la glace pure.

N-B : Les valeurs des coefficients de l'équation 2-9 de Clausius-Clapeyron déterminées expérimentalement permettant le calcul des pressions de vapeur aux équilibres solide/ vapeur et liquide /vapeur du TBA pur et du mélange à 90% de TBA +10% d'eau (%massique) sont données en Annexe 2.

2.4.3. Comparaison des courbes cinétiques pour les formulations à 100% de TBA et à 90% de TBA +10% d'eau (% massique).

Les courbes des cinétiques de séchage des travaux de thèse de Rim Daoussi ont été présentées au paragraphe 2.1. On remarque sur ces courbes une vitesse de sublimation de la formulation eutectique B supérieure à la vitesse de sublimation de la formulation à base de 100% de TBA dans les mêmes conditions opératoires ($P_c = 6 \text{ Pa}$, $T_{\text{étagère}} = -20^\circ\text{C}$). Si l'on compare les enthalpies de sublimation du TBA pur et de l'eutectique B (tableau 2.6), on observe que la valeur de l'enthalpie de sublimation du TBA pur est plus faible que celle de l'eutectique B (facteur 1,4). D'après ces données, si la vitesse de sublimation était exclusivement gouvernée par le transfert de chaleur, alors on aurait dû observer une vitesse de sublimation de la formulation à base de 100% de TBA plus élevée que celle observée avec l'eutectique B. Cependant, c'est le contraire qui est observé sur la figure 2.1 (cf § 2.1). Cela semble indiquer que, dans ces conditions opératoires (-20°C et 6 Pa), la vitesse de sublimation n'est pas principalement gouvernée par le transfert de chaleur.

| | Eutectique B | TBA pur |
|-----------------------------|--------------|---------|
| ΔH_s (kJ/kg) | 1027 | 732 |
| $\Delta H_{TBA}/\Delta H_s$ | 1,4 | 1 |

Tableau 2.6 : Comparaison de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique B et du TBA pur.

Par ailleurs, la comparaison des pressions de vapeur d'équilibre du système solide/vapeur de l'eutectique B et du TBA pur (figure 2.19) montre que les valeurs des pressions de sublimation de l'eutectique B sont 2 fois plus élevées que les valeurs des pressions de vapeur du TBA pur solide pur.

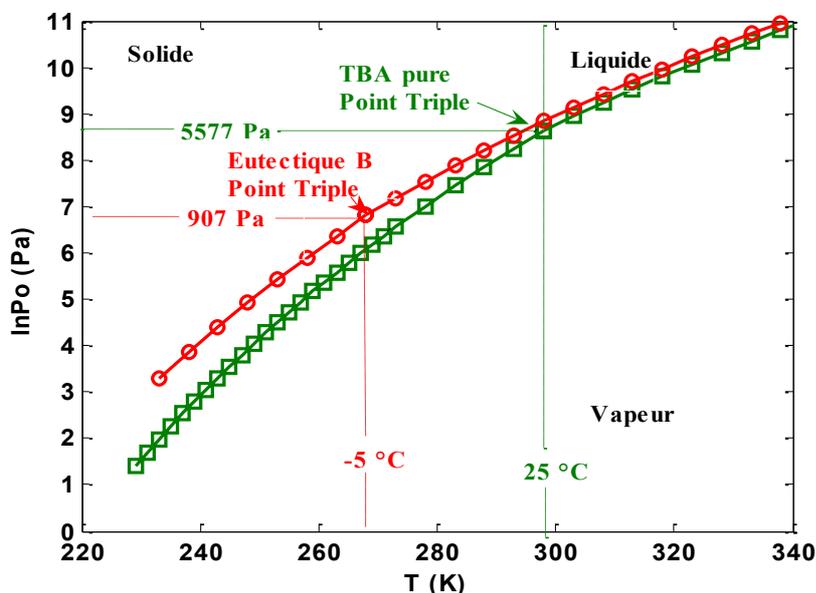


Figure 2.19 : Comparaison des pressions de vapeur d'équilibre : du TBA pur (\square) ; du mélange massique à 90% de TBA +10% d'eau (\circ).

Cet écart semble donc expliquer les résultats des cinétiques de sublimation observé par Rim Daoussi (2008), si l'on admet que dans les conditions opératoires de ses expériences, la vitesse de sublimation était limitée par le transfert de matière de la vapeur de solvant à travers la couche sèche.

2.5 Conclusion.

Dans cette partie du mémoire, nous avons présenté les résultats originaux de déterminations expérimentales des valeurs des pressions de vapeur d'équilibre et des enthalpies de sublimation du TBA pur et du mélange eutectique B, tout deux avantageusement utilisés comme solvant (co-solvant) organiques pour la lyophilisation de plusieurs principes actifs.

Cette détermination expérimentale de ces données thermodynamiques clés pour la modélisation et inexistantes dans la littérature a été effectuée par deux méthodes différentes : la méthode thermogravimétrique et la méthode statique. L'implémentation de la méthode thermogravimétrique comme un outil rapide et précis de détermination des pressions de vapeur (système solide/vapeur et liquide/vapeur) des corps organiques purs congelés a été validée avec le TBA pur. Puis l'utilisation de cette méthode a été étendue avec succès au mélange eutectique B. Les données thermodynamiques ainsi déterminées ont permis d'expliquer certains résultats des travaux de thèse de Rim Daoussi (2009). Ainsi, l'utilisation du TBA comme co-solvant organique permet une diminution considérable des temps de sublimation comparés à une formulation purement à base aqueuse. Ceci s'explique par le fait

que le TBA pur et l'eutectique B - 90% de TBA + 10% d'eau (% massique) - **présentent des pressions de vapeur d'équilibres plus élevées et des enthalpies de sublimation beaucoup plus faibles que glace pure.**

De plus, ces mêmes travaux de thèse de Rim Daoussi (2009), avaient montré que la formulation à la composition eutectique B permettait d'obtenir des cinétiques de sublimation plus élevées que la formulation à base de TBA pur. Cette caractéristique s'explique par le fait que le mélange eutectique B présente des pressions de vapeur 2 fois plus élevées que celles du TBA pur. Il en résulte donc un avantage certain à l'utilisation du TBA à la composition eutectique B comme co-solvant organique dans les procédés de lyophilisation de formulations pharmaceutiques de principes actifs.

CHAPITRE 3

ETUDE COMPARATIVE DE LA LYOPHILISATION EN MILIEU AQUEUX ET ORGANIQUE D'UN PRINCIPE ACTIF MODELE : L'IBUPROFENE.

3. Etude comparative de la lyophilisation en milieu aqueux et organique d'un principe actif modèle : L'Ibuprofène.

3.1 Introduction.

Dans leur grande majorité, les formulations pharmaceutiques destinées à être lyophilisées sont des solutions aqueuses. Dans ce cas, l'eau est typiquement le seul solvant qui doit être éliminé par sublimation puis par désorption. Cependant, il existe des cas où la lyophilisation à partir d'un solvant organique ou d'un mélange d'eau et de co-solvant organique présente de nombreux avantages par rapport à la lyophilisation à partir d'un milieu aqueux, notamment lorsque le principe actif (PA) destiné à être stabilisé est quasi insoluble dans l'eau. Le système de co-solvant organique qui a été le plus largement étudié est certainement le système tert-butanol + eau. Teagarden et Baker (2002) ont passé en revue les différents travaux de recherches qui ont utilisé ce mélange (tert-butanol + eau) en présentant en détails ses différents avantages et inconvénients. Les principaux avantages à l'utilisation du système tert-butanol + eau sont l'augmentation de la solubilité du produit, l'augmentation de la vitesse de sublimation et, par conséquent, la diminution du temps de séchage et une amélioration des propriétés de reconstitution. Dans toutes ces études, seule la formulation organique (co-solvant) a pu être étudiée, puisque, du fait de la faible solubilité des PA dans l'eau la formulation aqueuse n'a pas pu être réalisée. Ainsi, notre travail de recherche a consisté, dans un premier temps, à choisir un principe actif modèle insoluble dans l'eau qui a pu être formulé avec une solution à base aqueuse. Ce principe actif modèle est l'ibuprofène (solubilité dans l'eau < 1mg/ml). Le produit commercial lyophilisé à partir d'une base aqueuse (CALDOLOR) est utilisé par les hôpitaux et administré par injection intraveineuse. La formulation aqueuse (1g) comporte 100mg d'ibuprofène et de l'arginine à un ratio molaire ibuprofène/arginine 1/1. L'ajout d'arginine augmente drastiquement la solubilité de l'ibuprofène dans l'eau et rend ainsi possible la lyophilisation avec une formulation à base aqueuse. Dans un deuxième temps, une formulation organique (tert-butanol + eau) de l'ibuprofène a été réalisée. Cette formulation organique respecte le ratio molaire ibuprofène/arginine 1/1 et est réalisée à partir du mélange à 20% de tert-butanol + 80% d'eau (% massique). Une étude comparative approfondie a pu être effectuée à différents stades de la fabrication de l'ibuprofène lyophilisé pour les deux formulations étudiées. Ainsi, l'étude comparative a été menée sur l'étape de formulation, sur le procédé de lyophilisation (congélation, sublimation, désorption) et sur les propriétés finales du produit (humidité, réhydratabilité, aspect, couleur).

3.2 Caractéristiques physico-chimiques de l'ibuprofène.

L'ibuprofène a été introduit à la fin des années soixante comme agent anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) pour le traitement de la douleur, de l'inflammation, de l'arthrite, de la fièvre et de la dysménorrhée [Brunton et al., 2006]. On décompte dans le monde une trentaine de médicaments commercialisés contenant la molécule d'ibuprofène. A titre d'exemple, on peut citer l'Advil, le Brufen et l'Upfen. La majorité des médicaments contenant l'ibuprofène sont commercialisés sous forme de comprimés et/ou sous forme de suspensions buvables, ce qui conduit dans les deux cas à une administration orale du médicament. Mais depuis le 1^{er} juin 2009, un nouveau médicament à base d'ibuprofène a été commercialisé sous forme lyophilisée. Ce médicament, le Caldolor, est utilisé par les hôpitaux et est administré par injection intraveineuse. Caldolor est une marque déposée par Cumberland Pharmaceuticals et brevetée par cette même société.

L'ibuprofène appartient à la classe des dérivés de l'acide propénoïque. Il est désigné chimiquement sous le terme de 2-(*p*-isobutylphenyl) acide propénoïque (C₁₃H₁₈O₂) (cf, Fig 3.1) et sa masse molaire est de 206,28 g.mol⁻¹. Il est synthétisé à partir de l'isobutyl benzène par acétylation en donnant un produit intermédiaire, le «4-isobutylacétophénone». L'acétylation est suivie par l'addition du chloroacétate d'éthyle et de l'éthoxyde de sodium. Ensuite, ce composé est hydrolysé, décarboxylé puis oxydé (Higgins et al., 2001).

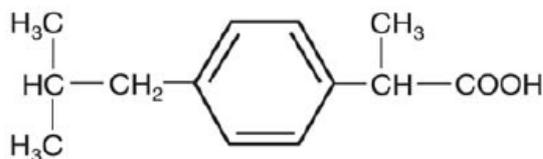


Figure 3.1 : Structure moléculaire de l'ibuprofène, RN CAS : 15687-27-1.

L'ibuprofène peut être cristallisé sous forme monoclinique dont les valeurs des paramètres d'une maille de cristal sont les suivantes $a = 14,667 \text{ \AA}$; $b = 7,886 \text{ \AA}$; $c = 10,730 \text{ \AA}$; $\beta = 99,70^\circ$. L'ibuprofène ne présente pas de polymorphisme mais il faut noter que l'ibuprofène traité de différentes manières peut présenter une dislocation, une surface rugueuse et/ou une aire de surface différente qui n'influence pas significativement son point de fusion (74-77°C). L'ibuprofène commercial se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche avec une taille de particules d'environ 100 μm et une masse volumique vraie $\rho_s = 1120 \text{ kg/m}^3$. Le pKa de l'ibuprofène est compris entre 4,5 et 4,6. Ce principe actif est pratiquement insoluble dans l'eau (< 1mg/ml). Cependant, il se solubilise facilement dans les milieux basiques, les solutions alcooliques et les solvants hydrocarbures non polaires [Higgins et al., 2001].

3.3 Formulation de l'ibuprofène à partir du mélange organique ter-butanol + eau.

Afin de choisir le bon ratio tert-butanol + eau à utiliser pour formuler l'ibuprofène, nous sommes basés sur nos connaissances du diagramme d'état du système tert-butanol + eau [Daoussi et al., 2011, Bogdani et al., 2011]. Dans la nouvelle formulation organique, des critères stricts ont dû être respectés, tels que la quantité finale totale de la solution injectable qui doit être égale à 1g, la masse d'ibuprofène égale à 100mg et une masse d'excipient définie par un ratio molaire d'ibuprofène/excipient de 1/1.

| excipient | Ratio molaire Ibuprofène/excipient | TBA % massique | Eau % massique | Solution |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| - | - | 100 | 0 | totalement soluble |
| - | - | 90 | 10 | claire |
| - | - | 50 | 50 | turbide |
| - | - | 20 | 80 | insoluble |
| mannitol | 1/1 | 100 | 0 | turbide |
| mannitol | 0.5/1 | 100 | 0 | turbide |
| glucose | 1/1 | 100 | 0 | précipitation |
| glucose | 1/1 | 90 | 10 | particules en suspension |
| L-lysine | 1/1 | 100 | 0 | insoluble |
| L-lysine | 1/1 | 90 | 10 | insoluble |
| PVP | 1/1 | 90 | 10 | insoluble |
| PVP | 1/1 | 20 | 80 | insoluble |
| arginine | 1/1 | 90 | 10 | Particules en suspension |
| arginine | 1/1 | 50 | 50 | soluble, claire |
| arginine | 1/1 | 20 | 80 | soluble claire, homogène. |

Tableau 3.1 : Caractéristiques des formulations à base organique d'ibuprofène.

D'après le tableau 3.1, l'arginine semble bien être le seul excipient qui permette une solubilisation totale de l'ibuprofène dans le mélange TBA + eau. Puis, une série d'expériences de screening a montré que la solubilisation totale et rapide de l'ibuprofène et de l'arginine est possible pour des ratios massiques compris entre 0,5/0,5 à 0,2/0,8 de TBA/eau. Au vu des avantages thermodynamiques qu'offrent les compositions eutectiques [Daoussi et al., 2011], nous avons conclu que la formulation organique de l'ibuprofène la plus appropriée est celle comportant 20% de TBA + 80% d'eau (Eutectique A) (cf diagramme d'état figure 2.2). De plus, le TBA étant un solvant assez onéreux, il est intéressant de limiter la quantité utilisée. D'autre part, en limitant la quantité de TBA dans la formulation, nous limitons les risques d'inflammation de celui-ci. Au final, la formulation organique type de 1 g de solution doit contenir 100mg d'ibuprofène + 83mg d'arginine + 163,4mg de TBA + 653,6mg d'eau. Il s'est avéré lors de nos essais de formulation qu'une dissolution de l'ibuprofène dans le TBA et de l'arginine dans l'eau suivie du mélange des deux solutions était la meilleure façon de procéder pour obtenir rapidement une solution totalement homogène à la température ambiante de travail. L'ibuprofène est très soluble dans le ter-butanol et sa dissolution est quasi instantanée. Alors que la formulation à base aqueuse demande un temps de préparation plus long à cause de la formation de mousse à la surface du liquide, mousse créée lors de la dissolution de l'ibuprofène et de l'arginine dans l'eau (cf Figure 3.2). Ceci rend la manipulation de la solution aqueuse délicate. Un temps d'attente de dégazage et de disparition de la mousse est nécessaire avant de passer à l'étape suivante qui est le remplissage des flacons destinés à la lyophilisation. De ce point de vue, la formulation à base organique peut être manipulée beaucoup plus facilement.

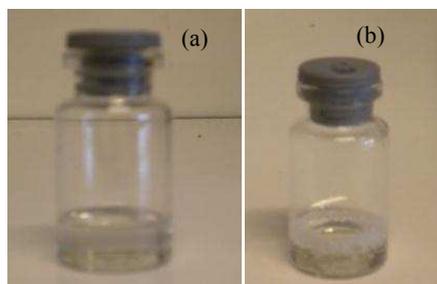


Figure 3.2 : Formulation de l'ibuprofène : à base organique (a), à base aqueuse (b).

3.4 Caractéristiques thermodynamiques.

Dans cette partie de l'étude, des caractérisations thermodynamiques des produits purs ainsi que des deux formulations, aqueuses et organiques, ont été effectuées. Ces multiples expériences de caractérisation ont consisté à déterminer, par des essais de DSC, les températures de fusion, les températures de cristallisation spontanée et de transition vitreuse, et, par cryomicroscopie, la température de collapse (T_c). Puis la méthode statique a été utilisée pour déterminer les valeurs expérimentales des pressions de vapeur d'équilibre solide/vapeur (sublimation) de l'eutectique A, ainsi que la valeur expérimentale de l'enthalpie de sublimation.

3.4.1. Caractérisation thermodynamique des produits purs

La Figure 3.3 montre les thermogrammes de chauffe respectivement de l'ibuprofène (a) de l'arginine (b) et du mélange eutectique A, à 20% de TBA + 80 % d'eau (c) (% massique), obtenus par DSC.

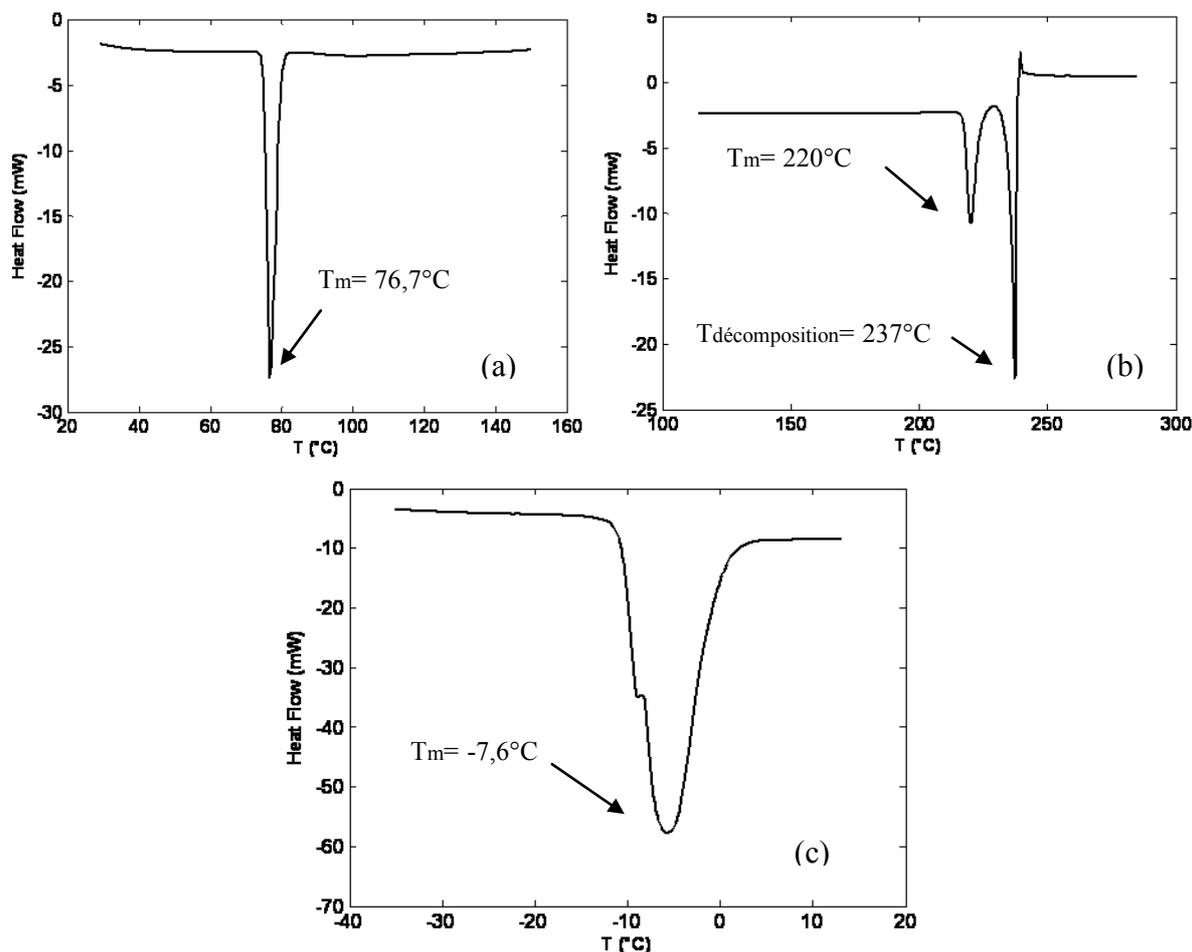


Figure 3.3 : Thermogramme de chauffe de l'ibuprofène (a), de l'arginine (b) et du mélange eutectique A à 20% de TBA + 80 % d'eau (c) (%massique). DSC modulée à la vitesse de $3^\circ\text{C}/\text{min}$, modulation $\pm 0,5^\circ\text{C}$ tout les 40 secondes.

D'après cette figure 3.3, la température de fusion de l'ibuprofène est de $76,7^\circ\text{C}$, celle de l'arginine de 220°C . Ces valeurs sont en parfait accord avec les données fournies par le fournisseur (Sigma-Aldrich). La température de fusion du mélange eutectique à 20% de TBA + 80 % d'eau (% massique) est égale à $-7,6^\circ\text{C}$. Le thermogramme de l'arginine présente un deuxième pic à 237°C . Ce deuxième pic correspond à une décomposition endothermique de l'arginine.

3.4.2. Caractérisation thermodynamique de la formulation à base aqueuse.

Nous avons déterminé la température de transition vitreuse (T_g) et la température de collapse (T_c). La température de transition vitreuse T_g a été obtenue par DSC modulée et la température de collapse (T_c) par cryomicroscopie. La figure 3.4 montre le thermogramme de

chauffe de la formulation d'ibuprofène à base aqueuse. D'après ce thermogramme, la formulation aqueuse présente une température de transition vitreuse T_g égale à $-26,4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cette valeur est obtenue par exploitation de la courbe rouge qui représente le 'flux de chaleur réversible' et de la courbe bleue qui représente le 'Cp réversible'. Le thermogramme met aussi en évidence le pic de fusion de la glace à 0°C .

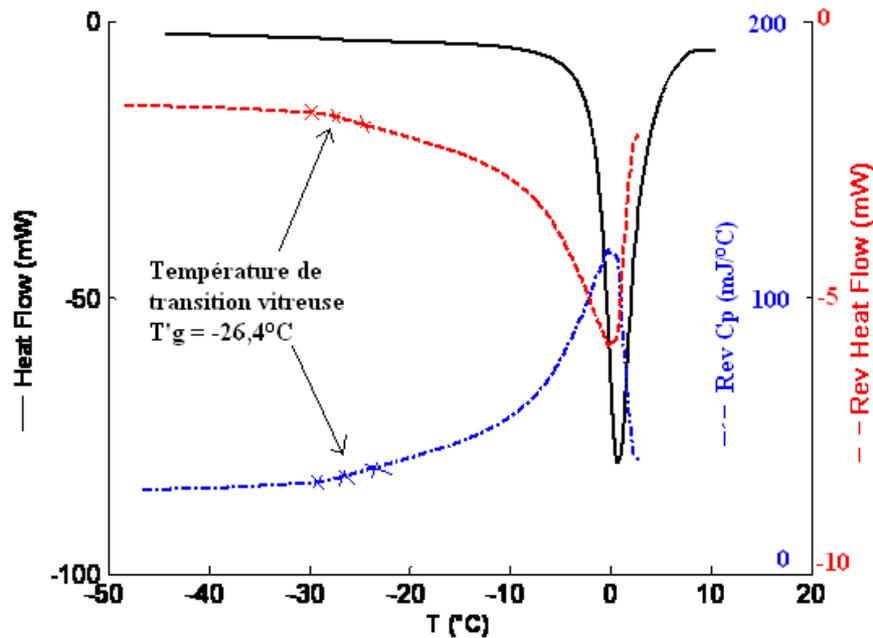


Figure 3.4 : Thermogramme de chauffe de la formulation à base aqueuse d'ibuprofène. DSC modulée à la vitesse de $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, modulation $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ tout les 40 secondes.

La température de collapse pour la formulation aqueuse a été trouvée égale à $T_c = -25,5^{\circ}\text{C}$ (cf. figure 3.5b). Cette température est d'environ 1°C supérieure à la température de transition vitreuse.

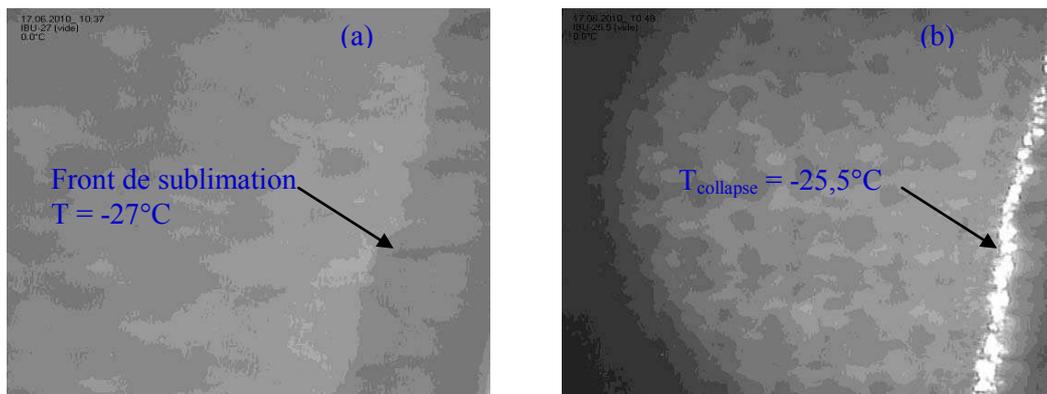


Figure 3.5 : Avancé du front de sublimation (a) : effondrement de la structure sèche (b). Cryomicroscope Linkam.

3.4.3. Caractérisation thermodynamique de la formulation à base de co-solvant organique

Comme pour la formulation aqueuse, la détermination de la température de transition vitreuse à concentration maximale, notée T_g , a été effectuée par DSC. Dans un premier temps un essai en DSC standard (figure 3.6) a été effectué afin de repérer les différents phénomènes thermiques apparaissant sur les thermogrammes de refroidissement et de chauffe. La figure 3.6 représente les thermogrammes de refroidissement et de chauffe de cet essai.

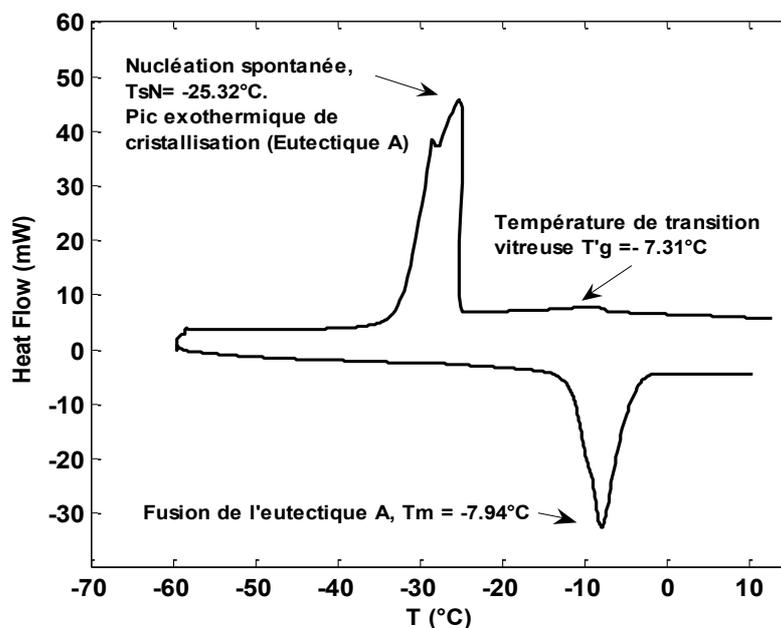


Figure 3.6 : Thermogramme de refroidissement et de chauffe de la formulation à base organique, DSC standard à la vitesse de 3 °C/min

Comme attendu, le pic de fusion de l'eutectique A apparaît à une température égale à $-7,94^{\circ}\text{C}$, valeurs très proche de la température de fusion donnée par la littérature et égale à $-8,2^{\circ}\text{C}$ [Kasraian et Deluca 1995]. Un autre pic exothermique caractéristique de la cristallisation apparaît à $-25,32^{\circ}\text{C}$. Ce pic correspond à la cristallisation de l'eutectique A qui présente dans ce cas un degré de surfusion d'environ 17°C . Compte tenu de ces deux pics de cristallisation et de fusion de l'eutectique A, d'après les bases de la thermodynamique, le thermogramme de chauffe ou de refroidissement devrait faire apparaître une température de transition vitreuse inférieure à la température de fusion de l'eutectique A ($-7,94^{\circ}\text{C}$), ce qui n'est pas le cas. En effet, la température de transition vitreuse, T_g , est détectée sur le thermogramme de refroidissement (cf figure 3.6) à $-7,31^{\circ}\text{C}$ et sur le thermogramme de chauffe en DSC modulée (cf. figure 3.7) à $-7,55^{\circ}\text{C}$. D'après les lois de la thermodynamique, une formulation liquide homogène, lorsque elle est refroidie, ne peut présenter un état vitreux et par la suite un état cristallin. De même que, lorsque cette formulation homogène est chauffée elle ne peut présenter une fusion suivie par un état vitreux. La seule explication plausible pour que l'enchaînement de ces phénomènes ait une raison physique est que, pour une température avoisinant les -7°C , il y ait une démixtion avec apparition de deux phases liquides totalement immiscibles. Une des deux phases est totalement saturée en ibuprofène et en arginine, à un tel point que l'on est dans les conditions de formation spontanée d'une phase vitreuse, d'où l'apparition de la transition vitreuse à la température T_g de $-7,31^{\circ}\text{C}$. L'autre phase liquide,

totalemment démunie de principe actif, est composée de TBA et d'eau dans des proportions telles que l'eutectique A puisse se former.

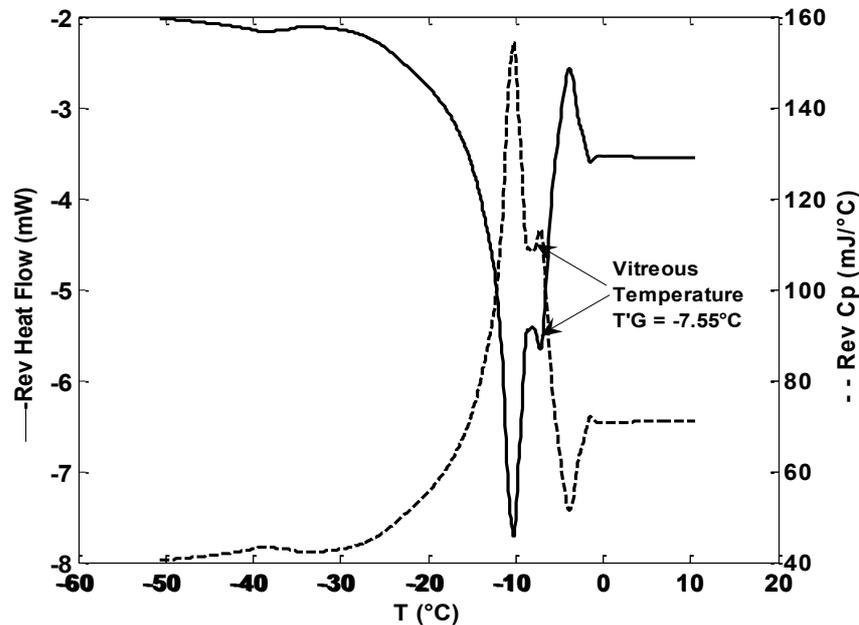


Figure 3.7 : Thermogramme de chauffe par DSC modulée à la vitesse de 3°C/min, modulation $\pm 0,5^\circ\text{C}$ tout les 40 secondes

Dans le but de vérifier visuellement les hypothèses d'apparition d'un état vitreux pour une température avoisinant les -7°C et de cristallisation de l'autre phase liquide non miscible aux alentours des -25°C , des tests de cryomicroscopie en refroidissement à pression atmosphérique ont été réalisés ainsi que des essais de congélation à l'aide du pilote de congélation/lyophilisation SMH45. La vitesse de refroidissement imposée pendant les tests de congélation avec le pilote était de $1^\circ\text{C}/\text{min}$.

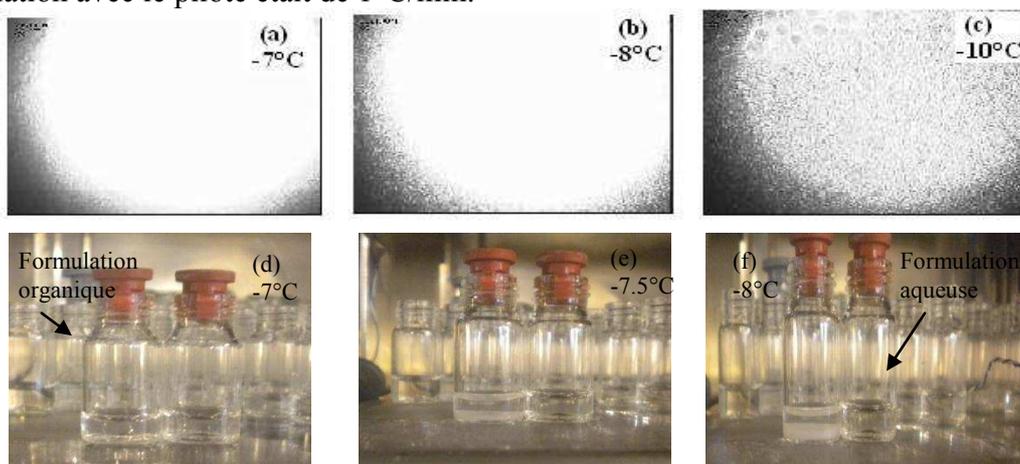


Figure 3.8 : Essais cryomicroscopiques : solution organique homogène (a) : démixtion, vitrification sur les bords de l'échantillon (b) : démixtion, vitrification d'une des deux phases liquides sur l'ensemble de l'échantillon (c). Congélation pilote SMH45 : solution organique homogène (flacon de gauche), aqueuse (flacon de droite) (d) : démixtion, vitrification de la solution organique au fond du flacon (e) : vitrification de haut en bas de la solution organique (f).

La série de figures 3.8a à 3.8f met en évidence que pour une température comprise entre -7°C et -8°C , la solution à base organique change d'aspect et l'apparition d'une phase vitreuse semble être confirmée.

La série de figures 3.9a, 3.9b, et 3.9c montre qu'à -23°C il y a cristallisation de l'eutectique A avec une avancée visible et rapide du front de cristallisation en fonction du temps.

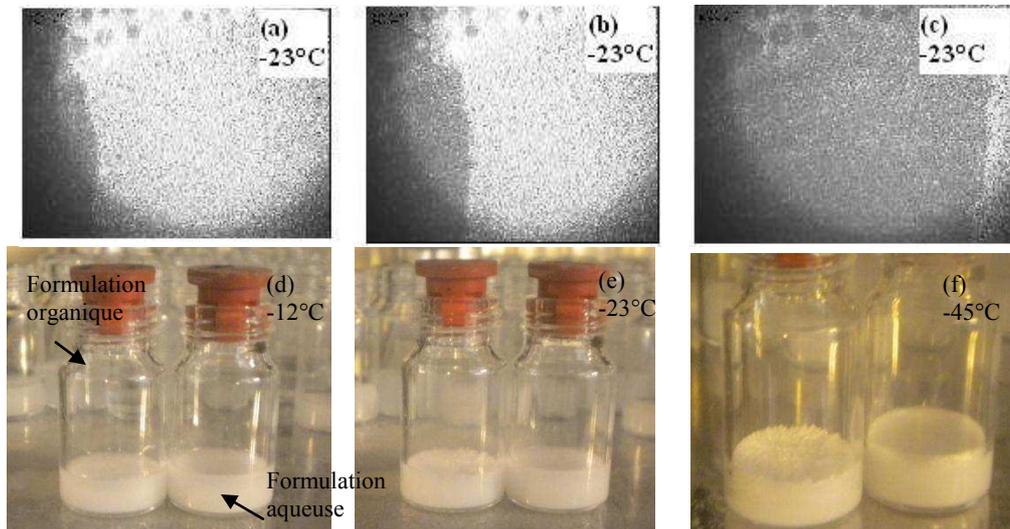


Figure 3.9 : Essais cryomicroscopiques : cristallisation de l'eutectique A, avancée du front de sublimation en fonction du temps (a, b, c). Congélation pilote SMH45 : cristallisation des cristaux de glace de la solution aqueuse (d) : cristallisation de l'eutectique A (e) : aspect des congelats (organique et aqueux) (f).

La figure 3.9d montre que pour une température avoisinant les -12°C , la formulation à base aqueuse (flacon de droite) change d'aspect. En effet, à cette température, il y a cristallisation spontanée des cristaux de glace qui vont croître de proche en proche. Puis, pour une température proche de -23°C , la formulation à base organique (flacon de gauche) cristallise dans les proportions de l'eutectique A. Comme le montrent les figures 3.9e et 3.9f, le congelât à base de solvant organique présente un aspect différent du congelât à base aqueuse. Les cristaux d'eutectique A présentent une morphologie sous forme de dendrites. Ceci est en parfaite adéquation avec les données de la littérature [Teagardent et Baker 2001] qui décrivent une cristallisation dendritique du mélange eutectique A.

Nous avons également déterminé de manière expérimentale les valeurs des pressions de vapeur et d'enthalpie de sublimation de l'eutectique A. La méthode thermogravimétrique (méthode TGA) n'a pas pu être utilisée pour déterminer expérimentalement les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur car, comme le montre la figure 2.14, le mélange liquide à 20% de TBA + 80% d'eau n'est pas un azéotrope. Par conséquent, les équations 2-2 à 2-7 ne sont pas applicables à ce mélange. Cependant, il aurait été intéressant de mesurer directement par la méthode thermogravimétrique les valeurs des pressions de vapeur d'équilibre du système solide/vapeur. En effet, le mélange à 20% de TBA + 80% d'eau sous sa forme solide forme un eutectique qui permet dans ce cas une utilisation de la méthode TGA et des équations 2-2 à 2-7. Malheureusement, l'eutectique A fond à la température de $-8,2^{\circ}\text{C}$ et notre appareil de TGA est limité par la technologie du groupe froid

aux températures supérieures à 10°C. C'est pour ces raisons que la détermination directe des pressions de vapeur à l'équilibre liquide/vapeur et solide/vapeur de l'eutectique A a été réalisée en utilisant la méthode statique. Les points expérimentaux obtenus par la méthode statique étaient au nombre de 5 pour l'équilibre liquide/vapeur et de 6 pour l'équilibre solide/vapeur. Ces points expérimentaux ont permis de déterminer les valeurs des coefficients de l'équation de Clausius-Clapeyron (2-9) (cf annexe 3). Puis cette équation a été utilisée pour calculer un nombre plus significatif de valeur des pressions de vapeur pour les équilibres liquide/vapeur et solide/vapeur. La figure 3.10 présente le diagramme de phase du mélange à 20% de TBA + 80% d'eau dont les valeurs des pressions de vapeur ont été obtenues par la méthode statique. A titre de comparaison, sur cette même figure, nous avons aussi porté les valeurs des pressions de vapeur de l'eau pure.

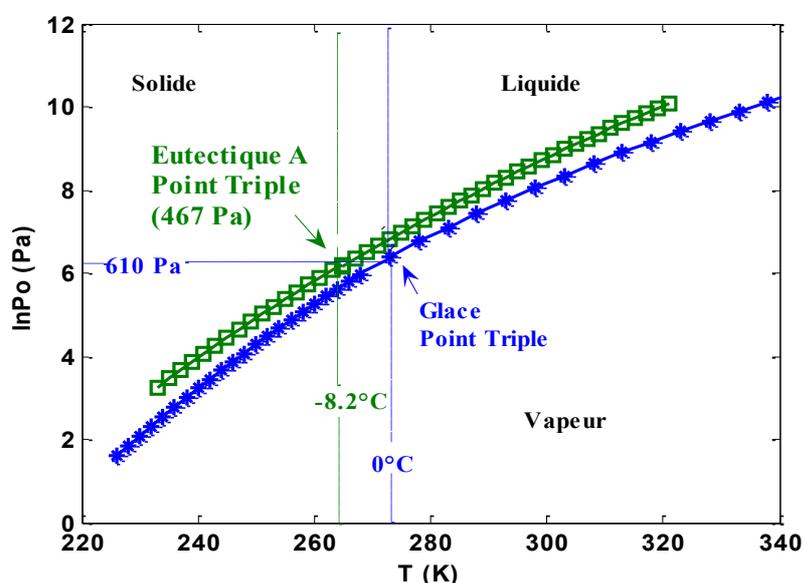


Figure 3.10 : Pressions de vapeur d'équilibre du mélange à 20% de TBA + 80% d'eau (% massique), méthode Statique (\square); de l'eau pure (*).

D'après la figure 3.10, les valeurs des pressions de vapeur de l'eutectique A à l'équilibre solide/vapeur sont plus élevées d'un facteur 1,8 par rapport aux valeurs des pressions de vapeur de la glace. De plus, la valeur de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique A déterminée par l'équation 2-9 a été trouvée égale à $\Delta H_s = 2352 \text{ kJ/kg}$. Cette valeur est 1,2 fois plus faible que l'enthalpie de sublimation de la glace. Au vu de ces données thermodynamiques, la formulation à base de solvant organique d'ibuprofène devrait présenter, pour les mêmes conditions opératoires (température d'étagère et pression de la chambre), des cinétiques de sublimation plus rapides et donc des temps de sublimation plus faibles que la formulation à base aqueuse [Daoussi et al., 2011, Bogdani et al., 2011].

3.4.4. Comparaison des données thermodynamiques de la formulation à base aqueuse et de la formulation à base organique.

Cette première étude de caractérisation thermodynamique a montré que la formulation aqueuse présente une température de transition vitreuse autour de $-26,4^{\circ}\text{C}$ et que la formulation organique présente une température de transition vitreuse aux environs de $-7,5^{\circ}\text{C}$. Habituellement, la température de transition vitreuse est un paramètre important du cycle de lyophilisation car elle représente le paramètre clef pour le contrôle de la sublimation puisque la température de l'étagère est réglée de telle façon que la température du produit ne dépasse jamais cette température de transition vitreuse afin de maintenir la phase cryoconcentrée à l'état vitreux au cours de la sublimation. Ceci est vrai pour la formulation à base aqueuse mais pas totalement vrai pour la formulation à base organique. En effet, il a été montré que la formulation à base organique avait un comportement particulier et présentait une température de fusion de l'eutectique A ($-8,2^{\circ}\text{C}$) inférieure à la température de transition vitreuse ($-7,5^{\circ}\text{C}$). Ainsi, en toute rigueur, les températures des étagères doivent être réglées de façon à ce que le produit ne dépasse jamais la température de fusion (T_m) de la phase cristalline (eutectique A) et la température de transition vitreuse ($T'g$) de la phase cryoconcentrée. Donc, dans ce cas particulier, il faut considérer les deux températures, T_m et $T'g$, comme des paramètres clef pour le contrôle de l'étape de sublimation. Pour notre système, nous constatons que les températures de transition vitreuse, $T'g$, et de fusion, T_m , de la formulation à base organique sont nettement supérieures à la température $T'g$ de la formulation à base aqueuse. Ainsi, il est possible de réaliser la sublimation de la formulation à base organique à un niveau de température beaucoup plus élevé et, par conséquent, d'accélérer les cinétiques de sublimation et donc de réduire fortement les temps de sublimation. De plus, il a été observé que les valeurs des pressions de sublimation de la formulation à base organique étaient plus élevées que les valeurs des pressions de sublimation de la formulation à base aqueuse (cf figure 3.10). Par ailleurs, la valeur de l'enthalpie de sublimation de la formulation à base organique est plus faible que la valeur de l'enthalpie de sublimation de la formulation à base aqueuse. Ces deux facteurs doivent donc contribuer de façon très importante à réduire les coûts opératoires du procédé de lyophilisation et notamment permettre une diminution importante des temps de séchage (sublimation).

3.5 Etude de la congélation.

Comme souligné précédemment dans la partie bibliographique, la congélation est une étape clé du procédé de lyophilisation car elle détermine le nombre de cristaux, leur forme et leur taille. L'étape de congélation mérite donc une étude approfondie puisque la structure congelée influe directement sur les caractéristiques morphologiques du lyophilisat et, par conséquent, sur les cinétiques de sublimation, et ainsi, sur les coûts globaux du procédé de séchage. Nous avons étudié, pour les deux formulations, aqueuse et organique, respectivement la morphologie des cristaux de glace et ceux de l'eutectique A. Cette étude morphologique a consisté à déterminer la distribution en taille des cristaux de glace et des cristaux d'eutectique A. Parallèlement, l'influence de la vitesse de congélation sur la taille des cristaux a été aussi étudiée. Dans cette étude, la congélation des échantillons a été effectuée à

l'aide du lyophilisateur pilote SMH45. Cette étude morphologique a nécessité l'emploi de plusieurs techniques, notamment de la microscopie optique par réflexion en chambre froide.

3.5.1. Microscopie en chambre froide.

3.5.1.1 Principe.

La microscopie optique par réflexion en chambre froide (cf figure 3.11) permet une observation in situ du solvant au sein de la structure de la matrice congelée dans des conditions proches de la congélation. La surface de l'échantillon est éclairée perpendiculairement par éclairage épiscopique coaxial et elle est observée par réflexion dans le même axe que l'axe d'éclairage. La formation d'une image contrastée est basée sur la différence des quantités de lumière réfléchies par l'échantillon. Ces contrastes proviennent des différences de lumière absorbée par les différents constituants ou des différents flux réfléchis sur les différentes interfaces des phases constituant la structure congelée.

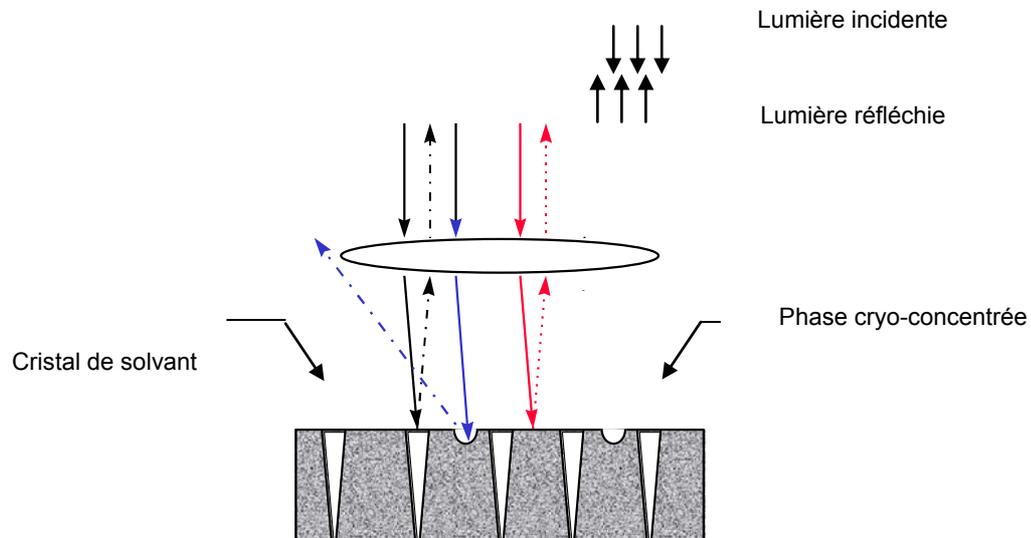


Figure 3.11 : Schéma de principe de la microscopie optique par réflexion à épiscopie coaxiale

Pour une bonne observation de l'échantillon, sa surface doit être la plus lisse possible et sans rugosité importante, état qui est obtenu par un surfacage soigneux après réalisation de la découpe au microtome. La microscopie optique à épiscopie coaxiale présente cependant ses limites. Elle nécessite un équipement permettant l'observation à basse température d'où la nécessité de faire les observations dans une chambre froide maintenue à $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, ce qui n'est pas très confortable pour l'opérateur. De plus, elle n'offre pas des grossissements aussi importants que les autres techniques microscopiques (SEM, cryo-SEM). Enfin, l'échantillon doit être parfaitement et donc longuement surfacé, pour être observé et analysé dans de bonnes conditions. Cependant, cette technique d'observation présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet la visualisation de la structure du produit à des températures proches de la congélation, ce qui permet d'obtenir des informations sur les

arrangements et la morphologie des différentes phases. Ensuite, l'absence de traitement préalable à l'observation, et le faible nombre de manipulations, limitent le risque de modification de la structure. De plus, c'est une technique très rapide et simple d'utilisation et le matériel qu'elle nécessite est relativement peu coûteux.

3.5.1.2 *La chambre froide.*

La microscopie optique à épiscopie coaxiale est une méthode directe d'observation de l'échantillon congelé. Il est donc important de conserver la chaîne du froid durant toutes les étapes de la manipulation. C'est pourquoi le microscope et le microtome (utilisé pour surfaçer les échantillons) sont placés dans une chambre froide maintenue à -25°C . Cependant, ces observations sont rendues très difficiles par la formation de givre sur l'objectif du microscope ou même sur la surface de l'échantillon, givre provenant des entrées d'air et de vapeur d'eau lors de l'accès de l'expérimentateur à l'intérieur de la chambre froide et également de sa présence (respiration). Pour des questions de sécurité, l'opérateur doit ressortir de la chambre froide toutes les 30 minutes en faisant au minimum une pause de 15 minutes. Il est conseillé dans ces conditions d'effectuer les manipulations en hiver afin que l'écart de température chambre froide et ambiante soit le plus faible possible et éviter ainsi un trop grand choc thermique.

3.5.1.3 *Le microtome et le microscope.*

La visualisation des échantillons est rendue possible grâce à leur surfaçage précis à l'aide d'un microtome 2000 R (Leica) et d'un microscope stéréoscopique MZ 12 (cf figure 3.12). Le microtome est muni de lames en acier enrichies en carbone, ce qui apporte une meilleure qualité de coupe et une plus grande longévité pour une utilisation avec des matrices congelées. Le microscope fournit des grossissements dans la gamme allant de 25 à 100.

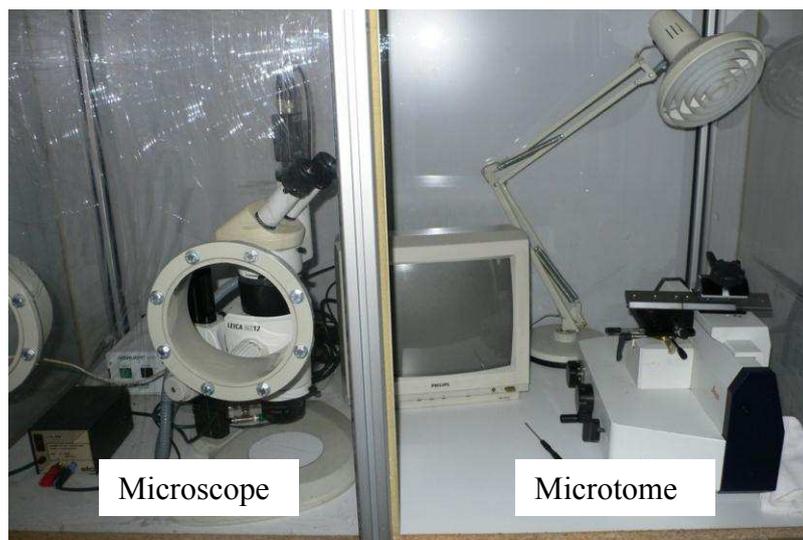


Figure 3.12 : Chambre froide renfermant le matériel d'observation et le microtome (LEICA)

3.5.2. Protocoles de congélation et préparation des échantillons.

Les expériences de caractérisation de la morphologie de la glace et de l'eutectique A ont été réalisées pour les deux protocoles de congélation différents indiqués ci-dessous :

- vitesse de congélation lente ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), jusqu'à -45°C et maintien à cette température pendant 2h ;
- vitesse de congélation modérée ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), jusqu'à -45°C et maintien à cette température pendant 2h.

Une masse de 1g de solution (aqueuse ou organique) a été introduite dans chaque flacon en verre de 4mL (flacon fabriqué par Verretubex, Nogent le Roi). Ceci correspond à une hauteur de remplissage du flacon de 1cm. Pour chaque essai, pour lequel, la vitesse de congélation a été fixée, 3 échantillons (aqueux ou organiques) ont été congelés. De plus, des essais de répétabilité ont été menés afin de vérifier la justesse de nos résultats. La congélation des échantillons a été réalisée à l'aide du lyophilisateur SMH 45 pour reproduire le mieux possible les vitesses de congélation obtenues lors des cycles de lyophilisation étudiés au cours de ce travail. Ensuite, à la fin de l'étape de congélation, les échantillons sont sortis du lyophilisateur et les flacons enrobés de parafilm. Puis les flacons de verre sont cassés par compression grâce à un étai. Le parafilm enveloppant le verre évite que celui-ci forme des débris en éclatant. Ainsi, par cette technique nous travaillons en toute sécurité. Une fois le morceau de congelât récupéré, celui-ci est déposé sur un support métallique spécialement conçu pour le fixer. Une colle spéciale pour froid est utilisée pour rigidifier et solidariser le support avec le congelât en plongeant le tout dans de l'azote liquide (cf figure 3.13). Une fois l'échantillon prêt, il doit être immédiatement introduit dans la chambre froide pour éviter la fonte de celui-ci. Le surfacage se fait par pas dégressifs de $20\ \mu\text{m}$ à $1\ \mu\text{m}$. C'est la qualité du surfacage qui détermine celle de l'observation i.e la netteté et le contraste des images obtenues (stries visibles sur la photo). C'est pourquoi, il est important d'opérer avec méthode, rigueur et beaucoup d'attention pour atteindre le cœur de l'échantillon avec une vitesse de lame régulière et lente.

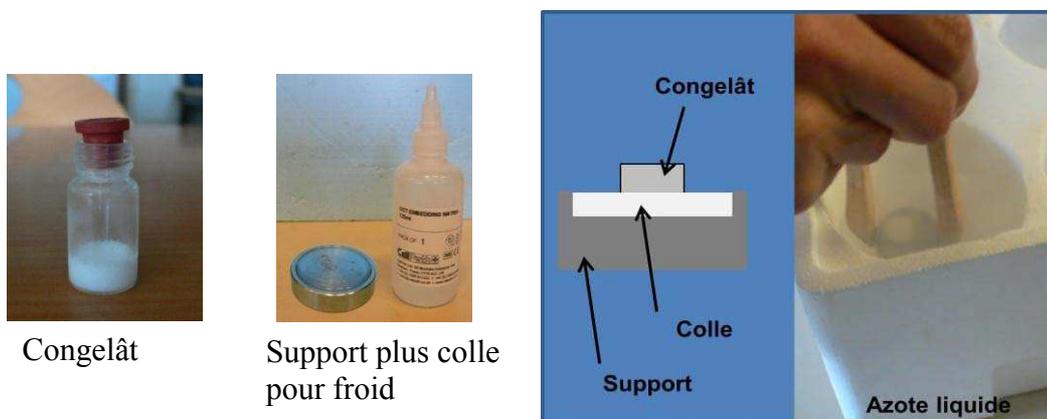


Figure 3.13 : Préparation de l'échantillon pour l'étude de microscopie en chambre froide.

3.5.3. Observation des cristaux de glaces et d'eutectique A.

Après surfacage, l'échantillon est observé directement à l'aide d'une loupe binoculaire disposant d'un éclairage épiscopique coaxial d'une puissance de 150 W (cf figure 3.14). L'oculaire du microscope optique est équipé d'une caméra numérique (Hitachi CCD), reliée à un ordinateur doté d'un logiciel d'acquisition et de traitement d'image (Visilog 5.4), l'ordinateur se trouvant à l'extérieur de la chambre froide. Ainsi, les images obtenues sont directement stockées et peuvent être ensuite analysées après leur acquisition, à la convenance de l'expérimentateur.



Figure 3.14 Observation de l'échantillon congelé.

Pour chaque analyse de structure correspondant à une formulation et un protocole de congélation donnés, 10 photos ont été prises sur toute la surface de l'échantillon. Un échantillon était, en moyenne, surfacé à 3 niveaux différents. Ce qui conduit au final pour un essai (contenant 3 échantillons) à une quantité d'images obtenues égales à 90. Le tableau 3.2 ci-dessous donne les valeurs des différents facteurs de conversion utilisés entre une dimension donnée en pixels et une longueur réelle exprimée en micron. Ce facteur de conversion a été obtenu en enregistrant une image avec une règle micrométrique pour chaque grossissement existant du microscope. Ensuite, un logiciel de photo (Image J) a été utilisé afin d'ouvrir les images enregistrées et le nombre de pixels sur une distance de 100 μm donnée par la règle a ainsi pu être déterminé.

| Grossissement | 25 | 32 | 40 | 50 | 63 | 80 | 100 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|
| Facteur de conversion ($\mu\text{m}/\text{pixel}$) | 3,16 | 2,48 | 1,99 | 1,58 | 1,25 | 0,98 | 0,86 |

Tableau 3.2 : Correspondance entre longueur réelle et nombre de pixels pour les différents grossissements utilisés

3.5.4. Traitement des images et mesure de la taille moyenne des cristaux de glace et d'eutectique A.

Lors de l'étude d'observation, deux grossissements ont été utilisés : le $\times 32$ et le $\times 63$. Une fois l'image originale (figure 3.15a) récupérée, elle est traitée grâce au logiciel Image J. Ce traitement consiste à tracer manuellement le contour des cristaux de glace ou d'eutectique A (figure 3.15b). Puis par une succession de traitement d'images (binarisation, soustraction, etc.) il en résulte une image (figure 3.15c) qui fait apparaître clairement le pourtour des cristaux.

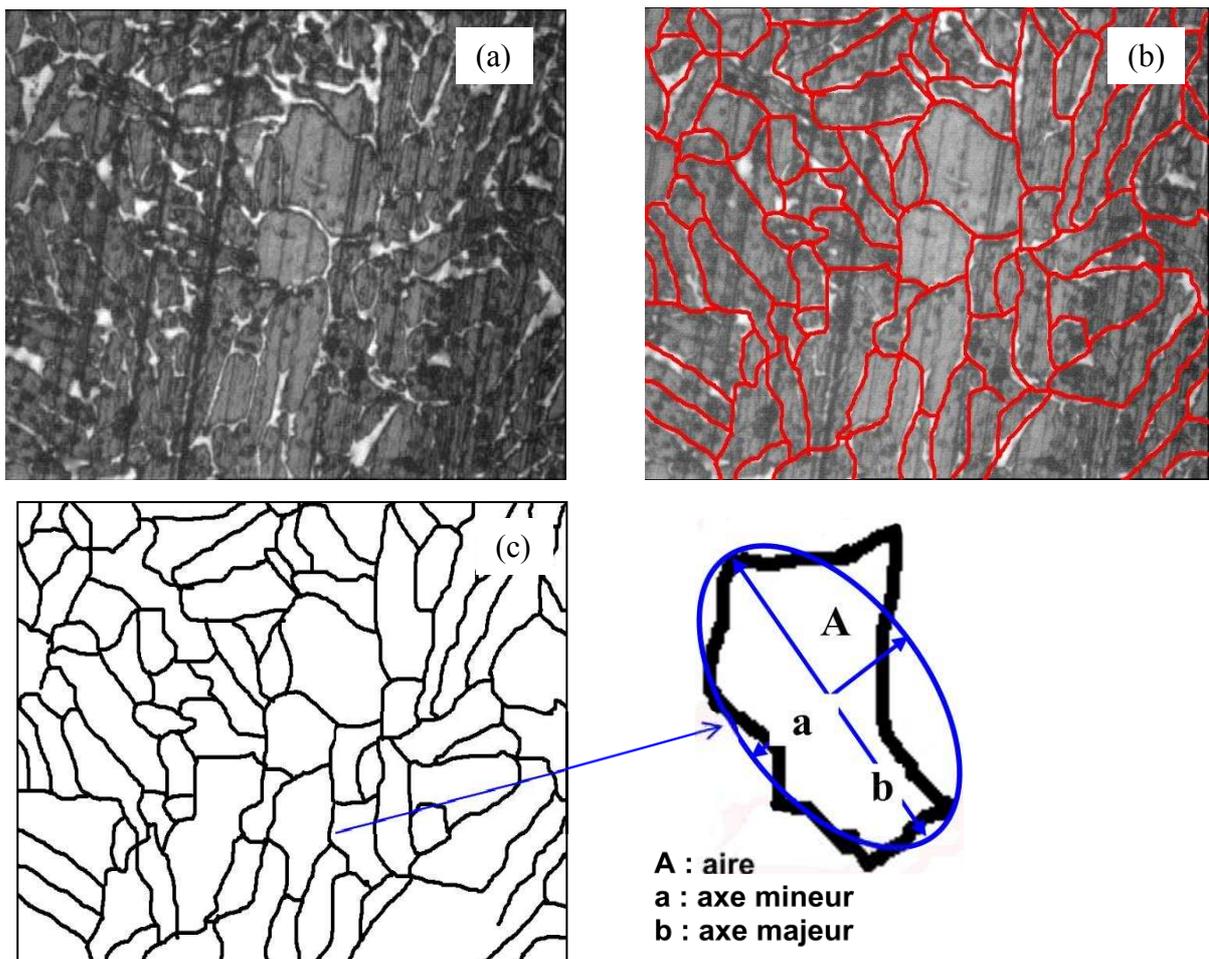


Figure 3.15 : Exemple de traitement d'images avec le logiciel Image J. Images : originale (a), du tracé des cristaux (b), finale (c).

On se basant sur l'image finale représentée par la figure 3.15c, on se rend compte que les cristaux n'ont pas une forme sphérique régulière. C'est pourquoi on cherche à estimer leur surface afin de déterminer leur diamètre équivalent. L'aire des cristaux a été calculée en se servant de deux longueurs caractéristiques, notées a et b, et schématisées sur les figures 3.15c et 3.16.

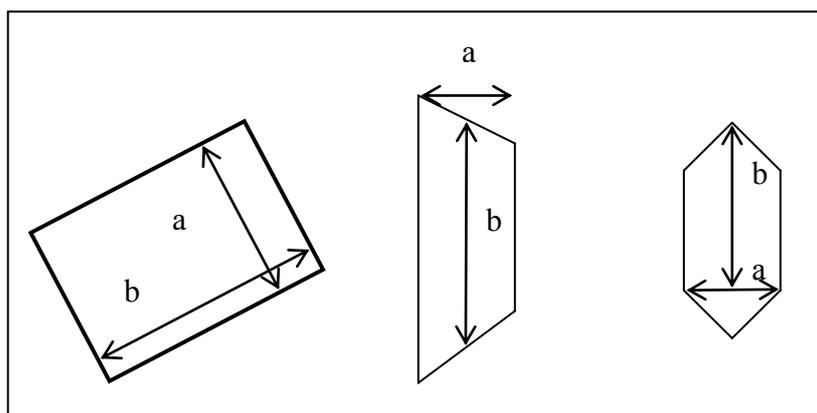


Figure 3.16 Estimation des dimensions caractéristiques pour le calcul de la surface des cristaux.

Si le cristal n'a pas une forme géométrique simple, il faut essayer de se rapprocher au plus de sa surface réelle en pondérant visuellement l'une des deux longueurs caractéristique notées a et b . On peut alors calculer l'aire moyenne du cristal, notée A , en effectuant le produit $A = a \times b$. Ce qui permet d'estimer le diamètre équivalent notée d_{eq} de la sphère ayant la même surface que le cristal, à l'aide de la relation suivante :

$$d_{eq} = \sqrt{\frac{4A}{\pi}} \quad (\text{Eq 3-1})$$

Pour chaque échantillon, plusieurs images ont été analysées de manière à obtenir une valeur moyenne la plus représentative possible. A partir de l'estimation de la surface A , on peut en déduire la valeur moyenne $\overline{d_{eq}}$, et tracer des courbes de distribution. Ces courbes de distribution sont calculées avec un incrément de taille (aussi appelé classe) de $20\mu\text{m}$. Toutes les classes avaient la même largeur. La distribution en nombre représente le nombre de cristaux ayant une taille comprise entre $L-10\mu\text{m}$ et $L+10\mu\text{m}$, nombre rapporté au nombre total de cristaux. La distribution cumulée représente la sommation de la distribution précédente en nombre. Le nombre de cristaux mesurés était d'environ 200 par échantillon.

3.5.5. Morphologie des cristaux de glace de la formulation d'ibuprofène à base aqueuse.

La vitesse de congélation va influencer directement la taille des cristaux de glace et, de manière générale la morphologie du lyophilisat et, par conséquent, les cinétiques de sublimation. Ainsi, nous avons dans un premier temps étudié l'influence de la vitesse de congélation sur le degré de surfusion en suivant la variation de la température du congelât en fonction du temps. Pour cela, les thermocouples de type K, présents dans la chambre de lyophilisation, ont été placés à l'extérieur et au fond du flacon. La figure 3.17 présente la variation de la température du congelât à base aqueuse pendant l'étape de congélation (pilote SMH 45) en fonction du temps, pour les deux vitesses de congélation étudiées, à savoir la vitesse de congélation de $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$ dite lente et celle de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ dite modérée.

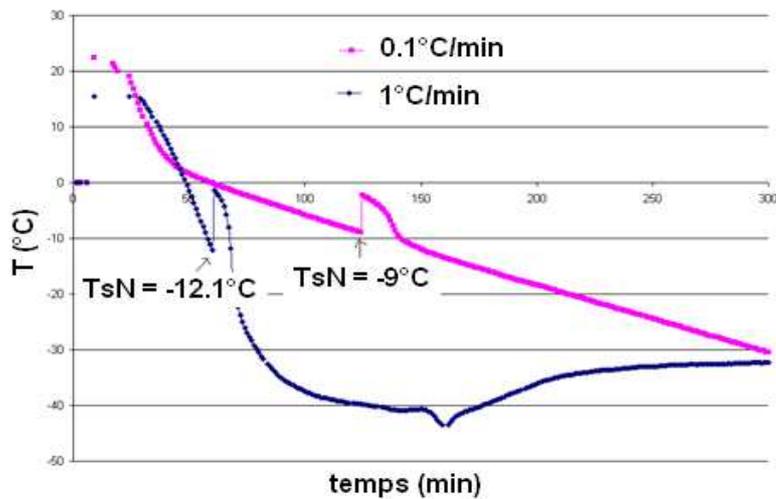


Figure 3.17 : Variation de la température du congelât à base aqueuse en fonction du temps pour deux vitesse de congélation différentes.

D'après la figure 3.17, on observe que plus la vitesse de congélation est élevée plus la nucléation spontanée de la glace est retardée et repoussés vers des températures plus basses. Il en résulte donc une augmentation du degré de surfusion avec la vitesse de congélation. Ceci est en parfait accord avec ce que l'on observe habituellement avec les formulations à base aqueuse [Nakagawa et al., 2006]. Afin, d'observer visuellement l'influence de la vitesse de congélation sur la taille des cristaux de glace, nous avons effectué une étude morphologique par microscopie en chambre froide. Les figures 3.18a et 3.18b présentent les images du congelât de la formulation à base aqueuse obtenues respectivement pour une vitesse de congélation de 0,1°C/min et 1°C/min.

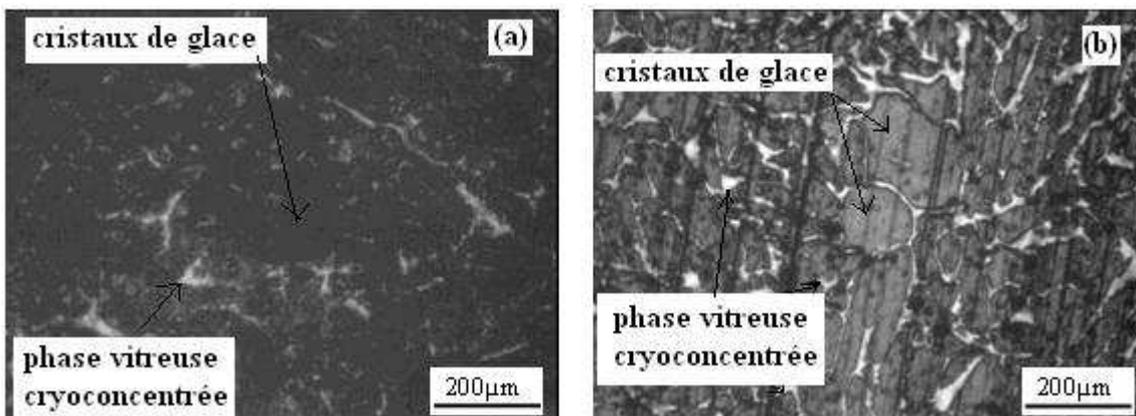


Figure 3.18 : Microscopie en chambre froide : Formulation à base aqueuse, vitesse de congélation 0,1°C/min (a), 1°C/min (b).

Comme attendu, on observe visuellement, que la taille moyenne des cristaux de glace de la formulation à base aqueuse s'avère inversement proportionnelle à la vitesse de congélation. Il est à noter qu'il nous a été impossible de tracer avec une précision satisfaisante le pourtour

des cristaux de glace sur les images originales obtenues par microscopie en chambre froide pour une vitesse de congélation de 0,1°C/min. Ainsi nous n'avons pu étudier que la distribution en taille des cristaux de glace obtenu avec une vitesse de congélation égale à 1°C/min. Les résultats de cette distribution seront présentés au paragraphe 3.5.7.

3.5.6. Morphologie des cristaux d'eutectique A de la formulation d'ibuprofène à base organique.

Comme pour la formulation à base aqueuse nous avons suivi la variation de la température du congelât en fonction du temps pendant la phase de congélation. Les deux vitesses de congélations étudiées sont les mêmes que celle citées précédemment, à savoir 0,1°C/min et 1°C/min. Ces résultats sont reportés sur la figure 3.19. On observe que, contrairement à la formulation à base aqueuse, avec la formulation organique la vitesse de congélation ne semble avoir que très peu d'influence sur la température de nucléation spontanée de l'eutectique A qui se produit pour les deux vitesses étudiées à une température voisine de -22°C. Par conséquent, l'influence de la vitesse de congélation sur la taille des cristaux (eutectique A) sera très faible avec la formulation à base organique.

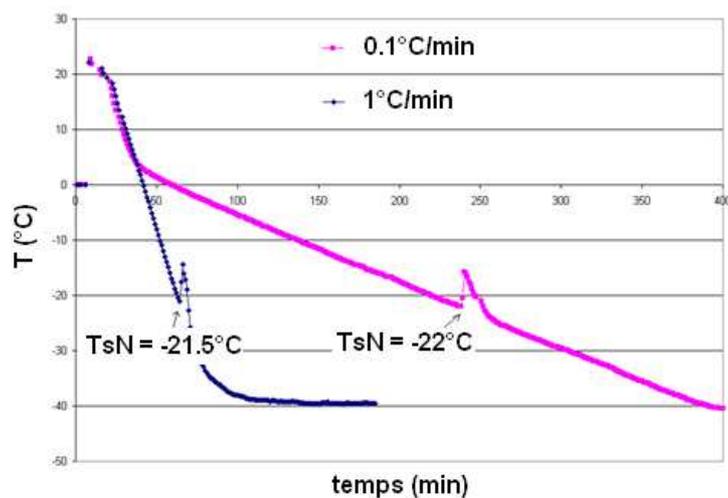


Figure 3.19 : Variation de la température du congelât à base organique en fonction du temps pour deux vitesses de congélation différentes.

Une explication possible de cette tendance, qui ne correspond pas à ce que l'on observe avec les formulations à base aqueuse, pourrait être que les nucléi de l'eutectique A vont pouvoir naître et croître dans un espace restreint délimité par la phase vitreuse, annulant ainsi l'influence de la vitesse de congélation sur le degré de surfusion.

Cette tendance se confirme visuellement en observant les images obtenues par microscopie en chambre froide (cf figures 3.20a et 3.20b).

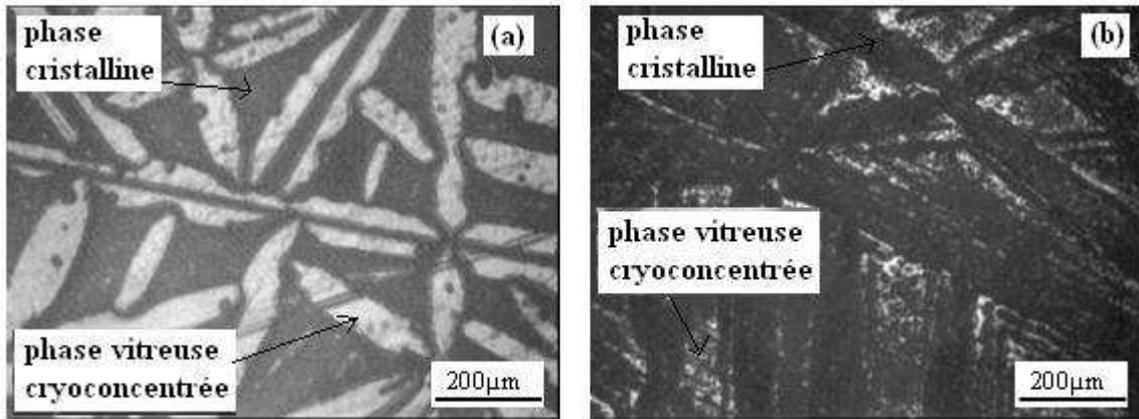


Figure 3.20 : Microscopie en chambre froide : Formulation à base organique, vitesse de congélation 0,1°C/min (a) ; 1°C/min (b).

Après traitement des images, nous avons tracé la courbe de la distribution en taille des cristaux d'eutectique A. On observe pour une vitesse de congélation égale à 0,1°C (cf figure 3.21), un diamètre équivalent moyen des cristaux d'eutectique A égal à 119,9 µm.

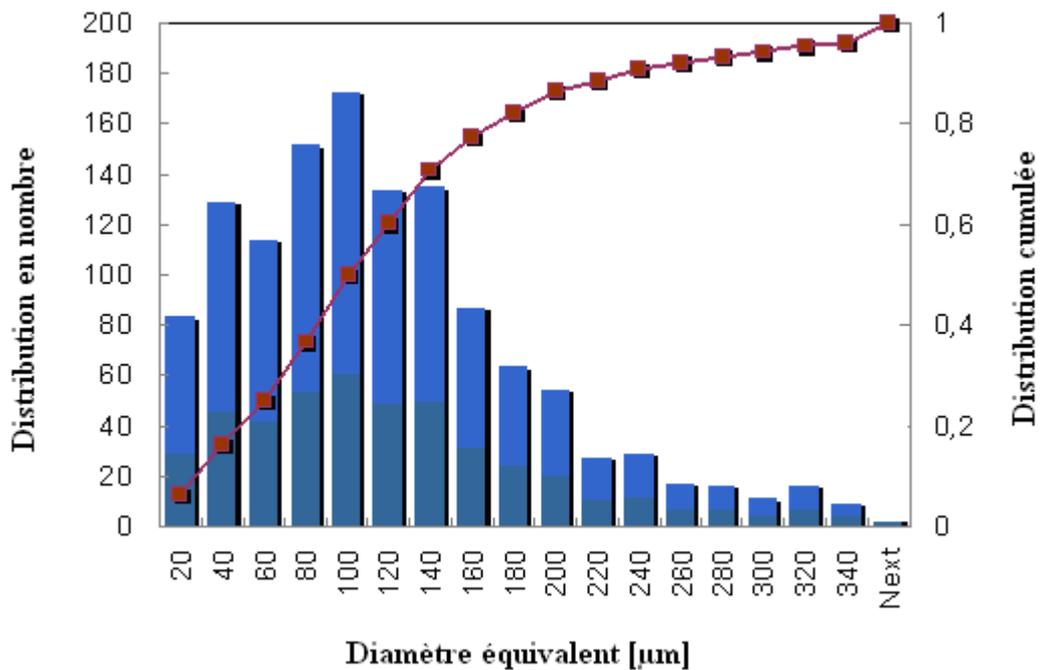


Figure 3.21 : Distribution en nombre et cumulée de la taille moyenne des cristaux de la formulation à base organique pour une vitesse de congélation de 0,1°C/min. Grossissement x63 et x32. Diamètre équivalent moyen 119,9µm.

De même, pour une vitesse de congélation égale à 1°C (cf figure 3.22), le diamètre équivalent moyen des cristaux d'eutectique A a été trouvé égale à 104,5 µm, ce qui confirme que la vitesse de congélation n'a que peu d'influence sur la taille des cristaux d'eutectique A.

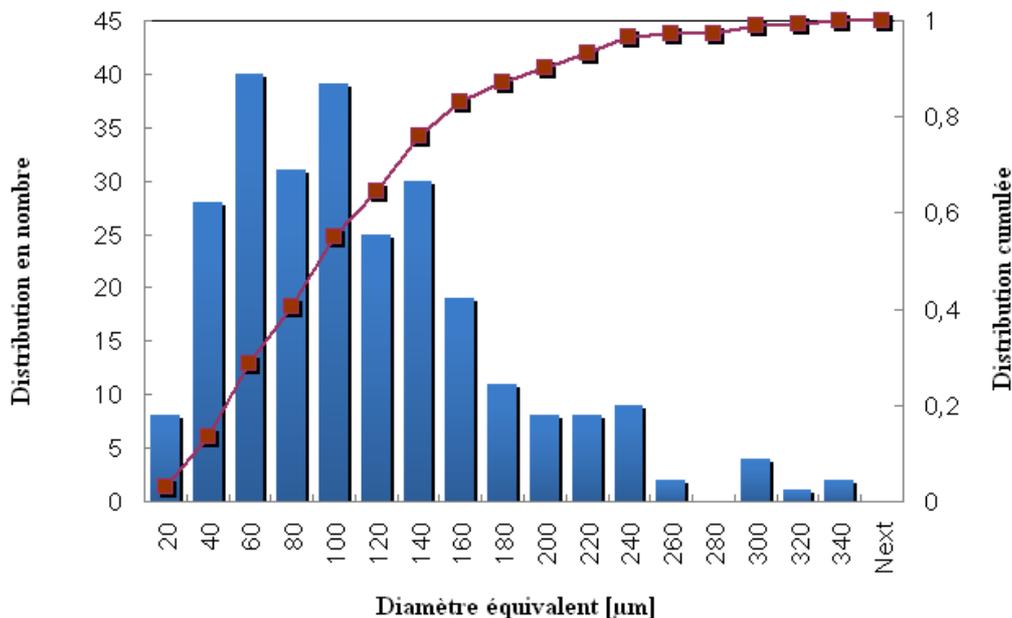


Figure 3.22 : Distribution en nombre et cumulée de la taille moyenne des cristaux de la formulation à base organique pour une vitesse de congélation de 1°C/min. Grossissement x63 et x32. Diamètre équivalent moyen 104,5 µm.

3.5.7. Comparaison morphologique des cristaux de solvant de la formulation à base aqueuse avec la formulation à base organique.

Le diagramme de distribution en taille des diamètres équivalents des cristaux (cf figure 3.23) met en évidence et confirme que, pour la formulation organique, la vitesse de congélation n'a que très peu d'influence sur la distribution en taille moyenne des cristaux obtenus avec l'eutectique A. Par ailleurs, la comparaison de ces distributions pour les deux formulations étudiées pour une vitesse de congélation de 1°C/min montre que la formulation à base organique présente une distribution en taille moyenne des cristaux plus élevée que la formulation à base aqueuse. Ceci représente un avantage certain pour la sublimation car des pores plus gros vont augmenter la perméabilité de la couche sèche au transfert de matière de la vapeur d'eau (ou de solvant) et de ce fait augmenter les vitesses de sublimation si celle-ci est contrôlée par le transfert de masse de cette vapeur, ce qui peut contribuer à réduire les coûts opératoires généralement élevés du procédé de lyophilisation.

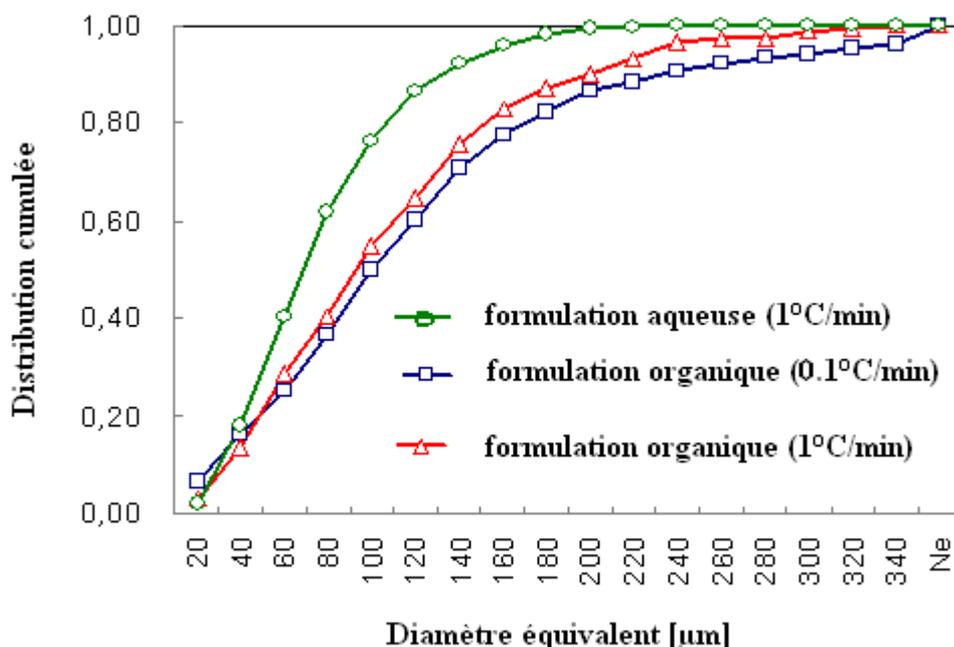


Figure 3.23 : Distribution cumulée de la taille des cristaux de solvant pour la formulation à base organique et à base aqueuse. Grossissement x32 et x63.

N-B : Des images obtenues par microscopie en chambre froide, pour les formulations, à base aqueuse et à base organique, pour les deux vitesses de congélation étudiées sont présentées en annexe 4.

3.6 Etude de la sublimation

L'étape de sublimation est la plus longue du cycle de lyophilisation et, par conséquent, la plus onéreuse. Ainsi, une optimisation des paramètres opératoires, à savoir, la température des étagères, notée T_{shelf} , et la pression totale dans la chambre de lyophilisation, notée P_c , est nécessaire afin d'obtenir des temps de sublimation les plus courts tout en assurant la qualité du produit final. Nous avons optimisé les paramètres opératoires de l'étape de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique par une nouvelle approche, nommée Quality by Design (QbD). Cette nouvelle approche nous a conduits à la construction du Design Space de la formulation à base organique. Puis, en s'appuyant sur ce Design Space, une étude comparative des cinétiques de sublimation des deux formulations, à base aqueuse et organique a été effectuée pour différentes conditions opératoires (température d'étagère et pression totale de la chambre).

3.6.1. Définition du Quality by Design (QbD) et du Design Space.

Le Quality by Design (QbD) se définit, d'après l'International Conference Harmonisation (ICH) Q8-R2 2009, comme une approche systématique du développement d'un médicament, qui vise à mieux explorer les caractéristiques des molécules pharmaceutiques, à mieux connaître le procédé de fabrication en l'explorant aux limites et en identifiant les paramètres critiques de celui-ci. La finalité du QbD est que la qualité du produit ne soit plus assurée en fixant les conditions opératoires pour atteindre une seule valeur cible, mais par une plage de valeurs, dénommée Design Space, espace de conception dans lequel les paramètres de production peuvent varier sans altérer la qualité du produit final. Ainsi, ce concept permet d'identifier et de comprendre comment les attributs de qualité du produit sont influencés par les paramètres opératoires clés du procédé. Le Design Space est représenté sous forme d'un espace (graphique) à plusieurs dimensions qui regroupent les paramètres de formulation du produit et des variables opératoires du procédé afin de fournir l'assurance de performance et de qualité adéquates du lyophilisat. Ainsi, tout changement de valeurs des paramètres opératoires du procédé situés à l'intérieur du Design Space peut être mis en œuvre sans approbation préalable des autorités de réglementations et sans avoir à déposer un nouveau dossier réglementaire. En somme, l'introduction du Design Space vient alors donner plus de flexibilité à l'enregistrement d'un nouveau produit pharmaceutique.

3.6.2. Forme générale du Design Space du procédé de lyophilisation.

Nail (2010) suggère de représenter le Design Space du procédé de lyophilisation par un graphique dont le tracé reporte les valeurs du débit massique de sublimation, notée \dot{m} , les valeurs de la pression de la chambre de lyophilisation, notée P_c , les valeurs de la température des étagères, notée T_{shelf} , et les valeurs de la température du produit, notée T_b (cf. figure 3.24). Le Design Space ainsi conçu, permet dans un premier temps, de mettre en lumière l'influence des paramètres opératoires indépendants (T_{shelf} et P_c) sur les valeurs de la température du produit (T_b) et sur les valeurs du débit massique de sublimation. On observe ainsi sur la figure 3.24, que pour une température d'étagère fixe, l'augmentation de la pression totale de la chambre de lyophilisation a pour conséquence une augmentation des valeurs de la vitesse de sublimation. Cette tendance s'explique par le fait que, l'augmentation de la pression totale de la chambre augmente le transfert de la chaleur par conduction à travers la couche de gaz située entre le fond du flacon et l'étagère. Cet effet accroît la température du produit et, par conséquent, augmente la valeur de la pression de vapeur à l'interface de sublimation et, in fine, augmente la force motrice ($P_o - P_c$) du transfert de la vapeur de solvant. Or, pour une température d'étagère fixe, l'augmentation de la pression de la chambre devrait conduire à une diminution de la force motrice ($P_o - P_c$) et, par conséquent, à une diminution de la vitesse de sublimation, mais c'est le contraire qui est observé sur la figure 3.24. Ceci s'explique, par le fait que, dans le domaine des très basses pressions (6 à 50 Pa) utilisées dans les cycles de sublimation pour la lyophilisation des produits pharmaceutiques, l'augmentation de la pression totale de la chambre a un impact **positif plus important** sur le transfert **de chaleur que l'impact négatif** (inverse) sur la **force motrice** du transfert de vapeur. De même, il est à noter que pour une pression de la chambre de lyophilisation fixe, la vitesse de sublimation

augmente avec la température des étagères. D'une manière générale, pour avoir la meilleure efficacité de l'étape de sublimation (temps de sublimation faibles), il est d'usage d'imposer **une pression de chambre la plus faible** possible et **une température d'étagère la plus grande** possible tout en maintenant la valeur de la température du produit inférieure à sa température critique (T_g ou $T_{collapse}$).

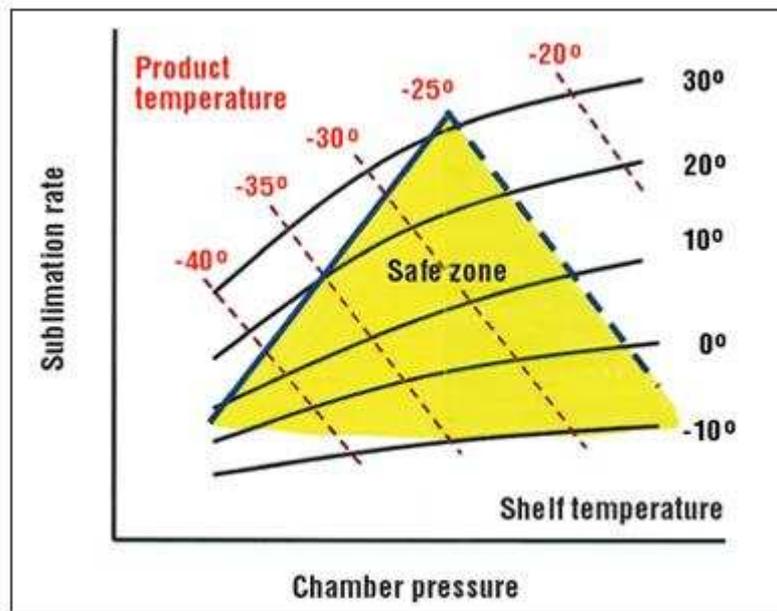


Figure 3.24 : Schématisation du Design Space de l'étape de sublimation du procédé de lyophilisation d'une formulation aqueuse. [Nail 2010]

Cette température critique fait partie des attributs critiques de qualité dénommés encore CQA (Critical Quality Attributes). Un CQA est une propriété thermodynamique, physique, chimique, biologique, et microbiologique ou une caractéristique qui doit être comprise dans une limite, une gamme, ou une distribution appropriée pour assurer une qualité de produit désirée. Dans le Design Space du procédé de lyophilisation, l'une des propriétés principales est la température du produit. Afin d'assurer la bonne qualité du produit final, la température du produit congelé ne doit jamais dépasser la température de fusion de l'eutectique ou de la température de transition vitreuse, T_g , respectivement, dans le cas où le produit congelé conduit à un système solide cristallin ou à un système solide amorphe. Ainsi cette température critique est introduite dans le Design Space et constitue une limite supérieure, représentée sur la figure 3.24 par une isotherme (courbe bleu, trait discontinu), limite qui ne doit jamais être dépassée au risque de détériorer le produit. La bonne qualité finale du produit sec ne dépend pas seulement des propriétés intrinsèques de celui-ci mais aussi des performances du lyophilisateur. Les limites de performance du lyophilisateur sont à répertorier et la valeur la plus critique doit apparaître dans le Design Space. Selon Nail (2010), la limitation de l'équipement la plus critique qui doit être prise en compte est la limitation du transfert de masse de la vapeur de solvant dans le tube qui connecte la chambre de lyophilisation avec le condenseur. Lorsque le débit de sublimation devient trop élevé, on atteint le point

d'engorgement, ce qui se traduit par un décrochage brutal de la pression totale dans chambre de lyophilisation. Ainsi la courbe représentant le débit de sublimation au point d'engorgement en fonction de la pression de la chambre est reportée sur la figure 3.24 (courbe bleu, trait continu) et forme une autre limite supérieure qui assure la bonne qualité finale du produit. Concrètement, pour déterminer le point d'engorgement, Nail (2010) a procédé de la manière suivante. Tout d'abord un demi-litre d'eau a été congelé dans un plateau formant ainsi une couche de glace. Puis la pression de la chambre de lyophilisation a été fixée à la pression de travail souhaitée. Une augmentation par palier de la température des étagères a été programmée. Le point d'engorgement correspond au moment où, pour une température d'étagère donnée, la pression de la chambre décroche. La vitesse de sublimation étant mesurée en continu par la technique TDLAS (Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy) [Geisler et al., 2007], il est alors possible d'en déduire la vitesse de sublimation qui va conduire à l'engorgement de la vapeur de solvant dans le tube de connexion pour une pression totale de la chambre et une température d'étagère données.

3.6.3. Design Space de l'étape de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base organique.

Nous avons construit le Design Space de l'étape de sublimation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène formulé à partir du mélange massique de co-solvant 20 % de TBA + 80% d'eau (eutectique A). Pour ce faire, nous avons utilisé la même représentation graphique du Design Space que celle suggérée par Nail (2010) (cf figure 3.24). La construction de ce graphe a nécessité l'utilisation de différentes techniques de suivi en ligne de l'étape de sublimation, techniques nommées PAT (Process Analytical Technology) en anglais, à savoir la microbalance Christ pour la mesure en ligne de la perte de masse du solvant sublimé et des thermocouples de type K pour la mesure de la température du produit. La construction du Design Space a été effectuée en suivant un mode opératoire précis et bien défini. Ainsi, le Design Space est construit pour une seule formulation, dans notre cas la formulation d'ibuprofène à base organique, et pour un seul type de flacon (taille, nature). Ce flacon en verre d'une capacité de remplissage de 4mL est le même que celui utilisé dans l'étude de l'étape de congélation. Avant de passer à l'étape de sublimation, la solution liquide doit être congelée. Ainsi, nous avons tout au long de cette étude utilisé le même protocole de congélation qui a consisté à congeler la solution en lui imposant une vitesse de refroidissement de 1°C/min jusqu'à -45°C avec maintien à cette température pendant 120 min. Nous allons détailler dans les paragraphes qui suivent toute la méthodologie qui nous a permis de construire le Design Space de l'étape de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base organique.

3.6.3.1 Détermination du coefficient global de transfert de chaleur externe, K_v .

La première étape de la construction du Design Space, consiste à déterminer expérimentalement les valeurs du coefficient global de transfert de chaleur externe, notée K_v , pour différentes conditions opératoire (T_{shelf} et P_c) de l'étape de sublimation. La valeur du coefficient global de transfert de chaleur externe (K_v), dépend des conditions opératoires

(T_{shelf} et P_c) ainsi que de la géométrie du flacon. A contrario, la valeur du K_v étant indépendante de la nature de la formulation, Nail (2010), préconise dans le but d'effectuer des économies - prix élevés des PA - de déterminer expérimentalement la valeur du K_v en remplissant les flacons avec seulement du solvant (absence de PA et d'excipients) à une hauteur de remplissage du flacon de 1cm. Dans cette configuration - absence de couche sèche - l'interface de sublimation est libre et la résistance au travers la couche sèche, notée R_p , est inexistante. La détermination de la valeur du K_v pour un essai type s'est déroulée de la manière suivante. Dans un premiers temps, un lot de 30 flacons a été rempli chacun avec 1g de solution à la composition eutectique A, et, ensuite congelé en suivant le mode opératoire décrit précédemment. La masse d'un des flacons est pesée en continu par la microbalance Christ, permettant ainsi de suivre l'évolution de la perte de masse en fonction du temps, pendant l'étape de sublimation. Cette perte de masse correspond à la masse de solvant sublimé. Le tracé de la courbe représentant la masse d'eutectique A sublimé en fonction du temps permet d'en déduire une valeur moyenne du débit massique de sublimation \dot{m} pour une température d'étagère et une pression de chambre fixées (cf figure 3.25). Cette valeur de \dot{m} correspond à la valeur du coefficient directeur (pente) de la partie de la courbe qui correspond à une droite décroissante.

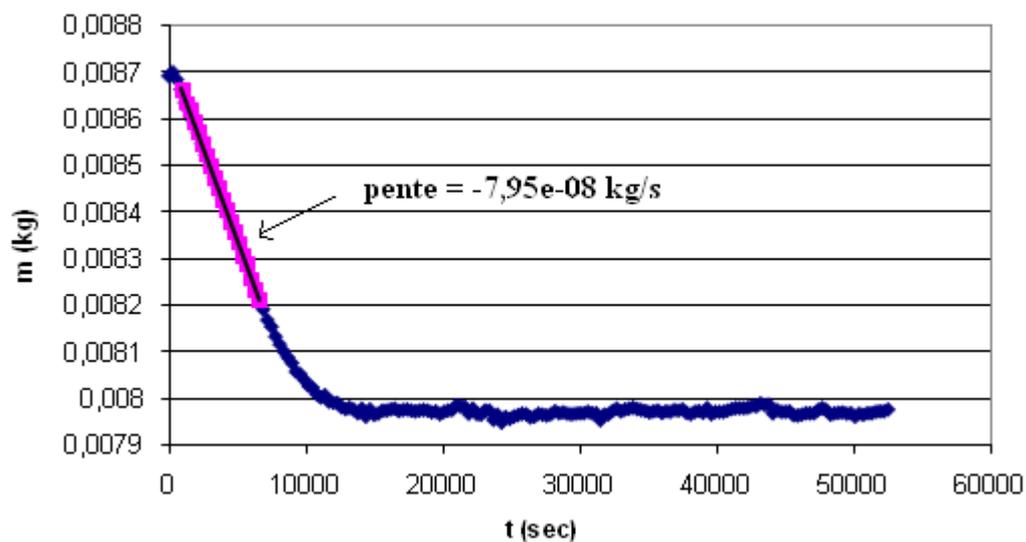


Figure 3.25 : Détermination de la vitesse moyenne de sublimation du solvant (TBA + eau ; composition de l'eutectique A) par utilisation de la microbalance Christ, pour $T_{shelf} = 10^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon verre 4mL.

Sur deux autres flacons, à l'extérieur et au fond de ceux-ci, des thermocouples qui permettent de suivre la variation de la température du produit (T_b) en fonction du temps ont été placés. Sur la figure 3.26 sont reportés les températures T_b mesurées pendant les étapes de congélation et de sublimation de l'eutectique A, pour une température d'étagère et une pression totale fixées respectivement à 10°C et 6 Pa. On observe sur la figure 3.26, la présence d'un palier de température du produit, à $T_b = -35,5^{\circ}\text{C}$. L'existence d'un tel palier indique que le système a atteint un état quasi-stationnaire, ce qui signifie que toute l'énergie

fournie au produit est consommée par la sublimation du solvant. A l'état quasi-stationnaire la valeur du débit massique moyen de sublimation est constante. La fin du palier de température du produit marque la fin de l'étape de sublimation qui correspond à un réchauffement du produit et qui se traduit par une augmentation rapide de la température T_b dont la valeur atteint puis se stabilise à la température de l'étagère.

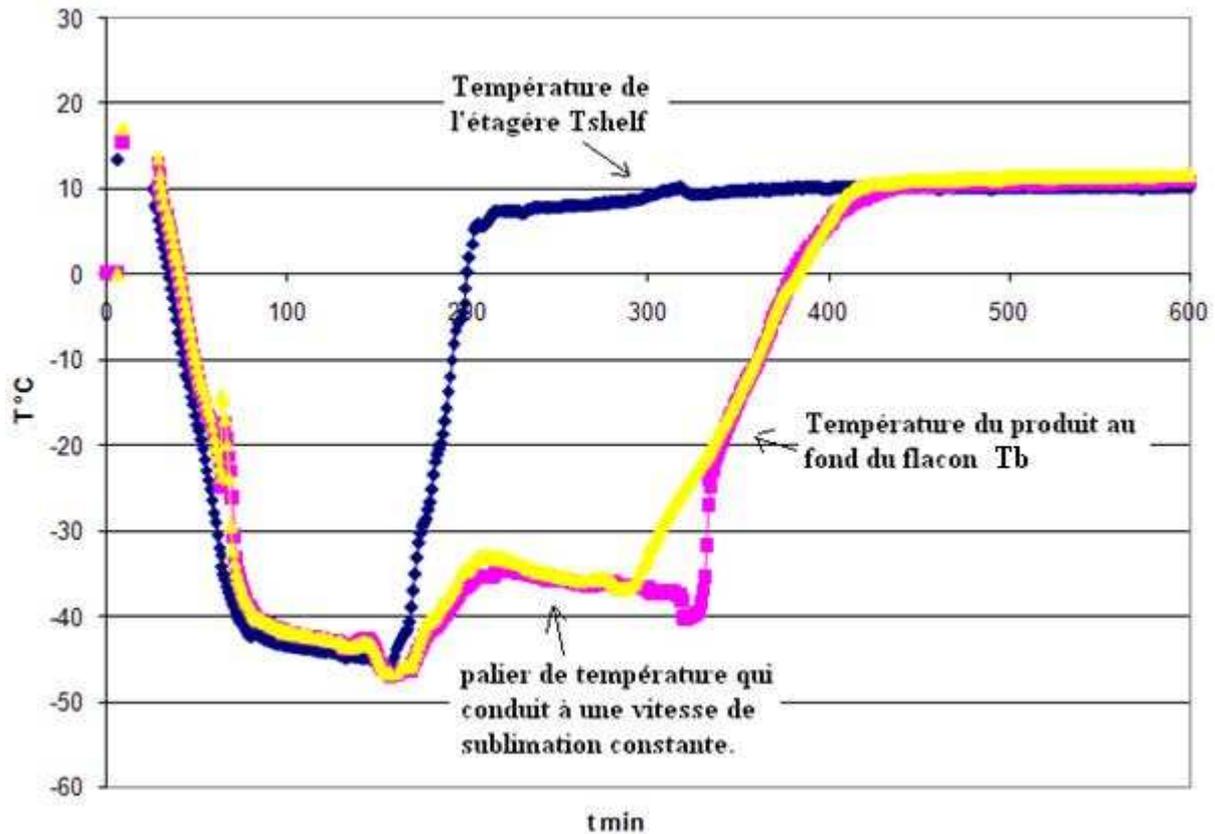


Figure 3.26 : Suivi en ligne de la température du produit mesurée au fond de flacon ($T_{shelf} = 10^{\circ}C$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$). Flacon verre 4mL.

Les valeurs du débit massique moyen de sublimation (\dot{m}) et de la température du produit T_b mesurées pendant l'étape de sublimation à l'état quasi-stationnaire ont été utilisées pour calculer la valeur du coefficient global de transfert de chaleur externe, K_v ($W/m^2 K$) à partir de l'équation 3-2 ci dessous :

$$K_v = (\dot{m} \cdot \Delta H_s) / (A_v (T_{shelf} - T_b)) \quad \text{Eq (3-2)}$$

où la valeur de la section du flacon calculée à partir du diamètre externe est égale à $A_v = 2,01 \cdot 10^{-4} m^2$ et la valeur de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique A est égale à $\Delta H_s = 2352 kJ/kg$. Il en résulte alors, pour une température d'étagère de $10^{\circ}C$ et une pression totale de la chambre de 6 Pa, une valeur de K_v égale à $20,44 W/m^2 K$.

En suivant cette méthodologie, nous avons mesuré les débits massiques de sublimation (\dot{m}) et la température du produit (T_b) pendant l'étape de sublimation à l'état quasi-stationnaire, pour 4 températures d'étagères différentes, c'est-à-dire 0°C, 10°C, 20°C et 30°C aux pressions totales de la chambre de lyophilisation respectivement égales à 6Pa, 15Pa, 20Pa, 30Pa et 50Pa. Les valeurs des débits massiques de sublimation pour un seul flacon avec une formulation correspondant à l'eutectique A mesurées à l'état quasi-stationnaire pour ces différents essais sont reportées sur la figure 3.27 ci-dessous :

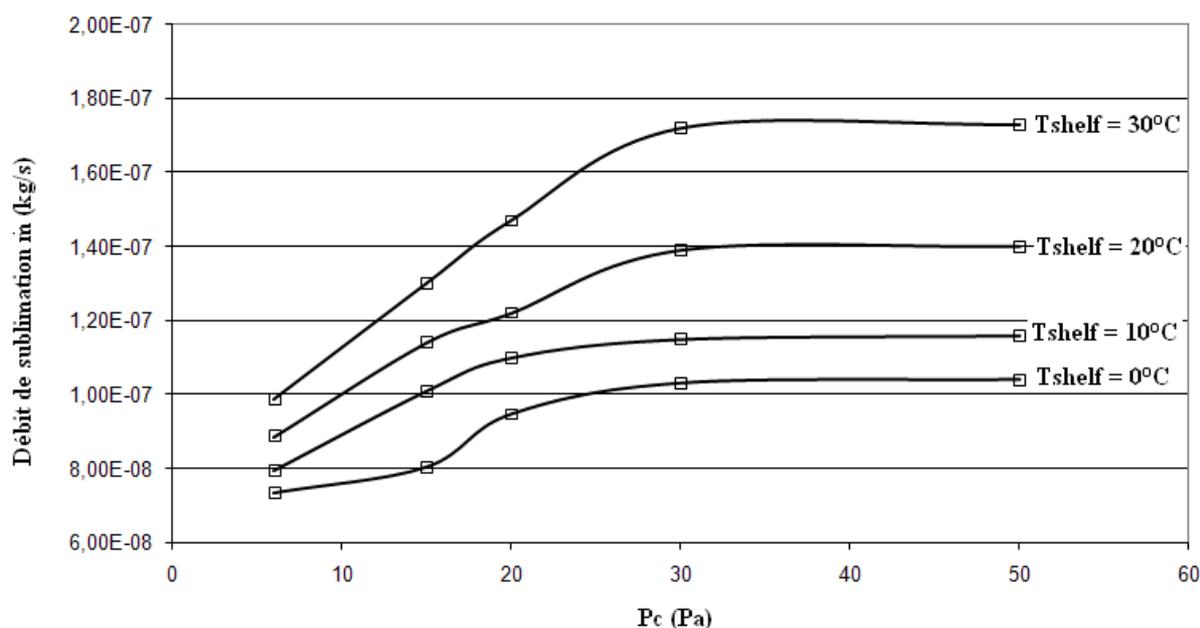


Figure 3.27 : Débit massique de sublimation mesuré par la microbalance Christ pour différentes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c). Flacon verre 4mL.

D'après la figure 3.27, on observe que la valeur du débit massique de sublimation \dot{m} augmente avec la température des étagères. Cette tendance semble se vérifier lorsque l'on augmente la pression totale de la chambre (P_c) de 6 Pa à 30 Pa. Par contre, on observe que pour des pressions de la chambre supérieure à 30 Pa la valeur de \dot{m} atteint un palier quelle que soit la température de l'étagère. Ceci peut s'expliquer par le fait que, l'influence positive de l'augmentation de la pression de la chambre sur le transfert de chaleur et, par conséquent, sur la valeur de \dot{m} est minimisée par l'influence négative résultant de l'augmentation de P_c sur le transfert de masse du fait d'une diminution de la forme motrice ($P_0 - P_c$) pour le transfert de masse de la vapeur de solvant.

Les valeurs de la température du produit (T_b) mesurées à l'état quasi-stationnaire sont reportées figure 3.28. On observe que T_b augmente simultanément avec la température des étagères et la pression totale de la chambre de lyophilisation.

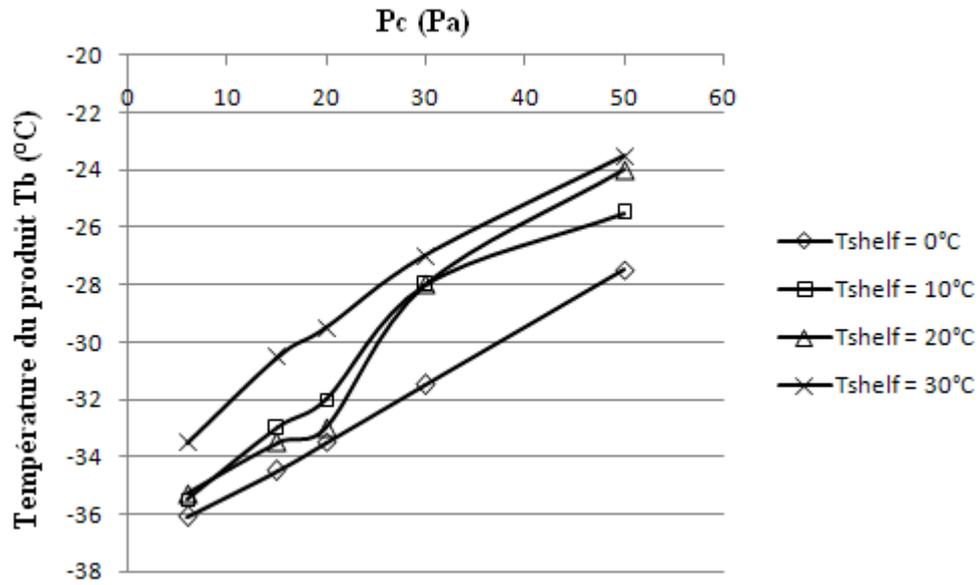


Figure 3.28 : Variation de la température du produit (eutectique A) congelé en fonction des paramètres opératoires (T_{shelf} et P_c). Flacon verre 4mL.

Puis nous avons calculé les valeurs du coefficient global de transfert de chaleur externe (K_v), à partir de l'équation 3-2. Les valeurs de K_v pour ces différentes conditions opératoires sont reportées figure 3.29.

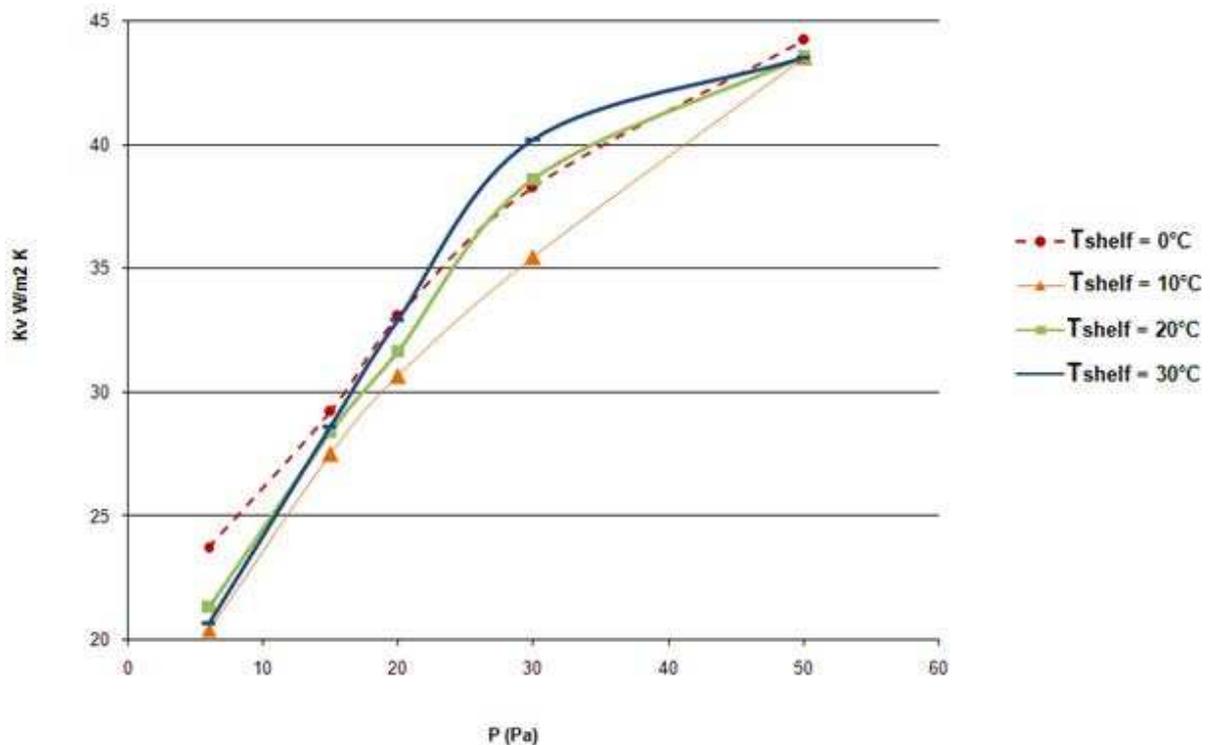


Figure 3.29 : Détermination expérimentale du coefficient global de transfert de chaleur, K_v pour différentes conditions opératoires (T_{shelf} , P_c). Flacon verre 4mL.

D'après la figure 3.29, on observe que pour une valeur de la température d'étagère constante, la valeur du K_v augmente avec la pression totale de la chambre de lyophilisation. Comme expliqué au paragraphe 3.6.2, cette augmentation de la valeur de K_v en fonction de la pression de la chambre est due à l'augmentation du transfert de chaleur par conduction à travers la couche de gaz située entre le fond bombé du flacon et l'étagère et aussi, dans une moindre mesure, à l'augmentation du transfert de chaleur par convection naturelle entre l'ambiance et les parois du flacon. Pour une température d'étagère allant de 10°C à 30°C, on observe, pour une même valeur de la pression totale de la chambre de lyophilisation une augmentation légère de la valeur de K_v en fonction de la température. Dans ce cas aussi, l'augmentation de la valeur de K_v s'explique par l'augmentation du coefficient de transfert de chaleur par conduction à travers la couche de gaz présente entre l'étagère et le flacon. En effet la conductivité thermique des gaz, aux très basses pressions, augmente linéairement avec la température. Par contre, pour une température d'étagère égale à 0°C, nous observons que les valeurs du K_v sont égales voire plus grandes que les valeurs du K_v obtenues pour les températures d'étagère égales à 10°C, 20°C et 30°C. Ces valeurs élevées de K_v s'expliquent par le fait qu'aux basses températures, $T_{shelf} < 0^\circ\text{C}$, le transfert de chaleur par rayonnement devient de plus en plus important ce qui entraîne une forte augmentation des valeurs de K_v aux très basses températures due à la composante radiative.

3.6.3.2 Détermination des valeurs de la résistance normalisée de la vapeur de solvant à travers la couche sèche (\hat{R}_p).

Au paragraphe précédent, les valeurs du débit massique de sublimation de l'eutectique A (20% TBA + 80% eau) ont été déterminées pour une solution d'eutectique A sans PA ni excipients, et, par conséquent sans la présence d'une couche sèche microporeuse. Or, l'existence de la couche sèche, en général, a pour conséquence une diminution de la valeur du débit massique de sublimation due à la résistance que rencontre la vapeur de solvant à travers cette couche sèche. Les valeurs des débits de sublimation qui doivent être portées dans le Design Space sont les valeurs pour les formulations réelles qui prennent en compte la limitation du transfert de la vapeur de solvant à travers la couche sèche microporeuse. De ce fait, Nail a (2010) suggéré, pour chaque température d'étagère, c'est-à-dire, 0°C, 10°C, 20°C et 30°C et une pression de chambre choisie aléatoirement, d'effectuer un essai de sublimation en remplissant cette fois les flacons avec 1g de formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique. Ainsi, le débit massique de sublimation déterminé par pesée successives en utilisant la microbalance Christ sera un débit plus réaliste qui est limité éventuellement par le transfert de masse de la vapeur de solvant à travers la couche sèche microporeuse. La figure 3.30 représente le débit massique de sublimation de la formulation d'ibuprofène mesuré par la microbalance Christ pour les conditions opératoires suivantes : $T_{shelf} = 30^\circ\text{C}$ et $P_c = 6\text{Pa}$. Il en résulte, dans ces conditions opératoires, une valeur du débit massique de sublimation (\dot{m}) égale à $8,70 \cdot 10^{-8} \text{ kg/s}$. Cette valeur est bien évidemment inférieure à la valeur de \dot{m} déterminée dans les mêmes conditions opératoires et pour une solution d'eutectique A pure, à savoir $\dot{m} = 9,86 \cdot 10^{-8} \text{ kg/s}$.

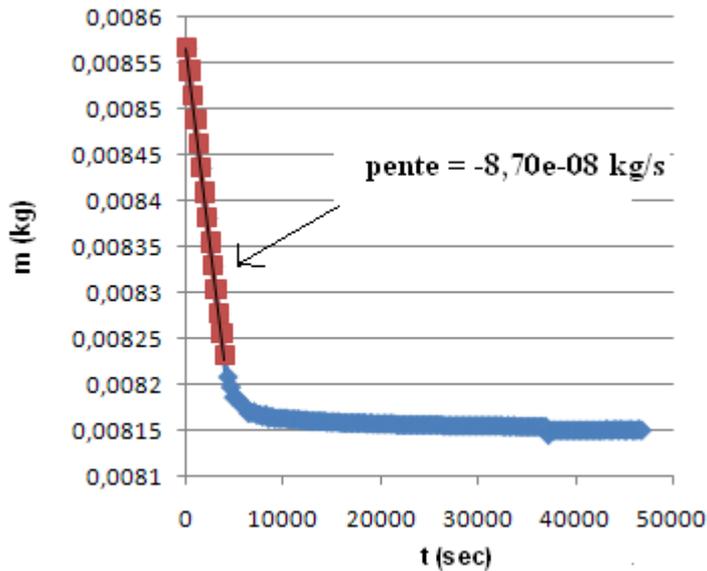


Figure 3.30 : Variation de la masse totale d'un flacon rempli de la formulation organique d'ibuprofène ; utilisation de la microbalance Christ. $T_{shelf} = 30^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon verre 4mL

En suivant le même mode opératoire qu'au paragraphe précédent, la température du produit au fond du flacon a aussi été mesurée. Les résultats portés sur la figure 3.31, montrent une température du produit mesurée à l'état quasi-stationnaire de l'ordre de -23°C . La valeur de cette température est de 10°C supérieure à la valeur du produit T_b mesurée pour une solution d'eutectique A pur.

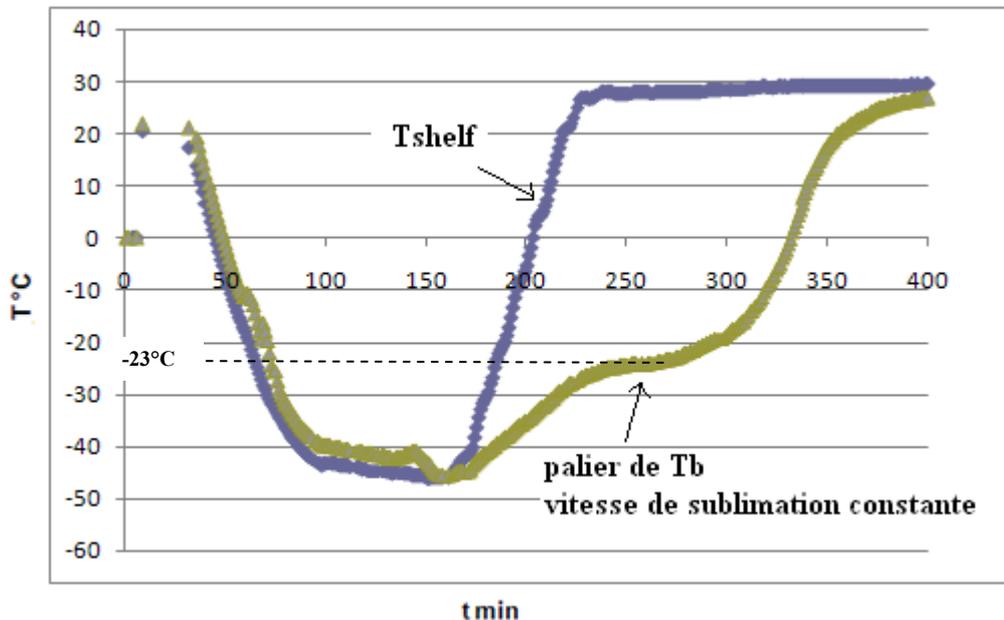


Figure 3.31 : Suivi en ligne de la température du produit mesurée au fond de flacon ($T_{shelf} = 30^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$). Flacon verre 4mL.

Après détermination expérimentale des valeurs du débit massique de sublimation et de la température du produit T_b , la valeur de \hat{R}_p est calculée à partir de l'équation 3-3 ci-dessous :

$$\hat{R}_p = A_s (P_0 - P_c) / \dot{m} \quad \text{Eq (3-3)}$$

où A_s , représente la surface de sublimation d'un flacon supposée égale à la surface de la section droite interne de ce dernier et égale à $A_s = 1,76 \cdot 10^{-4} m^2$ (flacon verre 4mL), P_0 représente la pression de la vapeur d'équilibre de l'eutectique A au front de sublimation calculée par la relation de Clapeyron déterminée expérimentalement au laboratoire (cf. § 3.4.3), à savoir $\ln P_0 = \frac{-5745,9}{T_b} + 27,909$, (P_0 en Pascal et T_b en Kelvin) Ainsi, pour une température d'étagère de 30°C et une pression de la chambre de 6 Pa, il en résulte une valeur de la résistance $\hat{R}_p = 2,71 \cdot 10^5 Pa.m^2.s/kg$.

La valeur de \hat{R}_p dépend de la morphologie des pores (taille et forme) de la couche sèche et donc, indirectement, de la morphologie des cristaux de solvant formés pendant l'étape de congélation. Or, tous nos essais réalisés pour la construction du Design Space ont subi le même protocole de congélation et, par conséquent, la valeur de \hat{R}_p , pour une température d'étagère fixée reste inchangée avec la variation de la pression de la chambre de lyophilisation. Ainsi, il est alors possible d'en déduire la valeur de la température du produit T_b , pour $T_{shelf} = 30^\circ C$, et les valeurs de P_c égales à 15 Pa, 20 Pa, 30 Pa et 50 Pa en résolvant par itération successives, à l'aide du logiciel Matlab, l'équation itérative suivante en adoptant l'hypothèse de l'état quasi stationnaire au palier du profil de température représenté sur la figure 3.31.

$$\frac{\Delta H_s \cdot A_s (\exp(-5745,9/T_b + 27,909) - P_c)}{\hat{R}_p} = K_v A_v (T_{shelf} - T_b) \quad \text{Eq (3-4)}$$

Les valeurs de K_v nécessaires aux calculs sont celles déterminées au paragraphe 3.6.3.1. Le programme Matlab nécessaire à la résolution de l'équation 3-4 est donné en l'annexe 5. Les valeurs de T_b ainsi calculées sont reportées sur la figure 3.32. Sur cette même figure, à titre de comparaison, sont aussi reportées les valeurs de T_b mesurées pour la solution d'eutectique A pure sans la présence du principe actif. On observe sur la figure 3.32 que les valeurs de T_b obtenues pour la formulation avec principe actif sont supérieures de 10°C par rapport aux valeurs de T_b obtenues sans la présence du principe actif. Les valeurs de T_b déterminées par l'équation 3-4 ont été utilisées pour calculer le débit massique de sublimation réel qui tient compte de la limitation au transfert de la vapeur du solvant à travers la couche sèche, en utilisant l'équation 3-5 ci-dessous :

$$\dot{m} = K_v A_v (T_{shelf} - T_b) / \Delta H_s \quad \text{Eq (3-5)}$$

Les valeurs du débit massique de sublimation de la formulation avec principe actif sont tracées sur la figure 3.33 et comparées aux valeurs de \dot{m} obtenues sans principe actif.

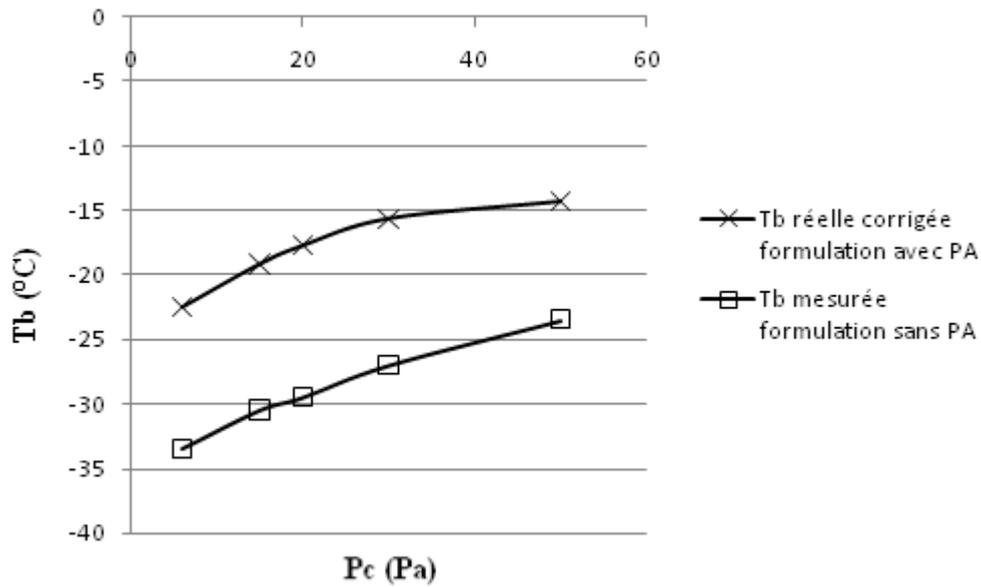


Figure 3.32 : Températures du produit (T_b). Formulation à base organique avec principe actif (x), sans principe actif (\square); $T_{shelf} = 30^\circ\text{C}$. Flacon verre 4mL.

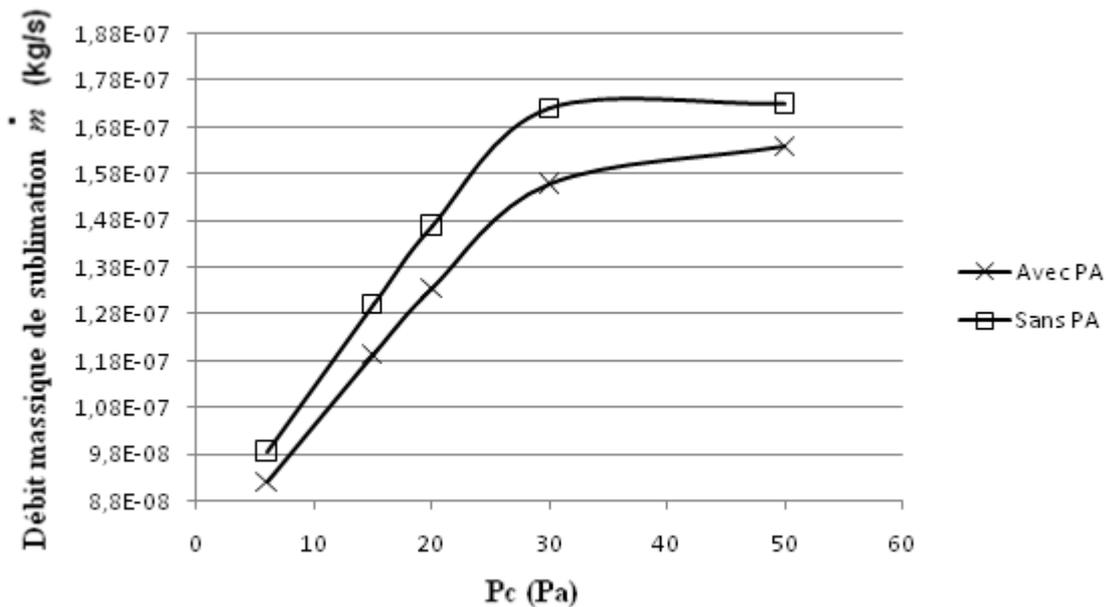


Figure 3.33 : Débit massique de sublimation de la formulation à base organique avec (x), et sans (\square) principe actif. $T_{shelf} = 30^\circ\text{C}$; Flacon verre 4mL.

La figure 3.33 met en évidence que pour la même température d'étagère, à savoir $T_{shelf} = 30^\circ\text{C}$, les valeurs de \dot{m} obtenues pour la formulation avec principe actif sont inférieures aux valeurs de \dot{m} obtenues sans principe actif. Cette tendance s'explique facilement par l'apparition d'une résistance au transfert de matière de la vapeur de solvant lors de son passage à travers la couche sèche microporeuse située au-dessus du front de sublimation.

Cependant, on n'observe, au maximum, qu'un écart de 10% entre les valeurs de \dot{m} obtenues sans principe active et celles obtenues avec principe actif. Ce qui laisse supposer que le transfert de chaleur est majoritairement limitant. En suivant cette méthodologie nous avons déterminé expérimentalement les valeurs de R_p dans les conditions opératoires suivantes regroupées dans le tableau 3.3 ci-dessous:

| T_{shelf} (°C) | P_c (Pa) | \hat{R}_p (Pa m ² s/kg) |
|---------------------|---------------|--------------------------------------|
| 0 | 20 | $2,17 \cdot 10^5$ |
| 10 | 6 | $1,99 \cdot 10^5$ |
| 20 | 6 | $2,62 \cdot 10^5$ |
| 30 | 6 | $2,71 \cdot 10^5$ |

Tableau 3.3 : Valeurs de la résistance au transfert de matière, R_p , pour différentes conditions de sublimation, T_{shelf} et P_c . Flacon verre 4mL.

Les valeurs de \hat{R}_p ont ensuite été utilisées pour calculer les valeurs de la température du produit T_b par l'équation 3-4 et puis celles du débit massique de sublimation avec l'équation 3-5. Ces valeurs de \dot{m} ainsi calculées ont ensuite été reportées sur la figure 3.34 ci-dessous qui constitue la base du Design Space de l'étape de sublimation du procédé de lyophilisation de la formulation organique réelle d'ibuprofène.

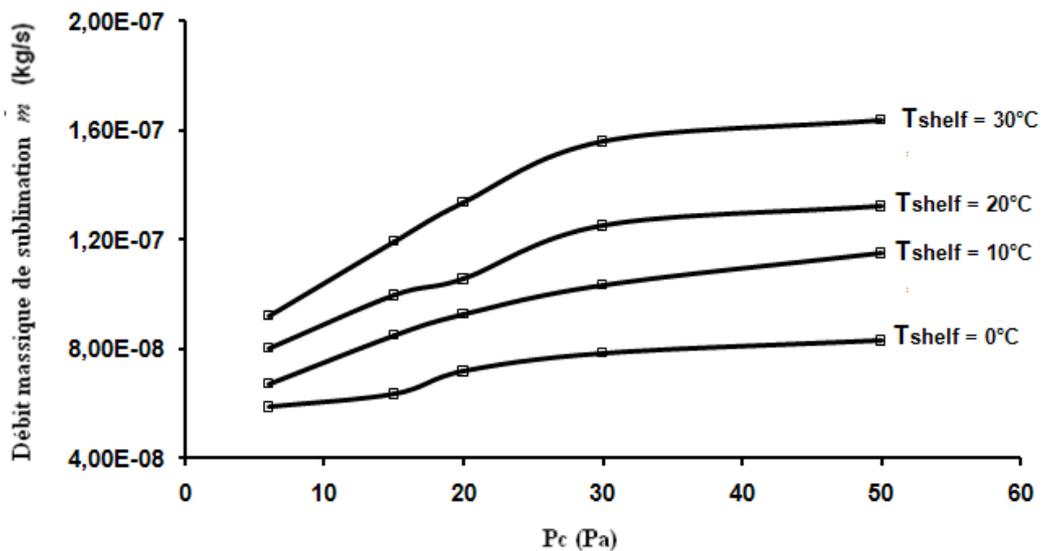


Figure 3.34 : Variation du débit massique de sublimation du solvant pour un flacon rempli de la formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique (eutectique A) en fonction de T_{shelf} et P_c . Flacon verre 4mL.

3.6.3.3 Tracé des isothermes du produit T_b

La construction du Design Space se poursuit par le tracé des isothermes du produit $T_b = \text{cte}$. Pour cela, on a choisi arbitrairement, pour une température d'étagère donnée, une valeur de T_b et une valeur de P_c . Puis, on a déterminé la valeur du débit massique de sublimation en utilisant l'équation 3-6 ci-dessous :

$$\dot{m} = \frac{A_s (\exp(-5745,9/T_b + 27,909) - P_c)}{\hat{R}_p} \quad \text{Eq (3-6)}$$

Chaque isotherme $T_b = \text{constante}$ étant une droite, seuls deux points de calcul suffisent pour effectuer son tracé. La figure 3.35 représente le Design Space de l'étape de sublimation de l'eutectique A complété par les isothermes de température du produit, $T_b = \text{constante}$.

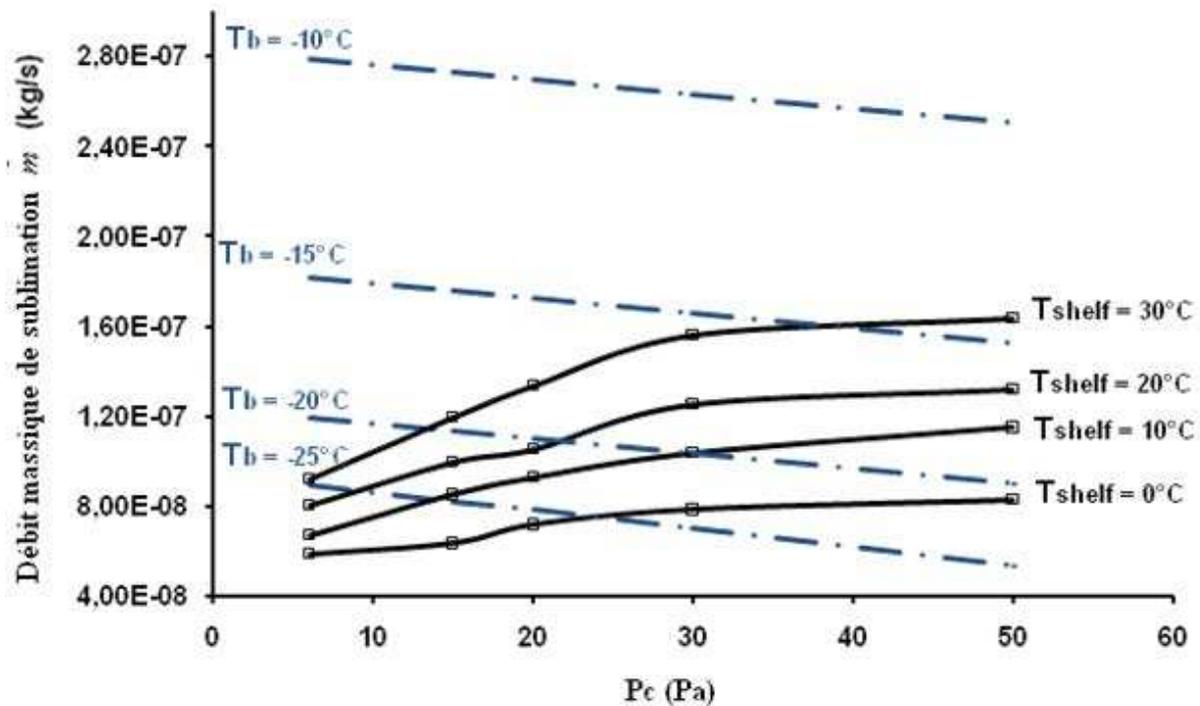


Figure 3.35 : Variation du débit massique de sublimation du solvant pour un flacon rempli de la formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique (eutectique A) et de la température du produit, notée T_b en fonction de T_{shelf} et P_c . Flacon verre 4mL.

A ce stade de la construction, on constate que le Design Space décrit parfaitement la dynamique de l'étape de sublimation. Ce graphe en deux dimensions renseigne bien sur les valeurs des cinétiques de sublimation et la sur température moyenne du produit pour différentes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c).

3.6.3.4 Finalisation du Design Space : introduction des attributs critiques de qualité CQA (Critical Quality Attributes).

La finalisation du Design Space se poursuit par l'introduction des limites qui vont assurer la bonne qualité finale du lyophilisat. Dans le cas du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène formulé à base de co-solvant organique, la limite due à l'équipement n'est pas à considérer. En effet, la quantité de solvant sublimé dans notre lyophilisateur pilote SMH 45 est très faible - sublimation de 30 flacons- de sorte que l'on n'atteindra jamais le point d'engorgement de l'écoulement de la vapeur de solvant à l'intérieur du tube qui relie la chambre de lyophilisation au condenseur. Ainsi, les limites à prendre en considération dans le Design Space sont les propriétés du produit et notamment, dans ce cas précis, les propriétés thermodynamiques de celui-ci. On a observé au paragraphe 3.4.4 que les températures des étagères doivent être réglées de façon à ce que le produit ne dépasse jamais la température de fusion (T_m) de la phase cristalline (eutectique A) et la température de transition vitreuse (T_g) de la phase cryoconcentrée. Il faut donc prendre en compte ces limites et porter sur le Design Space les deux isothermes correspondantes. Ces deux isothermes, notées T_m et T_g , reportées sur la figure 3.36 ci-dessous font apparaître finalement une zone dite de sécurité à l'intérieur de laquelle tout changement de valeurs des paramètres opératoires principaux de sublimation (T_{shelf} et P_c) n'altérera pas la qualité finale requise par le lyophilisat.

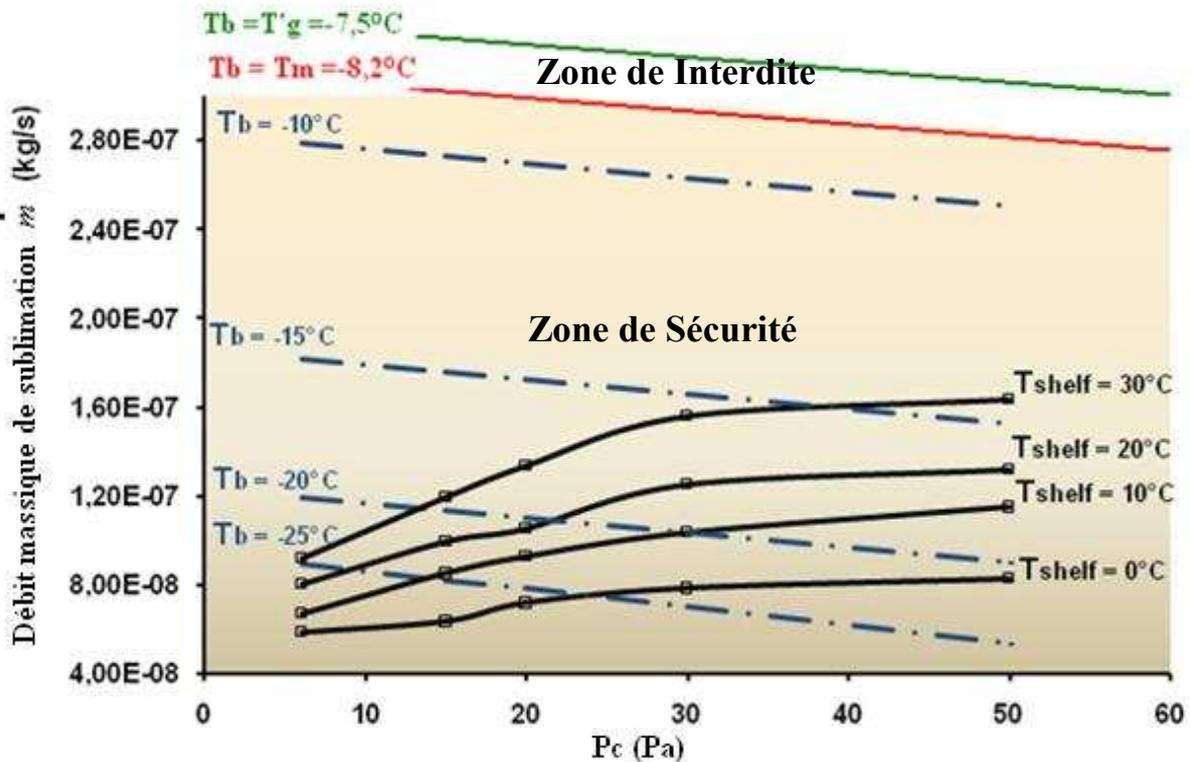


Figure 3.36 : Design Space de sublimation d'une formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organiques (TBA + eau : composition eutectique A). Flacon verre 4mL.

3.6.4. Comparaison des cinétiques de sublimation de la formulation à base aqueuse et de la formulation à base organique.

En se basant sur le Design Space de l'étape de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base organique (cf figure 3.36), nous avons comparé les cinétiques de sublimation de la formulation à base aqueuse avec celles de la formulation à base organique. Pour ce faire, nous avons pris l'hypothèse que pour les mêmes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c) fixées, donc, pour la même quantité d'énergie fournie au flacon, l'état quasi-stationnaire pour les deux formulations, à base organique et aqueuse, est atteint pour une même température de produit $T_b = \text{constante}$. Cette hypothèse a été adoptée, car comme démontré au paragraphe 1.3.2.4b, la température du produit $T_b = \text{constante}$ est la résultante du transfert de chaleur par conduction à l'intérieur du produit à travers la couche sèche et la couche congelée. Ce transfert de chaleur par conduction est décrit par la loi de Fourier et il est directement dépendant de la valeur de la conductivité thermique, notée λ , de la couche sèche et de la couche congelée. En ce qui concerne la conduction à travers la couche sèche, la valeur de la conductivité thermique des deux formulations, à base aqueuse et à base organique, est supposé similaire car le produit sec est le même. Donc, dans ce cas, on suppose que la valeur de la température du produit T_b , mesurée au fond du flacon dépendra du transfert de chaleur à travers la couche congelée. Ainsi, l'hypothèse qui est à prendre en compte pour que $T_{b,org} = T_{b,aq} = \text{constante}$ est que les valeurs de la conductivité thermique de la couche congelée des deux formulations, aqueuse et organique soient sensiblement égales. On suppose ainsi que la faible quantité de TBA (20% massique) utilisée dans la formulation organique impacte très peu sur la valeur de la conductivité thermique de la couche congelée.

La zone de comparaison du Design Space doit être une zone dans laquelle la température T_b des deux formulations ne doit pas dépasser la température critique. La température critique de la formulation à base aqueuse qui ne doit pas être dépassée lors de l'étape de sublimation est la température de transition vitreuse, $T'_{g,aq}$. Cette température a été déterminée expérimentalement au paragraphe 3.4.1 et sa valeur trouvée égale à $T'_{g,aq} = -26,4^\circ\text{C}$. Avant de reporter cette limite sur le Design Space présenté sur la figure 3.36, il est nécessaire de vérifier l'hypothèse énoncée précédemment. Pour cela, les formulations d'ibuprofène à base aqueuse et à base organique ont été sublimées dans les mêmes conditions opératoires, à savoir $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Dans ces conditions, la température du produit au fond du flacon, pour les deux formulations, a été mesurée en utilisant les thermocouples de type K disposés dans la chambre de lyophilisation. Le résultat de ces mesures est reporté sur la figure 3.37. On observe sur cette figure que les valeurs de la température T_b mesurées pour la formulation à base organique et à base aqueuse correspondent au même un plateau à $T_b = -28^\circ\text{C} = \text{constante}$. Ce qui vérifie l'hypothèse que, pour les deux formulations étudiées, à l'état quasi-stationnaire $T_{b,org}$ est sensiblement égale à $T_{b,aq}$. Sur cette même figure, on observe que la fin de l'étape de sublimation - qui correspond à l'augmentation de la température T_b pour tendre progressivement vers la valeur de la température de l'étagère T_{shelf} - de la formulation organique est atteinte au bout de 5,72 heures de sublimation alors que l'étape de sublimation de la formulation aqueuse dure 9,85 heures. La durée de l'étape de sublimation de la

formulation organique est donc 1,7 fois plus courte que la durée de l'étape de sublimation de la formulation à base aqueuse.

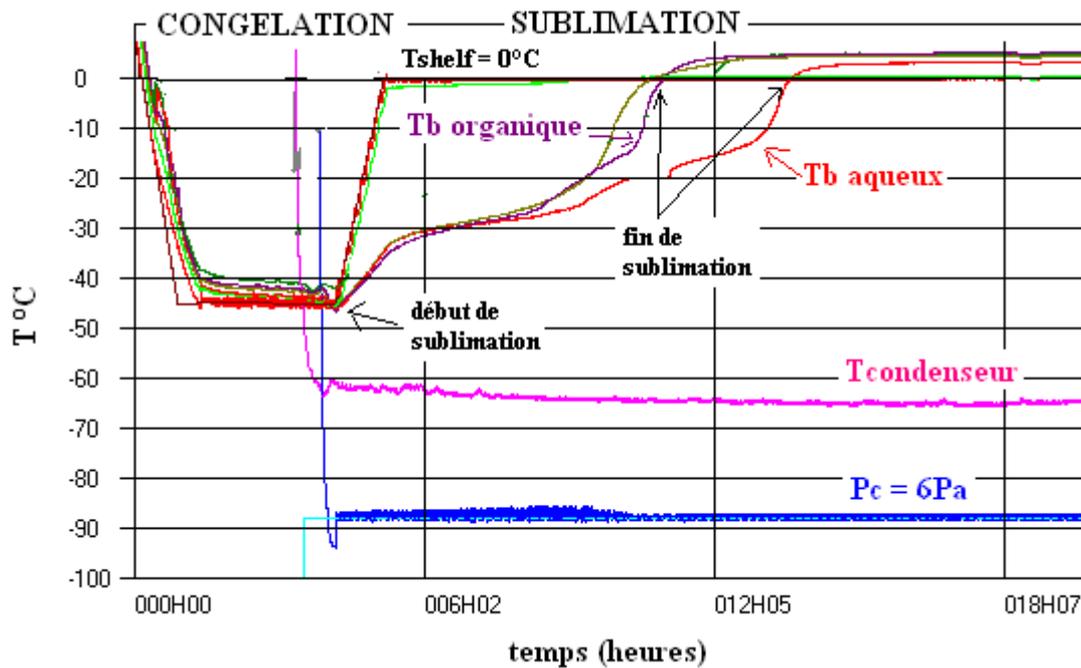


Figure 3.37 : Suivi en ligne de la température T_b mesurée au fond de flacon pour la formulation à base organique et à base aqueuse pendant l'étape de sublimation. $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6\text{ Pa}$. Flacon verre 4mL.

Il en résulte une réduction de 4 heures de la durée de l'étape de sublimation ce qui va avoir pour conséquence des économies d'énergie certaines. Sur la figure 3.37, on peut observer aussi que pour des conditions opératoires fixées à $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6\text{ Pa}$, la valeur de $T_b = -28^\circ\text{C}$ mesurée est très proche de la valeur de la température critique $T'_{g,aq} = -26,4^\circ\text{C}$. On se trouve ainsi dans ces conditions opératoires à la limite de la température critique T'_g que la formulation à base aqueuse ne doit pas dépasser pendant l'étape de sublimation. De ce fait, la zone de comparaison des cinétiques de sublimation dans le Design Space ainsi tracé (cf figure 3.36), de la formulation à base organique et de la formulation à base aqueuse est limitée à des conditions opératoires telles que $T_{shelf} \leq 0^\circ\text{C}$ et $6\text{ Pa} \leq P_c \leq 50\text{ Pa}$. Nous avons de ce fait effectué une deuxième étude comparative des cinétiques de sublimation des deux formulations étudiées pour les conditions opératoires suivantes, $T_{shelf} = -5^\circ\text{C}$ et $P_c = 6\text{ Pa}$. Les valeurs des températures T_b mesurées au fond du flacon pour les deux formulations sont reportées sur la figure 3.38. On observe, dans ce cas aussi, qu'à l'état quasi stationnaire, la température T_b de la formulation organique est égale à la température T_b de la formulation aqueuse. De même, la durée de l'étape de sublimation de la formulation organique, $t_{org} = 6,1$ heures, est 1,62 fois plus faible que la durée de l'étape de sublimation de la formulation aqueuse, $t_{aq} = 9,9$ heures. Ce qui confirme bien que, pour les mêmes conditions opératoires, T_{shelf} et P_c , les cinétiques de sublimation de la formulation à base organique sont accélérées par rapport aux cinétiques de sublimation de la formulation à base aqueuse. Cette accélération des cinétiques de sublimation de la formulation à base organique s'explique essentiellement

par le fait que pour une même température de front de sublimation – température sensiblement égale à T_b – la valeur des pressions de sublimation de l'eutectique A est 1,8 fois plus élevée que la valeur des pressions de sublimation de la glace (cf paragraphe 3.4.3). De plus cette accélération de la cinétique de sublimation est aussi due au fait que l'enthalpie de sublimation de la formulation à base organique est plus faible ; rappelons que cette formulation présente des tailles moyennes de pores de la couche sèche plus élevées que la formulation à base aqueuse, ce qui a pour conséquence de diminuer la résistance au transfert de masse de la vapeur de solvant à travers la couche sèche microporeuse.

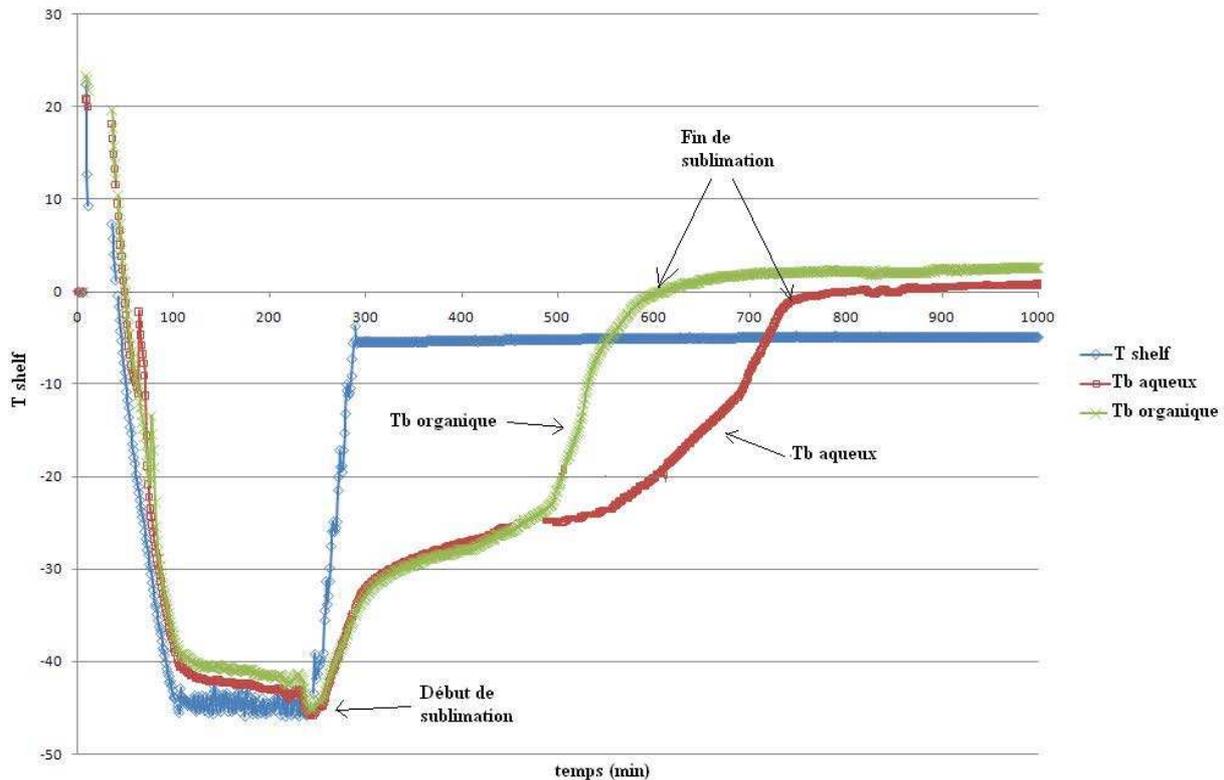


Figure 3.38 : Suivi en ligne de la température T_b mesurée au fond de flacon pour la formulation à base organique et à base aqueuse pendant l'étape de sublimation. $T_{shelf} = -5^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon verre 4mL.

On peut donc en conclure, que la formulation d'ibuprofène à base organique conduit à des cinétiques de sublimation plus rapides et, par conséquent, à des temps de sublimation plus faibles comparés à la formulation à base aqueuse, pour les mêmes conditions opératoires de l'étape de sublimation.

3.7 Etude de la dessiccation secondaire : Désorption.

La dessiccation secondaire ou désorption est l'étape qui permet d'éliminer le solvant non cristallisé et lié à la matrice sèche. Comme pour l'étape de sublimation, les paramètres opératoires clés de l'étape de désorption sont la température des étagères et à un degré

moindre, la pression de la chambre de lyophilisation. Celles-ci doivent être fixées de telle sorte que la température du produit T_b ne dépasse jamais la température de transition vitreuse du lyophilisat obtenu à la fin de l'étape de sublimation, notée T_g . La durée de l'étape de désorption, pour une quantité de formulation d'API égale à 1g, dépasse rarement les 4h. Ceci s'explique par le fait que les valeurs de T_g qui augmentent avec l'élimination du solvant, permettent de fixer les températures d'étagère à des valeurs très élevées qui peuvent atteindre parfois 40°C. Afin de fixer correctement la température de l'étagère qui permettra, au final, d'obtenir un lyophilisat non collapsé, il faut tout d'abord s'assurer que, dans la plage de température allant de 30°C à 40°C habituellement utilisée en désorption, le lyophilisat présente une température T_b inférieure à T_g . Pour cela des tests de DSC ont été réalisés dans cette plage de température, à savoir de 30°C à 40°C afin de vérifier si, dans cette plage de température, les deux lyophilisats présentent ou pas une transition vitreuse. Les résultats de ces essais de DSC obtenus pour les lyophilisats formulés à partir d'une formulation à base aqueuse et d'une formulation à base organique sont respectivement présentés fig.3.39 a et 3.39 b.

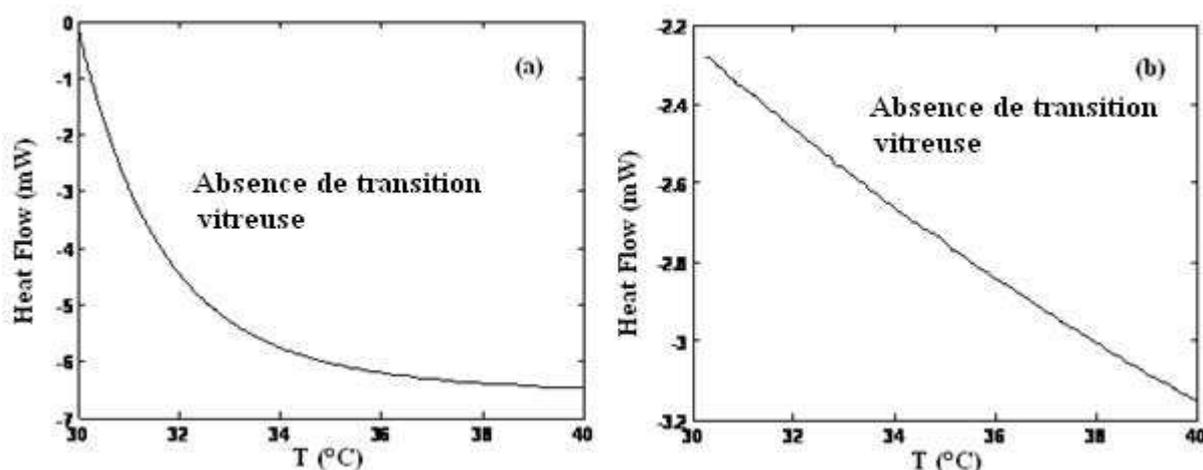


Figure 3.39 : Thermogrammes de chauffe du lyophilisat : (a) à base aqueuse ;(b) à base organique. DSC standard à la vitesse de 3°C/min. Sublimation à $T_{shelf} = -5^{\circ}C$ et $P_c = 6Pa$.

On observe sur les figures 3.39 a et 3.39 b qu'aucun phénomène de transition thermique n'est observé et qu'il y a, dans la plage étudiée, absence de transition vitreuse. Ainsi, en s'appuyant sur ces résultats, nous avons mené l'étape de désorption en fixant la température de l'étagère à une valeur maximale de 40°C et la pression de la chambre à 6 Pa. A titre d'exemple, on présente sur la figure 3.40 le cycle de lyophilisation complet mené dans les conditions opératoires suivantes : congélation avec une vitesse de 1°C/min jusqu'à -45°C, sublimation à $T_{shelf} = -5^{\circ}C$ et $P_c = 6 Pa$, désorption à $T_{shelf} = 40^{\circ}C$ et $P_c = 6 Pa$. On observe sur cette figure que contrairement à l'étape de sublimation pendant laquelle les températures du produit et de l'étagère sont différentes à l'état quasi-stationnaire, au cours de l'étape de désorption la température du produit suit continuellement la valeur de la température de l'étagère. Cela veut dire que la fin de l'étape de dessiccation secondaire ne peut être déduite par le suivi en ligne de la température du produit. En effet l'optimisation de la durée de l'étape de sublimation est

dépendante de la quantité résiduelle de solvant en fin de cycle qui doit être inférieure aux normes en vigueur. La durée de l'étape de dessiccation secondaire présentée sur la figure 3.40 a été fixée arbitrairement égale 4 heures. Les valeurs des taux résiduels et des autres paramètres assurant les bonnes propriétés d'usage requises du lyophilisat final seront présentés au paragraphe 3.7 suivant.

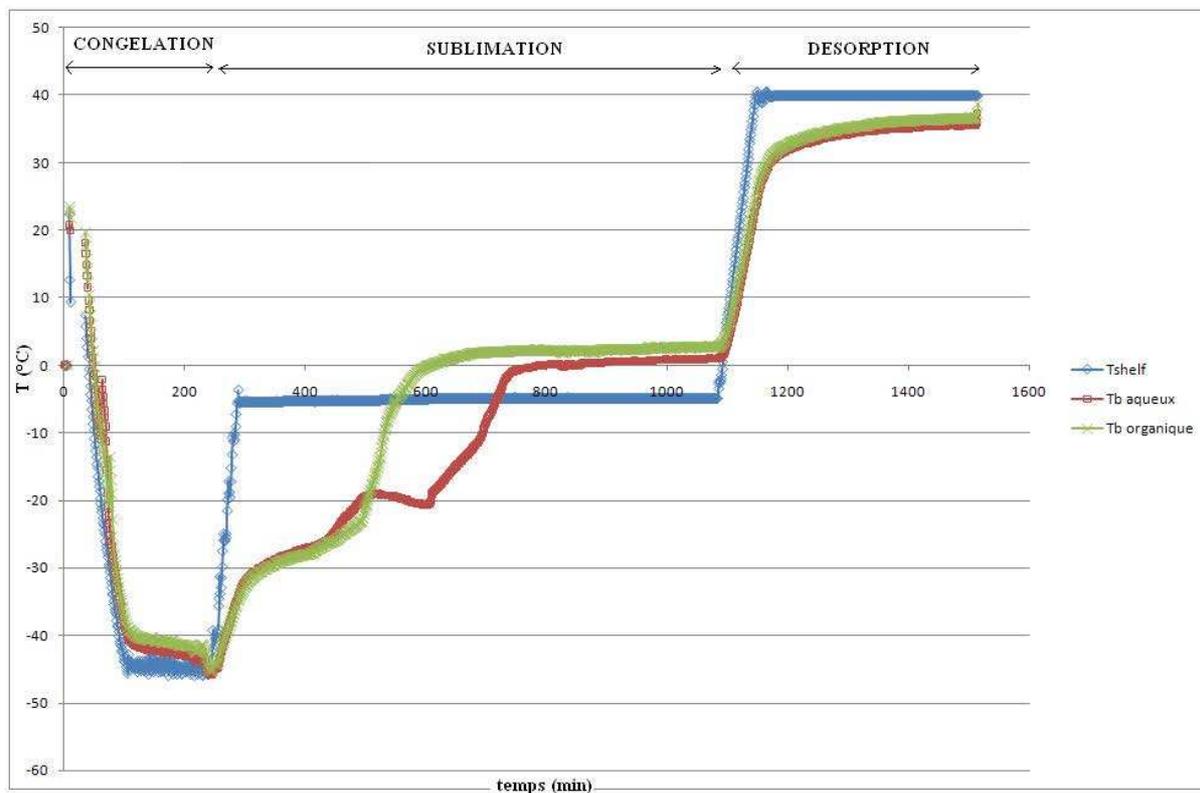


Figure 3.40 : Suivi en ligne de la température T_b , mesurée au fond de flacon pour la formulation à base organique et à base aqueuse pendant le cycle de lyophilisation. Congélation : $1^\circ\text{C}/\text{min}$ jusqu'à -45°C , Sublimation : $T_{shelf} = -5^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$, Désorption : $T_{shelf} = 40^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon verre 4mL.

3.8 Caractérisation du lyophilisat final et étude des critères de qualité

L'étape de désorption finalise le cycle de lyophilisation et doit conduire à un produit final sec qui respecte un certain nombre de critères de qualité qui assurent les bonnes propriétés d'usage du produit sec final. Ces critères sont à transcrire dans le cahier des charges et ils peuvent être considérés comme plus ou moins importants selon le point de vue. En effet, on distingue deux catégories de critères de qualité du produit final. Le premier critère est lié à son aspect visuel pour lequel le service marketing définit une couleur requise du lyophilisat final. L'autre catégorie de critères de qualité est liée aux normes en vigueur définies par la pharmacopée. Ainsi, le lyophilisat final doit avoir une réhydratation immédiate et surtout présenter des taux de solvants résiduels inférieurs aux normes en vigueur. Dans ce paragraphe nous présentons donc les résultats de l'étude de caractérisation de ces principaux critères de qualité du lyophilisat sec final ainsi que les différentes méthodes et techniques utilisées.

3.8.1. Aspect visuel des lyophilisats.

3.8.1.1 Echelle macroscopique.

Comme mis en évidence au paragraphe 3.4.3, les lyophilisats obtenus à partir des formulations à base organique et à base aqueuse présentent à l'échelle macroscopique un aspect visuel différent (cf. figure 4.41.). Il est à noter qu'un des critères visuels que doit respecter le lyophilisat final est l'absence de collapse. Ce critère indique que le cycle de lyophilisation a été optimisé de façon correcte et qu'aucun des attributs critiques de qualité prédéfini pour les différentes étapes du procédé de lyophilisation n'a été dépassé.

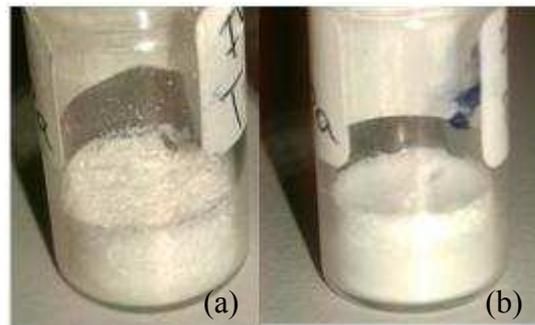


Figure 3.41 : Lyophilisat final : (a) à base organique ; (b) à base aqueuse. Congélation : 1°C/min jusqu'à -45°C, Sublimation : $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$, Désorption : $T_{shelf} = 40^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon verre 4mL.

3.8.1.2 Echelle microscopique : caractérisation des lyophilisats par MEB (microscopie électronique à balayage).

La microscopie électronique à balayage (MEB ou « Scanning Electron Microscopy » SEM) est une puissante technique d'observation de la topographie des surfaces. Elle est fondée principalement sur la détection des électrons secondaires émis par cette surface sous l'impact d'un très fin pinceau d'électrons primaires qui balaye la surface observée; elle permet d'obtenir des images avec un pouvoir séparateur souvent inférieur à 5 nm et une grande profondeur de champ [Paqueton et Ruste 2010]. Elle utilise, en complément, les autres interactions des électrons primaires avec l'échantillon : émergence des électrons rétrodiffusés, absorption des électrons primaires, ainsi que l'émission de photons X et parfois celle de photons proches du visible. Chacune de ces interactions est souvent significative de la topographie et/ou de la composition de la surface. L'instrument permet de former un pinceau quasi parallèle, très fin (jusqu'à quelques nanomètres), d'électrons fortement accélérés par des tensions réglables de 0,1 à 30 kV, de le focaliser sur la zone à examiner et de la balayer progressivement. Des détecteurs d'électrons appropriés et spécifiques (secondaires, rétrodiffusés, parfois absorbés...), complétés par des détecteurs de photons, permettent de recueillir des signaux significatifs lors du balayage de la surface et d'en former diverses images significatives.

Nous avons étudié la topographie de l'ibuprofène et de l'arginine pure, ainsi que celle des lyophilisats finaux correspondant à des formulations à base aqueuse et à base organique. Ces essais ont été effectués en utilisant un MEB Environnementale fourni par JOEL JCM-5000 Neoscope dont le schéma de principe est présenté sur la figure 3.42 ci-dessous.

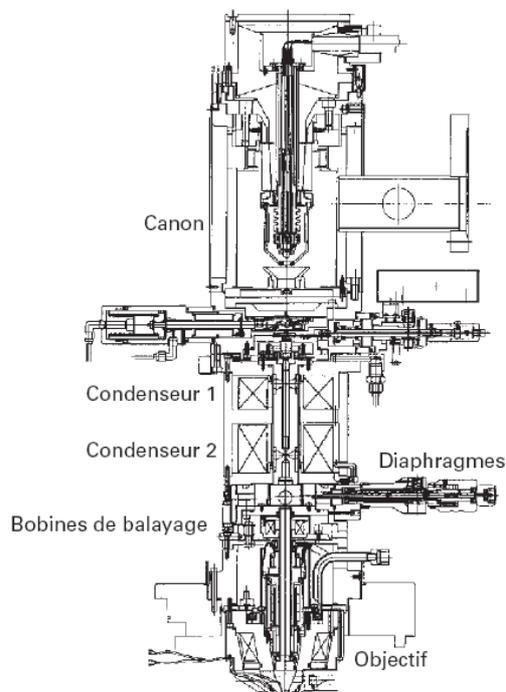


Figure 3.42 : Schéma de principe du MEB fourni par JOEL JCM-5000 [Paqueton et Ruste 2010].

Une faible quantité de produit est déposée sur un film adhésif en carbone double face qui est lui même collé à un support cylindrique métallique. Le voltage utilisé pour accélérer les électrons était de 10 kV. Le MEB JMC-5000 permet un réglage manuel du zoom, de la luminosité et du contraste. Afin que l'image prise soit la plus nette possible, ces paramètres de réglage sont à régler minutieusement. Malgré cela, nous n'avons pas pu éviter l'apparition de taches blanches lors de la capture de l'image, car pour des raisons d'économies et de temps la surface de l'échantillon n'a pas pue être métallisée avec une couche mince en or. La série de photographies de la figure 3.43 présente les images obtenues par MEB respectivement pour le principe actif d'ibuprofène pur (fig.3.43 a), pour l'arginine pure (fig.3.43 b), pour le lyophilisat final formulé à base aqueuse (fig.3.43 c) et pour le lyophilisat final formulé à base de co-solvant organique (fig.3.43. d). Cette étude topographique confirme les aspects visuels différents du lyophilisat aqueux et du lyophilisat organique. Ces aspects différents sont accentués par les différences de morphologie des pores que présentent les deux lyophilisats. En effet le lyophilisat aqueux (cf. figure 3.43 c) présente des pores de forme sphériques alors que le lyophilisat organique (cf. figure 43.d) présente des pores dont la morphologie s'identifie facilement à des dendrites.

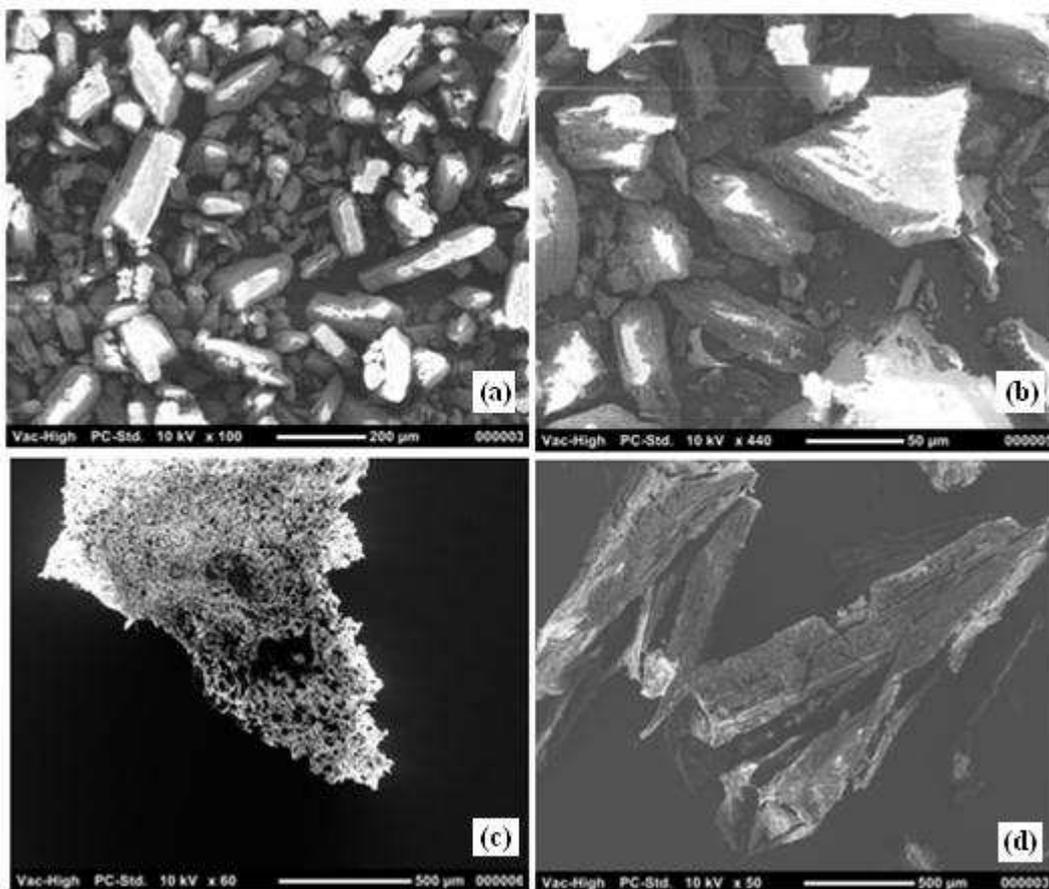


Figure 3.43 : Images obtenues par MEB JOEL JCM-5000 de : (a) l'ibuprofène pur; (b) l'arginine pure; (c) du lyophilisat aqueux et (d) du lyophilisat organique.

3.8.2. Caractérisation du lyophilisat final par DRX.

La Diffraction des rayons X a été utilisée pour caractériser les produits purs et les deux lyophilisats finaux obtenus respectivement à partir des formulations à base organique et à base aqueuse. Les diffractogrammes nous renseignent sur la présence d'un réseau cristallin ou pas. On a pu ainsi vérifier l'amorphisation complète des deux lyophilisats.

3.8.2.1 Principe de la DRX.

Le principe fondamental de la DRX est la mesure de l'intensité des rayons X diffractés par la poudre ou le cristal pour un angle incident θ donné. Une cellule émet un faisceau de rayons X monochromatiques et parallèles en direction de l'échantillon, comme indiqué sur la figure 3.44. Les rayons sont diffractés d'un angle 2θ par rapport à l'incidence. Les particules de l'échantillon étant réparties aléatoirement, il est possible de voir tous les plans simultanément pour un angle d'incidence donné. Le détecteur relève les intensités de diffraction pour une série d'angles 2θ et on obtient le diffractogramme caractéristique de l'échantillon étudié.

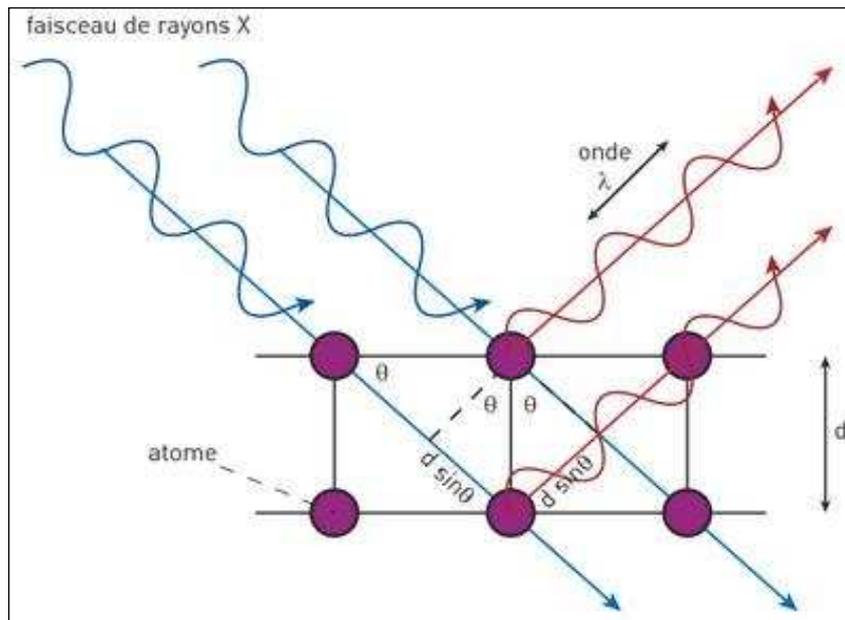


Figure 3.44 : Principe de la diffraction des rayons X

Dans le cas d'un cristal unique il est possible d'obtenir les orientations des plans cristallins en utilisant la Loi de Bragg, corrélation entre l'angle de diffraction θ , la longueur d'onde λ et la distance entre deux plans parallèles d :

$$n\lambda = 2d \sin(\theta) \quad \text{Eq (3-6)}$$

3.8.2.2 Méthodologie des mesures par DRX et résultats.

Les diffractogrammes de l'ibuprofène solide, de l'arginine solide, du lyophilisat final d'ibuprofène formulé à base du co-solvant organique avec 20% TBA + 80% (% massique) eau et de l'ibuprofène formulé à base aqueuse ont été effectués au centre de diffractométrie Henri Longchambon (Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne). L'appareil utilisé est un diffractomètre BRUCKER D8 ADVANCE équipé d'un goniomètre à géométrie Bragg-Brentano utilisant le rayonnement $K\alpha$ d'une anticathode de cuivre (de longueur d'onde 1,54 Å) ; l'alimentation du tube est la suivante : 33 kV et 45 mA. Les intensités sont mesurées pour des valeurs de l'angle 2θ de $4,5^\circ$ à 30° avec une vitesse de balayage de $10^\circ/\text{min}$ avec une ouverture de 3° sur PSD (Position Sensitive Detector). Les échantillons sont étalés sur des supports neutres à fond plat pour poudres. Les diffractogrammes obtenus sont dépouillés grâce au logiciel DIFFRAC – PLUS et reportés sur la figure 3.45 ci-dessous :

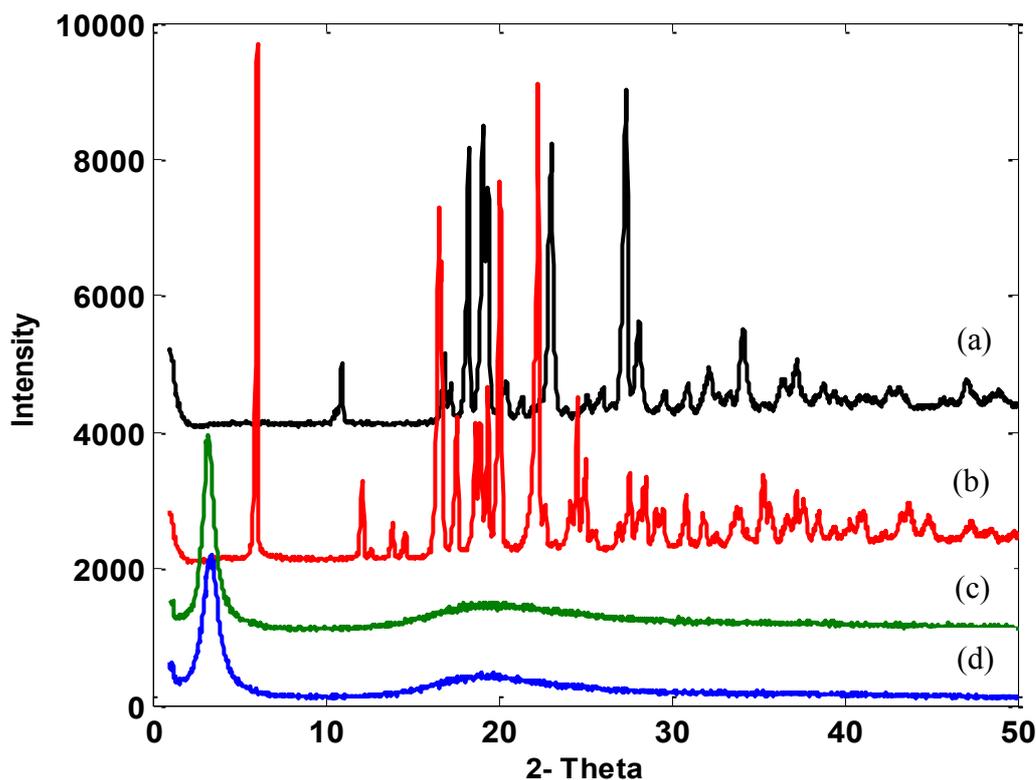


Figure 3.45 : Diffractogrammes de : (a) l'arginine pure ;(b) l'ibuprofène pure ;(c) du lyophilisat final à base aqueuse et (d) du lyophilisat final à base organique.

On observe sur cette figure une amorphisation complète des lyophilisats obtenus à partir de la formulation à base organique et à base aqueuse en raison de l'absence de pics sur les diffractogrammes de DRX. De plus, les diffractogrammes du lyophilisat à base organique et du lyophilisat à base aqueuse sont identiques ce qui conduit pour les deux lyophilisats à une biodisponibilité identique malgré leur apparence visuelle différente.

3.8.3. Caractérisation thermodynamique du lyophilisat final par DSC.

La caractérisation thermodynamique des lyophilisats obtenus à partir des deux types de formulation, à base aqueuse et à base organique, a été effectuée par DSC. Cette caractérisation a consisté, dans un premier temps, à vérifier si, pour une température de stockage inférieure à 50°C, le lyophilisat subit un changement de phase et/ou une dégradation. Ensuite, cette caractérisation a été aussi étendue à des températures supérieures à 50°C afin de détecter une éventuelle transition de phase comme une cristallisation ou une fusion.

3.8.3.1 Caractérisation thermodynamique du lyophilisat correspondant à la formulation à base aqueuse.

Le lyophilisat final correspondant à la formulation à base aqueuse a été obtenu à l'aide du cycle de lyophilisation suivant : congélation à 1°C/min jusqu'à -45°C; sublimation à $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6$ Pa, désorption à $T_{shelf} = 40^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6$ Pa. La figure 3.46 présente respectivement le thermogramme de chauffe obtenu par DSC standard (cf. figure 3.46 a), une photo du lyophilisat aqueux chauffé dans un four pour une température inférieure à 70°C (cf. figure 3.46b) et une photo pour une température du four supérieure à 70°C (cf. figure 3.46c). On observe sur la figure 3.46a que pour une température inférieure à 50°C, température maximale de stockage rencontrée, le thermogramme de chauffe ne montre aucun phénomène thermique ce qui indique que le lyophilisat aqueux pourra être stocké à des températures inférieures à 50°C et conserver son aspect, sa texture et ses propriétés physiques et chimiques finales inchangées.

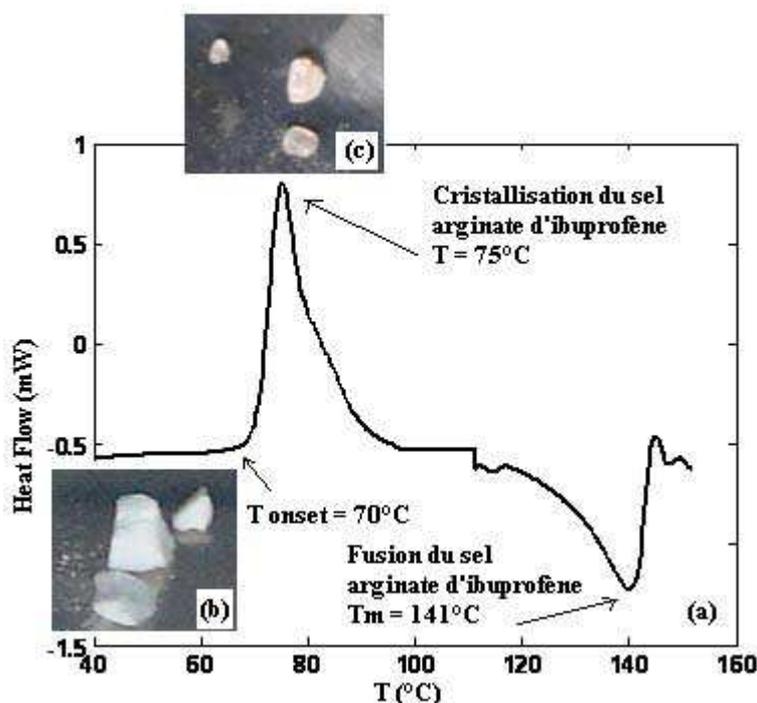


Figure 3.46 : Thermogramme de chauffe (a) du lyophilisat formulé à base aqueuse. Photo du lyophilisat chauffé au four pour : (b) $T < 70^{\circ}\text{C}$; (c) $T > 70^{\circ}\text{C}$.

Pour une température du produit égale à 75°C, le thermogramme de chauffe présente un pic exothermique de cristallisation suivi d'un pic endothermique de fusion à 141°C. D'après la littérature [Stroppolo et al., 1995], l'ibuprofène et l'arginine forment un sel appelé arginate d'ibuprofène. Mehlisch et al., 2002 ont montré que l'arginate d'ibuprofène présente une efficacité analgésique équivalente au principe actif pur. Il est ainsi utilisé comme principe actif dans certains médicaments non stéroïdien. On peut citer à titre d'exemple Spifen qui est un anti-inflammatoire dont le principe actif est l'arginate d'ibuprofène. L'obtention de ce sel est breveté [Stroppolo et al., 1995] et l'une des façons de l'obtenir est la suivante : faire fondre 100mg d'ibuprofène (T_m ibuprofène = 76,7°C) et ajouter 50 mg d'eau. Ajouter au

mélange liquide une quantité d'arginine égale à 81 mg, quantité qui correspond à un ratio molaire ibuprofène/arginine égale à 1/1. Le mélange final présente un aspect crémeux. Puis, par évaporation de l'eau, l'arginate d'ibuprofène est formé. On se basant sur les données de la littérature, on peut en déduire que le lyophilisat correspondant à la formulation à base aqueuse (figure 3.46 b) au voisinage d'une température égale à 70°C passe d'une phase amorphe à une phase viscoélastiques dans laquelle les mouvements moléculaires et ioniques sont possible ce qui permet la formation du sel d'arginate d'ibuprofène (cf. figure 3.46 c).

3.8.3.2 Caractérisation thermodynamique du lyophilisat correspondant à la formulation à base organique.

Le lyophilisat final correspondant à la formulation à base organique a été obtenu en utilisant le même cycle de lyophilisation qu'au paragraphe précédent à savoir : congélation à 1°C/min jusqu'à -45°C ; sublimation à $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6$ Pa ; désorption à $T_{shelf} = 40^\circ\text{C}$ et $P_c = 6$ Pa. Afin de mettre en évidence visuellement la formation du sel d'arginate d'ibuprofène, des essais de chauffe du produit en ATG ont été effectués. Dans un premier temps, le produit a été chauffé jusqu'à une température de 80°C, puis la chauffe a été arrêtée, l'échantillon sorti du four de l'appareil d'ATG et une photo réalisée (cf. figure 3.47 b). Puis l'échantillon est remis dans le four de l'ATG et chauffée jusqu'à 110°C. A cette température, la chauffe a été de nouveau arrêtée et une photo de l'échantillon réalisée (cf. figure 3.47c). On observe sur la figure 3.47 a représentant le thermogramme de chauffe obtenu par DSC, que comme pour le lyophilisat de la formulation à base aqueuse, le lyophilisat de la formulation à base organique pourra être stocké à des températures inférieures à 50°C tout en gardant ses bonnes propriétés d'usages. De même, les figures 3.47 a, 3.47 b et 3.47c confirment la formation du sel d'arginate d'ibuprofène.

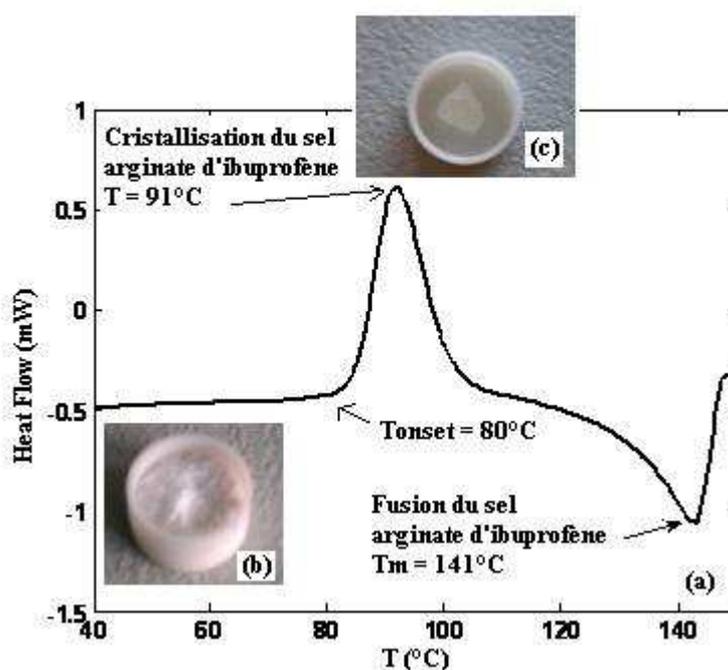


Figure 3.47 : Thermogramme de chauffe du lyophilisat (a) formulé à base organique. Photo du lyophilisat chauffé par ATG pour : (b) $T < 80^\circ\text{C}$; (c) $T > 80^\circ\text{C}$.

3.8.4. Humidité résiduelle finale.

L'humidité résiduelle finale dans les lyophilisats est le critère de qualité le plus critique du procédé de lyophilisation. Pour les formulations à base aqueuse, la limite résiduelle en eau est généralement fixée à 3%. Pour des valeurs d'humidité inférieures à 3%, l'activité de l'eau est faible ce qui a pour conséquence une limitation voire la disparition de toute réaction chimique ou biochimique dans le lyophilisat. Ainsi, une conservation à long terme du produit est possible. Pour le lyophilisat correspondant à la formulation à base organique, l'humidité finale résiduelle comprend le résidu en eau et le résidu en solvant organique (TBA). Contrairement à l'eau, dont la teneur résiduelle limite est fixée par rapport à la conservation du produit à long terme, la teneur résiduelle limite du TBA est fixée par rapport à la quantité maximale journalière administrable au patient, limite qui est fixée à 5000ppm soit 0,5% massique pour le TBA. Nous avons déterminé la teneur résiduelle finale en eau des lyophilisats 'aqueux' et 'organique' en utilisant la méthode Karl Fischer (cf. paragraphe 1.4.4.3). La teneur en TBA du lyophilisat à base organique a été déterminée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG). A titre de comparaison l'ATG, a aussi été utilisée pour déterminer l'humidité finale des deux lyophilisats étudiées. Mais cette technique présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord, elle ne permet que la détermination de la teneur résiduelle totale, eau +TBA, sans pouvoir préciser séparément les quantités résiduelles d'une part, de TBA, et, d'autre part, d'eau. D'autre part, les essais en ATG nécessitent l'ouverture du flacon en verre bouché sous vide pour prélever l'échantillon à analyser. Cette étape met en contact le lyophilisat très hygroscopique avec l'ambiance qui comporte une certaine humidité relative. Ainsi le lyophilisat risque fortement de capter l'humidité de l'air ce qui risque de fausser les résultats. Notons que par la méthode Karl Fischer et par CPG, le dosage de la teneur finale en solvant ne nécessite pas l'ouverture du flacon en verre bouché sous vide. Les lyophilisats finaux ont été obtenus par deux cycles différents de lyophilisation dont les conditions opératoires des étapes successives du procédé sont reportées sur le tableau 3.4 ci-dessous.

| Etape | Cycle 1 | | Cycle 2 | |
|-------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
| | T _{shelf} (°C) | P _c (Pa) | T _{shelf} (°C) | P _c (Pa) |
| Congélation | 1°C/min à -45°C | atmosphérique | 1°C/min à -45°C | atmosphérique |
| Sublimation | 0 | 6 | -5 | 6 |
| Desorption | 40 | 6 | 40 | 6 |

**Tableau 3.4 : Conditions opératoires des cycles de lyophilisation.
Flacon verre 4mL.**

3.8.4.1 Principe de la détermination de la teneur résiduel en TBA par CPG.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse dont les principes généraux sont fondés sur la migration différentielle des constituants du mélange à analyser au travers d'un substrat choisi [Tranchant 1996]. La particularité du procédé est d'opérer en totalité avec des produits volatilisés, ce qui implique de maintenir une température minimale convenable, mais sans qu'il y ait volatilisation du substrat, et de travailler en circuit étanche aux gaz. La figure 3.48 présente les différentes parties du chromatographe. La CPG comporte une colonne, dans laquelle est enfermé le substrat qui va permettre le processus de migration différentielle des éléments du mélange à analyser. Ces éléments, appelés solutés, sont obligés de parcourir la colonne entraînés par un gaz inerte, appelé gaz porteur ou gaz vecteur. Un injecteur approprié permet d'introduire le mélange à analyser dans le circuit gazeux, sans rupture de celui-ci et un détecteur permet le repérage des solutés au fur et à mesure de leur sortie de la colonne - celle-ci étant conditionnée à des températures convenables à l'aide d'un four – et d'obtenir un thermogramme à l'aide d'un enregistreur.

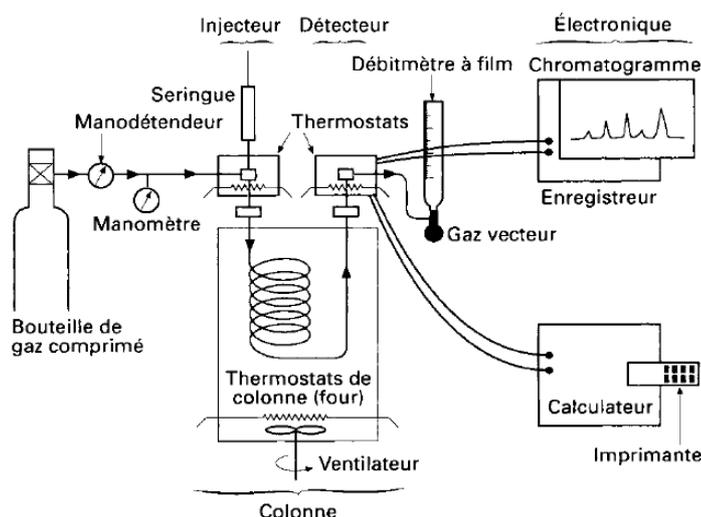


Figure 3.48 : Principe de la CPG [Tranchant 1996]

La détermination de la teneur résiduelle en TBA a été effectuée en utilisant une colonne de CPG fournie par Agilent 7890A. Le dispositif de CPG est équipé d'une colonne Poraplot Q (CHROMAPACK) (longueur : 25 m, diamètre interne : 320 μ m, épaisseur de film : 10 μ m), avec un injecteur split/splitless en mode split et une détecteur FID. Dans un premiers temps, l'étalonnage de la colonne a été effectué en utilisant comme étalon interne le butanol. Pour ce faire, nous avons préparé quatre solutions étalon dont les rapports massiques mTBA/mBuOH varient de 0,5 à 3. La droite d'étalonnage obtenue présentée sur la figure 3.49 montre que le coefficient de corrélation obtenu est très satisfaisant.

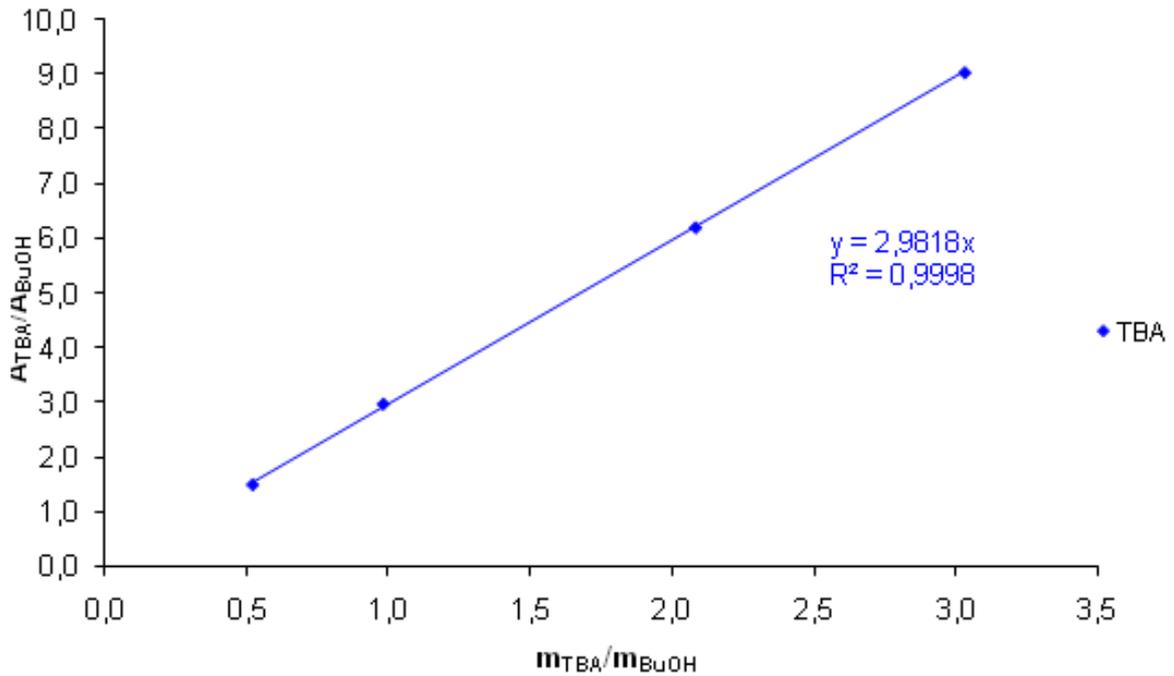


Figure 3.49 : Droite d'étalonnage pour l'analyse du ter-butanol (TBA).

La droite d'étalonnage permet à partir de l'aire des pics du TBA et du butanol d'en déduire le pourcentage massique de TBA résiduel. Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

- Température de l'injecteur : 250°C
- Pression en tête de colonne : $0,67 \cdot 10^5$ Pa
- Ratio de division : 10
- Programmation du four :
 - Température initiale : 50°C
 - Rampe de température : 20°C/min
 - Température finale : 240°C (10 minutes)
- Température du détecteur : 250°C
- Volume injecté : 1 μ L

A titre d'exemple, un chromatogramme type est présenté sur la figure 3.50 ci-dessous:

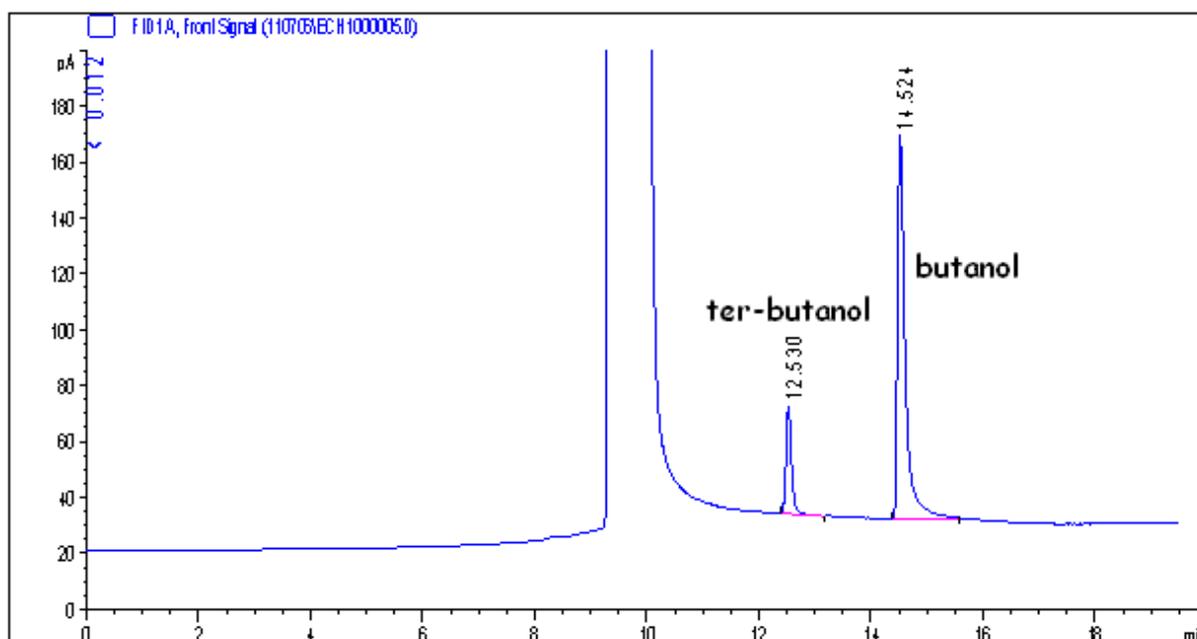


Figure 3.50 : Chromatogramme type pour l'analyse du ter-butanol

3.8.4.2 Taux de solvant résiduel final.

La figure 3.51 présente les teneurs résiduelles en eau présentes dans les lyophilisats finaux correspondant à la formulation à base aqueuse déterminées par Karl Fischer et par ATG pour les deux cycles de lyophilisation prédéfinis. A titre d'exemple, les résultats obtenus par ATG sont présentés en annexe 6.

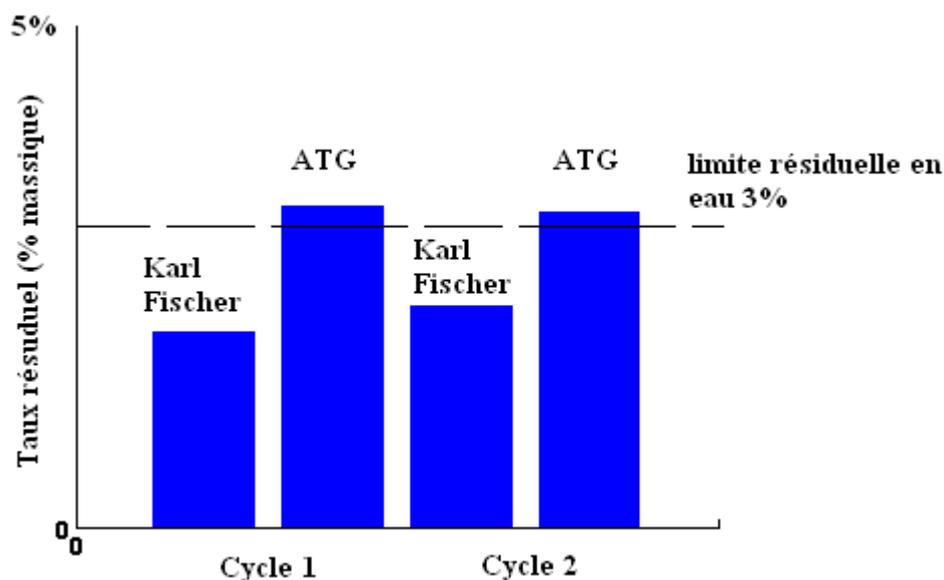


Figure 3.51 : Teneurs limites résiduelles en eau des lyophilisats aqueux déterminées par Karl Fischer et par ATG pour deux cycles de lyophilisation différents.

La figure 3.51 montre que les teneurs résiduelles en eau obtenues par ATG sont supérieures à celles obtenues par la méthode Karl Fischer. Comme mentionné au paragraphe 3.8.4, l'ATG n'est pas une méthode appropriée pour caractériser l'humidité finale des lyophilisats hygroscopiques. Par contre, la méthode Karl Fischer reste la méthode la plus précise pour la détermination de la teneur en eau résiduelle finale dans le lyophilisat. La figure 3.51 montre que les teneurs en eau obtenues par la méthode Karl Fischer sont inférieures à la limite en eau fixée à 3%. Une conservation à long terme du lyophilisat final sera donc possible.

La figure 3.52 présente les teneurs résiduelles en TBA et en eau respectivement déterminées par CPG et par la méthode Karl Fischer sur des lyophilisats finaux correspondant à des formulations à base de co-solvants organiques. On observe que les teneurs résiduelles en TBA et en eau sont bien inférieures à la quantité maximale permise à savoir 0,5% pour le TBA et 3% massique pour l'eau. Ainsi, le lyophilisat organique pourra être administré en toute sécurité au patient et, d'autre part, la conservation à long terme de celui-ci semble tout à fait possible.

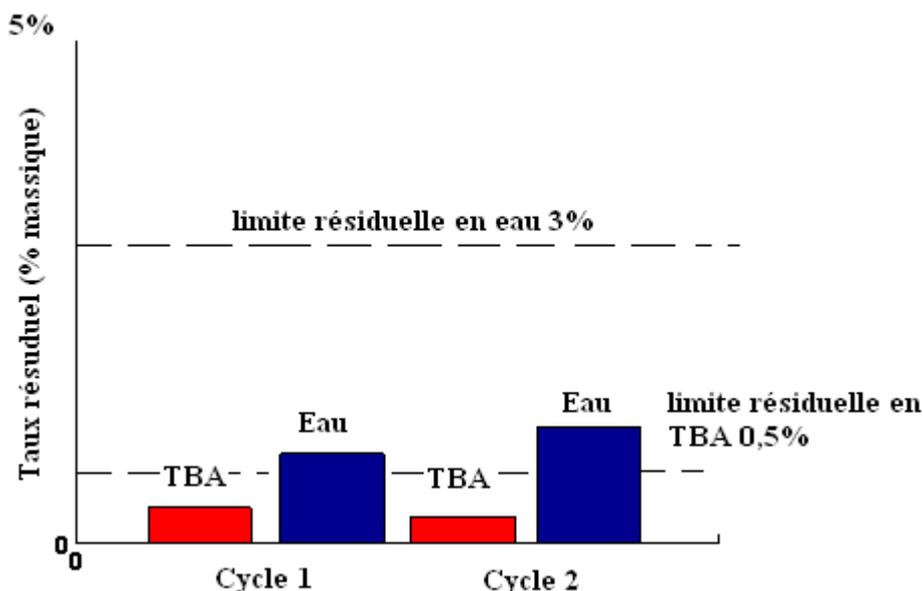


Figure 3.52 : Teneurs limites résiduelles en eau des lyophilisats aqueux déterminées par la méthode Karl Fischer et par ATG pour deux cycles de lyophilisation différents.

3.9 Conclusions.

L'étude comparative de la lyophilisation des deux formulations à base aqueuse et à base organique de notre principe actif modèle, à savoir, l'ibuprofène, nous a renseigné sur les avantages qu'apportait l'utilisation des co-solvants organiques. Dans un premier temps, cette étude a montré que le TBA permettait une augmentation de la solubilité de l'ibuprofène ainsi qu'une augmentation de la facilité de préparation de la formulation, notamment en raison de

la disparition de la mousse qui apparaît lors de la formulation de celui-ci avec une solution essentiellement à base aqueuse. Dans un deuxième temps, cette étude nous a confirmé que l'emploi du TBA dans une moindre quantité en tant que co-solvant organique permettait dans les mêmes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c) de réduire les temps de sublimation d'un facteur 1,8. Il a été conclu que cette augmentation des cinétiques de sublimation résultait des valeurs des propriétés thermodynamiques du mélange eutectique 20% en TBA + 80% en eau (% massique), à savoir des valeurs de la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur plus élevées et d'une valeur de l'enthalpie de sublimation plus faible que celle de glace.

Par ailleurs, la caractérisation de la taille des cristaux de solvant a mis en évidence que la formulation à base organique présentait une taille moyenne des cristaux de solvant plus élevée que celle des cristaux de glace de la formulation à base aqueuse. Par conséquent, la formulation à base organique a montré des valeurs de la résistance au transfert de masse de la vapeur de solvant (eau + TBA) plus faibles que celle de la formulation à base aqueuse ce qui participe à l'augmentation des cinétiques de séchages lorsque le TBA est utilisé comme co-solvant organique.

L'étude de caractérisation finale a mis en évidence que les deux formulations étudiées conduisaient à des lyophilisats qui satisfont aux principaux critères de qualité du lyophilisat sec final à savoir en termes de réhydratabilité, d'humidité finale, de collapse, etc...

CHAPITRE 4

MODELISATION DE L'ETAPE DE SUBLIMATION.

4. Modélisation de l'étape de sublimation avec Comsol Multiphysics.

4.1 Modèles existants.

Dans le procédé de lyophilisation, l'étape de sublimation est l'étape la plus longue et la plus consommatrice d'énergie. On peut rencontrer dans l'industrie pharmaceutique des cycles de lyophilisation de l'ordre de 130 heures ce qui représente un coût énorme en énergie et, de plus, ceci limite surtout la productivité du site. Ainsi, une des solutions pour augmenter cette productivité et pour répondre à la demande croissante de produits pharmaceutiques lyophilisés, est d'investir dans l'achat de nouveaux lyophilisateurs afin d'augmenter la capacité de production. Cependant ces investissements sont lourds et viennent augmenter le coût du procédé de lyophilisation. La deuxième solution pour augmenter cette productivité est d'optimiser la durée du cycle de sublimation, durée qui n'est pas toujours optimisée dans les cycles de fabrication industriels. En effet, l'optimisation de l'étape de sublimation demande une étude approfondie de tous les facteurs qui peuvent influencer la durée de ce cycle. Il paraît donc évident que l'étude expérimentale et la modélisation de l'étape de sublimation représente un enjeu majeur pour les industriels en vue d'augmenter la productivité du procédé tout en maintenant les nombreux facteurs de qualité du lyophilisat final. Un des premiers modèles à une dimension qui a été utilisé pour interpréter les phénomènes de transfert de chaleur et de masse intervenant durant l'étape de sublimation est le model U.R.I.F (Uniformly Retreating Ice Front) explicité par King 1971 et puis modifié Wolff et al. 1989. Par la suite, Liapis 1998 a proposé un model bidimensionnel équivalent à celui de King 1971 mais en le complétant par l'introduction de la géométrie 2D des flacons utilisés. Les hypothèses avancées pour ces modèles classiques sont les suivantes :

- les transferts à travers les deux couches (congelée et sèche) sont unidirectionnels ;
- toute l'énergie transmise au front ne sert qu'à la sublimation et aucune accumulation de chaleur dans l'échantillon n'est prise en compte ;
- les lois de Fick et de Fourier étendues au milieu continu équivalent (diffusivités effectives et conductivités thermiques) interprètent les transferts de matière et de chaleur au sein du produit ;
- la température au cœur du produit - la température du front de sublimation- est supposée constante pendant la sublimation ;
- la température du front de sublimation reste constante pendant la sublimation ;
- la glace est en équilibre thermodynamique avec la vapeur d'eau au niveau du front de sublimation ;
- le produit reste homogène durant toute la lyophilisation ;
- le front de sublimation est plan et parallèle à la section droite du flacon.

Les modèles proposées par King 1971 et Liapis 1998 sont des modèles mathématiques relativement complexes dont le plus grand désavantage est qu'ils font intervenir un nombre considérable de paramètres physiques, à savoir de l'ordre de 40. Récemment, Brulls et Rasmuson 2009, ont proposé un modèle 2D de sublimation de la glace pure dans un flacon en verre d'une capacité de 10 mL. Les hypothèses avancées pour ce modèle sont les mêmes que dans celles du modèle U.R.I.F. Le modèle proposé par Brulls et Rasmuson 2009 permet une

bonne estimation de la température au fond du flacon et de la vitesse de sublimation. Cependant, à notre sens, ce modèle introduit encore trop de paramètres physiques qui sont difficiles à déterminer expérimentalement ou à estimer. C'est ainsi que, dans un premier temps, nous nous sommes posé comme objectif de proposer et de valider un modèle simple qui permette de modéliser la sublimation d'un solvant pur - sans présence de couche sèche - dans une géométrie de flacon en 3D donnée. Les paramètres nécessaires à la mise en oeuvre de ce modèle purement thermique sont des paramètres facilement mesurables ou estimables tels que la conductivité thermique et la masse volumique de la couche congelée, la température des étagères et celle au fond du flacon, la pression de vapeur d'équilibre du solvant et la pression de vapeur dans la chambre, la géométrie du flacon, la hauteur de remplissage du flacon, l'enthalpie de sublimation du solvant et le coefficient global de transfert de chaleur externe, noté K_v

4.2 Modélisation sous Comsol.

Nous avons modélisé sous Comsol l'étape de sublimation d'une formulation de 1g de glace pure, c'est-à-dire sans principe actif ni excipients sublimée dans un flacon en verre de 4 mL, pour une hauteur de remplissage de 1cm. Ensuite, cette modélisation a été étendue à la sublimation de 1g de mélange de co-solvant à la composition eutectique A toujours sans principe actif ni excipients. Comme indiqué au paragraphe 3.6.3.2 (cf figure 3.33), les cinétiques de sublimation de la formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique sont majoritairement limitées par le transfert de chaleur dans la gamme de température d'étagère et de pressions très faibles (6 à 50 Pa) étudiées. C'est ainsi, que l'hypothèse d'une limitation purement thermique a été avancée. Le modèle ainsi construit nous a permis d'estimer et de visualiser l'avancement du front de sublimation et le profil de température du produit au fond du flacon en fonction du temps pour des conditions opératoires (T_{shelf} et P_c) fixées ainsi que de prédire la durée de la sublimation.

4.2.1. Comsol en quelques mots.

Environnement interne à Matlab, Comsol (anciennement Femlab) est un logiciel dédié à la modélisation et la simulation de tout phénomène physique pouvant être interprété sous forme d'Equations aux Dérivées Partielles (EDP). Il permet de résoudre numériquement des systèmes linéaires et non-linéaires couplés, représentés par des équations aux dérivées partielles, ceci en utilisant la méthode des éléments finis et un maillage automatique de la géométrie en utilisant des triangles ou des tétraèdres selon la dimension de la géométrie (2D ou 3D). Grâce à son environnement de CAO qui permet de représenter finement l'objet de l'étude, au meilleur, aux modèles prédéfinis ou à ses modes d'application optimisés, Comsol permet de modéliser simplement une grande variété de phénomènes physiques. Pour les applications plus pointues, il est possible de modifier et d'ajuster directement l'écriture des équations physiques descriptives (constitutives et de bilan) et de les modifier selon les besoins spécifiques. Des modules spécialisés sont aussi disponibles pour le génie chimique, la mécanique des fluides, les sciences de la terre, la mécanique des solides et des structures,

l'électromagnétisme etc. Par ailleurs, une fonctionnalité de Comsol, appelée «Multiphysics» permet de modéliser et de résoudre des problèmes combinant plusieurs phénomènes physiques.

4.2.2. *Méthode de résolution générale sous Comsol.*

La démarche à suivre pour résoudre tout problème physique sous *Comsol* est relativement simple; voici les étapes de cette méthode:

- *Définition du modèle:* il faut choisir la dimension (*1D*, *2D*, *3D*) et la nature du problème, soit par le choix d'une équation applicable à un phénomène quelconque, soit par le choix d'un phénomène physique ;
- *Mise en place de la géométrie du problème:* il s'agit de dessiner, à l'aide de la barre d'outils de dessin intégrée à *Comsol*, un modèle géométrique du problème. Les outils de dessin de *Comsol* étant tout de même limités, les géométries complexes devront être modélisées par des assemblages de formes simples ou en utilisant des logiciels de CAO ;
- *Spécification des paramètres des équations aux dérivées partielles du problème:* Pour ce faire, il faut sélectionner le sous-domaine voulu (ici, la couche congelée de la formulation du mélange de co-solvant à la composition eutectique A) et définir les propriétés et paramètres spécifiques, **comme la masse volumique, la capacité calorifique, etc.**
- *Spécification des conditions aux limites:* celles-ci peuvent être des constantes ou des équations (type *Dirichlet*, *Neuman* ou *Fourier*) ;
- *Choix d'un maillage:* celui-ci pouvant être défini automatiquement par *Comsol* ou être manuellement ajusté, par exemple pour obtenir une plus grande finesse de résolution. Dans notre cas, le module *Moving Mesh (ALE)* a été utilisé afin de modéliser le déplacement du front de sublimation ;
- *Résolution et visualisation des résultats:* *Comsol* dispose d'un ensemble de solveurs (directs, itératifs, multigrilles) pour résoudre les équations de bilan implantées et permet de faire de l'analyse linéaire, non-linéaire, temporelle, modale, paramétrée. Le résultat s'affiche spontanément après la résolution. L'évolution du phénomène étudié peut être visualisé sous différentes formes: vue 3D, vecteurs, coupe en plan, dégradés de couleurs, etc.

4.2.3. Implémentation du modèle de sublimation sous Comsol.

4.2.3.1 Définition du modèle.

Le modèle présenté est basé tout d'abord sur des hypothèses classiques qui sont les mêmes que celle du modèle U.R.I.F (cf. paragraphe 4.1). En plus de ces hypothèses, nous avons aussi avancé l'hypothèse d'une limitation de la sublimation par le transfert thermique. Cette nouvelle hypothèse a été adoptée du fait qu'on a observé au paragraphe 3.6.3.2 que les valeurs des vitesses de sublimation, notées \dot{m} obtenues sans principe actif présentaient au maximum un écart supérieur de 10% par comparaison aux valeurs de \dot{m} obtenues avec une formulation contenant du principe actif. Par ailleurs, Hottot et al. 2007 ont démontré que dans la gamme des faibles pressions, à savoir de 6 Pa à 50 Pa, la sublimation est principalement limitée par le transfert de chaleur. De ce fait, le modèle présenté décrit la sublimation d'une couche de solvant congelé sans la présence de couche sèche, ce qui a pour conséquence de considérablement simplifier le modèle. La figure 4.1 représente le schéma simplifié du modèle de sublimation du solvant pur adopté.

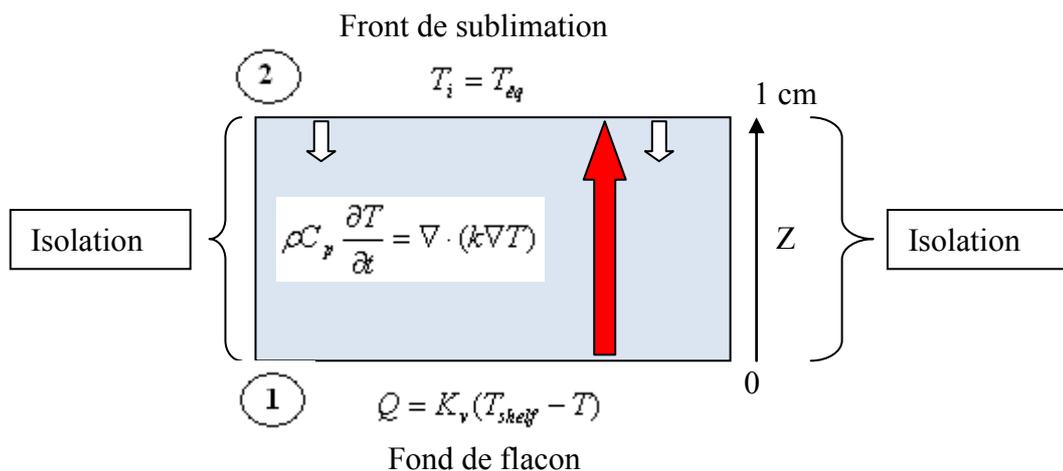


Figure 4.1 : Schéma simplifié de la sublimation du solvant pur.

Le produit congelé est défini comme un domaine avec deux frontières à savoir une frontière inférieure (1) et une frontière supérieure (2). La frontière inférieure est fixe alors que la frontière supérieure, correspondant à l'interface de sublimation, est mobile et elle se déplace avec une vitesse notée V_s . Cette vitesse est définie par l'équation 4-1 ci-dessous :

$$V_s = \frac{Q_s}{\Delta H_s \cdot \rho} \quad \text{Eq (4-1)}$$

Dans cette relation Q_s (W/m^2) représente le flux de chaleur conductif à travers la couche congelée nécessaire au maintien d'une sublimation à l'état quasi-stationnaire, valeur

sensiblement égale au flux de chaleur global Q externe imposé sur la frontière inférieure (1) et déterminée par l'équation 4-2 suivante :

$$Q = K_v (T_{shelf} - T) \quad \text{Eq (4-2)}$$

dans laquelle les valeurs de T_{shelf} et de $T=T_b$ sont obtenues par mesure directe et celle de K_v est facilement déterminée expérimentalement (cf. paragraphe 3.6.3.1).

Du fait que l'on considère un flux de chaleur global à la frontière (1) on peut alors considérer que les faces externes du domaine sont parfaitement isolées.

Une des hypothèses majeures qui a été avancée est que la température du front de sublimation reste constante pendant la sublimation. Cela implique d'adopter comme condition limite à la frontière supérieure, $T_i = T_{eq} = \text{constante}$. La température du front de sublimation est un paramètre difficilement estimable surtout lorsque le domaine comporte une couche congelée et une couche sèche. En effet, dans ce cas, le solvant congelé est supposé en équilibre thermodynamique avec la vapeur de solvant au niveau du front de sublimation. Cette pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur est différente de la pression partielle du solvant dans la chambre de lyophilisation. Cette différence est due à la résistance que rencontre la vapeur d'eau ou de solvant au passage de la couche sèche microporeuse. Cependant, dans le cas de la sublimation d'une couche de solvant pur congelé, sans présence de couche sèche, la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur est sensiblement égale à la pression partielle de vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation. Dans le cas de la sublimation de la glace pure, la valeur de la pression partielle en eau peut être déterminée indirectement à partir de la mesure directe de la pression totale dans la chambre de lyophilisation par un manomètre à vide (jauge Pirani). Comme indiqué au paragraphe 1.5.2 la jauge Pirani permet de mesurer la pression totale de la chambre de lyophilisation en tenant compte de la présence de la vapeur d'eau dans la chambre contrairement au capteur à capacitance du type MKS qui est insensible à la composition du gaz. On a observé [Nail 1991] que la valeur de la pression totale $P_{cPirani}$ mesurée par la jauge Pirani est 1,5 fois plus élevée que la pression de la chambre mesurée par le capteur MKS. A partir de cette mesure de $P_{cPirani}$ et en prenant l'hypothèse que la vapeur dans la chambre de lyophilisation correspond à de la vapeur d'eau pure, on peut en conclure que la pression partielle en eau, notée P_{eau} est sensiblement égale à la pression totale $P_{cPirani}$. On en déduit alors la valeur de la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur au front de sublimation, notée $P_{eq} = P_{cPirani}$. Ainsi, la température $T_i = T_{eq}$ de la glace au front de sublimation peut être estimée par la relation 4-3 ci-dessous :

$$T_{eq} = \frac{-6320,15}{\ln(P_{cPirani}) - 29,56} \quad \text{Eq (4-3)}$$

dans laquelle T_{eq} est en Kelvin et $P_{cPirani}$ en Pascal.

Dans le cas de la modélisation de la sublimation d'une couche congelée à la composition eutectique A, pour des raisons de sécurité (risque d'explosivité des vapeurs de co-solvants organiques (TBA)), la jauge Pirani ne peut être utilisée. De plus, celle-ci est calibrée avec de la vapeur d'eau et elle permet de mesurer exclusivement la pression de vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation. Ainsi la valeur de la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur de l'eutectique A, notée $P_{\text{éq,eutA}}$, doit être estimée par extrapolation de la valeur $P_{c\text{Pirani}}$ déterminée précédemment, pour les mêmes conditions opératoires T_{shelf} et P_c . On a observé au paragraphe 3.4.3, que les valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide-vapeur de l'eutectique A étaient 1,8 fois plus élevées que les valeurs de la glace pure. Ainsi nous avançons l'hypothèse que la valeur $P_{\text{éq,eutA}}$ peut être estimée en utilisant l'équation 4-4 ci-dessous :

$$P_{\text{éq,eutA}} = 1,8P_{c\text{Pirani}} \quad \text{Eq (4-4)}$$

Ainsi la température $T_{\text{éq}}$ de l'interface de sublimation de l'eutectique A a pu calculée en utilisant la relation 4-5 qui dérive de la relation de Clausius-Clapeyron (cf. annexe 3), avec $T_{\text{éq}}$ en Kelvin et $P_{c\text{Pirani}}$ en Pascals.

$$T_{\text{éq}} = \frac{-5745,9}{\ln(1,8P_{c\text{Pirani}}) - 27,909} \quad \text{Eq (4-5)}$$

Les conditions limites aux frontières ainsi définies, la résolution du problème va consister à intégrer numériquement l'équation de la chaleur qui interprète le transfert par conduction (Eq 4-6) à travers la couche de solvant congelé.

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T) \quad \text{Eq (4-6)}$$

où ρ représente la masse volumique (kg/m^3), C_p la capacité calorifique massique (J/ kg K) et k la conductivité thermique (W/m K) du congelât.

4.2.3.2 Construction de la géométrie.

Pour représenter le plus précisément possible la sublimation du solvant à l'intérieur du flacon en verre de 4mL rempli à hauteur de 1cm, nous avons représenté sa géométrie 3D la plus réaliste possible en utilisant les outils fournis par COMSOL. Cette géométrie complexe du flacon présentée sur la figure 4-7 a été construite par des assemblages de trois formes simples qui forment trois sous-domaines dont vous trouverez les caractéristiques géométriques en Annexe 7. Dans notre cas, seule le sous-domaine 1 sera considéré comme actif, c'est-à-dire c'est dans ce seul domaine que l'on va appliquer le modèle physique de la sublimation de la couche de solvant congelé.

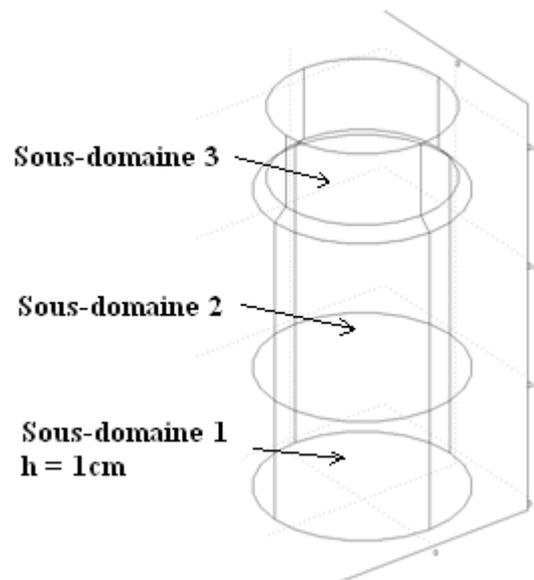


Figure 4-7 : Géométrie du flacon en verre de 4mL.

4.2.3.3 Maillage de la géométrie.

Le maillage consiste à discrétiser la géométrie réelle du flacon. La taille des mailles doit correspondre à l'échelle des fluctuations de la solution et, en même temps, décrire les détails de la géométrie. Plus le maillage est fin et donc plus le nombre de degrés de liberté est élevé, plus la solution est stable, ce qui représente un critère de convergence. Afin de modéliser l'avancement du front de sublimation, nous avons travaillé en mode 'mèche amovible' (ALE). Pour cela Comsol permet de régénérer le maillage au fur et à mesure de l'avancement du front pour permettre d'avoir en continu une taille de maille fine. Pour modéliser la sublimation de la glace et de l'eutectique A, nous avons utilisé un maillage dit fin. La vitesse de déplacement de la maille était guidé par le déplacement du front de sublimation à la vitesse linéaire, notée V_s .

4.2.3.4 Propriétés du sous-domaine 1 et des frontières.

Dans le sous-domaine 1, résultant du découplage de la géométrie du flacon présenté précédemment, on a adopté l'équation classique de la chaleur qui permet de décrire le transfert de chaleur par conduction à travers la couche de solvant congelé. La forme générale de cette équation de transfert de chaleur par conduction s'écrit sous Comsol sous la forme suivante:

$$\delta_{is} \rho C_p \partial T / \partial t - \nabla \cdot (k \nabla T) = Q \quad \text{Eq (4-7)}$$

où le terme Q (W/m^3) représente le terme source. Ce terme est égal à zéro dans le domaine 1 car il n'y a pas de source de chaleur dans ce domaine. Il y a bien une source de chaleur due à la sublimation du solvant à la frontière (2) qui est prise en compte comme une condition limite mais elle ne peut être considérée comme un terme source sur tout le domaine 1. Le terme δ_{is} (-) correspond au coefficient de temps 'time coefficient' de COMSOL, ρ (kg/m^3) à la masse volumique, C_p ($\text{J}/\text{kg K}$) à la capacité calorifique massique et k ($\text{W}/\text{m K}$) à la conductivité thermique de la couche congelée.

Après avoir défini l'équation de la chaleur, il faut implémenter sous Comsol les conditions aux frontières présentées au paragraphe 4.2.3.1. Nous avons regroupé dans le tableau 4.1 les différentes équations nécessaires à la résolution de notre modèle de sublimation sous Comsol. Afin de faciliter la compréhension des équations présentées dans ce tableau, les variables et les termes utilisés ont la signification suivante :

- Le terme q_0 (W/m^2) représente un terme source ou un puits de chaleur situé sur la frontière considérée. Ce terme est nul sur la frontière (1) qui ne comporte pas de source de chaleur et nul sur la frontière (2) du fait que la condition aux limites sur cette frontière est fixée par la température $T_{\text{éq}}$ et non pas par le flux de chaleur.
- $h(T_{\text{inf}} - T)$ est assimilé dans notre cas à $Kv(T_{\text{shelf}} - T)$ comme étant le flux global transmis au niveau de la frontière (1).
- $\text{Const}(T_{\text{amb}}^4 - T^4)$ représente le flux radiatif considéré comme nul du fait que l'apport du rayonnement est déjà comptabilisé dans la valeur du coefficient global de transfert de chaleur externe, noté Kv .

FRONTIERE (1)

Flux de Chaleur

$$n \cdot (k\nabla T) = q_0 + h(T_{\text{inf}} - T) + \text{Const}(T_{\text{amb}}^4 - T^4); \quad h(T_{\text{inf}} - T) = K_v(T_{\text{shelf}} - T) \quad \text{Eq (4-8)}$$

FRONTIERE (2)

Déplacement du front de sublimation

$$V_s = \frac{Q_s}{\Delta H_s \cdot \rho} \quad \text{Eq (4-1)}$$

Température

$$T = T_0; \quad T = T_{\text{éq}} \quad \text{Eq (4-9)}$$

Tableau 4.1 : Conditions limites aux frontières du produit congelé.

4.2.3.5 Résolution numérique du problème.

La résolution du problème a été effectuée en utilisant un solveur linéaire proposé par Comsol à savoir ‘Direct Paradiso out of core’. Cette résolution se fait en fixant le temps total de sublimation. Le pas de calcul pour cette résolution a été fixé à 60 secondes. La tolérance relative du solveur était de 0,01 et la tolérance absolue de 0,001. La résolution du problème en 3D permet de visualiser le déplacement du front de sublimation et la variation de la valeur de la température du produit à la frontière (1) en fonction du temps, ainsi que d’estimer la durée totale de l’étape de sublimation qui correspond à la durée nécessaire pour que le front de sublimation (frontière (2)) atteigne le fond du flacon (frontière (1)).

4.2.4. Résultats de la modélisation.

Avec le modèle ainsi implémenté, nous avons modélisé respectivement la sublimation de 1cm de glace pure et de 1cm de mélange TBA +eau à la composition eutectique A dans un flacon en verre de 4mL. Les propriétés physiques et thermodynamiques de la glace et de l’eutectique A utilisées pour résoudre le problème sont listées sur le tableau 4.2. Il est à noter que, du fait de la faible quantité de TBA dans le mélange eutectique A, les valeurs des propriétés thermophysiques, ρ , C_p et k de l’eutectique A congelée ont été prises égales à celle de la glace. Par contre, les données thermodynamiques telles que les valeurs des pressions de vapeur à l’équilibre solide-vapeur et la valeur de l’enthalpie de sublimation

différent de celle de la glace pure et de celles de l'eutectique A. La sublimation dans les deux cas étudiés a été simulée dans les conditions opératoires suivantes : $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. La valeur de K_v nécessaire aux calculs est la valeur expérimentale déterminée pour ces conditions opératoires au paragraphe 3.6.3.1.

| Nom | Glace | Eutectique A |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| ρ (kg/m^3) | 920 | 920 |
| k (W/m K) | 2,56 | 2,56 |
| C_p (J/kg K) | 1800 | 1800 |
| T_{init} (K) | 228 | 228 |
| Z_0 (m) | 0,01 | 0,01 |
| R_0 (m) | 0,008 | 0,008 |
| ΔH_s (J/kg) | $2,809 \cdot 10^6$ | $2,352 \cdot 10^6$ |
| T_{shelf} (K) | 273 | 273 |
| K_v ($\text{W/m}^2 \text{ K}$) | 23,7 | 23,7 |
| P_{eq} (Pa) | 16.6 | 30 |
| T_{eq} (K) | 234,7 | 234,45 |

Tableau 4.2 : Propriétés physiques et thermodynamiques de la glace et de l'eutectique A. Sublimation $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

La figure 4-8 représente les résultats de la simulation de la sublimation respectivement (a) de la glace pure et (b) de l'eutectique A. Comme attendu, on observe sur cette figure que pour une durée de sublimation de 19980 secondes soit 5,55 heures, le front de sublimation de l'eutectique A est plus avancé que le front de sublimation de la glace pure. Ce résultat est aussi observé sur la figure 4-9 qui présente l'avancement du front de sublimation en fonction du temps pour les deux solvants 'purs' étudiés. En effet, on observe sur cette figure une avancée plus rapide du front de sublimation de l'eutectique A par comparaison à l'avancement du front de sublimation de la glace pure dans les mêmes conditions opératoires à savoir, $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. La durée de l'étape de sublimation de l'eutectique A simulée dans ces conditions opératoires est de $t_{eutA} = 6,66 \text{ h}$ alors que celle de la glace est de $t_{glace} = 8,33 \text{ h}$. Par ailleurs, on observe sur la figure 4-10 que le profil de température simulé au fond du produit pour les deux solutions étudiées présente un plateau pour une valeur de $T_b = 237\text{K}$ (-36°C). De même, les deux solutions présentent (cf tableau 4.2 ci-dessus) des températures du front de sublimation égales environ à $T_{eq} = 234,5\text{K}$ ($-38,5^{\circ}\text{C}$). Soit un écart entre la température du produit au fond de flacon et la température de l'interface de sublimation égal à $2,5^{\circ}\text{C}$. Ainsi, ces résultats confirment que la diminution de la durée de l'étape de sublimation, lorsque l'on utilise l'eutectique A comme co-solvant résulte des valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide-vapeur plus élevées et, surtout, à une valeur de l'enthalpie de sublimation plus faible par comparaison avec les valeurs de la glace pure.

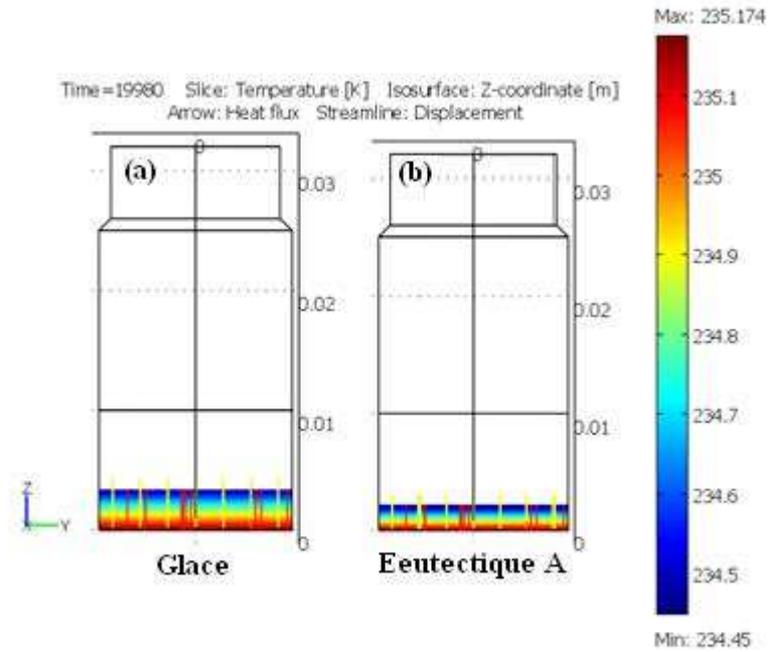


Figure 4-8 : Simulation 3D de la sublimation : (a) de la glace pure et (b) de l'eutectique A. Temps de sublimation = 5,55 heures. Sublimation $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

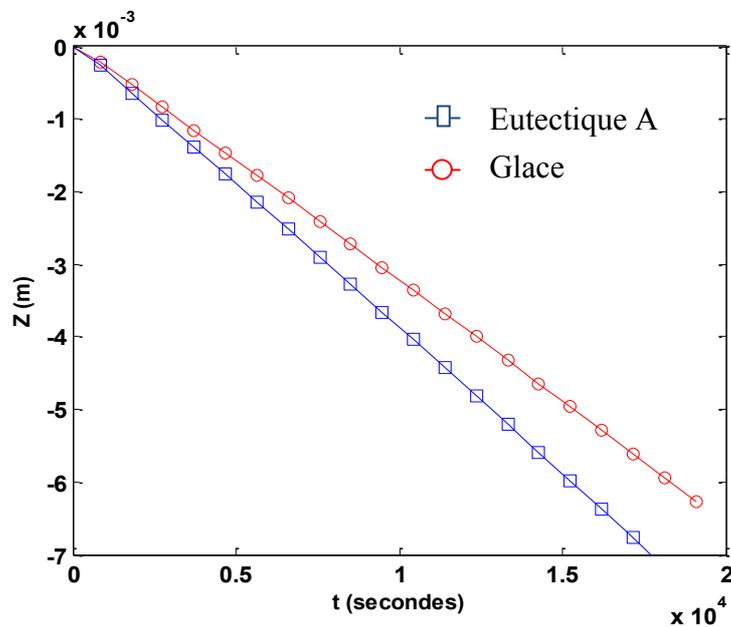


Figure 4-9 : Position du front de sublimation, Z , simulée en fonction du temps : (o) de la glace pure et (□) de l'eutectique A. Sublimation $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

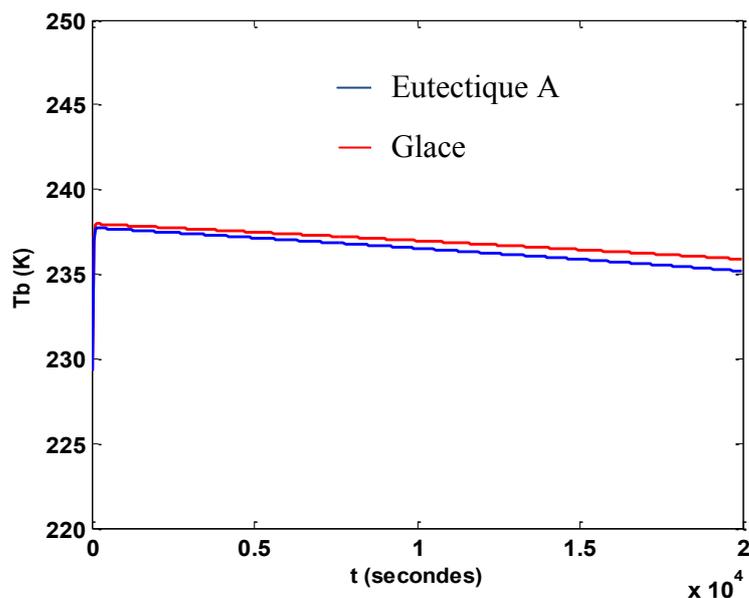


Figure 4-10 : Température du produit simulée au fond de flacon, notée T_b . Sublimation $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

4.2.5. Validation du modèle de sublimation pour $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$.

Afin de valider les résultats obtenus par simulation à partir de notre modèle, nous avons comparé sur la figure 4-11 la position du front de sublimation de l'eutectique A obtenu par simulation avec l'avancement du front de sublimation obtenu expérimentalement dans les mêmes conditions opératoires, à savoir $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$.

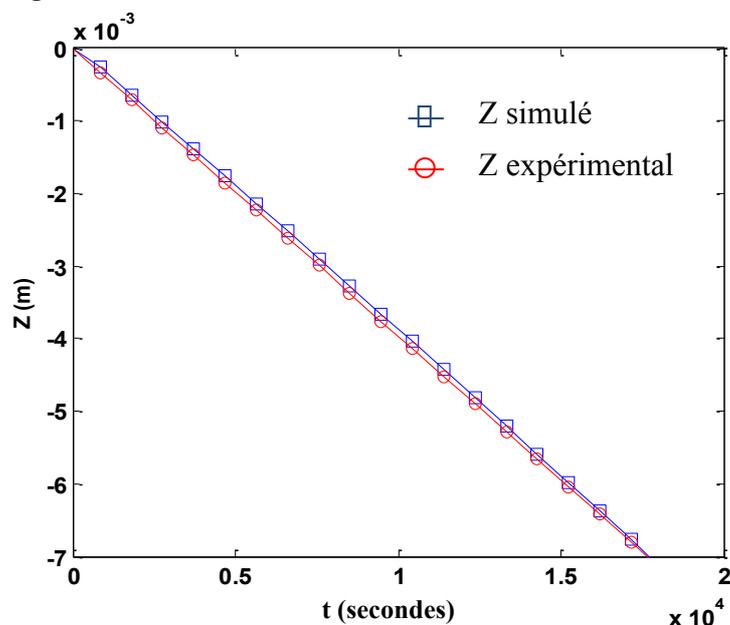


Figure 4-11 : Position du front de sublimation, noté Z : (\square) simulée, (\circ) expérimentale en fonction du temps pour l'eutectique A. Sublimation $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

On observe sur la figure 4-11 que les résultats obtenus par simulation sont en parfait accord avec les résultats obtenus expérimentalement. Par ailleurs, on observe sur la figure 4-12 qu'à l'état de sublimation correspondant à l'état quasi stationnaire, les valeurs simulées et expérimentales de T_b atteignent un palier à environ $T_b = -36^\circ\text{C}$. Par contre, notre modèle est limité par l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire et ne décrit donc pas le réchauffement du produit qui suit l'augmentation de la température des étagères avec une vitesse de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ pour atteindre la valeur cible de 0°C .

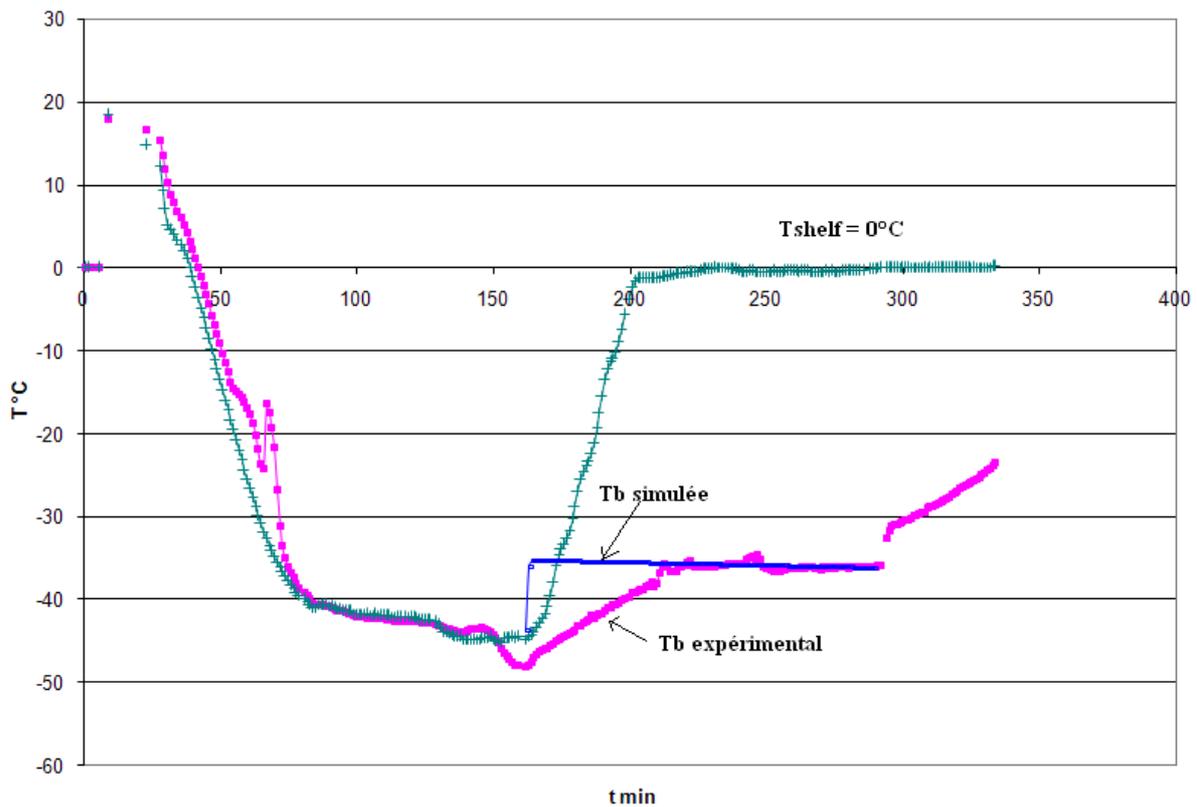


Figure 4-12 : Variation de la température au fond du flacon, T_b , de l'eutectique A simulée et expérimentale en fonction du temps. Sublimation $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

4.2.6. Validation du modèle pour le Design Space de l'eutectique A.

Nous avons validé au paragraphe précédent le modèle de sublimation de l'eutectique A en comparant les résultats obtenus par simulation avec les résultats obtenus expérimentalement pour des conditions opératoires fixées à $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Cependant, pour considérer que le modèle que nous proposons est fiable, la validation de celui doit être réalisée pour différentes conditions opératoires, notamment aux températures d'étagère et aux pressions totales de chambre qui ont conduit à la construction du Design Space de la formulation d'ibuprofène à base de co-solvant organique (eutectique A) (cf paragraphe 3.6). La validation du modèle pour l'essai de sublimation correspondant à $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et à $P_c = 6 \text{ Pa}$ a nécessité préalablement la détermination expérimentale de certains paramètres clés comme le coefficient global de transfert de chaleur, K_v , (indépendant de la formulation) mais aussi la pression de vapeur d'eau dans la chambre de lyophilisation notée $P_{cPirani}$. Puis la valeur $P_{cPirani}$

a été extrapolée pour en déduire une valeur de pression de vapeur de l'eutectique A pour les mêmes conditions opératoires, à savoir $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. En conclusion, la détermination de la valeur de la pression de vapeur de l'eutectique A à l'équilibre solide-vapeur a nécessité d'effectuer un essai de sublimation dans les mêmes conditions opératoires avec une formulation de glace pure. Ainsi, la validation du modèle pour les conditions opératoires du Design Space nécessiterait pour chaque couple T_{shelf} et P_c d'effectuer un essai de sublimation de la glace pure, ce qui augmenterait très significativement les essais expérimentaux nécessaires à la validation du modèle. Cependant, l'intérêt de la modélisation est de minimiser au maximum les essais expérimentaux ce qui est d'autant plus vrai pour les essais de lyophilisation qui demandent beaucoup de temps et sont donc relativement coûteux. Il paraît donc évident que la détermination de la valeur de la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur de l'eutectique A, notée $P_{\text{éq}}$ ne pourra pas se faire en suivant cette méthodologie sur toute la plage de conditions opératoires (T_{shelf} et P_c) étudiées. Ainsi, une nouvelle approche pour estimer la valeur de $P_{\text{éq}}$ de l'eutectique A et, par conséquent, la valeur de la température au front de sublimation, notée $T_{\text{éq}}$ est présenté. Il a été montré au paragraphe 4.2.4 que pour une sublimation menée dans les conditions opératoires suivantes, $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$, au temps de sublimation $t = 0 \text{ s}$, la valeur de l'écart initial de température, notée ΔT , qui représente la différence entre la température au fond de flacon (T_b) et la température de l'interface de sublimation ($T_{\text{éq}}$) était de $2,5^{\circ}\text{C}$. Ce gradient de température dans le cas d'une limitation purement thermique dépend essentiellement de la nature de la couche congelée notamment des propriétés thermophysiques et de l'épaisseur initiale (e_{cg}) de celle-ci. Or ces critères, pour une même formulation, restent constants malgré le changement des conditions opératoires à savoir T_{shelf} et P_c . Ainsi, l'hypothèse suivante a été adoptée, puisque le transfert de chaleur est le facteur limitant, nous considérons que, quelles que soient les conditions opératoires (T_{shelf} et P_c) de l'étape de sublimation, l'écart initial de température ΔT sera toujours sensiblement égal à $2,5^{\circ}\text{C}$ dans le cas de la sublimation de l'eutectique A pur. Cette hypothèse conduit donc à une estimation de $T_{\text{éq}}$ qui ne nécessite pas, pour chaque couple de conditions opératoires T_{shelf} et P_c , d'effectuer préalablement un essai supplémentaire de sublimation de la glace pure. On adoptant cette nouvelle hypothèse nous avons validé le modèle en comparant les cinétiques de sublimation et les profils de température T_b obtenus expérimentalement avec les valeurs obtenues par simulation.

4.2.6.1 Validation du modèle pour $P_c=6 \text{ Pa}$ et différentes valeurs de T_{shelf} .

Nous avons simulé l'étape de sublimation de l'eutectique A pur pour une pression de chambre fixée à 6 Pascals et pour des températures d'étagère égales à $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$, 10°C et 30°C . Les propriétés thermophysiques restant inchangés, nous avons reporté sur le tableau 4.3 les valeurs des paramètres thermodynamiques nécessaires aux calculs et dont les valeurs diffèrent en fonction des conditions opératoires. Les valeurs de T_b et de K_v sont les valeurs expérimentales déterminées au paragraphe 3.6.3.1. Les valeurs de $T_{\text{éq}}$ sont calculées par l'équation 4-10 suivante :

$$T_{\text{éq}} = T_b - \Delta T \quad \text{Eq 4-10}$$

avec $\Delta T = 2,5 \text{ K}$ ou $2,5^{\circ}\text{C}$

| T_{shelf} (K) | 273 (0°C) | 283 (10°C) | 303 (30°C) |
|----------------------------|-----------|------------|------------|
| K_V (W/m ² K) | 23,7 | 20,44 | 20,67 |
| Tb mesurée | 236,95 | 237,5 | 239,5 |
| T_{eq} (K) calculée | 234,45 | 235 | 237 |

Tableau 4.3 : Propriétés thermodynamiques de l'eutectique A. Sublimation $P_c = 6$ Pa. $\Delta T = 2,5^\circ\text{C}$. Flacon en verre de 4mL.

On observe sur la figure 4-13 ci-dessous que les résultats obtenus par simulation sont en parfait accord avec les résultats obtenus expérimentalement. On observe également que pour une même pression totale de la chambre, les cinétiques de sublimation sont plus rapides lorsque l'on réalise la sublimation à des températures plus élevées. Par ailleurs, on observe sur les figures 4-14 et 4-15 que les valeurs de la température simulées au fond de flacon, T_b , sont également en parfait accord avec les résultats expérimentaux. On peut alors en conclure que l'écart $\Delta T = 2,5^\circ\text{C}$ reste constant et n'est pas influencé par le changement de la température des étagères. Ainsi hypothèse adoptée au paragraphe précédent est bien vérifiée.

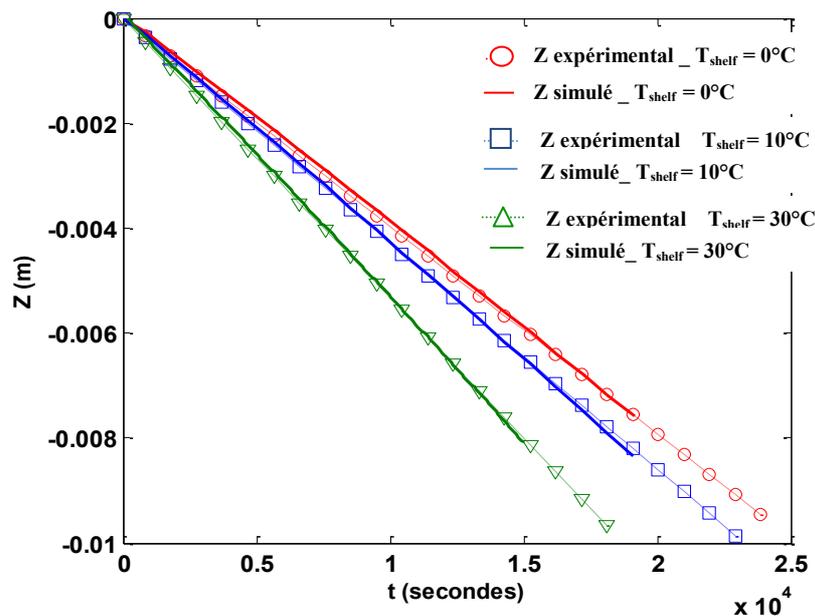


Figure 4-13 : Position du front de sublimation, notée Z, simulée et expérimentale pour $P_c = 6$ Pa et pour différentes valeurs de T_{shelf} . Flacon en verre de 4mL.

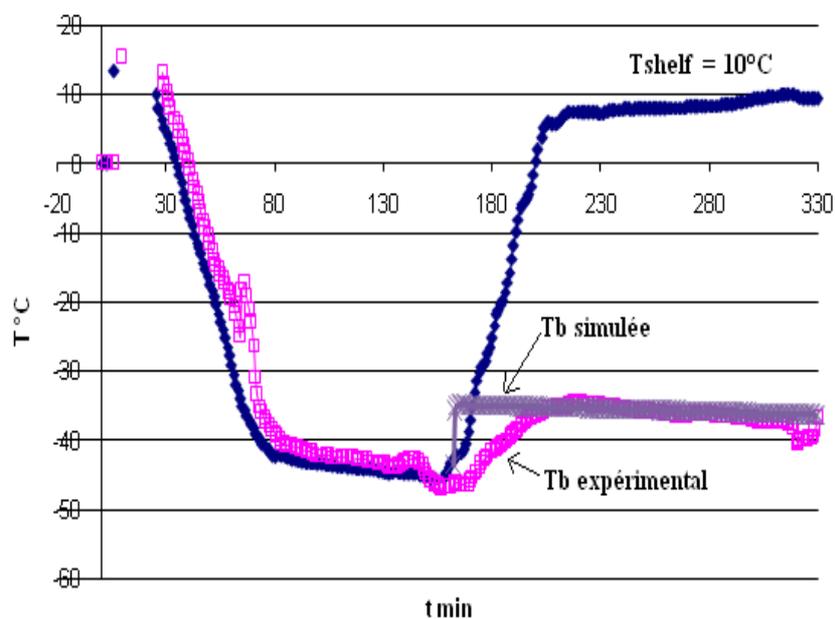


Figure 4-14 : Variation de la température au fond du flacon, T_b , de l'eutectique A simulée et expérimentale en fonction du temps. Sublimation $T_{shelf} = 10^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

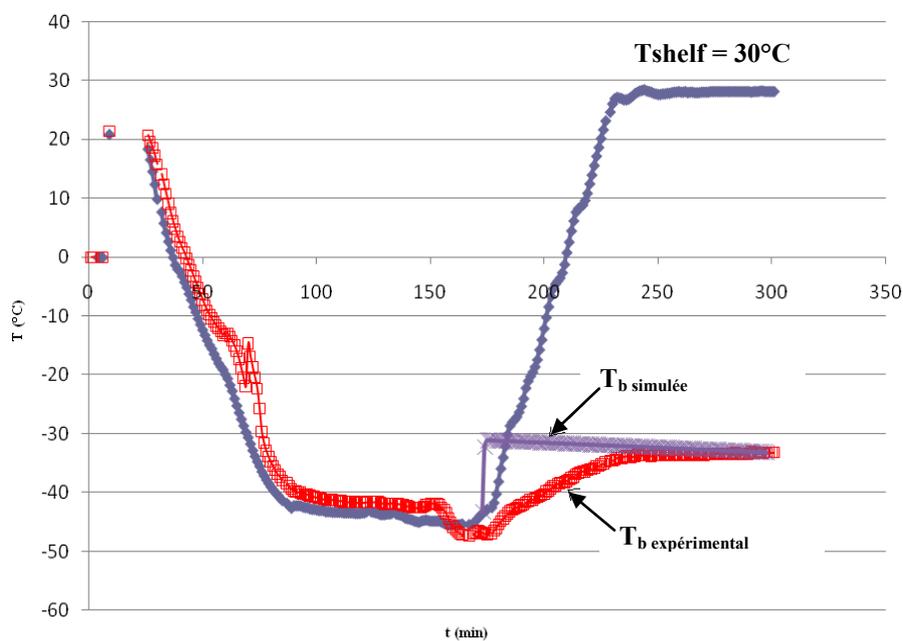


Figure 4-15 : Variation de la température au fond du flacon, T_b , de l'eutectique A simulée et expérimentale en fonction du temps. Sublimation $T_{shelf} = 30^\circ\text{C}$ et $P_c = 6 \text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

4.2.6.2 Validation du modèle pour $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et différentes valeurs de P_c .

Afin de valider définitivement l'hypothèse d'un écart initial $\Delta T = 2,5^{\circ}\text{C}$ presque constant quelles que soient les conditions opératoires dans les gammes de température d'étagère et de pression totale de la chambre utilisées pour la construction du Design Space, nous avons également simulé la sublimation de l'eutectique A en fixant la température de l'étagère à $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et en faisant varier la pression de la chambre. Nous reportons sur le tableau 4.4 ci-dessous les valeurs des propriétés thermodynamiques nécessaires à ces calculs.

| P_c (Pa) | 6 | 15 | 20 | 50 |
|--|--------|-------|-------|-------|
| K_v ($\text{W}/\text{m}^2 \text{K}$) | 23,7 | 27,23 | 33,04 | 44,2 |
| T_b mesurée | 236,95 | 238,5 | 239,5 | 245,5 |
| T_{eq} (K) calculée | 234,45 | 236 | 237 | 243 |

Tableau 4.4 : Propriétés thermodynamiques de l'eutectique A. Sublimation $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$. $\Delta T = 2,5^{\circ}\text{C}$. Flacon en verre de 4mL.

Comme au paragraphe précédent, les résultats expérimentaux décrivant l'avancement du front de sublimation (cf figure 4-16) et ceux décrivant la variation de la température T_b (cf figures 4-17 et 4-18) sont en parfait accord avec les résultats obtenus expérimentalement. On peut alors en conclure que la formulation à base d'eutectique A pur du fait de la limitation de la vitesse de sublimation par le transfert de chaleur correspond à l'écart de température $\Delta T = 2,5^{\circ}\text{C}$ quelles que soient les conditions opératoires T_{shelf} et P_c retenues.

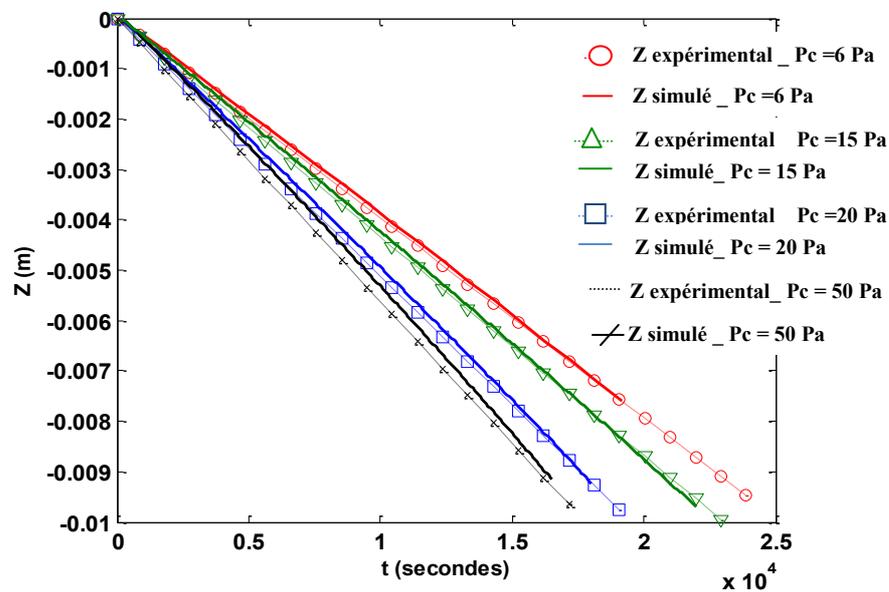


Figure 4-16 : Position du front de sublimation, notée Z, simulée et expérimentale pour $T_{shelf} = 0^{\circ}\text{C}$ et pour différentes valeurs de P_c . Flacon en verre de 4mL.

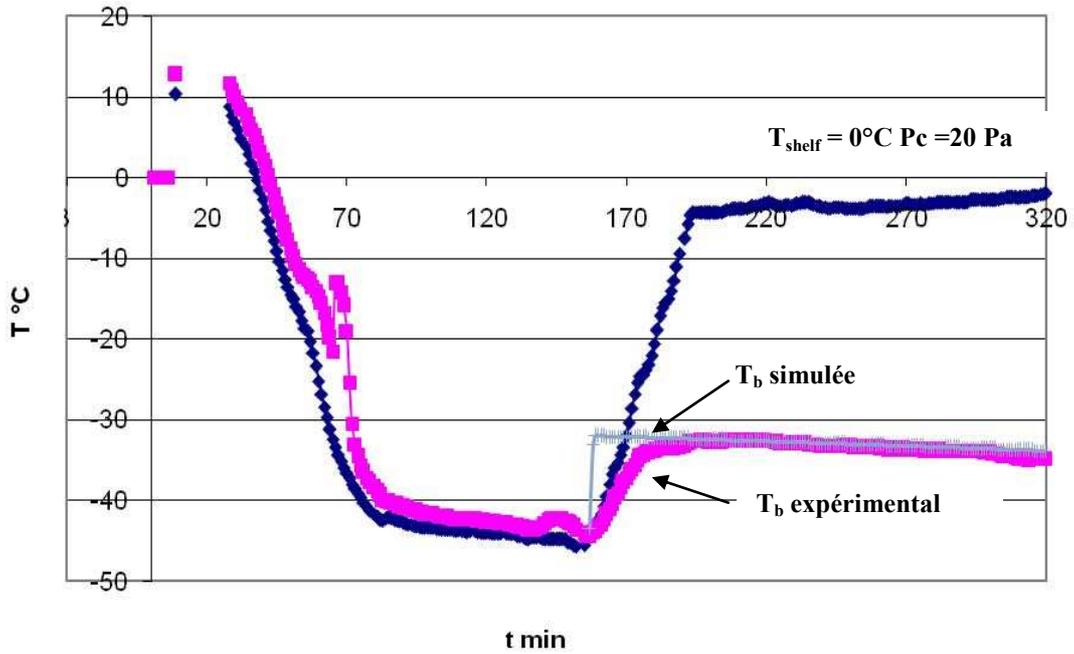


Figure 4-17 : Variation de la température au fond du flacon, T_b , pour l'eutectique A simulée et expérimentale en fonction du temps. Sublimation $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 20\text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

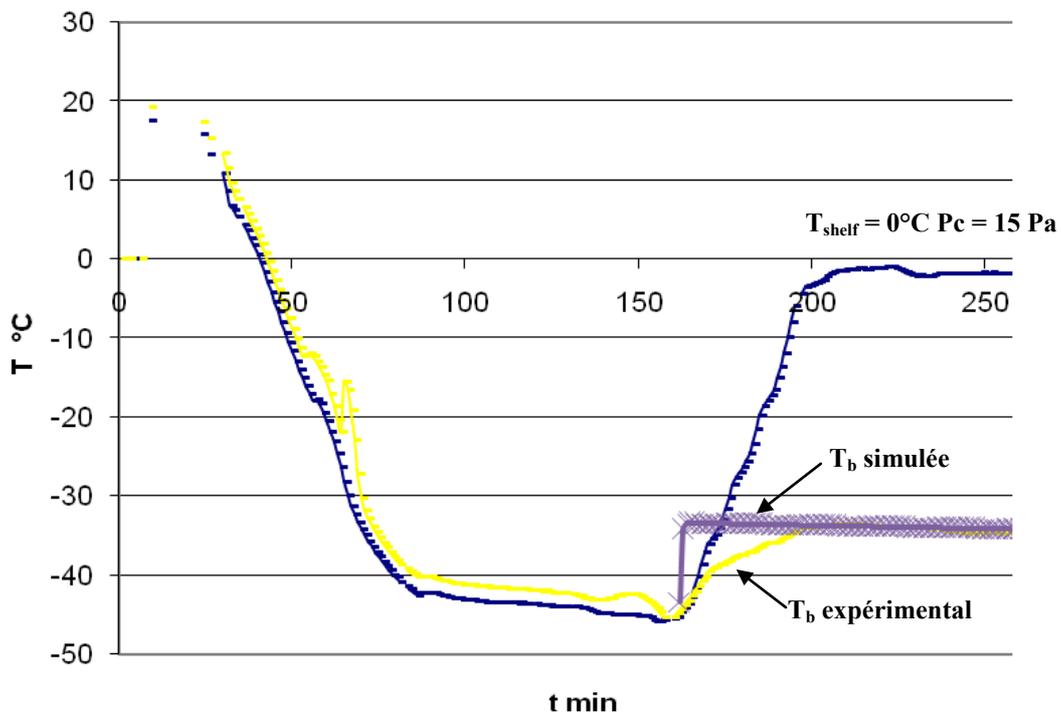


Figure 4-18 : Variation de la température au fond du flacon, T_b , pour l'eutectique A simulée et expérimentale en fonction du temps. Sublimation $T_{shelf} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 15\text{ Pa}$. Flacon en verre de 4mL.

4.2.6.3 Influence de la valeur de l'écart de température initial ΔT sur la vitesse du front de sublimation.

Afin de mettre en évidence l'importance d'une estimation correcte de la valeur de l'écart de température ΔT et, par conséquent, de la température du front de sublimation T_{eq} sur la vitesse de sublimation, nous avons effectué une étude de sensibilité paramétrique qui a consisté à déterminer par simulation la position du front de sublimation notée Z . La simulation a été effectuée pour les conditions opératoires de sublimation suivantes : $T_{\text{shelf}} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 15 \text{ Pa}$.

Les résultats regroupés sur la figure 4-19 montrent que plus la valeur de ΔT est élevée plus la vitesse de sublimation est rapide. Par ailleurs, on observe sur cette figure que la valeur de l'écart de température ΔT influence la qualité de prédiction du modèle, l'adéquation entre valeurs expérimentales et calculées étant maximale pour $\Delta T = 2,5^\circ\text{C}$. Cette valeur est la seule valeur qui permet un excellent accord entre résultats expérimentaux et résultats prédits par le modèle.

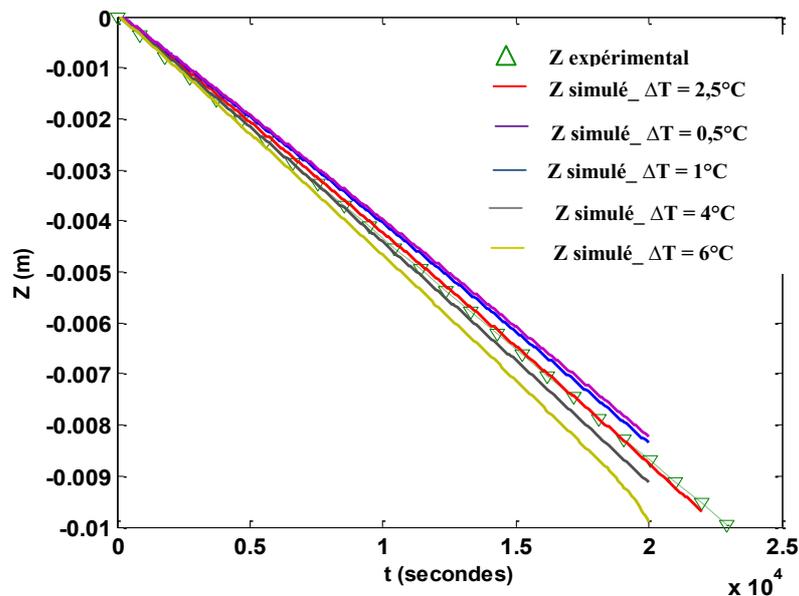


Figure 4-19 : Position du front de sublimation, notée Z , simulée et expérimentale pour $T_{\text{shelf}} = 0^\circ\text{C}$ et $P_c = 15 \text{ Pa}$. Influence de l'écart de température initial dans la couche congelée. $\Delta T = 0,5^\circ\text{C}; 1^\circ\text{C}; 2,5^\circ\text{C}; 4^\circ\text{C}$ et 6°C . Flacon en verre de 4mL.

4.3 Conclusions

Dans la dernière partie du mémoire, nous avons **modélisé** sous **Comsol** l'étape de **sublimation** d'une formulation à base aqueuse et à base de co-solvant organique contenue dans un flacon en verre de 4mL. Ce modèle physique de sublimation était basé sur l'hypothèse d'une limitation de la sublimation par le transfert thermique. Il nous a permis d'estimer et de visualiser l'avancement du front de sublimation en fonction du temps pour les conditions opératoires T_{shelf} et P_c fixées et de prédire la durée de la sublimation. Les cinétiques de sublimation obtenues à l'aide ce modèle sont en parfait accord avec les résultats

expérimentaux correspondant aux mêmes conditions opératoires. Ce modèle et cette validation ont été réalisés pour plusieurs conditions opératoires de sublimation telles que les conditions utilisées pour la lyophilisation de produits pharmaceutiques très sensibles (vaccins, levures ect..) correspondant à de très faibles pressions et de très basses températures de produit.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail de thèse était l'étude expérimentale et l'optimisation du procédé de lyophilisation de principes pharmaceutiques actifs formulés à partir de bases aqueuses et à partir de bases de co-solvant organiques. Les principaux résultats de ce travail sont rassemblés dans un mémoire divisé en trois grandes parties.

Dans la première partie, nous avons rassemblé les résultats originaux des déterminations expérimentales des valeurs des pressions de vapeur d'équilibre et des enthalpies de sublimation du TBA pur et du mélange eutectique B, solvants avantageusement utilisés comme solvant ou co-solvant organique pour la lyophilisation de plusieurs principes actifs. Cette détermination expérimentale de ces données thermodynamiques clefs pour la modélisation et inexistantes dans la littérature a été effectuée par deux méthodes différentes : la méthode thermogravimétrique et la méthode statique. L'implémentation de la **méthode thermogravimétrique** comme un outil **rapide et précis** de détermination des **pressions de vapeur** (système solide/vapeur et liquide/vapeur) des **corps organiques purs** congelés a été validée avec le tert-butanol (TBA) pur. Puis l'utilisation de cette méthode a été étendue avec succès au **mélange eutectique B**. Les données thermodynamiques ainsi déterminées ont permis d'expliquer certains résultats des travaux de thèse de Rim Daoussi (2009). Ainsi, l'utilisation du TBA comme co-solvant organique permet une diminution considérable des temps de séchage comparée à une formulation purement à base aqueuse. Ceci s'explique par le fait que le TBA pur et l'eutectique B - 90% de TBA + 10% d'eau (% massique) - **présentent des pressions de vapeur d'équilibres plus élevées et des enthalpies de sublimation beaucoup plus faibles que glace pure**. De plus, ces mêmes travaux de thèse de Rim Daoussi (2009), avaient montré que la formulation à la composition eutectique B permettait d'obtenir des cinétiques de sublimation plus élevées que la formulation à base de TBA pur. Ces observations s'expliquent par le fait que le **mélange eutectique B présente des valeurs de pressions de vapeur deux fois plus élevées que celles du TBA pur ce qui augmente nettement la force motrice du processus de sublimation**. Il en résulte donc un avantage certain quant à l'utilisation du mélange TBA + eau à la composition eutectique B, comme solvant principal de la formulation de plusieurs principes actifs.

Dans la deuxième partie du mémoire, l'étude comparative de la lyophilisation des deux formulations à base aqueuse et à base organique de notre principe actif modèle, à savoir, l'ibuprofène, nous a renseigné sur les avantages offerts par l'utilisation de mélanges à base de co-solvants organiques. Dans un premier temps, cette étude a montré que le TBA permettait une augmentation de la solubilité de l'ibuprofène ainsi qu'une augmentation de la **facilité de préparation** de la formulation notamment en raison de la disparition de la mousse qui apparaît avec des formulations à base aqueuse. Cette étude nous a aussi confirmé que l'emploi du TBA dans une moindre quantité en tant que co-solvant organique permettait dans les mêmes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c), de réduire les temps de sublimation d'un facteur 1,8. Nous en avons conclu que cette augmentation des cinétiques de sublimation résultait des caractéristiques particulières des propriétés thermodynamiques du mélange eutectique 20% en TBA + 80% en eau (% massique), **à savoir des valeurs plus élevées de la pression de**

vapeur à l'équilibre solide-vapeur et d'une valeur de l'enthalpie de sublimation **plus faible que celle de glace**. Par ailleurs, la caractérisation de la taille des cristaux de solvant a mis en évidence que la formulation à base organique présentait une taille moyenne des cristaux de solvant plus élevée que celle des cristaux de glace de la formulation à base aqueuse. Par conséquent, la formulation à base organique a montré des valeurs de la **résistance au transfert de masse** de la vapeur de solvant (eau + TBA) **plus faibles** que celle de la formulation à base aqueuse ce qui participe à l'augmentation des cinétiques de séchages lorsque le TBA est utilisé comme co-solvant organique.

L'étude de caractérisation finale a mis en évidence que les deux formulations étudiées menaient à des lyophilisats qui satisfont aux principaux critères de qualité du lyophilisat sec final à savoir réhydratabilité, humidité finale, collapse, etc. Un **développement industriel** de la formulation à **base organique** apparait donc nettement plus avantageux que la formulation à base aqueuse et semble donc tout à fait envisageable.

Dans la dernière partie du mémoire, nous avons **modélisé** sous **Comsol** l'étape de **sublimation** d'une formulation à base aqueuse et à base de co-solvant organique contenue dans un flacon en verre de 4mL. Ce modèle physique de sublimation était basé sur l'hypothèse d'une limitation de la sublimation par le transfert thermique. Il nous a permis d'estimer et de visualiser l'avancement du front de sublimation en fonction du temps pour les conditions opératoires T_{shelf} et P_c fixées et de prédire la durée de la sublimation. Les cinétiques de sublimation obtenues par ce modèle **sont en parfait accord avec les résultats expérimentaux obtenues dans les mêmes conditions opératoires**.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

Anchordoquy T.J., Carpenter J.F. *Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state.* Arch. Biochem. Biophys., Vol. 332, pp. 231-238 (1996).

Arakawa T., Kenney W.C., Prestreski S.J., Carpenter J.F. *Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins,* Advanced Drug delivery Review, 10, p 1-28 (1993).

Baldi G., Gasco M., Pattarino F. *Statistical procedures for optimizing the freeze-drying of a model drug in tert-butyl alcohol-water mixtures.* Eur J Pharm Biopharm 40, p 138-141 (1994).

Bai S.J., Nayar R., Carpenter J.F., Manning M.C. *Non invasive secondary structure determination of lyophilized proteins by near infrared spectroscopy,* Freeze drying of pharmaceuticals and biologicals, Breckenridge (2004).

Baker, D.S. Unpublished results (1998).

Bardat A., Briguet J., Chatenet E., Courteille F. *Moisture measurement: a new method for monitoring freeze-drying cycles,* Journal of Parenteral Science and Technology, 47, 6, p 293-299 (1993).

Blond G. *Optimisation de la stabilité des produits congelés en vue de leur conservation ou de leur lyophilisation,* cahier de l'ASFIA n° 18, p 27 (2000).

Brülls M., Rasmuson A. *Heat transfer in vial lyophilization.* Int. J. of Pharm., Vol. 246, pp. 1-16 (2002).

Brülls M., Folestad S., Sparen A., Rasmuson A. *In-Situ Near - Infrared Spectroscopy Monitoring of the Lyophilization Process.* Pharm. Res., Vol. 20, No. 3, pp. 494-499 (2003).

Brülls M., Rasmuson A. *Ice Sublimation in Vial. Lyophilization.* Drying Technology, 27:5, 695 -706 (2009).

Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* Goodman and Gilman's, 11th ed. McGraw-Hill, New York. (2006)

Carpenter J.F., Prestreski S.J., Arakawa T. *Factors affecting short term and long term stabilities of proteins,* Advanced Drug Delivery Review, 10, p 1-28 (1993).

Chouvenc P. *Optimisation du procédé de lyophilisation du complexe lipoprotéique DC-Chol/Uréase.* PhD Université Claude Bernard Lyon 1 (2004).

Chouvenc P., Vessot S., Andrieu J., Vacus P. *Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis,* Drying technology, 22, 7, p 1577-1601 (2004).

Corveleyn S., Remon J.P. *Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilization closures,* International Journal of Pharmaceutics, 159, p 57-65 (1997).

Cise M.D., Roy M.L. *Improvements in or relating to freeze-drying cephalothin sodium.* British Patent 1,589,317, May 13 (1981).

Daoussi R. *Etude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation d'un principe actif pharmaceutique en milieu organique.* PhD Université Claude Bernard Lyon 1 (2008).

Daoussi R., Vessot S., Andrieu J., Monnier Olivier. *Sublimation kinetics and sublimation end-point times during freeze-drying of pharmaceutical active principle with organic co-solvent formulations.* IChemE, 87, p 899-907 (2009).

Daoussi R., Bogdani E., Vessot S., Andrieu J., Monnier Olivier. *Freeze-Drying of an Active Principle Ingredient by Using Organic Co-solvent Formulations. Influence of Freezing Conditions and Formulation on Solvent Crystals Morphology, on Thermodynamics Data and on Sublimation Kinetics.* Drying Technology (accepted) (2011).

Daudon, J.L. *Thermogravimétrie.* Techniques de l'ingénieur. P1260, pp 1-21 (2001).

DeLuca P.P., Kamat M.S., Koida Y. *Acceleration of freeze-drying cycles of aqueous solutions of lactose and sucrose with tertiary butyl alcohol.* Congr Int Technol Pharm, 5th, p 439-447, (1989a).

DeLuca P.P., Kanke M., Sato T. *Porous microspheres for drug delivery and methods for make same.* United States Patent 4,818,542, April 4 (1989b).

Desai U.R., Klibanov A.M. *Assessing the structural integrity of lyophilized protein in organic solvents.* J Am Chem Soc 14, p 3940-3945 (1995).

Elder J.P. J. Therm. Anal. 49 897 (1997).

Elgindy N., Elkhodairy K., Abdallah Molokhia A., Elzoghby A. *Lyophilization monophasic solution technique for improvement of the physicochemical properties of an anticancer drug, flutamide.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 74, p 397-405 (2010).

Egawa H., Maeda S., Yonemochi E., Oguchi T., Yamamoto K., and Nakai Y. *Solubility parameter and dissolution behaviour of cefalexin powders with different crystallinity.* Chem. Pharm. Bull. 40 pp. 819-820 (1992).

Fonseca F., Obert J.P., Beal C., Marin M. *State diagram and sorption isotherms bacterial suspensions and fermented medium,* Thermochimica Acta, 366, p 167-182 (2001).

Franks F. *Properties of water in food.* Martinus Nijhoff, Dordrecht, p 497 (1985)

Franks F. *Freeze-drying: from empiricism to predictability.* Cryo-Letters 11, pp. 93-110 (1990).

Gieseler H. *Product Morphology and Drying Behavior delineated by a new Freeze-Drying Microbalance.* PhD Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (2004)

- Gieseler H., Kessler W.J., Fonson M., Davis S.J., Mulhall P.A., Bons V., Debo D.J., Pikal M.J.** *Evaluation of tunable diode laser absorption spectroscopy for in-process water vapor mass flux measurements during freeze drying.* J Pharm Sci. 96 : 1776–93. (2007).
- Gomez G., Pikal M.J., Rodriguez-Hornedo N.** *Effect of Initial Buffer Composition on pH Changes During Far-From- Equilibrium Freezing of Sodium Phosphate Buffer Solutions.* Pharm. Res., Vol. 18, No. 1, pp. 90-97 (2001).
- Gmehling J., Onken U., Arlt W., Grenzheuser P., Weidlich U., Kolbe B., Rarey J. (1991).** DECHEMA Chemistry Data Series, Vapor-Liquid Equilibrium Data Collection. Part 1: Aqueous-Organic Systems. Vol., 1, pp. 340-343.
- Green J.L., Angell C.A.** *Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly,* Journal of Physical Chemistry, 93, p 2880-2882 (1989).
- Grenet G., Legedre B.** *Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC).* Techniques de l'ingénieur P1205 (2010).
- Grenet G., Legedre B.** *Analyse calorimétrique différentielle à balayage à température modulée (DSC-TM).* Techniques de l'ingénieur P1206 (2011).
- Guggenheim E.A.** *Applications of statistical mechanisms,* Clarendon press. (Edition 1992) (1966).
- Guckel W., Synnatschke G., Rittig R.** Pesticide Sci. 45 (1995) 27 (1995).
- Hasegawa K., Hashi K., Okada R.** *Physiochemical stability of pharmaceutical phosphate buffer solutions I - complexation behaviour of Ca(II) with additives in phosphate buffer solutions.* J Parenter Sci Technol 36, p 128-133 (1982a).
- Hasegawa K., Hashi K., Okada R.** *Physiochemical stability of pharmaceutical phosphate buffer solutions II - complexation behaviour of Al(III) with additives in phosphate buffer solutions.* J Parenter Sci Technol 36, p 168-173 (1982b).
- Hasegawa K., Hashi K., Okada R.** *Physiochemical stability of pharmaceutical phosphate buffer solutions IV - prevention of precipitation in parenteral phosphate buffer solutions.* J Parenter Sci Technol 36, p 210-215 (1982c).
- Hasegawa K., Hashi K., Okada R.** *Physiochemical stability of pharmaceutical phosphate buffer solutions V - precipitation behaviour in phosphate buffer solution.* J Parenter Sci Technol 37, p 38-45 (1983).
- Higgins J.D., Gilmore T.P., Martelluci S.A., Bruce R.D., Brittain H.G.** *Ibuprofen.* Analytical Profiles of Drug Substances and Exipients, 27, 301-338. (2001).
- Hottot A.** *Etude expérimentale et modélisation de la lyophilisation des protéines bactériennes.* PhD Université Claude Bernard Lyon 1 (2002).

Hottot A., Vessot S., Andrieu J. *Determination of mass and heat transfer during freeze drying cycles of pharmaceutical products*, Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 59, 138-153 (2005).

Hottot A., Peczalski R., Vessot S., Andrieu J. *Freeze-drying of pharmaceuticals proteins in vials: modelling of freezing and sublimation steps*, Drying Technology, 24:5, 561-570 (2007).

Hsu C.C., Walsh A.J., Nguyen H.M., Overcashier D.E., Koning- Bastiaan H., Bailey R.C., Nail S.L. *Design and Application of a Low-Temperature Peltier-Cooling Microscope Stage*. J. Pharm. Sci., Vol. 85, No. 1, pp. 70-74 (1996).

Hubbard W.K. *International Conference on Harmonization; guidance on impurities: residual solvents*. Federal Register 62(247), p 67377-67388, December 24 (1997).

Imaizumi H., Nambu N., Nagai T. *Stability and several physical properties of amorphous and crystalline form of indomethacin*. Chem. Pharm. Bull. 2565-9 (1980).

Inoue A., Horikoshi K. *A Pseudomonas thrives in high concentrations of toluene*. Nature 338, p 264-266, (1989).

Jennings T.A. *Lyophilization introduction and basic principles*, Ed: interpharm/CRC (1999).

Jones J.A., Last I.R., MacDonald B.F., Prebble K.A. *Development and transferability of near-infra-red methods for determination of moisture in a freeze dried injection product*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 11, 11/12, p 1227-1231 (1993).

Jose J., Sawaya T., Mokbel I., Ainous N., Rauzy E., Berro C. *Experimental vapour pressures of six n-alkanes (C21, C23, C25, C27, C29, C30) in the temperature range between 350 K and 460 K*. J. Chem. Eng. Data. 51, 854-858 (2006).

Jose J., Sarrautea S., Mokbel I., Gomesa M.F.C., Majera V. *Atmosphere/water partition of halocyclohexanes from vapour pressure and solubility data*. Atmos. Environ. Vol.42, 19, 4724-4734 (2008).

Jose J., Razzouka A., Hajjaji A., Mokbel I., Mougine P. *Experimental vapor pressures of 1,2 bis(dimethylamino) ethane, 1-methylmorpholine, 1,2bis(2aminoethoxy)ethane and N benzylethanolamine between 273.18 and 364.97K*. Fluid Phase Equilib. 282, 11-13 (2009).

Karel M., Anglea S., Buera P., Karmas R. *Stability-related transitions of amorphous foods*, Thermochimica acta, 246, p 249-269 (1994).

Kasraian K. *The utilization of tertiary butylalcohol (TBA) as a mass transfer accelerator in lyophilization*. Diss Abstr Int B 54, p35-70 (1994).

Kasraian K., DeLuca P.P. *Thermal analysis of the tertiary butyl alcohol-water system and its implications on freeze-drying*. Pharm Res 12, p 484-490 (1995a).

Kasraian K., DeLuca P.P. *Effect of tert-butyl alcohol on the resistance of the dry product layer during primary drying*. Pharm Res 12, p 491-495 (1995b).

King C.J. *Freeze drying of foods*. CRC Press, p 86 (1971).

Knopp S.A., Nail S.L. *The relationship between the TDMSC curve of frozen sucrose solutions and collapse during freeze-drying*, Journal of Thermal Analysis, 54, p 659-67 (1998).

Knovel Critical Tables 2nd Edition, *Calculated vapor pressures of organic compounds*. (2008a) Available from Internet: <http://www.knovel.com>.

Knovel Critical Tables 2nd Edition *Physical constants and thermodynamics of phase transitions*. (2008b). Available from Internet: <http://www.knovel.com>.

Knovel Critical Tables 2nd Edition, *Calculated vapor pressures of inorganic compounds*. (2008c) Available from Internet: <http://www.knovel.com>.

Koyama Y., Kamat M., De Angelis R.J., Srinivasan R., DeLuca P.P. *Effect of solvent addition and thermal treatment on freeze drying of cefazolin sodium*. J Parenter Sci Technol 42(2):47-52 (1988).

Krohl T., Kastel R., Konig W., Ziegler H., Kohl H., Parg A. Pesticide Sci. 53 (4) 300 (1998).

Kuu W.Y., Hardwick L.M., Akers L.J. *Rapid determination of dry layer mass transfer resistance for various pharmaceutical formulations during primary drying using product temperature profiles*. International Journal of Pharmaceutics 313 (2006) 99–113 (2006).

Langmuir, I. *The Vapor Phase Pressure of Metallic Tungsten*. Phys. Rev. N.S 2, pp.329-342 (1913).

Le Neindre B. *Conductivité thermique des liquides et des gaz*. Techniques de l'ingénieur K427-2 (2008).

Liapis A.I., Sheehan. *Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: Numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies*. John Wiley & Sons, Inc. Biotechnol Bioeng. 60, 712–728 (1998).

May J.C., Grim E., Wheeler R.M., West J., *Determination of residual moisture in freeze-dried viral vaccines: Karl fisher, Gravimetric and thermogravimetric methodologies*, Journal of biological Standardization, 10, p 249-259 (1982).

Marin M., René F. *Lyophilisation*. Techniques de l'ingénieur, document F3 240. (2008)

Mellor J.D. *Fundamentals of freeze drying*. Academic press, London p 373 (1978).

Mehlich D.R, Ardia A, Pallotta T. *A Controlled Comparative Study of Ibuprofen Arginate versus Conventional Ibuprofen in the Treatment of Postoperative Dental Pain*, J Clin Pharmacol, 42, 904-911 (2002).

Milton N., Pikal M.J., Roy M.L., Nail S.L. *Evaluation of manometric measurement as a method of monitoring product temperature during lyophilization*, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 51, 1, p 7-16 (1997).

Mootz D., Staben D. *Die hydrate von tert-Butanol: Kristallstruktur von Me₃COH.2H₂O und Me₃COH.7H₂O*. Journal of Chemical Sciences. 48; 1325-1330 (1993).

Mullins J., Macek T.J. *Some pharmaceutical properties of Novobiocin*. Journal of the American Pharmaceutical Association, (46(4)), pp. 245-248 (1960).

Nail S.L. *Methodology for in process determination of residual water in freeze-drying products*. Development in Biological Standardization, 74, p 137-151 (1991).

Nail S., Gatlin L. *Freeze Drying: Principles and practice*. In: Avis A, Liebermann A, Lachmann L, editors. Pharmaceutical dosage forms, Vol. 2. Marcel Dekker, New York, pp. 163-333 (1993)

Nail S. *Experience with tunable diode laser absorption spectroscopy at laboratory and production scale*. In freeze-drying of pharmaceuticals and biological conference documentation, Garmisch-Partenkirchen, pp 357-381 (2010).

Nakagawa K., Hottot A., Vessot S., Andrieu J. *Influence of controlled nucleation by ultrasounds on ice morphology of frozen formulations for pharmaceuticals proteins freeze-drying*. Chemical Engineering and Processing, Vol45, 783-570 (2006).

Nema S., Avis K.E. *Freeze-thaw studies of model protein, lactate deshydrogenase, in the presence of cryoprotectants*, Journal of Parenteral Science and Technology, 47, p 76-83 (1993).

Obert J.P. *Modelisation, optimisation et suivie en ligne du procédé de lyophilisation. Application à l'amélioration de la productivité et de la qualité des bacteries lactiques lyophilisées*. PhD Thesis .INRA Paris –Grignon (2001).

Oetjen G.W. *Freeze drying*. Wiley- VCH, Weinheim, ISBN: 3-527-29571-2 (1999).

Oetjen G.W., Haseley P. *Freeze drying*. Wiley- VCH,, ISBN: 3-527-30620-X (rel) (2004).

Olsen W.P. *Volatile solvents for drying and microbial kill in the final container a proposal and a review, with emphasis on t-butanol*. Pharm Eng August, p 112-117 (1997).

Paqueton H., Ruste J. *Microscopie électronique à balayage (MEB)*. Techniques de l'ingénieur P865 (2010).

Papon P., Leblond J. *Thermodynamiques des états de la matière*. Hermann, Paris p566 (1990)

Phang P., Dollimore F., Evans S.J. 2002. *A comparative method for developing vapor pressure curves based on evaporation data obtained from a simultaneous TG–DTA unit*. Thermochim. Acta. 392–393, 119–125 (2002).

Perry R.H., Chilton C.H. *Chemical Engineers' Handbook*. Edition McGrawHill. 5th Edition (1973).

Pikal M.J., Roy M.L., Shah S. *Heat and mass transfer in vial freeze drying of pharmaceuticals: Role of the vial*. J. Pharm. Sci., Vol. 73, No. 9, pp. 1224-1237 (1983).

Pikal M.J. *Use of laboratory data in freeze drying process design: Heat and mass transfer coefficients and the computer simulation of freeze drying*. J. Parenter. Sci. Technol., Vol. 39, pp. 115-138 (1985).

Pikal M.J., Shah S. *The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase*. Int. J. Pharm., Vol. 62, pp. 165-186 (1990).

Pikal M.J. *Mechanisms of protein stabilization during freeze drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics*, In Freeze drying of pharmaceuticals and biological products, Rey, May; ed: Marcel Dekker, p.475 (1999 a).

Pikal M.J. *Automated Process Design Through Manometric Temperature measurement: Design of a "Smart Freeze Dryer"*, cours de Purdue university (1999 b).

Pikal M.J. *Freeze Drying*. In: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, New York, pp.1299-1326 (2002)

Pikal M.J. *Heat and Mass Transfer in Low Pressure Gases: Applications to Freeze Drying*. In: Pikal MJ, editor. Freeze Drying of Pharmaceuticals. Lecture script, University of Connecticut, Storrs (2003).

Pinazo A., Puigjamer L., Coderch L., Vinas M. *Butanol resistant mutants of Clostridium acetylbutylicum: isolation and partial characterization*. Microbios 73, p 93-104, (1993).

Price D.M. *Calorimetry of two dispersed dyes using thermogravimetry*. Thermochim. Acta. 315,19-24 (1998).

Price D.M. *Vapour pressure determination by thermogravimetry*. Thermochim. Acta. 367-368, 253-262 (2000).

Rahman M.S. *Toward prediction of porosity in foods during drying: a brief review*, Drying technology, 19, 1, p 1-13 (2001).

Rahman M.S., Sablani S.S. *Pore formation in selected foods as a function of shelf temperature during freeze-drying*, Drying technology, 20, 7, p 1379-1391 (2002).

Rey L. *Progrès récents en lyophilisation*, Ed Hermann, p196 (1962).

Rey L. *Glimpses into the realm of freeze drying; classical issues and new ventures*. Freeze drying of pharmaceutical and biological products. Drugs and the pharmaceutical science, Volume 96, New York, pp 475. (1999).

Rey L., May J.C. *Freeze drying/Lyophilization of pharmaceutical and Biological Products*. Second edition, vol 137, chap 8 pp 239-278 (2004).

Roos Y.H., Karel M. *Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars*. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 7, pp. 49-53 (1993).

Roos Y.H. *Phase transition in food*. Academic Press, pp 362. (1995)

Roth C., Winter G., Lee G. *Continuous Measurement of Drying Rate of Crystalline and Amorphous Systems during Freeze-Drying Using an In Situ Microbalance Technique*. *J. Pharm. Sci.*, Vol. 90, No. 9, pp. 1345-1355 (2001).

Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L. *Effect of species, processing conditions and phosphate buffer composition on IgG aggregation during lyophilization*. *Pharm. Sci.*, Vol. 1, p. 545 (1998).

Structure of products prepared by freeze-drying solutions containing organic solvents. J Parenter Sci Technol 39 (4):161-179 (1985).

Seager H., Taskis C.B., Syrop M., Lee T.J. *Freeze drying parenterals containing organic solvent - Part 1*. *Manuf Chem Aerosol News* 49, p 43-44, 47-48 (1978).

Seager H. *Freeze drying parenterals containing organic solvent - Part 2*. *Manuf Chem Aerosol News* 49, p 59-60,64 (1978).

Seager H. *Freeze drying parenterals containing organic solvent - Part 3*. *Manuf Chem Aerosol News* 50 p 40, 42-45 (1979a).

Seager H. *Freeze drying parenterals containing organic solvent - Part 4*. *Manuf Chem Aerosol News* 50, p41-42, 44-45, 48 (1979b).

Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. *The Ice Nucleation Temperature Determines the Primary Drying Rate of Lyophilization for Samples Frozen on a Temperature-Controlled Shelf*. *J. Pharm. Sci.*, Vol. 90, No. 7, pp. 860-871 (2001).

Sheehan P., Liapsis A.I. *Modeling of the primary and secondary stages of freeze-drying of pharmaceutical products in vials*. *Biotechnology and Bioengineering* 60 : 712-728. (1998).

Sorokina T.V., D. Dollimore D., Alexander K. *Thermochim. Acta* 292–293 (2001) 251 (2001).

Stroppolo F., Bodaneo V., Gazzaniga A. *Process of preparation of salt of ibuprofen*. US Patent 5.463.117 (1995).

Surov O.V. *Thermogravimetric method used to determine the saturated vapor pressure in a wide range of values*. *Russ. J. Appl. Chem.* 82, 44-47 (2009).

Sun W.Q. *Temperature and viscosity for structural collapse and crystallization of amorphous carbohydrate solutions*. *Cryo-Letters*, Vol. 18, pp. 99-106 (1997).

Tanaka K., Takeda T., Miyajima K. *Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase by freeze drying.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 39, p 1091-1094 (1991).

Tang X., Pikal M.J. *Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice.* Pharm. Res., Vol. 21, No. 2, pp. 191-200 (2004).

Teagarden D.L., Petre W.J., Gold P.M. *Stabilized prostaglandin.* El' United States Patent 5,741,523, April21 (1998a).

Teagarden D.L., Petre W.J., Gold P.M. *Method for preparing stabilized prostaglandin.* El United States Patent 5,770,230, June 23 (1998b).

Teagarden D.L., Baker D.S. *Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems.* Eur. J. Pharm. Sci. 15, 115-133 (2001).

Tranchant J. *Chromatographie en phase gazeuse (CPG).* Techniques de l'ingénieur P1485 (1996).

Verdonck E., Schaap K., Thomas L.C. *A discussion of the principles and applications of modulated temperature DSC (MTDSC),* International Journal of Pharmaceutics, 192, p 3-20 (1999).

Wallhausser K.H. *Appendix B. Antimicrobial preservation used by the cosmetic industry.* In: JJ Kabara, ed. Cosmetic and Drug Preservation. New York: Marcel Dekker, pp 605-745 (1984).

Wang Y.L., Han B.X., Yan H.K., Liu R.L. *Vapour pressures of binary mixtures of t-butyl alcohol and water.* Thermochim. Acta. 244, 243-247(1994).

Wang W. *Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.* Int. J. of Pharmaceutics, Vol. 203, pp. 1-60 (2000).

Willemer H. *Low temperature freeze drying of aqueous and non-aqueous solutions using liquid nitrogen.* In: SA Goldblith, L Rey, WW Rothmayr, eds. Freeze Drying and Advance Food Technology. New York: Academic Press, pp 461-477 (1975).

Wright E., Gibert H., Rodolphe G. *Vacuum freeze-drying kinetics and modelling of a liquid in a vial.* Chemical Engineering Process. 25, 153–158 (1989).

Wolff S.F., Dollimore D., Dunn J.G., Alexander, K. *Determination of vapour pressure curves of adipic acid and thriethanolamine using thermogravimetric analysis.* Thermochim. Acta. 421, 25–30 (2004).

Zhang Y., Deng Y., Wang X., Xu J., Li Z. *Conformational and bioactivity analysis of insulin: Freeze-drying TBA/water co-solvent system in the presence of surfactant and sugar.* International Journal of Pharmaceutics 371, p 71–81 (2009).

Annexe 1

| | Tert-butanol (TBA) | 2-propanol |
|---|--|--|
| Formule brute | $C_4H_{10}O$ | <u>C_3H_8O</u> |
| Masse molaire (kg/kmol) | 74,1216 | 60,095 |
| T° fusion (°C) | 24-25 | -88,5 |
| T° ébullition (°C) | 83°C | 82,5 |
| Masse volumique (kg/m ³) | 800 | 785,05 |
| Limites d'explosivité dans l'air (%vol) | 2,4–8,0 | - |
| Equation de Kierchoff et Riedel T (K), P (Pa) | Modifiée (Eq 2.1) A =172,3 ; B = -11590 ; D =1,37⊙10 ⁻⁵ ; F = 2; C = 22,118; | Originale P=exp(76.964+(-7623.8/T)+ (-7.4924*ln(T))+ (5.9436E-18*(T^(6))) |

Données physico-chimiques et thermodynamiques du TBA et du 2-propanol pur.

Annexe 2

| | TBA (liquide) | TBA (solide) | Eutectique B (liquide) | Eutectique B (solide) |
|--------------------------------|------------------|-----------------|------------------------------|-----------------------------|
| $\Delta H / R$ (K) | -5583,5 | -6400,9 | -5364,8 | -6276,5 |
| B (Pa) | 27,295 | 30,037 | 26,833 | 30,233 |
| Plage de Température (K) | 298-500 | 229-298 | 268-344 | 227-268 |

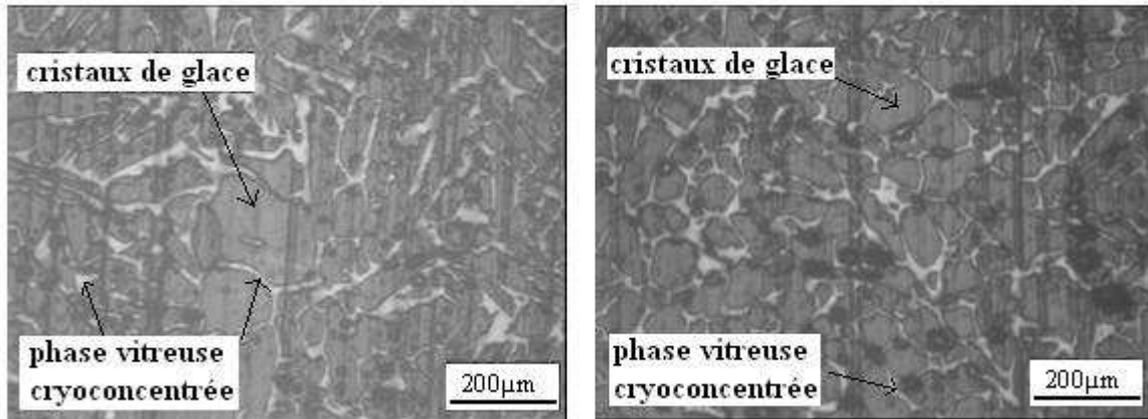
Coefficients expérimentaux de l'équation de Clausius-Clapeyron Eq.(2-9) du TBA pur et du mélange eutectique B.

Annexe 3

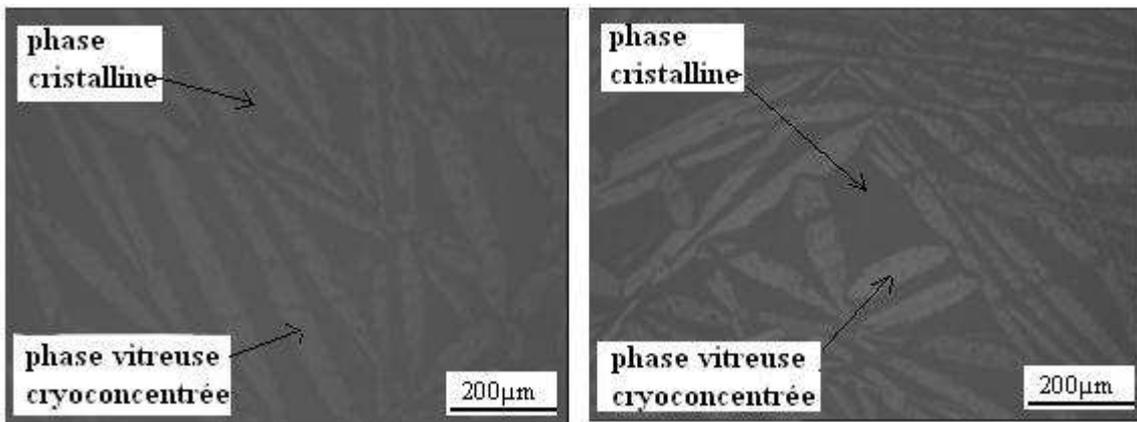
| | Eutectique A (liquide) | Eutectique A (solide) |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| $\Delta H / R$ (K) | -5942 | -5745,9 |
| B (Pa) | 28,58 | 27,909 |
| Plage de Température (K) | 264-321 | 233-264 |

Coefficients expérimentaux de l'équation de Clausius-Clapeyron Eq.(2-9) du mélange eutectique A.

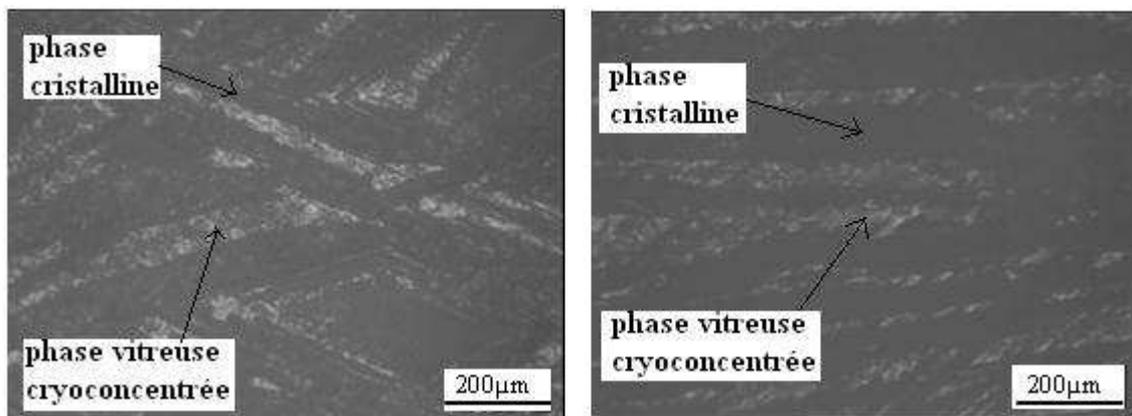
Annexe 4



Microscopie en chambre froide : Formulation d'ibuprofène à base aqueuse ; vitesse de congélation de 1°C/min



Microscopie en chambre froide : Formulation d'ibuprofène à base organique ; vitesse de congélation 0,1°C/min.



Microscopie en chambre froide : Formulation d'ibuprofène à base organique ; vitesse de congélation 1°C/min.

Annexe 5

Programme Matlab pour la résolution de l'équation 3-4

```
%prog eni

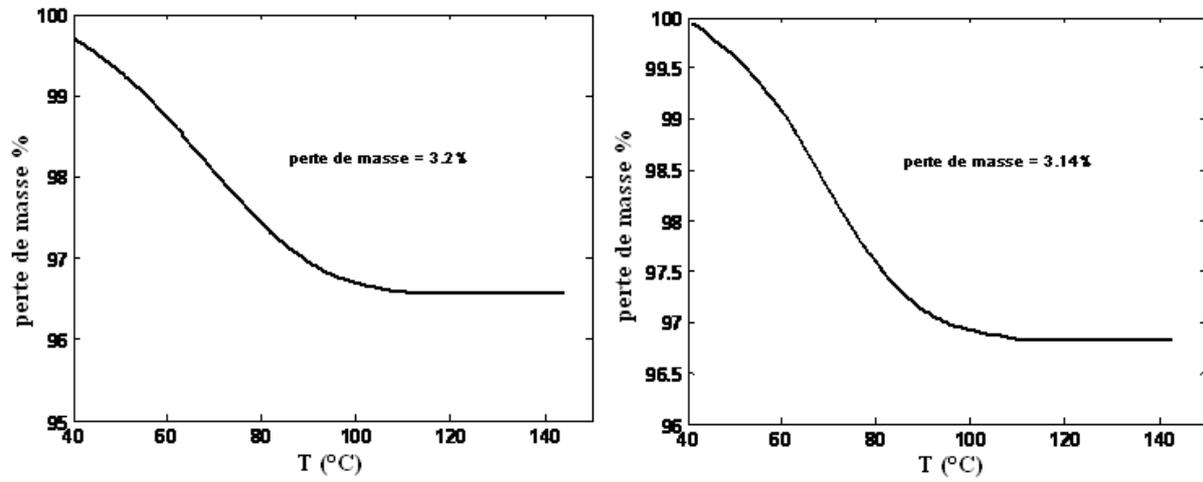
clear all
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%def variable connu
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
dhs=2352e3;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
ap=0.000176625;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
A=-5745.9;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
B=27.909;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
pc=50;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
kv=43.46;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
av=2e-4;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
ts=30+273.15;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
rp=2.71e5;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%Recherche solution
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%initialisation
x0=273.15-45;
% x0=0.2;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%nombre itération
si=1000;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%vecteur solution
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%init
savex=zeros(1,si+1);
gs=zeros(1,si+1);
ys=zeros(1,si+1);
savex(1)=x0;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
for i=1:si
    x=x0;
    g(kv*av*(ts-x));
    gs(i+1)=g;
    x1=A/(log(g/(dhs*ap/rp)+pc)-B);
    savex(i+1)=x1;
    x0=x1;
end

plot(savex-273.15)

disp('solution')
savex(end)-273.15
```

Annexe 6



Teneur en eau finale, obtenue par ATG, des lyophilisats formulés à base aqueuse.

Annexe 7

| Géométrie Sous-domaine | Volume m ³ | Surface m ² |
|---------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | $2,01 \cdot 10^{-6}$ | $9,04 \cdot 10^{-4}$ |
| 2 | $3,01 \cdot 10^{-6}$ | $1,15 \cdot 10^{-3}$ |
| 3 | $1,10 \cdot 10^{-6}$ | $6,85 \cdot 10^{-4}$ |

Caractéristiques géométriques du flacon en verre de 4mL

RESUME en français

L'objectif principal de ce travail était l'étude et l'optimisation du procédé de lyophilisation en milieu aqueux et organique de l'ibuprofène. Une étude comparative approfondie a été réalisée à différents stades de la fabrication de l'ibuprofène lyophilisé pour les deux formulations étudiées. Cette étude comparative a été menée sur l'étape de formulation, sur le procédé de lyophilisation (congélation, sublimation, désorption) et sur les propriétés finales du produit (humidité, réhydratabilité, aspect...). On a observé, que l'utilisation comme solvant du mélange eutectique A, correspondant à une composition de 20% en TBA + 80% en eau (% massique), permettait une forte augmentation de la solubilité de l'ibuprofène et conduisait pour les mêmes conditions opératoires (T_{shelf} et P_c), à une augmentation des cinétiques de séchage d'un facteur 1,8, par rapport aux résultats observés avec la formulation d'ibuprofène à base aqueuse. Par ailleurs, la détermination expérimentale des valeurs des pressions de vapeur à l'équilibre solide-vapeur et de l'enthalpie de sublimation a été effectuée par deux méthodes différentes : la méthode thermogravimétrique et la méthode statique. Ces déterminations nous ont permis de conclure que l'augmentation des cinétiques de sublimation résultait essentiellement des valeurs plus élevées de la pression de vapeur à l'équilibre solide-vapeur et d'une valeur plus faible de l'enthalpie de sublimation de l'eutectique A par rapport à la glace. Ces données thermodynamiques ont aussi été utilisées comme paramètres clefs pour la modélisation de l'étape de sublimation sous Comsol Multiphysics. In fine, l'optimisation des paramètres opératoires de l'étape de sublimation par la méthodologie du Design Space a conduit à un lyophilisat final d'ibuprofène formulé à base organique qui satisfait entièrement aux critères standard de qualités recherchés (couleur, aspect, résidus de solvants etc). Un développement industriel de la formulation à base de co-solvant organique apparaît plus avantageux qu'avec la formulation à base aqueuse.

TITRE en anglais: Freeze-drying of ibuprofen by using organic solvent.

RESUME en anglais

The main objective of this work was the study and the optimization of the freeze-drying process of ibuprofen with aqueous and/or organic based formulations. A detailed comparative study was realized at different steps of the ibuprofen freeze-drying process for both types of investigated formulations. This comparative study was realized at the successive stages of freezing, sublimation and desorption and also concerned some properties of the final freeze-dried product (humidity, rehydratability, aspect...). We observed that the use of eutectic A mixture, corresponding to 20 % TBA + 80 % water (mass %) as co-solvent, allowed a strong increase of the solubility of ibuprofen and for the same operating conditions (T_{shelf} and P_c), led to an increase of drying kinetics values by a factor 1.8 by comparison to aqueous based formulations of ibuprofen. Besides, the experimental determination of equilibrium solid-vapour pressure and of sublimation enthalpy values was carried out by using two different methods: the thermogravimetric method and the static method. These determinations allowed to conclude that the increase of sublimation kinetics resulted essentially from the higher equilibrium solid-vapour pressure values and from the lower sublimation enthalpy value of eutectic A by comparison to pure ice values. Next, these thermodynamical data were used as key parameters in the modelling of the sublimation stage under Comsol Multiphysics. In fine, the overall optimization of the operating parameters of sublimation stage was achieved by using the Design Space approach. It proved that the organic based formulation led to final freeze-dried cakes which fulfilled largely the main quality criteria (color, aspect, solvents residues, etc.). Thus, the development of an ibuprofen freeze-drying process with organic based formulation seems more advantageous than an aqueous based formulation process.

DISCIPLINE: Génie des Procédés

MOTS-CLES :

Lyophilisation, ibuprofène, co-solvant organique, sublimation, modélisation.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

LAGEP, CNRS UMR 5007, Université Claude Bernard Lyon 1 bât.318G ESCPE-Lyon, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex.