



HAL
open science

Développement d'une plateforme microfluidique versatile pour l'étude de l'état solide de principes actifs pharmaceutiques.

Guillem Peybernès

► **To cite this version:**

Guillem Peybernès. Développement d'une plateforme microfluidique versatile pour l'étude de l'état solide de principes actifs pharmaceutiques.. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université d'Aix-Marseille, 2019. Français. NNT : . tel-02349617

HAL Id: tel-02349617

<https://theses.hal.science/tel-02349617>

Submitted on 5 Nov 2019

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

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



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

TECHNOLOGIE SERVIER

ECOLE DOCTORALE 352

UFR SCIENCE

CINaM/UMR 7325

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Physique et science de la matière

Guillem Peybernès

Développement d'une plateforme microfluidique versatile pour
l'étude de l'état solide de principes actifs pharmaceutiques.

Soutenue le 11/10/2019 devant le jury :

Fabienne ESPITALIER	IMT-Mines Albi	Rapportrice
Enrique ESPINOSA	Université de Lorraine	Rapporteur
Emilie GAGNIERE	Université de Lyon	Examinatrice
François PUEL	Université Paris Saclay	Examineur
Philippe LETELLIER	Technologie SERVIER	Examineur
Nadine CANDONI	Université d'Aix-Marseille	Directrice de thèse
Stéphane VEESLER	Université d'Aix-Marseille – CNRS	Directeur de thèse
Romain GROSSIER	CINaM-CNRS	Invité

Résumé

Mots-clés: Microfluidique, Solubilité, Polymorphisme, Criblage, Principe actifs.

L'étude de l'état solide d'un principe actif (PA) est une étape cruciale dans le développement d'un médicament. En fonction des conditions de cristallisation, une molécule peut apparaître sous différentes formes ou phases (polymorphes, solvates, sels, co-cristaux, amorphes) ayant chacune des propriétés physico-chimiques qui leur sont propres comme la solubilité, la morphologie, l'hygroscopicité et la stabilité. Le but est donc d'identifier la forme solide permettant d'obtenir les propriétés les plus adaptées et de déterminer ses conditions de cristallisation. Pour cela, un criblage complet est nécessaire. De plus, la nucléation étant un phénomène stochastique, un grand nombre d'expériences doivent être réalisées pour obtenir des données fiables, ce qui entraîne une consommation importante de matière première. Dans ce contexte, des techniques de criblage à haut débit ont été développées. Parmi celles-ci, la microfluidique à base de goutte permet la génération de centaines de gouttes monodispersées (isolées les unes des autres par de l'huile) pouvant être considérées comme des nano-cristallisoirs indépendants (volume de l'ordre de la centaine de nanolitres).

Cette thèse présente le développement d'une plateforme microfluidique pour l'étude de l'état solide de PA. Dans un premier temps, cette plateforme permet de partir directement de la poudre, de la dissoudre dans différents solvants, d'estimer ses solubilités en fonction de la température et de préparer des solutions sursaturées. Puis dans un deuxième temps, le PA est cristallisé dans des gouttes avec différentes conditions expérimentales : compositions chimiques, concentration et température. Enfin, les cristaux obtenus sont caractérisés in situ à l'aide d'un microscope Raman ou par Diffraction des Rayons X. Si nécessaire les cristaux peuvent être récupérés pour des analyses plus précises en ex-situ.

Abstract

Keywords: Microfluidic, Solubility, Polymorphism, Screening, Active Pharmaceutical Ingredient.

The solid state study of an Active Pharmaceutical Ingredient (API) is a critical step in the development of pharmaceuticals. Depending on the crystallization conditions, a molecule can appear in different forms or phases (polymorphs, solvates, salts, co-crystal, amorphous), each of them having significantly different physico-chemical properties such as solubility, crystal habit, hygroscopicity or stability. Then the purpose is to identify the solid form that provides the most appropriate properties and to determine its crystallization conditions. Therefore, a wide screening is necessary. Moreover, due to the stochasticity of the nucleation phenomenon, a large number of experiments is required in order to obtain reliable data which leads to significant consumption of raw material. In this context High Throughput Screening techniques have been developed. Among them, droplet-based microfluidics seems to be promising. Indeed, it allows the generation of hundreds of monodisperse droplets (isolated from each other by oil), each of them being considered as independent nano-crystallizer (volume of about one hundred nanoliter).

This thesis presents the development of a microfluidic platform for solid state study of API. First, this versatile platform allows to start directly from the powder, to dissolve it in different solvents, to estimate solubilities online and to prepare supersaturated solutions. Second, we recrystallize the API in the droplets for different experimental conditions: chemical composition, API concentration and temperature. Finally, the crystals obtained are characterized in situ by Raman microscopy and X-ray diffraction. If it is necessary, crystals can be collected for ex-situ X-ray Diffraction.

Sommaire

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Sommaire	3
Introduction	9
A. Étude Bibliographique	13
Chapitre 1. Cristallisation en solution	14
1.1. Solution et solubilité	14
1.2. Sursaturation et diagramme de phase	14
1.3. Nucléation	16
1.3.1. Nucléation primaire homogène en TCN	17
1.3.2. Nucléation primaire hétérogène	18
1.3.3. Aspect cinétique de la nucléation en TCN	19
1.3.3.1. Fréquence de nucléation	19
1.3.3.2. Temps d'induction de la nucléation	20
1.4. Croissance	20
1.5. Polymorphisme et transitions de phases	21
Chapitre 2. Étude de l'état solide d'une molécule d'intérêt pharmaceutique	24
2.1. Généralités	24
2.2. Criblage du polymorphisme	25
2.3. Criblage de sels et de co-cristaux	26
2.3.1. Formation d'un sel	26
2.3.2. Criblage et choix de sel	27
2.3.3. Formation d'un co-cristal	27
2.4. Techniques de caractérisation du solide	28
2.5. Le polymorphisme du Sulfathiazole	28
Chapitre 3. Cristallisation en microfluidique	31
3.1. Manipulation de fluides et hydrodynamique	32
3.1.1. Hydrodynamique des flux continus en microfluidique	32
3.1.2. Hydrodynamique des gouttes en microfluidique	34
3.1.2.1. Nombres et dimensions caractéristiques	34
3.1.2.2. Génération de gouttes en microfluidique	35
3.1.2.3. Régimes et mécanismes de formation des gouttes	36
3.1.2.4. Taille des gouttes	37

3.1.2.5.	Mélange	38
3.1.2.5.1.	Mélange avant la formation des gouttes	38
3.1.2.5.2.	Mélange lors de la formation des gouttes	39
3.1.2.5.3.	Mélange après la formation des gouttes	40
3.1.2.5.4.	Homogénéisation du mélange	41
3.2.	Les différents matériaux utilisés en microfluidique	42
3.2.1.	Le Polydiméthylsiloxane	43
3.2.2.	Le verre	44
3.2.3.	Les thermoplastiques rigides	44
3.2.4.	Les polymères fluorés	44
3.2.5.	Avantages des systèmes « Plug and Play »	45
3.3.	Exemples d'outils microfluidiques pour la cristallisation et applications	45
3.3.1.	Cristallisation en microfluidique à base de flux continu	45
3.3.2.	Systèmes intégrés à réservoirs	47
3.3.3.	Cristallisation en microfluidique à base de gouttes	48
3.3.3.1.	Obtention de cristaux monodisperses en taille	49
3.3.3.2.	Mesure de la solubilité	49
3.3.3.3.	Étude du polymorphisme	51
3.3.3.4.	Étude de la fréquence de nucléation	52
3.3.3.5.	Vers le criblage à haut débit	53
3.4.	Caractérisation en ligne des cristaux	55
3.4.1.	Microscopie optique	55
3.4.2.	Diffraction des rayons X	56
3.4.3.	Spectroscopie Raman	56
3.5.	Caractérisation en ligne des solutions	56
3.5.1.	Spectrométrie UV/Visible	56
3.5.2.	Conductimétrie	57
3.5.3.	Spectroscopie Raman	58
3.5.4.	Diffraction des rayons X aux Petits Angles (DXPA)	58
	Conclusion de l'étude bibliographique	59
	B. Matériels et Méthodes	61
	Chapitre 1. La plateforme microfluidique	62
1.1.	Module de génération des gouttes	62
1.1.1.	Les pousse-seringues	62
1.1.2.	Les capillaires microfluidiques	63
1.1.3.	Les jonctions microfluidiques	63
1.1.4.	Les filtres	64
1.1.5.	Les vannes	65
1.1.6.	Le chauffe-seringues	65
1.2.	Module de caractérisation en ligne des gouttes	66
1.3.	Module d'incubation et d'observation des gouttes	67

Chapitre 2. Matériels	69
2.1. Les huiles	69
2.2. Les solvants	69
2.3. Les principes actifs	70
2.3.1. Le Paracétamol	70
2.3.2. Le sulfathiazole	70
2.3.3. Le Gliclazide	70
2.3.4. Le S42305-3	71
2.4. Le microscope Raman RXN1 (Kaiser)	71
2.5. Dispositif utilisé pour la diffraction des Rayons X sur monocristal	73
Chapitre 3. Méthodes	74
3.1. Mesure de solubilité en multipuits	74
3.2. Retour Base d'un sel	75
C. Résultats et discussion	78
Chapitre 1. Préparation des solutions et mesure de solubilité en microfluidique	79
1.1. Problématique de la préparation des échantillons	79
1.2. Méthode de préparation en ligne des solutions	80
1.2.1. Principe et Montage	80
1.2.2. Limitations de ce premier montage	82
1.2.3. Résolution du problème d'étalonnage	84
1.3. Courbe de solubilité déterminée en ligne	85
1.3.1. Montage	85
1.3.2. Protocole	86
1.3.3. Résultats expérimentaux de courbes de solubilité	89
1.3.3.1. Courbes de solubilité du Paracétamol	89
1.3.3.2. Courbes de solubilité du Gliclazide	89
1.3.4. Avantages de la méthode microfluidique de mesure de solubilité	90
1.4. Optimisation du montage microfluidique	91
1.4.1. Prototypage d'une cellule UV	91
1.4.1.1. Absorbance des capillaires	92
1.4.1.2. Fixation des capillaires et des fibres optiques	93
1.4.2. Choix d'un système de régulation de température	95
1.4.2.1. Régulation par air chaud ventilé	95
1.4.2.2. Régulation par Chauffage Infra Rouge	95
1.4.2.3. Régulation par circulation d'eau	97
1.4.2.4. Régulation à l'aide d'un four HPLC	97
Chapitre 2. Étude du polymorphisme en système microfluidique	99
2.1. Introduction	99

2.2.	Choix de l'huile	100
2.2.1.	Problématique du choix d'huile	100
2.2.2.	Matériels et méthodes pour tester l'huile	100
2.2.3.	Résultats et discussion	101
2.2.3.1.	Huile FMS	101
2.2.3.2.	Huile FC70	101
2.2.3.3.	Les huiles GPL (103 105 106)	102
2.3.	Montage microfluidique pour l'étude du polymorphisme	102
2.3.1.	Présentation du montage	102
2.3.2.	Problème de bulles	104
2.4.	Procédure de cristallisation	106
2.4.1.	Génération de gouttes saturées à différentes températures	106
2.4.2.	Déclenchement de la nucléation	107
2.5.	Analyse des cristaux obtenus	108
2.5.1.	Microscopie optique	108
2.5.2.	Analyse In-situ par Microscopie Raman	110
2.5.2.1.	Identification d'un cristal dans une goutte.	110
2.5.2.2.	Influence des différents paramètres de mesures	111
2.5.2.2.1.	Diamètre interne des capillaires	112
2.5.2.2.2.	Influence du focus	112
2.5.2.3.	Protocole de mesure lors d'un criblage	113
2.5.3.	Méthode d'analyse en diffraction des rayons X	114
2.5.3.1.	Mesure in situ à travers le capillaire	114
2.5.3.2.	Mesure Ex-situ	116
2.5.3.2.1.	Par passage de la goutte dans un capillaire en verre	116
2.5.3.2.2.	Après extraction de la goutte puis passage dans un capillaire en verre	119
2.6.	Étude du polymorphisme d'une molécule modèle : Le Sulfathiazole	120
2.6.1.	Matériels et méthodes	120
2.6.2.	Résultats	121
2.6.2.1.	Mesure des solubilités	121
2.6.2.2.	Microscopie optique	123
2.6.2.3.	Analyse par spectroscopie Raman des solides obtenus	126
2.6.2.4.	Analyse par DRX des solides obtenus	129
2.6.2.5.	Synthèse des résultats sur le polymorphisme	131
2.6.3.	Discussion	135
2.6.3.1.	Analyse et discussion des résultats obtenus dans l'eau	135
2.6.3.2.	Analyse des résultats obtenus dans le n-propanol et l'acétonitrile	137
2.7.	Conclusion	138

Chapitre 3. Transfert en laboratoire pharmaceutique, vers le criblage de sel __ 140

3.1.	Transfert des outils et méthodes microfluidiques développées en laboratoire industriel	140
3.2.	Proposition de montages microfluidiques pour le criblage de sels	141
3.2.1.	Proposition d'un montage pour une approche académique du criblage de sel	142

3.2.2. Proposition d'une approche industrielle du criblage de sel intégrant des outils microfluidiques	143
3.2.2.1. Stratégie classique de choix de sels à Technologie Servier	143
3.2.2.2. Proposition d'intégration de la microfluidique dans le choix de sel	144
Conclusion générale et perspectives	147
Références bibliographiques	152
Annexes	161
Annexe 1 : Diffractogramme et liste des d_{hkl} obtenus sur des cristaux de sulfathiazole et comparaison avec ceux de la Cambridge Structurale Database	162
Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe III d'après la spectroscopie Raman et suthaz02	162
Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe IV d'après la spectroscopie Raman et suthaz04	164
Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe II d'après la spectroscopie Raman et suthaz :	166
Annexe 2: Article « Microfluidics Setup Rapidly Measures Solubility Directly from Powder»	168

Introduction

La cristallisation est un phénomène constitué de deux étapes : la nucléation, correspondant à un changement d'état, au cours duquel un corps va passer d'un état désorganisé (gazeux, liquide, dissous) à l'état de solide organisé, formant un premier germe cristallin, et la croissance durant laquelle celui-ci va croître. C'est l'une des opérations les plus anciennes dans l'industrie chimique qui a pour but la séparation, la purification et la mise en forme des particules produites. Il existe trois types de cristallisation selon les phases à partir desquelles les cristaux sont produits : la cristallisation en phase gazeuse, en bain fondu ou en solution. Nous nous intéresserons dans ce manuscrit uniquement à la cristallisation en solution, car c'est la plus répandue dans l'industrie pharmaceutique, domaine d'application de ma thèse.

Lors de la cristallisation en solution d'une molécule d'intérêt, les cristaux peuvent apparaître sous différentes phases solides. Ils peuvent être sous la forme d'un solvate, d'un sel ou d'un co-cristal. Toutes ces phases solides peuvent exister sous différents polymorphes, liés à l'arrangement tridimensionnel des molécules dans le cristal. Chaque phase solide d'une même molécule a des propriétés physico-chimiques qui peuvent être radicalement différentes. Par exemple, différentes phases d'un même principe actif pharmaceutique n'ont pas les mêmes solubilités et les mêmes cinétiques de dissolution : certaines se dissolvent très lentement perdant tout intérêt, alors que d'autres se dissolvent très rapidement dans l'organisme et peuvent devenir toxiques. De même, du point de vue de l'efficacité du médicament, il est également essentiel de savoir quel polymorphe constitue le principe actif et de connaître sa stabilité au cours du temps. Le choix de l'état solide d'une molécule est alors un paramètre primordial. Enfin, la découverte d'un nouveau polymorphe d'un principe actif pharmaceutique peut retarder ou prolonger sa commercialisation comme dans le cas du Zantac¹ et du Norvir².

Lors de l'étude de l'état solide d'une nouvelle molécule d'intérêt pharmaceutique, la première étape est de mesurer sa solubilité dans l'eau car elle est reliée à sa biodisponibilité. S'il est estimé que sa solubilité est suffisante, un criblage des solvants est effectué pour l'identification des différentes phases polymorphiques, du faciès et des conditions de cristallisation. En revanche, si sa solubilité dans l'eau est insuffisante, il sera préférable de choisir un sel ou un co-cristal afin d'améliorer sa solubilité. Dans le cas du choix d'un sel, un criblage de sels doit être effectué. Le choix de la forme finale de la molécule va être déterminé par plusieurs paramètres comme sa solubilité, son point de fusion, son hygroscopicité, son polymorphisme, sa stabilité, etc.

Dans ce cadre, un criblage consiste à faire varier les conditions de cristallisation (milieu, température, sursaturation) pour obtenir les différentes phases solides existantes (polymorphes, solvates, sels, co-cristaux, amorphes) puis d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques à l'aide de techniques de caractérisation du solide variées. Ainsi, un grand nombre d'expériences est nécessaire à ce stade du développement de la molécule, où les quantités de matière disponibles sont faibles (quelques grammes). Pour cela, des méthodes de criblages adaptées doivent être utilisées. Les techniques classiques de criblage en laboratoire sont

souvent longues et onéreuses, c'est pourquoi des techniques dites à haut débit ont été développées utilisant principalement des robots de cristallisation. Parmi ces techniques la microfluidique est particulièrement intéressante, car elle permet de réaliser un grand nombre d'expériences en parallèle tout en utilisant des quantités de matière première très faibles, le tout à faible coût. Cependant, bien que la microfluidique soit de plus en plus utilisée en cristallisation, il y a peu de références dans le domaine du criblage de petites molécules d'intérêt pharmaceutique et son utilisation en laboratoire reste marginale.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse a été de développer des outils microfluidiques permettant l'étude de la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques transférables et utilisables dans le cadre de criblage de sels et de polymorphes en laboratoire industriel. Pour cela, dans une première partie bibliographique, les mécanismes de la cristallisation et ses enjeux dans le domaine pharmaceutique seront décrits. Puis les notions de microfluidiques seront abordées et un état de l'art sur les études de cristallisation en système microfluidique sera exposé. Une deuxième partie de ce manuscrit sera dédiée à la description des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail. Enfin, dans une troisième partie, les résultats obtenus au cours de cette thèse seront décrits. Dans cette partie, un premier chapitre exposera une nouvelle méthode de mesure de solubilité à partir de la poudre, utilisant un outil microfluidique, et permettant des mesures rapides et précises avec peu de matière première. Puis, dans un second chapitre, une méthodologie d'étude de la cristallisation de principes actifs en système microfluidique sera présentée. Et l'étude du polymorphisme d'une molécule modèle (le Sulfathiazole) permettra de montrer son intérêt.

A. Étude Bibliographique

Chapitre 1. Cristallisation en solution

L'objectif de ce chapitre est de rappeler les notions théoriques reliées à la cristallisation en solution, à ses mécanismes et aux propriétés des cristaux, le tout en relation avec les problématiques de cristallisation des principes actifs pharmaceutiques abordés dans ce manuscrit.

1.1. Solution et solubilité

Une solution de cristallisation est un mélange de deux ou plusieurs substances qui forment une seule phase homogène (avant cristallisation). Nous nous intéresserons ici aux suspensions composées d'un solvant et d'un soluté (sous forme solide avant dissolution). Le solvant dissout le soluté selon le principe du « qui se ressemble s'assemble et se dissout » ou le « like dissolves like » des Anglo-Saxons³.

À une température ou une condition donnée, la quantité maximale de soluté qui peut être dissoute dans un volume donné de solvant s'appelle la solubilité C_s . La solubilité C_s est donc la concentration en soluté au moment où la saturation est atteinte, la solution est dite saturée. La solubilité d'un soluté dans un solvant donné dépend de la température. Pour la majorité des molécules, C_s augmente avec la température, même si l'évolution de C_s en fonction de la température est très variable d'un composé à l'autre. Cependant, la solubilité peut également diminuer avec la température, on parle de solubilité inverse (c'est le cas du calcaire CaCO_3). Cette relation entre la solubilité et la température est décrite graphiquement par la courbe de solubilité (Figure 1).

1.2. Sursaturation et diagramme de phase

La notion de saturation implique un état d'équilibre. Lorsque la concentration réelle en soluté dissout (C) dépasse la concentration d'équilibre à saturation (ou solubilité notée C_s), la solution est hors équilibre et l'on peut caractériser l'écart à la solubilité par la sursaturation β :

$$\beta = \frac{C}{C_s}$$

ÉQUATION 1

La nucléation et la croissance cristalline sont entraînées par une force motrice de la cristallisation. Cette force motrice est la différence des potentiels chimiques $\Delta\mu$ entre l'état sursaturé ou sous-saturé μ et l'état saturé μ_s , c'est-à-dire à l'équilibre cristal-solution. Cette différence est décrite ci-dessous avec k , la constante de Boltzmann et T , la température.

$$\Delta\mu = \mu - \mu_s = kT \ln \beta = kT \ln \frac{C}{C_s}$$

ÉQUATION 2

À une température donnée, $\Delta\mu$ est déterminée uniquement par la sursaturation β . Lorsque la solution est sous-saturée ($\beta < 1$), $\Delta\mu < 0$, la cristallisation ne peut pas se produire et les cristaux présents en suspension vont se dissoudre. Lorsque $\beta > 1$, $\Delta\mu > 0$, la solution est sursaturée et la solution tend vers l'équilibre cristal/solution (vers $\beta = 1$, $\Delta\mu = 0$) par croissance des cristaux présents. En outre, plus β est grand, plus le système est loin de l'équilibre, plus le processus de cristallisation est accéléré.

Dans une expérience de cristallisation mettant en jeu la concentration en soluté et la température, il existe trois domaines que l'on peut représenter sur un diagramme de phase (Figure 1) :

- Une zone sous-saturée ($\beta < 1$), se situant en dessous de la courbe de solubilité, dans laquelle le soluté est entièrement dissous.
- Une zone sursaturée ($\beta > 1$) métastable dans laquelle la cinétique de nucléation est moins favorable que la cinétique de croissance.
- Une zone sursaturée ($\beta > 1$) labile dans laquelle la nucléation est spontanée (la cinétique de nucléation étant plus importante que la cinétique de croissance).

La limite entre la zone sursaturée métastable et la zone sursaturée labile est appelée limite de zone métastable, elle est liée à la cinétique de la nucléation (pointillés sur la Figure 1). Cette limite cinétique dépend de la manière dont la sursaturation est atteinte, du volume et du temps choisi pour considérer la nucléation comme rapide.

Pour sursaturer une solution préparée à une concentration inférieure à C_s , soit le solvant est ôté par évaporation, soit un « mauvais solvant » (antisolvant) est ajouté, soit la solubilité C_s est diminuée par d'autres paramètres physico-chimiques³. Dans le cas de la cristallisation de molécules organiques ou de protéines, ces paramètres sont la température, le solvant, le pH, les forces ioniques, les agents de cristallisation, etc. Ces différentes manières d'arriver à la sursaturation permettent de se déplacer différemment dans le diagramme de phase définissant différents procédés de cristallisation, comme il est montré sur la Figure 1 pour un refroidissement (flèche orange) et une évaporation (flèche jaune).

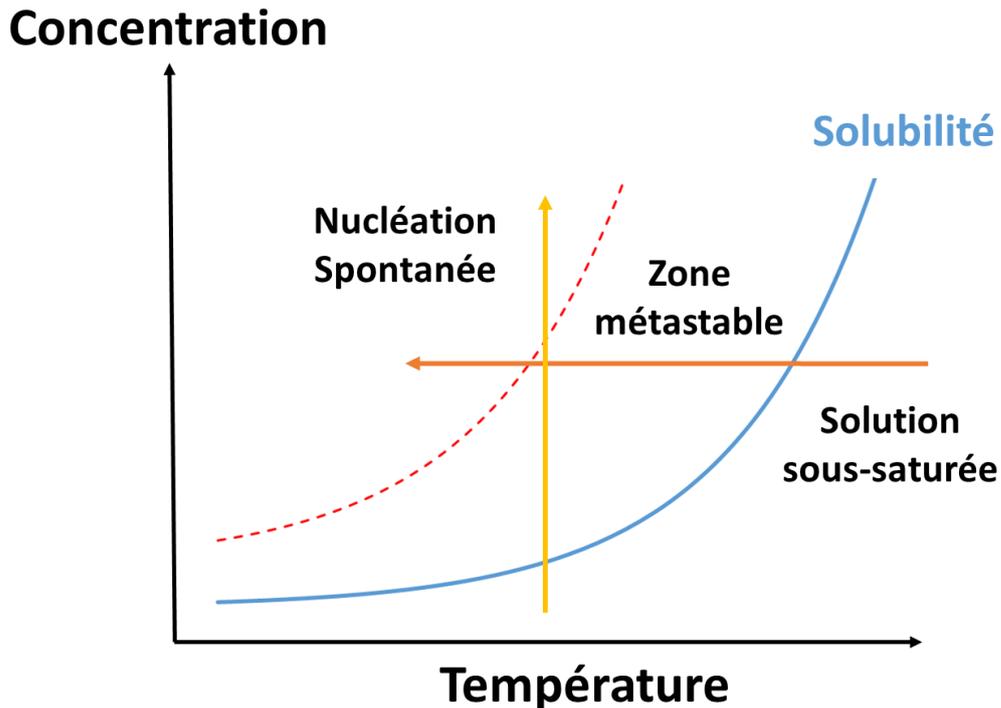


Figure 1. Diagramme de phase représentant la concentration de soluté en fonction de la température. La flèche orange représente le déplacement dans le diagramme de phase lors d'un refroidissement et la flèche jaune lors d'une évaporation. La courbe en bleu représentant la solubilité et la courbe en pointillé rouge la limite de zone métastable.

1.3. Nucléation

Comme nous l'avons vu précédemment, lorsque la solution est sursaturée, celle-ci est instable et va tendre vers l'équilibre en produisant un premier germe ou nucléus. Ce phénomène s'appelle la nucléation. Il existe à ce jour, deux théories de la nucléation. La théorie classique de la nucléation (TCN)⁴ s'apparente au phénomène de condensation d'une goutte liquide à partir d'une phase vapeur. La description thermodynamique de ce processus a été développée à la fin du 19^{ème} siècle par Gibbs puis a été utilisée pour expliquer le phénomène de nucléation de cristaux. La deuxième théorie est la théorie de la nucléation en deux étapes : La première étape consiste en la formation d'une zone liquide riche en soluté due aux fluctuations de densité et d'agréments rapides des molécules, zone qui par analogie avec les séparations de phases liquide-liquide est assimilée à une goutte. La deuxième étape correspond ensuite à la formation d'un germe cristallin à l'intérieur de cette goutte (transformation du « liquide » dense en cristal), la surface du cristal étant alors mouillée par ce liquide dense⁵. Dans ce document, nous nous intéresserons plus particulièrement à la théorie classique de la nucléation, car c'est, à ce jour, la plus utilisée pour interpréter et expliquer les résultats expérimentaux.

Il existe plusieurs mécanismes de nucléation. On parlera de nucléation primaire lorsque les germes sont directement issus de la solution mère. La nucléation primaire est dite homogène si les germes se forment dans le volume de la solution, et hétérogène si les germes se forment sur un corps étranger à la solution (parois du cristalliseur, agitateur ou sur des particules solides, cristallines ou non, en suspension). On parlera en revanche de nucléation secondaire si les cristaux se forment en présence de cristaux de la même phase.

La formation d'un germe cristallin en TCN va trouver sa source dans les fluctuations locales de concentration aléatoire en solution dues au mouvement brownien. Ainsi l'agrégation des molécules permettant la formation du germe cristallin a une composante aléatoire. La nucléation est, par conséquent, un phénomène stochastique.

1.3.1. Nucléation primaire homogène en TCN

Dans la théorie classique de la nucléation, une solution sursaturée ne contient pas uniquement des molécules isolées, mais aussi des embryons de germes constitués de plusieurs molécules³. Ces agrégats se font et se défont par capture ou perte aléatoire d'une molécule. D'un point de vue thermodynamique, le grossissement de l'agrégat se fait avec une augmentation de son volume et de sa surface de contact avec la solution. L'accroissement du volume se fait alors avec un gain en énergie, tandis que l'augmentation de surface nécessite une dépense énergétique. En faisant la supposition que ces agrégats sont sphériques et que l'énergie interfaciale agrégat/solution est identique en tout point de la surface, on peut écrire l'équation 3 correspondant à l'énergie nécessaire pour obtenir un agrégat de rayon r à température et pression constantes. Cette énergie est l'énergie libre d'activation, notée ΔG .

$$\Delta G = -n (\mu - \mu_s) + S \gamma$$

ÉQUATION 3

n : nombre de molécules constituant le germe

μ : potentiel chimique de la molécule dans la solution (J)

μ_s : potentiel chimique de la molécule dans le cristal (J)

S : aire du germe (m^2)

γ : énergie interfaciale cristal-solution (J/m^2).

Dans ces conditions, le terme de volume $-n (\mu - \mu_s)$ diminue avec n , soit avec le rayon r du germe alors que le terme de surface $S\gamma$ augmente avec r (Figure 2). Lorsque r augmente, il y a donc compétition entre les termes surfacique et volumique et la fonction énergie d'activation de nucléation ΔG passe par une valeur critique ΔG^* lorsque le germe atteint une taille critique r^* , pour laquelle le germe est en équilibre instable avec la solution. Si on lui enlève une molécule, le germe se dissout ($r < r^*$) et si on lui ajoute une molécule le germe croît. Dans les deux cas, le processus se fait avec gain d'énergie ($\Delta G < \Delta G^*$), il est spontané.

La nucléation finit donc à partir du moment où un agrégat de molécules atteint une taille critique r^* qui peut être calculée grâce à l'équation de Gibbs-Thomson (équation 4)

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT\ln\beta}$$

ÉQUATION 4

Ω : volume d'une molécule dans le cristal (m^3)

k : constante de Boltzmann ($m^2.kg/(s^2.K^1)$ ou J/K)

T : température (K).

D'après cette équation, plus la sursaturation est élevée plus la taille critique du germe r^* sera faible et plus l'énergie libre d'activation critique ΔG^* sera également faible.

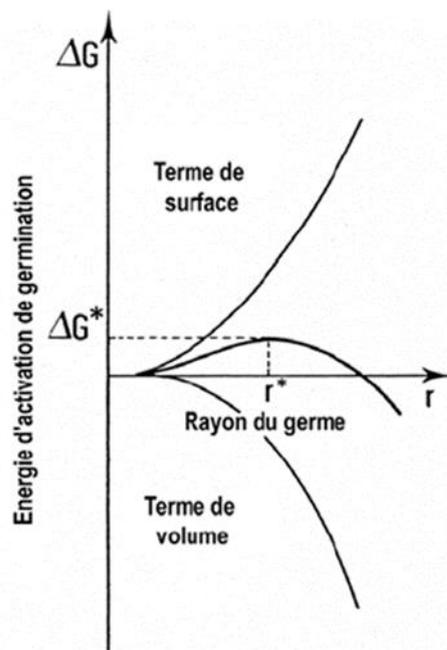


Figure 2. Évolution de l'énergie d'activation de la nucléation ΔG en fonction du rayon r du germe³.

1.3.2. Nucléation primaire hétérogène

Malgré la purification du milieu de cristallisation et la réduction des interactions soluté-cristallin, la nucléation primaire homogène est un cas idéal. En réalité, la nucléation primaire est en grande majorité de type hétérogène car induite par la présence d'un substrat étranger. Ceci permet au cristal de nucléer à des sursaturations plus faibles, car lorsqu'un germe se forme sur un substrat celui-ci n'est plus sphérique, mais sous forme de calotte sphérique (Figure 3).

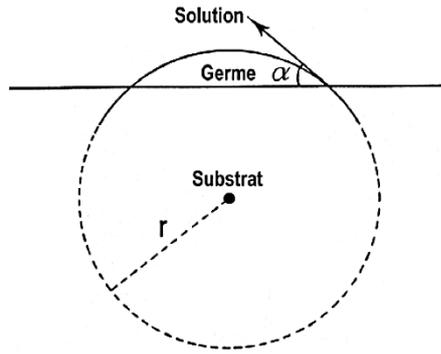


Figure 3. Nucléation primaire hétérogène d'un germe sur un substrat avec un angle de contact α .³

En nucléation hétérogène, le rayon de courbure critique de la calotte sphérique est identique au rayon critique en nucléation homogène. La différence entre les deux types de nucléation vient alors du fait que moins de molécules sont nécessaires pour former la calotte sphérique en nucléation hétérogène que pour la sphère complète en nucléation homogène. L'énergie d'activation en nucléation hétérogène (ΔG_{het}^*) est donc moins élevée que celle de la nucléation homogène. Ainsi, la présence de molécules « étrangères » : particules, bulles, parois du cristallisateur, interface liquide-liquide et liquide-air vont agir comme catalyseur de la nucléation. Cette différence va dépendre de l'angle de contact α formé entre le germe et la surface du substrat tel que :

$$\Delta G_{het}^* = f(\alpha) \times \Delta G^*$$

ÉQUATION 5

α est ainsi défini entre 0 et π et l'on peut en déduire que :

$$0 < f(\alpha) < 1$$

ÉQUATION 6

Le facteur $f(\alpha)$ est généralisé pour différentes formes de cluster et de substrat⁶⁻⁸.

1.3.3. Aspect cinétique de la nucléation en TCN

La cinétique de nucléation joue un rôle prédominant sur le contrôle de la qualité des cristaux : leur nombre, leur taille et leur phase. Cette cinétique peut être caractérisée par deux grandeurs : la fréquence de nucléation (J) et le temps d'induction de la nucléation (t_N).

1.3.3.1. Fréquence de nucléation

La fréquence de nucléation J représente le nombre de cristaux qui se forment dans la solution sursaturée par unité de volume et par unité de temps :

$$J = \frac{n_c}{V \times \Delta t}$$

ÉQUATION 7

n_c : nombre de cristaux ayant nucléés dans la solution

V : volume total de la solution (mL)

Δt : temps de nucléation (s)

J : fréquence de nucléation (nombre/(mL.s))

1.3.3.2. Temps d'induction de la nucléation

Le temps d'induction de la nucléation est le temps nécessaire pour obtenir un cristal détectable. Il correspond donc à la somme du temps transitoire nécessaire pour atteindre un état stable, du temps de nucléation et du temps requis pour que le germe critique atteigne une taille détectable. Celui-ci est généralement mesuré par l'observation du premier cristal, ou par changement des propriétés physiques de la solution (diffusion de lumière, diffusion des rayons X aux petits angles, turbidité de la solution, indice de réfraction,...). Le temps de nucléation t_N s'écrit de la manière suivante :

$$t_N = \frac{n_c}{J \times V}$$

ÉQUATION 8

D'après cette équation, plus le volume diminue plus le temps de nucléation est long. C'est l'effet cinétique du confinement par le volume.

1.4. Croissance

Une fois le rayon critique du germe atteint, le cristal va pouvoir croître par intégration des molécules de soluté. Cette croissance va être limitée par un ensemble de faces. L'ensemble des faces qui se déduisent les unes des autres grâce aux éléments de symétrie du cristal constitue une forme. La morphologie des cristaux est représentée par l'ensemble des faces cristallines, mais la morphologie ne contient pas tout à fait la notion de forme extérieure du cristal. Celle-ci est donnée par le faciès faisant intervenir le développement relatif des faces entre elles⁹. Le faciès cristallin est donc l'aspect extérieur des cristaux qui est déterminé par les vitesses relatives de croissance des faces entre elles. Au cours de la cristallisation, les faces qui ont une vitesse de croissance importante poussent rapidement et disparaissent, alors que la forme de croissance du cristal ne comporte que les faces dont la cinétique de croissance est la plus lente. La Figure 4 représente deux exemples de cristaux qui présentent les mêmes faces cristallines (et donc une même morphologie), mais des faciès différents, dus aux vitesses de croissance différentes.

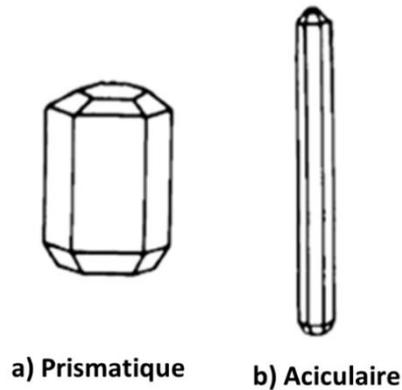


Figure 4. Différents faciès cristallins dus aux différentes vitesses de croissance des faces.¹⁰

Le faciès cristallin est donc fortement influencé par le milieu de croissance (solvant), la présence d'impuretés, et particulièrement par la sursaturation au cours de la cristallisation. Le faciès d'un cristal a un effet important sur ses propriétés rhéologiques.

1.5. Polymorphisme et transitions de phases

Lors de leur agrégation, les molécules peuvent s'assembler sous différentes phases si les conditions du milieu de cristallisation le permettent. Elles peuvent être sous forme de solides amorphes (désordonnées) ou sous forme de cristaux (ordonnées). Dans les cristaux, les molécules peuvent s'assembler sous la forme :

- d'un solvate (Figure 5b), quand des molécules de solvant sont incorporées dans le réseau cristallin,
- d'un sel (Figure 5a) si la molécule d'intérêt est associée à un contre-ion acide ou basique
- d'un co-cristal (Figure 5c) si elle est associée à une autre molécule (ni solvant, ni sel).

De plus, ces cristaux peuvent exister sous différents polymorphes, liés à l'arrangement tridimensionnel des molécules dans le cristal. Ainsi les polymorphes sont des solides qui ont strictement la même composition chimique, mais différentes structures cristallines (Figure 5d).

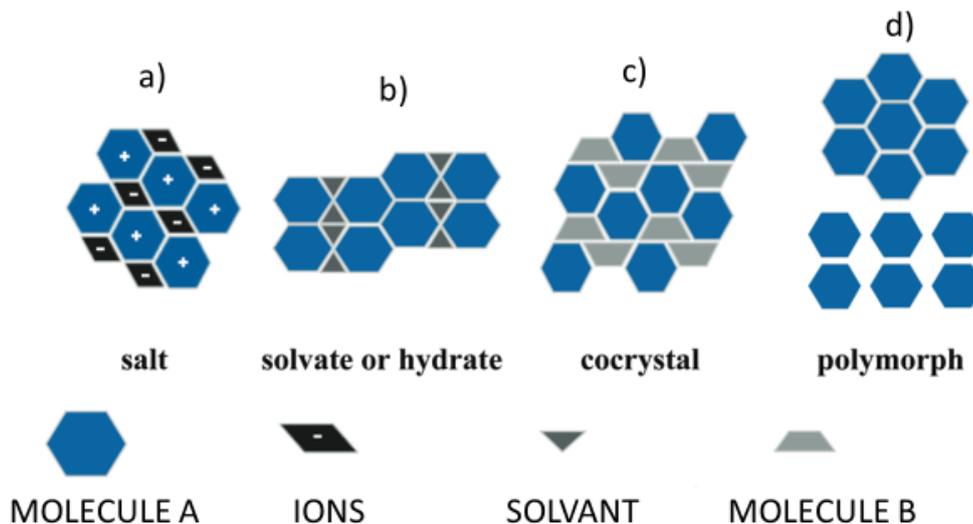


Figure 5. Schéma de différents types de cristaux ¹¹

L'exemple de polymorphisme probablement le plus connu est celui du carbone qui peut, suivant les conditions de cristallisation, se structurer en maille hexagonale formant du graphite ou en maille cubique formant du diamant. Différents polymorphes auront des propriétés physiques (solubilité, point de fusion, densité, dureté...) différentes. Le diamant est par exemple un matériau beaucoup plus dur (10 sur l'échelle de Mohs) que le graphite (entre 1 et 2 sur l'échelle de Mohs). À noter que dans le cas d'un corps simple comme le carbone, le terme allotropisme est utilisé préférentiellement au terme polymorphisme.

Pour aborder le problème du polymorphisme et des transitions de phase, prenons l'exemple du diagramme de phase en fonction de la température pour deux phases polymorphiques A et B, la phase B ayant une solubilité supérieure à la phase A (Figure 6). Plaçons-nous dans le cas où la solution est sous-saturée par rapport aux deux phases et ne contient aucun cristal (Figure 6 point 1). À ce stade, la saturation n'étant pas atteinte aucun cristal ne pourra nucléer. Si la température est diminuée jusqu'à atteindre le point 2, la solution n'est alors sursaturée que par rapport à la phase A, et seule celle-ci pourra apparaître. Ces cristaux vont ensuite pouvoir croître, ce qui aura pour effet de diminuer la concentration de la solution (Figure 6 point 3). En revanche, si la température est diminuée de telle manière que la sursaturation soit atteinte pour les deux phases (Figure 6 point 4), les deux peuvent nucléer. Les cristaux des phases A et B étant en suspension dans une solution sursaturée, ils se mettent à croître, diminuant la concentration de la solution jusqu'au point 5. À partir de là, les cristaux de la phase B se trouvent dans une solution à l'équilibre alors que ceux de A sont dans une solution sursaturée. Les cristaux de la phase A vont alors croître diminuant ainsi la concentration de la solution et les cristaux de la phase B, sous-saturée, vont se dissoudre au profit de la phase A. La phase B est donc une phase métastable qui se convertira

spontanément vers la phase A (phase stable) après un certain temps. Le polymorphe le plus stable est donc celui ayant la solubilité la plus faible ⁹.

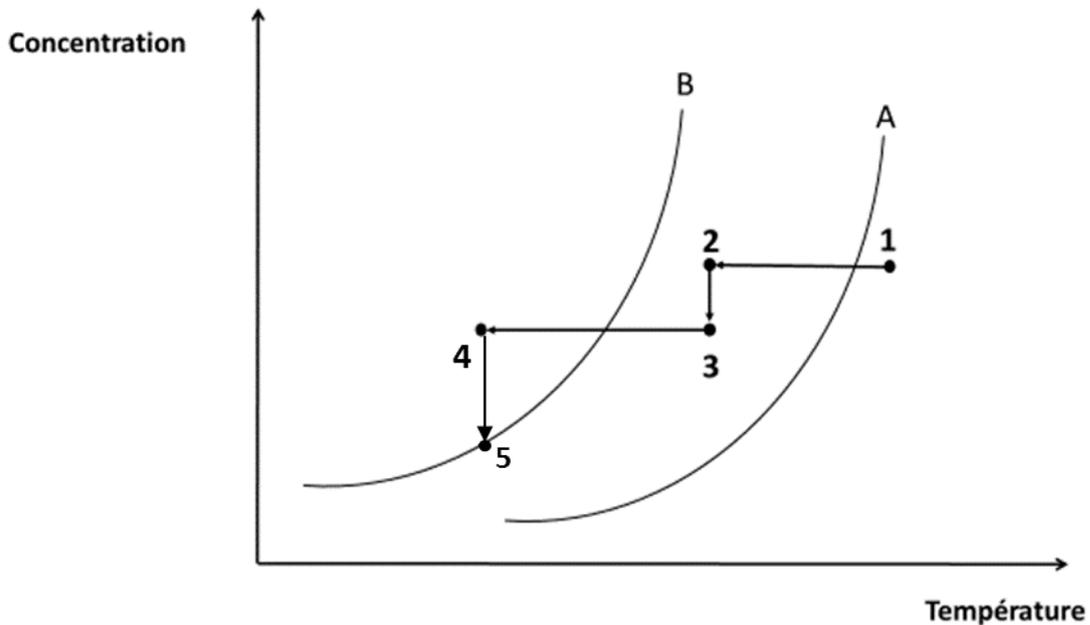


Figure 6. Représentation schématisée des courbes de solubilité de deux phases en fonction de la température.

Par ailleurs, la nucléation est un processus cinétique pour lequel on s'attendrait à ce que la fréquence de nucléation de la phase stable (J_A) soit plus importante que la fréquence de nucléation de la phase métastable (J_B) ($J_A > J_B$), car la sursaturation est plus importante pour la phase A que pour la phase B. Or, il est souvent observé que $J_A < J_B$. C'est ce qu'énonce la règle d'Ostwald : la phase métastable se forme souvent la première, car les facteurs cinétiques qui imposent la nucléation l'emportent sur les facteurs thermodynamiques imposant l'équilibre final.

Chapitre 2. Étude de l'état solide d'une molécule d'intérêt pharmaceutique

2.1. Généralités

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, en fonction des conditions de cristallisation, une molécule peut apparaître sous différentes phases solides déterminant ses propriétés physico-chimiques. L'enjeu en développement pharmaceutique est donc de trouver la ou les phases permettant d'avoir les propriétés les plus intéressantes tout en évitant de développer une phase métastable. On recherchera la solubilité adéquate de la molécule dans l'eau car celle-ci est étroitement liée à la biodisponibilité. De plus, une bonne stabilité permettra d'avoir une meilleure longévité du futur médicament. Par ailleurs, la découverte d'un nouveau polymorphe d'un principe actif pharmaceutique peut retarder ou prolonger sa commercialisation comme dans le cas du Zantac¹ et du Norvir². De plus, la connaissance des différentes phases cristallines est exigée pour le dépôt d'un dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et la découverte d'une autre phase cristalline (non brevetée) par un laboratoire concurrent peut engendrer des pertes importantes.

Pour cela, des criblages peuvent être réalisés à différents moments du développement et notamment dans sa phase préliminaire préclinique. À ce stade, la quantité de matière première disponible (de l'ordre du gramme) et de temps, peuvent devenir des facteurs limitants pour l'étude de l'état solide. Or les études cliniques et pharmacocinétiques sont lancées une fois le choix de l'état solide réalisé. Ainsi, un changement d'état solide implique le renouvellement de toutes les études cliniques ou au minimum de réaliser des études pivots en toxicologie et pharmaco-cinétique pour vérifier la bio-équivalence des formes.

Lors de la découverte d'une nouvelle molécule d'intérêt, l'une des premières étapes est de mesurer sa solubilité dans l'eau ou en milieux aqueux bio-similaires tel que le Fasted Simulated Intestinal Fluid (FasSIF) et de la corrélérer à des mesures de perméabilité sur membranes biologiques afin d'estimer sa biodisponibilité. Si la solubilité est estimée suffisante, un criblage du polymorphisme est réalisé afin d'identifier les différents polymorphes et solvates existants et d'en mesurer les propriétés. Si la solubilité aqueuse est estimée trop faible, plusieurs solutions sont possibles afin de l'améliorer, comme la formation d'un sel ou d'un co-cristal. Les différents sels et co-cristaux possibles sont alors criblés et leurs propriétés mesurées.

Il est important d'avoir à l'esprit que le nombre d'expériences ainsi nécessaires est important, et que les contraintes de temps et la faible quantité de produit disponible ne permettent pas de réaliser toutes les expériences possibles ni d'avoir une connaissance parfaite de toutes les phases solides. L'enjeu est donc d'adopter une stratégie de criblage

efficace permettant de mettre en évidence le plus rapidement possible les phases les plus intéressantes.

2.2. Criblage du polymorphisme

L'étude du polymorphisme d'une molécule consiste à trouver les différentes structures cristallines existantes et d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques. Pour cela, un grand nombre de conditions de cristallisations sont testées. Selon le principe de McCrone, le nombre de polymorphes connu dépend du temps passé à en chercher. En développement pharmaceutique, l'important n'est donc pas de connaître tous les polymorphes et solvates existants (ce qui serait trop coûteux dans un premier temps), mais d'identifier rapidement les plus stables, ainsi que les phases métastables qui peuvent apparaître lors de la cristallisation du médicament et de son stockage.

Les techniques classiques de criblage du polymorphisme sont réalisées en solution. Ces méthodes utilisent des solvants ou des mélanges de solvant pour induire la cristallisation par refroidissement, évaporation, ajout d'un anti-solvant, diffusion de vapeur ou « salting-out ». Le criblage est mené en faisant varier les conditions de cristallisation (température, milieu de cristallisation, sursaturation, vitesse de refroidissement...). D'autres techniques ne faisant pas intervenir de solvant sont possibles comme par induction de chaleur, sublimation, broyage, cristallisation en bain fondu... (Figure 7)

Chacune de ces méthodes peut favoriser la cristallisation de phases cristallines différentes : les méthodes de cristallisation lente permettront de mettre en évidence plus facilement les phases les plus stables alors que les méthodes induisant une cristallisation plus rapide favoriseront l'apparition de phases métastables. Il peut donc être nécessaire de combiner plusieurs de ces techniques pour réaliser un criblage complet. Un récapitulatif des différentes techniques de criblage est présenté sur la Figure 7 .

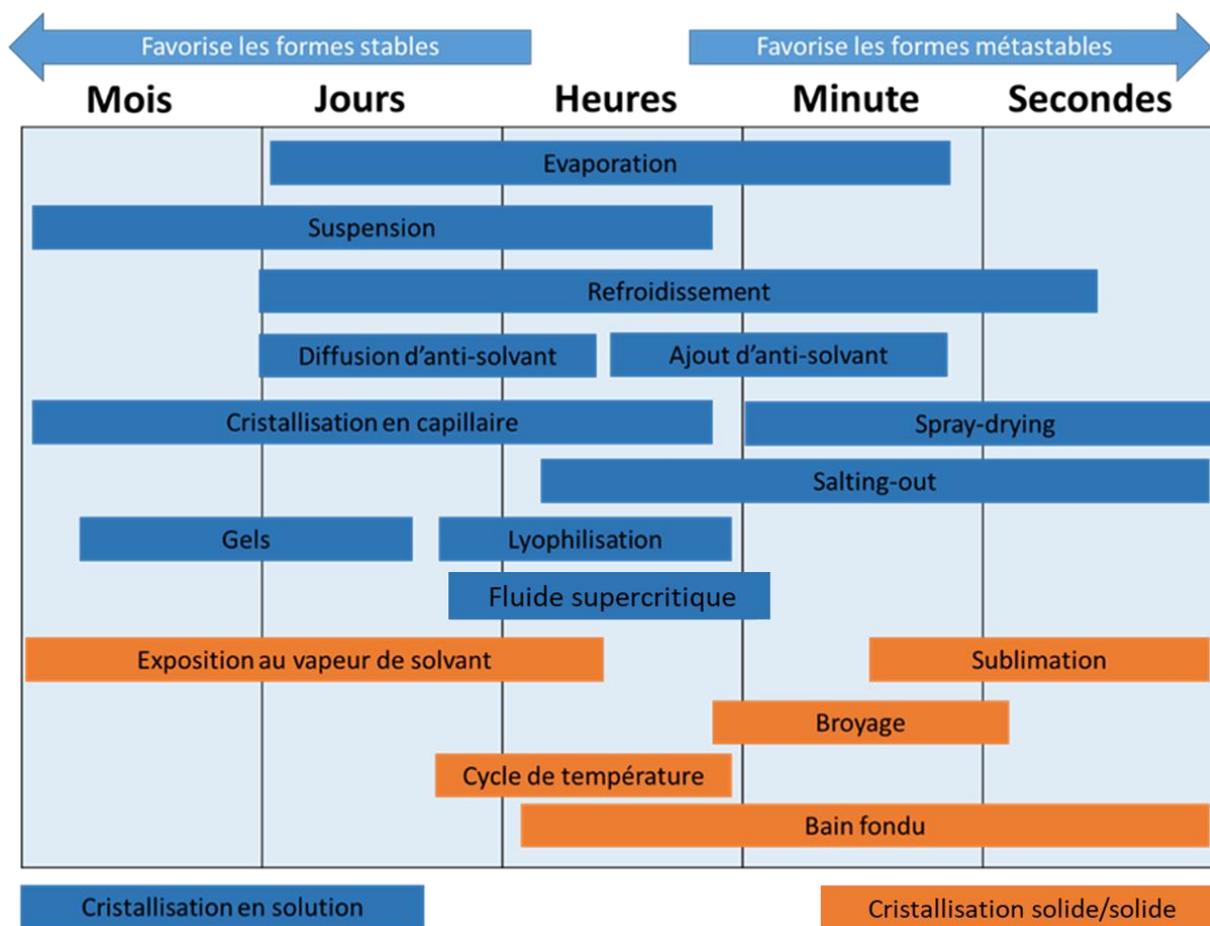


Figure 7. Délais des méthodes de criblage courantes (adapté de A. Newman ¹²)

2.3. Criblage de sels et de co-cristaux

De nos jours, de plus en plus de molécules d'intérêt arrivant en développement pharmaceutique sont des molécules hydrophobes, ayant une solubilité dans l'eau très faible souvent inférieure à 0,1 g/L. Une solution possible pour améliorer la « solubilité apparente » de la poudre est le broyage en fines particules améliorant la cinétique de dissolution, mais n'agissant pas directement sur la solubilité. Cette méthode a donc une efficacité très limitée. La méthode la plus courante, et souvent la plus efficace, est de former un sel de principe actif ou un co-cristal. Cela permet d'améliorer la solubilité en phase aqueuse, mais aussi d'autres propriétés physico-chimiques comme la stabilité et l'hygroscopicité mais également des propriétés d'usage comme la filtrabilité et l'écoulement sans modification de la molécule.

2.3.1. Formation d'un sel

Un sel se forme par réaction entre un acide et une base. Tout composé acide ou basique peut à priori former un sel avec un contre-ion mais sa bonne formation va dépendre

de la force relative de l'acide ou de la base. C'est pourquoi la connaissance des pKa de la base et de l'acide est importante¹³. En pratique, un sel peut être formé suivant plusieurs méthodes de salification :

- la plus utilisée est la méthode en solution où le principe actif et son contre-ion sont dissous à équivalence molaire dans un solvant puis recristallisés (par refroidissement, évaporation, lyophilisation...) sous forme de sel.
- Une autre méthode est le co-broyage où le principe actif et son contre-ion sont broyés ensemble (à équivalence molaire), la salification se faisant alors par réaction solide-solide. Ce co-broyage peut être réalisé manuellement avec un mortier et un pilon ou à l'aide d'un broyeur à billes haute énergie. Cette technique impose de travailler au-dessus de la température de transition vitreuse (Tg) du sel attendu pour conduire au sel cristallisé. Il a été montré que l'ajout d'une petite quantité de solvant ayant des affinités avec les réactifs et abaissant les températures de transition vitreuse améliore grandement la cinétique et le rendement de la réaction¹⁴.

2.3.2. Criblage et choix de sel

Choisir une forme salifiée permet de modifier un ensemble de propriétés, mais il est difficile de trouver une forme en particulier qui permette de cibler une propriété sans modifier les autres¹⁵. Bien qu'une meilleure solubilité aqueuse soit principalement recherchée, d'autres critères sont importants comme le rendement chimique, la qualité cristalline, le polymorphisme (important en production), ou encore la toxicité et les aspects pharmacocinétiques.

Afin d'évaluer la faisabilité des différents sels et leurs propriétés physico-chimiques un criblage est généralement réalisé. La stratégie de criblage qui va être mise en place à ce stade du développement est d'une grande importance. En effet, la cristallisation d'une dizaine de sels doit être évaluée dans une quinzaine de solvants et les phases cristallines obtenues doivent être caractérisées à l'aide de techniques variées pour retirer un maximum d'informations, le tout avec des quantités de matière première faibles (inférieures à 5 g). Des stratégies et des exemples de criblage de sels sont présentés par M. J. Bowker dans « Handbook of Pharmaceutical Salts »¹⁶

2.3.3. Formation d'un co-cristal

Un co-cristal est formé lorsqu'une molécule neutre est présente dans un composé cristallin à un ratio stœchiométrique défini. Cette molécule appelée « co-crystal former » ne doit pas être chargée (auquel cas il s'agira d'un sel) et ne doit pas être un solvant (auquel cas il s'agira d'un solvate). Les techniques permettant d'obtenir un co-cristal sont les mêmes que pour l'obtention d'un sel, mais la technique la plus utilisée est le co-broyage. Je ne parlerais

pas du criblage de co-cristaux qui est en dehors de mon sujet d'étude, mais je renvoie le lecteur vers le livre « Pharmaceutical Salts and Co-crystals »¹⁷ pour approfondir le sujet.

2.4. Techniques de caractérisation du solide

Les techniques de caractérisation du solide sont variées, chacune apportant des informations différentes et bien souvent complémentaires. Parmi ces techniques, la plus répandue pour avoir une vision précise de l'arrangement cristallin est certainement la diffraction des rayons X par un monocristal. Cette technique nécessite de produire des monocristaux de qualité rarement accessibles en début de développement en particulier lors d'une étude de choix de sel. La diffraction des rayons X sur poudre (DRXP) est aussi très utilisée, les quantités de matière mises en jeu avec cette approche sont plus importantes, mais les informations pouvant être déduites sont à la fois qualitatives et quantitatives (identification des phases, dosage des phases, etc). Il est aussi possible de réaliser de la DRXP en chambre thermostatée ou à humidité contrôlée afin de suivre l'évolution du solide (transition de phase, hydratation, dégradation...) pendant un changement environnemental. Il est souvent judicieux de mettre en perspective des diffractogrammes obtenus avec des techniques d'analyse thermique comme la Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC). Cette dernière permettra de diagnostiquer, entre autres, une désolvatation, une transition de phase (solide-solide) et de mesurer une température de fusion (il ne faut pas oublier que la DSC est une mesure dynamique, la température de fusion mesurée est ainsi dépendante des événements produits lors du profil de température imposé !). Il est aussi judicieux de mettre en parallèle un profil obtenu en DSC avec un profil obtenu en Analyse thermogravimétrique (ATG) ce qui peut permettre d'interpréter des événements difficilement interprétables avec une seule de ces techniques. La gravimétrie d'absorption d'eau (DVS) permet quant à elle de mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la pression de vapeur d'eau et ainsi d'évaluer son hygroscopicité. Elle peut aussi être utilisée avec certains solvants organiques pour étudier la solvatation d'une poudre.

Les techniques d'analyse dites « vibrationnelles » telles que la spectroscopie Raman et proche infrarouge (NIR) sont aussi très utilisées, car elles ont l'avantage de permettre des analyses qualitatives et quantitatives sans être invasives et donc sans dégradation de l'échantillon. Elles peuvent permettre l'identification d'une phase, bien qu'une confirmation par diffraction des rayons X soit souvent nécessaire.

2.5. Le polymorphisme du Sulfathiazole

Le sulfathiazole est un composé organosulfuré utilisé comme principe actif pharmaceutique dans le traitement des infections bactériennes. Très utilisé, il a aujourd'hui été remplacé par des dérivés moins toxiques¹⁸ (cette molécule pouvant provoquer des effets secondaires tels que des irritations cutanées et des réactions allergiques). Cependant, son

efficacité fait qu'il reste utilisé principalement dans le domaine vétérinaire. Bien que son utilisation pharmaceutique soit aujourd'hui plus restreinte, son utilisation en laboratoire de recherche est fréquente dans le domaine de la cristallisation, car le sulfathiazole présente un polymorphisme intéressant. Le sulfathiazole est connu pour avoir cinq variétés polymorphiques différentes¹⁹, bien décrites dans la littérature, mais aussi un grand nombre de solvates²⁰ ce qui l'amène à être utilisé comme molécule modèle dans des études de cristallisation.

Cependant dans la littérature, les noms des différents polymorphes du sulfathiazole sont notés de manière différente et il est parfois difficile de s'y retrouver. Le tableau 1 expose la nomenclature choisie dans ce manuscrit (correspondant à la nomenclature utilisée par la Cambridge Structural Database, CSD) et les informations cristallographiques associées.

Forme polymorphique	I	II	III	IV	V
Forme équivalente dans refcode CSD	Suthaz01	Suthaz	Suthaz02	Suthaz04	Suthaz05
	Suthaz07	Suthaz03	Suthaz11	Suthaz13	Suthaz06
	Suthaz08	Suthaz09	Suthaz12	Suthaz14	Suthaz15
	Suthaz16	Suthaz10	Suthaz17	Suthaz19	
	Suthaz23	Suthaz18 Suthaz20	Suthaz21	Suthaz22	
Groupe d'espace	P2 ₁ /C	P2 ₁ /C	P2 ₁ /C	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
a (Å)	10.554	8.235	17.570	10.867	14.330
b (Å)	13 220	8 550	8 574	8 548	15 273
c (Å)	17 050	15 558	15 583	11 456	10 443
β (degré)	108.06	93.67	112.93	88.13	91.05
Densité (g. cm ⁻³)	1,50	1,55	1,57	1,60	-

Tableau 1 : Nomenclature et données cristallographiques des polymorphes du sulfathiazole (adapté de Abdelli et al²¹).

La stabilité des polymorphes du sulfathiazole a été étudiée dans la littérature, mais l'ordre de stabilité des différents polymorphes change selon les auteurs. Khoshkloo et al proposent un ordre de stabilité suivant les solubilités des différents polymorphes du sulfathiazole qu'ils ont mesurées : I<II<IV<III²². Cependant Blagden et al proposent un ordre suivant la densité calculée des polymorphes : I<II<III<IV²³. Plus récemment, Munroe et al ont

établi l'ordre de stabilité suivant : I<V<IV<II<III en se basant sur des résultats obtenus par DSC et par mise en équilibre de solutions contenant des mixtures de polymorphes du sulfathiazole. Il semble donc que la stabilité des polymorphes II, III et IV ne fasse pas vraiment l'unanimité. Cela est certainement dû aux solubilités très proches de ces trois polymorphes et particulièrement celles des polymorphes III et IV comme peut le montrer les données de la littérature^{22,24}. De plus, il a été montré que la structure de ces deux polymorphes (III et IV) sont très proches²⁵.

Bien que, des procédés de cristallisation permettant d'obtenir uniquement des lots purs des 5 polymorphes ont été rapportés^{26,27}, les conditions de cristallisation de ces polymorphes ne sont pas vraiment claires. Khoshkloo et al. proposent que l'apparition d'un polymorphe est déterminée par le solvant de cristallisation. En fonction de l'affinité entre celui-ci et les différentes faces d'un polymorphe, la nucléation ou la croissance d'un polymorphe pourrait être avantagée au détriment des autres²². Ainsi certains polymorphes ne peuvent pas être obtenus dans certains solvants. Cette vision est loin de faire l'unanimité et d'autres auteurs affirment que les 5 polymorphes peuvent apparaître dans tous les solvants²⁸ et que la cristallisation du sulfathiazole suit la règle d'Ostwald^{23,29}. Il a aussi été montré par cet auteur que le polymorphisme du sulfathiazole pouvait être fortement influencé par la présence d'impuretés²³.

Le système polymorphique du sulfathiazole est complexe et sensible³⁰ mais, de par le nombre de publications sur le sujet, les différents polymorphes sont bien décrits par de nombreuses techniques d'analyse (DRX, Raman, microscopie Optique, « Magic-angle spinning NMR », DSC...) ce qui permettra d'avoir de bonnes références lors de nos expériences de cristallisation pour identifier les différents polymorphes obtenus.

Enfin, l'utilisation de la microfluidique pour l'étude du polymorphisme du sulfathiazole est intéressante, car l'augmentation du nombre d'expériences augmentera la probabilité d'obtenir différents polymorphes. De plus, le confinement dû au faible volume des gouttes permettra d'isoler une phase métastable et d'éviter les erreurs dues à un mélange de polymorphes.

Chapitre 3. Cristallisation en microfluidique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude de l'état solide d'une molécule en phase de développement pharmaceutique nécessite de nombreuses expériences et donc une consommation de matière première importante à un stade où la production de quelques grammes est très onéreuse. De plus, la nucléation étant un phénomène stochastique, il est préférable de répéter ces expériences. Le but est donc d'augmenter le nombre d'expériences indépendantes tout en diminuant les volumes d'études afin d'économiser de la matière première. C'est ce que peut permettre un outil microfluidique.

La microfluidique désigne l'ensemble des technologies permettant la manipulation de fluides dans des canaux de taille submillimétrique, c'est-à-dire des volumes du microlitre au femtolitre. Cette réduction des volumes d'étude justifie la large utilisation des systèmes microfluidiques dans des domaines variés tels que la chimie analytique, la biologie moléculaire, la micro-électronique, l'optique...³¹⁻³³.

Il existe différents types de systèmes microfluidiques :

- Les systèmes microfluidiques à flux continu utilisent des jonctions microfluidiques pour réaliser des mélanges de solutions et de réactifs. Ces mélanges et les réactions qui en découlent se font directement au sein des canaux microfluidiques. En jouant sur les différents débits, il est alors possible de contrôler la quantité de chaque réactif.
- D'autres systèmes microfluidiques plus complexes utilisent aussi la manipulation de flux continus, mais les mélanges se font dans de petits réservoirs. Dans ces systèmes, le remplissage des différents réservoirs se fait par l'utilisation de valves contrôlées par des pompes à vide. Le grand nombre de ces réservoirs permet de réaliser une multitude de conditions expérimentales avec le même dispositif.
- Enfin, les systèmes microfluidiques à base de gouttes sont des systèmes reposant sur la génération de gouttes monodispersées par mélange de deux liquides non miscibles (émulsion). Le volume des gouttes qui sont ainsi formées est généralement compris entre le μL et le pL . Ces gouttes sont isolées entre elles par une phase continue et peuvent être ainsi considérées comme un système fermé sans contact avec l'extérieur et donc comme de véritables nanocristalloirs indépendants. Un grand nombre de gouttes peuvent alors être générées pour permettre la répétition des expériences et effectuer des études statistiques.

La possibilité de réaliser de multiples opérations (mélange, séparation, analyse, etc.) permet la miniaturisation d'opérations complexes et la parallélisation d'expériences donnant accès à une grande quantité de données en utilisant peu de matière première. De plus, la répétition des expériences permet de réaliser des études statistiques du phénomène

stochastique qu'est la nucléation et les petits volumes mis en jeu permettent une consommation de matière première faible. La réduction du volume permet aussi d'atteindre des sursaturations plus importantes et augmente la probabilité d'obtenir des formes métastables³⁴. Ces différents avantages font de la microfluidique un outil de choix pour l'étude de la cristallisation.

Bien que la microfluidique soit de nos jours largement étudiée et utilisée pour la cristallisation de protéines dans le but de résoudre leurs structures, les publications pour son utilisation dans le cadre d'un criblage des conditions de cristallisation (milieu, polymorphisme, choix de sels...) de petites molécules d'intérêt pharmaceutique restent marginales. Cependant, les systèmes variés utilisés dans le cadre de la cristallisation de protéines peuvent être transposés pour d'autres applications. La principale limite de l'utilisation de la microfluidique pour le criblage de molécules d'intérêt pharmaceutique est la nécessité que le système soit compatible avec les solvants organiques et les températures « élevées » (60-80 °C) couramment utilisés pour leur cristallisation. Il est à noter que l'on retrouve en microfluidique, les trois procédés classiques de génération de sursaturation : mélange de solutions-relargage, évaporation et batch (avec variation de température).

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps l'hydrodynamique et la manipulation de fluide à l'échelle submillimétrique. Ensuite, nous verrons les différents matériaux utilisés pour la fabrication de systèmes microfluidiques. Et enfin, nous exposerons les différents exemples et applications de la microfluidique en cristallisation.

3.1. Manipulation de fluides et hydrodynamique

Nous allons ici nous intéresser aux phénomènes hydrodynamiques qui régissent l'écoulement de fluides et la formation de gouttes dans des canaux microfluidiques. Bien que les lois physiques de la mécanique des fluides soient les mêmes à l'échelle microscopique et à grande échelle, certains phénomènes négligeables macroscopiquement deviennent prépondérants à l'échelle microscopique comme la capillarité, alors que d'autres comme la gravité deviennent négligeables.

3.1.1. Hydrodynamique des flux continus en microfluidique

Le nombre de Reynolds (Re) représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses et permet de déterminer le régime d'un écoulement :

$$Re = \frac{\rho_c \times v_c \times W}{\mu_c}$$

ÉQUATION 9

ρ_c : masse volumique de la phase continue [kg/m³]

μ_c : viscosité dynamique du fluide [kg/(m.s)]

v_c : vitesse caractéristique du fluide [m/s]

W : diamètre du canal correspond à sa dimension caractéristique [m]

Si $Re > 2000$: Le régime est considéré comme turbulent (Figure 8a)

Si $Re < 1$: Le régime est considéré comme laminaire (Figure 8b)

Dans le cas de la microfluidique, les dimensions caractéristiques et les vitesses mises en jeu sont faibles. Le nombre de Reynolds est alors inférieur à 1. L'inertie peut donc être négligée et le régime d'écoulement est laminaire. Ainsi la vitesse moyenne des fluides dans un canal microfluidique cylindrique peut être évaluée à partir du diamètre W des canaux et du débit Q comme suit :

$$v = \frac{Q}{\pi (W/2)^2}$$

ÉQUATION 10

Q : débit [m³/s]

W : diamètre du canal [m]

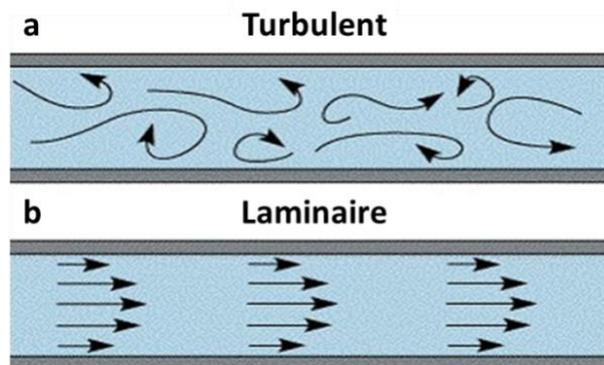


Figure 8. Différents types d'écoulement : a) Turbulent ($Re > 2000$) b) Laminaire ($Re < 1$). Les flèches représentent les champs de vitesse dans le fluide.

Un paramètre important à prendre en compte lors de l'élaboration d'un montage microfluidique est la perte de charge. Celle-ci correspond à la dissipation d'énergie mécanique par frottement d'un fluide en mouvement. Elle peut être caractérisée par une variation de pression ΔP . Une manière simple de calculer la perte de charge dans un canal cylindrique en écoulement laminaire est d'utiliser la loi de Poiseuille :

$$\Delta P = \frac{8Q\mu l}{\pi\left(\frac{W}{2}\right)^4}$$

ÉQUATION 11

Q : débit [m³/s]

μ : viscosité dynamique du fluide [kg/(m.s)]

l : longueur du canal [m]

W : diamètre du canal [m]

Cette équation permet aussi le calcul de la pression appliquée en un point du circuit.

3.1.2. Hydrodynamique des gouttes en microfluidique

La microfluidique à base de gouttes repose sur la production de gouttes de taille et de fréquence contrôlées dans des canaux de géométrie précise. Les gouttes sont formées par émulsification entre deux fluides non miscibles (exemple : huile/eau). Le fluide ayant le moins d'affinité avec la surface du canal microfluidique formera des gouttes et est appelé phase dispersée. Le fluide ayant le plus d'affinité avec la surface du canal est appelé phase continue. La mouillabilité des canaux est donc un paramètre important pour un montage microfluidique. En effet, des canaux hydrophobes permettront la génération de gouttes d'eau dans une huile (qui mouillera le canal), alors que des canaux hydrophiles permettront la génération de gouttes d'huile dans l'eau (qui mouillera le canal). Les débits des différents fluides sont contrôlés soit par un pousse-seringue, soit par des pompes appliquant une pression sur les fluides. Comme pour la microfluidique à base de flux continu, le nombre de Reynolds va déterminer le régime d'écoulement dans les canaux. De plus, il est possible en jouant sur les débits des différents fluides et sur la géométrie du dispositif de faire varier les caractéristiques des gouttes : fréquence, taille, composition.

3.1.2.1. Nombres et dimensions caractéristiques

L'interaction entre la phase dispersée (D) et la phase continue (C) dans un canal conduit à la création d'une interface caractérisée par l'énergie interfaciale γ_{CD} . La longueur capillaire (l_c) permet de déduire pour quelle dimension caractéristique les effets capillaires dominent les effets de la gravité (équation 12).

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma_{CD}}{\Delta\rho \times g}}$$

ÉQUATION 12

γ_{CD} : énergie interfaciale entre les phases continue et dispersée (en J/m² ou kg/s²)

g : l'accélération de la pesanteur (m/s²)

$\Delta\rho$: la différence de masse volumique entre les deux phases (kg/m³)

Si le diamètre du canal (W) est inférieur à l_c , les effets de la gravité sont négligeables et les gouttes ne sont pas aplaties contre la paroi.

En microfluidique à base de gouttes, le nombre capillaire (Ca) joue un rôle primordial dans le mécanisme de formation des gouttes (équation 13). Ca reflète la compétition entre la contrainte de cisaillement imposée par la phase continue et l'énergie interfaciale entre les phases continue et dispersée ³⁵ :

$$Ca = \frac{\mu_c \times v_c}{\gamma_{CD}}$$

ÉQUATION 13

v_c : vitesse de la phase continue (m/s)

μ_c : viscosité dynamique de la phase continue (kg.m⁻¹.s⁻¹)

Un faible Ca indique que l'énergie interfaciale est élevée comparée aux contraintes visqueuses et qu'elle domine la force de cisaillement.

3.1.2.2. Génération de gouttes en microfluidique

Il existe deux méthodes de génération de gouttes : par « flow-focusing » (ou focalisation de flux), et par « cross-flowing » (ou flux transversaux). En « flow-focusing », le flux de phase dispersée est pincé perpendiculairement par deux flux de phase continue, ce qui conduit à la rupture de la phase dispersée en gouttes parallèlement à sa direction d'injection (Figure 9a). En « cross-flowing », la phase continue croise perpendiculairement le flux de phase dispersée, conduisant à la formation des gouttes perpendiculairement à l'entrée de phase dispersée. Cette méthode peut être obtenue avec une jonction soit en croix (Figure 9b) soit en T (Figure 9c).

La génération de gouttes en microfluidique est très souvent aidée par l'utilisation d'un tensioactif. Celui-ci s'adsorbe à l'interface goutte/huile, réduisant l'énergie interfaciale, ce qui facilite la formation de cette nouvelle interface et ainsi stabilise l'émulsion en minimisant les risques de coalescence des gouttes³⁶. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de tensioactifs doit être évitée dans les études de cristallisation, car ceux-ci peuvent interagir avec le processus de cristallisation³⁷.

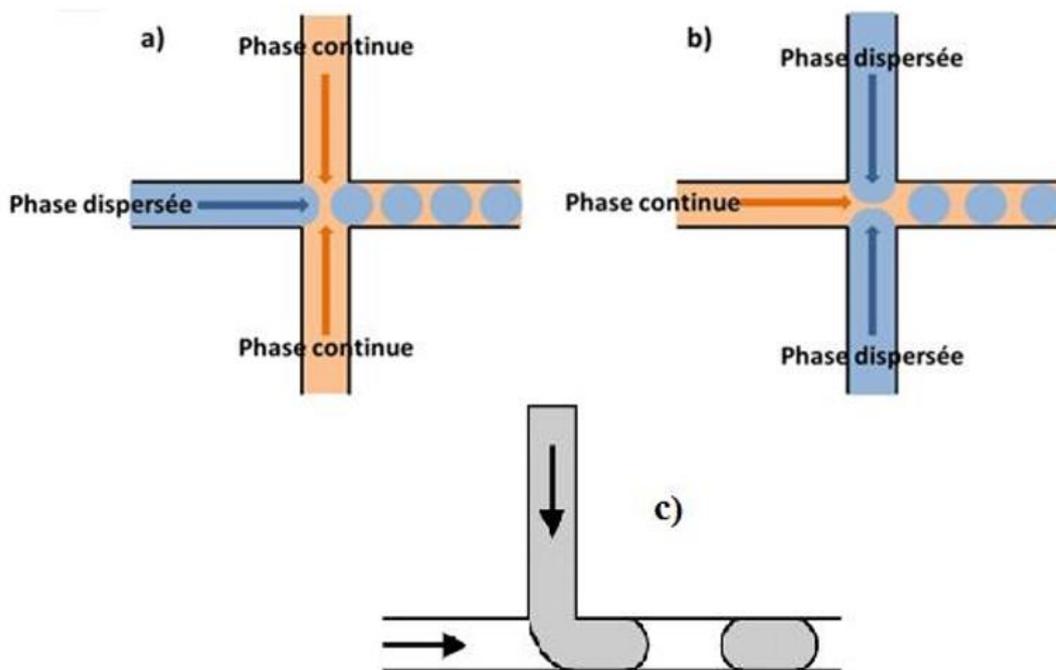


Figure 9. Différentes méthodes de génération de gouttes en microfluidique. a) par flow-focusing, b) par cross-flowing dans une jonction en croix et c) par cross-flowing dans une jonction en Té.

3.1.2.3. Régimes et mécanismes de formation des gouttes

La taille des gouttes générées est influencée à la fois par le Ca et par le ratio des débits ou des vitesses moyennes (calculées avec l'équation 10). Différents régimes et mécanismes de formation des gouttes peuvent être observés dans une jonction en Té. En *cross-flowing*, quatre régimes sont couramment décrits³⁸ :

- En régime *squeezing*, la goutte en formation remplit le canal de sortie avant de se détacher grâce à la chute de pression interne³⁹. La longueur de la goutte est alors supérieure au diamètre du canal de sortie, ce qui lui confère le nom de « plug » (Figure 10a). Ce régime est observé aux faibles valeurs de Ca ($<0,01$).
- Le régime *dripping* correspond à une goutte qui se détache avant d'avoir rempli le canal de sortie (Figure 10b) à cause de la contrainte de cisaillement de la phase continue³⁸. Sa taille est donc inférieure à celle du canal de sortie. Ce régime est observé aux valeurs de $Ca > 0,02$.
- Le régime *jetting* correspond à un écoulement de la phase dispersée sous forme d'un jet qui se déstabilise pour former des gouttelettes loin de la jonction (Figure 10c). Ceci est dû à l'énergie interfaciale γ_{CD} qui est plus faible dans le cas de gouttelettes comparées à celle d'un cylindre de liquide, malgré un volume identique. Les

gouttelettes sont alors transportées par l'écoulement de la phase continue⁴⁰. Ce régime est observé aux valeurs très élevées de Ca (proche de 0,2). Dans ce régime, la taille des gouttes augmente avec les débits appliqués.

- Le régime transitoire est le régime intermédiaire entre le *squeezing* et le *dripping*⁴¹. Le détachement des gouttes est contrôlé à la fois par la chute de pression et la contrainte de cisaillement. Même si la plupart des auteurs ne décrivent pas ce régime transitoire, une valeur critique de $Ca \approx 0,015$ peut être définie⁴⁰.

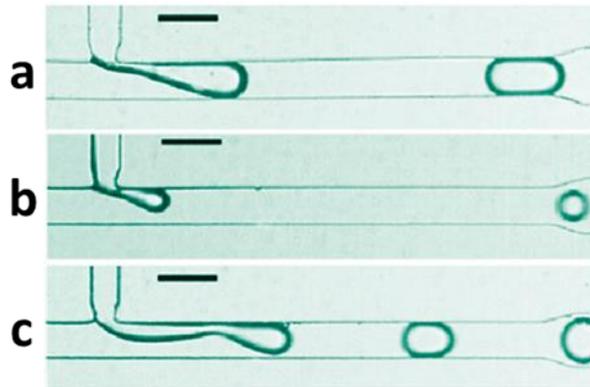


Figure 10. Régime de génération des gouttes en microfluidique : a) *squeezing*, b) *dripping*, c) *jetting*.⁴²

Le nombre capillaire dépendant fortement de la phase continue utilisée, on peut en déduire que le choix de l'huile en microfluidique à base de gouttes est un paramètre primordial. Le choix d'une huile se fait alors en fonction de sa viscosité, de son affinité avec les parois du canal microfluidique et de son immiscibilité avec la phase dispersée (liée à γ_{CD}). Ainsi, des huiles fluorées sont très souvent utilisées, car immiscibles avec la majorité des solvants utilisés comme phases dispersées.

3.1.2.4. Taille des gouttes

La taille des gouttes est caractérisée par le rapport entre sa longueur notée L et le diamètre W du canal de sortie. Il a été montré au laboratoire que le rapport L/W était influencé par le rapport des vitesses des phases dispersée et continue (V_D/V_C), la vitesse totale ($V_{TOT} = V_D + V_C$) et le nombre capillaire Ca ⁴³. Lorsque la longueur L est inférieure au diamètre ($L/W < 1$) (Figure 11a), les gouttes sont sphériques et mobiles dans la phase continue, risquant de coalescer puisque l'on n'introduit pas de tensioactif. Si $L/W > 2$, les gouttes sont allongées et le contact avec la paroi du canal est important, on parle alors de plugs (Figure 11b). Il est à noter que dans le cas de mélanges de solutions dans la goutte, l'homogénéité des gouttes s'établit d'autant plus lentement que les plugs sont longs car le mélange se fait essentiellement par diffusion (voir A-3.1.2.5). Dans le cas intermédiaire où $1 \leq L/W \leq 2$, le

contact avec la paroi du canal est faible, tout en évitant la coalescence des gouttes (Figure 11c) et les gouttes sont homogènes.

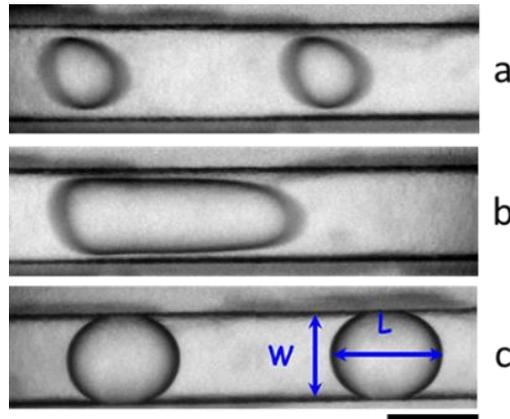


Figure 11. Différentes formes de gouttes en mouvement. a) Gouttes petites et instables avec $L/W < 1$. b) Gouttes de type plug avec $L/W > 2$. c) Gouttes avec $1 \leq L/W \leq 2$. Barre d'échelle : $500\mu\text{m}$.⁴³

Un autre paramètre important est la fréquence des gouttes (f_G), car plus les gouttes sont proches plus elles risquent de coalescer. Il n'existe pas, à ce jour, de loi universelle pour la prédiction de L/W et de f_G . Cependant des relations empiriques entre L/W ou f_G et les paramètres opérationnels, tels que V_D/V_C , V_{TOT} et Ca , ont été montrées¹⁰.

3.1.2.5. Mélange

La microfluidique peut permettre de réaliser des mélanges de solutions, pour réaliser des réactions chimiques dans les gouttes. Les solutions peuvent alors être mélangées dans la phase dispersée avant, pendant ou après la génération des gouttes.

3.1.2.5.1. Mélange avant la formation des gouttes

Le mélange de deux solutions de réactifs avant la formation des gouttes est difficile si les deux flux sont parallèles. En effet, deux phases de même nature injectées dans un canal avancent côte à côte de façon laminaire (dû au faible Re), et se mélangent uniquement par diffusion⁴⁴. Le mélange est alors très lent.

On peut cependant mélanger les réactifs avant de remplir le système d'injection comme dans une seringue par exemple. Mais le volume est plus grand dans la seringue et nous avons montré que le temps de nucléation diminuait lorsque le volume augmentait. Ainsi, la réaction risque de se produire dans le système d'injection et non dans les gouttes.

Une solution est de réaliser le mélange in situ en utilisant deux jonctions en T (Figure 12), une en amont pour le mélange et une pour la génération des gouttes. La première jonction en T sert à injecter perpendiculairement les deux solutions de réactif afin de garantir leur mélange à la sortie. Puis on crée les gouttes en rajoutant la deuxième jonction en T dans laquelle on injecte la phase continue. Cependant, la réaction risque de se produire dans le flux

de phase dispersée entre les deux Té avant la formation des gouttes et non dans les gouttes (Figure 12 zone orange).

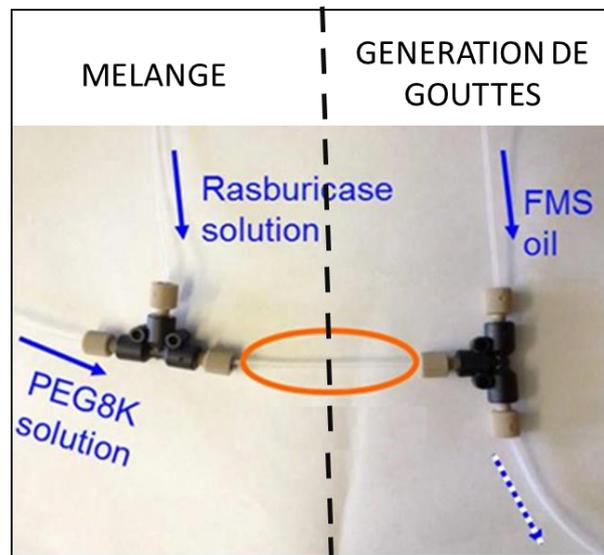


Figure 12. Montage avec deux jonctions en Té. Le premier Té (à gauche) permet de mélanger la solution à cristalliser (la Rasburicase) avec l'agent cristallisant (le PEG), et le second Té (à droite) génère les gouttes grâce à de l'huile (FMS). Il y a un risque de précipitation dans la zone entourée en orange.¹⁰

3.1.2.5.2. Mélange lors de la formation des gouttes

Lors de la formation des gouttes, il est possible de réaliser un mélange de solutions lors de la formation des gouttes de plusieurs manières. Tice et al⁴⁴ proposent un mélange des solutions en les injectant dans un flux d'huile fluorée comme présenté sur la Figure 13. Les gouttes sont mélangées rapidement par recirculation, représentée par des flèches blanches dans la Figure 13. Ainsi, les gouttes deviennent homogènes en composition dans le volume.

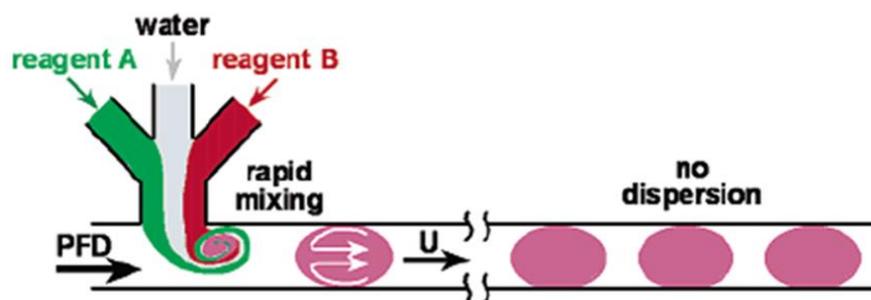


Figure 13. Représentation schématique de la formation de gouttes à partir de multiples solutions aqueuses en les injectant dans un flux d'huile fluorée (PFD) non miscible. Les gouttes sont mélangées rapidement par recirculation, représentée par des flèches blanches. Ainsi, les gouttes deviennent homogènes en composition et donc complètement identiques.⁴⁴

Une autre réponse est l'utilisation d'une jonction en croix avec une disposition en cross-flowing (Figure 9b). Les gouttes ainsi formées sont homogènes et reproductibles⁴³. Cette disposition a l'avantage d'être facile à mettre en place. Cependant, il est important de noter que des débits très différents entre les phases dispersées peuvent entraîner un reflux de la solution à fort débit vers l'entrée de la solution à faible débit.

3.1.2.5.3. Mélange après la formation des gouttes

Un dernier moyen de mélanger deux solutions consiste à former un train de gouttes de la première solution puis à injecter dans ces gouttes le flux de la deuxième solution⁴⁵. Pour cela, on utilise une jonction en T : dans une première entrée arrivent les gouttes de la première solution formées dans un flux de phase continue (Figure 14A) ; par une deuxième entrée, le flux de la deuxième solution vient se mélanger dans chaque goutte qui circule, car ces deux phases sont miscibles entre elles et immiscibles avec la phase continue (Figure 14B).

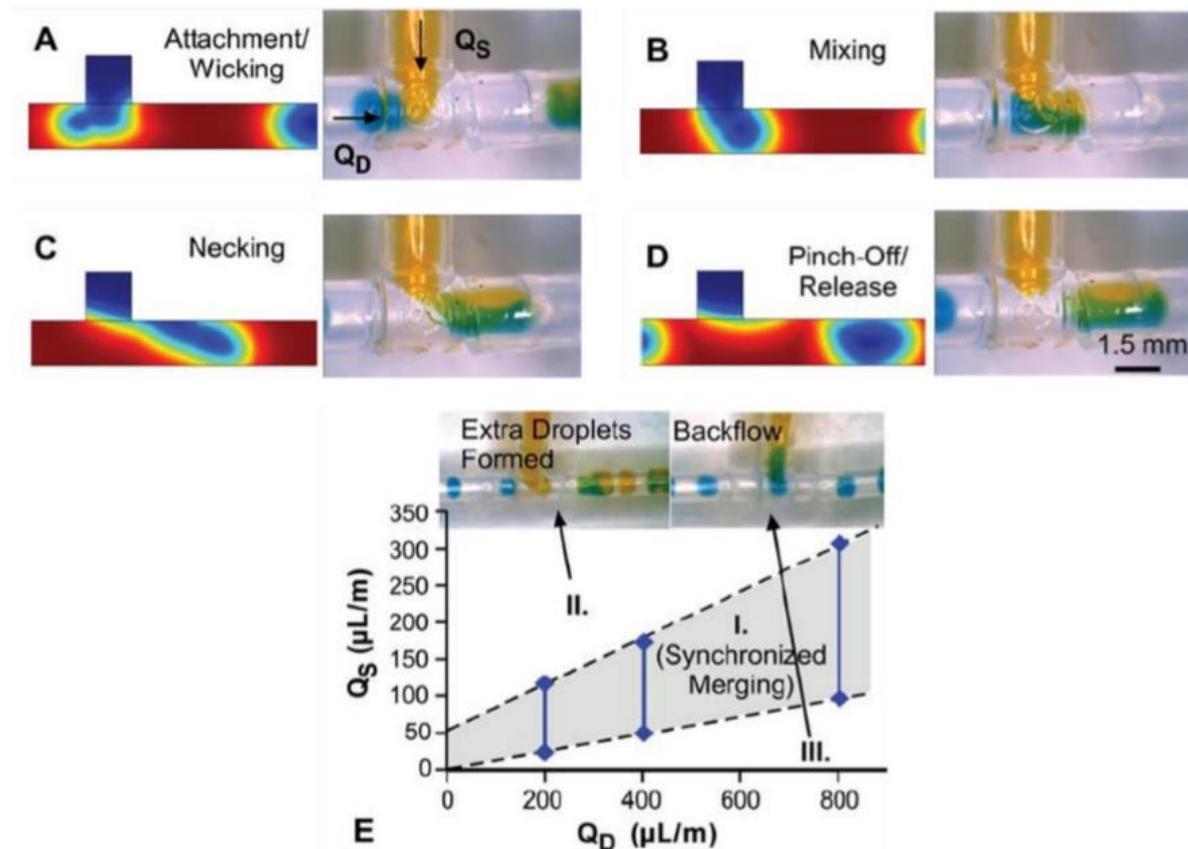


Figure 14. Mélange des gouttes à l'aide d'une jonction en T. (A-D) Simulation (à gauche) et résultats expérimentaux (à droite) montrant les 4 étapes de la fusion des gouttes. (E) Conditions optimales de débit pour la synchronisation de la fusion des gouttes.⁴⁵

L'addition de la deuxième solution à chaque goutte se produit en suivant 4 étapes :

- L'étape de fixation (Figure 14A) : lorsque la goutte arrive sur la jonction en T, les forces capillaires réduisent l'interface entre la goutte et le flux. En l'absence d'agents tensioactifs de stabilisation, ce processus se produit spontanément.

- L'étape de mélange (Figure 14B) : comme la goutte passe à travers la jonction, elle est « nourrie » par la deuxième solution et la taille de la goutte augmente.

- L'étape d'étranglement (Figure 14C) : la contrainte de cisaillement exercée sur le mélange par la phase continue provoque son amincissement à la jonction.

- L'étape de détachement (Figure 14D) : la goutte contenant les deux réactifs se détache et est libérée dans le canal.

Suivant le débit des gouttes de la première solution Q_D et de la deuxième solution Q_S , on obtient une zone de fusion synchrone (Figure 14E, zone I). Dans cette zone, le volume de la deuxième solution ajouté dans chaque goutte de la première solution est proportionnel à son débit Q_S . En dehors de cette zone : si Q_S est élevée, des gouttelettes supplémentaires de la deuxième solution sont injectées dans le train de gouttes de la première solution (Figure 14E, région II) ; si Q_S est faible, une partie du contenu des gouttes de la première solution reflue dans l'entrée de la deuxième solution (Figure 14E, région III)

Il a été montré que l'énergie interfaciale entre phase continue et phase dispersée joue un rôle important dans la stabilisation des gouttes. En dessous d'une certaine énergie interfaciale, les gouttes sont instables dans le capillaire et peuvent coalescer gênant le mélange.⁴⁶

3.1.2.5.4. Homogénéisation du mélange

L'homogénéisation du mélange va dépendre de la géométrie de la jonction et du canal de sortie. Le mélange se fait par recirculation. Cette recirculation est due à des interactions de cisaillement entre le fluide à l'intérieur de la goutte et la phase continue⁴⁷ comme il est montré sur la Figure 15.

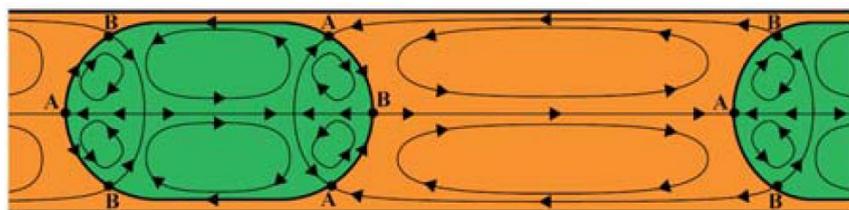


Figure 15. Schéma des zones de recirculation induites par la présence de l'interface entre la goutte (en vert) et la phase continue (en orange)⁴⁷

De plus, il a été démontré que la longueur des gouttes joue un rôle important dans le temps d'homogénéisation de celle-ci. En effet, le mélange de deux solutions à l'intérieur d'une goutte de quelques nanolitres se fait d'autant mieux que les dimensions de la goutte sont telles que $1 < L/W < 2$ ⁴⁴. Cet effet est illustré sur la Figure 16.

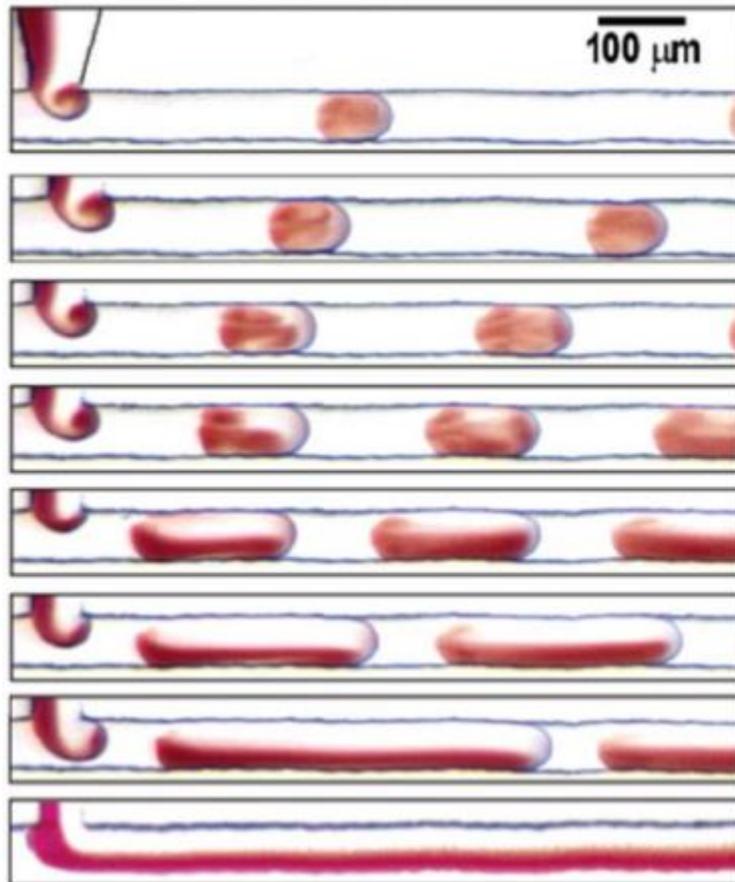


Figure 16. Photos de la formation de gouttes de longueurs différentes, à proximité de leur zone de formation (le rapport des débits eau/huile augmentant de haut en bas).⁴⁴

3.2. Les différents matériaux utilisés en microfluidique

Avant tout, il est important de préciser qu'il existe deux types de dispositifs microfluidiques qui vont nécessiter des matériaux aux propriétés différentes pour leur fabrication :

- les puces microfluidiques où les canaux et jonctions microfluidiques sont imprimés directement sur le matériau (Figure 17c). Les techniques de fabrication de ces puces nécessitent généralement l'utilisation de matériaux ayant un point de fusion relativement faible.

- les dispositifs microfluidiques à base de capillaires (souvent appelés dispositifs « Plug and Play ») pour leur facilité de montage (Figure 17a et b). Ces dispositifs sont généralement constitués de capillaires en polymère fluoré et de jonctions en PEEK dérivés des montages HPLC.

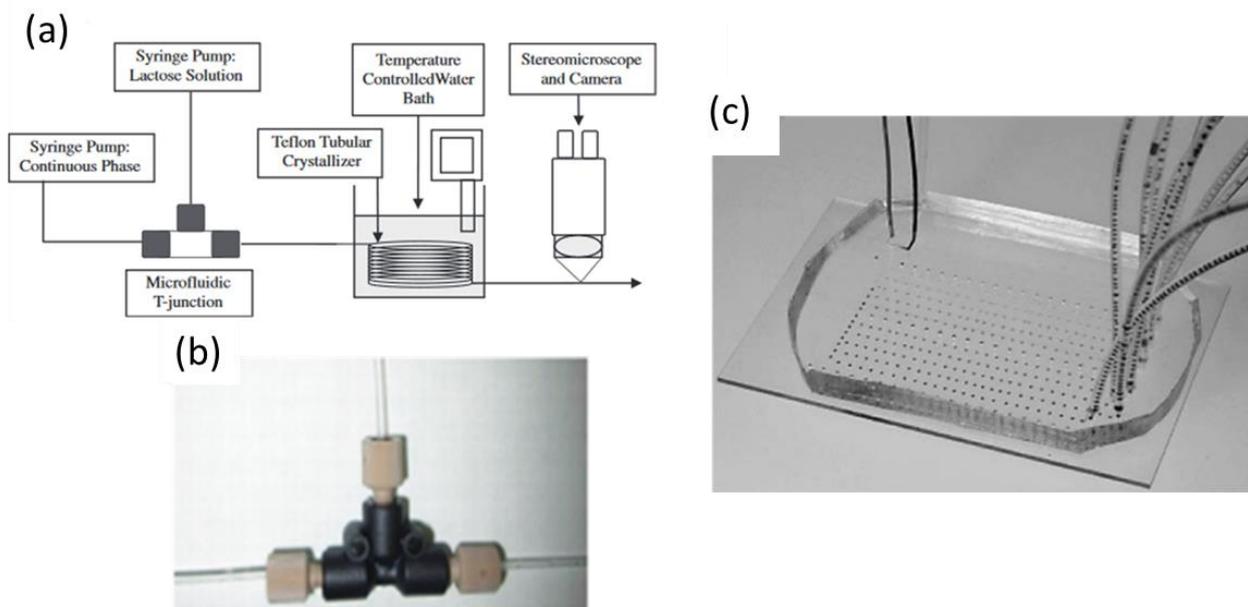


Figure 17. (a) Schéma d'un dispositif microfluidique à base de capillaires⁴⁸, (b) jonction microfluidique en Té⁴⁹, (c) puce microfluidique⁵⁰

Il existe un grand nombre de matériaux utilisés pour la fabrication de systèmes microfluidiques. Le choix des matériaux qui constitueront un système microfluidique est une étape importante. Ce choix est déterminé par plusieurs facteurs tels que le coût, la rapidité de fabrication, les équipements et technologies disponibles et surtout la nature des fluides utilisés. En effet, le système microfluidique doit être compatible avec tous les solvants couramment utilisés en cristallisation, comme les solvants organiques.

3.2.1. Le Polydiméthylsiloxane

Le Polydiméthylsiloxane (PDMS) est un matériau très utilisé pour la fabrication de puces microfluidiques. Il s'agit d'un élastomère silicone qui a la particularité d'être hydrophobe et souple. Le PDMS est compatible avec la quasi-totalité des produits biologiques, il est donc devenu le matériau de prédilection des puces microfluidiques dédiées à la biologie et est très utilisé pour la cristallisation de protéines. Ce matériau comporte une excellente transparence même pour des épaisseurs importantes et les puces microfluidiques en PDMS sont faciles à fabriquer et peu onéreuses. Cependant pour changer de géométrie, il est nécessaire de créer un nouveau moule. Car les canaux microfluidiques sont imprimés sur une surface par lithographie douce, constituant le moule dans lequel le PDMS sera coulé puis réticulé en chauffant dans une étuve. De plus, des solvants organiques (acétone, acétate d'éthyle...) sont régulièrement utilisés en cristallisation, avec lesquels le PDMS n'est pas compatible⁵¹. Les puces microfluidiques en PDMS sont donc réservées à la cristallisation de molécules solubles dans l'eau. Par ailleurs, le PDMS est légèrement poreux à l'eau et aux gaz.

Il ne peut donc être utilisé que pour des temps de cristallisation courts (quelques heures) et à température peu élevée (<50 °C).

3.2.2. Le verre

Le verre est un matériau intéressant, car il est peu réactif chimiquement et présente une excellente transparence. Les puces microfluidiques en verre ont l'avantage d'être compatibles avec tous les solvants organiques utilisés en cristallisation. Cependant, c'est un matériau très dur, cassant et la fabrication de ce type de puces est complexe et onéreuse. De plus, le verre présente des propriétés hydrophiles, l'eau est alors utilisée comme phase continue pour la formation de gouttes, ce qui limite son utilisation (car certains solvants organiques utilisés pour la cristallisation sont miscibles dans l'eau). Cependant, il est possible de traiter les puces en verre pour les rendre hydrophobes, mais cela rajoute une étape de fabrication et les traitements de surface permettant une homogénéité parfaite sont coûteux et peuvent être fastidieux.

3.2.3. Les thermoplastiques rigides

Les matériaux thermoplastiques rigides, tels que le COC (Cyclic Olefin Copolymer) ou le PMMA (Polyméthylméthacrylate), sont des matériaux hydrophobes, peu onéreux et faciles à préparer. Ils ont également une bonne transparence et sont compatibles avec les produits biologiques. Bien que ces matériaux aient une meilleure compatibilité avec les solvants organiques que le PDMS, ils restent incompatibles avec certains solvants couramment utilisés en cristallisation tels que l'acétone pour le PMMA, ou le toluène pour le COC⁵².

Le PEEK (Polyether ether ketone) est un polymère thermoplastique organique ayant une excellente résistance aux solvants organiques. Cependant, c'est un matériau opaque et son point de fusion est élevé (343 °C), c'est pourquoi il n'est pas utilisé pour la fabrication de puces microfluidiques. En revanche, le PEEK est très utilisé en microfluidique à base de capillaires pour jouer le rôle de jonction.

3.2.4. Les polymères fluorés

Les polymères fluorés comme le PFA (Perfluoroalkoxy), le FEP (Fluorinated Ethylene Propylene) ou le PTFE (polytétrafluoroéthylène) sont des matériaux intéressants pour la microfluidique, car ils sont très hydrophobes, inertes chimiquement et souples. De plus, ils présentent une excellente résistance avec les solvants organiques utilisés en cristallisation. Cependant, ils ne sont pas totalement transparents aux UV et aux rayons X ce qui peut les pénaliser dans le cadre de certaines applications. À cause de leur point de fusion élevé (250-300 °C) ces matériaux ne sont pas utilisés pour la fabrication de puces microfluidiques, cependant ils sont très utilisés en microfluidique à base de capillaires. Par ailleurs, il a été montré que la vitesse d'évaporation des gouttes est moins rapide dans des capillaires en PTFE

que dans une puce PDMS⁴⁹. Ainsi des gouttes peuvent ainsi être stockées dans des capillaires en polymère fluoré pendant plusieurs mois.

Le THV (tetrafluoroéthylène, hexafluoropropylène et fluorure de vinylidène) est un matériau présentant des propriétés similaires, mais avec un point de fusion plus faible (120 °C) permettant son utilisation en puces microfluidiques. Mais bien qu'il ait une bonne résistance à certains solvants organiques, son utilisation n'est pas compatible avec l'acétone et l'acétonitrile.

3.2.5. Avantages des systèmes « Plug and Play »

Les systèmes microfluidiques « Plug and Play » sont composés de capillaires en polymères fluorés et de jonctions en PEEK leurs permettant une excellente compatibilité avec la majorité des solvants organiques. Ces systèmes sont dérivés de montages d'HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et d'UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography). Les différents éléments, canaux et jonctions se connectent à l'aide de férules permettant un prototypage rapide et un grand choix de géométries et donc de procédés. Ceci est un avantage considérable par rapport aux puces microfluidiques (COC ou PDMS) pour lesquelles les canaux et les jonctions étant figés, le nombre d'expériences est limité et l'utilisation est même souvent unique (non recyclable). Enfin, les systèmes « Plug and Play » permettent d'avoir une grande versatilité ce qui est particulièrement appréciable lors des étapes de recherche et de développement d'un montage microfluidique.

3.3. Exemples d'outils microfluidiques pour la cristallisation et applications

Il existe un grand nombre d'exemples d'applications dans le domaine de la cristallisation en microfluidique. La très grande majorité concerne la cristallisation des protéines, qui est bien décrite et de manière plus détaillée dans les articles de revue de Leng et Salmon³⁴ de Li et Ismagilov⁵³. Nous nous focaliserons plus particulièrement ici sur la cristallisation en microfluidique de petites molécules.

3.3.1. Cristallisation en microfluidique à base de flux continu

En microfluidique à base de flux continu, la cristallisation a lieu directement dans les canaux microfluidiques. Cette technique est généralement utilisée pour réaliser la cristallisation par ajout d'un antisolvant⁵⁴⁻⁵⁷ parfois couplé avec un saut de température⁵⁵ ou de l'ensemencement⁵⁴.

Bhamidi et al⁵⁶ utilisent le montage microfluidique décrit sur la Figure 18. La solution contenant le soluté est introduite dans le canal du milieu et l'antisolvant dans les canaux latéraux. Le mélange se fait alors par diffusion au sein du capillaire et après une période courte

de mélange, la cristallisation a lieu. Les cristaux sont ensuite récupérés à la sortie de la puce dans des puits pour en permettre une analyse par spectroscopie Raman et ainsi l'identification des différentes formes polymorphiques. L'auteur a montré que la variation des débits joue un rôle important sur le mécanisme de diffusion, influençant le polymorphisme de la glycine. De même, en jouant sur la nature de l'antisolvant une forme polymorphique pourra être privilégiée.

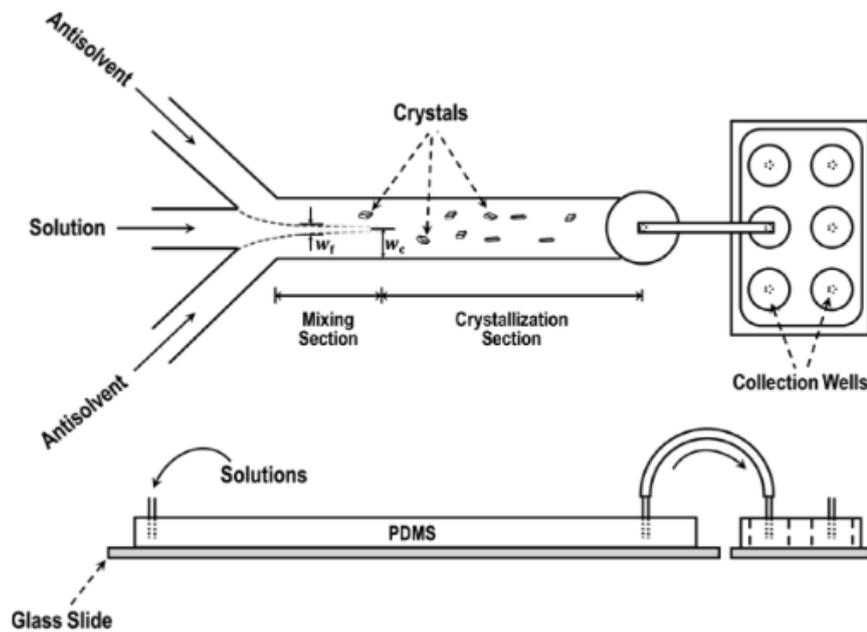


Figure 18. Schéma du fonctionnement de la puce microfluidique proposée par Bhamadi et al ⁵⁶.

Cependant, la cristallisation en flux continu est assez incontrôlable à cause de l'interaction des parois du canal, et la première nucléation qui est donc hétérogène est le plus souvent suivie d'une nucléation secondaire due à la présence d'autres cristaux dans le canal. L'agglomération de cristaux peut aussi provoquer le bouchage des canaux et un traitement des parois est souvent nécessaire. Toutefois, cette technique peut être intéressante pour réaliser de la production à petite échelle en utilisant des canaux de taille millimétrique ⁵⁸.

Une approche un peu différente a été proposée par E. Simone et al ⁵⁹ avec leur plateforme MMicroCryGen. La technologie mise en œuvre ne nécessite pas l'utilisation de pousse seringue pour le remplissage en solution saturée des canaux, car celui-ci se fait par capillarité. Les canaux utilisés sont des « strips » ou rubans (MicroCapillary Film, MCF) composés de 10 canaux de diamètre interne de 200 μm . Ceux-ci sont trempés dans une solution saturée préparée ultérieurement ; par capillarité le canal se remplit puis est stocké dans une enceinte thermostatée où la sursaturation sera générée par refroidissement. Les cristaux obtenus sont ensuite analysés in-situ par spectroscopie Raman. Ce dispositif permet la parallélisation d'expériences. Les auteurs ont utilisé cette approche pour le criblage du polymorphisme de molécules d'intérêt pharmaceutique.

3.3.2. Systèmes intégrés à réservoirs

Les systèmes intégrés à réservoirs ont largement été popularisés dans le domaine de la cristallisation de protéines par l'équipe de Carl L. Hansen⁶⁰⁻⁶². Ces systèmes ont été repris par le groupe de recherche de P. J. A. Kénis qui a développé des systèmes microfluidiques qui sont de véritables plateformes de criblage et les applications en sont diverses : criblage de sels^{63,64}, de polymorphes^{65,66}, de co-cristaux⁶⁷ appliquées aux principes actifs pharmaceutiques et des conditions de cristallisation de protéines⁶⁸. Ces systèmes se présentent sous forme de puces, comportant un grand nombre de puits reliés par des canaux permettant leur remplissage. La composition de ces puces varie suivant leurs applications, mais elles sont composées principalement de PDMS et de COC (Cyclic Olefin Copolymer). Différentes puces ayant des caractéristiques et compositions différentes ont alors été développées pour chaque criblage, et plusieurs méthodes de cristallisation sont proposées (antisolvant⁶⁵, évaporation⁶³, ensemencement⁶⁶). Sur chaque puce, un grand nombre de conditions peuvent être testées.

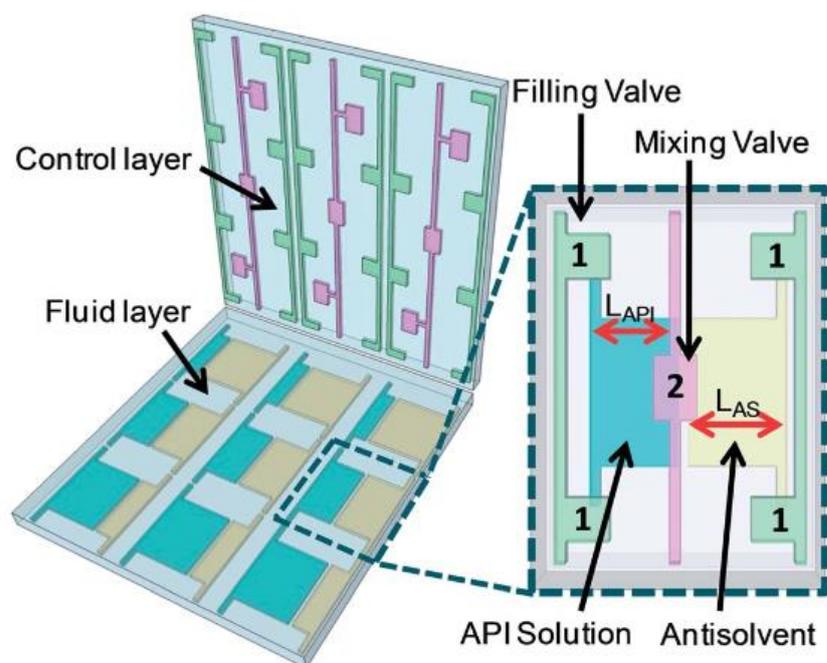


Figure 19. Schéma de la puce microfluidique utilisée pour le criblage du polymorphisme de principes actifs pharmaceutiques (1) vannes permettant le remplissage de chaque puits. (2) vannes permettant le mélange entre deux puits.⁶⁵

La puce développée pour le criblage du polymorphisme par antisolvant⁶⁵ est illustrée sur la Figure 19. Elle est constituée de couples de puits distincts, pour les solutions de principes actifs (API) et d'antisolvants (AS). Des canaux dédiés pour chaque couple de puits permettent le remplissage des deux solutions, indépendamment. Une pompe à vide est reliée au dispositif pour actionner différentes vannes permettant de remplir la puce. La vanne reliant les deux puits d'un couple est ensuite ouverte permettant le mélange par diffusion et induisant la

cristallisation. Différents ratios de concentrations sont testés simultanément, ce qui permet le criblage d'un grand nombre de conditions. L'identification des différents polymorphes peut être obtenue par spectroscopie Raman directement dans la puce.

La puce développée pour le criblage de sel par évaporation du solvant⁶³ est un petit peu différente, car un canal d'évaporation est ajouté (Figure 20). Ainsi, les réservoirs contenant la forme neutre et le contre-ion sont séparés par une valve. Une fois cette valve ouverte les deux solutions se mélangent. Puis, la valve fermant le canal d'évaporation est ouverte provoquant l'évaporation du solvant et la cristallisation. Cette puce permet le criblage de 24 conditions différentes et est compatible avec un spectromètre Raman.

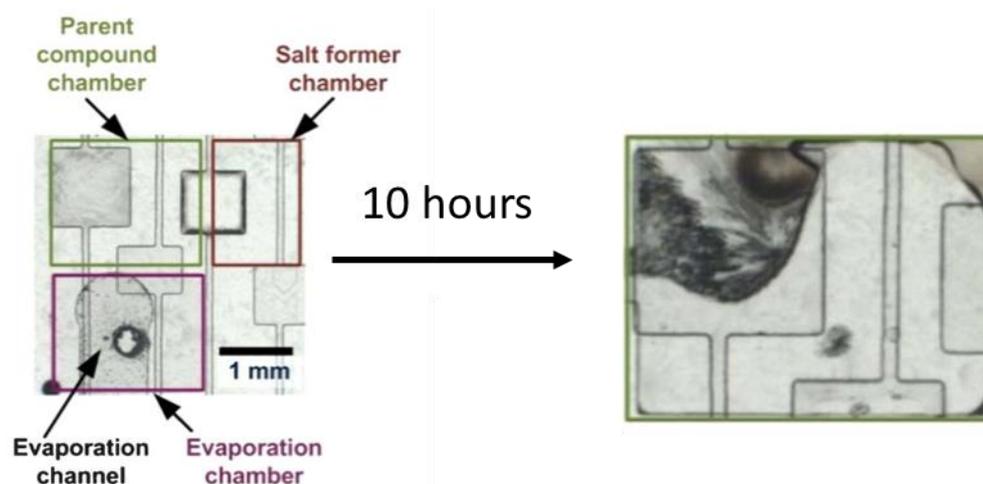


Figure 20. Principe de fonctionnement de la puce pour le criblage de sel par évaporation de solvant.⁶³

Cependant, ces montages microfluidiques présentent un certain nombre de désavantages. En effet, l'utilisation de ce type de puce nécessite un lourd appareillage constitué de pompes et de valves, et les puces proposées sont à usage unique. De plus, cette technologie peut s'avérer difficile à utiliser par des non spécialistes de la technique. Par ailleurs, les matériaux utilisés pour la fabrication de ces puces ne sont pas compatibles avec tout type de solvant. En effet, le COC qui est le matériau en contact avec les solutions n'est pas compatible avec les solvants de type non-polaire (dichlorométhane, chloroforme, benzène, toluène...).

3.3.3. Cristallisation en microfluidique à base de gouttes

L'utilisation de gouttes de petit volume pour l'étude de la cristallisation n'est pas récente. On trouve une première expérience de cristallisation du nitrate de potassium dans des gouttes de 30 nL à 30 μ L en 1959⁶⁹. Cependant, les développements récents de la microfluidique ont énormément élargi les possibilités offertes par la microfluidique à base de gouttes. Son utilisation a largement été popularisée dans le domaine de la cristallisation de protéines par les travaux de l'équipe d'Ismagilov au début des années 2000⁷⁰⁻⁷⁴.

3.3.3.1. *Obtention de cristaux monodisperses en taille*

Dans le domaine de la cristallisation de petites molécules, une première étude est publiée en 2007 par Dombrowski et al ⁴⁸. Leur système microfluidique est composé d'un pousse-seringue permettant de contrôler les débits des phases continue et dispersée délivrés dans une jonction en Té en PEEK. Cette disposition permet de générer des gouttes monodispersées en taille d'une solution de lactose sursaturée (avec un coefficient de variation CV_1 de 3 %) à 80 °C, sans utilisation d'un tensioactif. Les capillaires en téflon contenant les gouttes passent dans un bain thermostaté permettant leur refroidissement et induisant la nucléation. Le temps d'incubation à la température désirée est de 24h. Une caméra permet ensuite de visualiser les gouttes en sortie du bain (Figure 17a). Ce montage leur a permis d'étudier le nombre de cristaux par goutte en fonction de la sursaturation engendrée par le refroidissement. Plus la sursaturation est élevée, plus le pourcentage de gouttes comportant au moins un cristal augmente. De plus, cette étude a montré que cette technique permet d'imposer une taille maximale aux cristaux ainsi produits, en limitant l'effet de la vitesse de croissance. Ils annoncent alors que leur système permet d'obtenir des cristaux dont la dispersion en taille est faible : Le coefficient de variation (CV_2) de la taille des cristaux étant petit (16 %) comparé à celui traditionnellement obtenu par « bulk crystallization » (40 %). Ce CV_2 peut atteindre les 7 % dans le cas où il n'y a qu'un seul cristal par goutte (Figure 21).

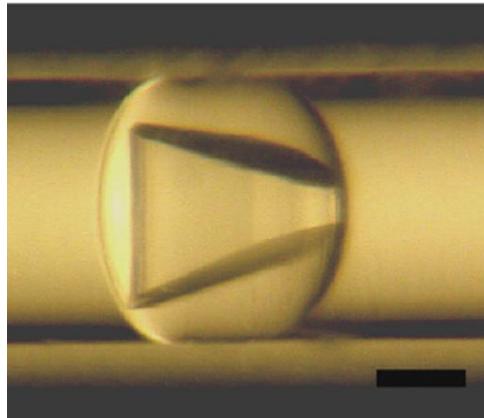


Figure 21. Goutte contenant un monocristal de lactose monohydraté. Barre d'échelle de 50 μm . ⁴⁸

3.3.3.2. *Mesure de la solubilité*

Laval et al proposent une puce microfluidique en PDMS pour une mesure directe et très visuelle des courbes de solubilité⁵⁰. Cette puce est simplement constituée d'un générateur de gouttes et de canaux parallèles. Chaque canal est tour à tour rempli avec des gouttes dont la concentration est diminuée d'un canal à l'autre formant un gradient discret de concentration. Les canaux sont ensuite placés entre deux éléments Peltier de températures différentes afin de générer un gradient de température orthogonal au gradient de

concentration (Figure 22a et b). L'abaissement important de la température provoque la nucléation de cristaux dans les gouttes. Après l'étape de cristallisation, toutes les gouttes ont cristallisé. La température est alors remontée pour l'ensemble de la puce, mais avec un gradient de 65 à 32 °C de la partie gauche à la partie droite de la puce. Ainsi, pour les gouttes dans lesquelles la température est supérieure à la température d'équilibre, les cristaux commencent à se dissoudre ; et dans celles où elle est inférieure à la température d'équilibre, les cristaux croissent. La lecture de la solubilité se fait en traçant la courbe passant entre la dernière goutte contenant un cristal et la première goutte n'en contenant plus (Figure 22c et d). Cependant, ce système microfluidique ne permet pas la mesure des courbes de solubilité de différents polymorphes.

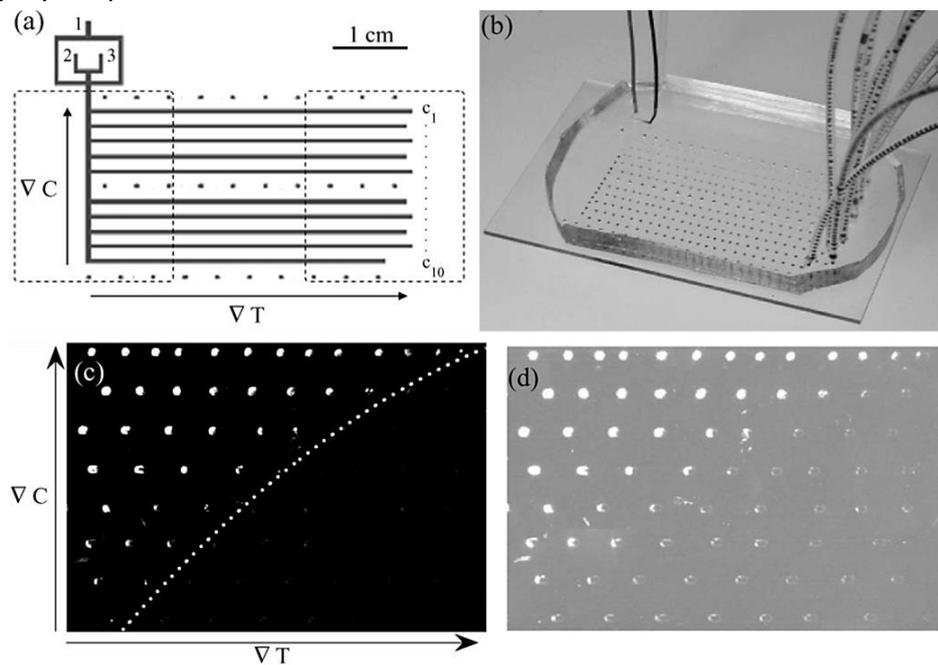


Figure 22. Mesure directe de la solubilité. La concentration en acide adipique a été graduellement diminuée dans les canaux de haut en bas. (a) conception du dispositif microfluidique (la largeur du canal est de 500 μm). L'huile silicone est injectée par l'entrée 1 et les solutions aqueuses par les entrées 2 et 3. Les deux zones en pointillés à gauche et à droite indiquent les positions des deux modules Peltier utilisés pour appliquer des gradients de température ΔT . Les trois lignes horizontales en pointillés marquent les positions des mesures de température. (b) Ensemble de la puce PDMS. (c) Courbe de solubilité en pointillés qui sépare des gouttes vides (sans cristal) des gouttes avec des cristaux. (d) Même image de la position des gouttes avec un contraste différent.⁵⁰

3.3.3.3. Étude du polymorphisme

Une autre puce microfluidique est présentée par Laval et al en 2008, pour l'étude du polymorphisme du nitrate de potassium⁷⁵. Cette puce est constituée d'un générateur de gouttes avec une géométrie de type flow-focusing permettant la génération d'un grand nombre de gouttes et le contrôle de leur concentration. Ces gouttes monodispersées en taille et en concentration sont stockées dans un long canal de la puce qui est refroidi par un dispositif Peltier, induisant la nucléation. Si le nombre de gouttes est suffisant, le caractère stochastique de la nucléation fait que certaines cristalliseront sous une forme polymorphique et d'autres sous une autre. La puce est ensuite chauffée afin de dissoudre les cristaux. Deux polymorphes ayant des solubilités distinctes se dissoudront à des températures différentes. En répétant cette opération pour d'autres concentrations, les courbes de solubilité des différents polymorphes peuvent être estimées (Figure 23a). L'avantage de cette méthode est que la forme métastable reste dans la goutte, car elle n'est pas en présence de la forme stable. De plus, les volumes mis en jeu étant faibles, il est possible d'atteindre des sursaturations plus importantes augmentant ainsi la probabilité d'apparition de différents polymorphes. Ce dispositif présente aussi l'avantage de pouvoir être couplé à un spectromètre Raman afin d'identifier le polymorphisme directement dans la puce (Figure 23b et c). Ildefonso et al ont appliqué cette même approche pour la cristallisation du lysozyme et ils ont mis en évidence une phase métastable⁷⁶.

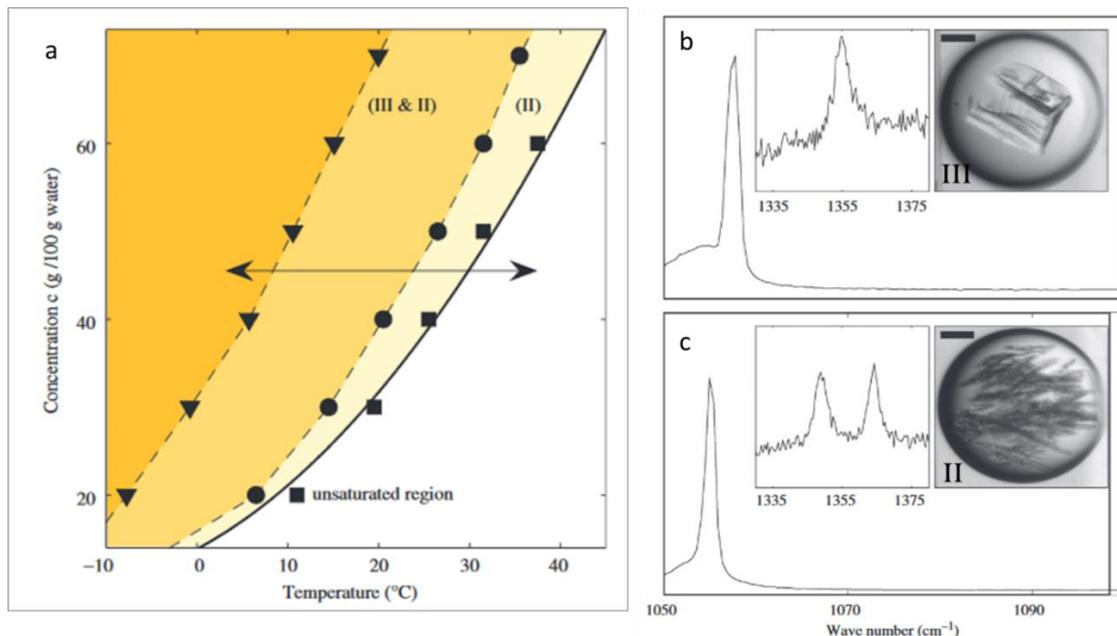


Figure 23. Étude du polymorphisme. (a) Mesure de solubilité et des limites de zone métastable des formes II et III du nitrate de potassium : les carrés représentant la courbe de dissolution mesurée du polymorphe II ; les ronds représentant la courbe de dissolution mesurée du polymorphe III ; Les triangle correspondent à la température où presque tous les cristaux sont apparus dans les gouttes ; La courbe noire représentant la solubilité du polymorphe II

*(b) Faciès et spectre Raman de la forme III. (c) Faciès et spectre Raman de la forme II. Barre d'échelle de 100µm.*⁷⁵

Une étude de l'effet de la sursaturation sur le polymorphisme de l'acide glutamique a été réalisée en microfluidique à base de gouttes⁷⁷. Cette étude montre que la zone métastable de nucléation des cristaux de la phase stable est manifestement plus large dans les microgouttelettes que dans les cristallisoirs traditionnels, ce qui confirme l'effet de la réduction du volume sur la fréquence de nucléation J.

3.3.3.4. Étude de la fréquence de nucléation

La microfluidique à base de gouttes permet de se rapprocher des conditions de nucléation primaire homogène. Cela la rend particulièrement intéressante pour l'étude de la fréquence de nucléation.

La fréquence de nucléation et la cinétique de croissance de cristaux d'eflucimide ont été étudiées dans une puce microfluidique en verre par Teychené et al⁷⁸. Il faut préciser que l'eau sert de phase continue dans les puces en verre, car le verre est hydrophile. Pour cette étude, la sursaturation est atteinte soit par un gradient thermique, si le solvant utilisé est immiscible dans l'eau, soit par transfert de masse si le solvant est partiellement miscible dans l'eau.

Lu et al. utilisent un système microfluidique à base de gouttes pour l'étude de la fréquence de nucléation de l'aspirine, de l'ibuprofène et du lactose⁷⁹. Ce système microfluidique utilise l'air comme phase continue, ce qui permet d'inhiber les transferts de masse entre la phase continue et les gouttes. Les gouttes sont formées par cross-flowing dans une jonction en T en PEEK. La sursaturation est atteinte à l'aide du refroidissement des capillaires dans un bain d'eau de température contrôlée.

La fréquence de nucléation de colloïdes a été mesurée par Gong et al⁸⁰. Des gouttes de colloïde générées par flow-focusing sont stockées dans des capillaires en verre, la cristallisation est ensuite induite par refroidissement. L'évolution de la fraction de gouttes contenant un cristal de colloïde permet alors l'estimation de la fréquence de nucléation. En comparant les résultats qu'ils ont obtenus en microfluidique avec ceux obtenus par « bulk crystallization », Gong et al ont montré que la fréquence de nucléation est surestimée par cette dernière technique.

Ildefonso et al proposent un système microfluidique à base de capillaires facile à utiliser et facilement transposable dans un laboratoire non spécialiste en microfluidique⁴⁹. Ce système microfluidique, composé de capillaires en téflon et de jonctions microfluidiques en PEEK, comporte l'avantage d'être compatible avec tous les solvants utilisés en cristallisation. Ce dispositif (s'inspirant d'études précédentes utilisant une puce en PDMS pour l'étude de la fréquence de nucléation⁸¹ et du polymorphisme⁷⁶ du lysozyme) permet la génération de gouttes monodispersées en taille et en composition, à haute température à l'aide d'un

système thermostaté et d'une jonction en T (Figure 24a). La nucléation est ensuite induite par refroidissement en récupérant le capillaire contenant les gouttes et en le stockant dans une étuve à température connue. Ainsi, plusieurs capillaires contenant chacun des concentrations différentes sont stockés à différentes températures pendant un temps donné. Ce système microfluidique permet l'estimation de la limite de zone métastable d'une molécule dans un solvant donné. Ainsi, les limites de zone métastable du lysozyme en présence de NaCl dans l'eau et de la caféine dans l'éthanol (Figure 24b) ont pu être estimées^{49,76}.

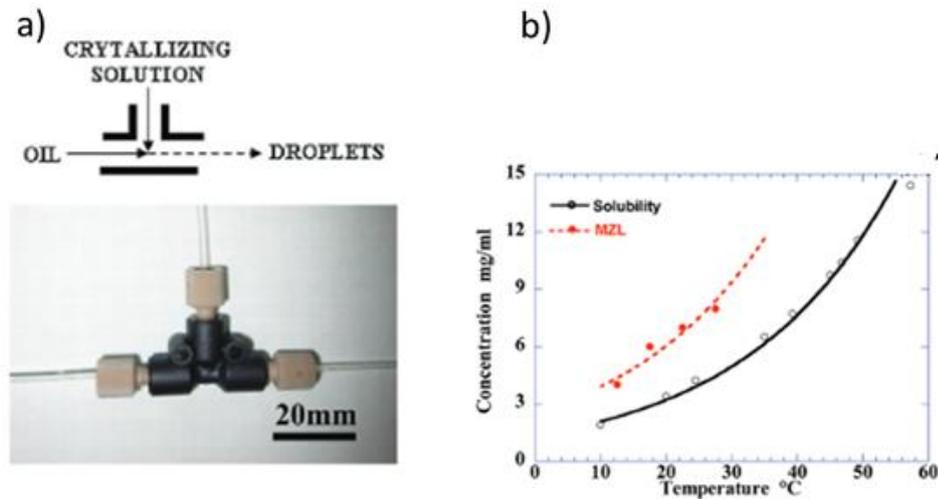


Figure 24. Détermination de la limite de zone métastable (LMZ) de la caféine dans l'éthanol. (a) Schéma du montage microfluidique utilisé et photographie de la jonction en T utilisée. (b) Mesure de la solubilité et de la LMZ de la caféine dans l'éthanol en fonction de la température.⁴⁹

Ildefonso et al ont aussi comparé l'effet de l'huile et de la composition des puces (PDMS/silicone à Téflon-PEEK/FMS) sur la nucléation du lysozyme. Ils ont montré que la nucléation est toujours hétérogène, mais avec plus ou moins d'affinité pour le matériau composant les canaux et l'huile PDMS^{82,83}. Ils ont conclu que l'utilisation d'un système PEEK-Téflon et d'une huile fluorée (FMS) permet de se rapprocher d'une nucléation homogène et donne une fréquence de nucléation plus faible.

3.3.3.5. Vers le criblage à haut débit

La microfluidique à base de gouttes permet la répétition et la parallélisation des expériences. Un grand nombre d'expériences peuvent ainsi être réalisées avec un même système microfluidique et en utilisant peu de matière première, ce qui la rend particulièrement intéressante pour le criblage à haut débit.

Une première approche d'un criblage à haut débit pour l'optimisation des conditions de cristallisation de protéines membranaires est proposée par Li et al⁷⁴. Ce système microfluidique permet la génération de plugs contenant des réactifs à des concentrations

différentes. Les trains de gouttes contenant un même réactif sont séparés par une bulle d'air (Figure 25).

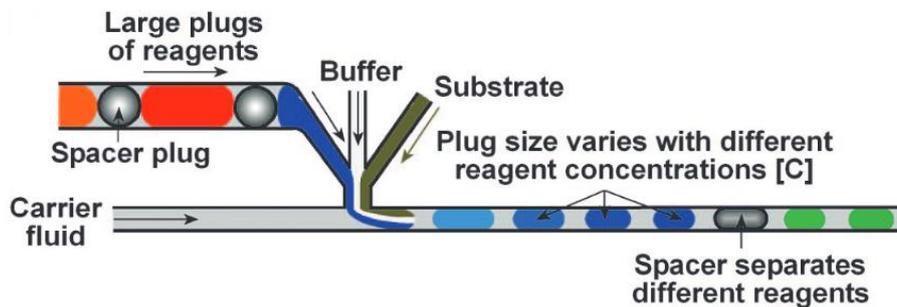


Figure 25. Schéma du système microfluidique utilisé par Li et al pour l'étude de la cristallisation de protéines membranaires.⁷⁴

Une approche plus versatile est proposée par Zhang et al^{84,85}. Leur plateforme microfluidique est composée de trois modules :

- Un module de génération permettant d'envisager plusieurs géométries pour réaliser des mélanges de gouttes
- Un module de détection composé d'un spectromètre UV-Visible équipé d'une fibre optique permettant la mesure de la composition et de la taille des gouttes en ligne
- Un module d'incubation et d'observation composé d'un bain thermostaté où les capillaires sont stockés et observés à l'aide d'une caméra motorisée.

En réalisant des gradients de concentration dans les capillaires et en stockant ces derniers à une température connue, un morphodrome de la cristallisation du lysozyme a été obtenu (Figure 26).

Bien que ne travaillant pas dans le domaine de la cristallisation, l'équipe de Trivedi et al proposent des montages microfluidiques innovants pour la réalisation de criblage haut débit⁴⁵, dont se sont inspirés Gérard et al⁴⁶.

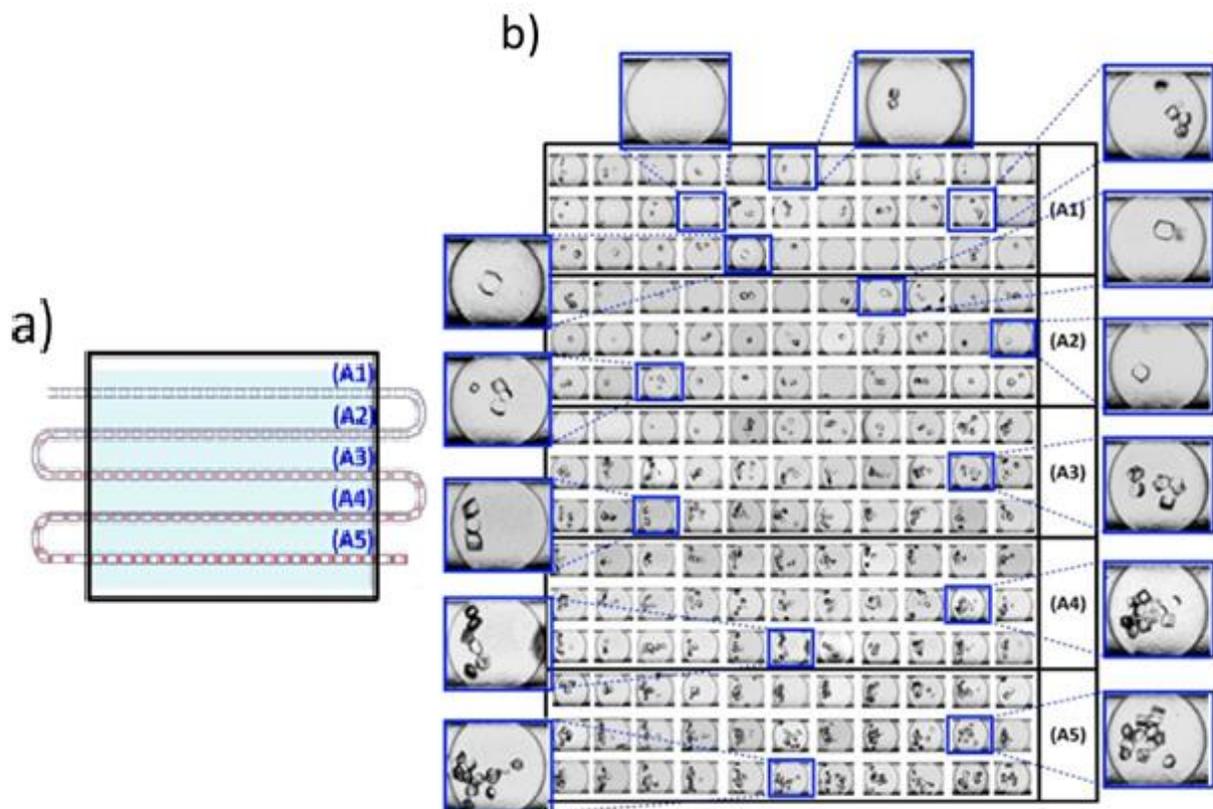


Figure 26. Morphodrome de la cristallisation du lysozyme dans une solution de PEG 5k (15 % wt/vol) et $C_{10}E_5$ (0,08 % wt/vol) par réalisation d'un gradient de concentration. Un gradient de 5 concentrations en lysozyme a été effectué (A1) 5 mg/mL, (A2) 7,5 mg/mL, (A3) 10 mg/mL, (A4) 12,5 mg/mL et (A5) 15 mg/mL. Des capillaires de 500 μm de diamètre interne ont été utilisés. (a) Illustration schématique du gradient de concentration. (b) Morphodrome de la cristallisation du lysozyme pour le gradient effectué.⁸⁴

3.4. Caractérisation en ligne des cristaux

Plusieurs techniques permettent la caractérisation des cristaux obtenus en microfluidique.

3.4.1. Microscopie optique

La microscopie optique (la plus utilisée) permet la visualisation des cristaux contenus dans les canaux, puits ou gouttes microfluidiques afin de déterminer leurs tailles et leurs faciès. Une source de lumière polarisée peut permettre la détection des cristaux. Pour pouvoir utiliser la microscopie optique en microfluidique, il faut évidemment que les matériaux constituant le système microfluidique soient transparents dans le domaine du visible. L'acquisition d'image se fait à l'aide d'une caméra. Un phénomène de polymorphisme peut

être détecté par variation de température et observation en microscopie optique^{75,76}, mais il n'est pas possible avec cette technique de caractériser les différents polymorphes.

3.4.2. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est le plus souvent utilisée. La diffraction des rayons X est une méthode d'analyse physique utilisée pour caractériser la matière cristalline (minéraux, métaux, céramiques, polymères semi-cristallins, produits organiques, protéines,...). À l'aide de cette technique, la caractérisation structurale des cristaux est possible. En microfluidique elle peut être effectuée in situ si le matériau composant le canal microfluidique est assez transparent aux rayons X. C'est le cas du PDMS ou du verre avec lesquels il a été montré que la résolution de structure de protéines était possible^{61,86}. Les autres matériaux, comme les polymères fluorés présentent une moins bonne transparence, il est alors parfois nécessaire d'extraire les cristaux du système microfluidique, ce qui peut être une étape délicate, mais possible⁸⁷.

3.4.3. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est également un outil très utilisé pour la caractérisation du solide. Elle consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la diffusion de la lumière. Le milieu traversé modifie légèrement la fréquence de la lumière suivant sa composition chimique. Elle permet une analyse à la fois quantitative et qualitative d'un échantillon. Cette technique est de plus en plus utilisée in situ en microfluidique⁸⁸⁻⁹⁰ notamment pour l'identification de différentes phases polymorphiques^{65, 75}, de co-cristaux⁶⁷ et de sels⁶³. L'avantage de l'utilisation d'un spectromètre Raman en microfluidique est sa compatibilité avec des matériaux semi-opaques⁸⁸.

3.5. Caractérisation en ligne des solutions

Une multitude de techniques peuvent être couplées à la microfluidique pour la caractérisation des solutions. Ci-dessous, je vais établir une liste non exhaustive des principales techniques en ligne.

3.5.1. Spectrométrie UV/Visible

Une première méthode possible est l'analyse par spectroscopie UV/Visible. En effet, la mesure de l'absorbance des solutions (contenues dans les gouttes ou dans les canaux microfluidiques), illuminées dans la gamme UV-visible, peut donner une information de leur composition si la molécule à détecter absorbe et émet dans cette gamme. Pour cela, des LEDs couplées à des fibres optiques peuvent être utilisées comme source d'excitation et des

photodétecteurs couplés à des fibres optiques comme détecteur. En utilisant des LEDs avec différentes longueurs d'onde d'émission, la détection d'absorbance pourrait être réalisée à de multiples longueurs d'onde simultanément. Trivedi et al ⁴⁵ ont décrit la combinaison d'un système de détection d'absorbance avec le criblage à haut débit d'une chimiothèque dans un système microfluidique à base de gouttes. Le problème principal de la conception du détecteur d'absorbance à fibres optiques est la mise en place des fibres. Une focalisation de la lumière est nécessaire afin d'éviter une perte de lumière. Pour cela, les fibres doivent être parfaitement alignées axialement et placées à proximité l'une de l'autre, de part et d'autre du canal microfluidique. Cette technique a également été utilisée dans le montage microfluidique développé par Zhang et al ¹⁰ permettant la mesure de la concentration, de la taille et de la fréquence des gouttes (Figure 27).

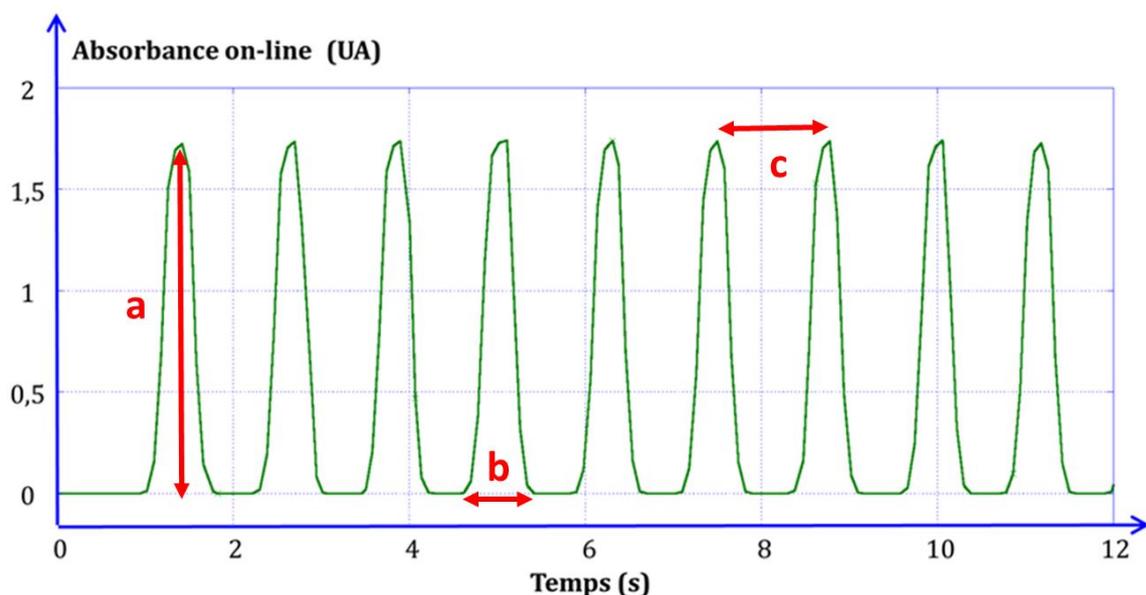


Figure 27. Évolution de l'absorbance en fonction du temps lors du passage de gouttes. (a) Absorbance de la goutte permettant de remonter à la concentration des gouttes, (b) temps de passage de la goutte permettant de remonter à la taille des gouttes, (c) période des gouttes permettant de remonter à la fréquence des gouttes. (adaptée de Zhang et al¹⁰)

3.5.2. Conductimétrie

La conductimétrie procède par la mesure de la conductivité et permet de mesurer la concentration ionique d'une solution. Elle peut aussi permettre la mesure de la taille, de la fréquence et de la vitesse de gouttes. La première utilisation de l'électrochimie pour mesurer la concentration ionique et la taille de gouttes en microfluidique a été réalisée par Luo et al ⁹¹. Cette technique leur a permis de mesurer la composition d'un gradient de concentration en NaCl (allant de 0,02mM à 1 M) au sein de gouttes de quelques picolitres. Cette technique a

également été utilisée pour mesurer une cinétique enzymatique rapide dans un système microfluidique à base de gouttes⁹².

3.5.3. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman présente de nombreux avantages pour son utilisation en microfluidique pour l'analyse de solutions. Elle comporte une haute résolution spatiale et une grande sensibilité et permet la détection à haut débit. De plus, elle est non-invasive et permet des mesures in-situ à travers une puce ou un capillaire microfluidique. Une première application de la spectrométrie Raman dans un système microfluidique à base de gouttes a été rapportée par Cristobal et al en 2006⁹³.

3.5.4. Diffraction des rayons X aux Petits Angles (DXPA)

La DXPA (ou SAXS en anglais) est une technique puissante pour sonder les structures à l'échelle nanométrique. Une mise en œuvre particulièrement puissante du SAXS est de l'appliquer à l'écoulement continu d'échantillons liquides dans des dispositifs microfluidiques. Cette approche a été utilisée abondamment, mais la plupart des études existantes reposent sur l'utilisation de la microfluidique à une seule phase. La combinaison du SAXS à la microfluidique à base de gouttes, contenant plusieurs phases, a été décrite dans l'étude de la formation de nanoparticules d'or dans des gouttes⁹⁴. Une approche consiste à utiliser un dispositif de microcapillaires en verre afin de former des nanoparticules d'or in situ en mélangeant deux liquides aqueux précurseurs dans les gouttes. Ainsi, les gouttes peuvent être sondées in situ et la diffusion due aux nanoparticules d'or est directement isolée des données brutes. Des informations quantitatives sur la taille, la forme et la concentration des nanoparticules dans les gouttes sont ainsi obtenues. Plus récemment Pham et al ont utilisé cette technique pour étudier les interactions macromoléculaires de protéines en solution dans des gouttes microfluidiques⁹⁵.

Conclusion de l'étude bibliographique

Dans cette étude bibliographique, les mécanismes de la cristallisation en solution ont été abordés afin de mettre en évidence les paramètres importants jouant un rôle lors de la cristallisation d'une molécule. Ainsi nous avons pu montrer que la variation de ces paramètres peut engendrer l'apparition de différentes phases ayant des propriétés physico-chimiques bien distinctes. La cristallisation étant une technique très largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, nous avons vu que l'étude de l'état solide (et donc de la cristallisation) d'une molécule d'intérêt pharmaceutique est une étape primordiale de son développement. Cette étape aux enjeux importants est liée à de fortes contraintes. Les criblages de sels et de polymorphes nécessitent un grand nombre d'expériences engendrant une consommation de quantité de matière qui peut être importante à un stade où les quantités disponibles sont faibles. La réduction des volumes utilisés en microfluidique peut permettre de répondre à ce problème. Parmi les différentes techniques microfluidiques, la microfluidique à base de gouttes est particulièrement intéressante. En effet, cette technique permet la génération de gouttes de volume monodisperse, séparées par de l'huile, que l'on peut considérer comme des nanocristalloirs indépendants. Ainsi, il est possible de réaliser un grand nombre d'expériences en utilisant très peu de matière première. De plus, la répétition de conditions identiques permet d'avoir une approche statistique du phénomène aléatoire qu'est la nucléation, et augmente la probabilité de voir ce qui est improbable (nouvelles phases métastables). Cependant, la principale limite de l'utilisation de la microfluidique en cristallisation est l'incompatibilité de certains systèmes avec les solvants organiques couramment utilisés. Un autre frein est l'utilisation de tensioactifs, couramment utilisés pour la formation des gouttes en microfluidique, mais pouvant interagir avec la cristallisation. Pour cela, des systèmes microfluidiques utilisant des jonctions en PEEK et des capillaires en Téflon ont été développés. En plus de leurs compatibilités avec les solvants organiques, ces systèmes « Plug and Play » sont faciles à mettre en œuvre et permettent d'envisager une multitude d'applications sans ajouts de tensioactifs. Enfin, il existe différentes techniques permettant de caractériser en ligne la solution des gouttes et le cristal présent dans les gouttes. L'objectif est donc de développer une plateforme microfluidique versatile répondant à ces exigences : économies de matière première, répétitions des expériences, étude de l'état solide d'une molécule d'intérêt pharmaceutique.

B. Matériels et Méthodes

Chapitre 1. La plateforme microfluidique

La plateforme microfluidique disponible au CINaM a été développée par M. Ildefonso, S.Zhang et C.J.J Gérard lors de leurs thèses dans le cadre de la cristallisation de protéines en système microfluidique^{10, 82, 96}. Même si ce dispositif a été modifié et optimisé pour l'étude de l'état solide de principes actifs pharmaceutiques, les outils de base de cette plateforme sont conservés. Cette plateforme est composée de trois modules dont les principaux composants sont décrits dans cette partie (Figure 28).

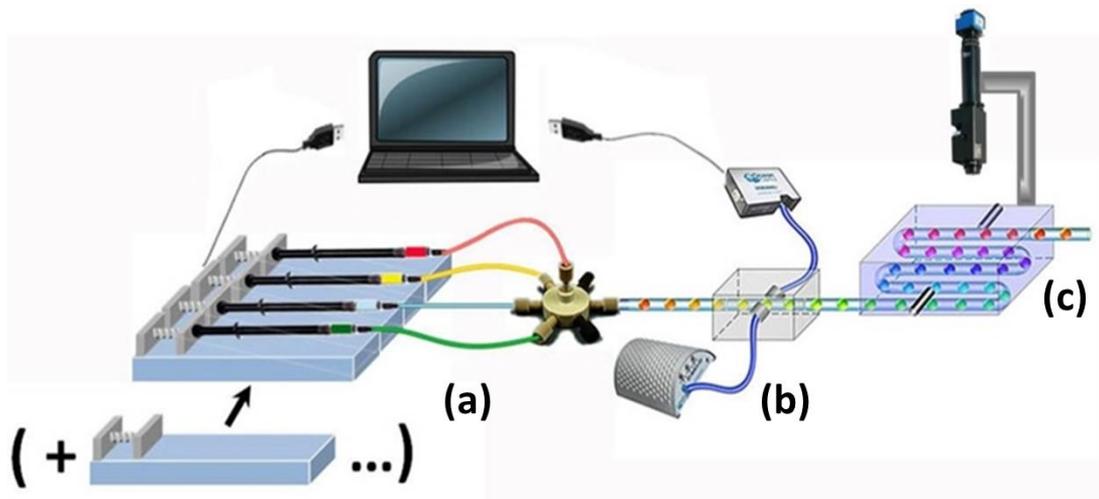


Figure 28. Schéma de la plateforme microfluidique du CINaM comportant trois modules (a) module de génération des solutions et des gouttes (b) module de caractérisation (c) module d'incubation, de stockage et d'observation.

1.1. Module de génération des gouttes

Ce module comporte les différents éléments microfluidiques permettant le contrôle des débits des fluides (solutions et huile), la génération des gouttes et le mélange des solutions et des gouttes.

1.1.1. Les pousse-seringues

Les phases continues et dispersées sont chargées séparément dans des seringues distinctes (Hampton Research) placées dans une plateforme de pousse-seringues neMESYS (Figure 29). Ces pousse-seringues permettent de générer des flux microfluidiques à des débits très précis et stables de 0,01 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 316 440 $\mu\text{L}/\text{min}$ (en fonction des seringues utilisées). Ces pousse-seringues sont pilotés par le logiciel neMESYS.



Figure 29. Pousse-seringues neMESYS et seringues Hampton Research.

1.1.2. Les capillaires microfluidiques

Les capillaires microfluidiques en fluoropolymère permettent le transport de l'huile, des solutions et des gouttes. Ce type de matériau est utilisé, car il présente l'avantage d'être compatible avec la grande majorité des solvants organiques. De plus il permet d'éviter tout phénomène d'évaporation même après une semaine de stockage à température ambiante⁸².

Il existe de nombreux capillaires différents en fonction du type de fluoropolymère utilisé (PFA, PTFE, FEP), de leur diamètre interne (0,15 ; 0,5 ; 1 mm) et de leur diamètre externe (le plus souvent noté en pouce). Le diamètre interne du capillaire est choisi en fonction de la taille et donc du volume des gouttes à générer. Par exemple, un capillaire de 0,5 mm permettra de générer des gouttes sphériques de 0,5 mm de diamètre pour un volume environ égal à 70 nL. Les capillaires utilisés dans le cadre de cette thèse sont des capillaires en PFA de diamètre externe de 1/16" et de diamètre interne 0,5 ou 1mm.

1.1.3. Les jonctions microfluidiques

Les jonctions microfluidiques vont permettre de par leurs géométries, la génération et le mélange des solutions et des gouttes. Le choix des matériaux et du type de jonction est crucial dans l'utilisation d'un système microfluidique. Les jonctions dont nous disposons sont en PEEK (polyétheréthercétone), un polymère plastique inerte très résistant aux solvants organiques. Il existe plusieurs géométries possibles présentées sur la Figure 30.

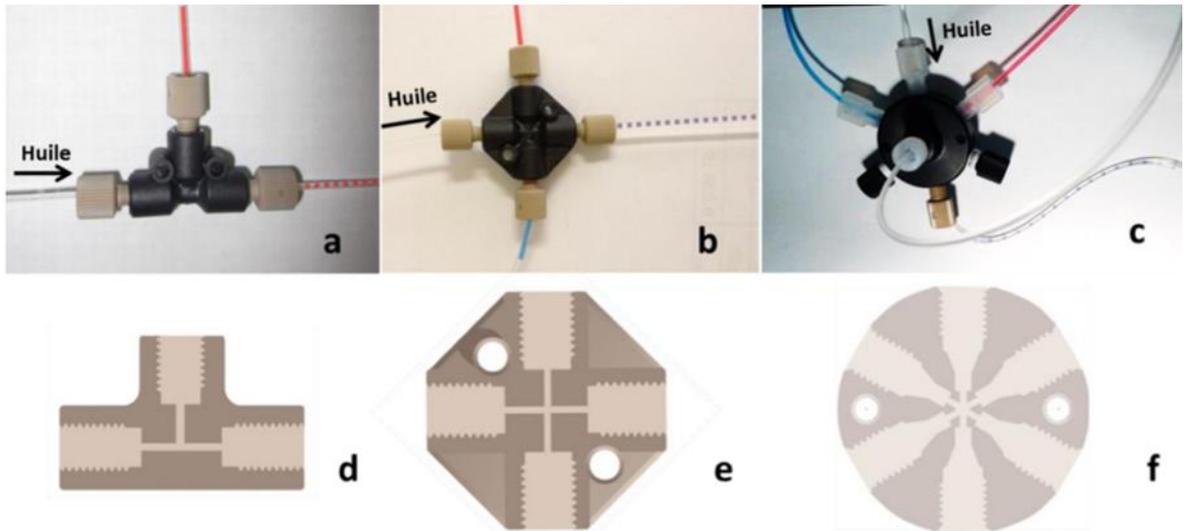


Figure 30. Photos des jonctions microfluidiques (a) en Té, (b) en croix, (c) « multiports ». (d), (e) et (f) : Schémas respectifs des canaux intérieurs des jonctions.

D'autres jonctions à une entrée/sortie permettent de relier des capillaires pouvant servir de vanne manuelle ou de jonction entre deux capillaires de diamètre interne différents (Figure 31).

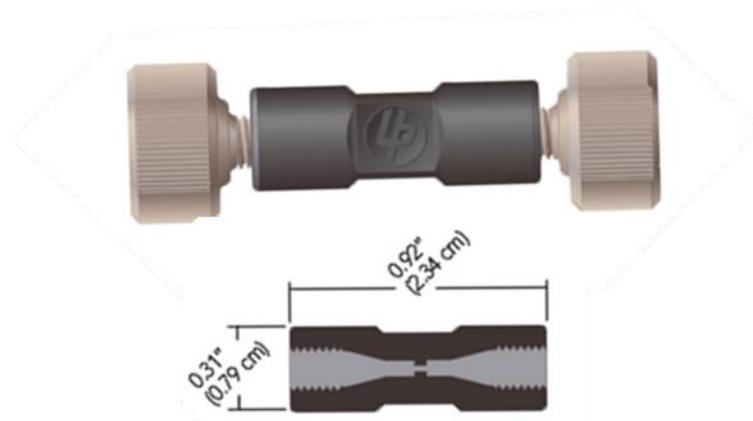


Figure 31. Schéma d'une jonction Union de diamètre interne 500 μm (adapté du catalogue IDEX Health and Science 2014)

1.1.4. Les filtres

Il est possible de filtrer des solutions en ligne à l'aide de filtres « frités »
 ». Ces filtres sont composés de deux éléments : le filtre en lui-même (en PEEK, dont la taille des pores peut être choisie entre 2 ou 0,5 μm) et son support dans lequel il vient s'insérer pour le raccordement au reste du circuit (Figure 32).

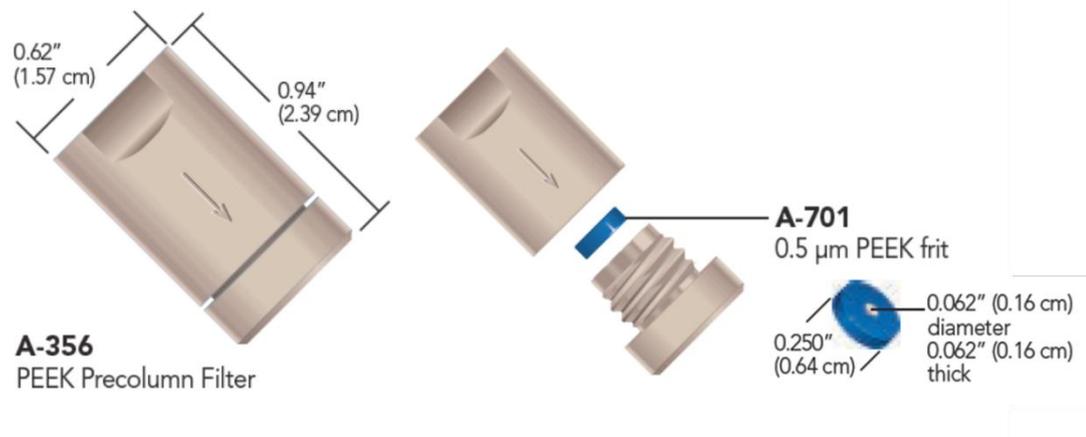


Figure 32. Filtre « frité » 0,5 μm de taille de pores et son support (adapté du catalogue IDEX Health and Science 2014).

1.1.5. Les vannes

Les pousse-seringues sont équipés de vannes automatisées avec une entrée et deux sorties (ou deux entrées et une sortie si la vanne est utilisée à l'envers), et permettent de choisir une des deux sorties (ou une des deux entrées si elles sont montées à l'envers). Ces vannes sont pilotables avec le logiciel du pousse-seringues neMESYS.

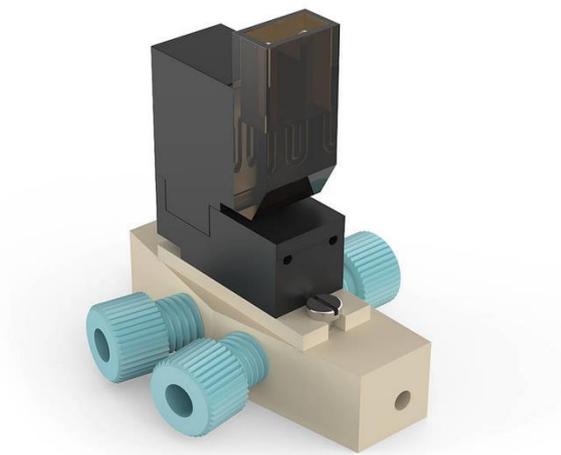


Figure 33. Schéma de la vanne « 3/2-Way Solenoid Valve (3 bar max.) » vendu par la société Cetoni⁹⁷.

1.1.6. Le chauffe-seringues

Cette enceinte thermostatée a été développée lors de la thèse de M. Ildefonso⁸² en collaboration avec la société ANACRISMAT et permet grâce à la ventilation d'air chaud (chauffé par une résistance chauffante) la régulation de la température de l'enceinte. La

particularité de ce dispositif est qu'il a été conçu pour être monté sur le pousse-seringues et ainsi permettre le chauffage des seringues. La régulation de la température dans l'enceinte se fait à l'aide d'un élément chauffant ventilant de l'air chaud. (Figure 34)

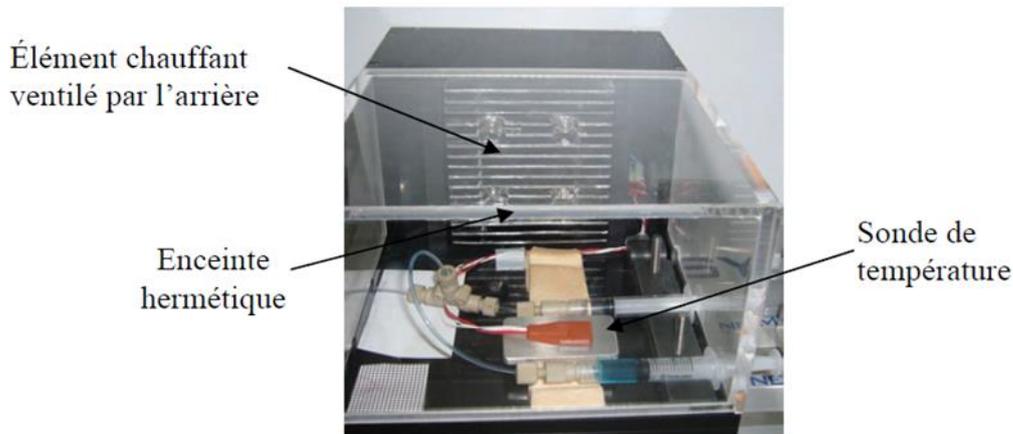


Figure 34. Photo du Chauffe-seringues.

1.2. Module de caractérisation en ligne des gouttes

Ce module permet, grâce à un spectromètre UV-Visible, la mesure de l'absorbance des solutions et des gouttes lors de leur passage entre deux fibres optiques, permettant de déduire la concentration des solutions et la taille des gouttes. Il est composé de :

- une source de lumière DT-mini-2-GS (Océan optics) qui combine une source de lumière UV excitée par deutérium et une source de lumière Visible-proche infrarouge excitée par halogène-tungstène. Le domaine d'utilisation en longueur d'onde est compris entre 215 et 2500 nm (Figure 35a).
- deux fibres optiques de 400 μm de diamètre (Premium-grade Patch Cords, QP400-1-UV-Vis, Ocean optics) qui sont utilisées pour le transport de la lumière de la source au porte-capillaire, puis de ce dernier au spectromètre (Figure 35c).
- un porte-capillaire, qui est une cellule en PMMA, permettant d'aligner les fibres optiques sur le centre du capillaire (Figure 35b).
- un spectromètre (USB 2000+, Océan optics) ayant une gamme spectrale comprise entre 190 et 2300 nm (Figure 35d).
- une interface logicielle (OceanView, Ocean optics) pour l'acquisition et l'analyse des résultats. Les paramètres de mesures tels que la longueur d'onde d'intérêt et le temps d'intégration sont configurés manuellement (Figure 35e).

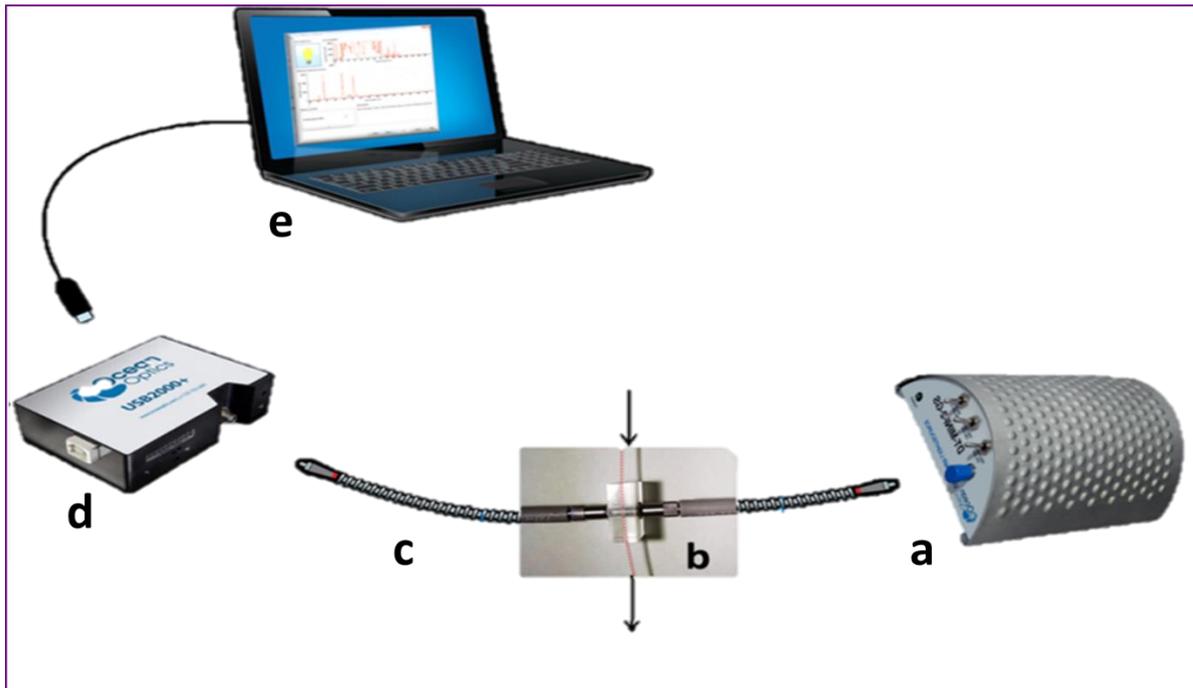


Figure 35. Module de caractérisation en ligne de la composition chimique des gouttes. (a) Source de lumière, (b) Porte-capillaire, (c) Fibres optiques, (d) Spectromètre UV-Vis-NIR, et (e) Interface logicielle.

1.3. Module d'incubation et d'observation des gouttes

Ce module d'incubation et d'observation des gouttes a été développé lors de la thèse de C.J.J. Gérard⁹⁶ en collaboration avec la société ANACRISMAT et permet la régulation de température d'un bain d'eau par un élément Peltier (Figure 36b). Un bain thermostaté (circuit secondaire) permet de refroidir les Peltier afin d'éviter leur échauffement et leur dégradation. Les capillaires microfluidiques sont placés comme le montre la Figure 36c. L'observation des gouttes est réalisée à l'aide d'une caméra à zoom variable (OPTO) motorisée et montée sur une table motorisée XYZ (Figure 36a). Enfin, les photos des gouttes sont traitées grâce à un logiciel d'analyse d'images (ImageJ).

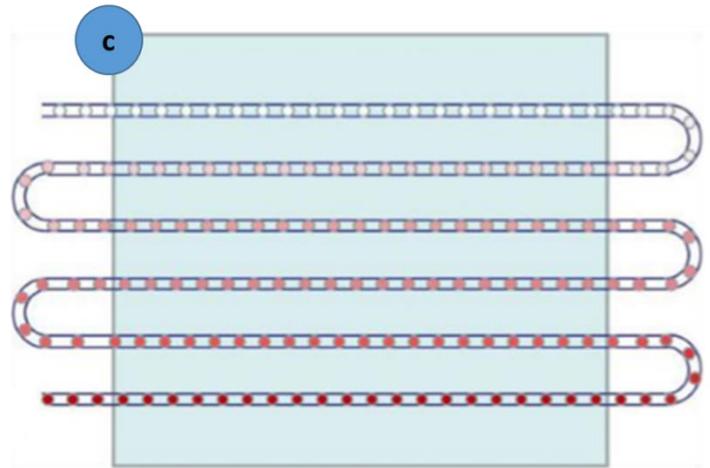
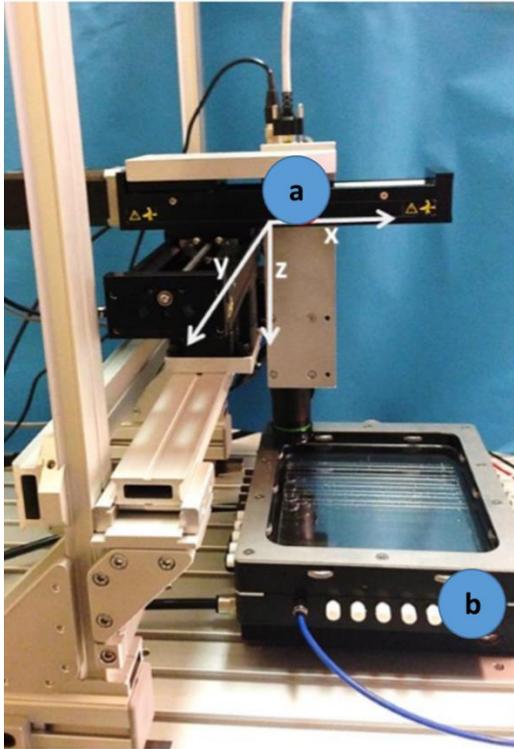


Figure 36. Module d'incubation et d'observation des gouttes. (a) caméra motorisée avec zoom, (b) porte-capillaire thermostaté, (c) schéma du positionnement d'un capillaire dans le porte-capillaire.

Chapitre 2. Matériels

2.1. Les huiles

Nous avons pu voir précédemment l'importance du choix de la phase continue pour faire des gouttes en microfluidique sans utiliser de tensioactif (Partie A-Chapitre 3). Pour cela, plusieurs huiles aux propriétés différentes sont disponibles au laboratoire du CINaM. Les huiles utilisées lors de cette thèse et certaines de leurs propriétés sont présentées ci-dessous.

Nom	CAS	Fournisseur	Densité	Viscosité (cSt)
FMS	63148-56-1	Hampton research	1,25	300-350
FC70	86508-42-1	Hampton research	1,94	12
GPL103		DuPont™Kryptox	1,92	82
GPL105		DuPont™Kryptox	1,93	522
GPL106		DuPont™Kryptox	1,94	822

Tableau 2 : Caractéristiques des huiles utilisées

Les huiles FC70 et GPL103-105-106 sont des huiles inertes non miscibles avec la plupart des solvants et ne réagissant pas avec les solvants organiques utilisés.

2.2. Les solvants

Tous les solvants utilisés sont de type analytique dont la pureté est supérieure à 99,9 %. Les solvants utilisés au cours de ce travail de thèse sont présentés sur le Tableau 3 ci-dessous :

Solvant	CAS	Masse volumique (à 20°C) (kg/m ³)	Masse molaire (g/mol)	Température d'ébullition à pression atmosphérique (°C)
eau	7732-18-5	998,3	18	100
éthanol	64-17-5	789	46	79
isopropanol	67-63-0	785	60	82,5
n-propanol	71-23-8	803	60	97
Acétonitrile	75-05-8	780	41	82
Dichlorométhane	75-09-2	1330	85	40

Tableau 3 : Caractéristiques des solvants utilisés

2.3. Les principes actifs

2.3.1. Le Paracétamol

Le paracétamol ou acétaminophène est un antalgique et antipyrétique bien connu et très utilisé. Sa formule chimique est présentée sur la Figure 37.

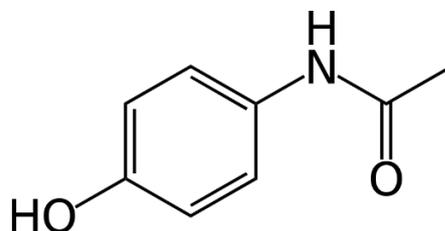


Figure 37. Formule chimique du paracétamol

Le paracétamol utilisé lors de cette thèse est fourni par Alfa Aesar (A11240, batch 10162567). Ce lot est composé de la forme stable pure du paracétamol.

2.3.2. Le sulfathiazole

Le sulfathiazole (4-Amino-N-(2-thiazolyl)benzenesulfonamide) est un antimicrobien autrefois très utilisé, mais aujourd'hui mis de côté, car des alternatives moins toxiques ont été découvertes¹⁸. Cependant, le sulfathiazole reste une molécule modèle pour son polymorphisme qui a beaucoup été étudié. Sa formule chimique est présentée sur la Figure 38.

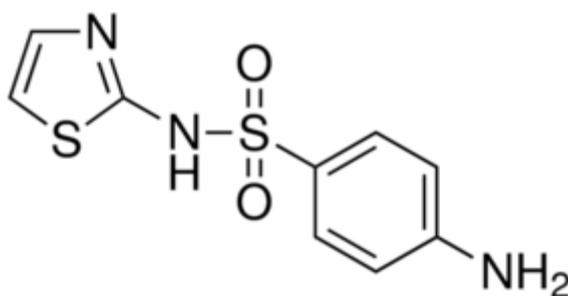


Figure 38. Formule chimique du Sulfathiazole

Le Sulfathiazole utilisé lors de cette thèse est fourni par Fluka analytical (MKBQ0002V, batch 1001670734). Ce lot est composé de la forme stable pure du Sulfathiazole (Forme III).

2.3.3. Le Gliclazide

Le Gliclazide (1-(cis-3-Azabicyclo[3.3.0]oct-3-yl)-3-p-tolylsulphonylurea) est un antidiabétique oral commercialisé par les laboratoires Servier (Diamicon). Sa formule chimique est présentée sur la Figure 39.

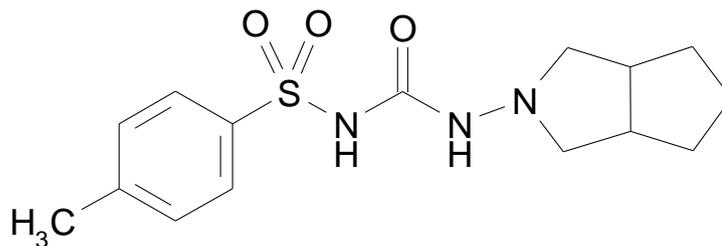


Figure 39. Formule chimique du Gliclazide

Le Gliclazide utilisé lors de cette thèse est fourni par Technologie Servier. Ce lot est composé de la forme stable pure du Gliclazide.

2.3.4. Le S42305-3

Le S42305-3 est une molécule dite « morte » (c'est-à-dire abandonnée avant la fin de son développement) fournie par Technologie Servier sous forme d'un citrate. Sa formule chimique ainsi que la formule chimique de l'acide citrique sont présentées sur la Figure 40.

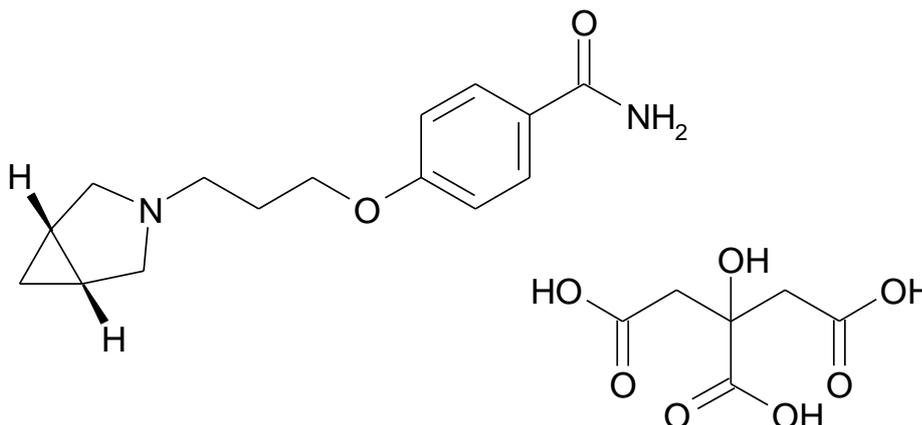


Figure 40. Formule chimique du S42305 base (à gauche) et de l'acide citrique (à droite)

Le facteur de conversion base/sel est de 0,575, c'est-à-dire que pour faire un 1 g de sel de citrate S42305-3 il faut 0,575 g de base et 0,425 g d'acide citrique.

2.4. Le microscope Raman RXN1 (Kaiser)

Le spectromètre Raman utilisé est un Raman RXN1 de la marque KAISER. Celui-ci est composé d'une source laser ayant pour longueur d'onde 785 nm (Invictus). Cette source est reliée via des fibres optiques à un microscope Leica DMLP permettant de focaliser le faisceau laser sur l'échantillon. Le porte échantillon est piloté en x et y par un contrôleur de platine

ProScan II (PRIOR). Une caméra CCD (Toshiba) permet de récupérer le signal Raman qui est ensuite visualisé et analysé à l'aide du logiciel Holograms. Une photo du dispositif est présentée sur la Figure 41.

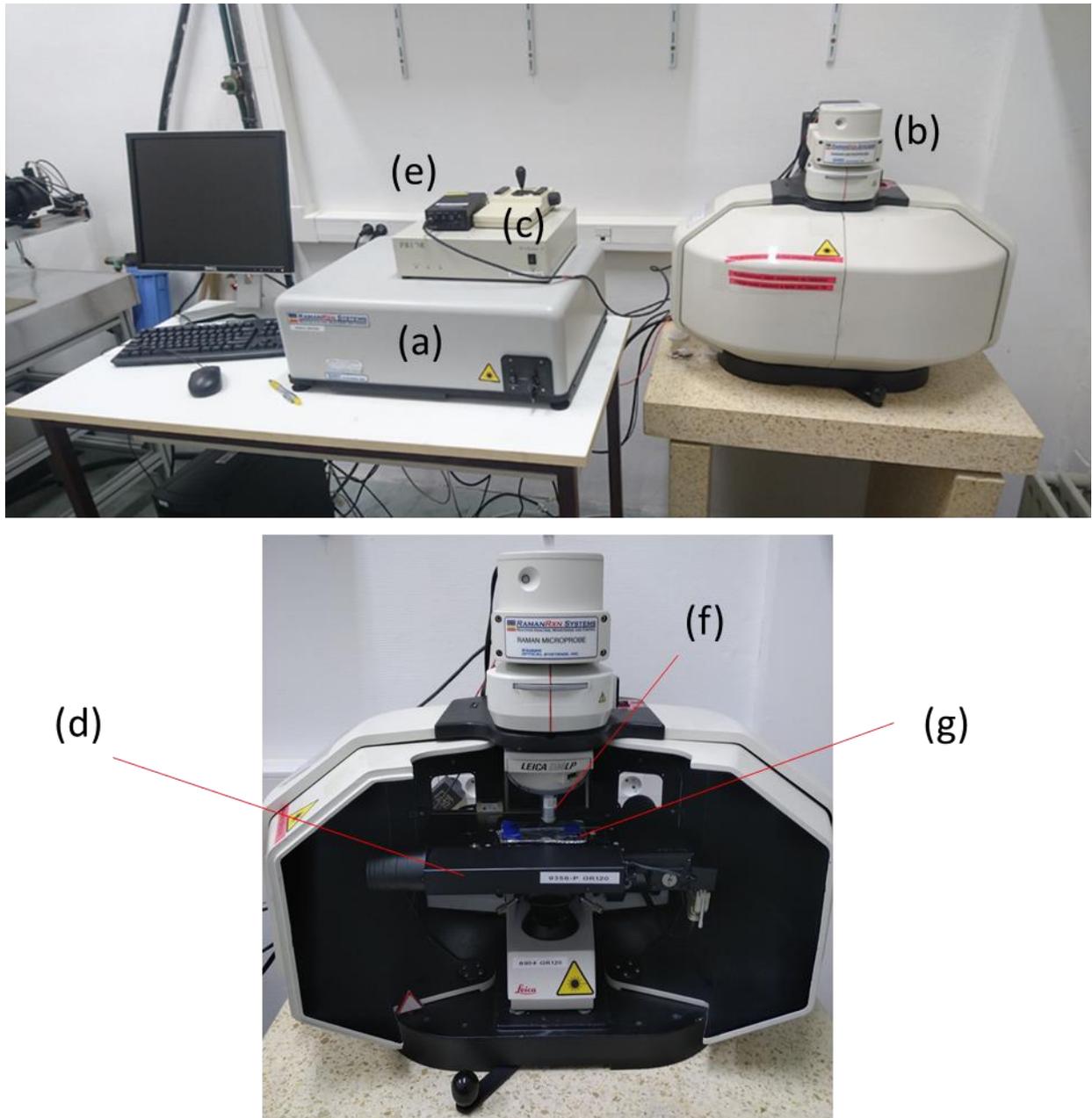


Figure 41. Microscope Raman RXN1 (Kaiser) (a) source laser 785nm, (b) Microscope LEICA, (c) pilote de la plateforme x/y, (d) platine x/y, (e) caméra CCD, (f) objectif x10 Zeiss, (g) échantillon sur support en aluminium.

La mesure consiste à positionner l'échantillon sur la platine motorisée du microscope puis de régler la position de l'échantillon et le focus du microscope afin de se focaliser sur la

zone d'intérêt. Il est nécessaire ensuite de fermer l'enceinte du microscope pour des raisons de sécurité (réflexions potentielles d'une partie du faisceau laser).

2.5. Dispositif utilisé pour la diffraction des Rayons X sur monocristal

Une photo du dispositif utilisé est présentée sur la Figure 42. Il est composé d'une source de rayons X par anode tournante (Figure 42a), d'un système optique (Figure 42b), d'un porte-échantillon sur lequel peuvent être fixés des capillaires et permettant une rotation de l'échantillon sur l'axe horizontal (Figure 42c) et un détecteur 2D « mar 345 » (Figure 42d).

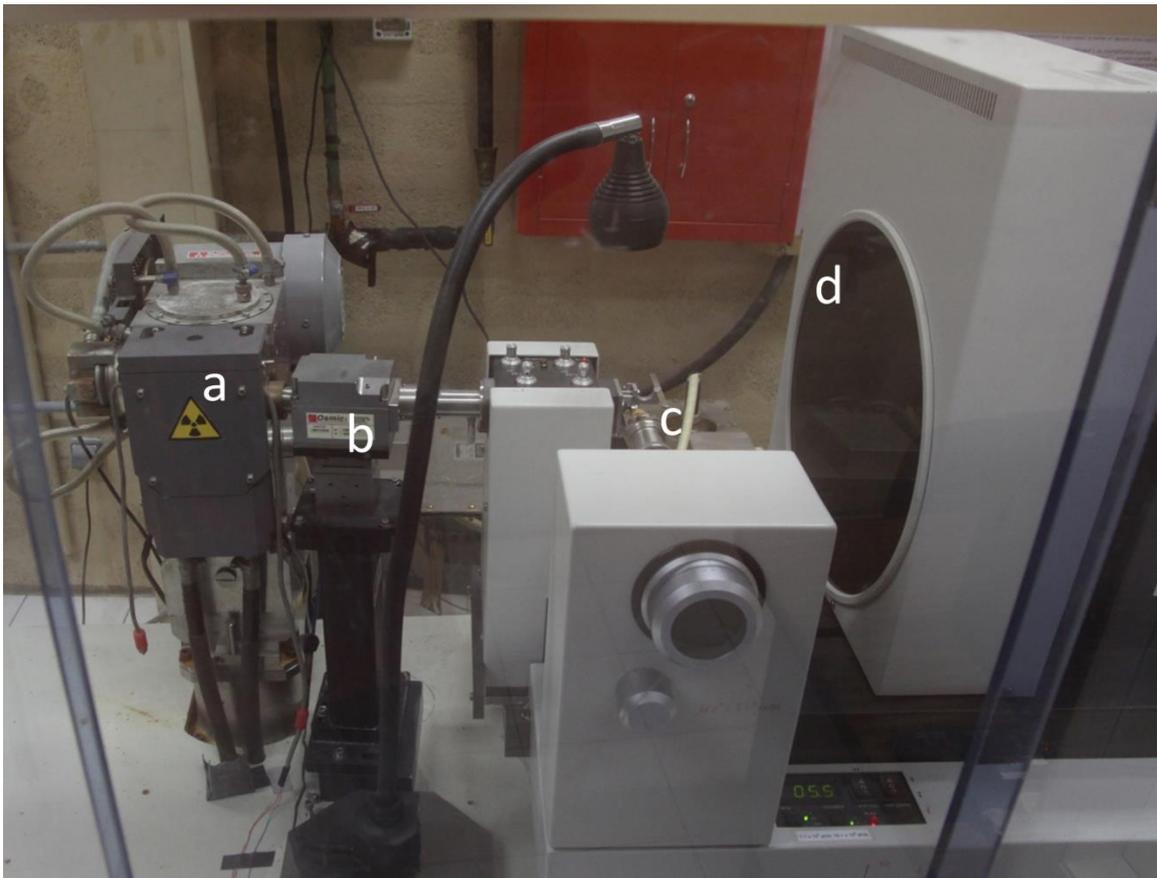


Figure 42. Photo du dispositif pour la diffraction des Rayons X sur monocristal. (a) Anode tournante, (b) système optique, (c) porte-échantillon (d) détecteur 2D.

Chapitre 3. Méthodes

3.1. Mesure de solubilité en multipuits

Le multipuits est un outil initialement développé lors de la thèse de T. Detoisien¹⁵, en collaboration avec la société ANACRISMAT, pour l'étude du polymorphisme et de la cristallisation de sels pharmaceutiques. Il permet d'observer le comportement des cristaux au cours du temps et à différentes températures. Cet appareil est composé d'une table motorisée XYZ sur laquelle sont placés deux blocs Peltier. Ces deux blocs peuvent être portés indépendamment à différentes températures. Chaque bloc reçoit un rack contenant 12 vials d'une capacité de 2 mL. Un microscope optique muni d'une caméra permet d'observer les cristaux. L'ensemble de cet appareil est piloté par un logiciel de contrôle de la température, de position et d'acquisition d'images. Ainsi, 24 conditions différentes peuvent être étudiées.



Figure 43. Photographie du Multipuits, à gauche l'ensemble du montage ; à droite les blocs Peltier de 12 vials chacun.

Cet outil permet aussi de réaliser des mesures de solubilité par encadrement. Le protocole utilisé durant cette thèse est présenté pour le Gliclazide.

Les solubilités sont déterminées à trois températures différentes : 20 °C, 35 °C et 50 °C. Au départ, la température est fixée à 20 °C. On commence par remplir chaque vial avec 1 mL de solvant et on les place dans les différentes cellules. Puis on procède par ajouts successifs, c'est-à-dire que l'on ajoute successivement du Gliclazide dans le solvant jusqu'à arriver à saturation. On procède donc à un ajout de 5 mg de Gliclazide en poudre dans chaque vial. Afin de faciliter la solubilisation, les vials sont agités par un vortex. L'observation au microscope permet de voir si la poudre se dissout ou non. Suivant l'observation au microscope obtenue, deux cas sont possibles :

- La poudre est dissoute : il s'agira alors d'ajouter par ajouts successifs de la poudre jusqu'à atteindre la saturation.

- La poudre ne se dissout pas : cela signifie que la solution est saturée (voire sursaturée dans le cas d'ajout d'une phase métastable). Dans ce cas, il faut en conclure que la solubilité est comprise entre la quantité de poudre ajoutée précédemment et celle ajoutée dernièrement. La méthode utilisée est dite par encadrement.

Une fois la solubilité à 20°C déterminée, les étapes suivantes consistent à passer à 35 puis 50°C et à répéter l'opération, ce qui permettra de tracer la courbe de solubilité.

Afin de vérifier qu'il n'y a pas eu de transition de phase lors de la mise en suspension de la poudre et de l'attente de l'équilibre, l'excès de poudre obtenu en fin d'expérience est caractérisé par diffraction des rayons X puis comparé au diffractogramme de la poudre de départ. Et l'observation des cristaux en cours d'expérience donne aussi des informations sur d'éventuelles transitions de phases.

3.2. Retour Base d'un sel

Afin d'étudier la salification du S42305, il a été nécessaire de faire un « retour base » de sa forme salifiée (en citrate), c'est à dire séparer le S42305 de l'acide citrique, qui est le contre-ion (car nous ne disposons que de poudre sous forme salifiée de ce PA, le S42305-3). Le protocole permettant ce retour base est présenté ci-dessous :

- Mise en solution de S42305-3 dans l'eau.
- Addition d'un équivalent de NaOH, il y a alors apparition d'un précipité.
- Puis on ajoute un solvant non miscible avec l'eau, comme le dichlorométhane, dans lequel seule la base sera soluble. Ceci permet de séparer la phase aqueuse contenant l'acide citrique de la phase organique contenant le S42305, à l'aide d'une ampoule à décanter. Le dichlorométhane ayant une densité plus élevée que l'eau, la phase organique se situe en dessous de la phase aqueuse. Après plusieurs mélanges et dégazages, la phase organique est récupérée. Cette opération est réalisée plusieurs fois afin de récupérer un maximum de Base dans la phase organique.
- La phase organique est ensuite séchée à l'aide de Na₂SO₄. L'eau restant dans la phase organique est alors captée par le Na₂SO₄. Puis, une étape de filtration permet de récupérer uniquement la phase organique, et celle-ci est disposée dans un ballon.
- Ce ballon est ensuite monté sur un évaporateur rotatif afin d'effectuer une mise à sec. La température du bain est maintenue à 40 °C (température d'ébullition du dichlorométhane). Le dichlorométhane va alors s'évaporer et la Base en solution va cristalliser.

Des analyses par DRX ont ensuite été réalisées sur la poudre obtenue. Les diffractogrammes sont alors différents de celui du S42305 sous forme salifiée et de l'acide citrique confirmant le « retour base » du S42305.

C. Résultats et discussion

Chapitre 1. Préparation des solutions et mesure de solubilité en microfluidique

1.1. Problématique de la préparation des échantillons

Si la microfluidique permet de travailler avec de petits volumes d'étude, il est toutefois nécessaire de préparer un grand nombre d'échantillons à des volumes souvent plus importants. Ce qui pose la problématique de la mise en solution des composés à analyser et de son intégration dans le système microfluidique. Cette problématique est d'autant plus importante lorsque l'on souhaite travailler avec des solutions saturées à haute température (40-80°C). Typiquement, la méthode utilisée est présentée schématiquement sur la Figure 44. Dans un premier temps, un excès de poudre est ajouté dans un vial contenant un solvant à une « température élevée » connue. Après agitation et attente de l'équilibre, la solide est ensuite laissé à décanter puis le surnageant est prélevé et filtré avant d'être introduit dans le système microfluidique. La difficulté est alors de garder la solution à température lors de ces différentes étapes (décantation, filtration et transport vers le système microfluidique) et sans évaporation. En effet, l'évaporation du solvant ou une chute de la température aura pour conséquence une cristallisation non souhaitée. L'injection des solutions dans le système microfluidique se fait ensuite via des seringues qui doivent également être thermostatées. De plus, la manipulation de solvants volatils et inflammables, parfois dangereux à haute température, demande des contraintes de sécurité difficilement applicables dans un laboratoire. Enfin, il est souvent nécessaire de préparer des échantillons d'un volume de l'ordre du millilitre alors que seulement quelques μL seront utilisées en microfluidique. Aux vues de ces difficultés pratiques, l'élaboration d'une méthode de préparation des solutions en ligne en microfluidique a été étudiée et mise en place. De plus, disposer d'une méthodologie et d'un montage permettant de démarrer de la poudre reste un point peu ou pas étudié en microfluidique. Ce serait donc une avancée importante dans le domaine de la microfluidique appliquée aux études de cristallisation en solution.

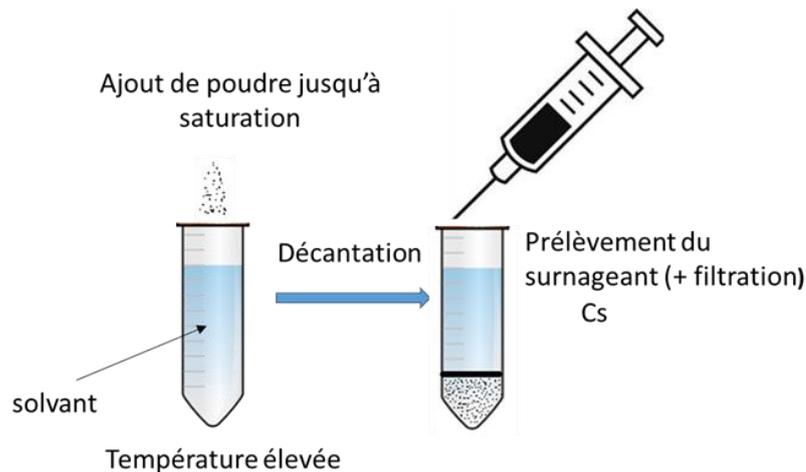


Figure 44. Schéma de la préparation classique des échantillons en microfluidique

1.2. Méthode de préparation en ligne des solutions

1.2.1. Principe et Montage

Cette méthode de préparation en ligne des solutions est basée sur la dissolution en ligne d'une poudre (à l'image d'un percolateur à café). Pour cela, un capillaire en PFA de 1mm de Diamètre Interne (DI) est rempli de poudre (environ 30 mg) qui est tassée manuellement. Puis ce capillaire est branché à un filtre (0,5 μm de taille de pore) bloquant la poudre (Figure 45b). Le principe est simple, un flux de solvant va traverser le lit de poudre bloqué par le filtre et ainsi le dissoudre. En sortie du filtre, la solution récupérée peut être analysée à l'aide d'un spectromètre UV en ligne. La partie « dissolution » de ce dispositif (capillaire, poudre et filtre) peut être placée dans une enceinte thermostatée afin de réguler la température à laquelle le solvant passera dans la poudre et ainsi augmenter la concentration de la solution récupérée en sortie du filtre. L'enceinte thermostatée utilisée pour ces premières expériences permet le contrôle de la température entre la température ambiante et 65 °C (ANACRISMAT).

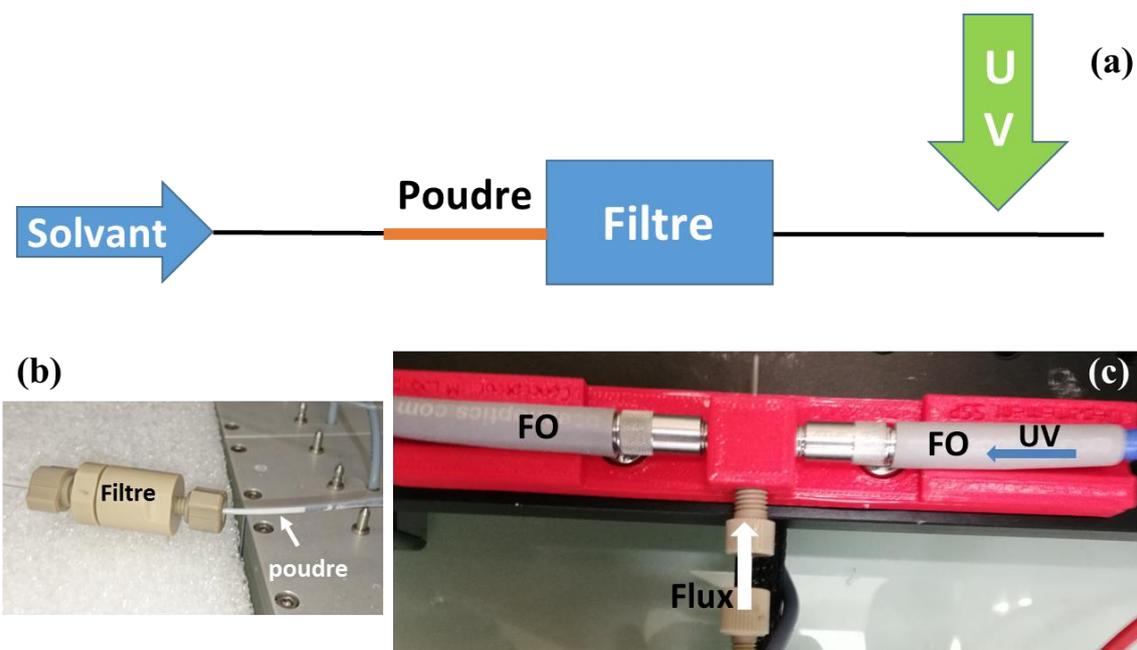


Figure 45. (a) Schéma du montage de préparation en ligne des solutions (b) capillaire de 1 mm de diamètre interne rempli de poudre et connecté à un filtre (c) cellule UV et fibres optiques (FO).

Ce premier montage a permis de valider la nouvelle méthode de préparation en ligne des solutions. En effet, la poudre se dissout bien pendant le passage du solvant et ne bloque pas le flux. La vitesse du fluide en sortie du filtre reste constante après une courte période de stabilisation (quelques secondes). La Figure 46 montre le profil d'absorbance mesuré en sortie du filtre au cours du temps pour une petite quantité de Gliclazide dans lequel passe de l'acétonitrile à un débit relativement élevé (2 mL/h au lieu d'un débit de l'ordre de 0.5mL/h utilisé classiquement). Le but étant ici de pouvoir mesurer tout le profil d'absorbance jusqu'à quasi-dissolution totale de la poudre. On peut ainsi remarquer que l'on mesure un palier d'absorbance (et donc de concentration) pendant un temps important avant un décrochage dû à la consommation de la quantité de poudre nécessaire pour atteindre un équilibre. Il est à noter que le pic d'absorbance aux alentours de 0 seconde est dû à l'interface entre l'air et le « front » de la solution. De même le pic observé vers 980 secondes correspond au passage d'une bulle d'air.

Absorbance @274nm (u.a)

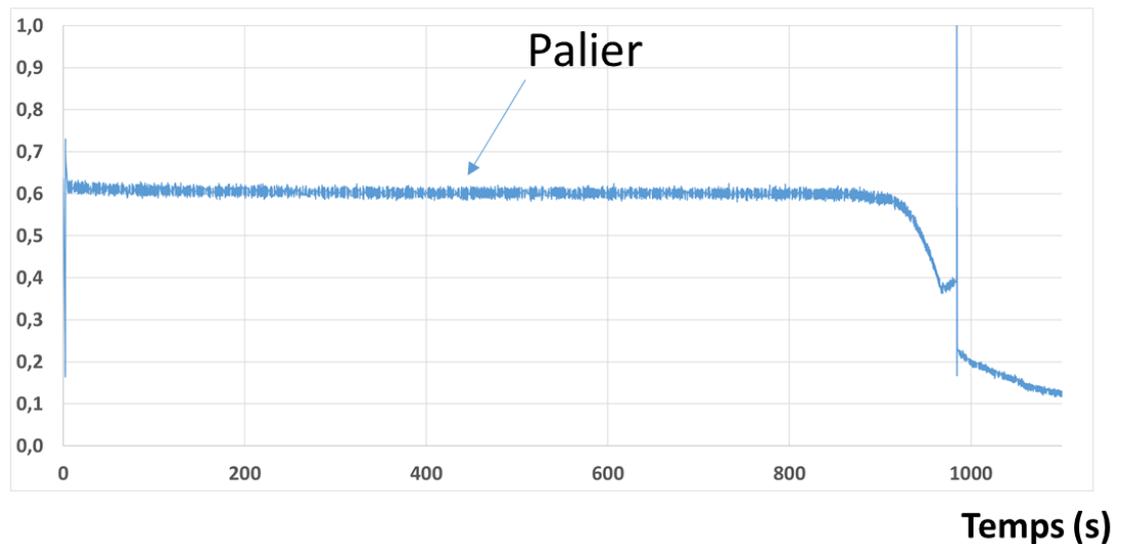


Figure 46. Absorbance (à 274nm) en fonction du temps mesurée en sortie du filtre après passage d'acétonitrile, dans un lit de poudre de Gliclazide ($\approx 10\text{mg}$) à un débit de 2mL/h .

Les concentrations, correspondant à ce palier mesuré, après passage dans le lit de poudre sont très proches des valeurs de solubilité de ces poudres à la température appliquée. Il semble donc que la dissolution soit optimale. Cependant, nous allons voir que ce montage présente des limitations concernant la mesure de la concentration après dissolution.

1.2.2. Limitations de ce premier montage

Le spectromètre UV en ligne permet de mesurer l'absorbance de la solution passant à travers la cellule à la longueur d'onde d'intérêt de la solution passant à travers la cellule, et ainsi d'en déduire la concentration. Pour cela, il est nécessaire dans un premier temps de réaliser un « blanc » ; c'est-à-dire d'enregistrer l'absorbance engendrée par la cellule UV et le solvant, pour pouvoir ensuite la soustraire à l'absorbance mesurée et ne récupérer que l'absorbance due au passage de la molécule étudiée. Une seconde étape consiste à réaliser un étalonnage grâce au passage dans la cellule UV de solutions de concentration connues, afin de déduire la relation entre absorbance et concentration. Classiquement, cette relation permet de déduire le coefficient (ϵ) reliant absorbance et concentration dans la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon l C$$

ÉQUATION 14

A : l'absorbance (sans unité)

ϵ : le coefficient d'absorption molaire ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

l : la distance entre les fibres optiques (cm^{-1})

C : la concentration de la solution ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Cependant, le domaine d'application de la loi de Beer-Lambert est restreint à un domaine de faible concentration, dans lequel l'absorbance évolue linéairement. Comme on peut le voir sur la Figure 47, à partir d'une certaine concentration, l'absorbance n'évolue plus de manière linéaire et tend vers une valeur de saturation. Dans le cas de nos mesures, les concentrations mesurées en sortie du filtre sont élevées et dépassent souvent la zone de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Il est donc nécessaire de réaliser un étalonnage sur un large domaine de concentrations nécessitant la préparation d'un grand nombre de solutions étalons concentrées et ceci pour chaque solvant ou milieu de l'étude, ce qui engendre une consommation de matière première importante. On perd, ainsi, l'intérêt de la préparation en ligne en microfluidique si ces solutions étalons (préparées « hors-ligne ») sont nécessaires pour connaître les concentrations des solutions préparées en ligne.

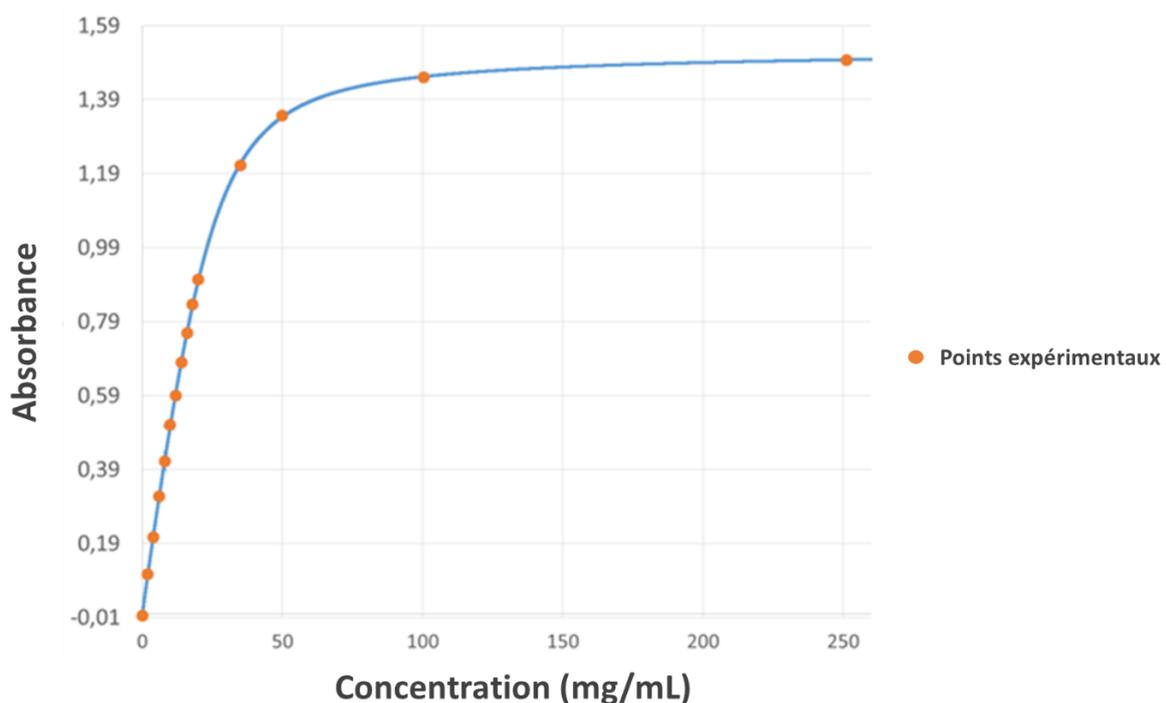


Figure 47. Absorbance UV (274 nm) en fonction de la concentration en Gliclazide/DMSO (courbe d'étalonnage)

1.2.3. Résolution du problème d'étalonnage

Afin de pallier ces problèmes, il a été choisi d'ajouter au montage précédent une étape de dilution utilisant une jonction en T et un second filtre. La jonction en T est utilisée pour injecter le même solvant en sortie du filtre afin de réaliser une dilution pour ramener la concentration de la solution dans la zone de linéarité de la loi de Beer-Lambert. Cependant, le mélange de deux solutions dans une jonction en T donne en sortie deux flux parallèles qui se mélangent seulement par diffusion, d'où un mélange peu homogène (Figure 48a). L'ajout d'un filtre permet d'améliorer un peu le mélange mais on peut voir dans la Figure 48b que la solution en sortie n'est toujours pas homogène. Par conséquent on ajoute du verre pilé en amont du second filtre, ce qui améliore considérablement l'homogénéisation du mélange (Figure 48c).

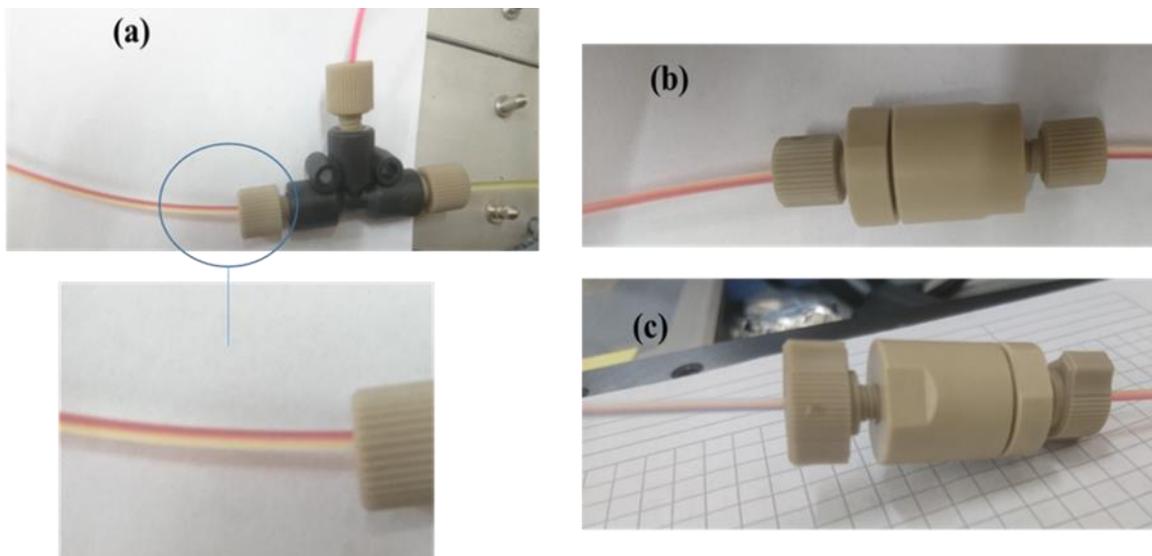


Figure 48. Photos lors du mélange 1 : 1 d'une solution aqueuse rouge et jaune dans une jonction en T (a) uniquement par diffusion (b) après passage dans un filtre $0,5 \mu\text{m}$ (c) après passage à travers une petite quantité de verre pilé et d'un filtre $0,5 \mu\text{m}$.

Le schéma du montage final est présenté sur la Figure 49. Il permet de remplacer la procédure d'étalonnage classique, qui est longue et coûteuse, par une unique mesure d'absorbance sur une solution étalon de faible concentration (environ 1mg/mL). Cette faible concentration permet de garantir que l'on se situe dans la partie linéaire de l'absorbance. Ensuite, il suffit que la dilution réalisée entre les deux filtres permette d'atteindre la même absorbance (ou intensité transmise) que la solution étalon, et de connaître le facteur de dilution appliqué. Ainsi, nous pouvons déduire la concentration de la solution préparée en amont. Ce montage a été testé pour la mesure de solubilité de deux systèmes de référence dans différents solvants : le paracétamol dont les solubilités sont bien connues dans la littérature et le Gliclazide dont les solubilités ont été mesurées à l'aide d'un

multiplie. Et nous retrouvons bien des concentrations des solutions, préparées par cette méthode, proches des solubilités.

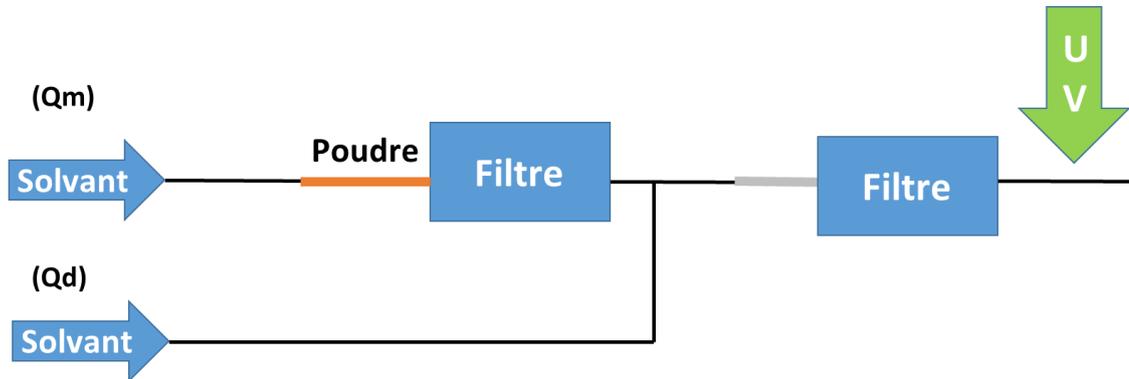


Figure 49. Schéma du montage permettant de préparer une solution homogène diluée afin d'en mesurer précisément la concentration en sortie du filtre.

1.3. Courbe de solubilité déterminée en ligne

Dans cette partie je présente le protocole utilisé pour la détermination de courbes de solubilité en ligne en microfluidique. Puis ces courbes seront comparées avec les données de la littérature afin de valider le protocole.

1.3.1. Montage

Le montage utilisé pour la détermination des courbes de solubilité est le même que celui vu précédemment (Figure 49). Afin de pouvoir mesurer la concentration après la préparation des solutions en ligne à plusieurs températures, une partie du montage (préparation et dilution) est insérée dans un bain thermostaté (Figure 50b). Comme l'absorbance d'une molécule peut dépendre de la température de mesure, la cellule UV a été placée à l'extérieur de l'enceinte thermostatée (Figure 50e). Ainsi, après dilution de la solution concentrée (à température élevée), le flux passe par un capillaire de refroidissement (Figure 50d) avant de passer dans la cellule UV. Il faut noter que la dilution permet d'éviter la cristallisation de la molécule lors du refroidissement. Ce montage permet aussi de ne pas avoir à chauffer les seringues, qui sont sensibles aux températures élevées. Pour garantir que le solvant passant dans le circuit soit bien à la température voulue, les capillaires d'entrées sont choisis assez longs et sont disposés dans l'enceinte thermostatée (environ 50 cm).

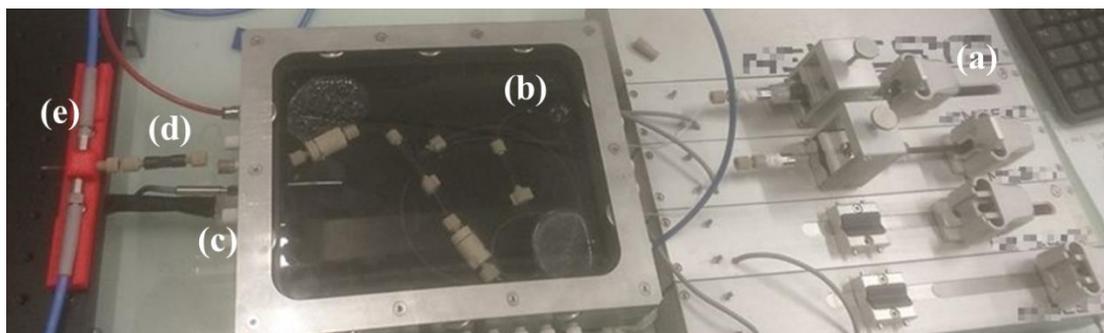


Figure 50. Photos du montage permettant la mesure des solubilités (a) pousse-seringues (b) enceinte thermostatée contenant une partie du circuit microfluidique (c) sonde de température (d) capillaire de refroidissement (e) cellule UV.

1.3.2. Protocole

Le protocole expérimental consiste dans un premier temps à la préparation hors ligne de 2 mL d'une solution étalon de faible concentration (environ 1 mg/mL), en consommant seulement 2 mg de poudre. La préparation de cette solution peut être effectuée par ajouts successifs de solvant, ce qui permet aussi d'estimer approximativement la solubilité à température ambiante par une méthode d'encadrement. le protocole est décrit sur la Figure 51.

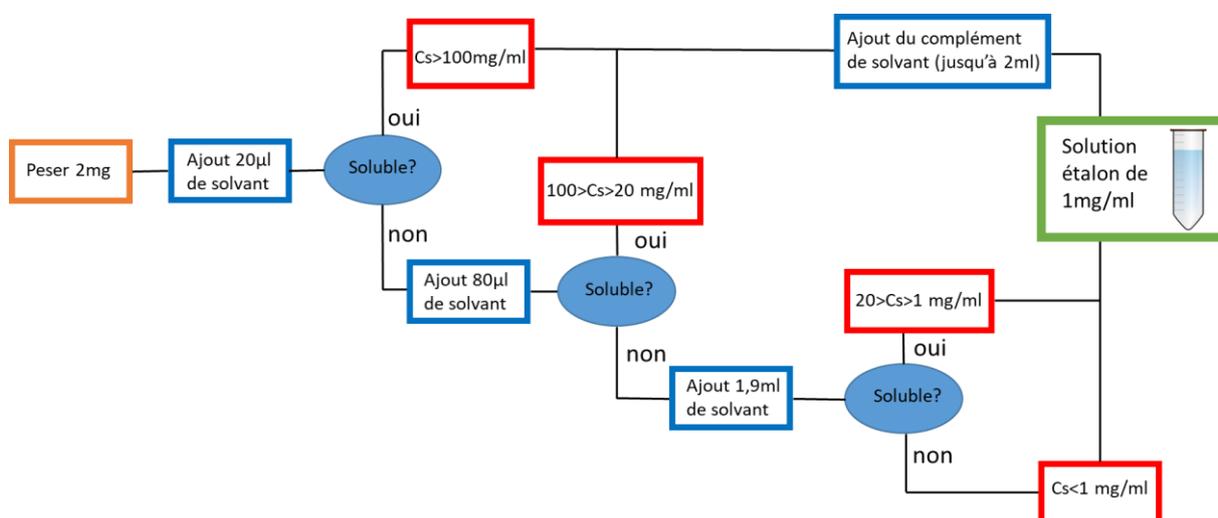


Figure 51. Schéma du protocole de préparation des solutions étalons et d'estimation par encadrement de la solubilité.

L'intensité transmise du solvant pur (I_0) est d'abord mesurée, puis celle de la solution étalon ($I_{\text{étalon}}$) comme référence. Ensuite, le solvant est injecté à travers la poudre à un débit connu (Q_m), et dans un même temps le solvant de dilution est injecté à un débit connu (Q_d).

La dilution de la solution à saturation (dont la concentration correspond à la solubilité (C_s)) est définie par le ratio $Q_m/(Q_m+Q_d)$. (Q_d) est varié par palier et l'intensité transmise (I_{mes}) est suivie afin de se rapprocher de la valeur $I_{étalon}$.

En théorie, on peut atteindre $I_{mes} = I_{étalon}$ (Figure 52a) et la concentration de la solution diluée est identique à celle de la solution étalon ($C_{étalon}$). On obtient alors la valeur de la solubilité (C_s) directement à partir de la concentration de la solution étalon ($C_{étalon}$) par :

$$C_s = C_{étalon} / (Q_m / (Q_m + Q_d))$$

ÉQUATION 15

En pratique, il est impossible d'obtenir exactement la bonne dilution pour avoir $I_{mes} = I_{étalon}$ (Figure 52b). On ne peut donc pas utiliser $C_{étalon}$ et il faut déterminer la vraie concentration de la solution diluée (C_{mes}). Cependant, on remarque que (I_{mes}) est très proche de ($I_{étalon}$) (Figure 52b) ce qui entraîne que (C_{mes}) et ($C_{étalon}$) sont également proche. On peut alors faire l'approximation suivante :

$$C_{mes} / A_{mes} = C_{étalon} / A_{étalon}$$

ÉQUATION 16

Où $A_{étalon} = -\log(I_{étalon}/I_0)$ et $A_{mes} = -\log(I_{mes}/I_0)$ représentent respectivement l'absorbance de la solution étalon et celle de la solution diluée. Ainsi on peut réécrire l'équation 15 en remplaçant ($C_{étalon}$) par (C_{mes}) :

$$C_s = C_{mes} / (Q_m / (Q_m + Q_d))$$

ÉQUATION 17

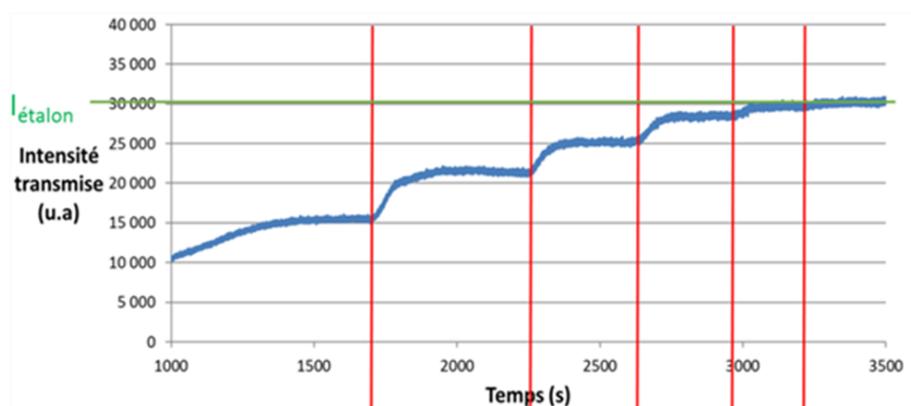
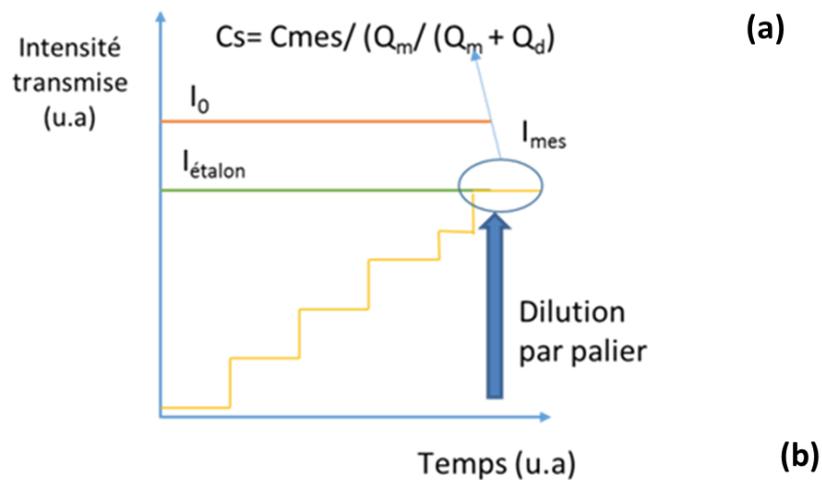


Figure 52. (a) Intensités transmises théoriques lors d'une dilution par palier (b) Intensité transmise lors d'une dilution par palier

Cette opération est ainsi répétée à différentes températures dans un solvant donné afin de pouvoir construire la courbe de solubilité. De plus, après le passage d'un solvant pour déterminer les valeurs de solubilité à toutes les températures choisies, s'il reste assez de poudre dans le capillaire, on peut changer de solvant en remplaçant les seringues. Cependant, il est nécessaire d'attendre que le précédent solvant soit bien entièrement remplacé par le nouveau solvant dans le capillaire contenant la poudre. Pour le vérifier, il suffit de suivre l'intensité transmise qui finira par se stabiliser une fois que la totalité du précédent solvant sera évacuée. Il est toutefois important de suivre attentivement ce changement de solvant, car plusieurs phénomènes peuvent fausser les mesures. Par exemple, lorsqu'une mixture de solvants permet une solubilité beaucoup plus importante, le reste de poudre peut entièrement être consommé pendant le nettoyage.

1.3.3. Résultats expérimentaux de courbes de solubilité

Afin de vérifier que cette méthode microfluidique permet de mesurer des solubilités fiables, c'est-à-dire d'atteindre l'équilibre nous avons mesuré les solubilités du Paracétamol et du Glicazide.

Les incertitudes de mesure sont estimées en prenant compte des sources d'incertitudes des différents paramètres de la mesure :

- Sur la masse de poudre pesée pour l'élaboration de la solution étalon
- Sur le volume de solvant ajouté pour l'élaboration de la solution étalon
- Sur la mesure des différentes intensités transmises
- Sur les débits délivrés par le pousse-seringues

Les incertitudes relatives sur la mesure de solubilité sont estimées inférieures à 5% pour tous les points de mesures réalisées.

1.3.3.1. Courbes de solubilité du Paracétamol

Les solubilités du Paracétamol ont été mesurées dans 3 solvants donnant des solubilités et des cinétiques de dissolution différentes et bien décrites dans la littérature. Ces 3 solvants sont l'eau, l'acétonitrile et l'isopropanol. Les résultats expérimentaux sont comparés aux données de la littérature utilisant des techniques variées : équilibration d'une suspension de paracétamol à différentes températures et dosage du surnageant par pesée du résidu sec⁹⁸⁻¹⁰⁰, spectrométrie UV¹⁰¹⁻¹⁰³, ou indice de réfraction¹⁰⁴. Les Figure 53a, b et c montrent que les courbes de solubilité obtenues en microfluidique sont en accord avec les données de la littérature dans une large gamme de valeurs de solubilité allant de quelques mg/mL à plus de 100mg/mL.

1.3.3.2. Courbes de solubilité du Gliclazide

La courbe de solubilité du Gliclazide a été mesurée dans l'acétonitrile par différentes méthodes. La courbe de solubilité obtenue en microfluidique est en accord avec celle obtenue par la méthode d'estimation par encadrement utilisant un multipuit développée par Detoisien et al¹⁰⁵, et avec les données fournies par Technologie Servier (TES). De plus, deux séries de mesures ont été effectuées avec la méthode microfluidique. En effet, un effort de différenciation des deux expériences a été fait en remontant le circuit microfluidique et en utilisant une solution étalon différente. La Figure 53d montre que les deux séries de mesures sont identiques à l'incertitude de mesure près.

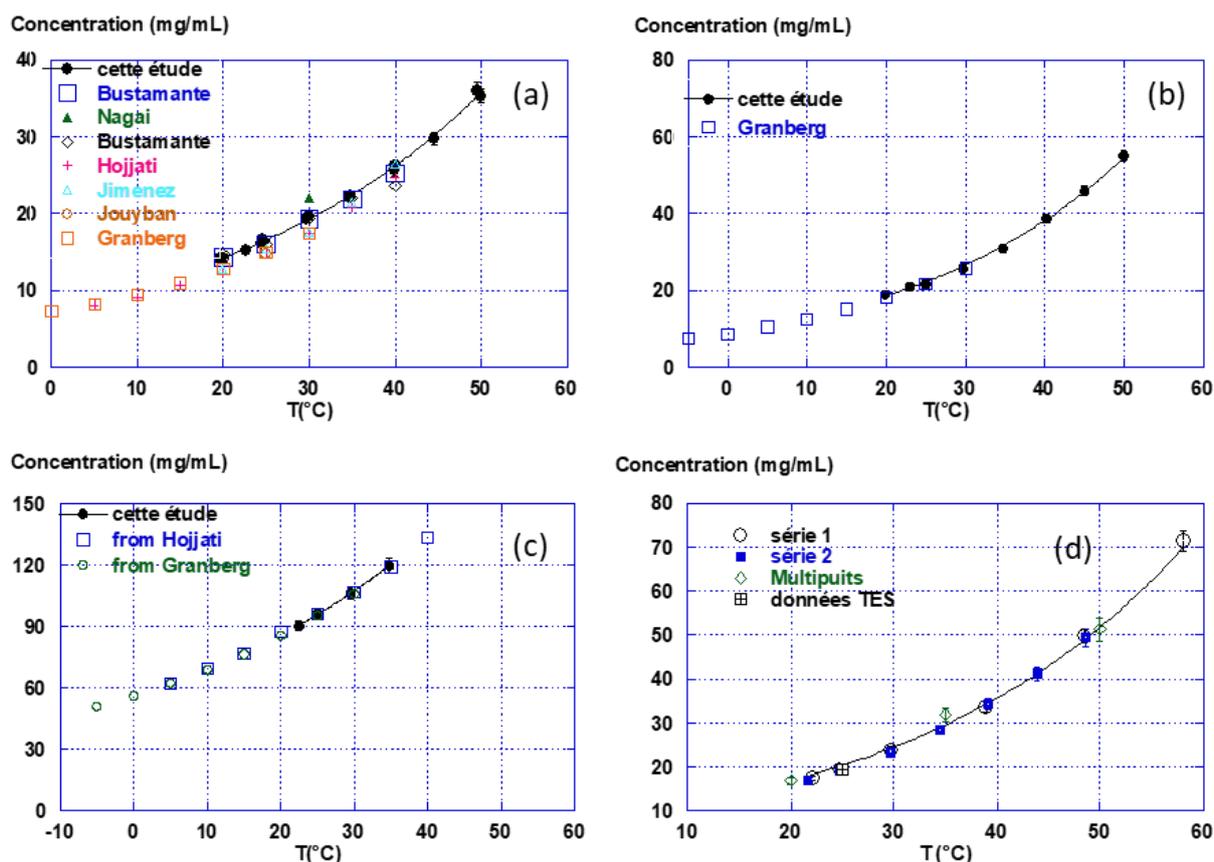


Figure 53. Courbe de solubilité du paracétamol obtenues dans (a) l'eau (b) l'acétonitrile (c) l'isopropanol ; (d) Courbe de solubilité du Gliclazide dans l'acétonitrile.¹⁰⁶

Les poudres étudiées jusqu'à présent (paracétamol et Gliclazide) sont des poudres pures et constituées de la phase cristalline stable.

1.3.4. Avantages de la méthode microfluidique de mesure de solubilité

Cette méthode de mesure microfluidique permet de mesurer rapidement (environ 2 heures) une courbe de solubilité avec très peu de poudre (environ 30 mg) même pour des solubilités supérieures à 100 mg/mL (cas du Paracétamol dans l'isopropanol sur la Figure 53c), le tout avec des incertitudes relatives faibles (< 5 %). La méthodologie mise en place permet de s'affranchir d'un étalonnage long et coûteux en matière première en utilisant un seul point d'étalonnage, qui est de surcroît à une concentration faible. Les résultats obtenus sont en accord avec les données de la littérature.

Dans ce travail de thèse, seules les solubilités de phases stables ont été mesurées. En effet, les poudres étudiées sont pures et constituées de la phase cristalline stable. Cependant, le temps très court d'atteinte de l'équilibre pourrait permettre la mesure de solubilité de phases métastables sans erreurs dues à la transition vers une phase plus stable durant la mesure. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour le vérifier.

De plus, on peut mesurer des solubilités à des températures plus élevées en évitant l'ébullition du solvant par la pression appliquée. En effet, on montrera dans le paragraphe C.2.3.2 (Figure 63) qu'en appliquant des pertes de charge au circuit, il est possible d'augmenter la pression dans le circuit microfluidique. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour vérifier la faisabilité des mesures de solubilité à des valeurs élevées de températures en augmentant la pression.

1.4. Optimisation du montage microfluidique

Une partie importante de ce travail de thèse a été consacrée à l'optimisation du matériel utilisé pour améliorer la qualité des différentes mesures effectuées avec la plateforme microfluidique. Pour la mesure de solubilité, les deux principaux défis étaient l'élaboration d'une cellule UV répondant à des caractéristiques spécifiques et le choix d'une régulation de température efficace.

1.4.1. Prototypage d'une cellule UV

La cellule UV dont nous disposons au CINaM, et qui avait été développée lors de la thèse de S.Zhang et C.J.J.Gerard (Figure 54), permet de placer un capillaire en PFA ou en PFA entre les deux fibres optiques reliées à la source lumineuse et au détecteur. Cette cellule UV a montré son efficacité pour la mesure de l'absorbance de protéines (Lysozyme et QR2) dont le maximum d'absorbance se situe vers 280 nm. Cependant, cette cellule comporte des défauts qui peuvent devenir limitants pour la mesure d'absorbance dans le cadre des mesures de solubilité de petites molécules.

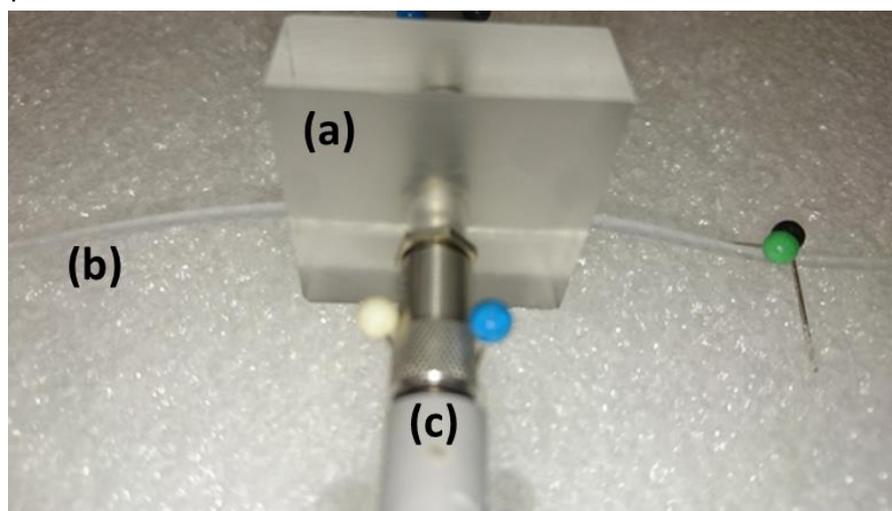


Figure 54. Photos de l'ancienne cellule UV (a) structure de la cellule en PMMA (b) capillaire en PFA, (c) fibres optiques.

1.4.1.1. Absorbance des capillaires

La lumière qui traverse la solution doit également traverser deux couches du capillaire en PFA ce qui engendre une absorbance importante (Figure 55, courbe orange). Cela a pour effet de couper le signal entre 200 et 250 nm et de le rendre très bruité entre 250 et 280 nm. Or les petites molécules étudiées dans cette thèse absorbent entre 240 et 300 nm. De plus, le bruit généré implique des incertitudes importantes sur le calcul des concentrations. On a essayé de s'en affranchir au maximum pour réaliser des mesures précises de solubilité en utilisant des capillaires en verre de 1 mm de diamètre interne et 1/16'' de diamètre externe (pour le bon raccordement avec le reste du circuit dans la zone de mesure). Même si ces capillaires sont en verre classique et présentent tout de même une absorbance jusqu'à 260 nm, cette dernière est bien moins importante que celle du PFA (Figure 55, courbe bleue), ce qui permet de réduire la coupure du signal à 220 nm au lieu de 250 nm, bien que le signal reste assez bruité entre 220 et 240 nm.

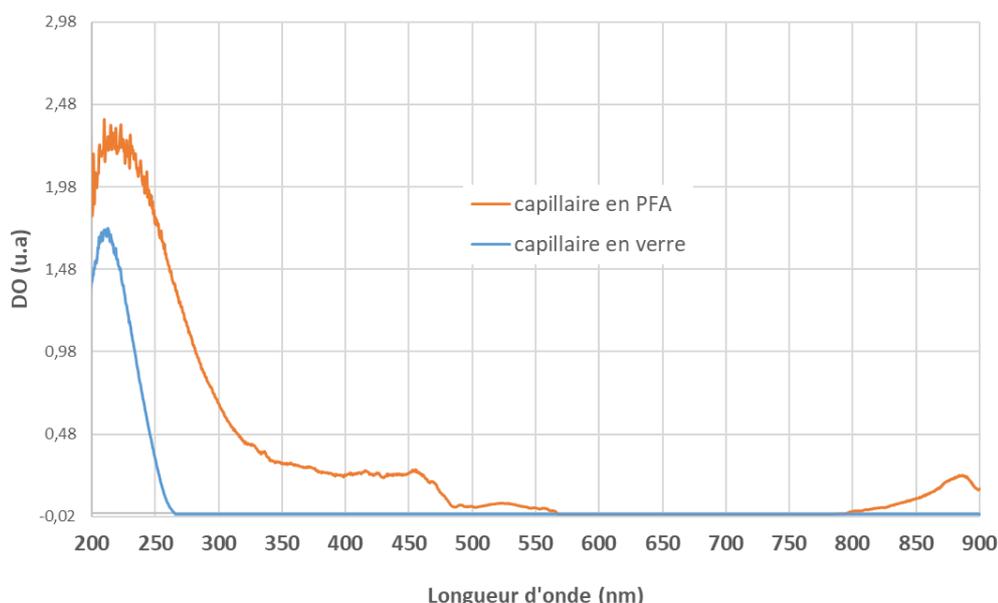


Figure 55. Spectre d'absorbance du capillaire en PFA et du capillaire en verre.
Blanc réalisé sur l'air, $t_{int}=100ms$.

Pour améliorer encore le rapport signal sur bruit à ces longueurs d'onde, une solution possible est l'utilisation de capillaire en verre de meilleure qualité ou avec une couche plus fine. En effet, la réduction du rapport signal sur bruit qu'il permet (en comparaison avec le PFA) est largement suffisante pour nos mesures effectuées entre 250 et 300nm. De plus, ces capillaires sont peu onéreux et facilement remplaçables (pouvant être considérés comme du consommable). Cependant, le raccordement avec le reste du circuit microfluidique peut être problématique et notamment avec l'utilisation de verre cassant.

1.4.1.2. Fixation des capillaires et des fibres optiques

Les capillaires (en verre ou PFA) ne sont pas fixés dans la structure en PMMA. Or lors des expériences, le capillaire peut bouger, engendrant des modifications du trajet optique qui mènent à des variations importantes des intensités transmises. De même, les fibres optiques doivent être maintenues afin d'éviter le même type de problèmes.

Pour cela, un nouveau prototype de cellule UV a été pensé, dessiné en CAO (Figure 56) puis réalisé à l'aide d'une imprimante 3D en collaboration avec Medhi Lagaize et Romain Grossier. Cette cellule UV imprimée en PLA comporte les améliorations suivantes :

- 2 trous permettant de visser la cellule à un support fixe pour éviter qu'elle ne bouge durant les mesures. (Figure 56a)
- 2 supports permettant de maintenir la partie sensible de la fibre à la cellule. (Figure 56b)
- 1 trou de diamètre 1/16" pour y faire passer le capillaire en verre (Figure 56c) dont un côté a été élargi et taraudé pour accueillir une fêrulle permettant la fixation du capillaire dans la cellule (Figure 56e). Ainsi une fois serré, le capillaire en verre n'a plus aucun degré de liberté.
- 1 trou perpendiculaire taraudé permettant d'accueillir l'embout SMA fixant les fibres optiques à la cellule UV tout en les alignant (Figure 56d).

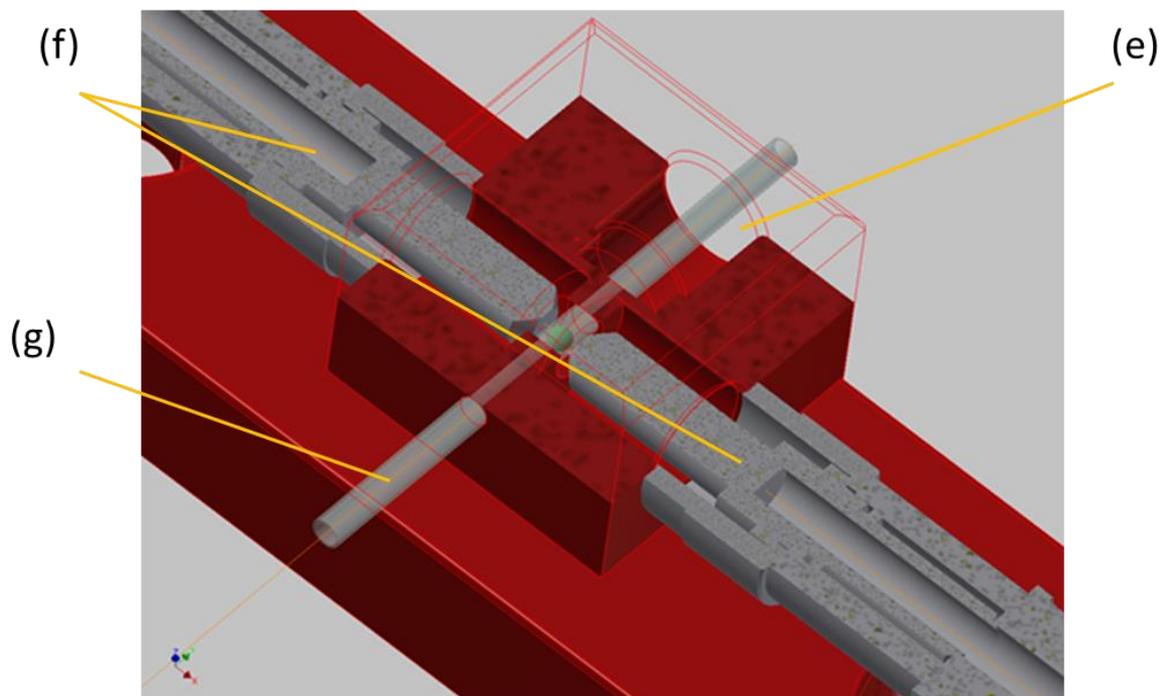
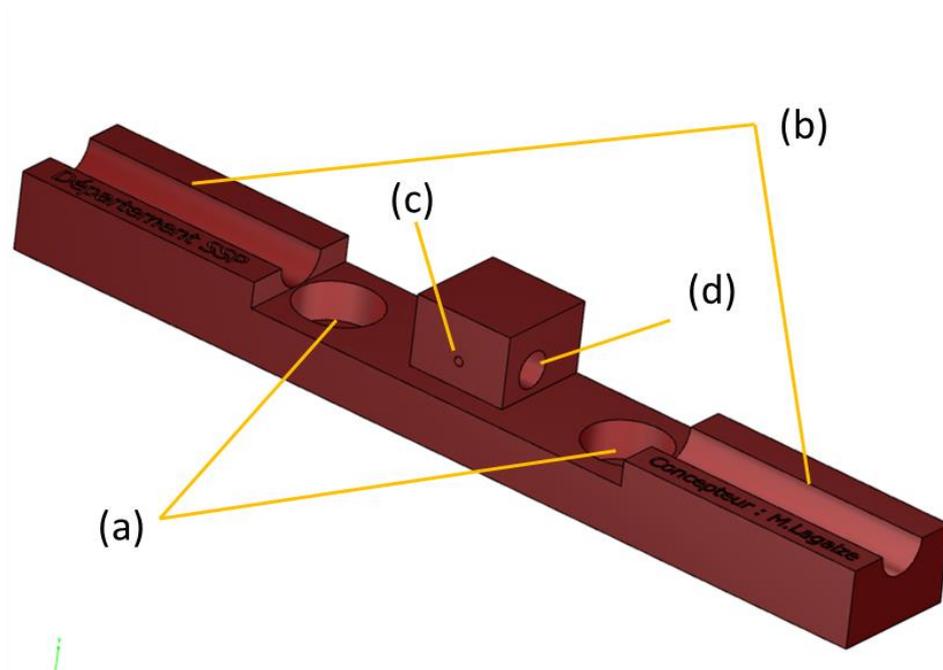


Figure 56. Dessin de la cellule UV : en haut vue globale et en bas vue en coupe (réalisé avec Inventor par Mr Medhi Lagaize) (a) trous de fixation de la cellule à un support, (b) support de maintien des fibres, (c) trou de passage du capillaire, (d) trou taraudé d'alignement des fibres, (e) trou taraudé pour accueillir la fêrulle de serrage du capillaire, (f) fibres optiques, (g) capillaire en verre.

1.4.2. Choix d'un système de régulation de température

1.4.2.1. Régulation par air chaud ventilé

La première solution pour réguler la température a été d'utiliser le chauffe-seringues déjà présenté précédemment (Figure 34). L'avantage de ce système de régulation est qu'il permet d'avoir accès au circuit microfluidique pendant les mesures et que son enceinte en PMMA transparente permet une bonne visualisation du montage. Cependant, la place manque dans l'enceinte pour accueillir à la fois le circuit et les seringues. Un autre problème est le fait que le chauffage des seringues à haute température (jusqu'à 70-80 °C) peut provoquer des fuites dues à la dilatation thermique. Or, une fuite dans le montage implique une mauvaise estimation des débits et donc une grande erreur sur la mesure des solubilités. Enfin, la température dans l'enceinte n'est pas vraiment homogène, des différences de quelques degrés peuvent être observées entre deux extrémités de l'enceinte.

Cette solution de régulation de la température peut être judicieuse pour chauffer des seringues à température modérée (jusqu'à 40-50 °C) ou réguler approximativement la température d'un circuit microfluidique, mais ne pourra pas être utilisée dans le cadre de la mesure de solubilité ou de la génération de solutions saturées où une précision plus importante est nécessaire.

1.4.2.2. Régulation par Chauffage Infra Rouge

Une solution plus « exotique » a été testée durant cette thèse. Le principe de celle-ci est d'utiliser une source d'émission de lumière infrarouge pour chauffer par rayonnement les circuits microfluidiques (Figure 57). La température est ainsi régulée par la variation de la puissance de la lampe infrarouge en fonction de la température mesurée par une sonde Pt100 et la température de consigne. La sonde de température peut être positionnée en contact direct avec les solutions passant dans le circuit microfluidique (Figure 58a et b). Les avantages de ce montage sont l'accessibilité du circuit pendant les expériences et le chauffage sélectif des composants absorbants. Cependant, il est assez compliqué de réguler la température en utilisant une source de chaleur par rayonnement. Les circuits microfluidiques sont composés de capillaires en PFA et de jonctions en PEEK qui absorbent différemment les infrarouges et chaufferont donc différemment. Une homogénéisation de la température au sein de circuit n'a pas pu être réalisée jusqu'à présent, mais cette solution peut être envisagée pour chauffer approximativement une partie du circuit microfluidique, par exemple pour transporter ou stocker une solution sous-saturée à « haute » température, c'est-à-dire au-dessus de la température de l'expérience à réaliser.

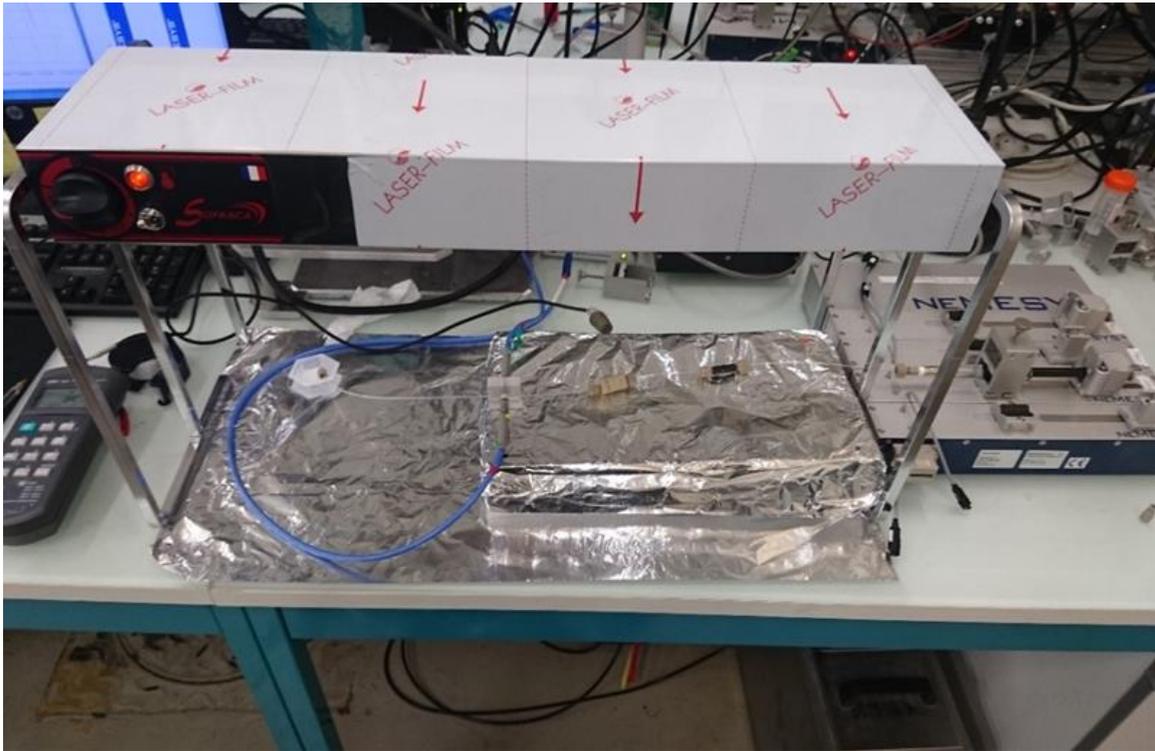


Figure 57. Photo du montage de régulation de température par chauffage Infrarouge.

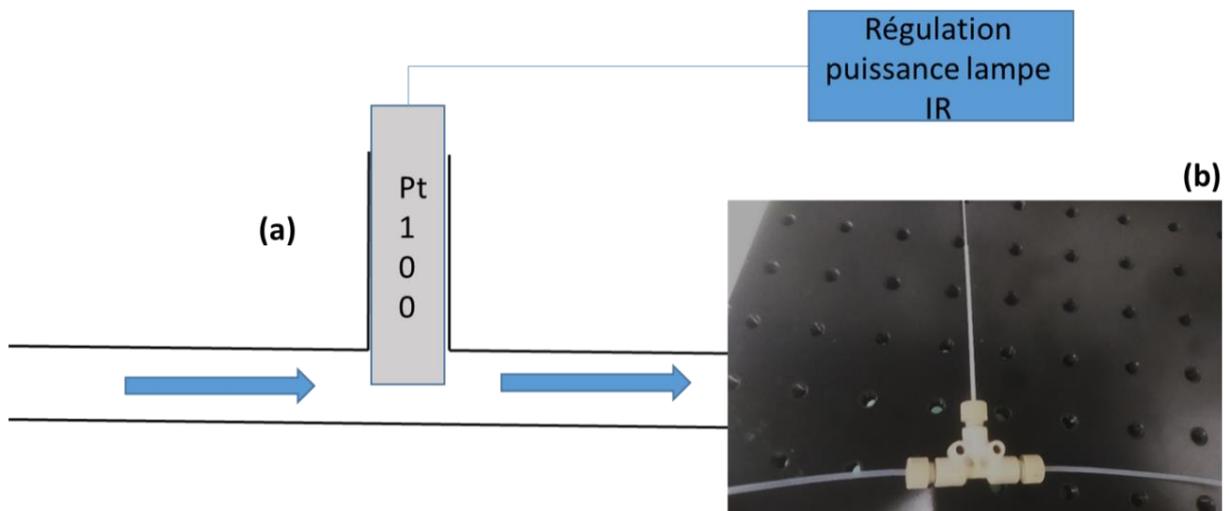


Figure 58. (a) Schéma de la technique de mesure de la température avec une sonde Pt100 (b) photo du montage.

1.4.2.3. Régulation par circulation d'eau

Une autre solution testée est d'utiliser de l'eau comme fluide caloporteur pour chauffer le circuit microfluidique. Cette eau peut être soit en circulation et chauffée par un bain thermostaté, soit chauffée par un élément Peltier. Les enceintes thermostatées utilisées ont été développées lors des thèses de doctorants précédents en collaboration avec la société ANACRISMAT, mais leur utilisation a été détournée de leur fonction de stockage des capillaires pour accueillir tout le circuit microfluidique. L'avantage de ce type de régulation est qu'elle permet une régulation optimale de la température qui reste homogène dans toute l'enceinte thermostatée. De multiples entrées/sorties sont prévues, et la mesure de la température se fait via une sonde Pt100 placée dans le bain d'eau. L'inconvénient est qu'une fois l'enceinte fermée, le circuit microfluidique n'est plus accessible jusqu'à la fin de la mesure. Ce montage permet toutefois une grande modularité notamment en comparaison des montages sur puce en PDMS ou COC « figées ».

Cette solution est celle qui a été retenue pour la mesure des solubilités en microfluidique au laboratoire du CINaM.

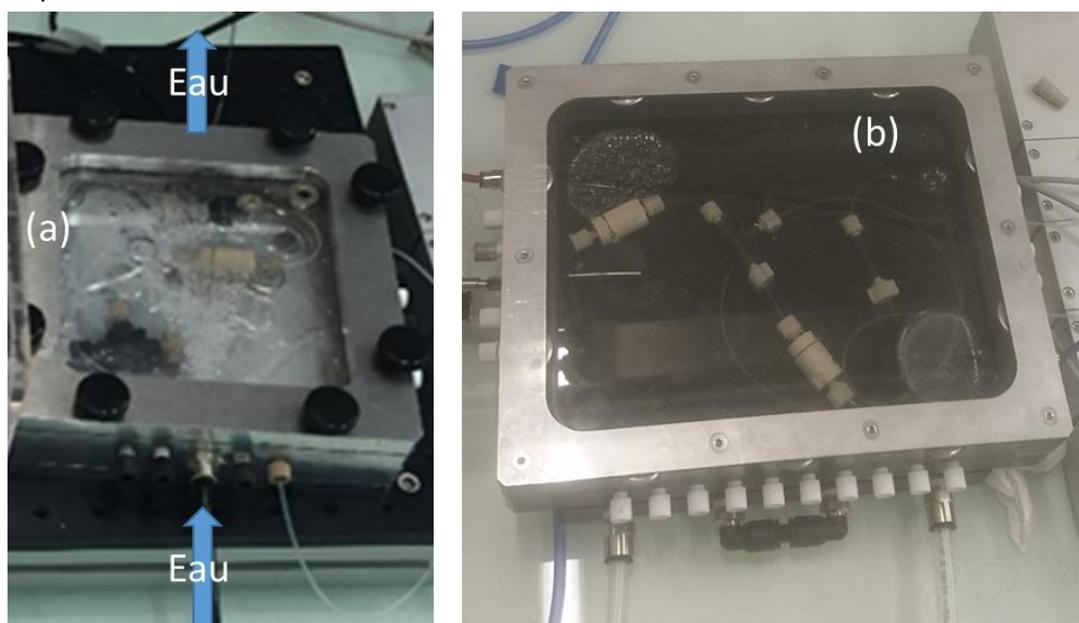


Figure 59. Photos des enceintes thermostatées en bain d'eau. (a) Par circulation d'eau chauffée à l'aide d'un bain thermostaté (b) Par eau chauffée par un élément Peltier.

1.4.2.4. Régulation à l'aide d'un four HPLC

Enfin, une solution de régulation plus adaptée au milieu industriel a été testée. Celle-ci utilise un ancien four de colonne d'HPLC pour le chauffage du circuit (Figure 60). Son système de fonctionnement est basé sur le chauffage d'une plaque métallique par effet Joule

au sein de l'enceinte. Si celle-ci est bien fermée, la température est homogène après quelques minutes. Cette solution permet de répondre aux contraintes de sécurité particulières appliquées dans un laboratoire de développement pharmaceutique. C'est pourquoi il a été choisi d'utiliser ce four pour les expériences en microfluidique dans les locaux TES.

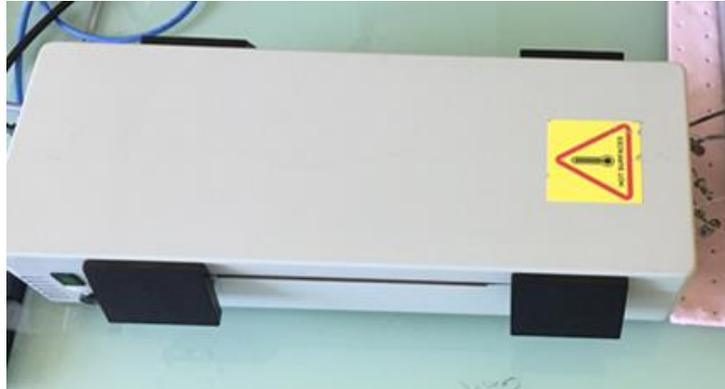


Figure 60. Four HPLC utilisé pour la régulation des circuits microfluidiques à TES.

Chapitre 2. Étude du polymorphisme en système microfluidique

2.1. Introduction

Nous avons vu précédemment qu'avec la microfluidique en capillaires, nous pouvions partir d'une poudre pour la dissoudre et générer des solutions saturées, dont nous savions mesurer la concentration en ligne. Nous contrôlons également la température à laquelle nous générons ces solutions afin d'atteindre des concentrations différentes. A la suite, l'enjeu consiste à utiliser ces solutions saturées pour l'étude de la cristallisation.

Afin de répondre au besoin de multiplier les expériences et de réduire les volumes dans les études de cristallisation, nous avons choisi d'utiliser la microfluidique à base de gouttes. Lors des thèses précédentes, des méthodes de cristallisation en microfluidique à base de gouttes ont été développées, mais principalement dans le cadre de la cristallisation de protéines. Dans cette thèse, nous verrons dans un premier temps que ces méthodes peuvent être transposées à l'étude de la cristallisation de petites molécules. Cependant l'utilisation de solvants organiques à plus haute température, nécessite une optimisation notamment dans le choix de l'huile inerte utilisée comme phase continue.

Puis, le montage pour l'étude du polymorphisme sera présenté et les résultats obtenus avec une molécule modèle (le sulfathiazole) seront exposés. Cette partie du manuscrit a pour but de montrer la faisabilité de l'approche que nous proposons pour cribler les polymorphes directement, à partir de faibles quantités de poudre en microfluidique.

Comme nous avons pu le voir dans la partie bibliographie de ce manuscrit, l'étude du polymorphisme d'une molécule est une étape importante lors du développement pharmaceutique d'un nouveau médicament. Le but est de faire varier les conditions de cristallisation afin de cribler les polymorphes existants et d'évaluer leurs propriétés physicochimiques. Ainsi, un grand nombre d'expériences doivent être réalisées avec des quantités de poudre disponibles qui sont en général faibles. De plus, la nucléation étant un phénomène stochastique, la répétition des expériences peut permettre de voir des phénomènes peu probables.

2.2. Choix de l'huile

En microfluidique, la formation de gouttes est réalisée par émulsion entre une phase dispersée (solvants contenant les molécules) et une phase continue (huile). Nous avons expliqué dans la partie bibliographie de ce manuscrit (A.3.1.2) que la formation de gouttes était régie par le nombre capillaire Ca (équation 13) faisant intervenir la viscosité dynamique de la phase continue et son énergie interfaciale avec la phase dispersée. Le choix de l'huile qui sera utilisée comme phase continue est donc primordial pour la suite des essais en microfluidique.

2.2.1. Problématique du choix d'huile

Il faut trouver une huile inerte chimiquement, permettant la formation de gouttes de solvant organique pour une large gamme de température (20-80 °C). Ce choix est d'autant plus difficile que l'utilisation de tensioactif, aidant la formation de gouttes et permettant de les stabiliser, est à proscrire pour ne pas interagir avec nos expériences de cristallisation. Au CINaM, les huiles traditionnellement utilisées en microfluidique sont le FMS et le FC70. Cependant, ces huiles ont été utilisées pour la formation de gouttes d'eau à des températures dépassant rarement les 40 °C (pour la cristallisation de protéine).

Le but a donc été de tester plusieurs huiles fluorées pour la formation de gouttes de solvant dans des canaux microfluidiques et à différentes températures.

2.2.2. Matériels et méthodes pour tester l'huile

Le solvant utilisé pour ces essais est l'éthanol, car celui-ci a été remarqué comme étant l'un des solvants avec lequel il est le plus difficile de former des gouttes en microfluidique. Cela est dû à sa faible énergie interfaciale avec les huiles fluorées (presque dix fois inférieure à celle de l'eau avec les mêmes huiles). L'éthanol utilisé est de l'éthanol absolu (99,9 %). Les huiles qui ont été testées sont le FMS, le FC70, le GPL103, GPL105 et GPL106.

Le système microfluidique utilisé pour ces essais est composé d'un pousse seringue équipé du chauffe seringue (permettant de réguler la température des différentes phases), de capillaires microfluidiques de 500 μm de diamètre interne en PFA, d'une jonction de type croix et d'une binoculaire afin de visualiser les gouttes. Pour faciliter leur visualisation, une feuille d'aluminium est placée sous le capillaire de sortie du système microfluidique. Un schéma du montage utilisé est présenté sur la Figure 61. Nous avons généré des gouttes avec une géométrie en croix, car c'est la géométrie qui permet de réaliser des mélanges et de faire varier la composition des gouttes. De plus, c'est également la géométrie qui donne la zone de fonctionnement la plus étroite, ce qui nous place dans la situation la moins favorable comme pour l'utilisation de l'éthanol.

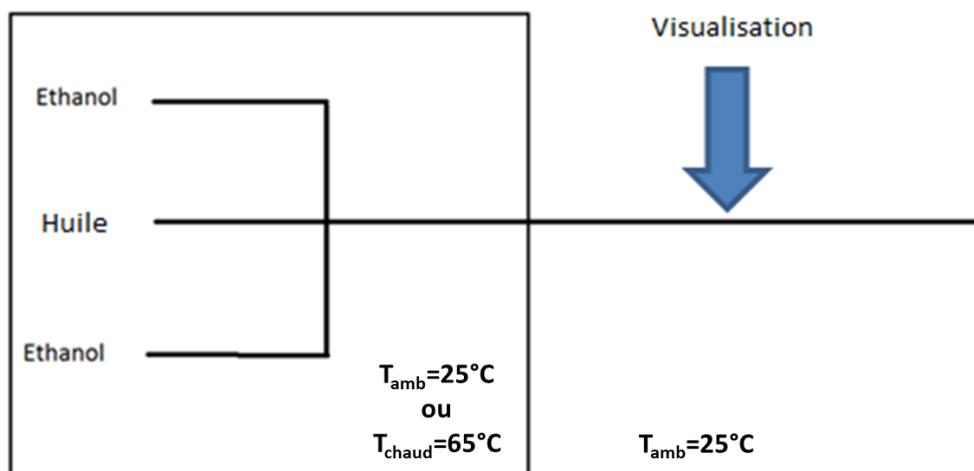


Figure 61. Schéma du montage de test des huiles pour la formation de gouttes d'éthanol

Pour chaque huile, la génération de gouttes est testée. D'abord à température ambiante pour une quinzaine de conditions de débits de phases continue et dispersée afin de délimiter la zone de fonctionnement donnant des gouttes monodispersées. Puis, à température plus élevée (65 °C) où les mêmes conditions de débits sont testées.

2.2.3. Résultats et discussion

2.2.3.1. Huile FMS

Cette huile ne permet pas de générer des gouttes d'éthanol monodispersées dans une large gamme de débits à haute température. De plus, cette huile n'a pas une bonne compatibilité avec les solvants organiques couramment utilisés en cristallisation comme ont pu le remarquer Zhang et al¹⁰, préférant l'utilisation du FC70 qui présente une meilleure compatibilité.

2.2.3.2. Huile FC70

Cette huile a été utilisée par Zhang et al¹⁰, pour la formation de gouttes d'éthanol à température ambiante. Bien qu'à 25 °C la génération de gouttes d'éthanol monodispersées est possible dans une large gamme de débits, à 65 °C cela se complique grandement : la gamme de générations de gouttes est réduite et les gouttes finissent par coalescer plus loin dans le capillaire (pendant le refroidissement dû au passage entre la zone chauffée du capillaire et la zone à température ambiante).

2.2.3.3. Les huiles GPL (103 105 106)

Les huiles GPL ont des caractéristiques chimiques similaires à celles du FC70, mais avec des viscosités différentes. Toutes ces huiles ont permis de générer des gouttes d'éthanol monodispersées à 25 et 65°C. Cependant, il a été remarqué que pour les huiles GPL103 et GPL105 (moins visqueuses que GPL106), les gouttes sont stables sur les dix premiers centimètres du capillaire de sortie, mais pas toujours plus loin dans le capillaire. De plus, lors d'un refroidissement (en chambre froide à 7°C) les gouttes finissent par coalescer.

En revanche, l'huile GPL106 qui est la plus visqueuse, permet de pallier ces problèmes. En effet, elle permet de générer des gouttes monodispersées d'éthanol dans une large gamme de débits pour des températures de 25 à 65°C et il n'y a pas coalescence lors d'un refroidissement du capillaire. L'huile GPL106 semble donc être un bon choix pour la formation de gouttes de solvants organiques en microfluidique.

2.3. Montage microfluidique pour l'étude du polymorphisme

2.3.1. Présentation du montage

Le montage microfluidique, choisi pour l'étude du polymorphisme de molécule d'intérêt pharmaceutique, est composé de deux principaux modules. Un module de génération des gouttes saturées et un module d'incubation et d'observation. Le montage complet est présenté sur la Figure 62. Le circuit microfluidique est composé de capillaires en PFA et de jonctions en PEEK. Les solutions sont introduites via les pousses seringues neMESYS®.

Dans le module de génération des gouttes (Figure 62b), les solutions saturées sont générées à l'aide de la méthode de préparation en ligne présentée précédemment (Figure 45). Le flux de la solution saturée rencontre ensuite un flux d'huile GPL106 dans une jonction en Té. Ainsi, des gouttes de cette solution saturée sont générées par « cross flowing », la phase continue étant injectée dans la branche principale et la phase dispersée dans la branche perpendiculaire. Afin, de contrôler la température de dissolution de la poudre, et donc la concentration des gouttes, cette partie du montage est immergée dans une enceinte thermostatée à circulation d'eau. La température de cette enceinte est contrôlée par un bain thermostaté et sa température est mesurée par une sonde Pt100. Pour séparer différentes conditions de génération des gouttes (et donc différentes compositions chimiques des gouttes), une vanne manuelle thermostatée permet d'orienter le flux de gouttes vers différents capillaires de sortie (Figure 62c). Cette vanne manuelle est composée d'une simple jonction union en PEEK disposée dans une enceinte thermostatée à circulation d'air (Figure 62c). La température de cette enceinte est réglée proche de la température de génération afin d'éviter d'éventuels phénomènes de nucléation non désirés dus à un changement de température.

Les gouttes sont ensuite stockées dans le module d'incubation et d'observation où la température est contrôlée par une enceinte thermostatée par des éléments Peltier avec de l'eau stagnante (Figure 62d). Une caméra motorisée permet de mémoriser la position des gouttes et de prendre automatiquement des photos de leurs évolutions durant l'incubation.

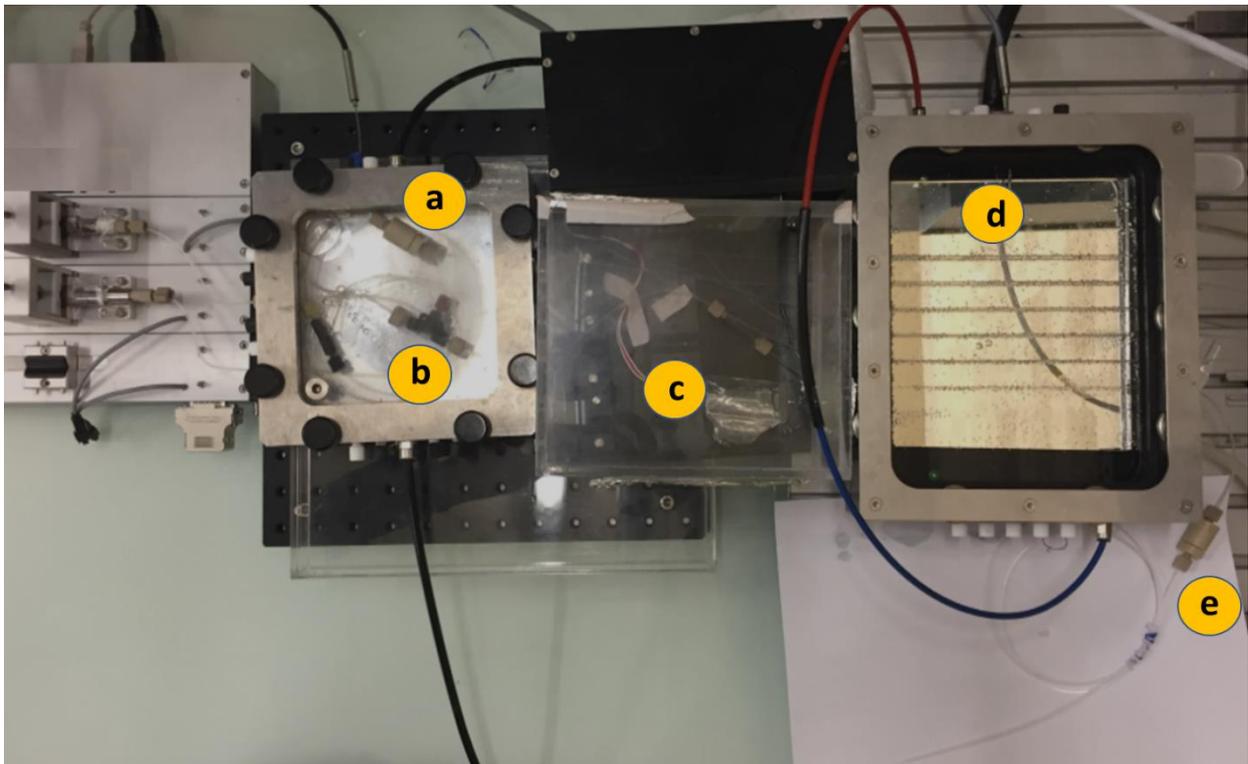
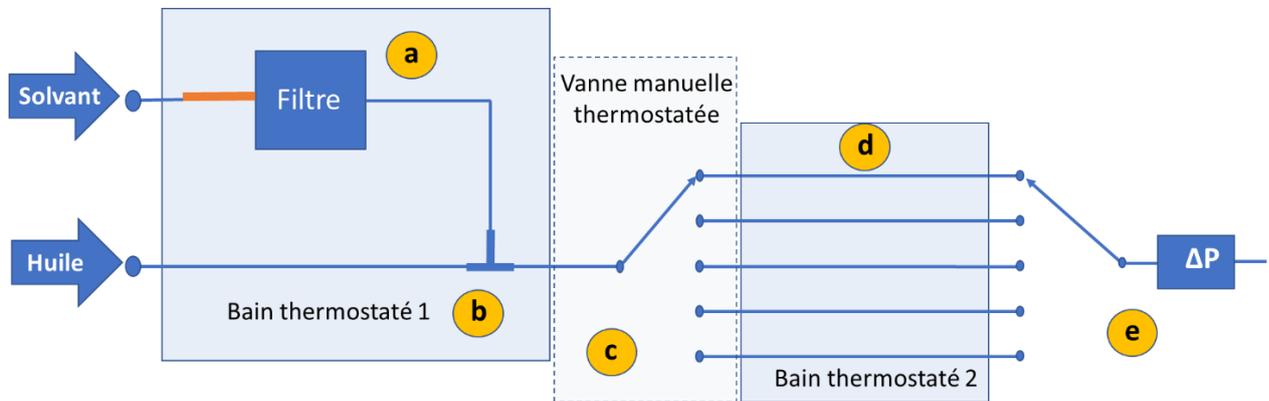


Figure 62. Montage microfluidique pour l'étude du polymorphisme. (a) capillaire 1mm DI rempli de poudre, (b) Module de génération des gouttes saturées, (c) Vanne manuelle thermostatée, (d) Module d'incubation et d'observation des gouttes, (e) Vanne manuelle et ajout de perte de charge (ΔP).

2.3.2. Problème de bulles

Lors des premiers essais, il a été remarqué la formation de bulles de gaz en sortie du filtre, notamment lors de l'augmentation en température, perturbant l'écoulement et provoquant la coalescence des gouttes. Ce problème a d'abord été pris pour un problème d'étanchéité dans le circuit puis pour un phénomène de nucléation de bulles d'air. Mais après vérification de l'étanchéité et dégazage des solvants utilisés, ce problème est resté persistant, car la cause de la formation de ces bulles est en fait, un phénomène de cavitation. En effet, l'augmentation locale de la vitesse du solvant lors de son passage dans le filtre (pore du filtre de $0,5\ \mu\text{m}$ (diamètre du capillaire de $500\ \mu\text{m}$) provoque des dépressions qui peuvent engendrer un changement d'état du solvant (flèche orange sur la Figure 63). Une réponse à ce problème est d'augmenter la pression appliquée au niveau du filtre, afin que les dépressions ne soient plus suffisantes pour le passage à l'état gazeux du solvant. Une manière d'augmenter la pression, à ce niveau du circuit microfluidique, est l'ajout de pertes de charge (noté ici ΔP) en aval du circuit (Figure 62e).

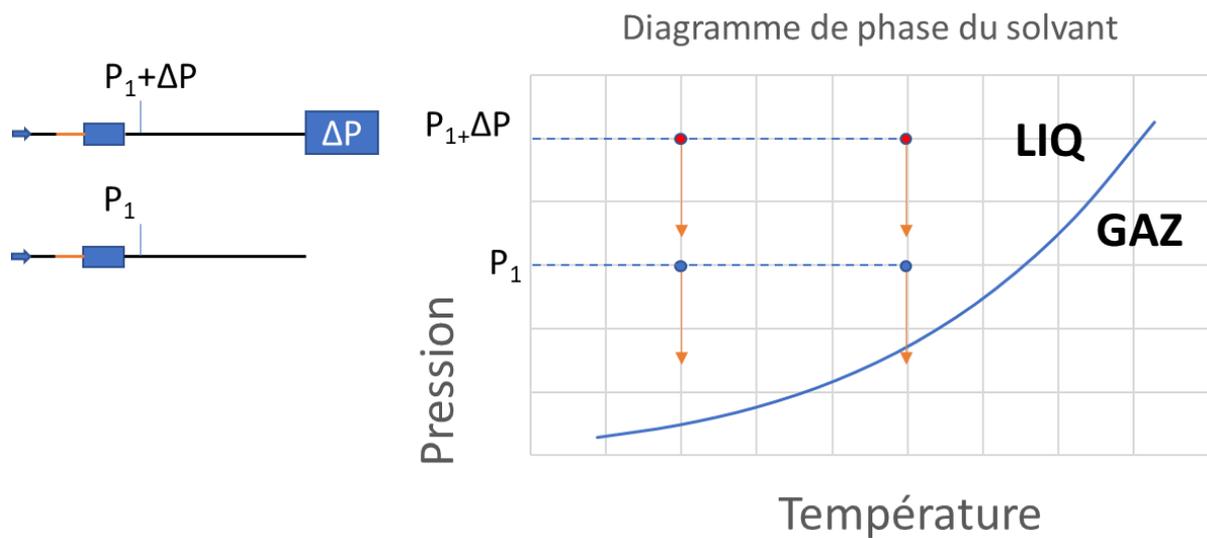


Figure 63. Schéma simplifié d'explication du phénomène de cavitation dans le circuit microfluidique. La courbe bleue représente la pression de vapeur saturante du solvant, en dessous de cette courbe le solvant est à l'état gazeux et au-dessus à l'état liquide. Les points bleus représentent l'évolution isobare lors d'une augmentation de la température dans le diagramme de phase lorsqu'aucune perte de charge n'est ajoutée. Les points rouges représentent l'évolution isobare lors d'une augmentation de la température dans le diagramme de phase lorsqu'une perte de charge est ajoutée. Les flèches orange représentent les dépressions générées lors du passage dans le filtre. Il est à noter que l'évolution de la pression lors d'une augmentation de température n'est pas réellement isobare, car la viscosité de l'huile va diminuer ayant pour effet une diminution de la pression au niveau du filtre selon l'équation 11.

Pour tester cette hypothèse, 50 cm de capillaire de 500 μm de diamètre interne ont été ajoutés à la fin du circuit (représentant une perte de charge d'environ 0,2 MPa dans nos conditions). Cela permet effectivement de s'affranchir des problèmes de formation de bulles. On peut même voir le retour à l'état liquide des bulles de solvant lors de l'ajout des pertes de charge. Afin de pouvoir ajouter la même perte de charge à toutes les sorties du circuit microfluidique une seconde vanne manuelle est ajoutée (Figure 62e).

2.4. Procédure de cristallisation

2.4.1. Génération de gouttes saturées à différentes températures

La première étape de la procédure de cristallisation consiste à générer des gouttes saturées à différentes températures (exemple de la Figure 64 : 45 ; 55 ; 70 °C). Chaque train de gouttes générées à une température, correspond à la concentration à saturation à cette température (C_s (T°C) sur la Figure 64). Chaque train de gouttes est alors stocké dans des capillaires différents choisis grâce à la vanne manuelle (il est à noter qu'à ce moment de l'expérience, il n'est pas nécessaire de connaître les solubilités qui pourront être mesurées ultérieurement). Tous les capillaires sont stockés dans le module d'incubation et d'observation à la température maximum de stockage noté T_{max} , choisie à 10 °C au-dessus de la température de génération la plus élevée (80 °C dans ce cas). Cela permet de dissoudre d'éventuels cristaux, formés lors d'un refroidissement non désiré dans le circuit. Cela permet aussi de tester l'éventuelle nucléation d'une phase plus stable (moins soluble). Pour cela, les gouttes sont stockées à T_{max} pendant 5 heures et des photos de chacune des gouttes (dont les positions ont été mémorisées au préalable) sont prises automatiquement par la caméra motorisée. L'augmentation de température des gouttes dans le diagramme de phase est schématisée sur la Figure 64.

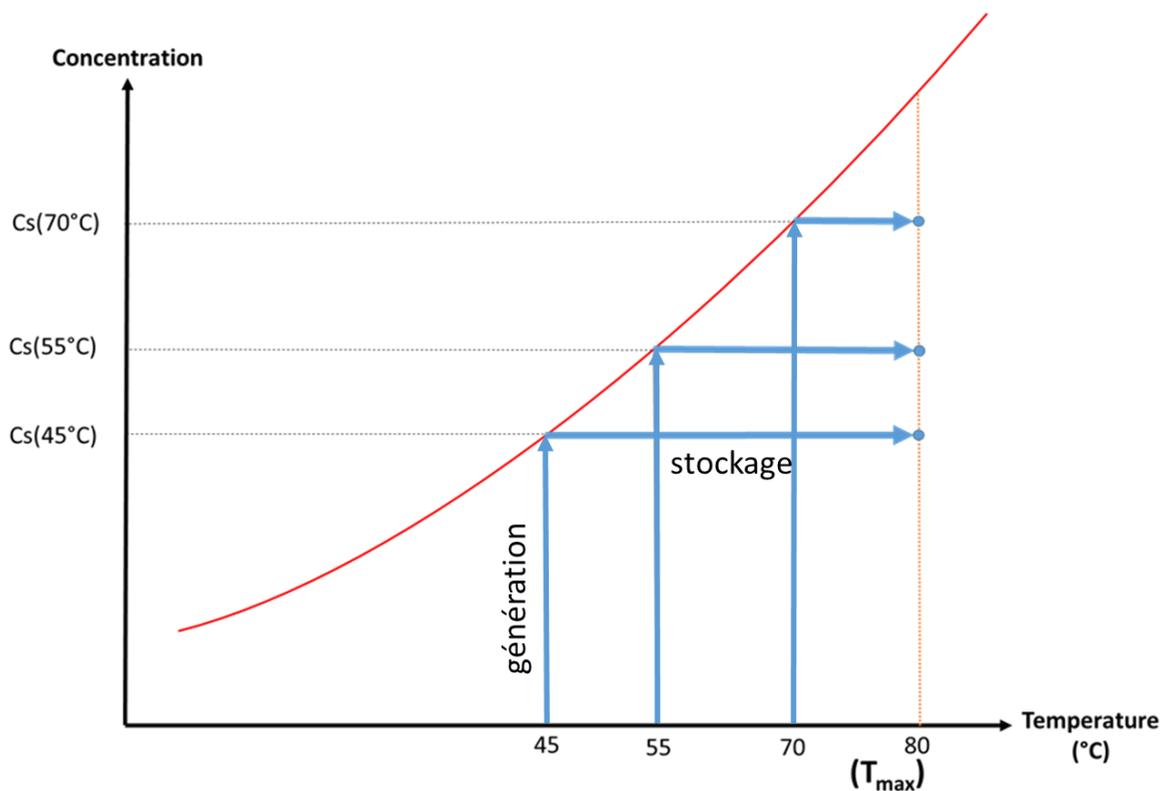


Figure 64. Schéma de l'évolution dans le diagramme de phase lors de la première étape.

2.4.2. Déclenchement de la nucléation

La deuxième étape de la procédure consiste à faire subir un refroidissement aux gouttes pour créer la sursaturation et déclencher d'éventuelles nucléations. Plusieurs types de refroidissement sont alors possibles comme une rampe de température ou une succession de paliers de refroidissement plus ou moins rapides. Ce refroidissement est réalisé jusqu'à la température minimale (T_{\min} sur la Figure 65) correspondant à la température minimale atteignable par l'enceinte thermostatée, ici 10 °C. Pendant ce refroidissement, des photos des gouttes sont prises automatiquement pour pouvoir suivre leur évolution (nucléation, croissance, dissolution, murissement...). Ainsi, la température et le temps d'incubation correspondant à un évènement donné pourront être connus. Cela permet de cribler une zone du diagramme de phases.

Une analogie peut être faite entre cette approche et celle développée par Detoisien et al ¹⁰⁵ avec un Multipuit. Il est possible, avec l'approche proposée ici, de réaliser le même type d'étude du polymorphisme qu'avec un multipuit mais avec les avantages de la microfluidique à base de goutte, c'est-à-dire la répétition des expériences et la diminution des quantités de matière première. De plus, le confinement lié au petit volume des gouttes permet d'atteindre des sursaturations plus importantes et d'isoler des phases métastables.

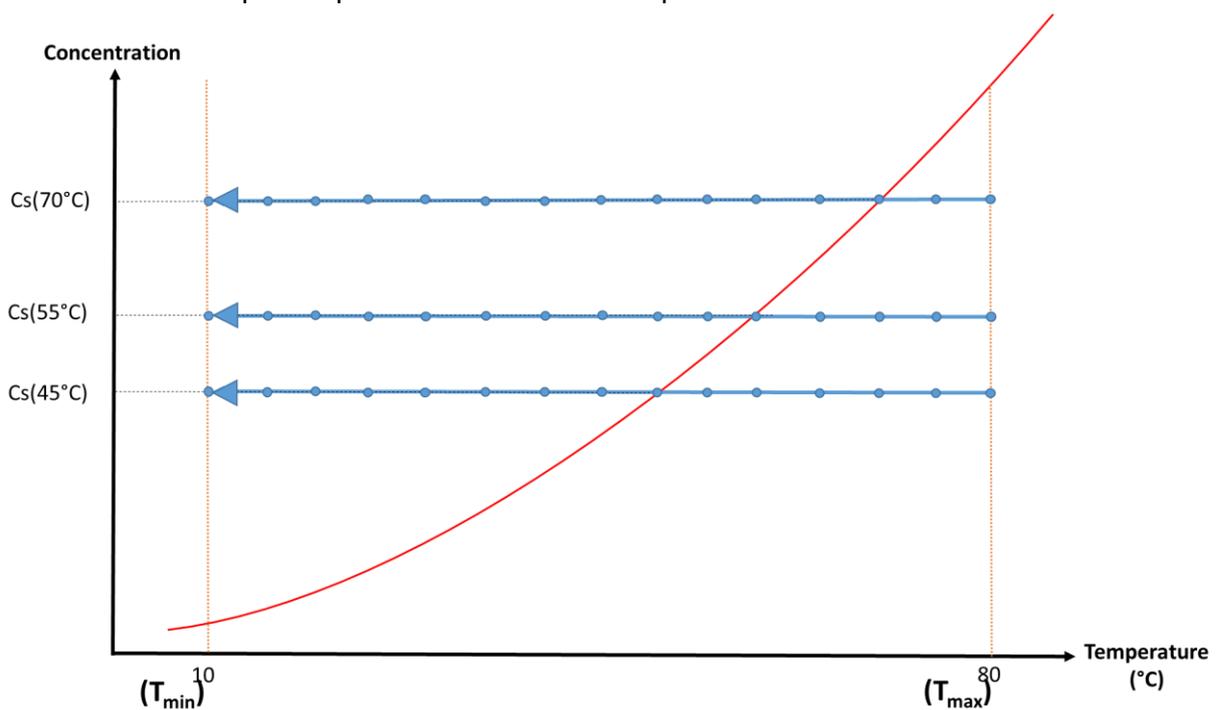


Figure 65. Schéma de l'évolution des gouttes dans le diagramme de phase lors d'un refroidissement par paliers. La courbe rouge représente la courbe de solubilité de la phase cristalline dissoute. Les points bleus représentent les paliers de températures.

2.5. Analyse des cristaux obtenus

Une fois l'étape de refroidissement terminée, un certain nombre de gouttes auront été le lieu de la cristallisation (par abus de langage, nous dirons que les gouttes ont nucléé). Les cristaux obtenus doivent alors être caractérisés afin d'identifier les phases cristallines apparues. Pour cela, plusieurs méthodes peuvent être utilisées ensemble ou séparément comme la microscopie optique, la spectroscopie Raman et la diffraction des Rayons X. Nous détaillerons ici, comment nous avons couplé ces méthodes de caractérisation à notre système microfluidique.

2.5.1. Microscopie optique

Comme nous avons pu le voir précédemment, une caméra motorisée permet la prise de photos durant l'évolution en température des gouttes. L'enceinte thermostatée utilisée dans le module d'incubation et d'observation permet d'immerger les capillaires dans de l'eau et d'adapter l'indice optique. Ainsi les images des gouttes sont nettes malgré la couche de PFA du capillaire. Il est donc possible, grâce à ce dispositif, de visualiser le faciès des cristaux obtenus (Figure 66), mais aussi leur croissance (Figure 67) pendant l'évolution de la température. En fin d'expérience, une rotation du capillaire peut être réalisée afin d'avoir plusieurs angles de vue d'un même cristal pour identifier ses faces (Figure 66).

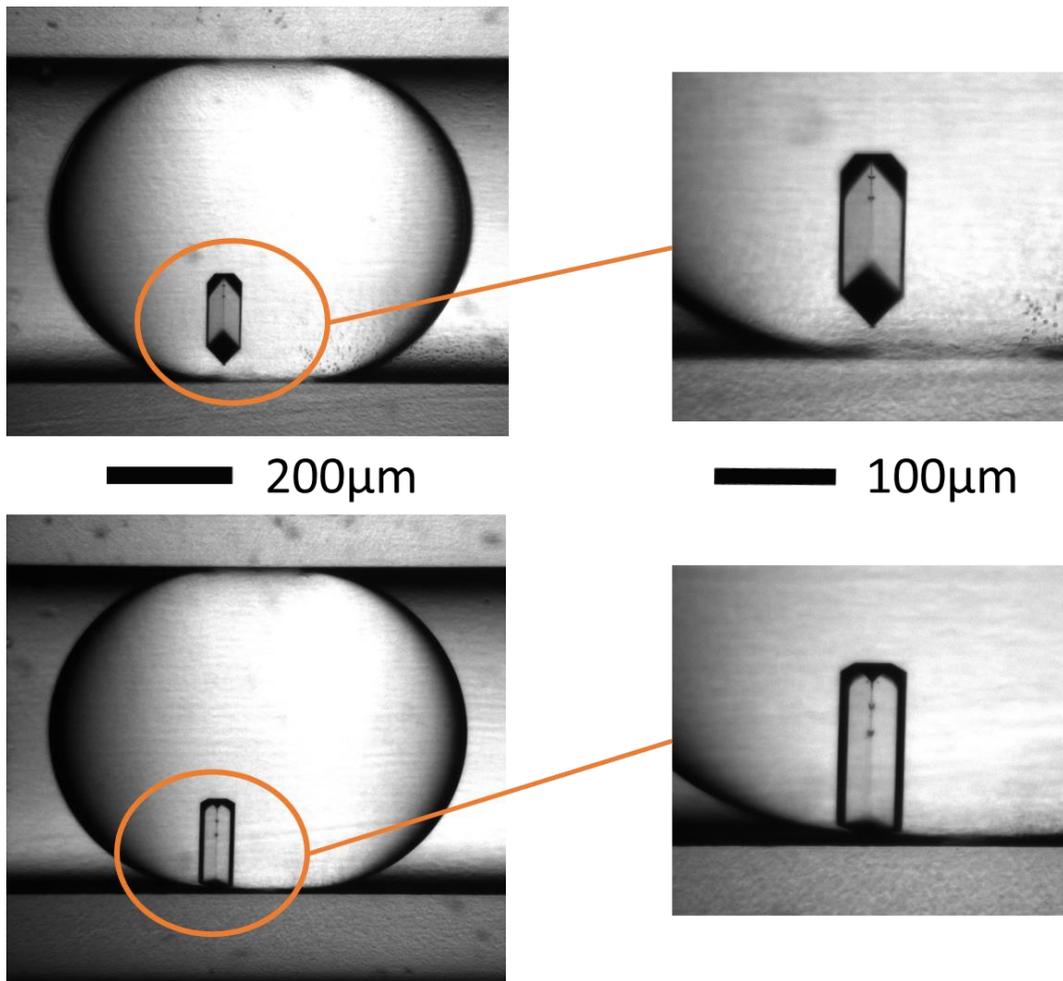


Figure 66. Photos d'un même cristal de Sulfathiazole avec 2 angles de vue et 2 grossissements différents.

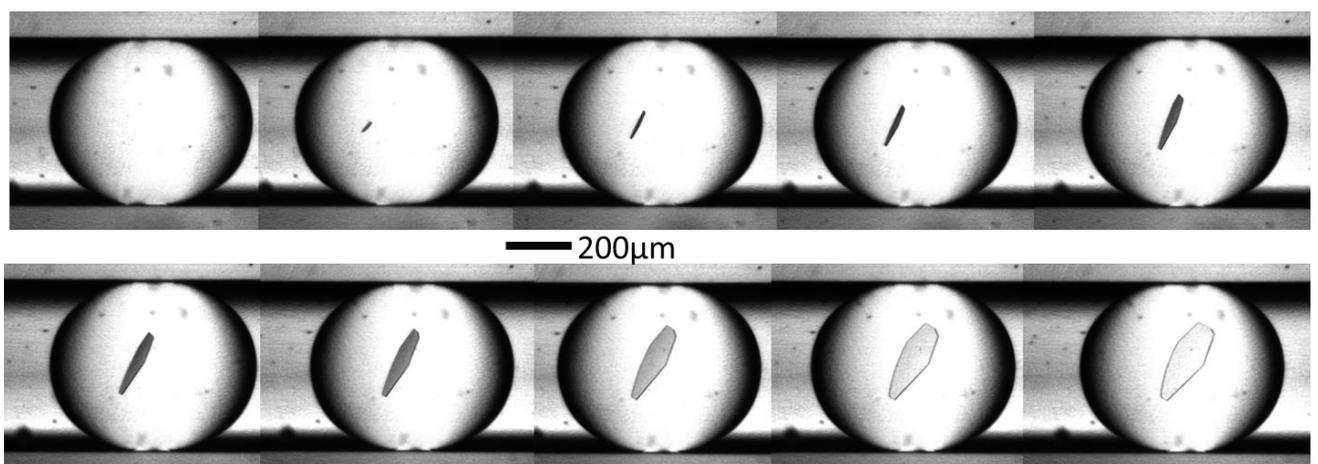


Figure 67. Croissance d'un cristal de Sulfathiazole dans l'eau (à température constante 45 °C) chaque photo de gauche à droite a été prise à 10 minutes d'intervalle.

2.5.2. Analyse In-situ par Microscopie Raman

L'avantage du couplage de la spectroscopie Raman à la microfluidique est qu'elle permet une analyse in situ des cristaux contenus dans une goutte, et donc de façon non invasive. De plus, le signal récupéré dû au cristal se distingue facilement du signal dû au laser qui traverse la couche de PFA, le solvant (constituant la goutte) et, potentiellement, une fine couche d'huile (entre la goutte et le capillaire).

Pour cela, une fois l'expérience de cristallisation terminée le capillaire est récupéré puis placé sous le microscope Raman (RXN1 Kaiser Figure 41). L'objectif utilisé est un objectif x10, sa focale permet de visualiser la goutte dans toute sa profondeur en zoomant sans toucher le capillaire (ce qui n'est pas le cas de l'objectif x50 dont nous disposons). Afin d'améliorer le signal Raman lors des mesures, un support en aluminium est placé sous le capillaire.

De plus, il est possible de modifier les conditions expérimentales comme le temps d'exposition (en seconde) et le nombre de répétitions. Ces paramètres vont déterminer le temps de mesure qui pourra varier de 2 s à plusieurs minutes. Ces paramètres sont choisis suivant la qualité du spectre souhaité et la taille du cristal. En effet, plus un cristal est petit, plus sa signature en Raman sera faible.

2.5.2.1. *Identification d'un cristal dans une goutte.*

Comme le laser traverse le capillaire, l'huile et le solvant en plus du cristal, nous devons dans un premier temps repérer les pics correspondant à ces matériaux. Pour cela, les spectres Raman du capillaire, de l'huile et du solvant sont mesurés en utilisant les mêmes paramètres expérimentaux. La Figure 68 montre la superposition des spectres d'un capillaire en PFA, de l'huile GL106, d'une goutte d'acétonitrile et d'un cristal de Gliclazide contenu dans une goutte avec une exposition de 5 fois 5 secondes. On peut remarquer, sur la courbe bleue, que même si les pics les plus intenses sont ceux du PFA et du solvant, un certain nombre de pics sont caractéristiques du cristal de Gliclazide. La Figure 69 compare le spectre d'un cristal de Gliclazide dans une goutte et le spectre obtenu directement sur la poudre. La superposition des pics obtenus confirme bien l'identification des pics dus au cristal dans la goutte.

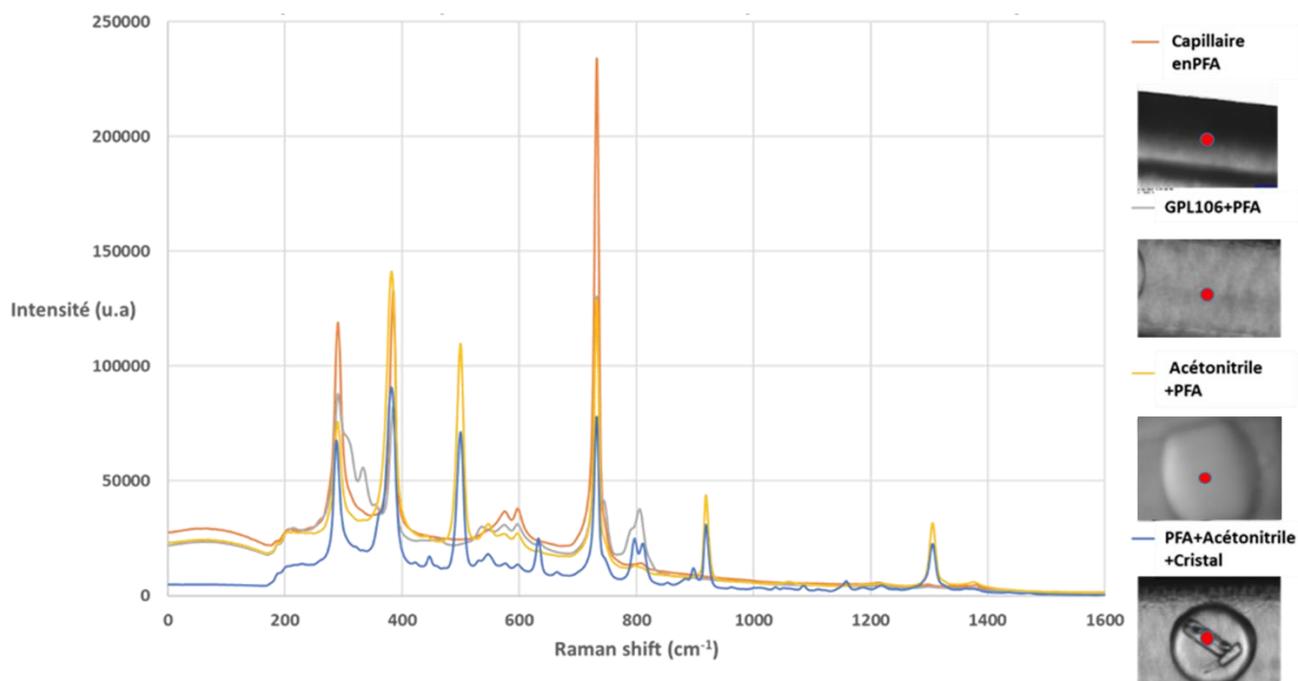


Figure 68. Spectre Raman obtenu à différents endroits d'un capillaire de 500 μm contenant des cristaux de Gliclazide dans des gouttes d'acétonitrile (Exposition : 5X5s)

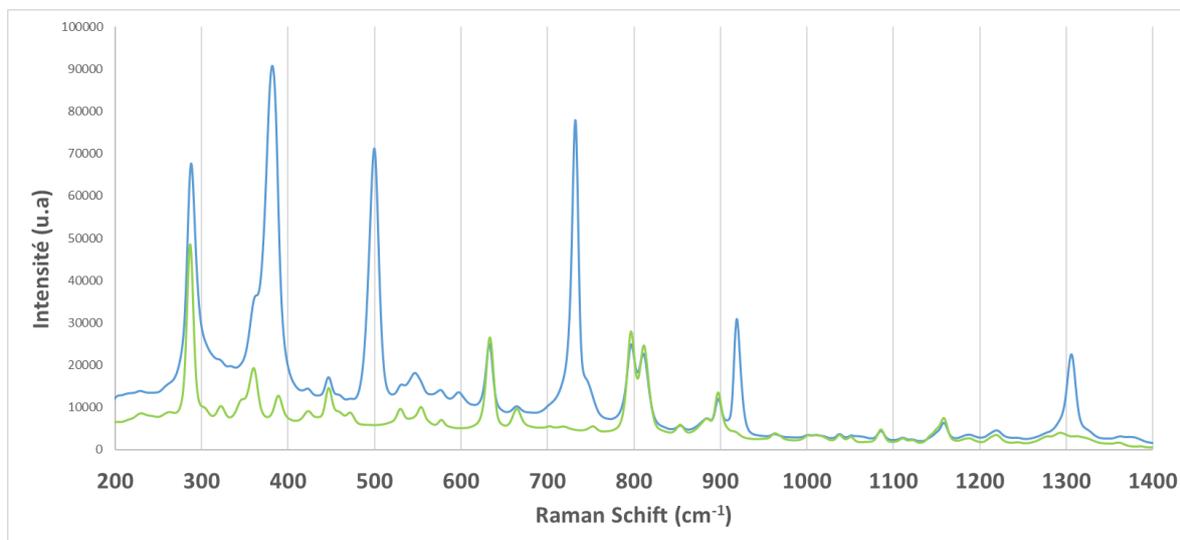


Figure 69. Spectre Raman d'un cristal de Gliclazide dans une goutte d'acétonitrile (en bleu) et de la poudre de Gliclazide (en vert) (Exposition 5X5)

2.5.2.2. Influence des différents paramètres de mesures

Comme nous avons pu le voir, il est possible d'identifier un cristal dans une goutte, in situ, à l'aide d'un microscope Raman. Cependant, le signal correspondant au cristal peut être faible c'est pourquoi nous verrons, ici, sur quels paramètres il est possible de jouer afin de l'améliorer.

2.5.2.2.1. Diamètre interne des capillaires

Une manière simple d'obtenir de meilleurs spectres est d'utiliser des capillaires dont la couche de PFA est plus mince. C'est le cas des capillaires de 1 mm de diamètre interne qui ont le même diamètre externe que ceux de 500 μm (1/16"). Ces capillaires permettent donc d'obtenir des spectres où le pic correspondant au PFA est moins intense. Il est à noter que l'utilisation de capillaire de PFA permet, tout de même, d'obtenir des spectres de suffisamment bonne qualité pour l'identification d'une phase (Figure 68 et Figure 69)

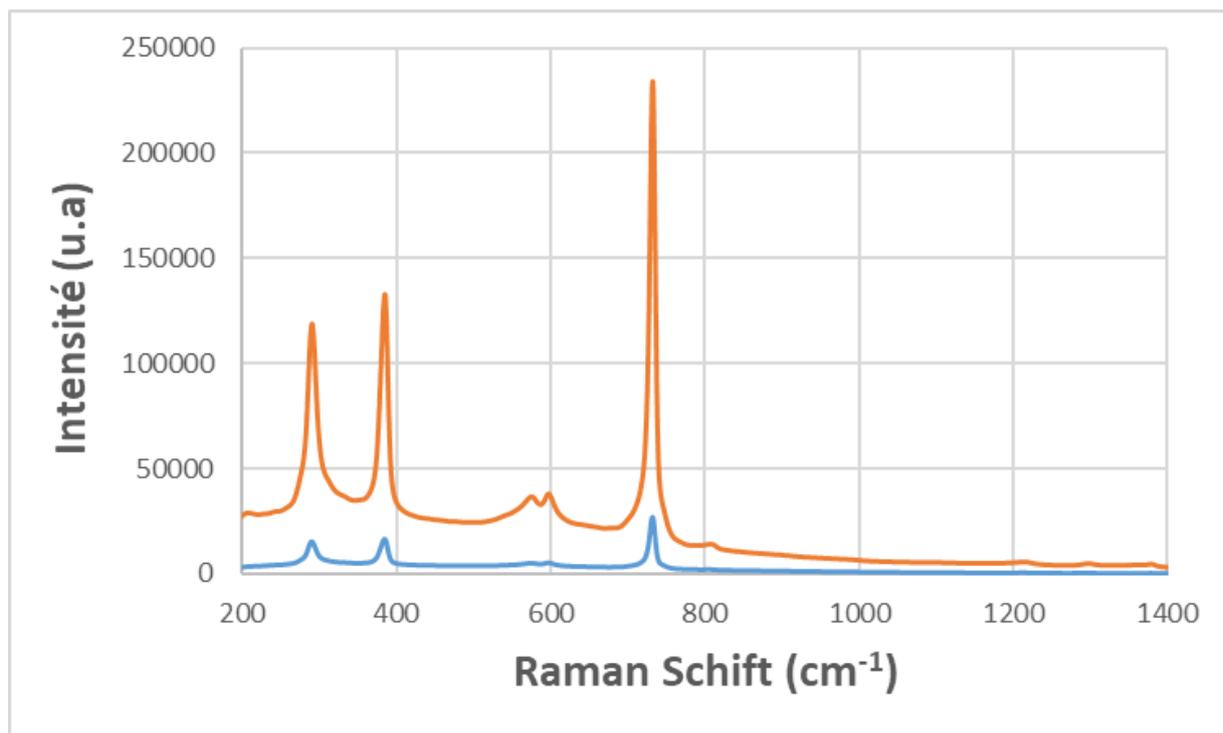


Figure 70. Comparaison du spectre d'un capillaire de PFA de 500 μm (Orange) et de 1 mm (Bleu) vide obtenu dans les mêmes conditions expérimentales (Exposition : 5X5s), le focus étant réalisé au centre du capillaire.

2.5.2.2.2. Influence du focus

Un facteur important lors de la mesure est le focus. Comme le montre la Figure 71, plus l'image du cristal est nette optiquement, plus le signal correspondant au Gliclazide (pic entre 620 et 640 cm^{-1}) est intense et celui du PFA faible (pics entre 560 et 620 cm^{-1}). Cependant on peut remarquer que la différence optique entre les focus 4, 5 et 6 n'est pas flagrante alors que ce dernier permet tout de même d'obtenir un signal significativement plus important. C'est pourquoi, si un spectre de bonne qualité est nécessaire, il sera préférable d'effectuer rapidement plusieurs focus pour déterminer lequel permet d'obtenir un signal optimal.

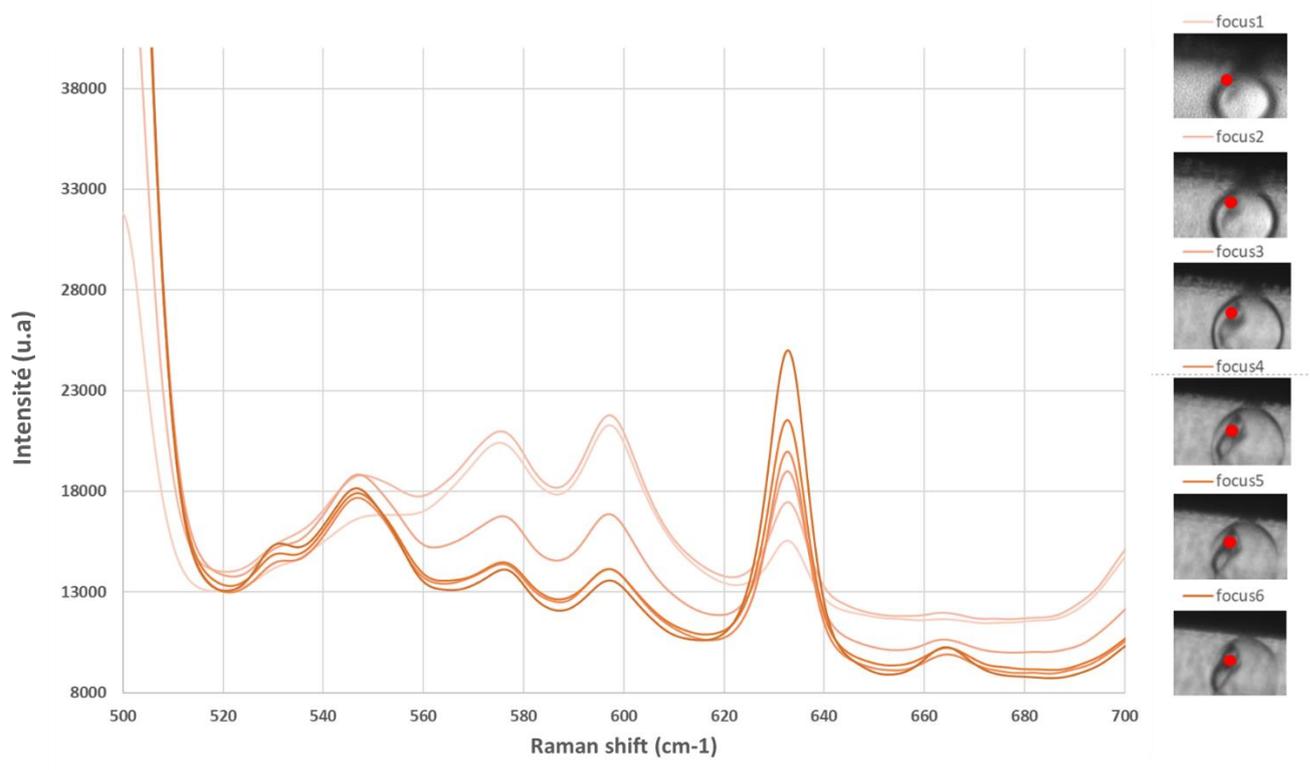


Figure 71. Spectres Raman d'un cristal de Gliclazide dans une goutte d'acétonitrile acquis à plusieurs focus. À droite, les photos obtenues à l'aide du microscope, le point rouge représentant le faisceau du laser.

2.5.2.3. Protocole de mesure lors d'un criblage

Nous avons vu comment obtenir le spectre Raman d'un cristal dans une microgoutte, comment repérer ses pics caractéristiques et améliorer le signal obtenu. Cependant, lors d'un criblage du polymorphisme, il n'est pas rare de devoir caractériser plusieurs centaines de microgouttes. De plus, les phases obtenues sont potentiellement inconnues et il sera alors nécessaire d'approfondir les résultats obtenus avec de la diffraction des rayons X. Nous allons voir ici comment nous avons optimisé l'étape de caractérisation in situ en Raman pour que le procédé puisse être applicable dans le cas d'un criblage.

Avant tout, il est nécessaire de mesurer le spectre Raman de la poudre de départ afin d'avoir une référence sur laquelle se baser pour la suite des expériences. Puis un spectre de référence des différents solvants, du capillaire et de l'huile utilisés est acquis (par mesure directe ou en utilisant une base de donnée provenant d'expériences précédentes). Une possibilité est aussi de prendre comme référence le spectre d'une goutte de solvant pur générée dans le capillaire qui sera donc la somme des spectres correspondant au capillaire au solvant et à l'huile.

Ensuite, les gouttes peuvent être passées, une par une, sous le microscope Raman, mais inutile d'avoir des spectres bien définis lors de cette première étape. Le but est

uniquement d'identifier si différents types de spectres sont obtenus (ce qui pourrait indiquer la présence de phases différentes). Pour cela, des spectres obtenus dans des conditions d'expositions rapides sont suffisants (2x2s). Si des spectres différents de celui obtenu à partir de la poudre de départ sont identifiés, on peut décider d'acquérir un spectre de meilleure qualité sur une des gouttes présentant des différences. La position de cette goutte est repérée sur le capillaire pour éventuellement la récupérer et la passer en diffraction des rayons X.

Ce protocole de criblage en 2 étapes permet de gagner du temps, d'analyser des centaines de gouttes en quelques heures et de repérer les gouttes qui doivent être récupérées pour des analyses plus poussées.

2.5.3. Méthode d'analyse en diffraction des rayons X

Afin de confirmer l'association d'un spectre Raman à une phase cristalline, il est nécessaire de réaliser de la diffraction des rayons X sur certains des cristaux obtenus. Plusieurs méthodes sont alors possibles. Une première méthode consiste à récupérer le cristal d'intérêt en déposant la goutte dans un bain d'huile fluoré puis d'utiliser une grille micromèche pour ne récupérer que le cristal d'intérêt⁸⁷. Cette méthode est efficace et a prouvé son efficacité. Cependant, lors de cette thèse d'autres méthodes plus directes ont été expérimentées afin de permettre une mesure plus rapide.

2.5.3.1. *Mesure in situ à travers le capillaire*

Une première méthode consiste à faire les mesures directement à travers le capillaire. Il suffit donc d'identifier la goutte d'intérêt puis de couper et sceller le capillaire autour de cette zone. Le morceau de capillaire contenant la goutte et le cristal est ensuite placé sur le goniomètre du diffractomètre et après réglage de la position du capillaire (pour que le faisceau de rayons X soit bien aligné) l'acquisition peut être lancée. Comme pour les mesures in situ en Raman, un cliché de diffraction est d'abord obtenu à partir d'une goutte ne contenant pas de cristal afin d'avoir une référence correspondant au capillaire, au solvant et à l'huile. Une comparaison des clichés obtenus sur une goutte avec et sans cristal est présentée sur la Figure 72.

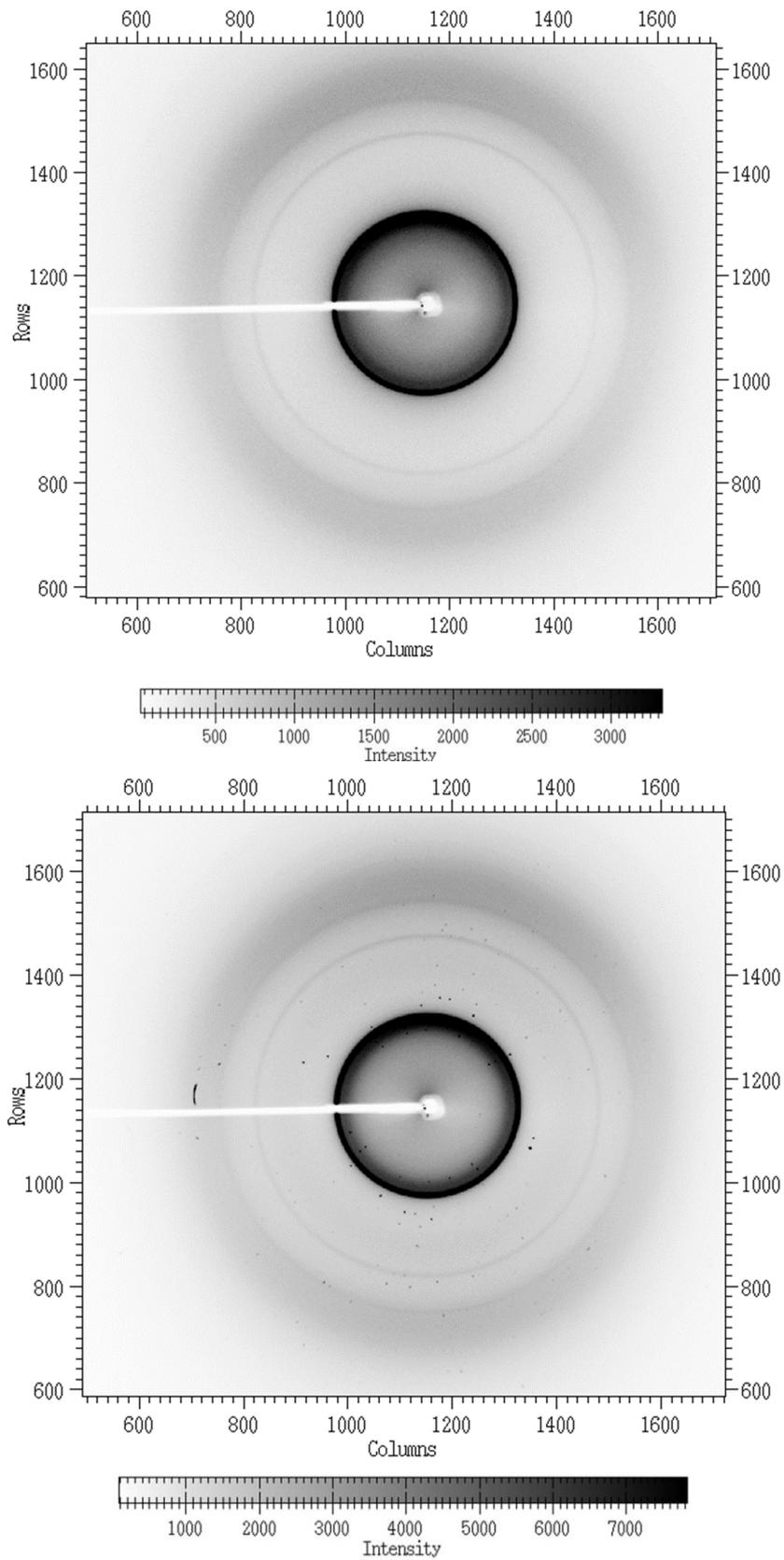


Figure 72. Clichés de diffraction obtenus : en haut sur une goutte d'eau ne contenant pas de cristal et en bas sur une goutte d'eau contenant un cristal de Sulfathiazole.

Comme on peut le voir, des tâches correspondant au cristal sont visibles. Cependant, il est difficile d'identifier une phase polymorphique particulière avec cette méthode, car les intensités des pics du cristal sont faibles comme peut le montrer la Figure 73, où tous les pics visibles correspondent au PFA du capillaire.

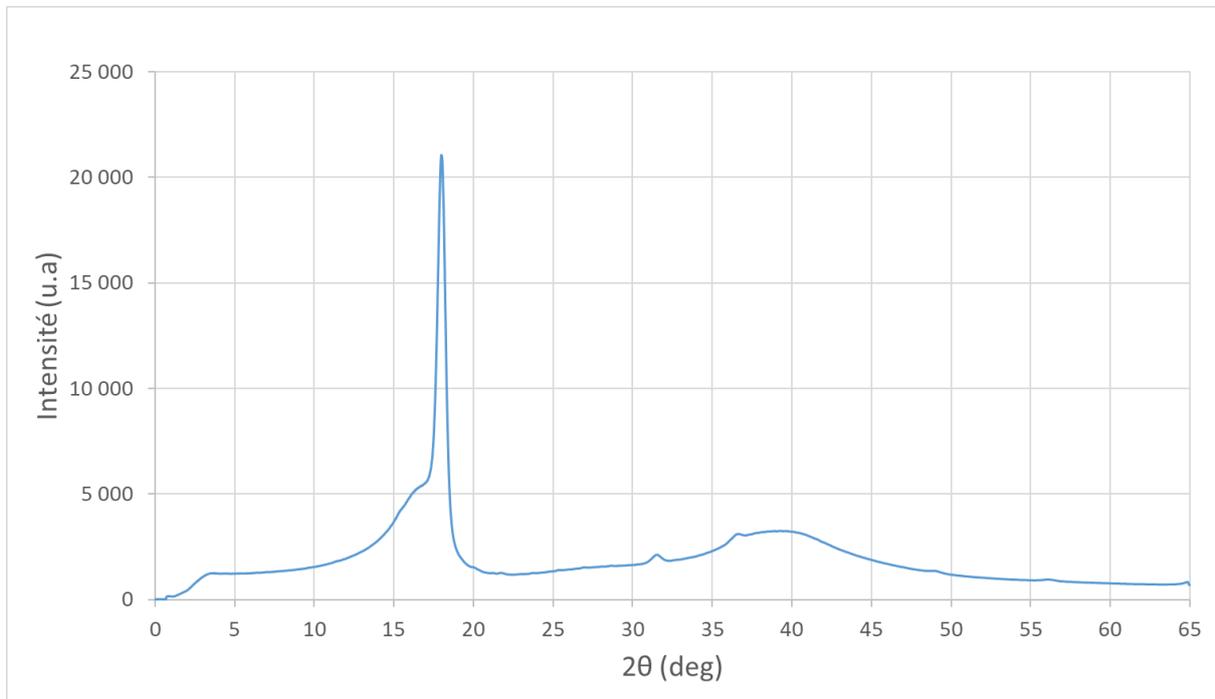


Figure 73. Diffractogramme d'un cristal de sulfathiazole II à travers un capillaire microfluidique de 1 mm de Diamètre interne (360 s d'exposition).

Il est cependant possible de récupérer les d_{hkl} à partir du cliché de diffraction afin de les comparer avec des données de la littérature (s'il elles sont disponibles).

2.5.3.2. Mesure Ex-situ

2.5.3.2.1. Par passage de la goutte dans un capillaire en verre

Afin d'obtenir des diffractogrammes de meilleure qualité, une solution intéressante est de réduire le signal correspondant au capillaire en PFA en utilisant un capillaire en verre. Une méthode de transfert a donc été expérimentée afin de récupérer la goutte d'intérêt dans un capillaire en verre sans contact avec l'extérieur.

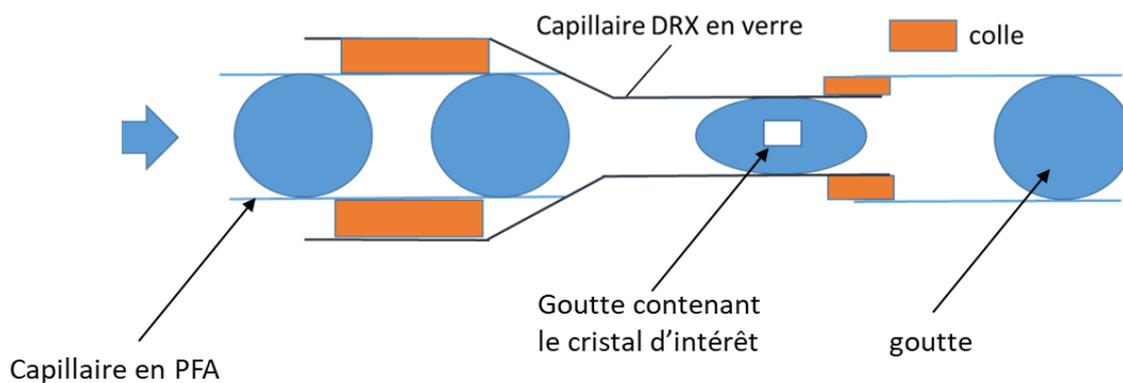


Figure 74. Schéma montrant le montage pour la récupération d'une goutte dans un capillaire en verre.

Le principe est de coller le capillaire en PFA contenant les gouttes à l'intérieur d'un capillaire en verre dans la partie la plus large, de diamètre supérieur au diamètre extérieur du capillaire en PFA. Ce capillaire en verre est préalablement rempli d'huile, cela permettra qu'une fine couche d'huile reste sur les bords intérieurs du capillaire, le rendant plus hydrophobe et améliorant le passage des gouttes. Puis l'extrémité du capillaire en verre qui présente un diamètre inférieur au diamètre interne du capillaire en PFA (<1mm) est collé à l'intérieur de ce dernier (Figure 74). Un débit faible (entre 0,5 et 1 mL/h) est appliqué afin de pousser les gouttes dans le capillaire en verre puis dans le capillaire en PFA. Une fois la goutte d'intérêt positionnée dans le capillaire en verre, le débit est stoppé et le capillaire en verre est récupéré, scellé et placé sur l'anode tournante du diffractomètre. Cette méthode permet de récupérer une goutte tout en gardant le reste des gouttes intactes. Cependant, cela nécessite de la minutie de la part de l'opérateur.

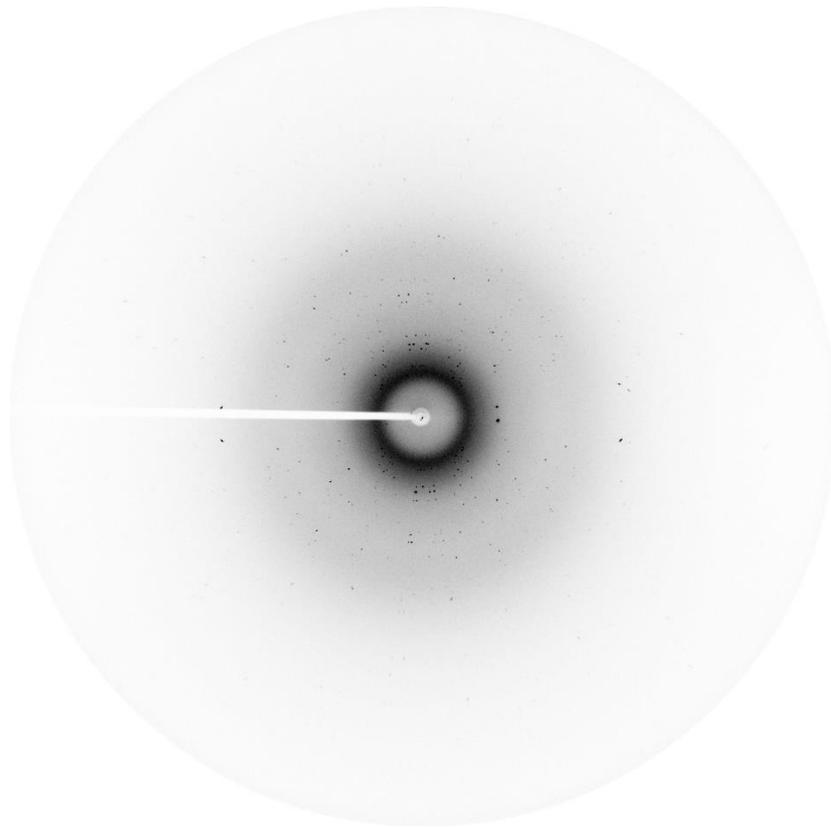


Figure 75. Cliché de diffraction d'un cristal de sulfathiazole obtenu dans un capillaire en verre de 0,7mm de diamètre interne (360 s d'exposition).

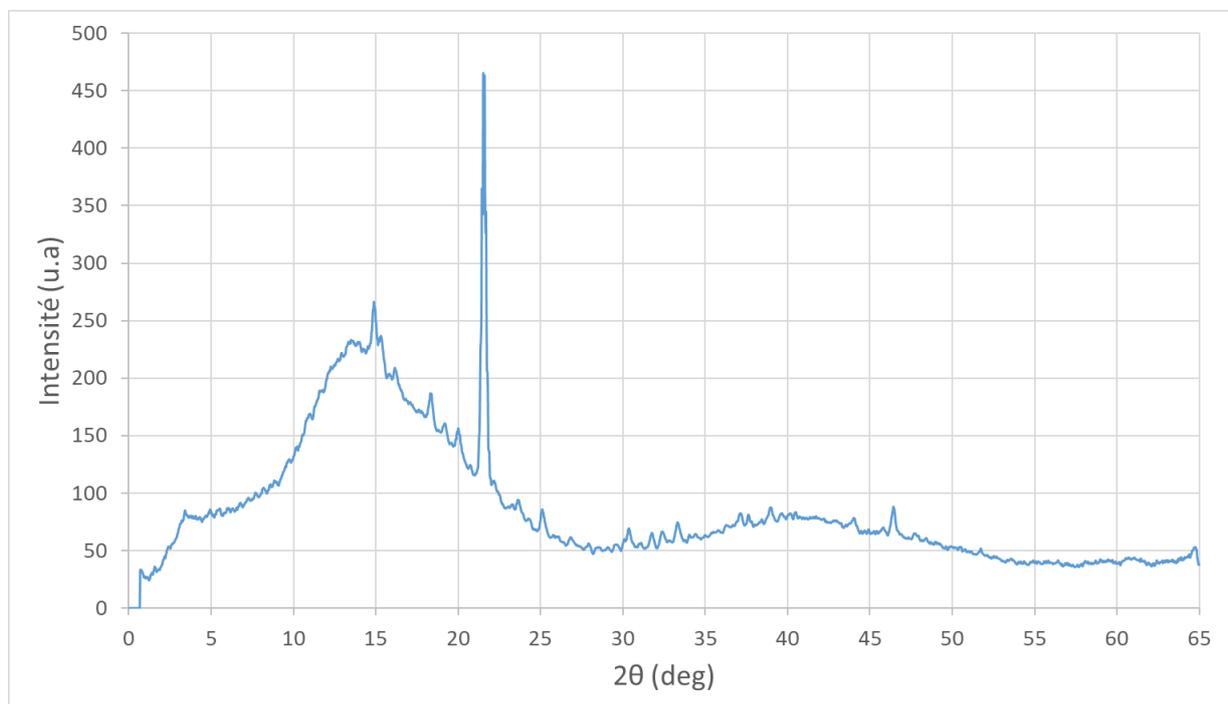


Figure 76. Diffractogramme d'un cristal de sulfathiazole obtenus dans un capillaire en verre 0.7mm de diamètre interne (360 s d'exposition).

La Figure 75 présente un cliché de diffraction obtenu avec cette méthode et la Figure 76, un diffractogramme. On peut remarquer que les pics de diffraction sont nombreux et peuvent permettre l'identification du cristal. Cependant, la qualité du diffractogramme peut, dans certains cas, ne pas permettre l'identification d'une phase polymorphique.

2.5.3.2.2. Après extraction de la goutte puis passage dans un capillaire en verre

Une autre méthode peut alors être utilisée, si des diffractogrammes de meilleure qualité sont nécessaires. Une goutte peut être récupérée en la déposant dans un bain d'huile pour éviter son évaporation (à l'image de la méthode présentée par Gérard et al⁸⁷). Puis, le cristal peut être récupéré à l'aide d'un capillaire en verre plus fin (par exemple de 0,3 mm de diamètre interne). Comme le montre la Figure 77 et la Figure 78, les clichés de diffraction et les diffractogrammes obtenus sont de bien meilleure qualité et permettent l'identification d'une phase polymorphique (le polymorphe II du sulfathiazole).

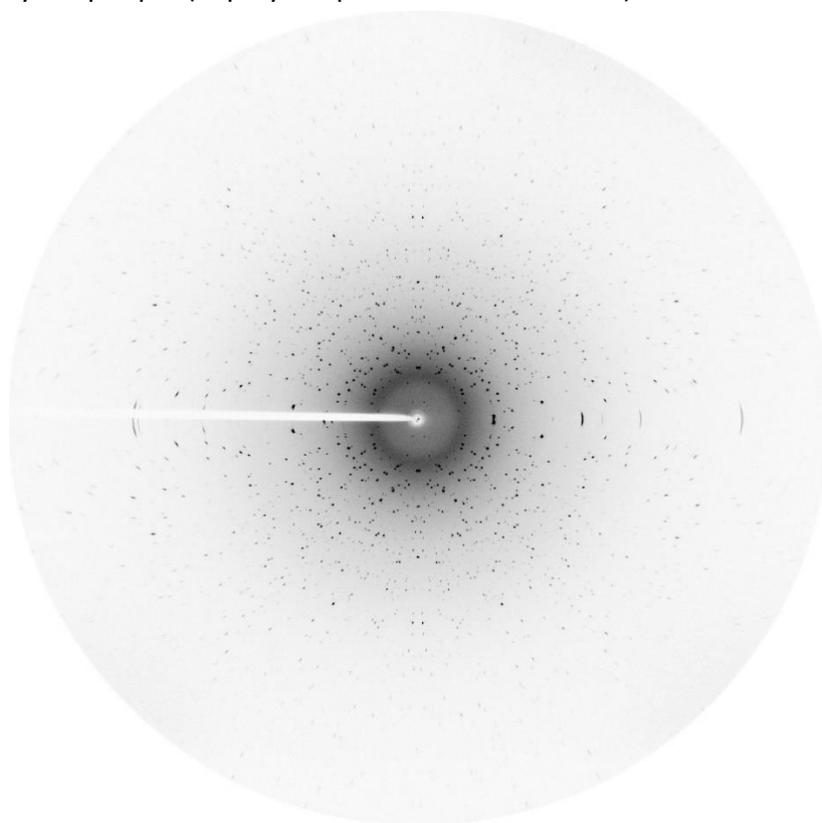


Figure 77. Cliché de diffraction d'un cristal de sulfathiazole obtenu dans un capillaire en verre de 0,3mm de diamètre interne (360 s d'exposition).

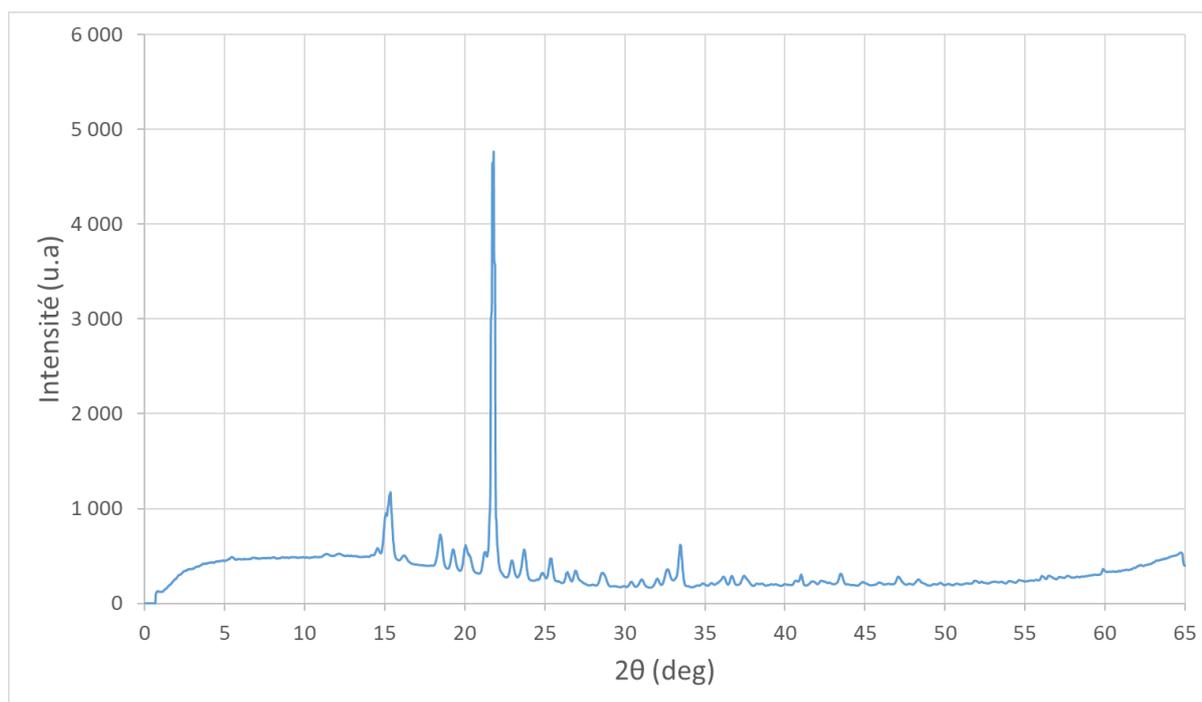


Figure 78. Diffractogramme d'un cristal de sulfathiazole obtenu sur un capillaire en verre de 0,3mm de diamètre interne (360 s d'exposition).

2.6. Étude du polymorphisme d'une molécule modèle : Le Sulfathiazole

Nous avons utilisé les techniques décrites précédemment pour étudier le polymorphisme d'une molécule modèle, le Sulfathiazole. Le polymorphisme de cette molécule a largement été étudié dans la littérature et les spectres Raman des différents polymorphes sont déjà connus, ce qui permet d'avoir une référence sur laquelle se baser lors des analyses in situ en Raman et de valider la méthode d'analyse.

2.6.1. Matériels et méthodes

Le montage microfluidique utilisé est celui décrit précédemment dans la partie 2.3.1. Nous avons généré des gouttes de 3 concentrations différentes pour chaque solvant. Pour cela, les gouttes saturées sont générées à 3 températures différentes : 45, 55 et 70 °C (+/- 0,2 °C). Pour chaque condition, une trentaine de gouttes sont générées. Les 3 solvants utilisés sont l'eau, l'acétonitrile, et le n-propanol.

Le montage microfluidique a été démonté et nettoyé entre chaque nouveau solvant utilisé. Pour chaque solvant, un capillaire de 1 mm de diamètre interne a été rempli d'approximativement 30 mg de poudre constituée de la phase décrite comme la plus stable du Sulfathiazole dans la littérature (la Forme III). Une fois les gouttes générées, elles sont

stockées et observées à $T_{max} = 80\text{ °C}$ pendant 5 heures, puis la température est diminuée par palier de 5 °C toutes les 5 heures (Figure 79).

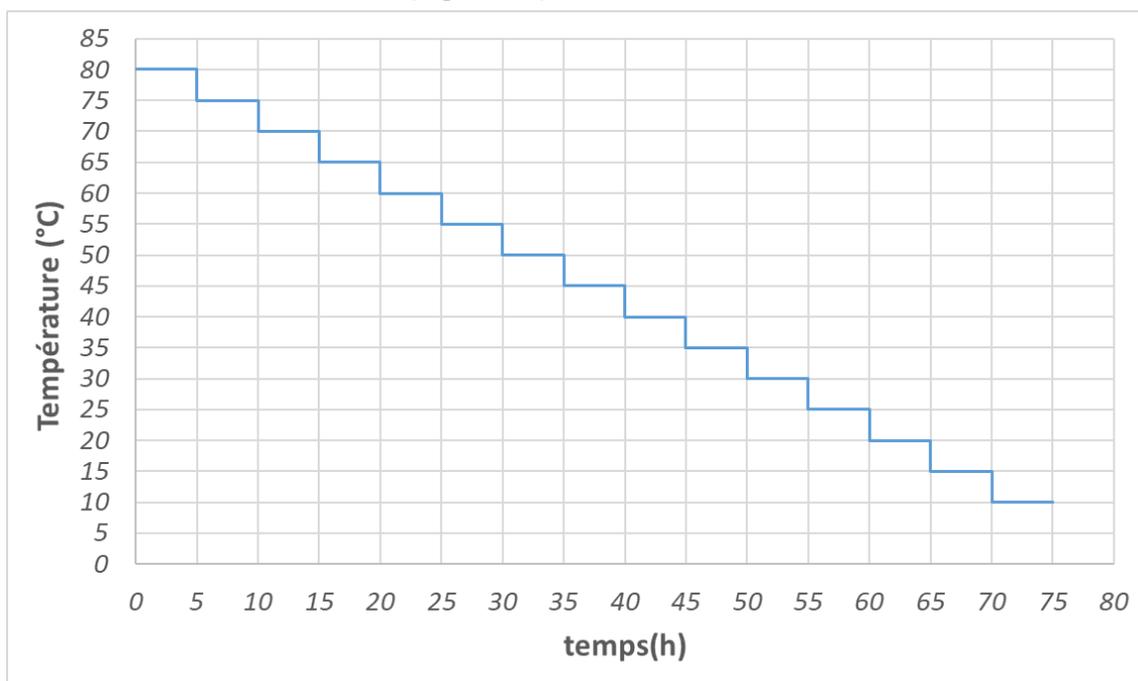


Figure 79. Évolution de la température en fonction du temps lors du refroidissement et de l'observation des gouttes.

Lors de ce refroidissement, une photo de chaque goutte est prise toutes les 10 minutes avec la caméra motorisée. Une fois le refroidissement terminé, les capillaires sont extraits du module d'observation et d'incubation et positionnés sous le microscope Raman pour l'analyse des cristaux obtenus. Tous les cristaux obtenus ont été analysés en utilisant les mêmes conditions expérimentales (5x5s d'exposition).

2.6.2. Résultats

2.6.2.1. Mesure des solubilités

En parallèle des études sur le polymorphisme, la solubilité de la forme III du sulfathiazole a été mesurée à différentes températures avec la méthode microfluidique décrite précédemment. Les solubilités mesurées dans l'acétonitrile, le n-propanol, et l'eau, sont présentées sur la Figure 80.

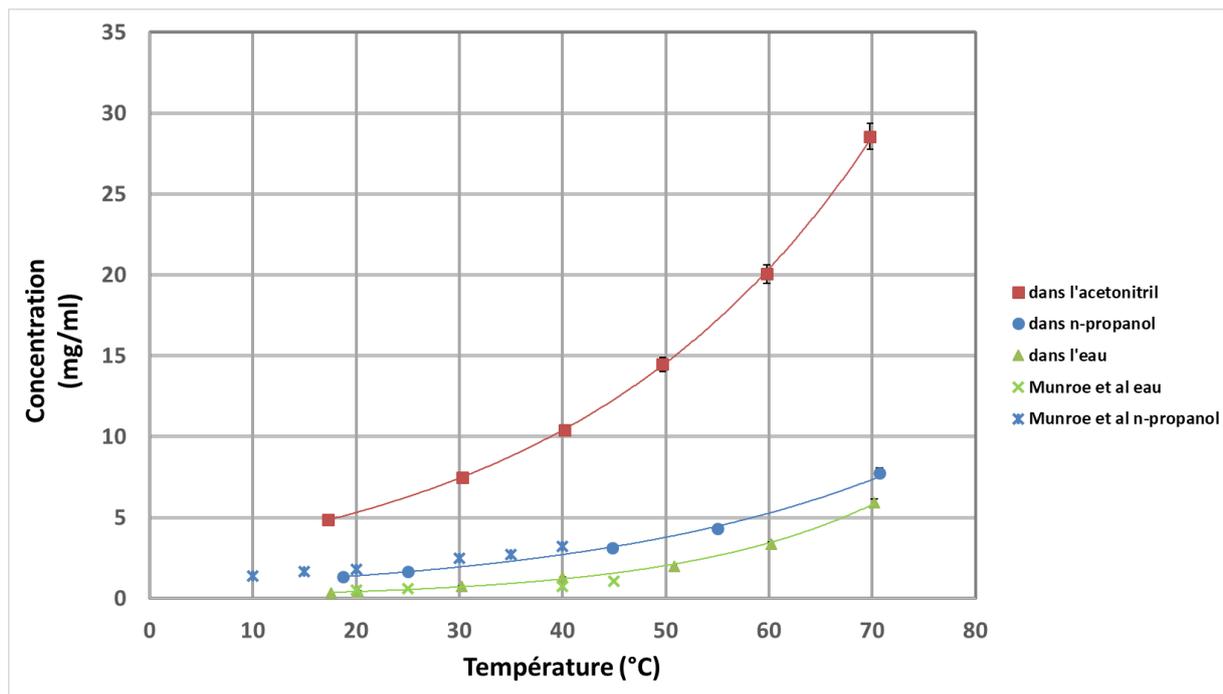


Figure 80. Solubilité du sulfathiazole III dans l'acétonitrile (en rouge), le n-propanol (en bleu) et l'eau (en vert). Pour l'eau et le n-propanol les résultats sont comparés à ceux obtenus par Munroe et al²⁴.

Les points de solubilité sont ajustés par une courbe exponentielle. On peut remarquer que les points de solubilité obtenus dans l'eau et le n-propanol avec la méthode microfluidique sont proche de ceux obtenus dans la littérature par Munroe et al²⁴. La Figure 81 présente l'évolution de $\ln(X)$ en fonction de $1/T$, avec X la solubilité (en fraction molaire). Nous remarquons une évolution linéaire qui se retrouve dans le cas de solutions idéales diluées sans aucune transition de phase, selon la relation de Van't Hoff :

$$\ln X = -\frac{a}{T} + b$$

ÉQUATION 18

Le coefficient directeur de la droite noté « a » permet de déduire ΔH_d de la manière suivante :

$$\Delta H_d = -a * R$$

ÉQUATION 19

Avec ΔH_d l'enthalpie de dissolution en J/mol

Et R la constante des gaz parfaits

Les valeurs de « a » et de ΔH_d sont présentées sur le Tableau 4 pour les trois solvants dans lesquelles les solubilités ont été mesurées.

solvants	a	ΔH_d (kJ/mol)
eau	-5248,8	43,6
n-propanol	-3429,5	28,5
acetonitrile	-3485,7	29,0

Tableau 4 : Tableau de valeur de « a » et de ΔH_d pour les solubilités mesurées expérimentalement

La linéarité des points obtenus nous permet donc de conclure qu'à priori aucune transition de phase n'a eu lieu lors des mesures. Afin de vérifier ce point, le spectre Raman du lit de poudre a été mesuré à travers le capillaire, en début et en fin d'expérience (avant évaporation du solvant alors contenu dans le lit de poudre). Et aucun nouveau pic, ne correspondant ni au sulfathiazole III, ni au capillaire et au solvant, n'est apparu entre le début et la fin des expériences.

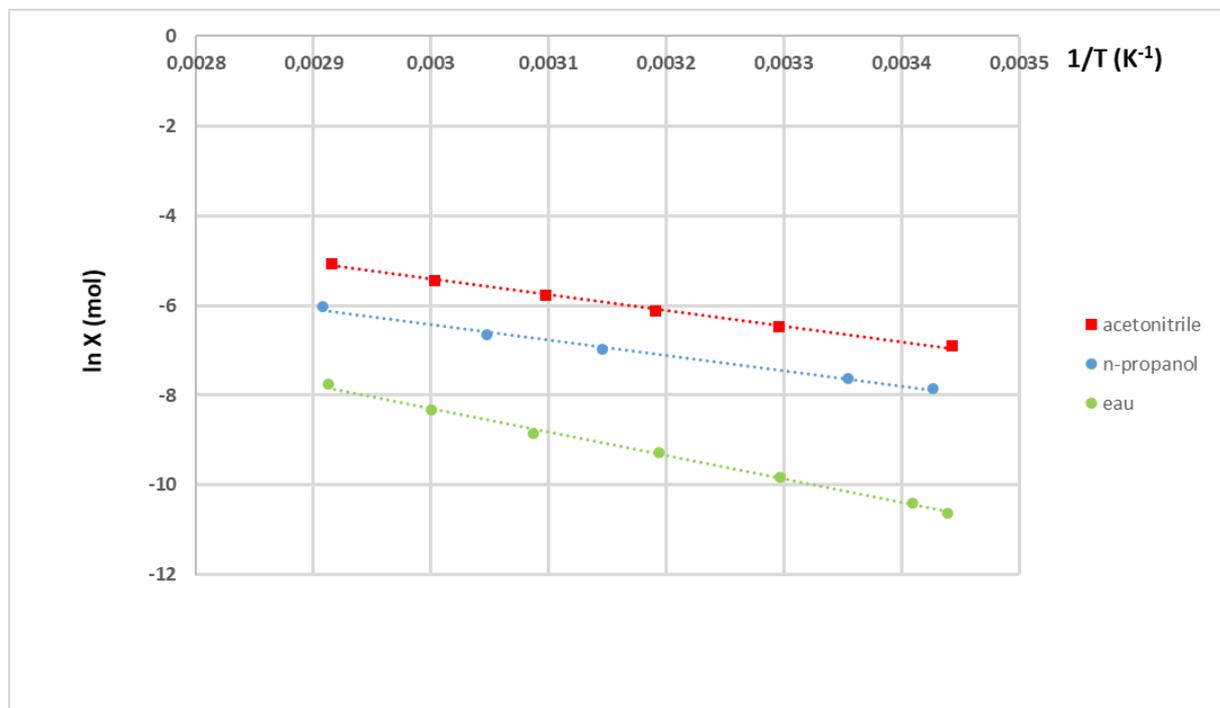


Figure 81. Évolution de $1/T$ en fonction de $\ln(X)$ pour vérifier la relation de Van't Hoff.

2.6.2.2. Microscopie optique

Grâce aux photos réalisées lors du refroidissement, il est possible de connaître la température à laquelle chaque goutte a nucléé. Une fois les cristaux nucléés, aucune transition de phase, qui serait due à la dissolution d'une phase au profit d'une autre ou à une transition solide/solide, n'a été détectée optiquement lors du refroidissement.

Un exemple de photos obtenues dans des gouttes d'eau/sulfathiazole générées à des températures différentes est présenté sur la Figure 82. Ces photos ont été prises en fin d'expérience avant passage au microscope Raman. On peut remarquer que pour la température de génération la plus faible, un nombre inférieur de gouttes a nucléé, alors que pour les deux autres températures de génération (plus élevées) toutes les gouttes ont nucléé avant la fin du refroidissement. On note également qu'il n'y a eu qu'un seul événement de nucléation par goutte et donc qu'il y a eu dans ce cas uniquement de la nucléation primaire.

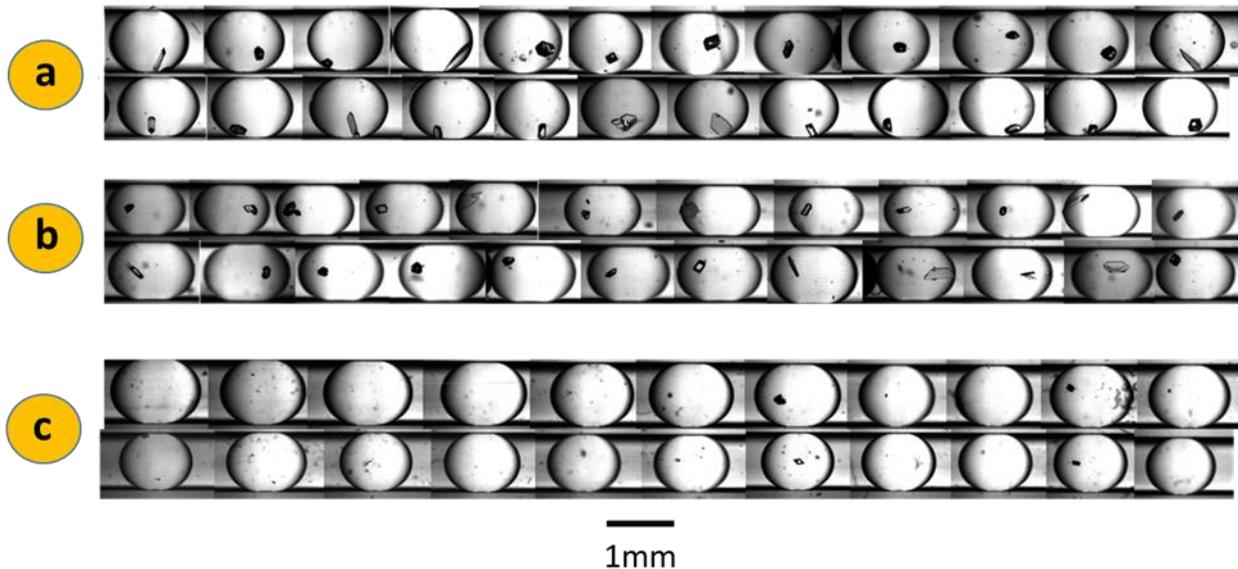


Figure 82. Photos de gouttes (sulfathiazole/eau) obtenues en fin d'expérience (après refroidissement jusqu'à 15 °C) : (a) gouttes générées à 70 °C de concentration environ égale à 5,9 mg/mL, (b) gouttes générées à 55 °C de concentration environ égale à 2,8 mg/mL, (c) gouttes générées à 45 °C de concentration environ égale à 1,5 mg/mL.

Dans l'eau, trois faciès et morphologies bien distincts ont pu être distingués (Figure 83). Dans le n-propanol, il est plus difficile de différencier optiquement les faciès obtenus (Figure 84). Dans l'acétonitrile, un seul type de faciès a été obtenu (Figure 85).

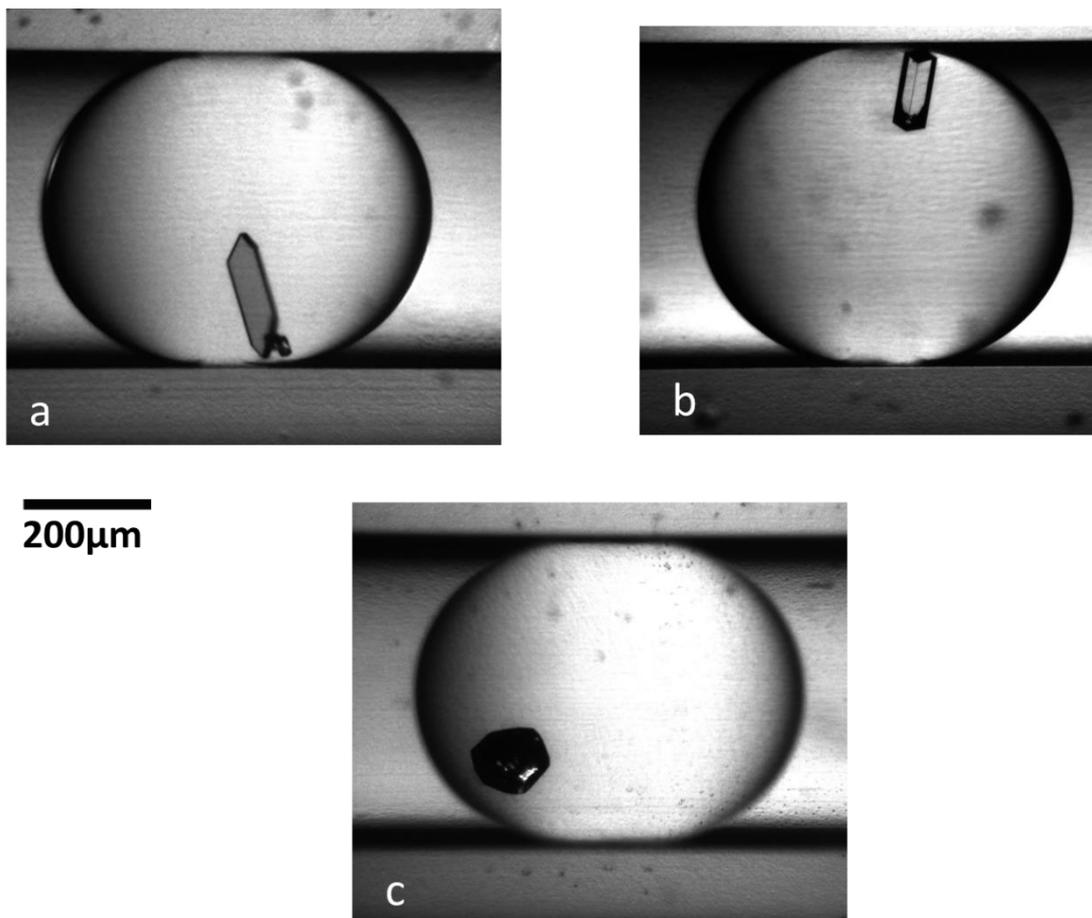


Figure 83. Photos de cristaux de Sulfathiazole obtenus dans l'eau (a) faciès en plaquette, (b) faciès en baguette, (c) faciès « arrondi »

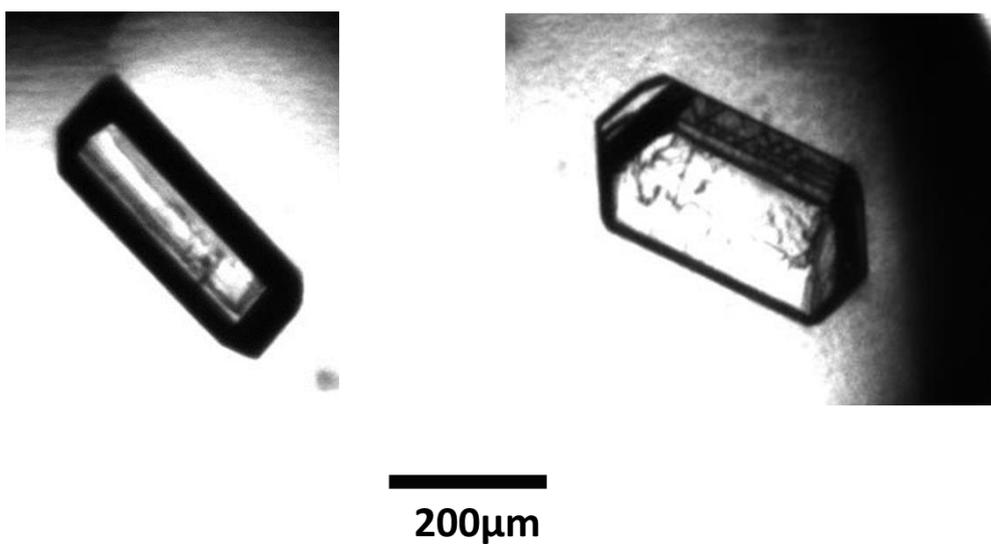


Figure 84. Zoom sur deux cristaux obtenus dans le n-propanol

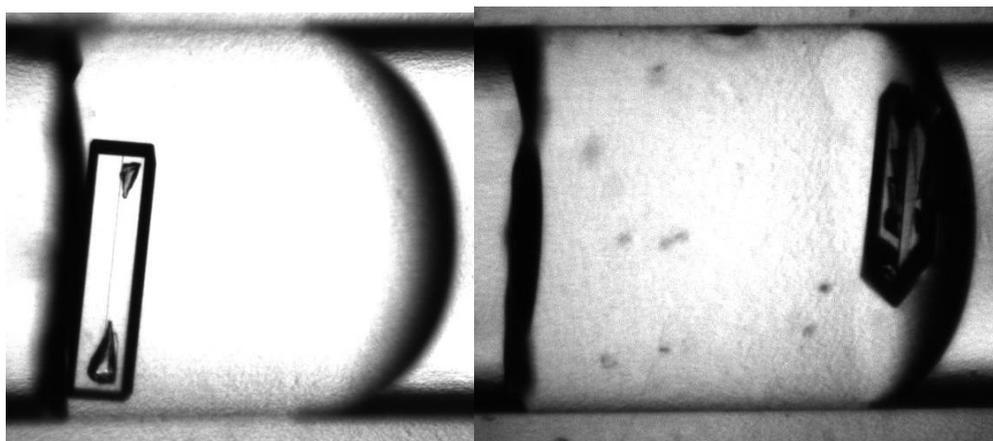


Figure 85. Faciès caractéristique des cristaux obtenus dans l'acétonitrile

2.6.2.3. Analyse par spectroscopie Raman des solides obtenus

Après passage de chaque cristal au microscope Raman, trois types de spectres ont été obtenus dans l'eau et dans le n-propanol. Ces trois types de spectres permettent de proposer la cristallisation de 3 phases différentes lors du refroidissement des gouttes.

Dans le cas des cristaux contenus dans les gouttes d'eau, l'identification des spectres est facile, car l'eau n'induit pas de signal Raman dans le domaine $0-1900\text{cm}^{-1}$. Seuls les pics intenses du capillaire en PFA ($290, 386$ et 733 cm^{-1}) peuvent gêner l'identification (Figure 86 courbe noire). Ainsi il est possible de différencier les trois types de spectres dans la zone $400-700\text{cm}^{-1}$ et $800-1000\text{ cm}^{-1}$. Un des types de spectres obtenus (Figure 86 courbe orange) correspond à celui de la poudre de départ, composé du polymorphe III pur du sulfathiazole. Les deux autres types de spectres montrent de grandes similitudes avec les spectres présentés dans la littérature par Munroe et al²⁴ et Hu et al¹⁰⁷, et semblent correspondre au polymorphe II décrit comme métastable et au polymorphe IV dont la stabilité fait débat, car il pourrait-être la phase stable²²⁻²⁴.

Dans le cas des cristaux contenus dans les gouttes de n-propanol, l'identification est plus difficile, car comme on peut le voir sur la courbe noire de la Figure 87 le n-propanol présente des pics intenses sur tout le domaine spectral. La zone $800-1000\text{cm}^{-1}$, où la différence entre les trois polymorphes est bien visible dans le cas de l'eau, est gênée par deux pics intenses dus au n-propanol. Cependant, il reste possible, après une observation attentive, de différencier trois types de spectres dont les pics caractéristiques des polymorphes II, III, et IV du sulfathiazole peuvent être repérés (notamment dans les zones $800-850$ et $900-950\text{ cm}^{-1}$).

Dans le cas des cristaux obtenus dans l'acétonitrile, un seul type de spectre a été observé correspondant au polymorphe II du sulfathiazole (Figure 88). Les spectres sont plus lisibles que ceux obtenus dans l'isopropanol, car le spectre de l'acétonitrile comporte moins de pics intenses.

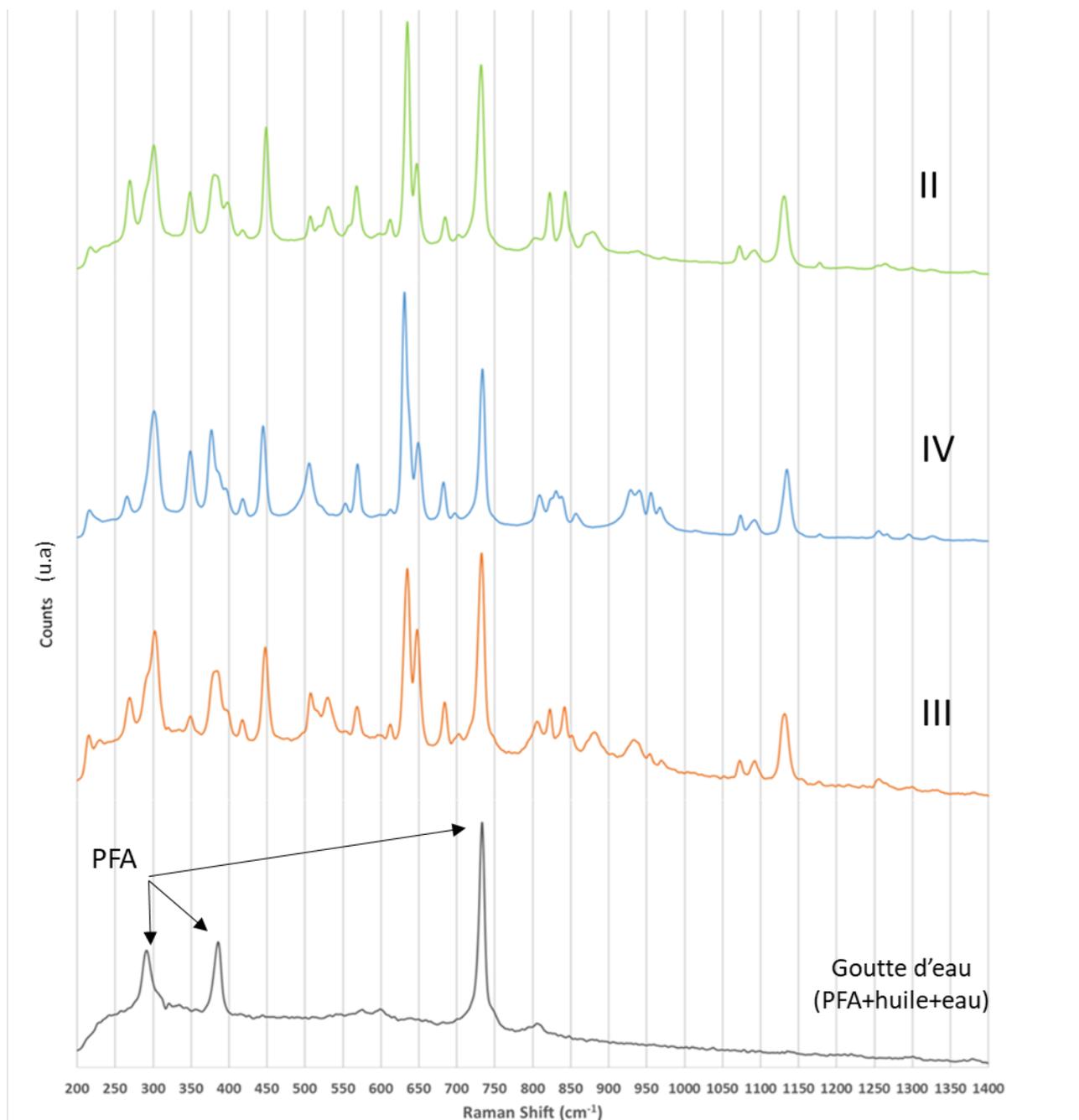


Figure 86. Graphique représentant les trois types de spectres obtenus dans les gouttes d'eau, correspondant à la forme II (en vert), à la forme IV (en bleu), à la forme III (en orange) comme la poudre de départ et le spectre de référence d'une goutte d'eau (en noir)

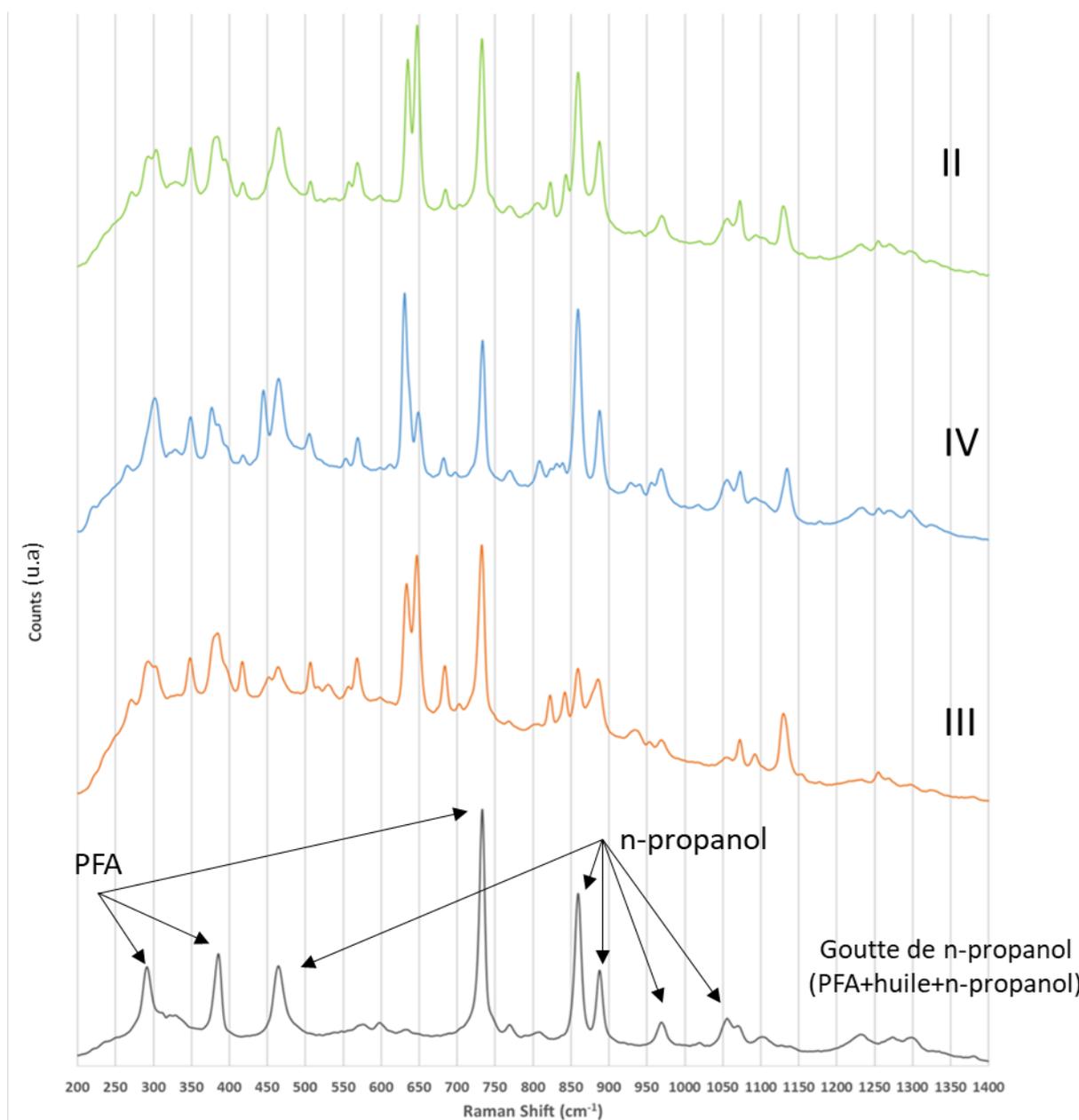


Figure 87. Graphique représentant les trois types de spectres obtenus dans les gouttes de n-propanol correspondant à la forme II (en vert), à la forme IV (en bleu), à la forme III (en orange) comme la poudre de départ et le spectre de référence d'une goutte de n-propanol (en noir)

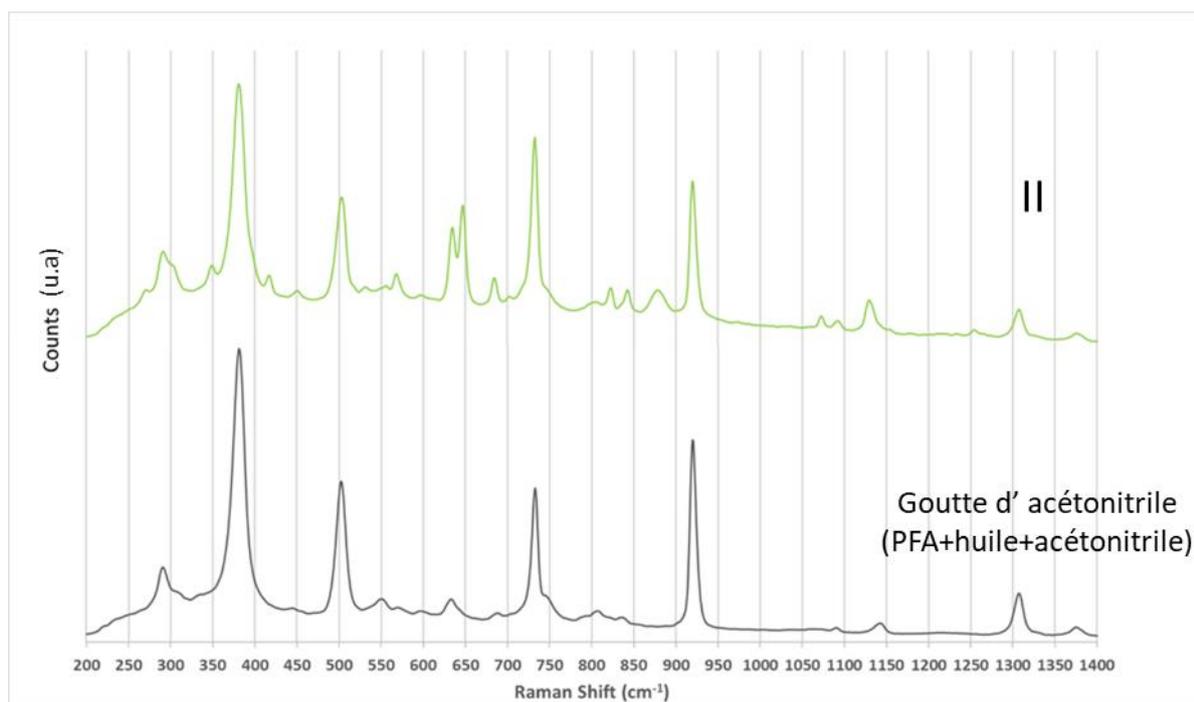


Figure 88. Graphique représentant le type de spectres obtenus dans les gouttes d'acétonitrile correspondant à la forme II (en vert) et le spectre de référence d'une goutte d'acétonitrile (en noir)

2.6.2.4. Analyse par DRX des solides obtenus

Afin de confirmer les analyses et l'attribution des phases par spectroscopie Raman des cristaux, un cristal associé à chaque type de spectre obtenu a été récupéré puis analysé par Diffraction des Rayons X. Les diffractogrammes obtenus sont alors comparés aux diffractogrammes correspondant au Suthaz, Suthaz02 et Suthaz04 correspondant respectivement aux polymorphes II, III et IV du sulfathiazole dans la Cambridge Structural Database (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>). Ces comparaisons sont présentées sur la Figure 89, la Figure 90 et la Figure 91 et confirment l'attribution d'un spectre Raman à un polymorphe. Il peut être remarqué que certains pics de diffraction des diffractogrammes provenant de la Cambridge Structural Database n'apparaissent pas ou peu sur les diffractogrammes obtenu avec l'anode tournante. Cela peut s'expliquer par le fait que nos mesures sont faites sur des monocristaux et que le monocristal ne tourne qu'autour d'un axe. Par conséquent, tous les plans réticulaires ne sont pas en position de diffraction. Ainsi, il ne faut pas tenir compte des intensités des pics obtenus. La liste des d_{hkl} générés à partir des diffractogrammes des cristaux mesurés et celle de la Cambridge Structural Database est présenté en Annexe1 pour une comparaison plus minutieuse.

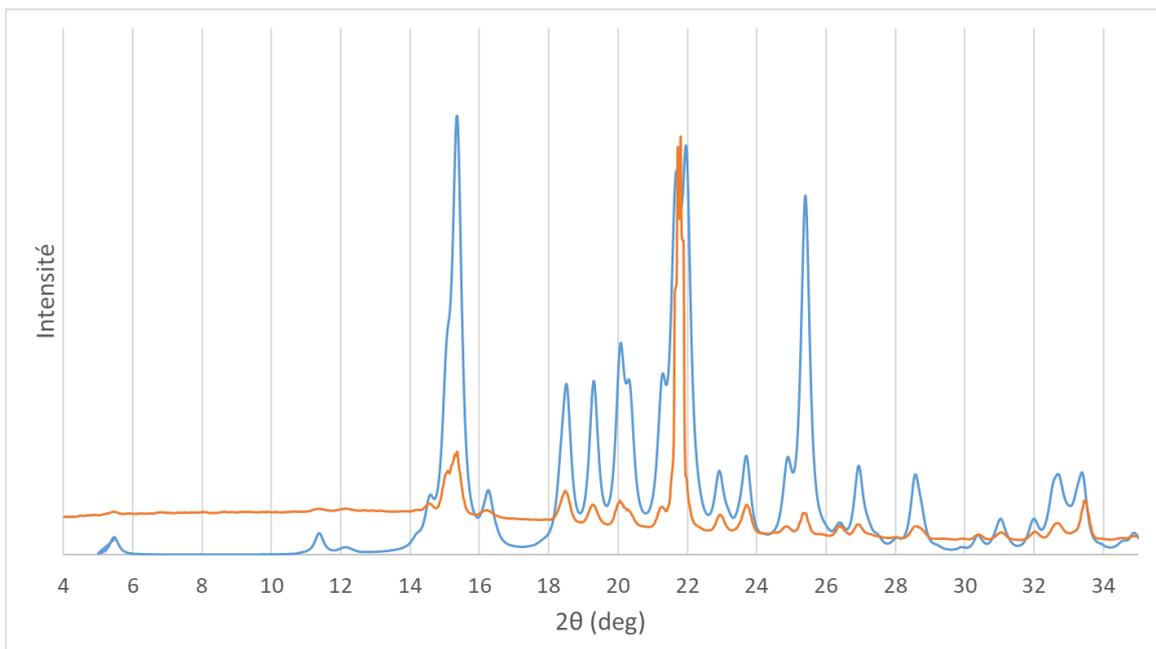


Figure 89. Comparaison (en orange) du diffractogramme obtenu à partir d'un cristal du polymorphe III du sulfathiazole d'après la spectroscopie Raman (dans un capillaire de 0,3 DI et un temps d'exposition de 360 s), et (en bleu) du diffractogramme du suthaz02 correspondant au polymorphe III du sulfathiazole dans la Cambridge Structural Database.

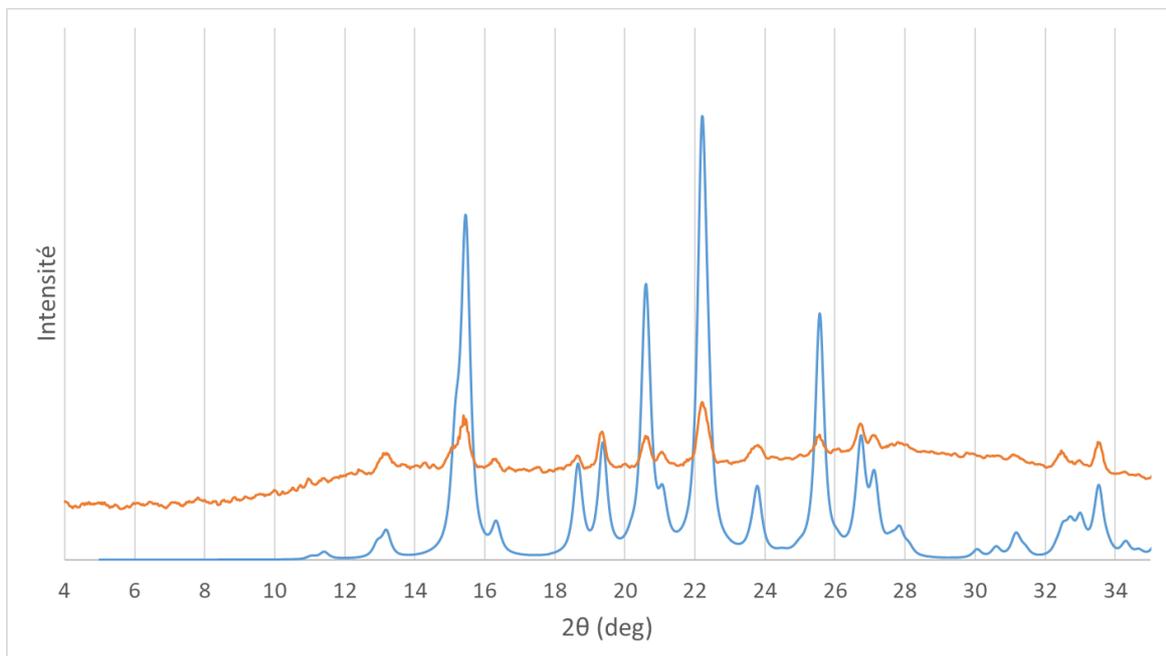


Figure 90. Comparaison (en orange) du diffractogramme obtenu à partir d'un cristal du polymorphe IV du sulfathiazole d'après la spectroscopie Raman (dans un capillaire de 0,7 DI et temps d'exposition de 360 s), et (en bleu) du diffractogramme du suthaz04 correspondant au polymorphe IV du sulfathiazole dans la Cambridge Structural Database.

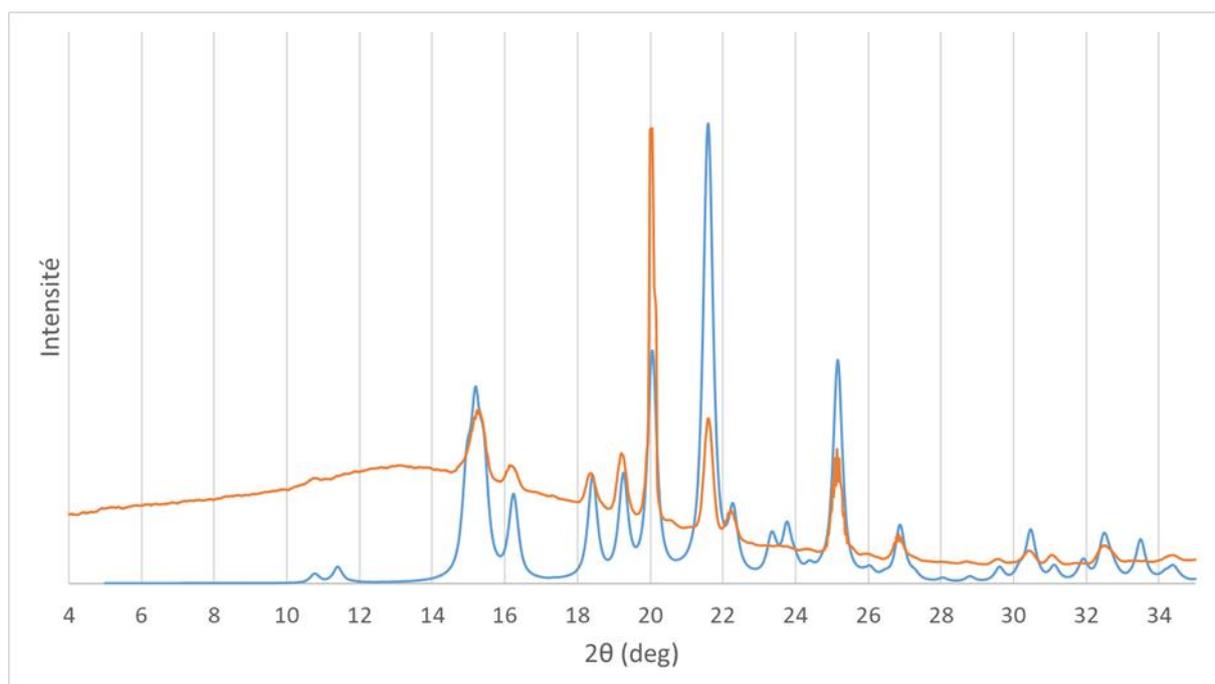


Figure 91. Comparaison (en orange) du diffractogramme obtenu à partir d'un cristal du polymorphe II du sulfathiazole d'après la spectroscopie Raman (sur un capillaire de 0,3 DI et un temps d'exposition de 360 s), et du diffractogramme du suthaz correspondant au polymorphe II du sulfathiazole dans la Cambridge Structural Database.

2.6.2.5. Synthèse des résultats sur le polymorphisme

Les expériences réalisées nous ont permis de connaître la température de nucléation de chacune des gouttes et de déterminer quel polymorphe est apparu et ce pour les 30 à 50 gouttes indépendantes générées pour chaque condition de concentration. À partir de ces données brutes, le nombre et le pourcentage d'apparition de chacun des polymorphes pour chaque température ont pu être déterminés, ainsi que le nombre, le pourcentage et le pourcentage cumulé d'évènement de nucléation par température. Ces informations étant complémentaires, nous avons choisi de rassembler toutes ces données sur un seul et même graphique par solvant permettant une vision complète des résultats. Ces graphiques (Figure 92, Figure 93 et Figure 94) représentent les diagrammes de phase (concentration en fonction de la température) du sulfathiazole III dans les différents solvants. La courbe de solubilité (mesurée expérimentalement en microfluidique) est représentée en orange.

Concentration (mg/ml)

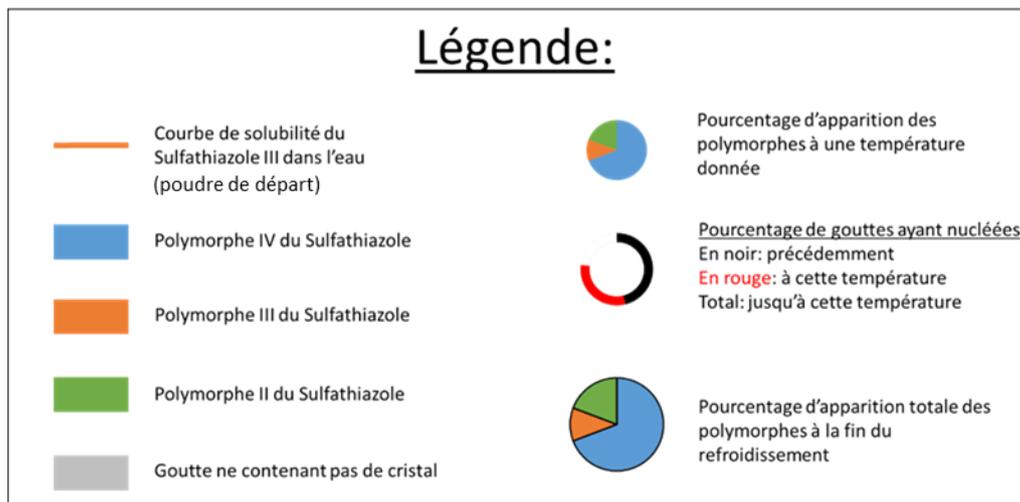
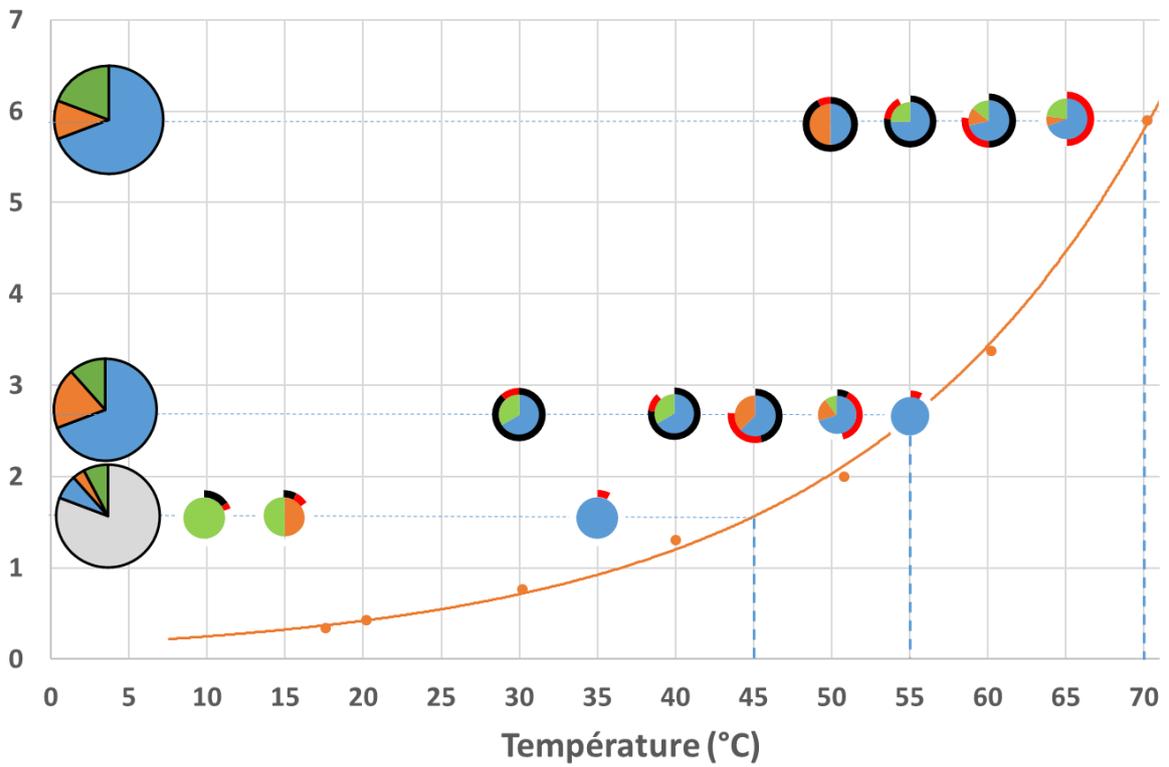


Figure 92. Graphique récapitulatif des résultats obtenus pour la cristallisation du Sulfathiazole dans l'eau pour un refroidissement par palier de 5°C toutes les 5h.

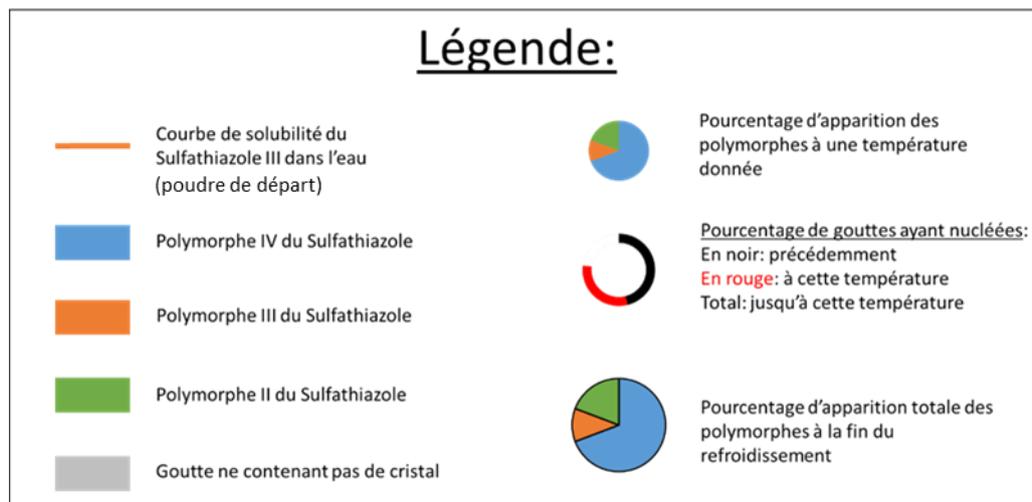
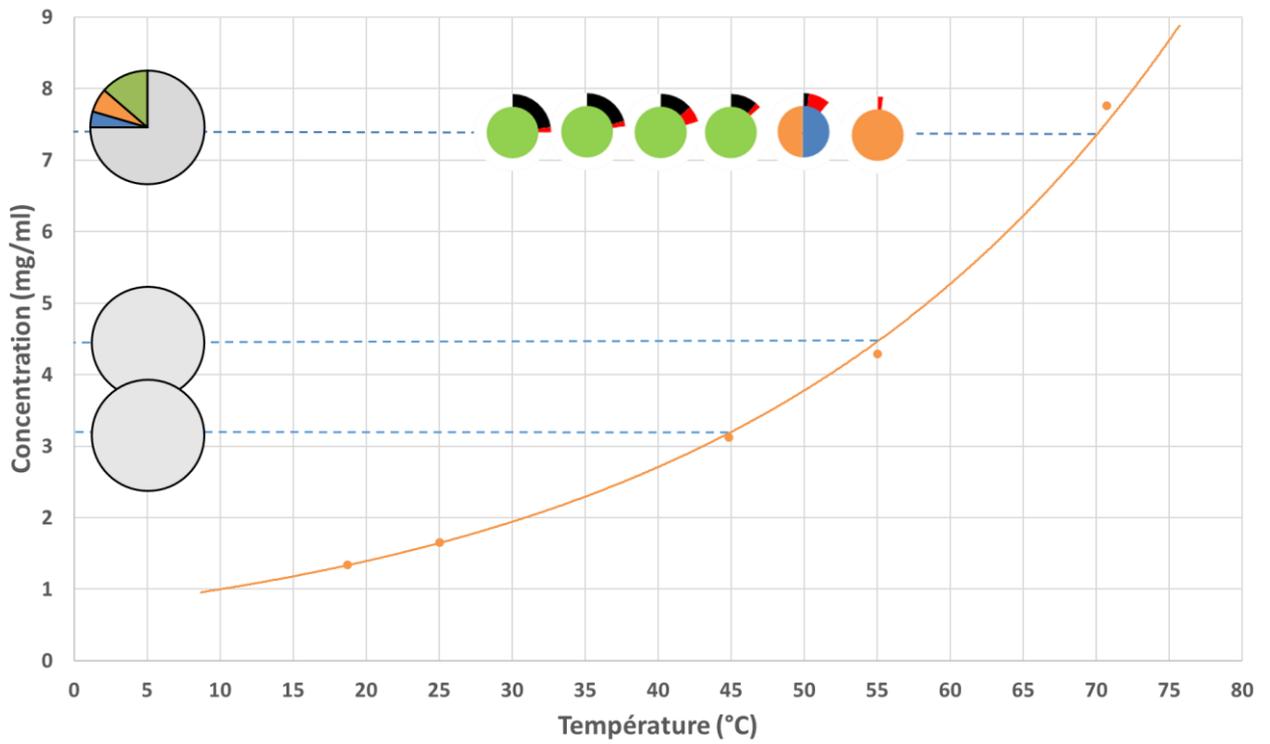


Figure 93. Graphique récapitulatif des résultats obtenus pour la cristallisation du Sulfathiazole dans le n-propanol pour un refroidissement par palier de 5°C toutes les 5h.

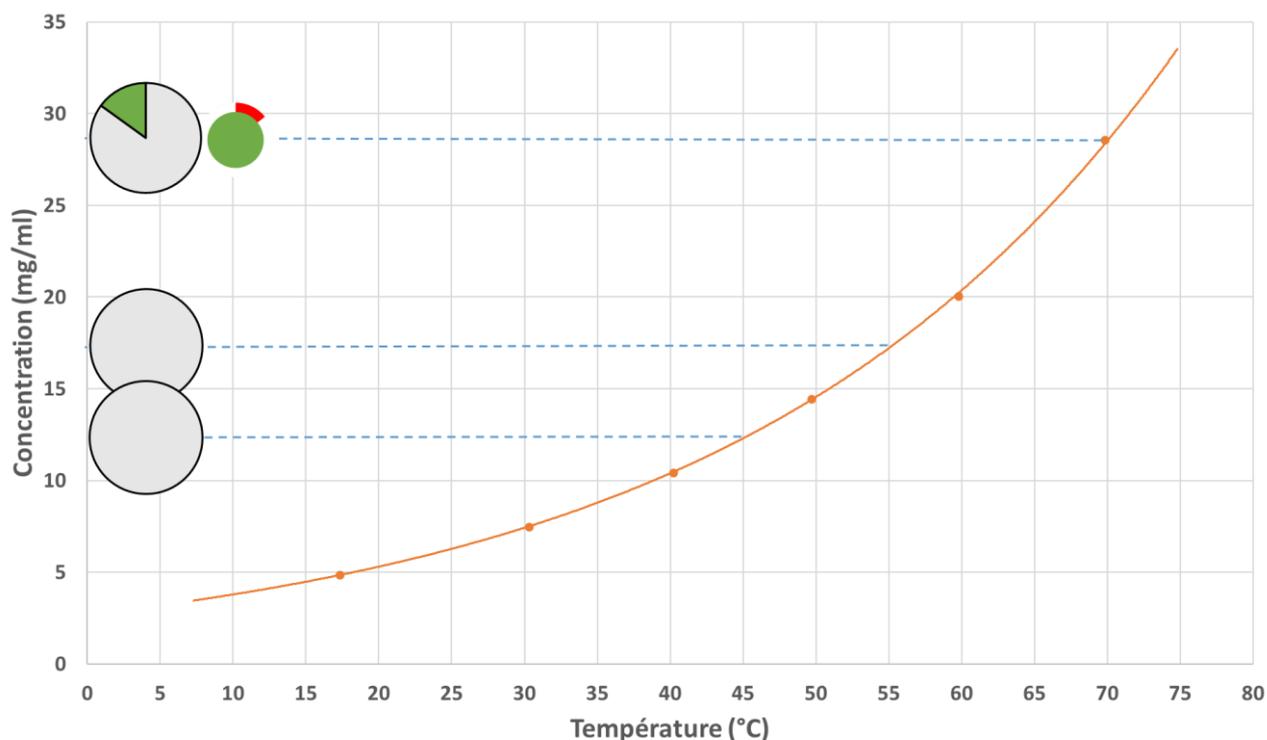


Figure 94. Graphique récapitulatif des résultats obtenus pour la cristallisation du Sulfathiazole dans l'acétonitrile pour un refroidissement par palier de 5°C toutes les 5h.

Afin de bien expliquer la lecture de ces graphiques, je prends l'exemple de la Figure 92 qui correspond aux résultats obtenus dans l'eau. La première ligne du graphique à 5,9 mg/mL représente le refroidissement des gouttes générées à 70 °C, dont la concentration est donc égale à la solubilité à cette température (mesuré à $5,9 \pm 0,3$ mg/mL) :

- Lors du refroidissement, aucune goutte n'a nucléé entre 80 et 70 °C.
- Une fois en dessous de 70 °C, les gouttes sont sursaturées (par rapport au polymorphe III, phase stable du sulfathiazole, composant la poudre de départ) et ainsi à 65 °C les premières gouttes commencent à nucléer. La portion d'anneau rouge représente le pourcentage de goutte ayant nucléé à cette température (à 65 °C, la moitié des gouttes ont nucléé). Le camembert représente le pourcentage des différents polymorphes étant alors apparus parmi ces gouttes (à 65 °C, 70 % des cristaux apparus sont du sulfathiazole IV en bleu, 23 % du sulfathiazole II en vert et 7 % du sulfathiazole III en orange).
- Puis, après le palier de 5 heures à 65 °C, la température est diminuée jusqu' à 60 °C. Parmi les gouttes n'ayant pas encore nucléé, la moitié ont été le lieu de l'apparition de nouveaux cristaux (la portion d'anneau noire représentant le pourcentage de gouttes nucléé précédemment). Et le pourcentage des

polymorphes apparues à cette température est de nouveau représenté par un camembert, codes couleur inchangés.

- À 50 °C, 100 % des gouttes ont été le lieu de nucléation de cristaux.
- Le grand camembert, en fin de ligne à gauche, représente le pourcentage total cumulé des polymorphes apparus aux différentes températures à la fin du refroidissement.

2.6.3. Discussion

Dans cette partie, les résultats obtenues pour les différents solvants sont analysés et discutés. Un premier constat est que le grand nombre d'essais réalisés met en avant l'aspect stochastique de la nucléation primaire. On peut voir sur la Figure 92 et la Figure 93 qu'il y a des plages de température de nucléation allant de 15 à 30 °C. Ce résultat est intéressant et permet de mieux comprendre pourquoi, pour un procédé de cristallisation industrielle, la nucléation secondaire par ensemencement est préférée, permettant de s'affranchir du côté aléatoire de la nucléation primaire, en la déclenchant de manière contrôlée et reproductible.

2.6.3.1. Analyse et discussion des résultats obtenus dans l'eau

En analysant les résultats obtenus dans l'eau nous remarquons l'étroitesse de la zone métastable. Par exemple, pour une concentration de 5,9 mg/mL les trois polymorphes peuvent apparaître dès 65 °C, très proches de la courbe de solubilité de la forme stable III, et pour une sursaturation $\beta \approx 1.3$ (par rapport à la solubilité de la poudre de départ décrite comme la phase stable du sulfathiazole dans la littérature). Pour les gouttes de concentration de 2,8 mg/mL, le même phénomène peut être observé et environ la moitié des gouttes ont nucléé dès 50 °C (pour $\beta \approx 1,4$).

Par ailleurs, l'apparition d'un cristal du polymorphe IV du sulfathiazole sur la courbe de solubilité du polymorphe III, connu comme le plus stable, est étonnante. Ce résultat pourrait suggérer que le polymorphe IV est plus stable que le polymorphe III, comme le prédit Blagden et al²³. Cependant, ce résultat peut tout à fait être un artéfact dû au fait que lors du refroidissement il arrive que la température de consigne soit dépassée de 1°C avant de se stabiliser. Ainsi, la légère sursaturation qui peut être engendrée aurait pu permettre la nucléation de cette phase. Cela confirme, tout de même, que les polymorphes III et IV ont une solubilité très proche dans l'eau comme il a pu être montré dans la littérature^{22,24}.

De plus, les gouttes composées de la plus faible concentration (générées à saturation à 45 °C et avec une concentration de 1,5 mg/mL) ont, quant à elle, donné lieu à moins de nucléation. En effet, à la fin du refroidissement moins d'un quart ont été le lieu de l'apparition de cristaux alors que, à 10 °C, la sursaturation est $\beta \approx 7,5$.

Globalement, l'apparition des différents polymorphes semble concomitante dans l'eau, avec une apparition privilégiée du polymorphe IV. En ce qui concerne le faciès des cristaux obtenus, il a été remarqué que, tous les cristaux comportant un faciès de type baguette, se sont révélés être des cristaux du polymorphe II. L'association des autres faciès obtenus à un polymorphe est plus complexe. Les polymorphes IV et III ne semblent pas être reliés à un type de faciès particulier.

En complément, lors d'une expérience préliminaire réalisée dans des conditions assez similaires (génération des gouttes à 70 °C à une concentration de 5,9 mg/mL, mais avec un refroidissement plus rapide) deux des gouttes ont nucléé plus tard que les autres à une température de 15 °C (les autres gouttes ayant nucléé plus tôt durant le refroidissement, entre 65 et 40°C. Ainsi seules ces deux gouttes ont atteint des sursaturations beaucoup plus importantes ($\beta \approx 23,5$) et une autre phase est apparue (photos la Figure 95 et le spectre Raman sur la Figure 96). Les spectres Raman de ces cristaux présentent de grandes similitudes avec celui du polymorphe I du sulfathiazole décrit dans la littérature¹⁰⁷. Cependant, la méthode de récupération des cristaux, pour analyse en DRX n'étant pas mise au point au moment des expériences, aucune confirmation par DRX n'a été possible.

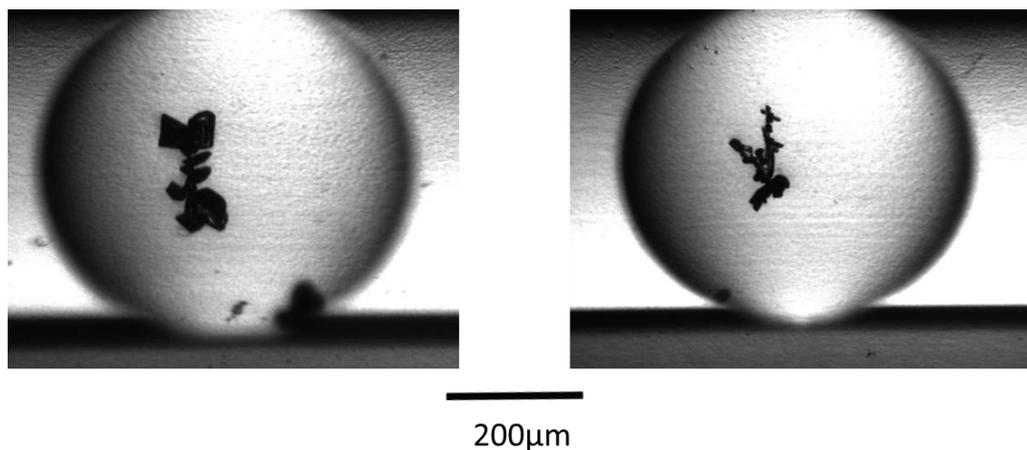


Figure 95. Faciès des cristaux obtenus à 15 °C pour des gouttes eau/sulfathiazole de 5,9 mg/mL (lors d'une expérience préliminaire)

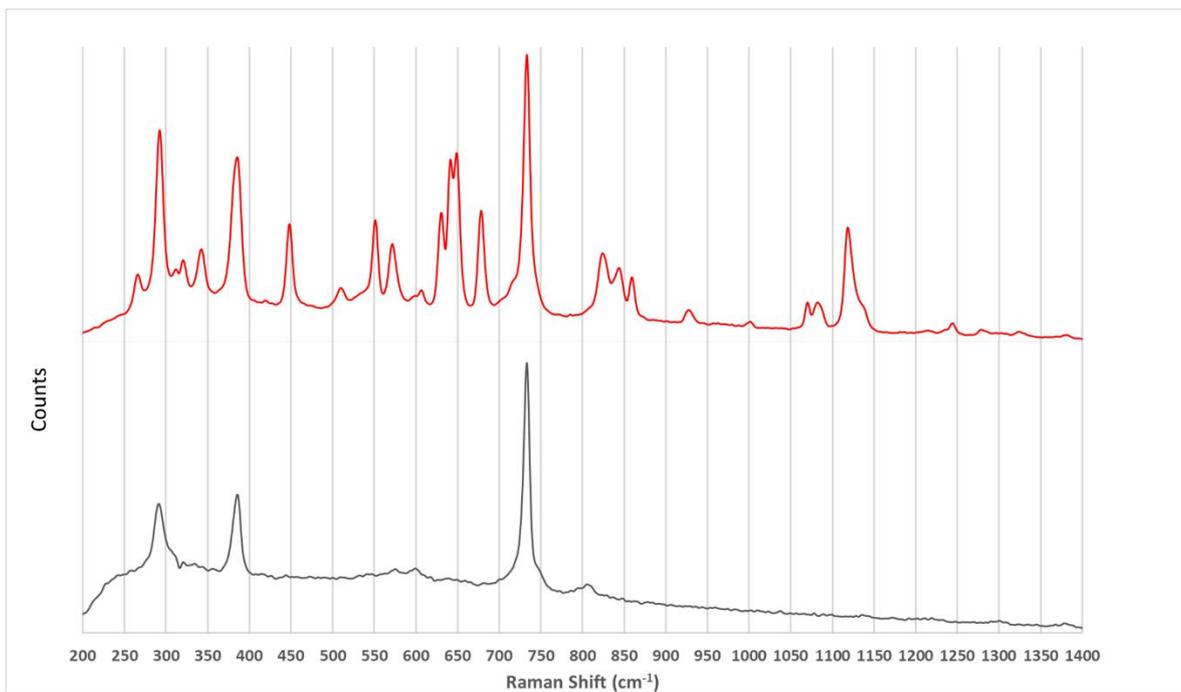


Figure 96. En gris : spectre correspondant à une goutte ne contenant pas de cristal. En rouge : spectre Raman caractéristique des cristaux obtenus à 15 °C pour des gouttes eau/sulfathiazole de 5,9 mg/mL (lors d'une expérience préliminaire).

Ces résultats montrent le rôle important de la façon dont on se déplace dans le diagramme de phase. Le refroidissement plus rapide ayant permis à certaines gouttes de ne pas avoir le temps de nucléer plus tôt et d'atteindre une sursaturation plus élevée, événement rare, qu'il a pu être possible de voir grâce à la répétition des expériences.

2.6.3.2. Analyse des résultats obtenus dans le n-propanol et l'acétonitrile

Dans le cas du n-propanol comme solvant, seules les gouttes les plus concentrées ont été le lieu de nucléation de cristaux et la zone métastable est plus large que dans le cas de l'eau. Il semblerait que les sursaturations plus élevées (à partir de $\beta \approx 2,35$) dans cette gamme de température, privilégient la cristallisation du polymorphe II métastable. Ceci bien que le nombre de gouttes ayant nucléé ne permet pas d'avoir des statistiques suffisantes pour conclure définitivement. Par ailleurs, on peut remarquer que, pour la concentration la plus élevée et en dessous de 30 °C, aucune goutte n'a nucléé alors que dans ces conditions, on devrait s'attendre à ce que l'augmentation de la sursaturation favorise une cinétique de nucléation plus rapide.

Dans le cas de l'acétonitrile comme solvant, seules les gouttes les plus concentrées ont été le lieu de l'apparition de cristaux et la zone métastable est plus large que dans le cas de l'eau et de l'isopropanol. Seuls des cristaux du polymorphe II du sulfathiazole ont nucléé à la

fin du refroidissement à 10 °C pour une sursaturation $\beta \approx 7,25$. L'acétonitrile semble favoriser la cristallisation du polymorphe II dans ces conditions de refroidissement.

Les résultats obtenus pour ces 2 solvants sont surprenants (mais préliminaires). On aurait pu s'attendre à une augmentation de la nucléation du fait des solubilités plus élevées que dans l'eau. Dans la littérature ce phénomène a déjà été observé notamment par Anderson et al¹⁰⁸ qui a montré que les cinétiques de nucléation dans l'eau sont plus rapides que dans le n-propanol et l'ammoniaque. La difficulté de nucléation peut alors provenir de l'association solvant-soluté, phénomène décrit dans les travaux de Gu et al¹⁰⁹ sur le polymorphisme du Sulfamerazine. Par ailleurs, les nucléations observées en début de rampe de température dans le n-propanol peuvent correspondre à de la nucléation hétérogène due à la présence de particules ou d'impuretés non désirées.

2.7. Conclusion

Nous avons développé un montage microfluidique à base de flux et de gouttes pour l'étude du polymorphisme de principes actifs pharmaceutiques. Ce montage permet de partir directement d'une poudre pour préparer une solution saturée à une température donnée, par le passage d'un solvant à travers un lit de poudre. La solution ainsi préparée est utilisée à la suite du montage pour générer des trains de gouttes de composition chimique différentes (solvants et concentrations en principe actif), en fonction de la température de passage du solvant. Les gouttes sont ensuite stockées et observées, pendant que l'on applique un profil de refroidissement qui permet de balayer le diagramme de phase concentration/température. Nous avons complété l'observation optique par de la spectroscopie Raman afin d'analyser in situ les cristaux obtenus (c'est-à-dire à travers le capillaire en PFA, l'huile et le solvant). Pour cela, la méthodologie que nous avons développée pour analyser un grand nombre de gouttes par expérience est en deux étapes : nous utilisons une première exposition rapide des gouttes (2x2s par goutte) pour repérer les gouttes qui présentent des spectres différents de celle de la poudre de départ, ce qui montre la présence de différentes phases dans ces gouttes. Puis, ces gouttes sont repérées en position pour à la fois réaliser des spectres de meilleure qualité et les analyser en diffraction des rayons X, in situ ou ex situ.

Les résultats expérimentaux concernent l'étude du polymorphisme du sulfathiazole dans trois solvants (eau, n-propanol et acétonitrile). Lors de cette étude, 4 des 5 polymorphes connus du sulfathiazole ont pu être détectés. Par l'observation optique, nous avons obtenu des données intéressantes, comme la température de nucléation et le faciès des cristaux. Par la spectroscopie Raman, nous avons pu identifier les phases cristallines obtenues lors du refroidissement. Nous avons donc établi à quelle température un cristal est apparu, dans quel milieu (solvant), à quelle concentration (par conséquent, à quelle sursaturation si les solubilités sont connues) et quelle phase cristalline est apparue. Afin de regrouper toutes ces

informations dans un diagramme de phase concentration/température, nous avons même développé une nouvelle façon de présenter toutes les données acquises.

En conclusion, nous avons montré la faisabilité d'un criblage en microfluidique en partant directement de la poudre : 30 mg de poudre par solvant pour au moins 3 concentrations et 30 à 50 essais indépendants par condition. Chaque goutte étant indépendante, la reproduction des expériences a permis d'avoir des données statistiques sur la nucléation, car c'est un phénomène aléatoire. En effet, avec les mêmes conditions de cristallisation certaines gouttes nucléent et d'autres pas, et il a pu être observé des plages de température de nucléation de 15 à 30 °C pour des gouttes générées dans les mêmes conditions. Par ailleurs, le confinement dû au faible volume des gouttes permet d'atteindre des sursaturations plus importantes et de stabiliser une phase métastable. Enfin, les cristaux obtenus étant monocristallins, les analyses par spectroscopie Raman in-situ et en diffraction de Rayons X in situ ou ex situ nous ont permis d'identifier les phases polymorphiques.

Chapitre 3. Transfert en laboratoire pharmaceutique, vers le criblage de sel

3.1. Transfert des outils et méthodes microfluidiques développées en laboratoire industriel

Un objectif important de cette thèse a été le transfert des outils et méthodes développées en laboratoire pharmaceutique industriel. Pour cela, j'ai eu l'occasion de passer quelques mois au sein de l'équipe « État Solide » de Technologie Servier basée sur Orléans. Ce transfert a nécessité un effort d'adaptation aux contraintes inhérentes au milieu industriel notamment en termes de sécurité et d'ergonomie pour le manipulateur.

Pour cela, les outils, notamment de contrôle de la température, ont dû être modifiés. En effet, l'utilisation d'un bain à circulation d'eau peut poser des problèmes de sécurité et l'utilisation d'un four de colonne HPLC a été préférée pour le chauffage des circuits microfluidiques (voir partie C.1.4.2.4). La Figure 97 présente le montage utilisé pour la mesure de solubilités chez TES. La cellule UV a été adaptée pour récupérer les solutions dans un vial hermétique après leurs passages entre les fibres optiques évitant tout contact des solutions avec l'air ambiant.

Afin de faciliter le travail des futurs utilisateurs, la méthode de mesures des concentrations a été revue pour mesurer directement les Absorbances (sans passer par les Intensités transmises) simplifiant la manipulation.

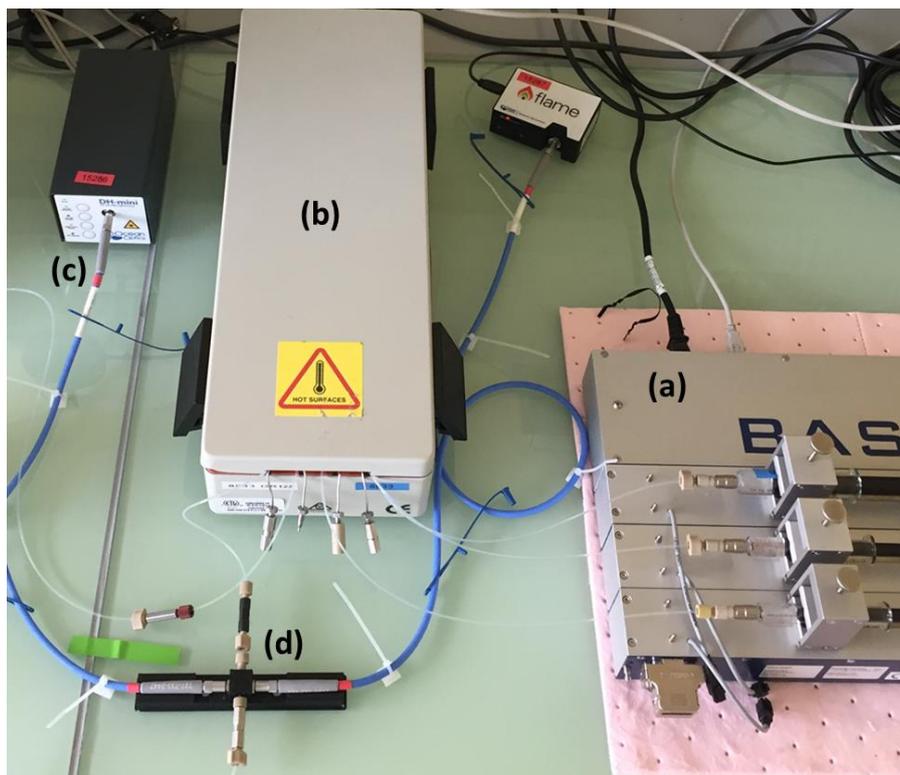


Figure 97. Montage de mesure de solubilités adapté au milieu industriel. (a) pousse-seringue, (b) four de colonne HPLC permettant le chauffage du circuit microfluidique, (c) spectromètre UV, (d) cellule UV imprimée en 3D au CINaM.

3.2. Proposition de montages microfluidiques pour le criblage de sels

Fort de l'expérience acquise et des outils développés pour le criblage du polymorphisme, des réponses en microfluidiques pour le criblage de sels ont commencé à être expérimentées durant cette thèse. Ces travaux préliminaires sont décrits succinctement dans cette partie.

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, le criblage de sels est une étape cruciale dans le développement d'un médicament. En effet, la salification d'un principe actif permet d'avoir, entre autres, une solubilité aqueuse plus importante. Pour réaliser ce type de criblage, un grand nombre d'expériences de cristallisation et d'analyses physico-chimique doivent être réalisées. Le principe étant de trouver le sel ayant les propriétés les plus intéressantes en termes de solubilité, stabilité, polymorphisme, « processabilité » ...

Ici deux approches sont brièvement présentées : une approche académique se basant sur les travaux réalisés au cours de cette thèse pour le criblage du polymorphisme et précédemment au CINaM pour le criblage de protéine-ligand ; et une approche industrielle prenant en compte les contraintes inhérentes au criblage de sel en laboratoire

pharmaceutique (temps, sécurité, ...), où des réponses en microfluidique seront apportées pour aider à un choix de sel classique.

L'approche académique se base sur les travaux de Gérard et al⁴⁶ qui proposent une « librairie chimique » disponible dans les canaux microfluidiques. La « librairie chimique » permet dans ces travaux d'ajouter différents ligands dans des gouttes de concentration connue en protéine. Dans notre cas, le couplage de cette méthode à celle de génération de solutions saturées est intéressant pour un criblage de sel.

Pour l'approche industrielle, j'ai pu passer quelques mois durant ma dernière année de thèse dans les locaux de Technologie Servier pour transférer les méthodes et les outils que j'ai développés au CINaM. J'ai alors mis en place les outils microfluidiques, permettant les mesures de solubilité et la génération de gouttes saturées, sur lesquels j'ai également formé un ingénieur. Le but était aussi d'échanger avec l'équipe présente pour proposer des réponses en microfluidique aux problématiques du choix de sel. Une approche industrielle se basant sur le couplage de la stratégie classique d'un choix de sel avec des méthodes microfluidiques est proposée.

3.2.1. Proposition d'un montage pour une approche académique du criblage de sel

Ce montage permet de générer des solutions saturées de la base (Figure 98 (1)) puis de rencontrer un flux d'huile pour générer des gouttes de cette solution (Figure 98 (2)). Dans une autre branche du circuit, une librairie de différents contre-ions en solutions est disposée dans un capillaire microfluidique (Figure 98 (3)). Ces deux flux se rencontrent dans une jonction en T afin de mélanger des gouttes saturées de la base avec différents contre-ions en solution (Figure 98 (4)). Ces gouttes de composition différentes sont stockées et observées pour étudier leur cristallisation durant un profil de température.

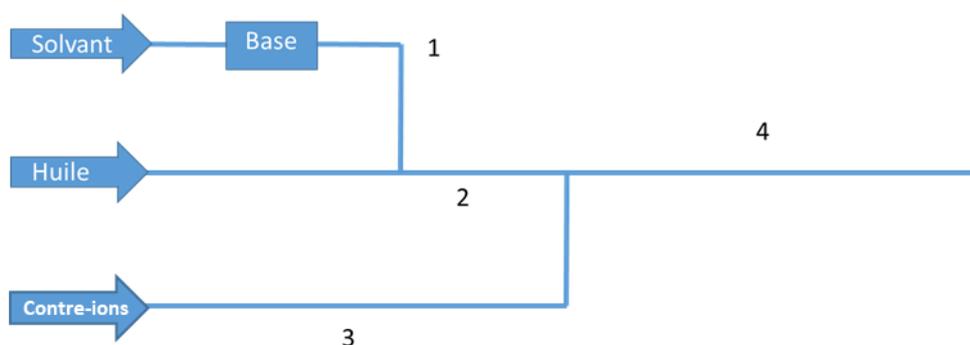


Figure 98. Montage proposé pour une approche académique du criblage de sels.

3.2.2. Proposition d'une approche industrielle du criblage de sel intégrant des outils microfluidiques

3.2.2.1. Stratégie classique de choix de sels à Technologie Servier

La Stratégie de choix de sels à Technologie Servier est décrite de façon simplifiée dans le Tableau 5. Cette stratégie ou des variantes proches sont classiquement utilisées dans l'industrie pharmaceutique et permettent le choix d'un sel par élimination :

- La première étape consiste à caractériser la forme neutre de départ et à évaluer son ou ses pKa afin de pouvoir sélectionner une dizaine de contre-ions potentiels. Ce criblage consiste à réaliser des expériences de formation des sels. La méthode utilisée est le mélange à équivalence de la forme neutre et d'un contre-ion dans une dizaine de solvants. En fin d'expérience, les résidus solides sont filtrés et analysés par Diffraction des Rayons X (DRX) et Calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Dans le cas de solutions limpides, celles-ci sont évaporées à sec puis analysées par les mêmes techniques.

Les résultats des expériences de cristallisation et les analyses qui leur sont associées permettront le choix de 6 sels au maximum (parmi les 10 du départ) qui présentent une meilleure cristallinité, mais aussi un nombre réduit de polymorphes. La production de petits lots (environ 200 mg) de chaque sel est réalisée afin de leur faire subir de plus amples analyses. L'objectif est de connaître aux mieux leurs propriétés physico-chimiques. À cette étape, une première mesure de solubilité approchée (peu précise, mais donnant un ordre de grandeur) est notamment réalisée. Des échantillons de chaque sel subissent, en parallèle, des tests préliminaires rapides (3jours) de stabilité permettant d'écarter les sels les moins stables. À la fin de cette étape et en fonction des résultats obtenus, 3 sels au maximum seront retenus.

L'étape suivante consiste à produire une plus grande quantité de ces 3 sels (environ 1 g de chaque) afin qu'ils subissent des analyses encore plus poussées et un test de stabilité plus long (6 semaines en incubateur à 40 °C et 75 % d'humidité relative) est réalisé. Grâce aux données collectées, il sera alors possible de choisir le sel ayant les propriétés physico-chimiques les plus intéressantes. Il est à noter que le choix d'un sel est aussi réalisé en collaboration avec d'autres services du laboratoire (formulation, génie chimique, toxicologie, pharmaco-cinétique...) afin que tous les aspects du développement pharmaceutique soient pris en compte.

Etape	Nom de l'étape	Nombre de sels	Quantité nécessaire	Durée	Activités
1	Caractérisation de la forme Neutre (base ou acide)	-	100mg	2-3jours	XRD, DSC, ATG, DVS, LC, ¹ H RMN
2	Criblage de la salification	10	3,5g	10jours	Test de formation des sels dans 9 à 10 solvants (jusqu'à 100 expériences de cristallisation) Et analyse par DRX et DSC des nouvelles formes obtenues
3		6		5jours	Choix de 6 sels et production de petit lots (environ 200mg) pour de plus amples analyses: DRX, DSC, ATG, DVS, LC, Solubilité approchée
4	6	3jours		Test de stabilité dans un incubateur à 40°C et 75% d'humidité relative. DRX avant et après incubation + LC après incubation	
5	Scale-up	3		8jours	Choix de 3 sels et production de 1g chacun pour de plus amples analyse: DRX, DSC, ATG, DVS, LC, ¹ H RMN, Solubilité
6	Test de stabilité long	3	8 semaines + 3 mois	Test de stabilité dans un incubateur à 40°C et 75% d'humidité relative. DRX, DSC, ATG, LC	
7	Choix du sel	1	-	-	Choix du sels ayant les propriétés physico-chimiques les plus intéressantes

Tableau 5 : Stratégie classique de choix de sels à Technologie Servier.

L'avantage de cette méthode est son efficacité. Il est, effectivement, difficile de passer à côté d'un bon sel. Cependant, elle nécessite beaucoup de temps et une quantité de matière première non négligeable. De plus, cette approche commence par se focaliser sur la cristallisation de tous les sels avant même d'avoir des données sur les propriétés physico-chimiques essentielles telles que le point de fusion ou la solubilité en milieu aqueux.

3.2.2.2. Proposition d'intégration de la microfluidique dans le choix de sel

Dans un premier temps, il a été envisagé d'appliquer la microfluidique à la stratégie classique. Des essais préliminaires de suivi de cristallisation par microscopie Raman ont été réalisés. Ces essais ont rapidement fait apparaître que les temps d'analyse n'étaient pas compatibles avec la durée très restreinte d'un choix de sel qui est une étape critique dans le plan de développement d'un principe actif pharmaceutique. Nous avons donc décidé de réfléchir à une approche radicalement différente en essayant de faire abstraction de l'existant et en se focalisant sur les contraintes de temps, matières premières disponibles et paramètres physico-chimiques critiques pour un choix de sel.

Il est apparu évident que la solubilité en milieux aqueux et la stabilité physicochimique étaient les points clés d'une telle étude. L'objectif a donc été d'élaborer un protocole

permettant d'accéder rapidement à ces données sans avoir à nous focaliser sur le criblage de cristallisation dans un premier temps.

Pour cela nous nous sommes inspirés de la méthodologie la plus classique et efficace pour le criblage de co-cristaux. Cette approche basée sur le co-broyage assisté par solvant (comme il est préconisé dans la littérature^{14,110}) conduit très fréquemment au co-cristal cristallin. En effet, l'utilisation de quelques microlitres de solvant favorise la solubilisation partielle des réactifs tout en abaissant les températures de transition vitreuse de tous les constituants et favorise ainsi leur cristallisation. Le choix du solvant utilisé pour le co-broyage a été basé sur des données de solubilité approchées des principaux acides organiques utilisés en pharmacie. Il est apparu que l'acétone est un solvant intéressant pour l'essentiel des acides à l'exception de l'acide tartrique. De plus, les principes actifs pharmaceutiques sous forme non salifiée ont potentiellement une solubilité non négligeable dans ce solvant. Nous avons donc décidé d'utiliser l'acétone comme solvant de co-broyage pour l'ensemble des acides. Dans l'hypothèse où le co-broyage ne conduirait pas à un sel cristallin, le sel amorphe sera tout de même évalué en termes de stabilité pour vérifier si celui-ci pourrait recristalliser sous l'effet de la température ou de l'humidité et pourrait potentiellement être intéressant.

Les sels ainsi obtenus peuvent être rapidement testés en termes de solubilité et stabilité et être caractérisés par DRX et DSC. Le couplage du co-broyage à la détermination de la solubilité par la méthode microfluidique mise au point précédemment permet d'accéder très rapidement aux données de solubilité et stabilité avec des quantités réduites de principes actifs pour ensuite concentrer les efforts de criblage de cristallisation uniquement sur les deux sels présentant le meilleur compromis entre solubilité et stabilité.

Le criblage de cristallisation des deux sels dans 15 à 20 solvants peut se faire soit via une méthode classique de criblage soit par microfluidique. Pour cela un premier montage permettant d'évaluer la cristallisation en microfluidique de chaque sel dans les différents solvants a été proposé. Ce montage permettant aussi la production de monocristaux pour la résolution des structures cristallines.

À la suite de cette étape, et à la lumière des tests de stabilité longs (6 semaines +3 mois) il sera alors possible de choisir le sel ayant les propriétés physico-chimiques les plus intéressantes.

Cette proposition de stratégie est toutefois encore en étude, et de nombreux défis doivent être relevés avant son utilisation en laboratoire industrielle :

- Optimisation du matériel pour le couplage co-broyage/solubilité par microfluidique
- Parallélisation des expériences de cristallisation en microfluidique
- Adaptation aux contraintes de sécurité

Etape	Nom de l'étape	Nombre de sels	Quantité nécessaire	Activités
1	Caractérisation de la forme Neutre (base ou acide)	-	100mg	XRD, DSC, ATG, DVS, LC, ¹ H RMN
2	Salification par co-broyage et caractérisation	10	2g (200mg/sel)	Formation des sels et caractérisation par: XRD, DSC, ATG, DVS, LC, NMR
3	Solubilités (en microfluidique)	10		Mesure des solubilités des 10 sels dans l'eau et du sérum physiologique à 25°C
4	Test préliminaire de stabilité	10		Test de stabilité dans un incubateur à 40°C et 75% d'humidité relative. + XRD, DSC, ATG, LC
5	Mini Scale-up	2	1g (500mg/sel)	Choix de 2 sels et production par co-broyage de 500mg chacun + Caractérisation par DRX
6	Criblage de la cristallisation (classique/microfluidique)	2		Test de cristallisation dans 16 à 20 solvants (méthode classique ou microfluidique) +DRX et DSC
7	Scale up	2	2g (1g/sel)	XRD, DSC, ATG, DVS, NMR, LC...
8	Test de stabilité long	2		Test de stabilité dans un incubateur à 40°C et 75% d'humidité relative. DRX, DSC, ATG, LC
9	Choix du sel	1	-	Choix du sels ayant les propriétés physico-chimiques les plus intéressantes

Tableau 6 : Synthèse résumant la Stratégie proposée et intégrant la microfluidique, à optimiser et valider

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Dans la partie bibliographique, nous avons montré que la variation des conditions de cristallisation peut engendrer l'apparition de différentes phases ayant des propriétés physico-chimiques bien distinctes. La cristallisation étant une technique très largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique, nous avons vu que l'étude de l'état solide d'une molécule d'intérêt pharmaceutique est une étape primordiale de son développement. Cette étape aux enjeux importants est liée à de fortes contraintes. En effet, les criblages de sels et de polymorphes nécessitent un grand nombre d'expériences engendrant une consommation de quantité de matière qui peut être importante à un stade où les quantités disponibles sont faibles. La réduction des volumes mis en jeu en microfluidique peut permettre de répondre à ce problème. Parmi les différentes techniques microfluidiques, la microfluidique à base de gouttes est particulièrement intéressante. En effet, cette technique permet la génération de gouttes de volume nanométrique monodisperse, qui sont isolées les unes des autres par de l'huile et que l'on peut donc considérer comme des nanocristallisoirs indépendants. Ainsi, il est possible de réaliser un grand nombre d'expériences en utilisant très peu de matière première. De plus, la répétition de conditions identiques permet d'avoir une approche statistique du phénomène aléatoire qu'est la nucléation, et augmente également la probabilité de voir ce qui est improbable comme des nouvelles phases. Cependant, les principales limites de l'utilisation de la microfluidique en cristallisation sont l'incompatibilité de certains systèmes avec les solvants organiques couramment utilisés et l'utilisation de tensioactifs pour la formation de gouttes qui peuvent interagir avec la cristallisation. Pour cela, des systèmes microfluidiques utilisant des jonctions en PEEK et des capillaires en Téflon ont été développés. En plus de leurs compatibilités avec les solvants organiques, ces systèmes « Plug and Play » sont faciles à mettre en œuvre et permettent d'envisager une multitude d'applications sans ajout de tensioactifs.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été de développer des outils microfluidiques permettant l'étude de la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques. Les outils développés doivent être utilisables dans le cadre d'études de l'état solide en laboratoire industriel. Afin de répondre aux contraintes de ce type d'études en microfluidique, une partie importante du travail de thèse a consisté à l'amélioration technologique de la plateforme microfluidique disponible au CINaM. Cette plateforme plutôt orientée vers la cristallisation de protéine n'était pas optimisée pour la cristallisation de principes actifs pharmaceutiques, qui nécessite l'utilisation de solvants organiques à haute température (proche de leur point d'ébullition) posant des défis qu'il a fallu surmonter.

Un premier défi a été de trouver une méthode permettant de partir directement de la poudre en microfluidique. Jusqu'à présent, il était nécessaire de préparer les solutions saturées à part, puis de les injecter dans le système microfluidique. Ceci pouvait poser des problèmes de recristallisation non désirée et des difficultés techniques pour

l'expérimentateur qui doit manipuler les solvants organiques à hautes températures. La méthode développée ici permet la dissolution de la poudre en ligne, directement dans le montage microfluidique. Cette méthode, basée sur le passage du solvant à travers un lit de poudre bloqué par un filtre (à l'image d'un percolateur à café), permet la génération de solutions saturées sans pertes et sans manipulation directe de l'expérimentateur.

La possibilité de générer en ligne, des solutions saturées a permis de développer un montage microfluidique pour la mesure de solubilités en ajoutant une cellule UV (spécialement conçue dans cette thèse) qui mesure la concentration des solutions. Grâce à la méthode de dissolution en ligne, il est également possible de s'affranchir d'un étalonnage long et coûteux en matière première, et la mesure d'une seule solution étalon faiblement concentrée est suffisante. Afin d'évaluer l'efficacité de cette méthode, les solubilités du paracétamol à différentes températures ont été mesurées dans trois solvants, ayant des affinités différentes avec la molécule et les résultats sont en accord avec la littérature. Cette méthode microfluidique permet la mesure de solubilités avec précision (incertitudes inférieures à 5 %) en utilisant très peu de matière première (environ 30 mg pour une courbe de solubilité complète) en peu de temps (environ 2 heures), le tout pour des gammes de concentration allant de moins de 1mg/mL à plus de 100mg/mL et des températures allant jusqu'à 70 °C. Dans ce travail de thèse, seules des solubilités de phases stables ont été mesurées. Cependant, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre étant très court, on peut envisager la mesure de solubilité de phases métastables, sans erreurs dues à la transition vers une phase plus stable durant la mesure.

Une grande partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude de la cristallisation en microfluidique à base de gouttes. Pour cela, nous avons conçu un montage pour générer des gouttes saturées à différentes températures, et donc à différentes concentrations. Ces gouttes sont ensuite stockées et observées, pendant que l'on applique un profil de refroidissement, permettant de balayer le diagramme de phase concentration/température. De cette observation, nous avons obtenu des données intéressantes, comme la température de nucléation et le faciès des cristaux. Chaque goutte étant indépendante, la répétition à l'identique des expériences permet d'avoir des données statistiques sur le phénomène aléatoire qu'est la nucléation. Nous avons couplé notre outil microfluidique à de la spectroscopie Raman sur chaque goutte, ce qui permet une analyse in situ des cristaux obtenus (c'est-à-dire à travers le capillaire, l'huile et le solvant). Ainsi, nous avons pu identifier les phases cristallines obtenues lors du refroidissement. Les cristaux obtenus étant monocristallins, nous les avons également analysés in situ et ex situ en diffractions de Rayons X. Nous savons donc à quelle température un cristal est apparu, dans quel solvant, à quelle concentration et à quelle sursaturation (si les solubilités sont connues) et de quelle phase cristalline il est constitué. Par cette technique, nous avons ainsi étudié le polymorphisme du sulfathiazole dans trois solvants (eau, n-propanol et acétonitrile). Lors de cette étude, nous avons observé l'apparition de 4 des 5 polymorphes connus du sulfathiazole, montrant la faisabilité d'un criblage en partant directement de la poudre. En effet, le confinement dû au

faible volume des gouttes permet d'atteindre des sursaturations plus importantes et de stabiliser une phase métastable. La méthodologie d'analyse par Spectroscopie Raman pourra être améliorée par un programme permettant de regrouper les spectres mesurés en fonction de leur point commun afin de faciliter l'analyse des résultats.

Enfin, j'ai transféré les outils et les techniques microfluidiques mis au point lors de cette thèse dans un laboratoire de développement pharmaceutique industrielle (Technologie Servier). Des échanges avec l'industrie ont eu lieu tout au long de cette thèse, ce qui nous a permis de proposer des réponses en microfluidique à flux et à base de gouttes pour le criblage et le choix de sels en laboratoire pharmaceutique.

Perspectives

Pour les études futures à envisager, je présente ici les perspectives à court et à long terme concernant les différents travaux réalisés durant cette thèse :

- Jusqu'à présent seules les solubilités de phases stables pures ont été mesurées avec la méthode microfluidique développée. Cependant, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre étant très court, avec cette méthode, on peut envisager la mesure de solubilités de phases métastables, sans erreurs dues à la transition vers une phase plus stable durant la mesure. De plus, le suivi en ligne de l'absorbance pendant l'expérience permettrait de repérer si une transition de phase a lieu. En effet, ce phénomène aurait pour conséquence une modification de la concentration en sortie du filtre provoquant un décrochage de l'absorbance puis un second palier correspondant à un nouvel équilibre.

- Une autre perspective intéressante serait l'amélioration du système de stockage et d'observation des gouttes qui permettra l'observation d'un plus grand nombre de gouttes simultanément et de faciliter le travail de l'expérimentateur. L'optimisation de ce nouveau système est en cours et celui-ci permet de stocker les gouttes dans un capillaire plus long disposé dans une spirale (conçu au laboratoire et imprimé en 3D) pour son maintien dans le bain thermostaté. Ce système permet le stockage d'environ 500 gouttes. L'augmentation du nombre de gouttes (et donc du nombre d'expériences indépendantes) nous permettra d'obtenir des résultats statistiques robustes. De plus l'amélioration de la méthodologie de mémorisation de la position des gouttes permettra un gain de temps important.

- Le traitement des données issues de la méthodologie d'analyse par Spectroscopie Raman pourra être améliorée par un programme permettant de regrouper les spectres mesurés en fonction de leurs points communs afin de faciliter l'analyse des résultats. De plus, un montage de spectroscopie Raman en ligne est en cours d'expérimentation. La configuration la plus intéressante pour réaliser ce type de mesure est d'utiliser un montage Raman en Transmission. Une fois optimisé ce montage permettrait des mesures plus rapides, car ne nécessitant pas l'extraction du capillaire microfluidique. De plus, un tel montage Raman pourrait permettre l'analyse en ligne de la concentration des solutions et donc d'élargir la

gamme d'application de la mesure de solubilités en microfluidique à des molécules absorbant peu ou pas en UV/Visible.

- Enfin, les outils et méthodes microfluidiques développés dans le cadre d'un criblage de sel en laboratoire industriel devront être optimisés et validés pour une utilisation en « routine ». Pour cela, il faudra trouver des solutions techniques pour améliorer la sécurité lors de la manipulation par les utilisateurs, notamment lors du remplissage des « cartouches » avec la poudre de principe actif qui permettrait son utilisation pour des molécules plus toxiques.

Références bibliographiques

- (1) Blagden, N.; Davey, R. Polymorphs Take Shape. *Chem. Br.* **1999**, *35* (3), 44–45.
- (2) Chemburkar, S. R.; Bauer, J.; Deming, K.; Spiwek, H.; Patel, K.; Morris, J.; Henry, R.; Spanton, S.; Dziki, W.; Porter, W.; et al. Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4* (5), 413–417. <https://doi.org/10.1021/op000023y>.
- (3) Boistelle, R. Concepts de La Cristallisation En Solution. In *Actualités Néphrologiques.*; 1985.
- (4) Walton, A. G. Nucleation in Liquids and Solutions. In *Nucleation*; Zettlemoyer, A.C., 1969; p p.225-307.
- (5) Wolde, P. R. ten; Frenkel, D. Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations. *Science* **1997**, *277* (5334), 1975–1978. <https://doi.org/10.1126/science.277.5334.1975>.
- (6) Kashchiev, D. *Nucleation*; Elsevier, 2000.
- (7) Fletcher, N. H. Size Effect in Heterogeneous Nucleation. *J. Chem. Phys.* **1958**, *29* (3), 572–576. <https://doi.org/10.1063/1.1744540>.
- (8) Liu, X. Y. Generic Progressive Heterogeneous Processes in Nucleation. *Langmuir* **2000**, *16* (18), 7337–7345. <https://doi.org/10.1021/la991333g>.
- (9) Veessler, S.; Puel, F.; Fevotte, G. Polymorphisme dans les procédés de cristallisation en solution. *STP Pharma Prat.* **2005**, *15* (1), 53–84.
- (10) Zhang, S. *Approche Microfluidique Polyvalente de La Cristallisation*; Aix-Marseille, 2015.
- (11) Schultheiss, N.; Newman, A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9* (6), 2950–2967. <https://doi.org/10.1021/cg900129f>.
- (12) Newman, A. Specialized Solid Form Screening Techniques. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (3), 457–471. <https://doi.org/10.1021/op300241f>.
- (13) Maurin, M. B.; Grant, D. J. W.; Stahl, P. H. The Physicochemical Background: Fundamentals of Ionic Equilibria. In *Handbook of pharmaceutical salts*; Wiley-vch, 2002; p 17.
- (14) Shan, N.; Toda, F.; Jones, W. Mechanochemistry and Co-Crystal Formation: Effect of Solvent on Reaction Kinetics. *Chem. Commun.* **2002**, *0* (20), 2372–2373. <https://doi.org/10.1039/B207369M>.
- (15) Detoisien, T. Cristallisation d'un sel pharmaceutique: développement de méthodologies d'étude. Thèse de doctorat, Université Paul Cézanne, Aix-en-Provence, Bouches-du-Rhône ; Marseille ; 1973-2011, France, 2010.
- (16) Bowker, M. J. A Procedure for Salt Selection and Optimization. In *Handbook of pharmaceutical salts*; Wiley-vch, 2002; pp 161–189.
- (17) *Pharmaceutical Salts and Co-Crystals*; RSC Drug Discovery Series; RSCPublishing, 2011. <https://doi.org/10.1039/9781849733502>.
- (18) Rouf, A.; Tanyeli, C. Bioactive Thiazole and Benzothiazole Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 911–927. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.058>.
- (19) Hughes, D. S.; Hursthouse, M. B.; Threlfall, T.; Tavener, S. A New Polymorph of Sulfathiazole. *Acta Crystallogr. C* **1999**, *55* (11), 1831–1833. <https://doi.org/10.1107/S0108270199010112>.
- (20) Bingham, A. L.; Hughes, D. S.; Hursthouse, M. B.; Lancaster, R. W.; Tavener, S.; Threlfall, T. L. Over One Hundred Solvates of Sulfathiazole. *Chem. Commun.* **2001**, No. 7, 603–604. <https://doi.org/10.1039/B009540K>.

- (21) Abdelli, S. Cristallisation Par Procédé Supercritique Anti-Solvant (SAS) : Influence Des Conditions Opératoires Sur Le Polymorphisme Des Cristaux. thesis, Aix-Marseille, 2017.
- (22) Khoshkhoo, S.; Anwar, J. Crystallization of Polymorphs: The Effect of Solvent. *J. Phys. Appl. Phys.* **1993**, *26* (8B), B90–B93. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/26/8B/013>.
- (23) Blagden, N.; Davey, R. J.; Rowe, R.; Roberts, R. Disappearing Polymorphs and the Role of Reaction By-Products: The Case of Sulphathiazole. *Int. J. Pharm.* **1998**, *172* (1), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00205-1).
- (24) Munroe, Á.; Rasmuson, Å. C.; Hodnett, B. K.; Croker, D. M. Relative Stabilities of the Five Polymorphs of Sulfathiazole. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (6), 2825–2835. <https://doi.org/10.1021/cg201641g>.
- (25) Gelbrich, T.; Hughes, D. S.; Hursthouse, M. B.; Threlfall, T. L. Packing Similarity in Polymorphs of Sulfathiazole. *CrystEngComm* **2008**, *10* (10), 1328–1334. <https://doi.org/10.1039/B807898J>.
- (26) Bakar, M. R. A.; Nagy, Z. K.; Rielly, C. D. Seeded Batch Cooling Crystallization with Temperature Cycling for the Control of Size Uniformity and Polymorphic Purity of Sulfathiazole Crystals. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (6), 1343–1356. <https://doi.org/10.1021/op900174b>.
- (27) Abu Bakar, M. R.; Nagy, Z. K.; Rielly, C. D.; Dann, S. E. Investigation of the Riddle of Sulfathiazole Polymorphism. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414* (1–2), 86–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.004>.
- (28) Threlfall, T. Polymorphism - Polymorph Myths and Misperceptions. *Eur. Pharm. Rev.* **2014**.
- (29) Blagden, N.; Davey, R. J.; Lieberman, H. F.; Williams, L.; Payne, R.; Roberts, R.; Rowe, R.; Docherty, R. Crystal Chemistry and Solvent Effects in Polymorphic Systems Sulfathiazole. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94* (8), 1035–1044. <https://doi.org/10.1039/A706669D>.
- (30) Bučar, D.-K.; Lancaster, R. W.; Bernstein, J. Disappearing Polymorphs Revisited. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, *54* (24), 6972–6993. <https://doi.org/10.1002/anie.201410356>.
- (31) Psaltis, D.; Quake, S. R.; Yang, C. Developing Optofluidic Technology through the Fusion of Microfluidics and Optics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 381–386. <https://doi.org/10.1038/nature05060>.
- (32) Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Applications of Microfluidics in Chemical Biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (6), 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>.
- (33) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- (34) Leng, J.; Salmon, J.-B. Microfluidic Crystallization. *Lab. Chip* **2009**, *9* (1), 24–34. <https://doi.org/10.1039/b807653g>.
- (35) Zhao, C.-X.; Middelberg, A. P. J. Two-Phase Microfluidic Flows. *ResearchGate* **2011**, *66* (7), 1394–1411. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.038>.
- (36) Baret, J.-C. Surfactants in Droplet-Based Microfluidics. *Lab. Chip* **2012**, *12* (3), 422–433. <https://doi.org/10.1039/C1LC20582J>.
- (37) Boistelle, R. Impurity Effects in Crystal Growth from Solution. In *Interfacial Aspects of Phase Transformations*; Mutaftschiev, B., Ed.; NATO Advanced Study Institutes Series; Springer Netherlands, 1982; pp 621–638. https://doi.org/10.1007/978-94-009-7870-6_24.

- (38) Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86* (18), 4163–4166. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.4163>.
- (39) Garstecki, P.; Fuerstman, M. J.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. Formation of Droplets and Bubbles in a Microfluidic T-Junction—Scaling and Mechanism of Break-Up. *Lab Chip* **2006**, *6* (3), 437–446. <https://doi.org/10.1039/B510841A>.
- (40) Menech, M. D.; Garstecki, P.; Jousse, F.; Stone, H. A. Transition from Squeezing to Dripping in a Microfluidic T-Shaped Junction. *ResearchGate* **2008**, *595*, 141–161. <https://doi.org/10.1017/S002211200700910X>.
- (41) Xu, J. H.; Li, S. W.; Tan, J.; Luo, G. S. Correlations of Droplet Formation in T-Junction Microfluidic Devices: From Squeezing to Dripping. *Microfluid. Nanofluidics* **2008**, *5* (6), 711–717. <https://doi.org/10.1007/s10404-008-0306-4>.
- (42) Zagnoni, M.; Anderson, J.; Cooper, J. M. Hysteresis in Multiphase Microfluidics at a T-Junction. *Langmuir* **2010**, *26* (12), 9416–9422. <https://doi.org/10.1021/la1004243>.
- (43) Zhang, S.; Guivier-Curien, C.; Veessler, S.; Candoni, N. Prediction of Sizes and Frequencies of Nanoliter-Sized Droplets in Cylindrical T-Junction Microfluidics. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *138*, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.07.046>.
- (44) Tice, J. D.; Song, H.; Lyon, A. D.; Ismagilov, R. F. Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir* **2003**, *19* (22), 9127–9133. <https://doi.org/10.1021/la030090w>.
- (45) Trivedi, V.; Doshi, A.; Kurup, G. K.; Erefej, E.; Vandevord, P. J.; Basu, A. S. A Modular Approach for the Generation, Storage, Mixing, and Detection of Droplet Libraries for High Throughput Screening. *Lab. Chip* **2010**, *10* (18), 2433–2442. <https://doi.org/10.1039/c004768f>.
- (46) Gerard, C. J. J.; Ferry, G.; Vuillard, L. M.; Boutin, J. A.; Ferte, N.; Grossier, R.; Candoni, N.; Veessler, S. A Chemical Library to Screen Protein and Protein–Ligand Crystallization Using a Versatile Microfluidic Platform. *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18* (9), 5130–5137. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00572>.
- (47) Baroud, C. N.; Gallaire, F.; Dangla, R. Dynamics of Microfluidic Droplets. *Lab Chip* **2010**, *10* (16), 2032–2045. <https://doi.org/10.1039/C001191F>.
- (48) Dombrowski, R. D.; Litster, J. D.; Wagner, N. J.; He, Y. Crystallization of Alpha-Lactose Monohydrate in a Drop-Based Microfluidic Crystallizer. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62* (17), 4802–4810. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.05.033>.
- (49) Ildefonso, M.; Candoni, N.; Veessler, S. A Cheap, Easy Microfluidic Crystallization Device Ensuring Universal Solvent Compatibility. *ResearchGate* **2012**, *16* (4), 556–560. <https://doi.org/10.1021/op200291z>.
- (50) Laval, P.; Lisai, N.; Salmon, J.-B.; Joanicot, M. A Microfluidic Device Based on Droplet Storage for Screening Solubility Diagrams. *Lab. Chip* **2007**, *7* (7), 829–834. <https://doi.org/10.1039/b700799j>.
- (51) Lee, J. N.; Park, C.; Whitesides, G. M. Solvent Compatibility of Poly(Dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (23), 6544–6554. <https://doi.org/10.1021/ac0346712>.
- (52) Nge, P. N.; Rogers, C. I.; Woolley, A. T. Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (4), 2550–2583. <https://doi.org/10.1021/cr300337x>.

- (53) Li, L.; Ismagilov, R. F. Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves, Droplets, and SlipChip. *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 139–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133630>.
- (54) Sultana, M.; Jensen, K. F. Microfluidic Continuous Seeded Crystallization: Extraction of Growth Kinetics and Impact of Impurity on Morphology. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (12), 6260–6266. <https://doi.org/10.1021/cg301538y>.
- (55) Shinohara, K.; Fukui, T.; Abe, H.; Sekimura, N.; Okamoto, K. Screening of C60 Crystallization Using a Microfluidic System. *Langmuir* **2006**, *22* (15), 6477–6480. <https://doi.org/10.1021/la0614177>.
- (56) Bhamidi, V.; Lee, S. H.; He, G.; Chow, P. S.; Tan, R. B. H.; Zukoski, C. F.; Kenis, P. J. A. Antisolvent Crystallization and Polymorph Screening of Glycine in Microfluidic Channels Using Hydrodynamic Focusing. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (7), 3299–3306. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00420>.
- (57) Ali, H. S. M.; Blagden, N.; York, P.; Amani, A.; Brook, T. Artificial Neural Networks Modelling the Prednisolone Nanoprecipitation in Microfluidic Reactors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *37* (3–4), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.04.007>.
- (58) Robertson, K.; Flandrin, P.-B.; Klapwijk, A. R.; Wilson, C. C. Design and Evaluation of a Mesoscale Segmented Flow Reactor (KRAIC). *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16* (8), 4759–4764. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00885>.
- (59) Simone, E.; McVeigh, J.; Reis, N. M.; Nagy, Z. K. A High-Throughput Multi-Microfluidic Crystal Generator (MMicroCryGen) Platform for Facile Screening of Polymorphism and Crystal Morphology for Pharmaceutical Compounds. *Lab. Chip* **2018**, *18* (15), 2235–2245. <https://doi.org/10.1039/C8LC00301G>.
- (60) Hansen, C. L.; Skordalakes, E.; Berger, J. M.; Quake, S. R. A Robust and Scalable Microfluidic Metering Method That Allows Protein Crystal Growth by Free Interface Diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (26), 16531–16536. <https://doi.org/10.1073/pnas.262485199>.
- (61) Hansen, C. L.; Classen, S.; Berger, J. M.; Quake, S. R. A Microfluidic Device for Kinetic Optimization of Protein Crystallization and In Situ Structure Determination. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (10), 3142–3143. <https://doi.org/10.1021/ja0576637>.
- (62) Lau, B. T. C.; Baitz, C. A.; Dong, X. P.; Hansen, C. L. A Complete Microfluidic Screening Platform for Rational Protein Crystallization. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (3), 454–455. <https://doi.org/10.1021/ja065855b>.
- (63) Goyal, S.; R. Thorson, M.; L. Schneider, C.; Z. Zhang, G. G.; Gong, Y.; A. Kenis, P. J. A Microfluidic Platform for Evaporation-Based Salt Screening of Pharmaceutical Parent Compounds. *Lab. Chip* **2013**, *13* (9), 1708–1723. <https://doi.org/10.1039/C3LC41271G>.
- (64) R. Thorson, M.; Goyal, S.; R. Schudel, B.; F. Zukoski, C.; Z. Zhang, G. G.; Gong, Y.; A. Kenis, P. J. A Microfluidic Platform for Pharmaceutical Salt Screening. *Lab. Chip* **2011**, *11* (22), 3829–3837. <https://doi.org/10.1039/C1LC20645A>.
- (65) R. Thorson, M.; Goyal, S.; Gong, Y.; Z. Zhang, G. G.; A. Kenis, P. J. Microfluidic Approach to Polymorph Screening through Antisolvent Crystallization. *CrystEngComm* **2012**, *14* (7), 2404–2412. <https://doi.org/10.1039/C2CE06167H>.
- (66) Horstman, E. M.; Goyal, S.; Pawate, A.; Lee, G.; Zhang, G. G. Z.; Gong, Y.; Kenis, P. J. A. Crystallization Optimization of Pharmaceutical Solid Forms with X-Ray Compatible Microfluidic Platforms. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (3), 1201–1209. <https://doi.org/10.1021/cg5016065>.

- (67) Goyal, S.; Thorson, M. R.; Zhang, G. G. Z.; Gong, Y.; Kenis, P. J. A. Microfluidic Approach to Cocrystal Screening of Pharmaceutical Parent Compounds. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12* (12), 6023–6034. <https://doi.org/10.1021/cg3011212>.
- (68) Perry, S. L.; Guha, S.; Pawate, A. S.; Bhaskarla, A.; Agarwal, V.; Nair, S. K.; Kenis, P. J. A. A Microfluidic Approach for Protein Structure Determination at Room Temperature via On-Chip Anomalous Diffraction. *Lab. Chip* **2013**, *13* (16), 3183–3187. <https://doi.org/10.1039/c3lc50276g>.
- (69) White, M. L.; Frost, A. A. The Rate of Nucleation of Supersaturated Potassium Nitrate Solutions. *J. Colloid Sci.* **1959**, *14* (3), 247–251. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(59\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0095-8522(59)90049-2).
- (70) Zheng, B.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F. Screening of Protein Crystallization Conditions on a Microfluidic Chip Using Nanoliter-Size Droplets. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (37), 11170–11171. <https://doi.org/10.1021/ja037166v>.
- (71) Zheng, B.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. Formation of Droplets of Alternating Composition in Microfluidic Channels and Applications to Indexing of Concentrations in Droplet-Based Assays. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 4977–4982. <https://doi.org/10.1021/ac0495743>.
- (72) Zheng, B.; Tice, J. D.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F. A Droplet-Based, Composite PDMS/Glass Capillary Microfluidic System for Evaluating Protein Crystallization Conditions by Microbatch and Vapor-Diffusion Methods with On-Chip X-Ray Diffraction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43* (19), 2508–2511. <https://doi.org/10.1002/anie.200453974>.
- (73) Chen, D. L.; Gerdt, C. J.; Ismagilov, R. F. Using Microfluidics to Observe the Effect of Mixing on Nucleation of Protein Crystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (27), 9672–9673. <https://doi.org/10.1021/ja052279v>.
- (74) Li, L.; Mustafi, D.; Fu, Q.; Tereshko, V.; Chen, D. L.; Tice, J. D.; Ismagilov, R. F. Nanoliter Microfluidic Hybrid Method for Simultaneous Screening and Optimization Validated with Crystallization of Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (51), 19243–19248. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607502103>.
- (75) Laval, P.; Giroux, C.; Leng, J.; Salmon, J.-B. Microfluidic Screening of Potassium Nitrate Polymorphism. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310* (12), 3121–3124. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2008.03.009>.
- (76) Ildefonso, M.; Revalor, E.; Punniam, P.; Salmon, J. B.; Candoni, N.; Veessler, S. Nucleation and Polymorphism Explored via an Easy-to-Use Microfluidic Tool. *J. Cryst. Growth* **2012**, *342* (1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2010.11.098>.
- (77) Jiang, N.; Wang, Z.; Dang, L.; Wei, H. Effect of Supersaturation on L-Glutamic Acid Polymorphs under Droplet-Based Microchannels. *J. Cryst. Growth* **2016**, *446*, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2016.04.035>.
- (78) Teychené, S.; Biscans, B. Microfluidic Device for the Crystallization of Organic Molecules in Organic Solvents. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (11), 4810–4818. <https://doi.org/10.1021/cg2004535>.
- (79) Lu, J.; Litster, J. D.; Nagy, Z. K. Nucleation Studies of Active Pharmaceutical Ingredients in an Air-Segmented Microfluidic Drop-Based Crystallizer. *Cryst. Growth Des.* **2015**, *15* (8), 3645–3651. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00150>.
- (80) Gong, T.; Shen, J.; Hu, Z.; Marquez, M.; Cheng, Z. Nucleation Rate Measurement of Colloidal Crystallization Using Microfluidic Emulsion Droplets. *Langmuir* **2007**, *23* (6), 2919–2923. <https://doi.org/10.1021/la063070d>.

- (81) Ildefonso, M.; Candoni, N.; Veessler, S. Using Microfluidics for Fast, Accurate Measurement of Lysozyme Nucleation Kinetics. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (5), 1527–1530. <https://doi.org/10.1021/cg101431g>.
- (82) Ildefonso, M. Développement d'un outil microfluidique polyvalent pour l'étude de la cristallisation : application à la nucléation de principes actifs pharmaceutiques. phdthesis, Aix-Marseille université, 2012.
- (83) Ildefonso, M.; Candoni, N.; Veessler, S. Heterogeneous Nucleation in Droplet-Based Nucleation Measurements. *ResearchGate* **2013**, *13* (5), 2107–2110. <https://doi.org/10.1021/cg4001686>.
- (84) Zhang, S.; Gerard, C.; Ikni, A.; Ferry, G.; Vuillard, L.; Boutin, J.; Ferte, N.; Grossier, R.; Candoni, N.; Veessler, S. Microfluidic Platform for Optimization of Crystallization Conditions. HAL archive ouverte November 4, 2016.
- (85) Zhang, S.; Ferté, N.; Candoni, N.; Veessler, S. Versatile Microfluidic Approach to Crystallization. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19* (12), 1837–1841. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00122>.
- (86) Yadav, M. K.; Gerdts, C. J.; Sanishvili, R.; Smith, W. W.; Roach, L. S.; Ismagilov, R. F.; Kuhn, P.; Stevens, R. C. In Situ Data Collection and Structure Refinement from Microcapillary Protein Crystallization. *J. Appl. Crystallogr.* **2005**, *38* (6), 900–905. <https://doi.org/10.1107/S002188980502649X>.
- (87) Gerard, C. J. J.; Ferry, G.; Vuillard, L. M.; Boutin, J. A.; Chavas, L. M. G.; Huet, T.; Ferte, N.; Grossier, R.; Candoni, N.; Veessler, S. Crystallization via Tubing Microfluidics Permits Both in Situ and Ex Situ X-Ray Diffraction. *Acta Crystallogr. Sect. F* **2017**, *73* (10), 574–578. <https://doi.org/10.1107/S2053230X17013826>.
- (88) Chrimes, A. F.; Khoshmanesh, K.; Stoddart, P. R.; Mitchell, A.; Kalantar-zadeh, K. Microfluidics and Raman Microscopy: Current Applications and Future Challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (13), 5880–5906. <https://doi.org/10.1039/C3CS35515B>.
- (89) Chen, L.; Choo, J. Recent Advances in Surface-Enhanced Raman Scattering Detection Technology for Microfluidic Chips. *ELECTROPHORESIS* **2008**, *29* (9), 1815–1828. <https://doi.org/10.1002/elps.200700554>.
- (90) Ashok, P. C.; Singh, G. P.; Rendall, H. A.; Krauss, T. F.; Dholakia, K. Waveguide Confined Raman Spectroscopy for Microfluidic Interrogation. *Lab Chip* **2011**, *11* (7), 1262–1270. <https://doi.org/10.1039/C0LC00462F>.
- (91) Luo, C.; Yang, X.; Fu, Q.; Sun, M.; Ouyang, Q.; Chen, Y.; Ji, H. Picoliter-Volume Aqueous Droplets in Oil: Electrochemical Detection and Yeast Cell Electroporation. *Electrophoresis* **2006**, *27* (10), 1977–1983. <https://doi.org/10.1002/elps.200500665>.
- (92) Han, Z.; Li, W.; Huang, Y.; Zheng, B. Measuring Rapid Enzymatic Kinetics by Electrochemical Method in Droplet-Based Microfluidic Devices with Pneumatic Valves. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (14), 5840–5845. <https://doi.org/10.1021/ac900811y>.
- (93) Cristobal, G.; Arbouet, L.; Sarrazin, F.; Talaga, D.; Bruneel, J.-L.; Joanicot, M.; Servant, L. On-Line Laser Raman Spectroscopic Probing of Droplets Engineered in Microfluidic Devices. *Lab. Chip* **2006**, *6* (9), 1140–1146. <https://doi.org/10.1039/b602702d>.
- (94) Stehle, R.; Goerigk, G.; Wallacher, D.; Ballauff, M.; Seiffert, S. Small-Angle X-Ray Scattering in Droplet-Based Microfluidics. *Lab. Chip* **2013**, *13* (8), 1529–1537. <https://doi.org/10.1039/C3LC41291A>.
- (95) Pham, N. V.; Radajewski, D.; Round, A. R.; Brennich, M.; Pernot, P.; Biscans, B.; Bonnete, F.; Teychene, S. Coupling High Throughput Microfluidics and Small-Angle X-Ray

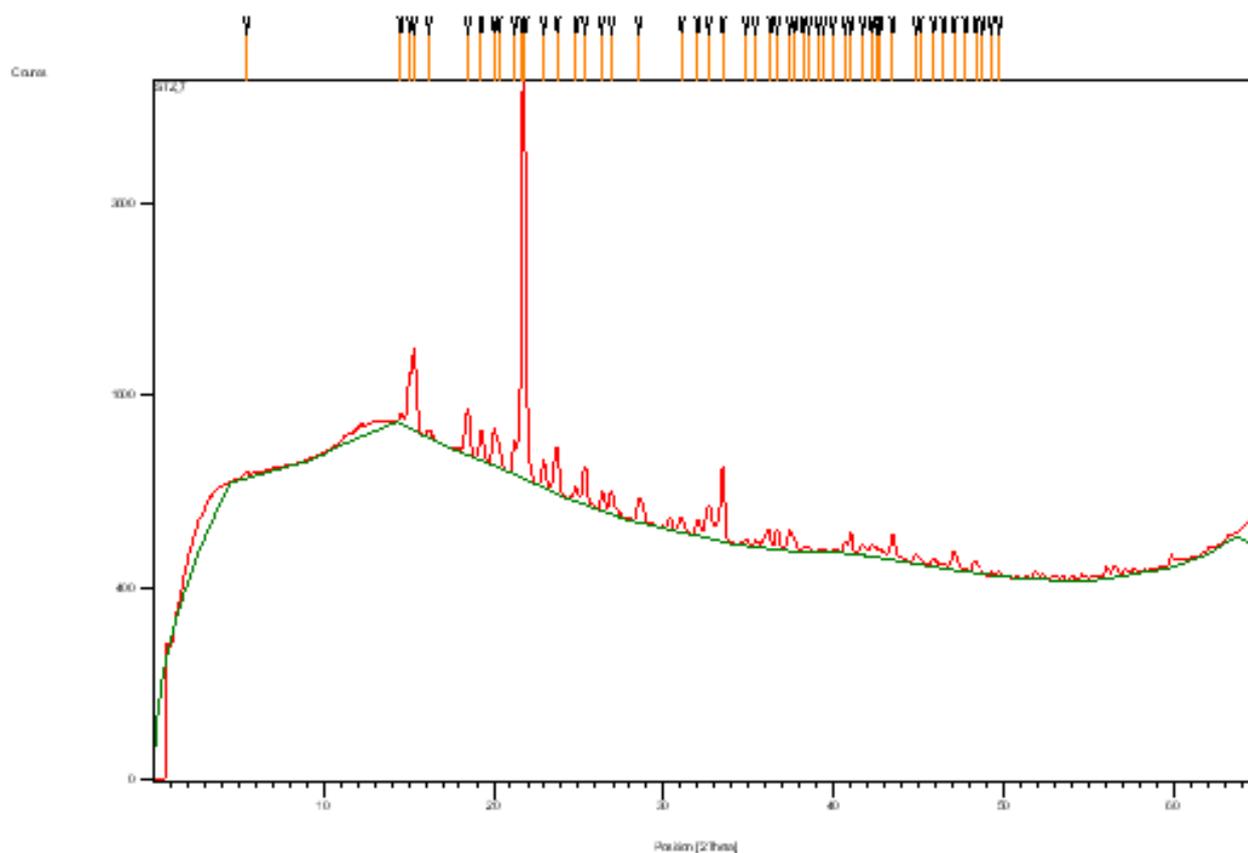
- Scattering to Study Protein Crystallization from Solution. *Anal. Chem.* **2017**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03492>.
- (96) Gerard, C. J. J. Plateforme Microfluidique Pour l'optimisation Des Conditions de Cristallisation Des Protéines, Aix-Marseille université, 2017.
- (97) Microsysteme, C. G. A. und. 3/2-Way Solenoid Valve (3 bar max.) <https://www.cetoni.com/products/32-way-solenoid-valve-3-bar-max/> (accessed Apr 8, 2019).
- (98) Bustamante, P.; Romero, S.; Peña, A.; Escalera, B.; Reillo, A. Enthalpy–Entropy Compensation for the Solubility of Drugs in Solvent Mixtures: Paracetamol, Acetanilide, and Nalidixic Acid in Dioxane–Water. *J. Pharm. Sci.* **87** (12), 1590–1596. <https://doi.org/10.1021/js980149x>.
- (99) Granberg, R. A.; Rasmuson, Å. C. Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *J. Chem. Eng. Data* **1999**, *44* (6), 1391–1395. <https://doi.org/10.1021/je990124v>.
- (100) Hojjati, H.; Rohani, S. Measurement and Prediction of Solubility of Paracetamol in Water–Isopropanol Solution. Part 1. Measurement and Data Analysis. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10* (6), 1101–1109. <https://doi.org/10.1021/op060073o>.
- (101) Bustamante, P.; Romero, S.; Reillo, A. Thermodynamics of Paracetamol in Amphiprotic and Amphiprotic–Aprotic Solvent Mixtures. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1** (11), 505–507. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb00366.x>.
- (102) Jouyban, A.; Chan, H.-K.; Chew, N. Y. K.; Khoubnasabjafari, M.; Acree, W. E. Solubility Prediction of Paracetamol in Binary and Ternary Solvent Mixtures Using Jouyban–Acree Model. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2006**, *54* (4), 428–431.
- (103) Nagai, T.; Prakongpan, S. Solubility of Acetaminophen in Cosolvents. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32* (1), 340–343. <https://doi.org/10.1248/cpb.32.340>.
- (104) Jiménez, J. A.; Martínez, F. Thermodynamic Study of the Solubility of Acetaminophen in Propylene Glycol + Water Cosolvent Mixtures. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17* (1), 125–134. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100018>.
- (105) Detoisien, T.; Forite, M.; Taulelle, P.; Teston, J.; Colson, D.; Klein, J. P.; Veessler, S. A Rapid Method for Screening Crystallization Conditions and Phases of an Active Pharmaceutical Ingredient. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (6), 1338–1342. <https://doi.org/10.1021/op9001593>.
- (106) Peybernès, G.; Grossier, R.; Villard, F.; Letellier, P.; Lagaize, M.; Candoni, N.; Veessler, S. Microfluidics Setup Rapidly Measures Solubility Directly from Powder. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22* (12), 1856–1860. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00300>.
- (107) Hu, Y.; Erxleben, A.; Ryder, A. G.; McArdle, P. Quantitative Analysis of Sulfathiazole Polymorphs in Ternary Mixtures by Attenuated Total Reflectance Infrared, near-Infrared and Raman Spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (3), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.05.002>.
- (108) Anderson, J. E.; Moore, S.; Tarczynski, F.; Walker, D. Determination of the Onset of Crystallization of N1-2-(Thiazolyl)Sulfanilamide (Sulfathiazole) by UV-Vis and Calorimetry Using an Automated Reaction Platform; Subsequent Characterization of Polymorphic Forms Using Dispersive Raman Spectroscopy. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2001**, *57* (9), 1793–1808. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(01\)00407-3](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(01)00407-3).
- (109) Gu, C.-H.; Young, V.; Grant, D. J. W. Polymorph Screening: Influence of Solvents on the Rate of Solvent-Mediated Polymorphic Transformation. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (11), 1878–1890. <https://doi.org/10.1002/jps.1137>.

(110) Bowmaker, G. A. Solvent-Assisted Mechanochemistry. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **2013**, 49 (4), 334–348. <https://doi.org/10.1039/c2cc35694e>.

Annexes

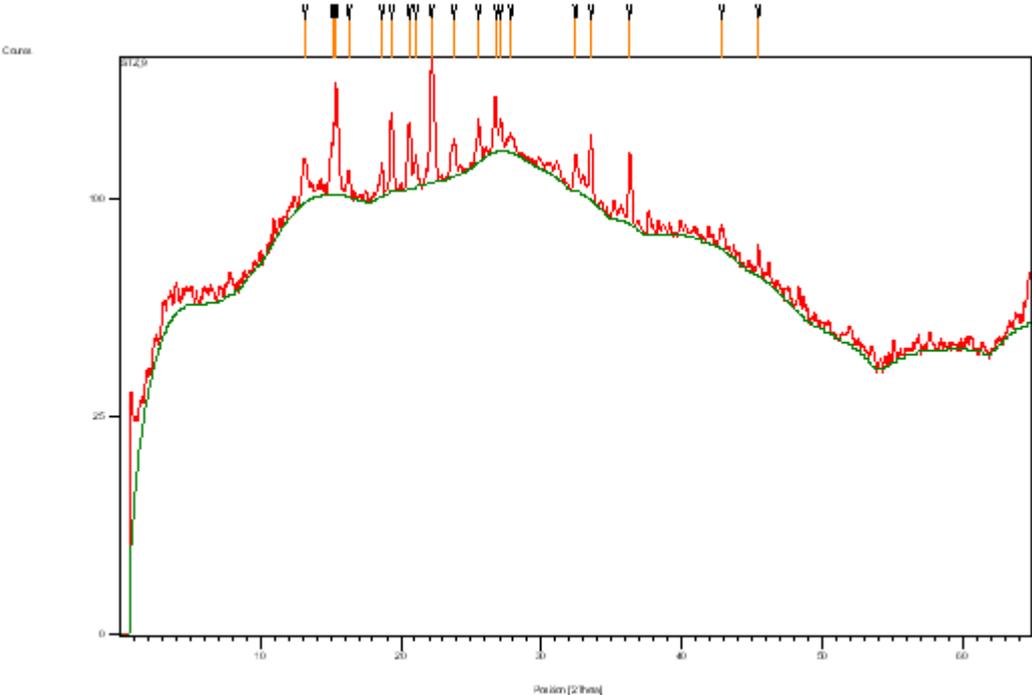
Annexe1 : Diffractogramme et liste des d_{hkl} obtenus sur des cristaux de sulfathiazole et comparaison avec ceux de la Cambridge Structurale Database

Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe III d'après la spectroscopie Raman et suthaz02 :



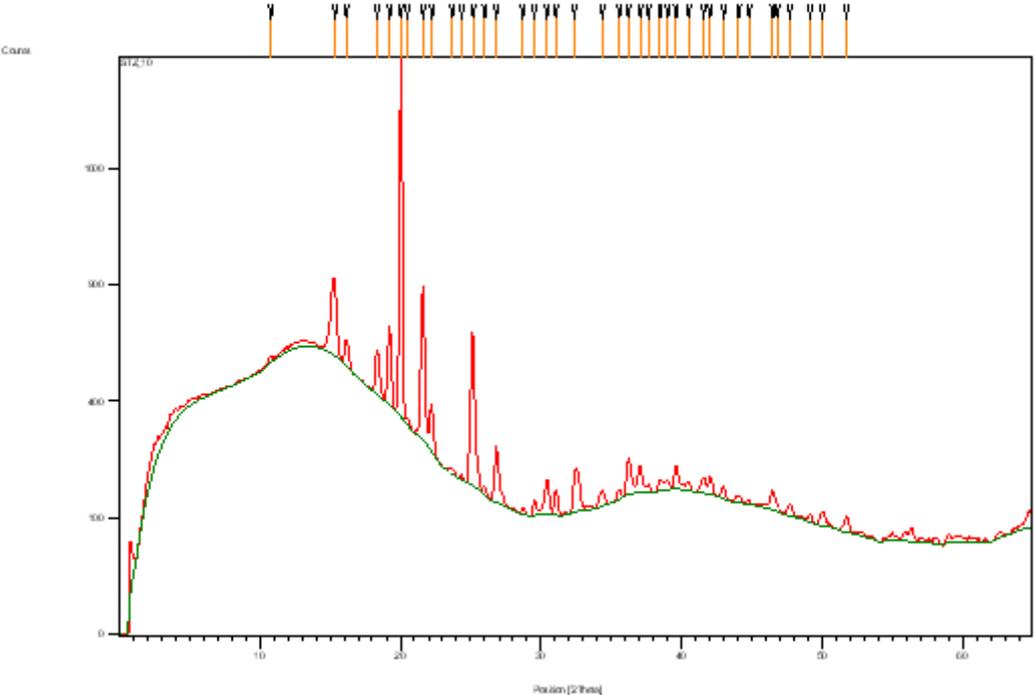
Pos.[°2Th.]	d-spacing[Å]	d-spacing (suthaz02)[Å]
5,486	16,10944	16.1816
14,5612	6,08336	8.09082
15,092	5,87058	7.77822
15,3196	5,78388	7.57619
16,2042	5,47005	7.3605
18,4963	4,79706	7.26974
19,2807	4,60362	7.17583
20,0304	4,43297	6.85587
20,2861	4,37767	6.24605
21,2342	4,1843	6.08315
21,6796	4,09933	5.88448
21,8481	4,06811	5.77833
22,9388	3,87709	5.76087
23,7236	3,75058	5.50288
24,8494	3,58314	5.45059
25,3769	3,50985	5.39388
26,3679	3,38015	5.35455
26,9222	3,3118	4.97243
28,5247	3,12928	4.83574
31,0449	2,88076	4.79172
32,0181	2,79538	4.59981
32,6408	2,74347	4.56558
33,4747	2,67701	4.55877
34,8461	2,57473	4.42583
35,3781	2,53722	4.36673
36,313	2,47402	4.31602
36,6693	2,45079	4.287
37,4228	2,40316	4.17761
37,7301	2,38429	4.14404
38,2061	2,35567	4.10766
38,5421	2,33591	4.09168
39,1021	2,30373	4.04541
39,4101	2,28644	4.0333
39,9421	2,2572	4.02518
40,6421	2,21993	3.98741
41,0214	2,20027	3.88911
41,7061	2,16572	3.88833
42,2381	2,13967	3.87955
42,5181	2,12622	3.85513
42,7421	2,1156	3.83956
43,4808	2,08135	3.8326
44,8421	2,02128	3.7881
45,0661	2,01175	3.75451
45,8781	1,97802	3.74809
46,4661	1,95435	3.73225
47,0606	1,93104	3.68025
47,7541	1,9046	3.67797
48,3461	1,88266	3.65862
48,7341	1,86857	3.63487
49,2661	1,84963	3.58791
49,7421	1,83304	3.57737
		3.54178
		3.50815
		3.50622
		3.49894
		3.45914
		3.44292
		3.42793
		3.42209
		3.38011
		3.36963
		3.3561

Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe IV d'après la spectroscopie Raman et suthaz04 :



Pos.[°2Th.]	d-spacing[Å]	d-spacing (suthaz04) [Å]			
13,1855	6,71479	8.01155	2.7002	2.15687	1.90832
15,148	5,849	7.7546	2.68321	2.15417	1.90741
15,4214	5,7459	6.84713	2.67313	2.14792	1.90668
16,2861	5,44275	6.71476	2.67052	2.14704	1.90008
18,6489	4,75814	5.84387	2.66973	2.14011	1.89058
19,3329	4,5913	5.74187	2.65257	2.13575	1.88461
20,6189	4,30777	5.72495	2.61424	2.12153	1.87823
21,0599	4,21854	5.43061	2.58774	2.11892	1.8743
22,1704	4,00969	4.75582	2.58487	2.11156	1.87231
23,7631	3,74443	4.58301	2.56703	2.10749	1.87072
25,5372	3,48818	4.40054	2.54966	2.10525	1.86857
26,8376	3,32204	4.31373	2.54888	2.09954	1.86378
27,1044	3,28994	4.29584	2.54645	2.09901	1.86242
27,8237	3,20651	4.2715	2.54113	2.09562	1.86194
32,4647	2,75795	4.21497	2.52197	2.08959	1.86158
33,5395	2,67198	4.00578	2.5121	2.08229	1.8506
36,2908	2,47548	4.00208	2.50737	2.07143	1.84544
42,8441	2,1108	3.97513	2.49882	2.07048	1.84535
45,4861	1,99415	3.8773	2.49599	2.06368	1.84183
		3.76923	2.49025	2.05908	1.83952
		3.74144	2.48494	2.05899	1.83207
		3.63811	2.4742	2.0263	1.82596
		3.62686	2.4741	2.01882	
		3.56459	2.47081	2.01824	
		3.53068	2.46362	2.01273	
		3.4848	2.45844	2.00289	
		3.48469	2.45513	2.00104	
		3.42357	2.42292	1.99645	
		3.42002	2.39833	1.9946	
		3.35738	2.38605	1.99308	
		3.34723	2.37791	1.98892	
		3.33342	2.33616	1.98757	
		3.2897	2.33099	1.97667	
		3.28362	2.32096	1.9741	
		3.24708	2.30985	1.97193	
		3.23943	2.29515	1.96514	
		3.22667	2.29151	1.96451	
		3.20432	2.28238	1.96393	
		3.17505	2.2644	1.96327	
		2.97336	2.25895	1.96223	
		2.92194	2.25563	1.95595	
		2.91907	2.24242	1.95435	
		2.89389	2.23825	1.95001	
		2.87094	2.23514	1.94796	
		2.86247	2.2261	1.94449	
		2.84605	2.22487	1.94115	
		2.84377	2.21189	1.93865	
		2.76967	2.21147	1.93625	
		2.76348	2.20507	1.92924	
		2.76183	2.20465	1.91834	
		2.75456	2.20027	1.91494	
		2.73681	2.18838	1.91454	
		2.7153	2.18089	1.91396	
		2.71417	2.17347	1.90984	

Comparaison des d_{hkl} entre cristal du polymorphe II d'après la spectroscopie Raman et suthaz :



Pos.[°2Th.]	d-spacing[Å]	d-spacing (suthaz)[Å]			
10,7836	8,20447	8.21811	2.72619	2.18111	1.91032
15,3538	5,77107	7.76305	2.69963	2.17912	1.90621
16,152	5,48764	7.48948	2.69268	2.17354	1.9058
18,3536	4,83401	5.92494	2.6754	2.16755	1.90388
19,2242	4,61702	5.83278	2.67346	2.16343	1.90341
20,023	4,4346	5.74743	2.66249	2.15025	1.90128
20,4931	4,33392	5.62268	2.64375	2.14695	1.89628
21,6016	4,11396	5.47121	2.63676	2.1375	1.89586
22,2401	3,99728	5.45239	2.62378	2.12907	1.89325
23,6741	3,7583	4.81835	2.60874	2.11753	1.89262
24,3741	3,65193	4.60844	2.60549	2.10944	1.89044
25,1895	3,53554	4.42744	2.5987	2.10872	1.88902
25,9981	3,42737	4.275	2.58768	2.10654	1.88564
26,8365	3,32218	4.12162	2.56067	2.10493	1.87563
28,7141	3,10907	4.10906	2.54743	2.09969	1.87423
29,5302	3,02498	3.99008	2.53288	2.09571	1.87237
30,4054	2,93988	3.88152	2.52763	2.06867	1.87004
31,0381	2,88138	3.8116	2.52137	2.06598	1.8659
32,3892	2,7642	3.79255	2.51966	2.06574	1.86233
34,3813	2,60846	3.74474	2.51476	2.06081	1.85624
35,5741	2,52369	3.7318	2.51238	2.06022	1.85479
36,1868	2,48235	3.70958	2.49649	2.0558	1.85178
37,0544	2,4262	3.70355	2.47673	2.05489	1.85135
37,6461	2,38942	3.6594	2.45012	2.05453	1.84653
38,4861	2,33918	3.65033	2.43818	2.04646	1.83792
39,0181	2,3085	3.59985	2.42856	2.04624	1.83778
39,5986	2,27599	3.55647	2.42416	2.03832	1.8297
40,5021	2,22728	3.53923	2.41257	2.03148	1.8264
41,5381	2,17409	3.53436	2.40949	2.01836	1.82586
42,0421	2,14919	3.44805	2.40918	2.01355	1.82516
43,0176	2,10268	3.42607	2.38879	2.00698	1.82374
44,0581	2,05541	3.42021	2.36857	1.99766	1.82299
44,7861	2,02368	3.36862	2.36845	1.99712	
46,4936	1,95326	3.31777	2.34184	1.99504	
46,8021	1,9411	3.29596	2.33223	1.99095	
47,6981	1,90671	3.27013	2.32821	1.97563	
49,1261	1,85458	3.18025	2.31467	1.97498	
50,0051	1,82402	3.10311	2.30883	1.97357	
51,7324	1,76564	3.09758	2.30647	1.97061	
		3.0169	2.30422	1.9688	
		2.96247	2.30329	1.9659	
		2.93502	2.29952	1.96437	
		2.9328	2.29725	1.95543	
		2.91869	2.27447	1.95318	
		2.91639	2.26501	1.94797	
		2.88556	2.26377	1.94426	
		2.87371	2.25574	1.94076	
		2.81134	2.24421	1.94002	
		2.8041	2.23449	1.93975	
		2.80316	2.22899	1.93749	
		2.76023	2.21977	1.93547	
		2.75361	2.21372	1.93166	
		2.73937	2.19465	1.91645	
		2.7356	2.19102	1.91581	

Annexe 2: Article « Microfluidics Setup Rapidly Measures Solubility Directly from Powder »

Microfluidics Setup Rapidly Measures Solubility Directly from Powder

Guillem Peybernès,^{†,‡} Romain Grossier,[†] Frédéric Villard,[‡] Philippe Letellier,[‡] Mehdi Lagaize,[†] Nadine Candoni,[†] and Stéphane Veesler^{*,†,‡}

[†]CNRS, Aix-Marseille University, CINaM (Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille), Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Cedex 09 Marseille, France

[‡]Technologie Servier, 27 Rue Eugène Vignat, 45000 Orléans, France

Supporting Information

ABSTRACT: This communication presents a new microfluidics device for solubility measurement based on the generation of saturated solutions starting from powder that is compatible with all solvents and molecules. This device is simple and easily incorporated into any laboratory, even those not specialized in microfluidics. We describe the method used to measure solubility, applied here to the pharmaceutical molecules paracetamol and gliclazide in different solvents. The device rapidly measures the solubility of a compound at a variety of temperatures ranging from 20 to 60 °C using extremely small quantities (here, only 30 mg) of material, with a concentration range from mg/mL to hundreds of mg/mL.

KEYWORDS: solubility, crystallization, microfluidics, pharmaceutical molecules

INTRODUCTION

Crystallization has a wide range of industrial and academic applications. Control of the end crystals and their properties usually strongly depends on the starting position in the phase diagram and the chemical composition. This requires a thorough understanding of the phase diagram. Thus, measuring solubility curves is a crucial step in crystallization studies and process development. Different methods are used to measure solubility, all based on the principle of measuring the concentration of a saturated solution. For instance, attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR)^{1,2} and Raman³ spectroscopies were reported for in situ solubility measurements. Small-scale (mL range) dedicated setups using turbidimetry^{4,5} and optical microscopy⁶ were also developed. However, sometimes only an extremely small quantity of material is available, which poses the problem of further reducing material consumption. Thus, there is a need for a setup and a methodology to obtain reliable solubility data using extremely small volumes (μL range) and different solvents. The microfluidics systems increasingly used over the past decade⁷ could be the answer, as they can manipulate fluids on the submillimeter scale.^{8,9} Here we propose a simple and versatile microfluidics-based tool for solubility measurements. Suitable for different conditions, chemical media, and temperatures, our device is based on the generation of saturated solutions starting directly from powder, and it is compatible

with most solvents and molecules. The device measures solubility with extremely small quantities and is easily incorporated into any laboratory, even those not specialized in microfluidics. In this communication, we describe our setup and how it is used to measure solubility. Here it is applied to the pharmaceutical molecules paracetamol and gliclazide in both aqueous and organic solvents. The device allows us to measure the entire solubility curve of a compound at a variety of temperatures ranging from 20 to 60 °C using an extremely small quantity of material (here, only 30 mg) in just 4 h.

EXPERIMENTAL SECTION

Testing Molecules. Paracetamol (4-acetamidophenol), stable form I, was purchased from Alfa Aesar (A11240, batch 10162567). Gliclazide ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, 1-(*cis*-3-azabicyclo-[3.3.0]oct-3-yl)-3-*p*-tolylsulfonylurea), which is used in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus, was furnished by Technologie Servier (TES). Solvents were analytical grade.

Microfluidics Setup. The principle of our microfluidics solubility measurement setup is that the solvent flows through a powder bed blocked by a filter. At the outlet of the filter, as a result of dissolution of the molecule, the solution concentration is at saturation. This saturated solution is then analyzed online using a UV–vis spectrometer. From the absorbance measured with this device, the equilibrium concentration is deduced from the Beer–Lambert law. It is then possible to measure the solubility at a variety of temperatures by controlling the powder bed temperature at the filter outlet.

All of the setups presented in this paper are polyether ether ketone (PEEK) devices based on HPLC techniques (IDEX Health and Science). T-junctions, precolumn filters, and perfluoroalkoxy alkane (PFA) tubing, which are resistant to many solvents, render the device applicable to mineral, organic, and biological materials. The solutions are loaded using separate syringes, and a programmable syringe pump (neMESYS, CETONI GmbH) controls the flow rates of the different fluids.

Proof of Concept of Reaching Saturated Solution from Powder. We first constructed a microfluidics system based on dissolving 30 mg of a powder placed in a 1 mm inner

Received: September 14, 2018

Published: November 21, 2018



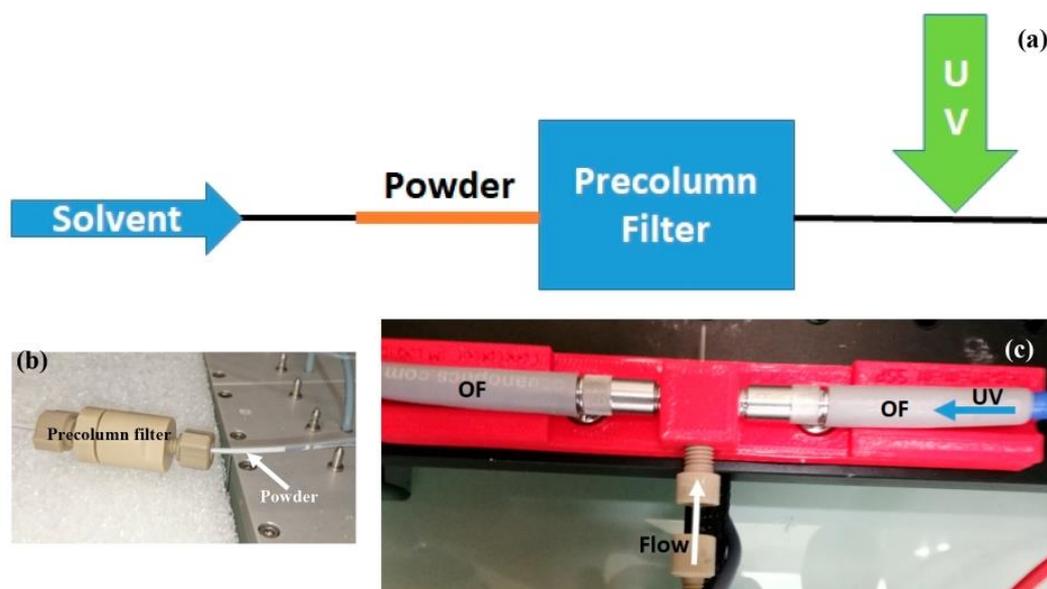


Figure 1. (a) Scheme of the dissolution setup. (b) Powder placed in a 1 mm i.d. tube connected to a precolumn filter. (c) UV cell with optical fiber (OF) from the light source (UV) at the right to the UV spectrophotometer at the left.

diameter (i.d.) tube connected to a 0.5 μm precolumn filter (IDEX Health and Science) (Figure 1a–b). The syringes, powder, and precolumn filter were placed in an incubator (Figure S1), allowing temperature control from room temperature to 65 $^{\circ}\text{C}$ ¹⁰ (ANACRISMAT). The solute concentration in the outlet flow was measured using a real-time online UV–vis absorbance spectroscopy method as described previously.¹¹ We coupled an online UV detector (USB2000+, Ocean Optics) to the PFA tubing after the T-junction using a homemade 3D-printed UV cell adapted for this purpose from Zhang et al.¹¹ (Figure 1c). Selecting one wavelength from the UV–vis absorption spectra of gliclazide in isopropanol (Figure S2), we measured the time evolution of the absorbance (here at 274 nm) (Figure 2). Raising the temperature from 25 to

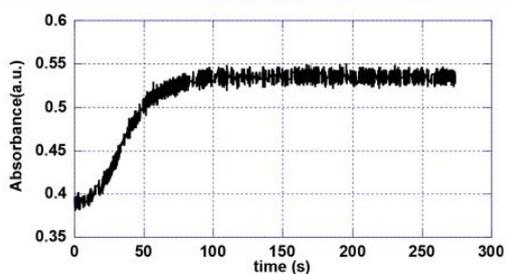


Figure 2. Absorbance (at 274 nm) of gliclazide in isopropanol at the outlet of the precolumn filter as the temperature was changed from 25 to 34.7 $^{\circ}\text{C}$.

34.7 $^{\circ}\text{C}$, we observed an absorbance plateau after less than 2 min, corresponding to the equilibrium concentration of gliclazide in isopropanol at 34.7 $^{\circ}\text{C}$. This simple setup and experiment consumed only 30 mg of powder. One limitation is that calculating the concentration from absorbance measurements requires that the absorbance be calibrated, necessitating

additional material. Applying the Beer–Lambert law also limits the concentration range that can be addressed (Figure S3).

Overcoming Limitations. To overcome this concentration limitation, we added to the first setup a dilution step using a microfluidics T-junction and a second precolumn filter (Figure 3). The T-junction was used to inject the same solvent at the filter outlet in order to be in the linear domain of the absorbance as a function of concentration. The second precolumn filter was filled with crushed glass and added downstream to ensure rapid mixing of solutions. The two columns and the T-junction were placed in a temperature-controlled incubator (from room temperature to 50 $^{\circ}\text{C}$).

In addition, the calibration step was replaced by a new procedure involving only measurement of the absorbance of a 1 mg/mL standard solution. This low concentration guaranteed that we were in the linear part of the absorbance curve.

It should be noted that using a 2 mL standard solution that consumes only 2 mg of powder enables us to estimate the solubility via bracketing at room temperature (see Figure S4 for a flowchart of the solubility estimation via successive addition of solvent during the preparation of the standard solution).

Solubility Measurement Using the Setup. The experimental protocol consists of first measuring the intensities of the UV light transmitted by the pure solvent solution (I_0) and by the standard solution (I_{standard}) as a reference. Second, the solvent is injected at a given flow rate (Q_m) to dissolve the powder placed in the tube, and the transmitted intensity is measured and compared with that of the standard solution. Third, this solution is diluted by a stepwise increase in the flow rate of the solvent (Q_d) at the filter outlet until the transmitted intensities of the diluted and standard solutions match (Figure 4a; for an application, see Figure 4b). When the transmitted intensities of the diluted and standard solutions match, the solubility (C_s) is given by

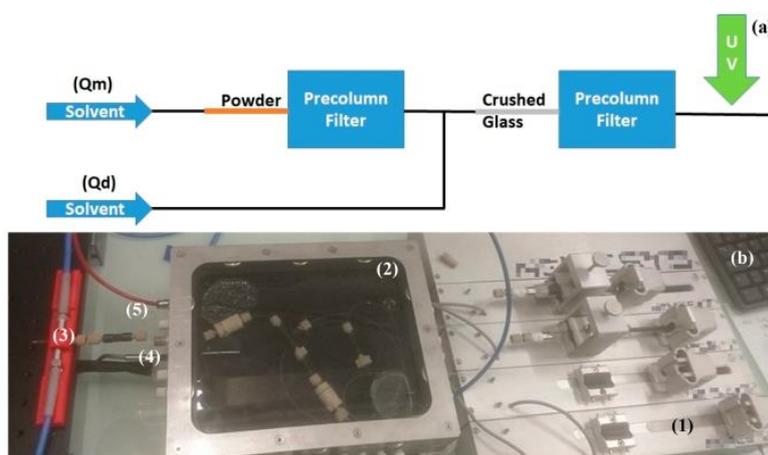


Figure 3. (a) Scheme and (b) photograph of the homemade microfluidics setup: (1) syringe pump, (2) temperature-controlled incubator, (3) UV cell, (4) temperature probe, and (5) outside loop ensuring solution thermal equilibrium at room temperature.

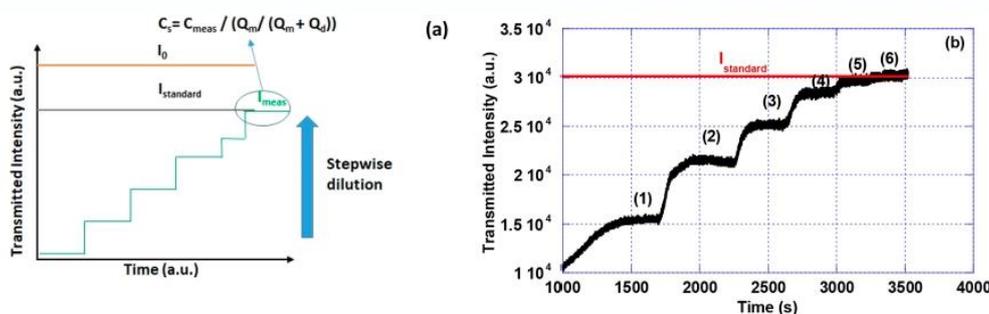


Figure 4. (a) Principle of the stepwise dilution for solubility measurement. (b) Evolution of the transmitted intensity at 274 nm as a function of time with increasing dilution ratio, with $I_0 = 40268$, $I_{\text{standard}} = 30165$, and $I_{\text{meas}} = 30200$ (in a.u.). Plateau (1) corresponds to $Q_m = 1000 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 1000 \mu\text{L/h}$, (2) to $Q_m = 500 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 1000 \mu\text{L/h}$, (3) to $Q_m = 500 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 1500 \mu\text{L/h}$, (4) to $Q_m = 500 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 2000 \mu\text{L/h}$, (5) to $Q_m = 500 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 2250 \mu\text{L/h}$, and (6) to $Q_m = 500 \mu\text{L/h}$ and $Q_d = 2350 \mu\text{L/h}$.

$$C_s = C_{\text{standard}} / [Q_m / (Q_m + Q_d)] \quad (1)$$

where C_{standard} is the concentration of the standard solution. The dilution is defined by the ratio $Q_m / (Q_m + Q_d)$ in eq 1, with Q_m and Q_d as variables. In practice, it is impossible to have an exact match between the transmitted intensities of diluted and standard solutions; thus, to be rigorous, a correction needs to be made using the absorbances according to eq 2 (here we suppose that the Beer–Lambert law applies):

$$C_{\text{meas}} / A_{\text{meas}} = C_{\text{standard}} / A_{\text{standard}} \quad (2)$$

where $A_{\text{standard}} = -\log(I_{\text{standard}}/I_0)$ and $A_{\text{meas}} = -\log(I_{\text{meas}}/I_0)$ represent the absorbances of the standard solution and experimental measurement, respectively (Figure 4). Then C_s is given by eq 3:

$$C_s = C_{\text{meas}} / [Q_m / (Q_m + Q_d)] \quad (3)$$

This operation is repeated for all temperatures and thus provides the solubility at a variety of temperatures in a given solvent. By this method it is also possible, when the powder is not completely dissolved, to change the solvent by replacing syringes with others containing a new solvent. It takes only 4 h and approximately 30 mg of powder to obtain one solubility curve for a solvent at six different temperatures ranging from 20 to 60 °C.

It should be noted that adding the dilution step prevents the solution from unwanted nucleation events during the measurement.

SOLUBILITY CURVES

Solubility measurements of our model compound paracetamol in three solvents (water, acetonitrile, and isopropanol) were performed to demonstrate the reliability of the setup. In Figure 5a–c, our data (data available on request) are compared to findings^{12–18} obtained by various techniques: equilibration of a paracetamol suspension at different temperatures and titration of the supernatant by weighing the dry residue,^{12,15,18} UV spectrophotometry,^{13,14,17} and refractive indexes.¹⁶ Our solubility data compare well with data from the literature for paracetamol. Moreover, the solubility range accessible is from mg/mL to hundreds of mg/mL.

We also performed solubility measurements for gliclazide from TES, who provided the solubility in acetonitrile at 25 °C. Here, to compare two methods of solubility measurement, we first used the methodology developed by Detoisien et al.⁶ with a multiwell setup. This required the consumption of >250 mg of material for one solvent at three different temperatures and took 2 days. Then we performed two sets of experiments using our new microfluidics setup and the methodology described above. Figure 5d compares the different setups and method-

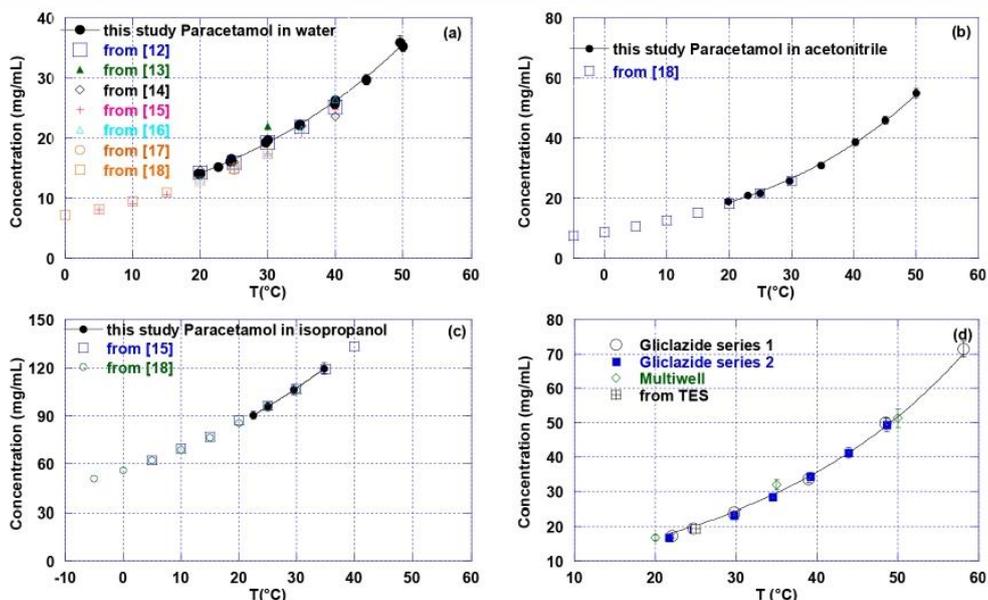


Figure 5. Solubilities of (a–c) paracetamol in (a) water, (b) acetonitrile, and (c) isopropanol and (d) gliclazide in acetonitrile. The curves are exponential fits to our measurements. The error was estimated as 3% (taking into account powder weighing, UV dosing, and syringe pump flow rates).

ologies. The data are consistent between methods with very good reproducibility. However, our new setup consumed only 30 mg of material for one solvent at seven temperatures and took only 4 h.

CONCLUSION

This communication presents a new microfluidics device for solubility measurements based on the generation of saturated solutions starting from powder that is compatible with all solvents and molecules. This device is simple and easily incorporated into any laboratory, even those not specialized in microfluidics. We have described the method used to measure solubility, applied here to the pharmaceutical molecules paracetamol and gliclazide in different solvents. The device rapidly measures the solubility of a compound at a variety of temperatures ranging from 20 to 60 °C using extremely small quantities of material (here, only 30 mg), with a concentration range from mg/mL to hundreds of mg/mL.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00300.

Photograph of the temperature-controlled incubator, UV–vis absorption spectrum and absorbance–concentration curve for gliclazide in isopropanol, and flowchart for solubility estimation (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: veesler@cinam.univ-mrs.fr.

ORCID

Stéphane Veesler: 0000-0001-8362-2531

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Technologie Servier for financial support. We are grateful to T. Bactivelane (CINaM) and M. Audiffren (ANACRISMAT) for technical assistance. We thank Marjorie Sweetko for English revision.

REFERENCES

- Dunuwila, D. D.; Berglund, K. A. ATR FTIR spectroscopy for in situ measurement of supersaturation. *J. Cryst. Growth* **1997**, *179* (1–2), 185–193.
- Lewiner, F.; Klein, J. P.; Puel, F.; Févotte, G. On-line ATR FTIR measurement of supersaturation during solution crystallization processes. Calibration and applications on three solute/solvent systems. *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 2069–2084.
- Schwartz, A. M.; Berglund, K. A. The use of Raman spectroscopy for in situ monitoring of lysozyme concentration during crystallization in a hanging drop. *J. Cryst. Growth* **1999**, *203*, 599–603.
- Yi, Y.; Hatzivramidis, D.; Myerson, A. S.; Waldo, M.; Beylin, V. G.; Mustakis, J. Development of a Small-Scale Automated Solubility Measurement Apparatus. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44* (15), 5427–5433.
- Jiang, S.; Ter Horst, J. H. Crystal Nucleation Rates from Probability Distributions of Induction Times. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11* (1), 256–261.
- Detoisien, T.; Forite, M.; Taulelle, P.; Teston, J.; Colson, D.; Klein, J. P.; Veesler, S. A Rapid Method for Screening Crystallization Conditions and Phases of an Active Pharmaceutical Ingredient. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (6), 1338–1342.
- Leng, J.; Salmon, J. B. Microfluidic crystallization. *Lab Chip* **2009**, *9*, 24–34.
- Squires, T. M.; Quake, S. R. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77* (3), 977.
- Lorber, N.; Sarrazin, F.; Guillot, P.; Panizza, P.; Colin, A.; Pavageau, B.; Hany, C.; Maestro, P.; Marre, S.; Delclos, T.; Aymonier, C.; Subra, P.; Prat, L.; Gourdon, C.; Mignard, E. Some recent

advances in the design and the use of miniaturized droplet-based continuous process: Applications in chemistry and high-pressure microflows. *Lab Chip* **2011**, *11*, 779–787.

(10) Zhang, S.; Ferte, N.; Candoni, N.; Veessler, S. Versatile Microfluidic Approach to Crystallization. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 1837–1841.

(11) Zhang, S.; Gerard, C. J. J.; Ikni, A.; Ferry, G.; Vuillard, L. M.; Boutin, J. A.; Ferte, N.; Grossier, R.; Candoni, N.; Veessler, S. Microfluidic platform for optimization of crystallization conditions. *J. Cryst. Growth* **2017**, *472*, 18–28.

(12) Bustamante, P.; Romero, S.; Peña, A.; Escalera, B.; Reillo, A. Enthalpy–entropy compensation for the solubility of drugs in solvent mixtures: Paracetamol, acetanilide, and nalidixic acid in dioxane–water. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87* (12), 1590–1596.

(13) Nagai, T.; Prakongpan, S. Solubility of Acetaminophen in Cosolvents. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32* (1), 340–343.

(14) Bustamante, P.; Romero, S.; Reillo, A. Thermodynamics of Paracetamol in Amphiprotic and Amphiprotic–Aprotic Solvent Mixtures. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1995**, *1*, 505–507.

(15) Hojjati, H.; Rohani, S. Measurement and Prediction of Solubility of Paracetamol in Water–Isopropanol Solution. Part 1. Measurement and Data Analysis. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10* (6), 1101–1109.

(16) Jiménez, J. A.; Martínez, F. Thermodynamic Study of the Solubility of Acetaminophen in Propylene Glycol + Water Cosolvent Mixtures. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 125–134.

(17) Jouyban, A.; Chan, H.-K.; Chew, N. Y. K.; Khoubnasabjafari, M.; Acree, W. E., Jr. Solubility Prediction of Paracetamol in Binary and Ternary Solvent Mixtures Using Jouyban–Acree Model. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54* (4), 428–431.

(18) Granberg, R. A.; Rasmuson, Å. C. Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *J. Chem. Eng. Data* **1999**, *44* (6), 1391–1395.

Résumé

L'étude de l'état solide d'un principe actif (PA) est une étape cruciale dans le développement d'un médicament. En fonction des conditions de cristallisation, une molécule peut apparaître sous différentes formes ou phases (polymorphes, solvates, sels, co-cristaux, amorphes) ayant chacune des propriétés physico-chimiques qui leur sont propres comme la solubilité, la morphologie, l'hygroscopicité et la stabilité. Le but est donc d'identifier la forme solide permettant d'obtenir les propriétés les plus adaptées et de déterminer ses conditions de cristallisation. Pour cela, un criblage complet est nécessaire. De plus, la nucléation étant un phénomène stochastique, un grand nombre d'expériences doivent être réalisées pour obtenir des données fiables, ce qui entraîne une consommation importante de matière première. Dans ce contexte, des techniques de criblage à haut débit ont été développées. Parmi celles-ci, la microfluidique à base de goutte permet la génération de centaines de gouttes monodispersées (isolées les unes des autres par de l'huile) pouvant être considérées comme des nano-cristalliseurs indépendants (volume de l'ordre de la centaine de nanolitres).

Cette thèse présente le développement d'une plateforme microfluidique pour l'étude de l'état solide de PA. Dans un premier temps, cette plateforme permet de partir directement de la poudre, de la dissoudre dans différents solvants, d'estimer ses solubilités en fonction de la température et de préparer des solutions sursaturées. Puis dans un deuxième temps, le PA est cristallisé dans des gouttes avec différentes conditions expérimentales : compositions chimiques, concentration et température. Enfin, les cristaux obtenus sont caractérisés in situ à l'aide d'un microscope Raman ou par Diffraction des Rayons X. Si nécessaire les cristaux peuvent être récupérés pour des analyses plus précises en ex-situ

Abstract

The solid state study of an Active Pharmaceutical Ingredient (API) is a critical step in the development of pharmaceuticals. Depending on the crystallization conditions, a molecule can appear in different forms or phases (polymorphs, solvates, salts, co-crystal, amorphous), each of them having significantly different physico-chemical properties such as solubility, crystal habit, hygroscopicity or stability. Then the purpose is to identify the solid form that provides the most appropriate properties and to determine its crystallization conditions. Therefore, a wide screening is necessary. Moreover, due to the stochasticity of the nucleation phenomenon, a large number of experiments is required in order to obtain reliable data which leads to significant consumption of raw material. In this context High Throughput Screening techniques have been developed. Among them, droplet-based microfluidics seems to be promising. Indeed, it allows the generation of hundreds of monodisperse droplets (isolated from each other by oil), each of them being considered as independent nano-crystallizer (volume of about one hundred nanoliter).

This thesis presents the development of a microfluidic platform for solid state study of API. First, this versatile platform allows to start directly from the powder, to dissolve it in different solvents, to estimate solubilities online and to prepare supersaturated solutions. Second, we recrystallize the API in the droplets for different experimental conditions: chemical composition, API concentration and temperature. Finally, the crystals obtained are characterized in situ by Raman microscopy and X-ray diffraction. If it is necessary, crystals can be collected for ex-situ X-ray Diffraction.