



HAL
open science

Procédé anti-solvant microfluidique pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes en conditions supercritiques

Thomas Jaouhari

► **To cite this version:**

Thomas Jaouhari. Procédé anti-solvant microfluidique pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes en conditions supercritiques. Matériaux. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0129 . tel-03996485

HAL Id: tel-03996485

<https://theses.hal.science/tel-03996485v1>

Submitted on 20 Feb 2023

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.

Thèse présentée
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale des sciences chimiques

Discipline : Physico-chimie de la matière condensée

Par **Thomas JAOUHARI**

**PROCÉDÉ ANTI-SOLVANT MICROFLUIDIQUE POUR LA
SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES ORGANIQUES
FLUORESCENTES EN CONDITIONS SUPERCRITIQUES**

Sous la direction de : Cyril AYMONIER, Arnaud ERRIGUIBLE et Samuel MARRE

Soutenue le 30 Mars 2021.

Président du jury :

M. MAGLIONE, Mario

Directeur de Recherche, CNRS-ICMCB, Univ. Bordeaux

Rapporteurs :

Mme BADENS, Elisabeth

Professeure, CNRS-M2P2, Univ. Aix-Marseille

M. PANSU, Robert

Directeur de Recherche, CNRS-PPSM, ENS Paris-Saclay

Examineurs :

M. AYMONIER, Cyril

Directeur de Recherche, CNRS-ICMCB, Univ. Bordeaux

M. ERRIGUIBLE, Arnaud

Maître de Conférences, CNRS-I2M/ICMCB, Univ. Bordeaux

Mme. FERY-FORGUES, Suzanne

Directrice de Recherche, CNRS-SPCMIB, Univ. Toulouse

M. MARRE, Samuel

Directeur de Recherche, CNRS-ICMCB, Univ. Bordeaux

Procédé anti-solvant microfluidique pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes en conditions supercritiques

Résumé :

Les nanoparticules organiques fluorescentes (FONs) sont aujourd'hui utilisées dans de nombreuses applications biomédicales d'imagerie cellulaire. Réduits à une échelle nanométrique, les FONs présentent un meilleur taux de dissolution dans le milieu biologique, ils peuvent notamment traverser plus facilement les membranes des tissus et être plus efficacement assimilés dans l'organisme. La plupart des molécules utilisées pour la fabrication des FONs sont très peu solubles dans les milieux aqueux, limitant ainsi leur biodisponibilité. Ainsi, une des stratégies considérées par les industries pharmaceutiques pour répondre à ces limitations consiste à diminuer la taille des particules d'ingrédients pharmaceutiques actifs (APIs). Dans cette thèse, nous proposons de combiner deux techniques d'intensification pour la synthèse des FONs, à savoir les procédés SAS (Supercritical Anti-Solvent) utilisant le dioxyde de carbone supercritique (sc-CO₂) et la technologie microfluidique (μ F). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons testé différentes molécules organiques fluorescentes qui ont été mises en forme à l'aide du procédé μ SAS. Des études paramétriques ont été réalisées dans le but de déterminer les conditions optimales pour la synthèse de nanoparticules. Enfin, des FONs dont l'intensité de fluorescence augmente à l'état agrégé (AIE) ont été choisies dans le but d'analyser *in situ* de manière originale les champs de nucléation de particules dans le système μ SAS, pour pouvoir comparer ces résultats à la simulation.

Mots clés :

Procédé anti-solvant ; Microfluidique ; Fluides supercritiques ; Nanoparticules organiques fluorescentes (FONs)

Process intensification for the synthesis of fluorescent organic nanoparticles by microfluidic supercritical anti-solvent

Abstract:

Nowadays, Fluorescent Organic Nanoparticles (FONs) are involved for cell imaging applications. After reducing the particle size to the nanosize range, FONs increase their dissolution rate in biological media. Thus, they present a high penetration in cell membranes and can be assimilated more efficiently. As is usual, poor water-soluble organic molecules encounter low oral bioavailability. To overcome the solubility problems, pharmaceutical companies develop approaches to decrease active pharmaceutical ingredient (API) particle size. During this thesis, we propose to combine two intensification strategies for FONs synthesis. First, we employ the Supercritical Anti-Solvent (SAS) process using supercritical carbon dioxide (sc-CO₂). The other point is that we add microfluidics (μ F). We suggest to test various organic molecules and to process them by μ SAS system. Parametric studies are performed to find optimal conditions for small particle size. Finally, specific FONs with Aggregation Induced Emission (AIE) effect are employed for the *in situ* characterization of nucleation field in μ SAS. Experimental and simulation results are both compared and discussed.

Key words:

Anti-solvent process; Microfluidics; Supercritical fluids; Fluorescent Organic Nanoparticles (FONs)

Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont eu l'amabilité d'examiner ma thèse ainsi que les nombreuses discussions scientifiques qui ont nourri l'échange lors de ma soutenance de thèse.

Je remercie tout d'abord Mme. Elisabeth Bandens, Professeure à l'Université de Aix-Marseille ainsi que M. Robert Pansu, Professeur à l'Université de Paris Saclay d'avoir accepté de rapporter mon manuscrit et de m'avoir permis de soutenir ma thèse le 30 mars 2021.

Mes remerciements vont également à Mme. Suzanne Fery-Forgues qui m'a fait l'honneur de prendre part à mon jury de thèse. Je te remercie Suzanne pour ton aide, tes conseils et ton point de vue extérieur au laboratoire qui m'ont permis de réaliser de très belles expériences.

Je remercie également le président du jury et directeur de l'ICMCB, M. Mario Maglione pour son accueil au sein du laboratoire et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de thèse.

Je remercie enfin Arnaud, Sam et Cyril – mes trois directeurs de thèse – de m'avoir fait confiance durant ces 3 années (et un peu plus), mais aussi pour leur soutien scientifique et leurs remarques incisives mais constructives.

Durant ces trois années, j'ai pu compter sur le soutien de nombreuses personnes aux qualités scientifiques d'ores et déjà démontrées, merci notamment à Guillaume et à Olivier. La thèse n'est pas un long fleuve tranquille, c'est une odyssee où en réalité les doctorants sont des combattants qui doivent garder la tête haute dans certains moments de psychose. La bonne ambiance et l'entre-aide entre les étudiants m'a permis d'aller fièrement jusqu'à la fin de cette thèse. Je tiens à saluer les membres rencontrés au labo et je leur dis *gracias, thanks, xiexie, eskerrik asko, grazie, choukrane*, ... et aux autres compères : merci ! Baptiste, le premier contact du bureau E20a, sache qu'il y aura toujours un matelas gonflable pour toi à Bordeaux, Fan, si t'es pas trop fatigué, on partira en voyage en Chine, Maria, sache que tu es mademoiselle hors norme, Nicolas qui ravit la journée avec ses remarques expressives, Antoine et ses ronchonneries au CAES, Valentina qui pouvait voir en moi la haine quand une micropuce hors de prix était cassée par accident, mon voisin "Toto", Romain, Quilfen, Marie, R1, Elen, Emeline, Farah, Rabie, Sandy, Iulia, Brian, Fatma, Cyrielle, mon binôme essentiel en période de rédaction avec qui on se disait « Comment c'est loin » en pensant à la fin de la thèse et que je remercie pour les remerciements!

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de disposer de services collectifs qui m'ont permis de réaliser de nombreuses caractérisations. Merci à Lionel, Marion, Sonia, Eric, Stan, Lydia et Alex. En parallèle de la vie scientifique, la vie au labo ne peut exister sans le soutien de certaines figures de l'ombre, fidèles au poste, toujours présentes pour t'aider, et que je remercie ici tout particulièrement : Sandrine, Fred, Christine, Carole, Cyril, Matthieu et Stéphane "Force et honneur!".

Je tiens à remercier toutes les personnes des différents laboratoires dans lesquels j'ai évolué pour les nombreuses discussions scientifiques et qui ont construit mon parcours de doctorant, merci notamment à Thierry Tassaing à l'ISM.

Par ailleurs, je tiens également à adresser mes sincères remerciements aux personnes non encore citées dont les permanents, les anciens et futurs docteurs ainsi que les stagiaires pour leur

soutien mutuel, leurs encouragements, leurs savoirs scientifiques et leurs échanges amicaux pendant ces trois années de dur labeur.

Je salue tous mes compagnons de route rencontrés au cours de ces trois ans à l'ICMCB et en dehors... À la belle époque et la nuit venue, les festivités étudiantes nous ont permis de nouer des liens au cours de *crazy nights*. La bise à Simon à qui je prédis une étoile sur le *walk of fame* du FIFID d'ici quelques années, à Béa avec qui il est de plus en plus difficile de réserver un Airbnb, à Laura et Oliv (si vous venez à Dour, je vous offre vos tee-shirts Shrek avec le prénom de votre choix, promis!), à la team Belcier, Chichi, Tim, Amau, Romain, Elise, Tiphaine (LA couturière de l'ADOC), JC, Mathias, les filles (quelle folie!) et Denis le « Pape Ricard ». Le vent se lève et l'heure de la séparation approche, sachez que je ne vous oublierai pas.

En guise de climax, je tiens à remercier toute ma famille qui m'a soutenu et je profite de l'occasion pour laisser graver dans la matrice toute mon admiration envers mes amis de toujours. Laura et Camille dont je suis fier de dire qu'à l'heure où sont écrites ces lignes, cela fait bientôt 25 ans que nous nous connaissons, joyeuses noces d'argent ! PH, j'espère vite venir te voir à VC, Flo, que je remercie de m'avoir proposé un jour de faire une magnifique coloc à St Mich. Claire, à qui je dois encore un café au Books, Mathieu, Anthoine, Caro, Elo, Matthieu, Nolo et les taïshs, les tortues que je retrouve toujours avec plaisir sur les skis (merci pour cette première étoile), par Skype ou en Mehari. Potes rencontrés ici ou aux quatre coins du globe, à tous, je vous salue!

Table des matières

Table des figures	11
Table des tableaux.....	15
Nomenclature	17
Liste des abréviations	19
Introduction générale.....	21
1.1 Nanoparticules fluorescentes	24
1.1.1 Nanoparticules fluorescentes organiques (FONs).....	24
1.1.2 Différents types de fluorophores	25
1.1.2.1 Historique	25
1.1.2.2 Mécanismes de fluorescence dans les AIEgènes	25
1.1.2.3 Caractéristiques des AIEgènes	28
1.1.3 Biodisponibilité des FONs	30
1.1.4 Méthodes classiques de synthèse des FONs.....	31
1.1.4.1 Précipitation par anti-solvant liquide (LAS).....	32
1.1.4.2 Mécanismes de précipitation.....	33
1.2 Première stratégie d'intensification : l'utilisation des fluides supercritiques	36
1.2.1 Définition	37
1.2.2 Dioxyde de carbone	38
1.2.3 Les procédés d'élaboration de poudres organiques en conditions supercritiques.....	39
1.2.3.1 Procédé anti-solvant supercritique : SAS	40
1.2.3.2 Impact des conditions opératoires sur la taille des particules	41
1.3 Seconde stratégie d'intensification : la microfluidique	44
1.3.1 Microfluidique & biochimie	45
1.3.2 La microfluidique conventionnelle.....	46
1.3.3 La microfluidique à haute pression – Introduction au micro-SAS	48
1.4 Nos contributions	51
Chapitre 2 Outils et méthodologie.....	53
Introduction.....	54
2.1 Étude thermodynamique	54
2.1.1 Domaine de travail.....	54
2.1.2 Outils de caractérisation <i>in situ</i> par infrarouge.....	56
2.1.2.1 Spectroscopie infrarouge.....	56
2.1.2.2 Mesure de solubilité	56
2.2 Outils de mise en forme des nanoparticules.....	59
2.2.1 Conception du système μ SAS.....	59

2.2.2 Choix du réacteur.....	59
2.2.2.1 Micro-puce.....	60
2.2.2.2 Microréacteur coaxial	65
2.2.3 Equipement haute pression.....	66
2.2.3.1 Pompes haute pression.....	66
2.2.3.2 Cellule de récupération.....	66
2.2.3.3 Régulateur de pression de sortie	69
2.3 Méthodologie pour la caractérisation des matériaux.....	70
2.3.1 Analyses <i>ex situ</i> des FONS	70
2.3.1.1 Microscopie électronique à balayage	70
2.3.1.2 Microscopie électronique à transmission	71
2.3.1.3 Dynamic Light Scattering (DLS)	72
2.3.2 Analyse <i>in situ</i> des FONS	74
2.3.2.1 La fluorescence	74
2.3.2.2 Technique d'observation par fluorescence en microscopie optique confocale.....	75
2.3.2.4 Observation <i>in situ</i> dans le micro-canal	77
Conclusion	81
Chapitre 3 Étude des mécanismes mis en jeu dans le cadre du procédé μSAS.....	83
Introduction	84
3.1 PARTIE I : Rappels de notions fondamentales.....	84
3.1.1 Sursaturation	84
3.1.2 Nucléation.....	85
3.1.3 Croissance des cristaux.....	87
3.1.4 Hydrodynamique et simulation numérique	87
3.2 PARTIE II : Synthèse de nanoparticules de TPE par le procédé μ SAS	88
3.2.1 Mesure de la solubilité du TPE dans le système THF/CO ₂ sous pression	88
3.2.1.1 Validation du protocole sur les données d'équilibre vapeur THF/CO ₂	88
3.2.1.2 Étude du système {soluté/solvant/anti-solvant}.....	92
3.2.2 Synthèse de nanoparticules de TPE par μ SAS	93
3.2.2.1 Approche expérimentale	93
3.2.2.2 Influence de l'effet de concentration et de la vitesse d'introduction	96
3.2.2.3 Comparaison avec la simulation numérique.....	99
3.3 PARTIE III : Cartographie <i>in situ</i> par fluorescence	103
3.3.1 Choix de la molécule	103
3.3.2 Mesure de la solubilité de BZX dans le système THF/CO ₂	104
3.3.3 Mise en forme de BZX par μ SAS et analyse <i>ex situ</i>	105

3.3.4 Détermination de la tension interfaciale solide/fluide par comparaison avec la simulation numérique	107
3.3.5 Dispositif expérimental pour la caractérisation <i>in situ</i>	107
3.3.5.1 Analyse temporelle	109
3.3.5.2 Analyse spectrale	110
3.3.6 Analyse <i>in situ</i> de l'intensité de fluorescence de BZX	111
3.3.7 Analyse statistique des temps caractéristiques	114
3.3.8 Analyse <i>in situ</i> de la longueur d'onde d'émission de BZX	116
Conclusion	119
Chapitre 4 Mise en forme des FONs par les procédés anti-solvant	121
Introduction	122
4.1 Procédés de mise en forme	122
4.1.1 Mise en forme des matériaux par le procédé μ SAS	122
4.1.2 Mise en forme des matériaux par le procédé LAS	123
4.2 Le Tétraphényléthylène (TPE)	123
4.2.1 μ SAS	123
4.2.2 LAS	124
4.3 BZX	126
4.3.1 μ SAS	126
4.3.2 LAS	129
4.4 NZX-tBu	130
4.4.1 μ SAS	130
4.4.2 LAS	131
4.5 Le Pérylène	132
4.5.1 μ SAS	133
4.5.2 LAS	134
4.6 Discussions sur la taille des FONs par μ SAS	136
4.7 Comparatif résumé des procédés de mise en forme μ SAS et LAS	137
4.8. Synthèses μ SAS avec le microréacteur coaxial pour le μ SAS	138
4.9 Application du μ SAS à la mise en forme d'un anticancéreux : la doxorubicine (DOX)	140
4.9.1 Contexte	140
4.9.2 Mise en forme de la doxorubicine par μ SAS	141
4.9.2.1 Choix du solvant	141
4.9.2.2 Première mise en forme de la doxorubicine	143
4.9.3 Mise en forme du système DOX+PEG par μ SAS	145
Conclusion	148

Conclusion générale et perspectives	149
Bibliographie	153
Annexes	163
Annexe 1 : Détails complémentaires Modes de vibration IR du CO ₂	164
Annexe 2 : Process intensification for the synthesis of ultra-small organic nanoparticles with supercritical CO ₂ in a microfluidic system.....	165
Annexe 3 : Code de programmation pour la cartographie des intensités	182
Annexe 4 : Code de programmation pour la cartographie des maxima des longueurs d'onde d'émission	183

Table des figures

Figure 1: Diagramme de Jablonski décrivant le mécanisme de fluorescence.....	24
Figure 2 : Molécule fluorescente aux effets AIE (1-méthyl-1,2,3,4,5-pentaphénylsilole) étudiée par l'équipe de Tang (Luo et al., 2001).	25
Figure 3 : Mise en évidence de l'effet AIE de la molécule HPS aux fortes fractions volumiques eau:solvant (Nie and Huang, 2016).	27
Figure 4 : Structures du BPI (AIEgène) et du FBPI (ACQgène) (à gauche). Variation de l'intensité de fluorescence des composés BPI et FBPI en solution pour différentes fractions volumiques eau:solvant (à droite) (Yamaguchi et al., 2017).	28
Figure 5 : Rendements quantiques à l'état agrégé et en solution de cinq fluorochromes (Suzuki et al., 2020).....	26
Figure 6 : a) Géométrie de la molécule BMeS-p-A dans ses états fondamental et excité. b) Spectres d'absorption et de fluorescence de BMeS-p-A à l'état fondamental (noir) et à l'état excité (rouge) (Beppu et al., 2015).	29
Figure 7 : Augmentation de la biodisponibilité d'un API par sa diminution de taille.....	30
Figure 8 : Approches d'élaboration de nanoparticules.	32
Figure 9: Schéma d'un procédé LAS.	33
Figure 10 : Relation entre la sursaturation et la taille moyenne des particules (Zhao et al., 2014).	34
Figure 11 : Schéma du mécanisme de la nucléation lors de l'ajout d'anti-solvant.	34
Figure 12 : A) Image de l'acéclofénac avant mise en forme. B) Effet du temps d'utilisation des ultrasons dans le procédé LAS sur la taille des particules d'acéclofénac (Rahim and Sadiq, 2017).	35
Figure 13 : Diagramme (p,T) du CO ₂	37
Figure 14 : Variation de la densité du CO ₂ en fonction de sa pression et proche de sa température critique.	38
Figure 15 : Procédé SAS schématisé.....	40
Figure 16 : Distribution en taille de particules de PLLA mises en forme par SAS pour différentes pressions (Zhang et al., 2013).....	42
Figure 17 : Distributions en taille des particules de GdAc (à gauche) et de EuAc (à droite) en fonction de la concentration initiale de la solution (Reverchon et al., 2002).	43
Figure 18 : Marché de la microfluidique (par secteur).....	45
Figure 19 : Marché de la microfluidique (en volume USD).	46
Figure 20: Système microfluidique avec intersection en T pour la formation de gouttelettes d'eau drainée dans de l'huile.	47
Figure 21 : Schémas des micromélangeurs (a) en croix, (b) par convection tridimensionnelle, (c) en T. En 1 sont représentées les entrées, en 2 les sorties.	48
Figure 22 : Image de l'injecteur turbulent coaxial dans un microréacteur par caméra à haute vitesse (Zhang, 2019).....	49
Figure 23 : Simulations de mélange {éthanol/CO ₂ } dans un microréacteur haute pression pour des temps de mélanges de 0,139 ms (a) et de 0,031 ms (b).	49
Figure 24 : Exemples de microréacteurs. Les performances du microréacteur haute pression sont représentées par les carrés oranges et bleus (Zhang, 2019).	50
Figure 25 : Courbes d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO ₂ } à 40 °C, 60 °C et 80 °C.	55
Figure 26 : Schéma expérimental du système de mesure des solubilités par FTIR. A) Source IR, B) cellule optique haute pression, C) détecteur du spectromètre, D) pompe, E) bouteille de CO ₂ , P) manomètre.....	57
Figure 27 : Cellule optique haute pression FTIR.....	57

Table des figures

Figure 28 : Spectres IR du CO ₂ et du THF pour différentes pressions.	58
Figure 29 : a) Schéma de la micropuce. b) Image de la micropuce. c) Vue de coupe de la zone de mélange dans la micro-puce. Rapports métriques respectés.	60
Figure 30 : Schémas des principales étapes de microfabrication	61
Figure 31 : Images d'un wafer de Pyrex (à gauche) et d'un wafer de silicium (à droite).	61
Figure 32 : Image du masque utilisé pour la photolithographie UV.	62
Figure 33 : a) Image d'un wafer de silicium gravé. La géométrie des canaux gravés correspond à celle du masque de la figure 33. Le trait rouge correspond au tracé de la pointe du profilomètre. b) Tracé du profil obtenu par la pointe du profilomètre (capture d'écran).	63
Figure 34 : Photographie de l'outil de découpe des wafers.	64
Figure 35 : a) Photo des bobines de capillaires utilisés en microfluidique. b) Photo d'une micro-puce à la fin des étapes de microfabrication.	65
Figure 36 : Vue de coupe du microréacteur coaxial. Rapports métriques respectés.	65
Figure 37 : Schéma du montage μ SAS composé de deux filtres en parallèle. 1 : Bouteille CO ₂ ; 2 : Solution organique ; A : Micropuce ; B : Cellule de récupération ; C : BPR.	67
Figure 38 : Schéma des différents constituants de la cellule de récupération.	67
Figure 39 : Photographie du fond de la cellule en saphir pour la récupération de poudre.	68
Figure 40 : Filtre cylindrique pour la récupération de poudre.	68
Figure 41 : Schéma du montage expérimental μ SAS.	69
Figure 42 : Images TEM d'une même zone avant et après destruction des particules sous le faisceau du TEM.	71
Figure 43 : Images TEM de FONs sur une grille de caractérisation.	72
Figure 44 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les modes d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence (avec absorption/émission d'un photon d'énergie $E=h\nu$).	74
Figure 45 : Schéma d'un microscope confocal.	76
Figure 46 : Représentations du système μ SAS avec le microscope confocal.	77
Figure 47 : Images de l'injecteur dans le micro-canal sous différentes sources.	78
Figure 48 : À gauche : images instantanées à $t = 1$ et à $t = 100$ du micro-canal. L'échelle correspond à l'intensité mesurée. À droite : analyse temporelle (cumul) pour t allant de 1 à 100 et pour la même zone. L'échelle correspond au cumul des intensités.	79
Figure 49 : Schéma des étapes réalisées pour visualiser le champ de nucléation in situ.	80
Figure 50 : Illustrations des techniques de caractérisation des poudres mises en place dans cette thèse.	81
Figure 51 : Energies libres d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du germe (r). 86	
Figure 52 : Structure moléculaire du Tétraphényléthylène (TPE)	88
Figure 53 : Courbes d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO ₂ } à 40 °C, 60 °C et 80 °C.	89
Figure 54 : Schéma et photographie de la cellule optique haute pression.	90
Figure 55 : Bandes IR du CO ₂ et du THF exploitées pour ce travail. Un zoom des bandes IR du CO ₂ est donné dans la fenêtre.	90
Figure 56 : Absorbance des bandes du CO ₂ (gauche) et du THF (droite) en fonction de la concentration du THF.	91
Figure 57 : Courbe d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO ₂ } à 40 °C. En vert, les résultats de Knez (2008), en bleu les résultats de nos travaux.	92
Figure 58 : Bandes IR du TPE, du THF et du CO ₂ pour différentes fractions molaires en CO ₂	92
Figure 59 : Solubilité du TPE dans le système {THF/CO ₂ } à 100 bar et à 40 °C.	93
Figure 60 : Photographie du montage μ SAS.	94
Figure 61 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 1. Encart : distribution en taille des particules de TPE.	95

Figure 62 : Distributions en taille pour le triplicata du cas n° 1.	96
Figure 63 : Résumé des distributions en taille des cas n° 1, 2 et 3.	97
Figure 64 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 2.	98
Figure 65 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 3.	99
Figure 66 : Histogramme : Distribution en taille obtenue expérimentalement du cas n° 1. Courbes : Distributions en taille simulées du cas n° 1 en fonction de la tension de surface.	100
Figure 67 : Champs instantanés et moyennés des fractions massiques du THF et du TPE.	101
Figure 68 : Histogramme : Distributions en taille des particules de TPE obtenues expérimentalement pour les cas n° 1 et 2. Courbe : Distributions en taille des particules de TPE simulées pour les cas n° 1 et 2 pour une tension de surface égale à 2,25 mN/m.	101
Figure 69 : Temps de mélange obtenus par les intensités de ségrégations des cas n° 1 et 2.	102
Figure 70 : Champ instantané de la sursaturation pour le cas n° 1.	102
Figure 71 : Structure moléculaire de BZX et sa courbe d'absorption.	103
Figure 72 : Image de 9 échantillons de BZX sous illumination par une lampe UV à 365 nm.	104
Figure 73 : Spectres d'émission des différentes solutions sous une excitation à 440 nm.	104
Figure 74 : Solubilité de BZX pour différentes concentrations molaires en CO ₂	105
Figure 75 : Images TEM des particules de BZX synthétisées par μSAS.	106
Figure 76 : Distributions en taille de BZX synthétisé par μSAS pour différents régimes de débits.	106
Figure 77 : Comparaison des distributions en taille données par l'expérimental (histogramme bleu) et par la simulation (courbes).	107
Figure 78 : Schéma de la micro-puce (à gauche), vue de coupe du micro-canal (en haut à droite), image en lumière visible de l'injecteur dans le micro-canal (en bas à droite).	108
Figure 79 : Images de la sortie de l'injecteur à 0 s, 20 s et 40 s après activation de la pompe HPLC.	108
Figure 80 : De gauche à droite : micro-canal reconstitué à partir de l'intensité de fluorescence mesurée pour 1, 10 et 100 images.	109
Figure 81 : Image sous excitation à 405 nm du micro-canal avec les régions d'intérêt tracées en couleur (à gauche), courbes d'émission correspondant aux régions d'intérêts (à droite).	110
Figure 82 : Cartographie du champ de précipitation de BZX en fonction de l'intensité de la fluorescence mesurée (à gauche). Champ moyenné de la concentration de particules de BZX par simulation numérique à différentes hauteurs du canal (à droite).	112
Figure 83 : Cartographie de l'intensité de la fluorescence de BZX sur 1 mm de longueur (par la mesure expérimentale en haut, par la simulation numérique en bas).	113
Figure 84 : Champs de concentration du TPE solubilisée (a), champs de la concentration volumique de particules solides de TPE (b), champs de la sursaturation (c) et champs du temps de micromélange de BZX sur 1 mm de longueur.	114
Figure 85 : Evaluations des temps de mélange, de croissance et nucléation de BZX à la sortie de l'injecteur.	115
Figure 86 : Distribution des sursaturations à la sortie de l'injecteur.	116
Figure 87 : Cartographie de l'intensité de la fluorescence de BZX (en haut). Cartographie du maximum de la longueur d'onde d'émission de BZX (en bas).	117
Figure 88 : Evolution de la taille moyenne de particules dans le micro-canal (partie grisée : solution non physique).	117
Figure 89 : Schéma du montage expérimental μSAS avec micro-puce. P1, P2 : Pompes ; S1 : Bouteille de CO ₂ ; S2 : Solution organique concentrée ; P : Capteur de pression.	123
Figure 90 : Image des particules de TPE après mise en forme par μSAS (Exp #1).	124
Figure 91 : Image TEM du TPE mis en forme par LAS.	125
Figure 92 : Distribution en taille de TPE par LAS (DLS).	125

Table des figures

Figure 93 : Distributions en taille des particules de TPE obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert).	126
Figure 94 : Structure moléculaire de BZX (gauche), image TEM de la poudre macrométrique avant mise en forme (droite).	127
Figure 95 : Image des particules de BZX après mise en forme par μ SAS (Exp #1)	128
Figure 96 : Distributions en taille de BZX par μ SAS, aux faibles débits (à gauche) et aux forts débits (à droite).....	128
Figure 97 : Spectres d'émission de BZX.	129
Figure 98 : Image des particules de BZX après mise en forme par LAS.....	129
Figure 99 : Distributions en taille des particules de TPE obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert).	130
Figure 100 : Structure moléculaire de NZX-tBu.....	130
Figure 101 : Images TEM de particules de NZX-tBu mises en forme par μ SAS.	131
Figure 102 : Images TEM (gauche) et SEM (droite) de NZX-tBu mis en forme par LAS.	132
Figure 103 : Distributions en taille des particules de NZX-tBu obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert).	132
Figure 104 : Structure moléculaire du Pérylène.....	133
Figure 105 : Images TEM de Pérylène mis en forme par μ SAS.	133
Figure 106 : Distribution en taille de Pérylène mis en forme par μ SAS.	134
Figure 107 : Spectres d'émission de Pérylène.	134
Figure 108 : Images TEM (gauche) et SEM (droite) de Pérylène à la suite d'une mise en forme par LAS.	135
Figure 109 : Distribution en taille de Pérylène mis en forme par LAS (DLS).	135
Figure 110 : Distributions en taille des particules de Pérylène obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert) (mesures obtenues par TEM).	136
Figure 111 : Images TEM des différents composés mis en forme par μ SAS et LAS.	137
Figure 112 : Schéma du montage expérimental μ SAS avec microréacteur coaxial. P1, P2 : Pompes ; S1 : Bouteille de CO ₂ ; S2 : Solution organique concentrée ; P : Capteur de pression.....	138
Figure 113 : Images TEM des différents composés mis en forme par μ SAS avec les deux types de microréacteurs.	140
Figure 114 : Illustration du mécanisme de libération d'un principe actif ciblant une cellule cancéreuse.	141
Figure 115 : DOX synthétisée par μ SAS avec du DMSO.	142
Figure 116 : DOX synthétisée par μ SAS avec différentes fractions volumiques (DMSO:Ethanol) du solvant organique : (a) 1:2 ; (b) 1:10.	143
Figure 117 : DOX synthétisée par μ SAS avec différents solvants organiques : (a) DMSO ; (b) Méthanol ; (c) DMF.	143
Figure 118 : Diagramme de phase DMF/CO ₂ à 20 °C (Duran-Valencia et al., 2001).	144
Figure 119 : Image TEM des particules de doxorubicine mises en forme par μ SAS (gauche) et leur distribution en taille (droite).	145
Figure 120 : Synthèse du PEG 5k par μ SAS.....	146
Figure 121 : Synthèse de nanoparticules à partir d'un mélange (DOX+PEG) de différentes zones et à différents grossissements : (haut) x20 000 ; (bas) x50 000.....	147
Figure 122 : Montage expérimental d'un microscope confocal associé à la FLIM (Buranachai et al., 2008).....	151
Figure 123 : Niveaux d'énergie vibrationnels et rotationnels d'une molécule	164
Figure 124 : Modes de vibration du CO ₂	164

Table des tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des inconvénient du procédé LAS.	36
Tableau 2 : Ordres de grandeur des propriétés des gaz, des fluides supercritiques et des liquides. ...	38
Tableau 3 : Techniques de synthèse de poudres utilisant le sc-CO ₂	39
Tableau 4 : Utilisation du sc-CO ₂ comme anti-solvant pour la synthèse de composés organiques par SAS.	41
Tableau 5 : Exemples de systèmes microfluidiques pour la synthèse de particules organiques. Ø _{AS} : Diamètre du canal d'injection de l'anti-solvant. Ø _S : Diamètre du canal d'injection du solvant.	47
Tableau 6 : Techniques de caractérisation ex situ des poudres.	70
Tableau 7 : Conditions opératoires du µSAS pour les cas n° 1, 2 et 3.	96
Tableau 8 : Conditions expérimentales de la synthèse de BZX par µSAS.	105
Tableau 9 : Résumé des distributions en taille de BZX en fonction des conditions opératoires.	106
Tableau 10 : Résumé des paramètres expérimentaux.	109
Tableau 11 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par µSAS.	124
Tableau 12 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par LAS.	125
Tableau 13 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par LAS.	126
Tableau 14 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de BZX par µSAS.	127
Tableau 15 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de BZX par LAS.	130
Tableau 16 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de NZX-tBu par µSAS.	131
Tableau 17 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de NZX-tBu par LAS.	131
Tableau 18 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de Pérylène par µSAS.	133
Tableau 19 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de Pérylène par LAS. Taille mesurée à partir des images TEM.	135
Tableau 20 : Conditions opératoires pour le µSAS utilisant un réacteur coaxial.	138
Tableau 21 : Distributions en taille de plusieurs composés organiques fluorescents mis en forme par µSAS avec les deux types de microréacteurs.	139
Tableau 22 : Propriétés physico-chimiques des solvants testés.	142
Tableau 23 : Conditions opératoires pour la mise en forme de la DOX par µSAS.	144
Tableau 24 : Conditions opératoires pour la mise en forme du PEG par µSAS.	145
Tableau 25 : Conditions opératoires pour la mise en forme de la DOX et du PEG par µSAS.	146

Nomenclature

Nomenclature

A	Absorbance
B	Fréquence de nucléation ($\text{m}^{-3}.\text{s}^{-1}$)
C ou [X]	Concentration ($\text{g}.\text{L}^{-1}$)
C_{sat}	Concentration à saturation ($\text{g}.\text{L}^{-1}$)
D	Coefficient de diffusion ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
E_{photon}	Énergie d'un photon (eV)
G	Taux de croissance ($\text{m}.\text{s}^{-1}$)
G_0	Energie libre (J)
I_m	Intensité de ségrégation
I_0	Intensité du faisceau incident
M	Masse molaire ($\text{g}.\text{mol}^{-1}$)
Q	Débit volumique ($\text{mL}.\text{min}^{-1}$)
R	Constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J}.\text{mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)
Re	Nombre de Reynolds
R_h	Rayon hydrodynamique (m)
S	Sursaturation
$S_{\text{spé}}$	Surface spécifique (m^2)
T	Température ($^{\circ}\text{C}$)
V_m	Volume molaire ($\text{m}^3.\text{mol}^{-1}$)
V_M	Volume moléculaire (m^3)
d	Diamètre moyen des particules (m)
d_{10}	Taille moyenne des particules (m)
h	Constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J}.\text{s}$)
k_B	Constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ m}^2.\text{kg}.\text{s}^{-2}$)
l	Trajet optique (cm)
m_0	Moment 0 (nombre total des particules par unité de volume) ($\text{N}.\text{m}^{-3}$)
m_1	Moment 1 (longueur totale des particules par unité de volume) (m^{-2})
n_0	Indice de réfraction
p	Pression (bar ou MPa)

Nomenclature

t_m	Temps de mélange (s)
t_n	Temps de nucléation (s)
t_p	Temps de précipitation (s)
x_{sat}	Solubilité ($\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)
x_α	Fraction molaire du composé α
ε	Coefficient d'extinction molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
$\bar{\varepsilon}$	Taux de dissipation d'énergie ($\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$)
η	Viscosité (Pa.s ou cP)
θ	Angle de diffusion ($^\circ$)
λ_{exc}	Longueur d'onde d'excitation (nm)
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission (nm)
ν	Fréquence (s^{-1})
ρ	Densité ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
σ	Tension de surface ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)
ϕ	Rendement quantique

Liste des abréviations

ACQ	Aggregation-Caused Quenching
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AIE	Aggregation-Induced Emission
ANR	Agence Nationale de la Recherche
API	Active Pharmaceutical Ingredient
BPR	Back Pressure Regulator
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CCD	Charge-Coupled-Device
CFD	Computational Fluid Dynamics
CO ₂	Dioxyde de carbone
DLS	Dynamic Light Scattering
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FON	Fluorescent Organic Nanoparticle
FSC	Fluide SuperCritique
FTIR	Fourier Transform InfraRed
HP	High Pressure
HPOC	High Pressure Optical Cell
I2M	Institut de Mécanique et d'Ingénierie
ICMCB	Institut de Chimie de la Matière Condensée de bordeaux
IR	Infra-Red
ISM	Institut des Sciences Moléculaires
LAS	Liquid Anti-Solvent
OLED	Organic Light-Emitting Diode
PBE	Population Balance Equations
PDMS	PolyDiMethylSiloxane
PEG	Polyethylene glycol
PL	PhotoLuminescence
PVDF	PolyVinylidene Fluoride

Liste des abréviations

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SAS	Supercritical Anti-Solvent
sc-CO ₂	Dioxyde de carbone supercritique
SEM	Scanning Electron Microscope
SPCMIB	Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique
TEM	Transmission Electron Microscope
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	TetraMethylAmmonium Hydroxid
TPE	TetraPhenylEthylen
UV	Ultra-Violet

Introduction générale

Ce travail de thèse se place dans le cadre du projet ANR SUPERFON. Celui-ci s'intéresse à la mise en forme de nanoparticules fluorescentes *via* l'utilisation d'un procédé microfluidique supercritique. Les deux principaux objectifs du projet, à savoir, (i) lever la limitation en taille des particules synthétisées par méthode conventionnelle et (ii) améliorer la compréhension des procédés utilisant des fluides supercritiques en tant qu'anti-solvants, constituent le fil conducteur de ces travaux de thèse.

Dans le premier chapitre, nous présenterons un travail bibliographique composé de deux parties. Tout d'abord, nous introduirons la notion de nanoparticules organiques fluorescentes (FONs – Fluorescent Organic Nanoparticles) qui sont au centre de nos travaux. Nous y verrons la nécessité de produire des FONs de petites tailles afin d'optimiser leurs propriétés dans certaines applications. C'est notamment dans le domaine biomédical que ces nanoparticules sont intéressantes. Elles sont employées dans le diagnostic, dans le traitement et dans la thérapie de nombreuses maladies. La bio-imagerie utilise de nombreux composés fluorescents dont les propriétés optiques sont sans cesse améliorées grâce aux travaux de recherche. Nous présenterons d'ailleurs une propriété optique découverte récemment qui confère à ces particules organiques une intensité de fluorescence beaucoup plus importante à l'état agrégé que lorsqu'elles sont solubilisées dans un solvant liquide. Ces molécules de « dernière génération » sont particulièrement étudiées actuellement.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous présenterons une technique de synthèse de poudres très utilisée en industrie pharmaceutique : la précipitation en présence d'un anti-solvant et à basse pression. Cependant, cette méthode de synthèse, qui est classiquement utilisée pour mettre en forme les FONs, ne permet pas d'atteindre de très petites tailles de particules. Ce dernier aspect peut présenter des limitations pour leur mise en œuvre finale. Nous détaillerons ici deux stratégies afin de lever la limitation en taille. La première stratégie se focalisera sur les techniques de synthèse des composés organiques de petite taille avec un anti-solvant supercritique. Ces nouvelles conditions opératoires ouvrent des portes vers des procédés hautement performants (haute pression). Nous présenterons la méthode nommée SAS – pour Supercritical Anti-Solvent – employant le dioxyde de carbone (CO₂) en conditions supercritiques comme anti-solvant. La seconde stratégie introduira la technologie microfluidique, un outil développé notamment en biochimie pour la synthèse contrôlée de particules.

L'association de ces deux techniques d'intensification doit permettre d'atteindre un haut degré de contrôle du mélange. Ce nouveau système élaboré à l'ICMCB et nommé μ SAS réunit le procédé de synthèse en conditions supercritiques SAS déjà bien connu et la technologie microfluidique. Le procédé μ SAS sera au centre de ces travaux pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes utilisables en bio-imagerie.

Le second chapitre de ce manuscrit concerne les différents développements technologiques effectués au cours de ce travail de thèse. Les méthodologies expérimentales mises en œuvre concernent trois aspects de ce travail de thèse. Tout d'abord, nous aborderons l'étude thermodynamique du système {soluté/solvant/anti-solvant}. De nombreux exemples de la littérature ont montré qu'il était favorable de travailler dans un domaine monophasique supercritique afin de bénéficier des propriétés de mélange avantageuses. Dans ces conditions de haute pression, nous nous

proposons d'étudier la solubilité du soluté dans le milieu. Cette donnée est indispensable pour simuler les phénomènes de nucléation (ou germination) et de précipitation du soluté dans le microréacteur. Dans un second temps, nous présenterons le montage expérimental μ SAS pour la synthèse des FONs. Enfin, nous décrirons les différentes techniques utilisées pour caractériser la taille (microscopie électronique) et les propriétés de fluorescence (spectrométrie UV) des matériaux synthétisés.

Le troisième chapitre traite de l'étude des mécanismes fondamentaux de notre procédé μ SAS. Il sera question de rappeler quelques notions fondamentales, telles que les phénomènes de nucléation et de croissance qui serviront de base à la discussion. Puis, nous discuterons des mesures *in situ* de solubilité des composés organiques fluorescents que nous cherchons à synthétiser dans un milieu solvant/ CO_2 en conditions supercritiques, résultats essentiels afin de pouvoir estimer la sursaturation dans le cadre de la simulation numérique. Afin de valider le procédé μ SAS, nous étudierons la précipitation du TPE, considéré comme matériau modèle. Les résultats de la simulation numérique seront comparés avec les résultats de la caractérisation *ex situ* des poudres obtenues dans le microréacteur. Cette comparaison nous permettra de déterminer la tension interfaciale (fluide/particules solides), difficilement mesurable expérimentalement. Enfin, nous tâcherons de visualiser le champ de précipitation *in situ* dans nos réacteurs. Pour cela, une molécule sera spécialement choisie pour ses propriétés optiques. Après avoir étudié le système thermodynamiquement, une analyse *ex situ* de la taille des particules produites sera couplée aux analyses *in situ* obtenues par microscopie confocale. Ces observations expérimentales seront alors confrontées à la simulation numérique.

Le dernier chapitre se focalise sur l'application des procédés anti-solvants pour évaluer la robustesse du procédé μ SAS. En étudiant différentes molécules difficiles à mettre en forme par voie conventionnelle, nous proposerons un système le plus performant possible. Les caractérisations par microscopie électronique permettront de mesurer les tailles de particules formées. Dans un second temps, nous évaluerons l'efficacité d'un procédé de mise en forme par voie liquide conventionnelle : le LAS. Nous observerons alors les bénéfices qu'apporte le procédé μ SAS pour une application biomédicale des FONs synthétisés. Puis, nous nous intéresserons à l'amélioration du montage expérimental du μ SAS dans le but d'augmenter le rendement de production des poudres. Enfin, nous étudierons un dernier système pouvant bénéficier d'une haute valeur ajoutée dans le domaine biomédical, système pour lequel une diminution en taille permettrait d'augmenter sa biodisponibilité. Une dernière étape consistera à étudier un système dans lequel l'agent actif et son polymère sont préalablement dissous dans la même solution mère avant leur mise en forme.

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Nanoparticules fluorescentes

De nombreuses particules de taille nanométrique ont été développées pour leurs propriétés optiques. En biologie, les nanoparticules luminescentes sont souvent utilisées pour des applications d'imagerie cellulaire, comme le marquage d'agents actifs envoyés dans l'organisme (Wu et al., 2007) ou encore comme la détection *in vivo* de cellules tumorales (He et al., 2019). Elles sont aussi utilisées à des fins de diagnostic et donnent, par exemple, des informations sur le pH (Schreml et al., 2012) ou sur l'état d'inflammation des tissus (Xu et al., 2019). Ces agents de contraste se basent sur l'interaction lumière-matière qui a l'avantage d'être non-invasive pour le système biologique étudié. La fonctionnalisation de leur surface leur permet d'être très efficaces, car elles ont peu de chances d'être bloquées par les protéines circulantes ou par le système immunitaire et parviennent ainsi plus facilement à leur cible que des molécules dispersées (Cormode et al., 2010; Wahsner et al., 2019). De nouvelles techniques de caractérisation par microscopie de fluorescence ont récemment vu le jour (Benz et al., 2013; H. M. Kim et al., 2008; Liao et al., 2016). En utilisant des molécules fluorescentes véhiculées par des nanoparticules, de nombreuses avancées médicales ont été rendues possibles dans le domaine du diagnostic et de la théranostique.

Les nanoparticules luminescentes sont catégorisées selon la nature de leurs composés : inorganiques, organiques, hybrides. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux nanoparticules organiques fluorescentes, très utilisées aujourd'hui en imagerie biomédicale.

1.1.1 Nanoparticules fluorescentes organiques (FONs)

Les nanoparticules fluorescentes organiques sont des systèmes développés pour leurs propriétés optiques, pour leur stabilité et pour leur faible toxicité dans l'organisme. Les fluorophores ou fluorochromes sont des composés organiques qui se caractérisent souvent par des structures moléculaires aromatiques. On définit la fluorescence comme la succession de deux procédés photophysiques (Figure 1). Tout d'abord, la molécule dans son état fondamental S_0 absorbe un photon, d'énergie $E_{\text{photon}} = h\nu$ (où h est la constante de Planck et ν la fréquence du photon) et passe ainsi dans un état excité de plus haute énergie (S_1). Après une relaxation rapide vers l'état vibrationnel de plus basse énergie de l'état excité (S_1), la molécule retourne à l'état fondamental (S_0) en émettant un photon.

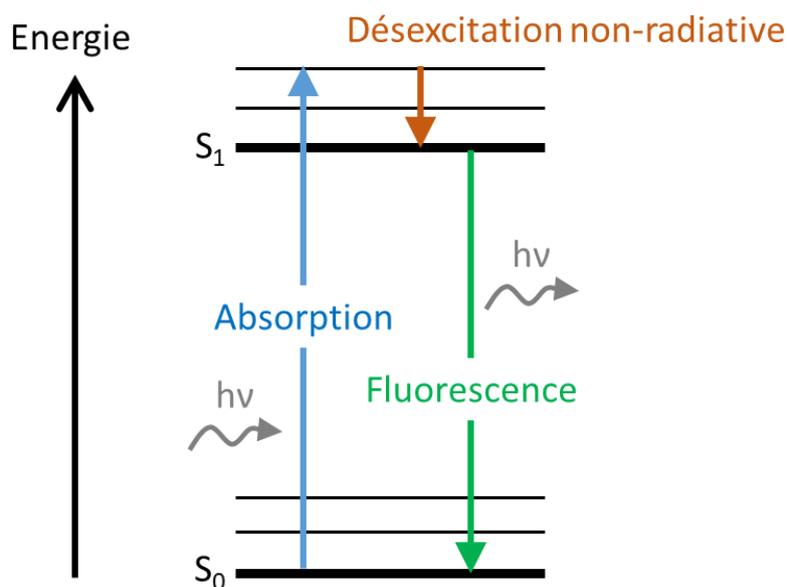


Figure 1: Diagramme de Jablonski décrivant le mécanisme de fluorescence.

On parle de fluorescence quand les deux états par lesquels passe la molécule sont de même multiplicité, c'est-à-dire des singulets dans le cas des molécules organiques. D'autres phénomènes de photoluminescence seront présentés en détails dans le deuxième chapitre.

1.1.2 Différents types de fluorophores

1.1.2.1 Historique

Il est bien connu que la plupart des fluorophores émettent fortement en solution, tandis que dans leur état agrégé ou solide, ils voient l'intensité de leur fluorescence diminuer. Ce comportement classique est appelé inhibition de fluorescence causé par l'agrégation, *Aggregation Caused Quenching* (ACQ). Par ailleurs, il existe des molécules luminogènes atypiques, pour lesquelles on constate une augmentation importante de la fluorescence à l'état agrégé par rapport aux solutions. Le phénomène a été appelé émission induite par l'agrégation, *Aggregation-Induced Emission* (AIE). Les composés présentant un effet AIE sont nommés AIEgènes.

Comme cela a bien été rappelé par l'équipe de Gierschner (Shi et al., 2017), le phénomène était connu depuis longtemps. Il a été redécouvert en 2001 par l'équipe de Tang en étudiant le 1-méthyl-1,2,3,4,5-pentaphénylsilole (Figure 2), pour lequel une augmentation inattendue de l'intensité de fluorescence sous la forme agrégée a été observée (Luo et al., 2001). Cette espèce présente une émission de fluorescence faible en solution dans un bon solvant, tandis que son émission de fluorescence est forte à l'état agrégé dans un mauvais solvant ou sous forme solide. Le mérite du groupe chinois a été de voir l'intérêt de ce type de molécules pour de nombreuses applications, tant dans le domaine des matériaux que dans celui de la biologie et du diagnostic biomédical (Chen et al., 2016; Mei et al., 2018, 2015; Wang and Liu, 2018). De nombreuses molécules ont été étudiées par la suite. Ce développement a suscité un grand intérêt de la part du monde scientifique, ce qui a eu pour résultat d'affiner la compréhension des phénomènes de luminescence dans les molécules à l'état solide et de revoir certains concepts fondamentaux. Désormais, des centaines de laboratoires travaillent sur ce type de molécules depuis deux décennies à travers le monde.

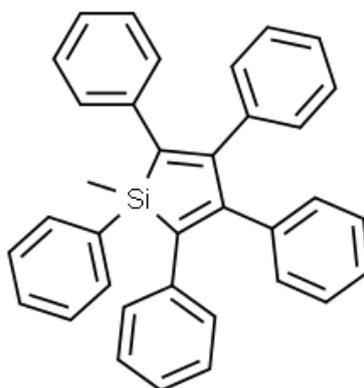


Figure 2 : Molécule fluorescente aux effets AIE (1-méthyl-1,2,3,4,5-pentaphénylsilole) étudiée par l'équipe de Tang (Luo et al., 2001).

1.1.2.2 Mécanismes de fluorescence dans les AIEgènes

De nombreuses molécules AIEgènes possèdent des groupements aromatiques, ou au moins des groupements insaturés, reliés entre eux par des liaisons simples. C'est le cas pour la molécule présentée en figure 2, où les cycles phényles sont placés en périphérie du silole. Ces aromatiques ont un mouvement rotatif libre en solution. Il a été proposé que les mouvements moléculaires (rotations, vibrations) de ces groupements dissipent l'énergie de la molécule excitée sous forme thermique, pour arriver à une désexcitation non radiative. La restriction de mouvement intramoléculaire (RIM) ou de

rotations (RIR) a été établie comme étant le mécanisme principal à l'origine du phénomène AIE (Chen et al., 2019; Shen et al., 2018) : à l'état agrégé, les rotations intramoléculaires sont bloquées, amenant à une forte fluorescence (Mei et al., 2015). Des avancées récentes faites par des chimistes théoriciens ont montré que des mécanismes beaucoup plus subtils entrent en jeu. Par exemple, pour le tétraphényléthène (TPE), la désexcitation met en jeu la formation photochimique d'un intermédiaire de type bi-radicalaire avec ouverture de la double liaison (Chen et al., 2019). Un mécanisme couramment rencontré est aussi la restriction à l'accès de l'intersection conique, *Restricted Access to Conical Intersection* (RACI). En solution, la flexibilité des molécules leur permet d'atteindre une géométrie très éloignée de l'équilibre, pour laquelle la surface d'énergie potentielle de l'état excité singulet S_1 est très proche de celle de l'état fondamental S_0 . Cet endroit où les surfaces se rejoignent s'appelle l'intersection conique. Il y a là un passage très facile d'un état à l'autre, qui s'effectue de manière non-radiative. Au contraire, à l'état solide, l'écart entre les niveaux d'énergie peut être plus important et la restriction des mouvements moléculaires ne permet plus aux molécules d'atteindre la géométrie requise. Le passage non-radiatif de l'état excité vers l'état fondamental est beaucoup plus difficile, d'où le retour de la fluorescence (Chen et al., 2019; Crespo-Otero et al., 2019; Suzuki et al., 2020).

Pour donner un exemple, la figure 3 montre une étude portant sur cinq fluorochromes. Les rendements quantiques mesurés à l'état agrégé (ϕ_{crystal}) et en solution (ϕ_{solution}) sont donnés. Les composés 1,4-BPA et 9,10-BPA présentent un effet AIE, tandis que les trois autres ont un meilleur rendement quantique en solution qu'à l'état agrégé (effet ACQ). Cette différence de comportement pour des isomères s'explique par la position de l'intersection conique (Suzuki et al., 2020).

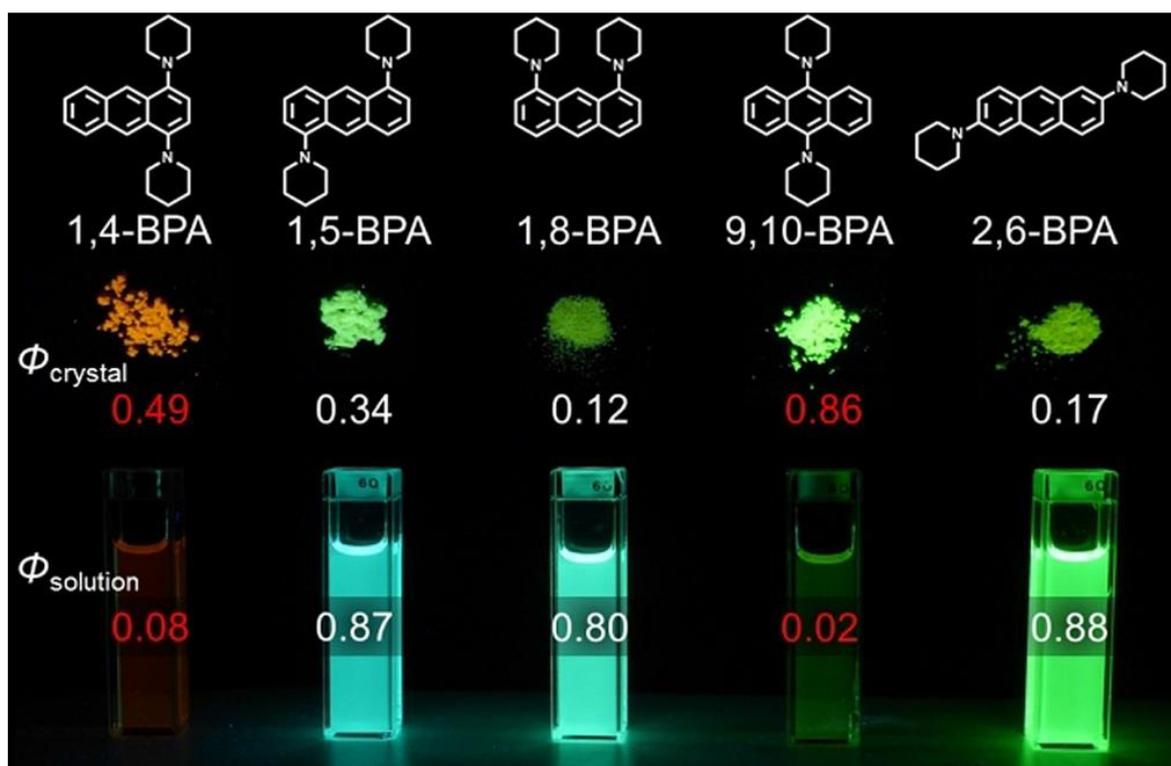


Figure 3 : Rendements quantiques à l'état agrégé et en solution de cinq fluorochromes (Suzuki et al., 2020).

Pour utiliser au mieux les capacités des AIEgènes, de nouvelles structures moléculaires ont été pensées. La fluorescence à l'état solide est très dépendante de l'arrangement moléculaire. Cela a

amené à privilégier des molécules encombrées pour miser sur des effets stériques (Kumar et al., 2017), ou des conformations moléculaires vrillées, comme celles du TPE ou du pentaphénylsilole, empêchant un empilement plan des molécules.

Il est courant de montrer l'effet AIE en dissolvant le colorant dans un solvant organique dans lequel il est bien soluble, puis en ajoutant des quantités croissantes d'un solvant dans lequel il ne l'est pas (anti-solvant), généralement l'eau, afin de générer une sursaturation et la formation d'agrégats. La molécule AIEgène dissoute émet faiblement, ou pas du tout, alors que la suspension d'agrégats dans la phase aqueuse émet une intense fluorescence (Figure 4).

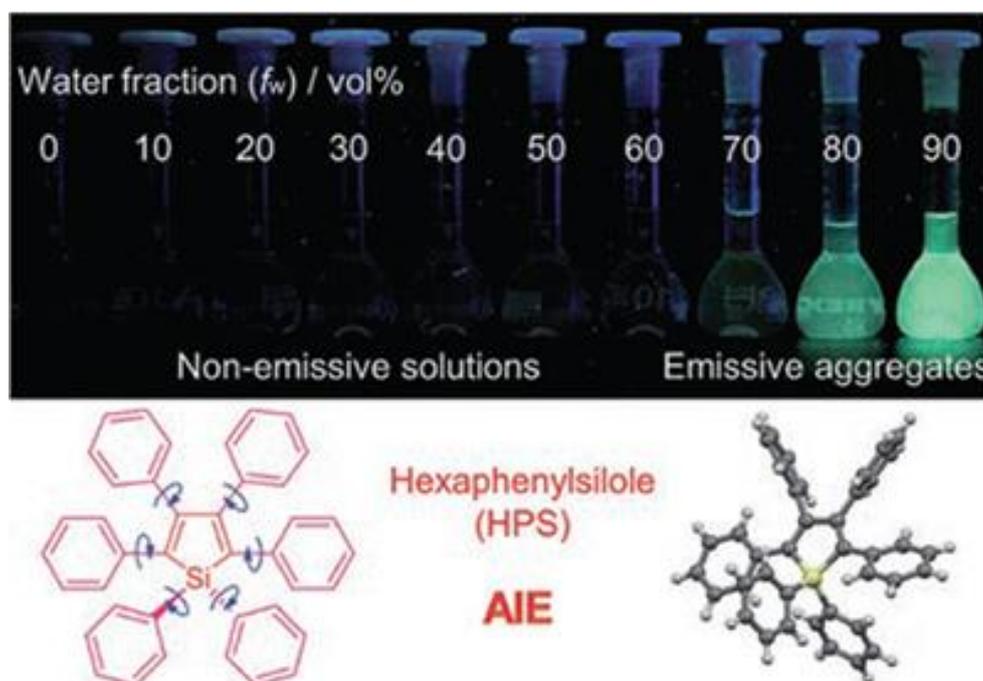


Figure 4 : Mise en évidence de l'effet AIE de la molécule HPS aux fortes fractions volumiques eau:solvant (Nie and Huang, 2016).

L'exemple suivant montre de manière visuelle la différence entre les phénomènes d'AIE et d'ACQ. Des complexes de bore plus ou moins flexibles en fonction de leur structure présentent des propriétés différentes pour des géométries moléculaires très proches. Le BPI (boron pyridinoiminate complex) est un AIEgène et son très proche voisin, le FBPI, est lui ACQgène (Figure 5). En solution, la molécule rigide FBPI présente une forte émission, là où son homologue BPI émet peu, et inversement sous forme d'agrégats (Yamaguchi et al., 2017). Il est intéressant de voir que la simple fusion de deux phényles provoque cette remarquable variation de comportement.

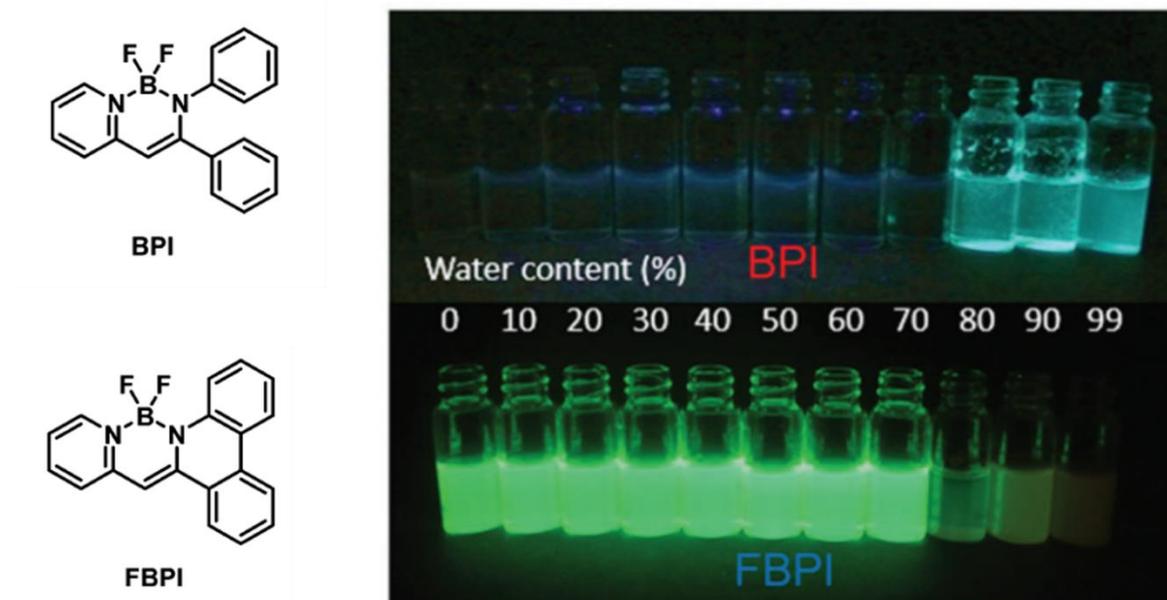


Figure 5 : Structures du BPI (AlEgène) et du FBPI (ACQgène) (à gauche). Variation de l'intensité de fluorescence des composés BPI et FBPI en solution pour différentes fractions volumiques eau:solvant (à droite) (Yamaguchi et al., 2017).

Dès lors que la molécule AlEgène se trouve dans l'incapacité de se mouvoir librement, elle émet. C'est le cas à l'état agrégé, dans une solution très concentrée, à l'état solide, ou encore piégée dans une matrice polymérique. C'est pour tenir compte de tous ces états solides, et non pas seulement de l'état agrégé, qu'on parle maintenant d'effet d'exaltation de luminescence à l'état solide, *Solid state Luminescence Enhancement SLE* (Shi et al., 2017).

1.1.2.3 Caractéristiques des AlEgènes

1.1.2.3.1 Rendement quantique

Un très grand nombre de fluorochromes a fait l'objet d'études, notamment sur leurs propriétés optiques. Un premier résultat important est la valeur du rendement quantique de chaque composé à l'état agrégé. Celui-ci est très variable suivant la molécule. Cependant, il faut comparer cette intensité de fluorescence à celle mesurée lorsque le composé est en solution. Pour certaines applications, il est important que l'émission soit faible en solution, et soit aussi élevée que possible à l'état solide.

1.1.2.3.2 Longueur d'onde d'émission

Outre des rendements quantiques très variés, les composés AlEgènes présentent des maxima d'émission très différents, couvrant toute la gamme des longueurs d'onde et s'offrant à un large panel d'applications. De nombreuses publications ont montré un important décalage de Stokes, c'est-à-dire un grand décalage de la longueur d'onde entre le maximum d'excitation et le maximum d'émission de la molécule AlEgène. Un décalage en longueur d'onde peut intervenir lors du passage de la solution à l'état agrégé. C'est également cet état agrégé qui apporte une meilleure photostabilité aux composés AlEgènes par rapport aux molécules en solution. En effet, pour ce type de molécules fluorescentes organiques, la perte de fluorescence peut être induite par photoblanchiment (Chen et al., 2016). Ce phénomène irréversible peut être dû à un changement structural de la molécule, voire à sa destruction suite à une réaction photochimique. Une bonne photostabilité est donc importante dans le choix de l'AlEgène afin d'augmenter le temps de vie de la molécule fluorescente, soumise à une forte excitation (Pawley and Masters, 2008).

De nouvelles biomolécules fluorescentes font leur apparition dans le très large panel des agents de contraste (Xu et al., 2018). Elles présentent des propriétés avantageuses pour les applications en imagerie. Un large décalage de Stokes facilite la mesure de la fluorescence à une longueur d'onde d'émission éloignée de la longueur d'onde d'excitation. De plus, certaines molécules proposent une émission dans le proche infrarouge, gamme d'énergie où les tissus humains sont généralement transparents. Dès lors, l'emploi de tels composés offre un moyen non invasif et efficace pour l'imagerie spectroscopique.

Les calculs numériques des structures optimisées dans leurs états fondamentaux et excités permettent aujourd'hui de mettre en lien la géométrie de la molécule et ses propriétés optiques. Par exemple, la figure 6 présente la molécule BMeS-p-A (2,5-bis(méthylsulfonyl)-1,4-diaminobenzène) dont la structure moléculaire est modélisée lorsque la molécule est en solution et lorsque la molécule est agrégée. Dans le second cas, le groupement sulfonyle est 0,354 Å au-dessus du plan et d'autres parties de la molécule sont déformées. Ceci a pour effet de créer un décalage de Stokes entre les deux cas de figure étudiés (Beppu et al., 2015; Sasaki, 2015; Yamaguchi et al., 2017).

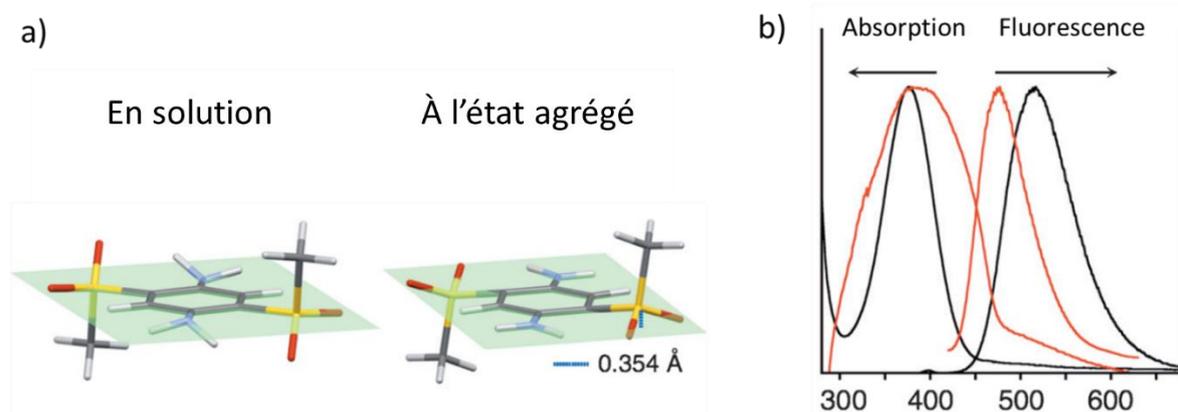


Figure 6 : a) Géométrie de la molécule BMeS-p-A dans ses états fondamental et excité.
b) Spectres d'absorption et de fluorescence de BMeS-p-A à l'état fondamental (noir) et à l'état excité (rouge)
(Beppu et al., 2015).

Parce que la structure de l'état cristallin est en général assez lâche, de nombreux composés AIEgènes sont sensibles aux stimuli mécaniques, comme le broyage, l'écrasement, le cisaillement, qui modifient cette structure, sans altération chimique des molécules. La couleur et l'intensité de la fluorescence émise varie avec ces stimuli. Cette propriété, appelée mécanofluorochromisme, en fait de bons capteurs de forces mécaniques (Wang and Li, 2017). Généralement, la chaleur ou l'exposition à des vapeurs de solvants permettent un retour au matériau initial. Des réactions chimiques, dues par exemple au contact avec des vapeurs acides ou basiques, ont aussi un impact sur la couleur d'émission de la poudre ou encore sur l'intensité de la fluorescence (Tong et al., 2014; Wang et al., 2016).

La taille des particules cristallisées peut également créer un décalage en longueur d'onde ou encore une variation de l'intensité du spectre mesuré. La variation en taille du cristal tend à modifier la rigidité de la structure, ce qui a un effet sur l'énergie de désexcitation lors du phénomène de fluorescence, et donc sur le spectre d'émission des particules. La présence de défauts cristallins sur de petits cristaux peut aussi être un facteur de désexcitation de la fluorescence (Gierschner et al., 2013).

Ces premières considérations permettent de faire un choix parmi les très nombreuses molécules AIEgènes, notamment à partir de leurs propriétés optiques. Dans le cadre des travaux de mise en forme des particules fluorescentes, il est important de comprendre leurs mécanismes biochimiques pour établir les critères satisfaisants d'un composé fluorescent à application biologique.

1.1.3 Biodisponibilité des FONs

Un principe actif (API) est le nom donné à une molécule présente dans un médicament à but curatif et/ou préventif. Les APIs rencontrent souvent des problèmes de biodisponibilité lorsqu'ils sont administrés par voie orale, sous forme de pommade ou en intraveineuse. La biodisponibilité d'une poudre synthétisée est intimement liée à la solubilité de la molécule et à son taux de dissolution (Li et al., 2016). On compte entre 70% et 90% de composés pharmaceutiques enregistrés par le BCS (système de classification des composés biopharmaceutiques) dont les molécules ont une très faible solubilité dans l'eau (Müller and Keck, 2012). Une méthode intéressante pour parvenir à augmenter la biodisponibilité de la poudre est la synthèse de nanoparticules ou de nanocristaux. Ces nanosystèmes peuvent pénétrer plus facilement les membranes biologiques et atteindre leur cible.

En effet, la surface spécifique de la particule est augmentée quand on diminue sa taille, ce qui augmente son taux de dissolution et donc au final améliore la biodisponibilité du composé. Ces différents paramètres sont mis en équation par Noyes-Whitney (Equation 1)

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS_{spé}}{Vh} (C_{sat} - C_t) \quad (\text{Eq 1}),$$

où dC/dt est le taux de dissolution du composé dont la concentration change en fonction du temps, D est le coefficient de diffusion, $S_{spé}$ la surface, V le volume de dissolution, h l'épaisseur de la couche de diffusion, C_{sat} la concentration à saturation, C_t la concentration à l'instant t .

Ainsi, les nanocristaux ont un meilleur taux de dissolution que les gros agrégats, puisqu'ils présentent une plus grande interface en raison de leur petite taille (Figure 7). Au final, une poudre nanométrique possède une bonne biodisponibilité. De par la réduction de la taille du cristal et de sa grande surface spécifique, elle possède une forte saturation de solubilité. La petite taille des nanoparticules des composés actifs et des polymères formant les APIs est donc bénéfique à leur pénétration à travers la membrane cellulaire.

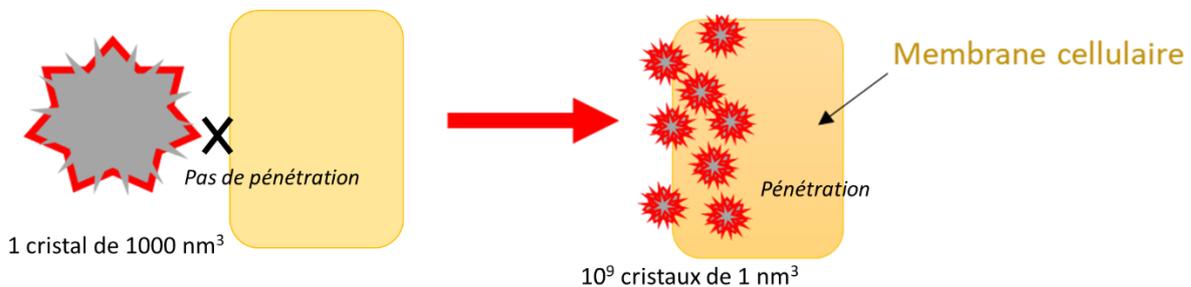


Figure 7 : Augmentation de la biodisponibilité d'un API par sa diminution de taille.

Il est possible d'évaluer l'efficacité des composés pharmaceutiques en caractérisant par différentes techniques les nanoparticules d'API synthétisées. Les mesures de calorimétrie permettent de détecter différents composés organiques au sein d'un même type de particules. Les présences de l'API et du polymère peuvent être détectées ainsi. Les mesures par RMN ou encore la spectroscopie par infrarouge donnent des informations précises quant aux structures moléculaires et aux interactions entre le l'API et son polymère. La surface des nanoparticules organiques peut être analysée par la spectrométrie de masse. Enfin, les techniques de microscopie électronique et la diffractométrie par laser sont couramment utilisées pour déterminer la taille et la distribution en taille des nanoparticules (Bhatia, 2016; Mourdikoudis et al., 2018).

1.1.4 Méthodes classiques de synthèse des FONs

En pharmacologie, les nanotechnologies sont employées dans de nombreuses applications médicales : elles peuvent être utilisées pour établir un diagnostic, pour des systèmes de libération de médicaments, pour des nanothérapies, pour mettre au point des matériaux d'implants ou encore des marqueurs biologiques.

Deux types de méthodes sont généralement considérés pour synthétiser des particules sub-nanométriques : le top-down (ou voie descendante) et le bottom-up (ou voie ascendante) (Figure 8). La première consiste à casser mécaniquement de gros cristaux par des techniques de broyage, d'homogénéisation en pression et de forte déformation. Des cristaux micrométriques sont soumis à des collisions à haute pression ou à des broyages mécaniques pour atteindre la taille de particules voulue. Cependant, ces méthodes descendantes sont souvent chronophages et peuvent polluer le produit, notamment à cause des outils de mécanosynthèse employés. La seconde technique produit de petites particules en partant de l'échelle de l'atome. Ce chemin de production offre un meilleur contrôle de la taille, de la morphologie, de la cristallinité de la particule synthétisée. De nombreuses techniques permettent la production de poudres nanométriques. On peut citer parmi ces méthodes de production : la précipitation par anti-solvant liquide, la fusion par émulsion, la précipitation par voie supercritique, la précipitation par évaporation, la micro-émulsion ou la pyrolyse-laser. Nous nous focaliserons dans la partie suivante sur la méthode de précipitation par anti-solvant.

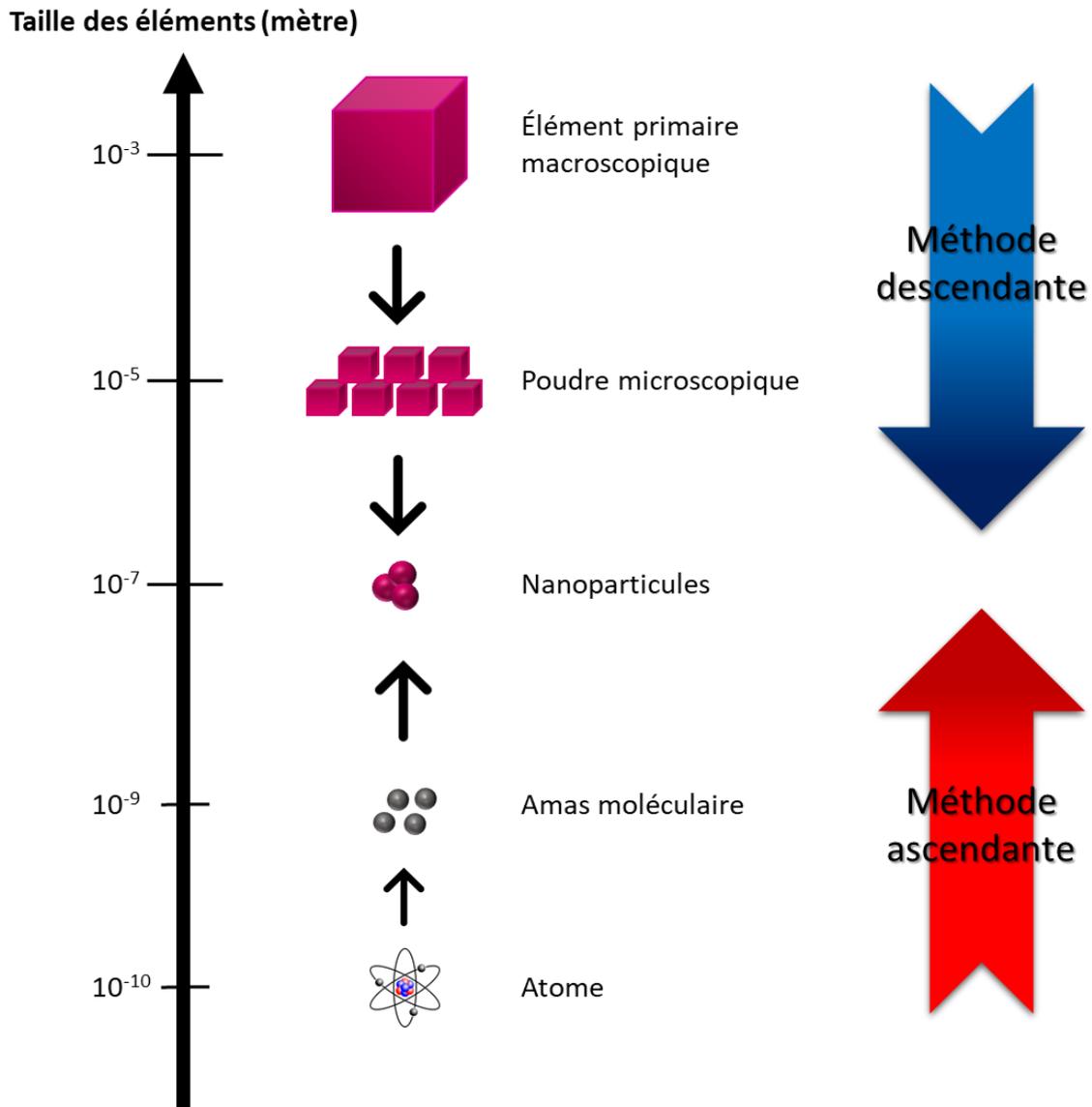


Figure 8 : Approches d'élaboration de nanoparticules.

1.1.4.1 Précipitation par anti-solvant liquide (LAS)

Les méthodes de synthèse anti-solvant sont basées sur le principe de précipitation d'un soluté en solution dans son solvant lors d'un mélange avec un anti-solvant. Une fois les conditions de sursaturation atteintes, surviennent dans un premier temps les phénomènes de nucléation (ou de germination), puis de croissance. La précipitation du soluté amène alors à la formation de nanocristaux dans le milieu solvant/anti-solvant. Le processus de nucléation est lié à la variation d'énergie libre dans le système faisant varier la taille du cristal formé. En d'autres termes, pour que la nucléation ait lieu, il faut dépasser une certaine barrière énergétique. Notons que les valeurs de la sursaturation et de la température ont des impacts importants sur la taille du cristal formé.

Une méthode dite conventionnelle est le LAS (Liquid Anti-Solvent) (Figure 9). Cette précipitation par voie liquide permet d'induire la précipitation du soluté en solution lors d'un mélange avec un liquide anti-solvant, dans lequel le soluté n'est pas soluble.

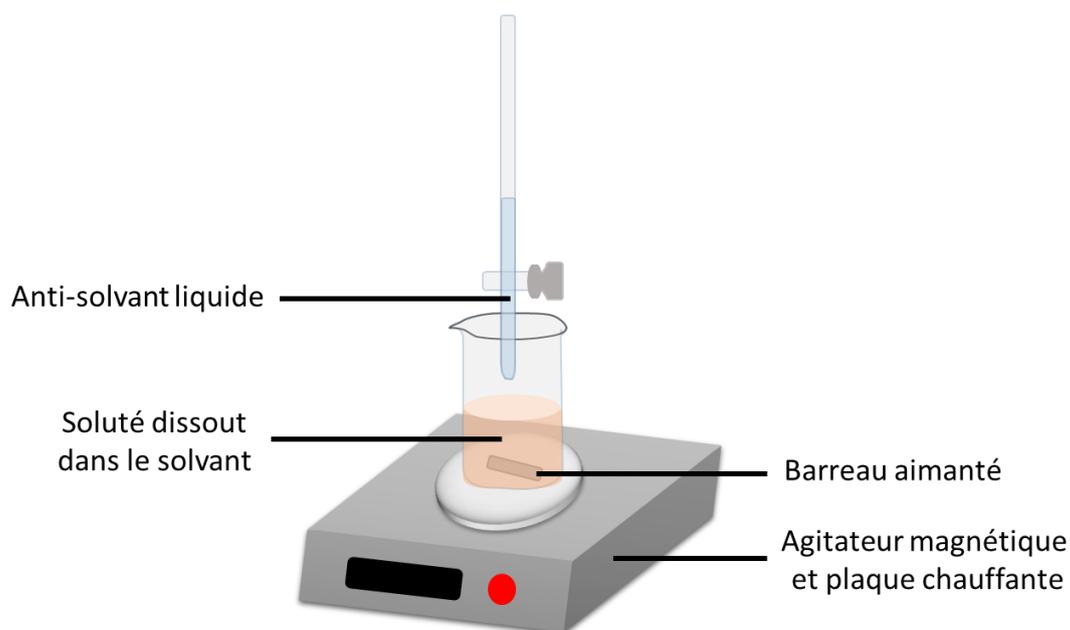


Figure 9: Schéma d'un procédé LAS.

Cette technique a montré son intérêt pour synthétiser des particules de petites tailles. Elle est pour cela utilisée très souvent dans l'industrie pharmaceutique. Une fois encore, grâce à une plus grande surface d'échange due à la formation de petites particules, la dispersion du composé dans l'eau est améliorée. Le nano-médicament a alors une meilleure biodisponibilité. Comparé aux techniques descendantes, le LAS est une technique facile et économique pour produire rapidement et en grande quantité de petites particules. (Djerafi et al., 2017; Thorat and Dalvi, 2016; Zu et al., 2014).

1.1.4.2 Mécanismes de précipitation

La force motrice de la nucléation est la sursaturation de la solution produite lors du mélange avec l'anti-solvant. La sursaturation ainsi que le champ de concentration sont des facteurs importants pour l'obtention de nanoparticules avec des distributions en tailles étroites.

Prenons le cas de la bétuline (Zhao et al., 2014). Une solution initiale de bétuline est préparée dans un bécher à différentes concentrations. Pour chaque expérience, un volume d'anti-solvant est choisi. Le volume d'anti-solvant ajouté est calculé pour que la concentration de la solution de bétuline soit la même que dans le mélange {solvant/anti-solvant}. L'expérience montre ici l'effet de la variation du rapport du volume de l'anti-solvant sur le volume du solvant (Figure 10). Une étude de la solubilité de la bétuline est faite pour chaque expérience afin de calculer la sursaturation dans le mélange. Les auteurs montrent alors l'effet de la sursaturation sur la taille des particules. On observe ici qu'à forte sursaturation, on obtient les plus petites particules.

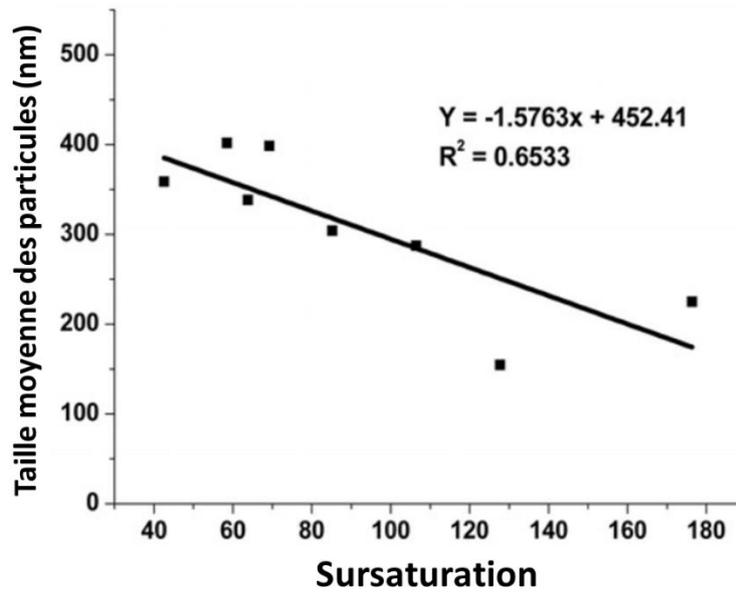


Figure 10 : Relation entre la sursaturation et la taille moyenne des particules (Zhao et al., 2014).

On remarque que de nombreux autres facteurs relatifs aux conditions de mélange ont un impact sur la taille des particules formées. On peut citer par exemple la température, la vitesse de rotation de l'agitateur magnétique, le temps de précipitation, la vitesse d'ajout de l'anti-solvant. Toutes ces données doivent être rigoureusement maintenues constantes lors de l'étude de l'impact d'un paramètre. Nous verrons dans le chapitre 4 quelques effets de ces paramètres expérimentaux sur la taille des particules synthétisées par notre procédé.

Le procédé LAS présente l'avantage d'une synthèse à pression atmosphérique et peut être réalisé sans chauffe du système. La précipitation des nanoparticules est issue d'une série de phénomènes ayant lieu lors du mélange. Les propriétés du composé final dépendent de l'uniformité de la sursaturation dans le mélange. La sursaturation est générée en réduisant la solubilité du produit en solution, généralement par refroidissement ou par l'ajout d'un anti-solvant. En effet, la vitesse de refroidissement et l'ajout d'anti-solvant influencent directement le niveau de sursaturation.

Lors de l'ajout d'un anti-solvant, le système entre dans une région métastable (Figure 11). La solution commence à sursaturer, c'est-à-dire qu'il y a plus de soluté en solution que prédit par la courbe de solubilité. Le phénomène de nucléation débute alors à la limite de la région métastable.

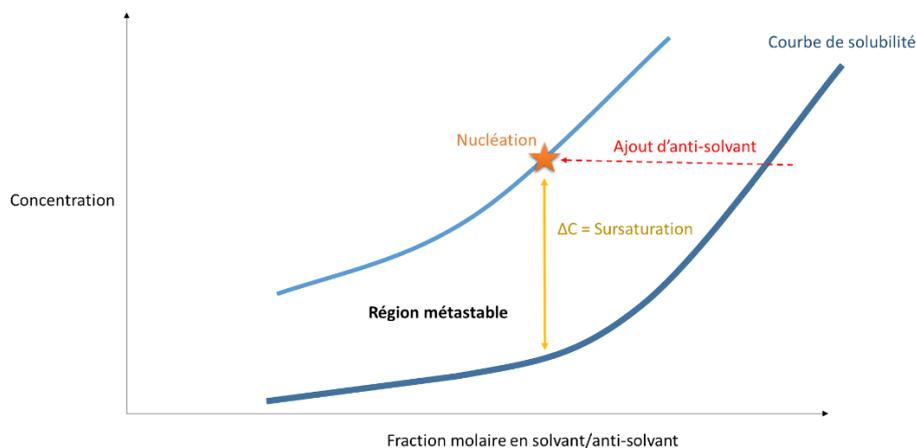


Figure 11 : Schéma du mécanisme de la nucléation lors de l'ajout d'anti-solvant.

Une fois cette barrière franchie, la cristallisation commence. On comprend facilement que la valeur de la sursaturation va impacter sur la taille, sur la morphologie, ainsi que sur la quantité des précipités. La sursaturation dicte les phénomènes de nucléation et de croissance des particules solides formées. Ainsi, à faible sursaturation, les cristaux ont une croissance plus rapide que leur nucléation, résultant en une large distribution de taille. En revanche, à forte sursaturation, c'est la nucléation qui domine la croissance. Les précipités formés sont alors de petite taille avec une étroite distribution en taille.

Pour optimiser le procédé, il est important de veiller au contrôle de la sursaturation, et plus particulièrement à la vitesse de création de cette sursaturation. C'est donc la vitesse d'ajout de l'anti-solvant liquide qui va gouverner les phénomènes de nucléation et de croissance. En effet, une vitesse d'ajout lente permet d'obtenir des cristaux de grande taille, puisque la croissance y sera favorisée. On peut parfois observer des croissances secondaires dans les précipités formés. Dans le cas où l'ajout de l'anti-solvant est rapide, on obtient des cristaux de plus petites tailles, puisque le phénomène de nucléation a consommé toutes les molécules, empêchant le phénomène de croissance.

La littérature a montré que l'augmentation de la concentration de la solution initiale amène en général à une diminution en taille des nano-cristaux formés. Une sollicitation extérieure au système peut permettre la réduction en taille des cristaux récoltés : comme l'utilisation des ultra-sons (Fontana et al., 2018). En effet, ces ultra-sons induisent une intensification du mélange par cavitation. Ceci a pour effet d'augmenter la sursaturation. Le résultat amène à une faible taille des particules et une faible dispersion de cette taille. Rahim l'a montré en synthétisant des nanocristaux d'acéclofénac d'une centaine de nanomètres (Rahim and Sadiq, 2017) (Figure 12) :

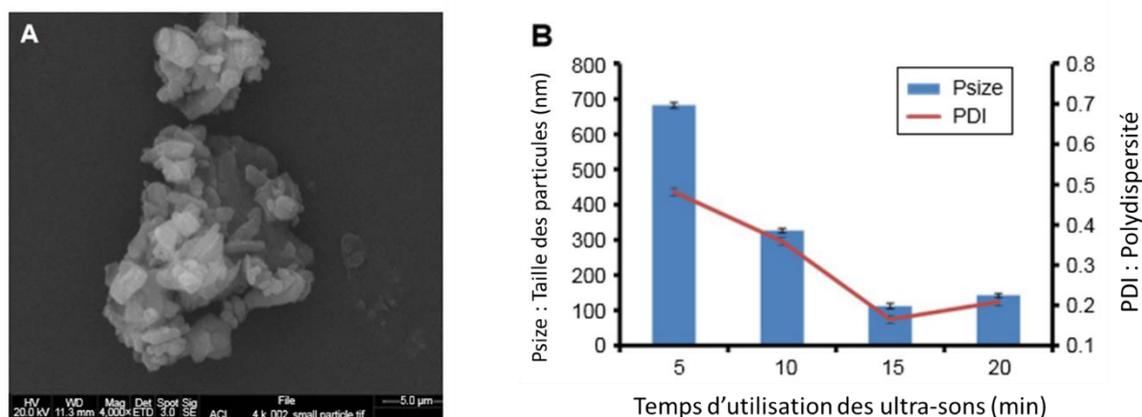


Figure 12 : A) Image de l'acéclofénac avant mise en forme.

B) Effet du temps d'utilisation des ultra-sons dans le procédé LAS sur la taille des particules d'acéclofénac (Rahim and Sadiq, 2017).

En résumé, à l'inverse des techniques descendantes, la précipitation obtenue à l'aide d'un anti-solvant liquide permet de former facilement des précipités d'une taille inférieure à la centaine de microns. Cependant, ce procédé présente des inconvénients incompatibles avec les applications pharmaceutiques : les particules formées sont relativement grandes (souvent > 1 micron) avec une large dispersion en taille, il est difficile de contrôler le polymorphisme cristallin, des résidus de solvant sont souvent présents dans la poudre finale et une étape de séchage est nécessaire (Tableau 1).

Les industries chimiques et pharmaceutiques fabriquent des produits essentiels pour la société actuelle. Cependant, ces entreprises font face à des challenges importants dans le développement de méthodes de mise en forme et de cristallisation pour la production des nanoparticules.

Tableau 1 : Récapitulatif des inconvénient du procédé LAS.

Taille des particules synthétisées	<ul style="list-style-type: none"> • Très faible contrôle de la taille des particules. • Large distribution en taille.
Morphologie des particules synthétisées	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle difficile du polymorphisme cristallin.
Élimination du solvant	<ul style="list-style-type: none"> • Traces de solvant résiduel.
Procédé	<ul style="list-style-type: none"> • Etape additionnelle nécessaire pour le séchage de la poudre obtenue.

À l'inverse, les procédés d'intensification offrent des avancées considérables dans les méthodes de synthèse et de mise en forme. Les procédés impliqués sont généralement constitués d'étapes d'opérations de réaction ou de séparation qui ont lieu en une seule unité, résultant d'un meilleur rendement, d'un procédé plus propre et économique. Ces techniques donnent accès à une meilleure qualité de mélange, augmentant les transferts de masse et de chaleur, les cinétiques de réaction et les rendements. Ces améliorations se traduisent technologiquement par l'emploi de moins de matériels et conduisent à une diminution de l'empreinte carbone. Le coût ainsi que les risques chimiques liés à ces outils industriels sont également diminués.

Comme nous avons pu le voir dans cette partie, le mélange est un des mécanismes clés du procédé de précipitation. Pour pallier les faiblesses des méthodologies classiques, il est intéressant de remplacer l'anti-solvant liquide par un anti-solvant supercritique. En effet, les fluides supercritiques possèdent d'excellentes propriétés de diffusion, une densité proche d'un liquide et une viscosité proche de celle d'un gaz, conduisant généralement à de très bonnes performances de mélange.

Nous présentons ci-après les deux stratégies d'intensification considérées pour la production de FONs : l'emploi des fluides supercritiques et la technologie microfluidique.

1.2 Première stratégie d'intensification : l'utilisation des fluides supercritiques

L'emploi des fluides supercritiques dans l'industrie pharmaceutique a considérablement augmenté lors des dernières décennies. Le remplacement des solvants conventionnels par le sc-CO₂ (dioxyde de carbone supercritique) permet de répondre aux problèmes des déchets chimiques et des rejets de solvants, très souvent polluants. Cette technique offre d'autres avantages, comme l'amélioration de la stabilité des produits ainsi que la biodisponibilité des molécules pharmaceutiques actives appelées APIs. Comme on va le voir, l'utilisation du sc-CO₂ limite les coûts énergétiques des technologies de synthèses conventionnelles en travaillant à des températures relativement faibles. La micronisation des particules est un avantage incontestable de ces technologies qui permettent, de manière générale, d'obtenir des particules nanométriques en utilisant un fluide supercritique.

Les procédés employant les fluides supercritiques donnent la possibilité de travailler sur un nouveau paramètre expérimental : la pression. Dans des conditions de hautes pressions, les temps de mélange sont considérablement réduits, ce qui a pour conséquence d'augmenter très rapidement la sursaturation du mélange, bien plus vite qu'en procédé LAS. Les particules ainsi formées peuvent présenter des tailles beaucoup plus petites avec des distributions en taille étroites.

1.2.1 Définition

Un composé chauffé au-delà d'une température critique et compressé au-dessus d'une pression critique est appelé fluide supercritique. Le diagramme pression-température (p, T) donne les conditions pour lesquelles un composé est solide, liquide, gazeux ou supercritique (Figure 13). Nous présentons ici le diagramme de phase du dioxyde de carbone que nous emploierons en conditions supercritiques dans ce travail de thèse.

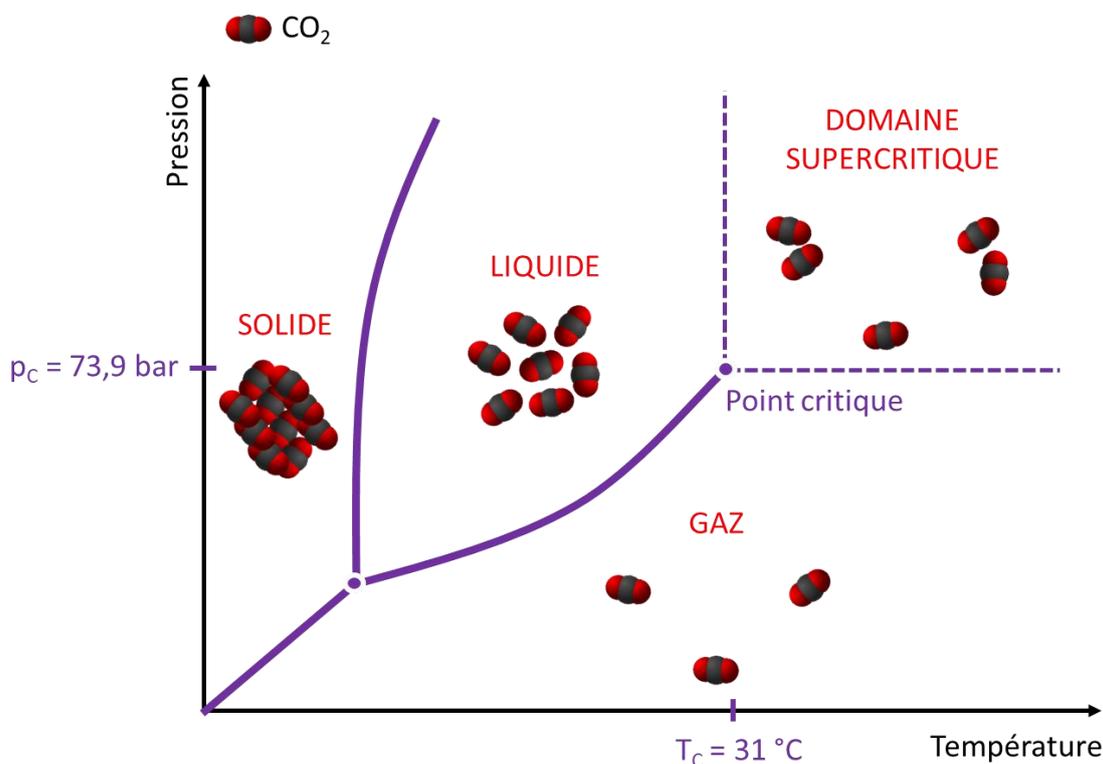


Figure 13 : Diagramme (p, T) du CO₂.

Sur ce diagramme, les états liquide et gazeux sont séparés par la courbe d'équilibre liquide-vapeur (aussi appelée courbe de vaporisation). Elle est définie par les couples de coordonnées pour lesquelles le liquide et le gaz coexistent. On note qu'elle commence au point triple et se termine en un autre point défini : le point critique. La pression critique (p_c) et la température critique (T_c) définissent ce point.

Afin de bien comprendre les propriétés du fluide aux conditions critiques, nous nous proposons de décrire l'état du système du point triple au point critique. Considérons une substance placée dans une cellule fermée. Au point triple, une phase liquide coexiste avec une phase gaz et une troisième phase à l'état solide. En augmentant la température et la pression de la cellule en suivant rigoureusement la ligne d'équilibre liquide-vapeur à densité fixée, la phase solide disparaît. Les phases liquide et gaz sont séparées par un ménisque, mettant bien en évidence les deux phases en présence à l'équilibre. Notons aussi que la forte densité du liquide fait que la phase liquide baigne la partie inférieure de la cellule du fait de la gravité, tandis que la phase gaz évolue dans la partie supérieure.

En se rapprochant du point critique, la densité du gaz augmente rapidement, tandis que la densité de la phase liquide diminue. Aux coordonnées critiques, le ménisque séparant les deux phases disparaît, les deux phases sont identiques et forment à présent une unique phase « supercritique », possédant une densité proche de celle d'un liquide et une viscosité s'apparentant à un gaz (Tableau 2). Cette

phase existe ensuite pour des températures et des pressions supérieures au point critique, comme indiqué sur le diagramme (p, T) (Figure 13).

Tableau 2 : Ordres de grandeur des propriétés des gaz, des fluides supercritiques et des liquides.

	Densité : ρ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)	Viscosité : η (Pa.s)
Gaz	$0,1 < \rho < 1$	$10^{-5} < \eta < 10^{-4}$
Fluide supercritique	$10^2 < \rho < 10^3$	$10^{-5} < \eta < 10^{-4}$
Liquide	$10^2 < \rho < 10^3$	$10^{-4} < \eta < 10^{-3}$

Par opposition aux liquides, les fluides supercritiques sont compressibles. Comme le montre la figure 14, la densité du fluide change drastiquement autour des coordonnées critiques du CO₂. Il est donc aisé de modifier la densité en ajustant la pression et/ou la température.

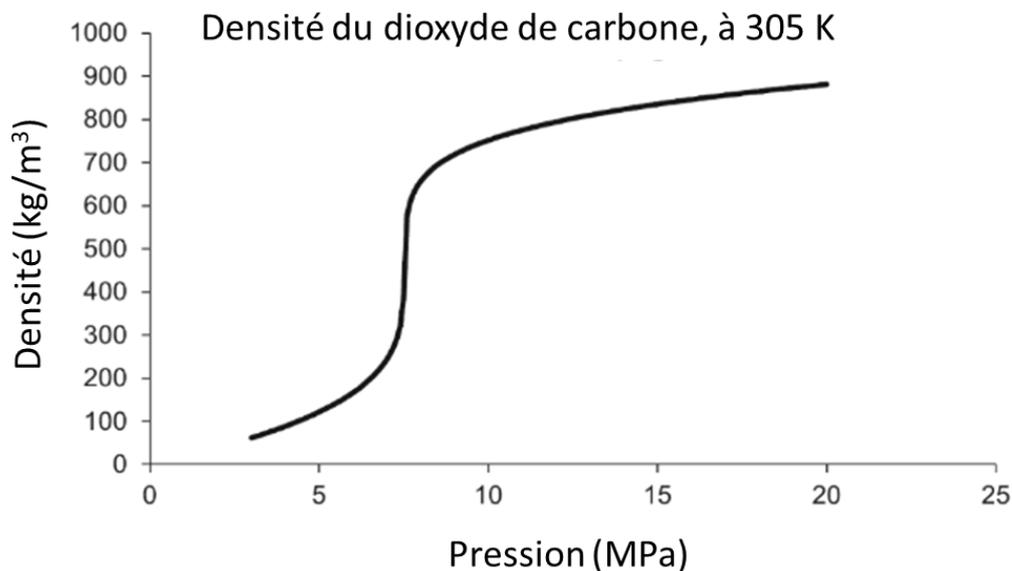


Figure 14 : Variation de la densité du CO₂ en fonction de sa pression et proche de sa température critique.

1.2.2 Dioxyde de carbone

Le CO₂ supercritique (sc-CO₂) est l'un des meilleurs choix pour jouer le rôle d'un anti-solvant dans un procédé de mise en forme de particules. Souvent employé dans des applications agroalimentaires ou pharmaceutiques, ce fluide supercritique est incolore, inodore et il est disponible naturellement en très grande quantité et à faible prix (environ 1 €.kg⁻¹). Ses coordonnées critiques relativement faibles (31 °C et 73,9 bar) réduisent le coût final d'utilisation.

Cependant, pour de nombreux polymères et molécules organiques employés en pharmaceutique, le sc-CO₂ est un mauvais solvant. La solubilité des molécules organiques fluorescentes (des APIs et d'autres molécules organiques) dans le sc-CO₂ dépend de la densité du fluide supercritique, et plus généralement de l'interaction entre la molécule organique et le CO₂ (polarité, polarisabilité par unité de volume). Ainsi, le sc-CO₂ dissout sélectivement les lipides alors qu'ils sont insolubles dans l'eau. Seront considérées comme hautement solubles dans le sc-CO₂ les molécules non polaires et légères, notamment en raison de leur forte pression de vapeur saturante. *A contrario*, les molécules lourdes et

polaires seront difficilement solubilisées dans le sc-CO₂. Ceci rend le sc-CO₂ miscible avec un grand nombre de solvants organiques (Kalani and Yunus, 2011).

Enfin, le sc-CO₂ peut être utilisé dans les procédés de récupération, ce qui en fait un bon candidat comme milieu de séchage dans les solutions liquides, dans les suspensions ou dans les dispersions contenant des solvants organiques.

1.2.3 Les procédés d'élaboration de poudres organiques en conditions supercritiques

Plusieurs procédés de préparation de poudres pour une administration sous la forme de particules sub-micrométriques utilisent le sc-CO₂. La maîtrise des phénomènes de nucléation et de croissance à travers la connaissance de leurs cinétiques sont cruciales pour un bon contrôle de la taille et de la morphologie des particules formées.

Comme il l'a été rappelé précédemment, le sc-CO₂ apporte des avantages économiques et environnementaux par rapport aux procédés de précipitation par voie liquide. Le tableau 3 donne une liste non exhaustive des méthodes populaires actuelles pour la synthèse de nanocomposés organiques avec des fluides supercritiques. En fonction du procédé, le sc-CO₂ peut jouer le rôle de solvant, d'anti-solvant ou encore de milieu de réaction pour faire précipiter le soluté préalablement solubilisé dans une solution organique.

Dans le cas où le sc-CO₂ joue le rôle de solvant, la solubilité du soluté dans ce fluide doit être relativement élevée. Or, le sc-CO₂ est très peu polaire. Bien qu'il permette de dissoudre bon nombre de molécules organiques comme les lipides, le CO₂ ne peut pas dissoudre les molécules porteuses de groupements polaires. C'est notamment le cas avec les sels, les sucres et les protéines. Pour s'affranchir de cette faible compatibilité, il est parfois nécessaire d'ajouter un co-solvant au système. Ce co-solvant doit être miscible avec le CO₂ et a pour but d'augmenter le pouvoir solubilisant du mélange (Dolgoplova et al., 2017).

Dans d'autres systèmes, le sc-CO₂ est utilisé comme anti-solvant du soluté à faire précipiter. Cette méthode est souvent utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour bénéficier des faibles solubilités des principes actifs dans le sc-CO₂. Les principales techniques de synthèse de poudres organiques utilisant le sc-CO₂ sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Techniques de synthèse de poudres utilisant le sc-CO₂.

Rôle du sc-CO ₂	Procédé	Caractéristiques
Solvant	RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solutions)	Une solution supercritique mélangée au sc-CO ₂ est pulvérisée dans le réacteur par dépressurisation.
	RESOLV (Rapid Expansion of supercritical solution into a liquid SOLvent)	Une solution supercritique mélangée au sc-CO ₂ est pulvérisée dans une solution à pression ambiante.
Anti-solvant	GAS (Gas Anti-Solvent)	Le sc-CO ₂ est injecté et expansé dans un réacteur fermé contenant initialement une solution.
	SAS (Supercritical Anti-Solvent)	Une solution est injectée en continu dans un réacteur pressurisé par le sc-CO ₂ .
Solvant & Anti-solvant	SAA (Supercritical Assisted Atomization)	Atomisation de gouttelettes {solvant organique/sc-CO ₂ } sous l'augmentation de la pression.

Dans cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au procédé SAS avec l'utilisation du CO₂ comme anti-solvant.

1.2.3.1 Procédé anti-solvant supercritique : SAS

Le procédé SAS est une technologie permettant de produire des microparticules et des nanoparticules à des conditions de températures relativement faibles. Cette particularité est compatible avec la synthèse de composés organiques, souvent peu stables au-delà de 80/100 °C.

Cette technique est basée sur l'emploi du sc-CO₂ comme anti-solvant. Il s'agit ici de faire précipiter un soluté préalablement solubilisé dans un solvant, puis de mélanger la solution avec l'anti-solvant. Tout comme dans le cas du LAS, un fort rapport molaire d'anti-solvant dans le système provoque une diminution de la solubilité du soluté dans le milieu {solvant/anti-solvant}. Ceci amène à une plus grande sursaturation, et donc à la précipitation des molécules du soluté. L'anti-solvant supercritique doit être miscible dans un solvant. Puis, l'anti-solvant supercritique peut être rapidement mélangé avec le solvant, ce qui a pour effet d'accélérer les processus de nucléation et de croissance, formant finalement des particules de tailles plus petites. La grande diffusivité du fluide supercritique apporte un meilleur mélange avec le solvant permettant de diminuer de plusieurs ordres de grandeur le temps de mélange (de 10⁻³ à 10⁻⁴ s) (Zhang, 2019). Ici encore, le choix du sc-CO₂ s'avère technologiquement intéressant : il remplace les solvants organiques souvent très polluants et dont l'utilisation nécessite des étapes de post-traitement pour purifier le produit final.

Dans le cas du procédé SAS (Figure 15), le CO₂ supercritique est pompé à l'intérieur d'une cellule à haute pression jusqu'à l'obtention de la pression de consigne. Puis, la solution contenant le soluté et son solvant organique est injectée dans le réacteur. Le mélange rapide associé à une faible solubilité du soluté dans le mélange conduit généralement à une nucléation rapide et homogène. Les particules issues de cette précipitation sont récoltées à l'intérieur de la cellule, tandis que le résidu de solvant est enlevé du réacteur par le CO₂.

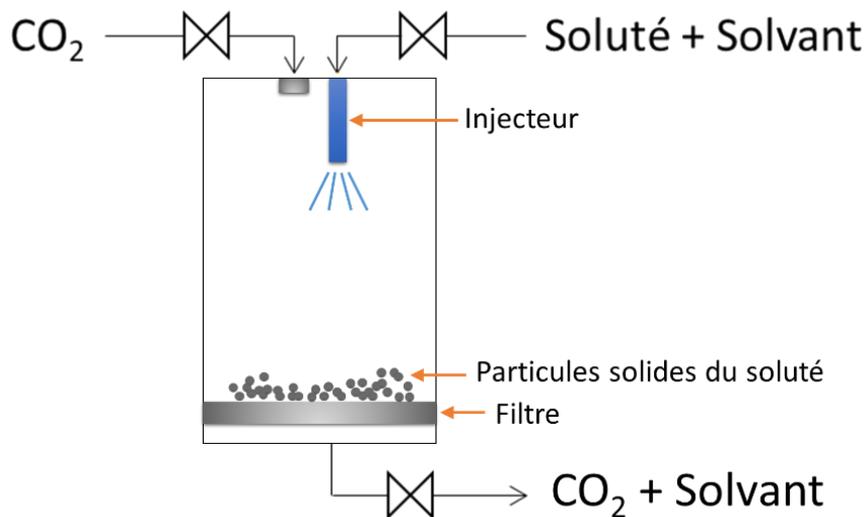


Figure 15 : Procédé SAS schématisé.

Le procédé semi-continu SAS présente de nombreux avantages comparé à son équivalent en phase liquide (LAS). Contrairement aux voies classiques, aucune étape supplémentaire de purification (filtration, centrifugation) n'est nécessaire. La poudre est récupérée à un haut taux de pureté simplement grâce au séchage continu avec le CO₂ supercritique qui permet d'éliminer les résidus de solvant présent dans la poudre. Cela permet aussi d'augmenter le temps d'opération qui ne dépend que de la capacité du filtre à récolter la poudre. Quant à l'anti-solvant lui-même, il est évacué du système lors de la dernière étape de dépressurisation sans ajout d'aucun nouvel élément.

Un travail à un fort rapport {anti-solvant:solvant} conduit généralement à des sursaturations importantes et donc à des particules de plus petites tailles.

Ce point est important pour expliquer l'enjeu technologique de la récupération des poudres en SAS. Dans les conditions d'un mélange intensif, le transfert de masse est augmenté et de plus petites particules sont formées. La zone de collecte des poudres est obstruée beaucoup moins rapidement et une plus grande quantité de poudres peut être récupérée avant un éventuel bouchon dans le système. Toujours dans le but d'éviter la formation de gros agrégats pouvant bloquer le procédé, des techniques additionnelles ont été mises au point. Citons par exemple les ultra-sons qui produisent des ondes de 10 à 100 kHz dans le but d'augmenter le transfert de masse entre le fluide supercritique et la solution (Sheng et al., 2014; Thorat and Dalvi, 2014). L'emploi d'un mélange de solvants a été étudié de nombreuses fois pour améliorer la solubilité du soluté et de réduire la taille des particules formées (De Marco et al., 2015; Malwade and Qu, 2019).

Cette technologie a montré de nombreuses fois sa capacité à produire des nanoparticules de taille contrôlée. Notons que d'autres molécules ont également été employées comme anti-solvant supercritique dans le procédé SAS : sc-NH₃, sc-N₂, ...

Tableau 4 : Utilisation du sc-CO₂ comme anti-solvant pour la synthèse de composés organiques par SAS.

Solvant	Soluté	Taille des particules synthétisées	Référence
Diméthylsulfoxyde	Lysozyme	60-80 nm	(Chang et al., 2008)
N-méthylpyrrolidone	Ampicilline	100-400 nm	(Tenorio et al., 2007)
Méthanol	Atorvastatine	150-400 nm	(M.-S. Kim et al., 2008)
Acétate d'éthyle	Éthyle cellulose	300 nm	(Djerafi et al., 2015)
N-méthylpyrrolidone	Tétracycline	600 nm	(Reverchon and Della Porta, 1999)
Éthanol	Taxifoline	700-4000 nm	(Zu et al., 2012)
Dichlorométhane	PLLA	1,5 µm	(Reverchon et al., 2000)
Tétrahydrofurane	Sulfasalazine	100 µm	(Wu and Su, 2017)

La grande majorité des molécules organiques fluorescentes est peu soluble dans le sc-CO₂ tandis qu'elles se solubilisent très bien dans des solvants organiques.

Cependant le choix d'un solvant n'interagissant pas sur la structure de la molécule paraît nécessaire pour les procédés anti-solvant. Les agents pharmaceutiques choisis doivent être solubles dans le solvant organique, qui lui-même doit être miscible avec le fluide supercritique. Tout ceci impose une limitation dans le choix du duo {solvant/soluté}. De manière générale, les molécules biomédicales sont solubles dans les solvants organiques polaires comme le DMSO ou le THF, solvants couramment employés dans les procédés SAS.

1.2.3.2 Impact des conditions opératoires sur la taille des particules

Dans le procédé SAS, il est possible de jouer sur de nombreuses conditions opératoires, comme la pression, la géométrie du réacteur, les débits d'injections des fluides, etc. Les propriétés des fluides supercritiques comme la densité, la viscosité, la diffusivité sont autant de grandeurs pouvant être ajustées en faisant simplement varier la température et/ou la pression du système pendant le processus. Ces conditions sont parfois difficiles à contrôler ce qui va directement affecter la qualité du

produit final. Nous allons voir dans cette partie quelques résultats contradictoires employant la technologie SAS.

- **Pression**

D'une manière générale, dans les conditions d'un mélange monophasique supercritique, la diminution de la pression amène à une baisse de la solubilité du soluté dans le fluide supercritique. La sursaturation est alors plus élevée et les particules produites ont une plus petite taille qu'aux hautes pressions. Toutefois, des études ont montré que les changements de pression n'ont aucun impact sur la taille des particules synthétisées.

Les travaux de Zhang sur des nanoparticules de PLLA montrent une diminution de taille pour une augmentation de la pression de 160 bar à 190 bar. Puis, une augmentation de la taille des particules en montant à 220 bar (Figure 16).

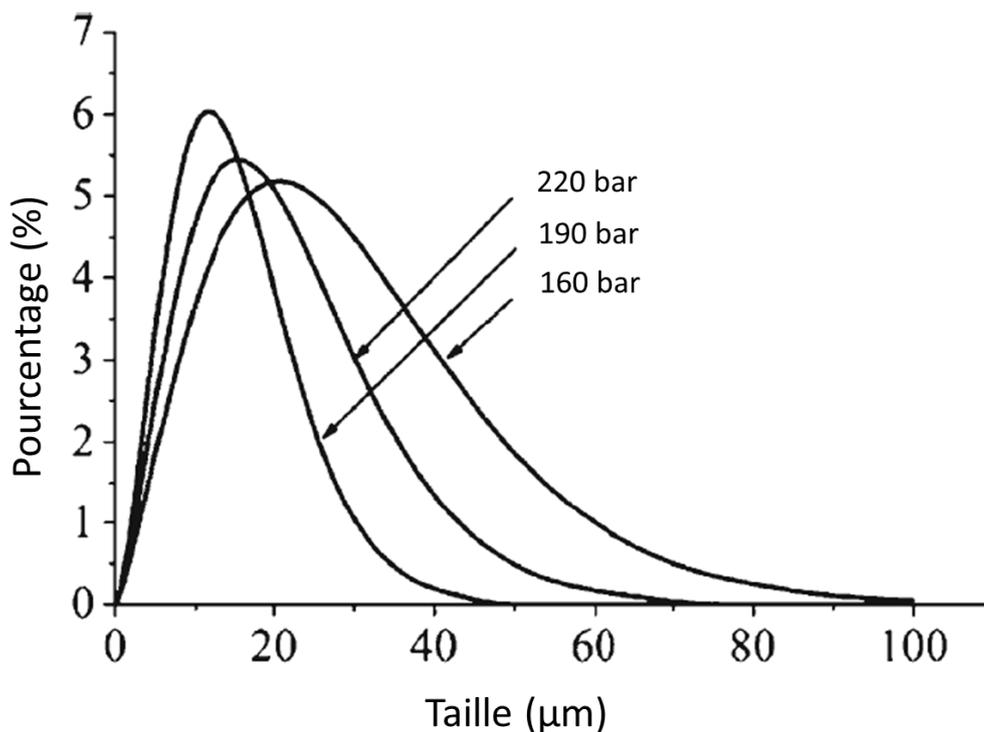


Figure 16 : Distribution en taille de particules de PLLA mises en forme par SAS pour différentes pressions (Zhang et al., 2013).

- **Température**

Tout comme la pression, la température affecte la densité du fluide supercritique, et donc le transfert de masse entre le solvant organique et le fluide supercritique. De nombreuses études montrent qu'à pression constante, l'augmentation de la température tend à augmenter la taille des particules. La solubilité plus élevée aux hautes températures explique ce phénomène : la sursaturation y est plus élevée, ce qui conduit à la formation de particules plus agglomérées, ainsi qu'à une forte croissance de cristaux et donc à de plus grosses particules (Montes et al., 2018; Reverchon et al., 2003).

Cependant, l'impact de la température est à mettre en lien avec le choix du solvant et du soluté. D'autres études n'observent donc pas de variation significative de la taille des particules pour certains systèmes (He et al., 2006; Reverchon and Della Porta, 1999).

Notons aussi que pour ces applications, la gamme de température de travail est relativement étroite en vue de ne pas dégrader le soluté organique possédant un point de fusion souvent inférieur à 80 °C.

- **Concentration du soluté dans la solution initiale**

La concentration du soluté dans la solution initiale joue significativement sur la taille des particules formées. Cependant, des résultats antagonistes ont été rapportés dans la littérature, selon le système étudié. Certains travaux montrent que la diminution de la concentration initiale mène à la production de particules petites et proches en taille. Ceci peut être expliqué par le fait qu'en diminuant la concentration, la sursaturation du soluté dans le mélange n'est atteinte que tardivement. Au final, la précipitation est retardée et le phénomène de nucléation domine la croissance, produisant ainsi des particules de petite taille. Reverchon a montré qu'en fonction du système étudié, l'impact de la concentration sur la taille est plus ou moins marqué.

Les particules d'acétate d'euprécium (EuAc) voient leur taille augmenter de 2000 % pour des concentrations allant de 100 à 300 mg/mL. En revanche, les particules d'acétate de gadolinium (GdAc) n'augmentent que de 100 %. D'après les auteurs, la différence de structures chimiques affecte la croissance des particules (Reverchon et al., 2002) (Figure 17).

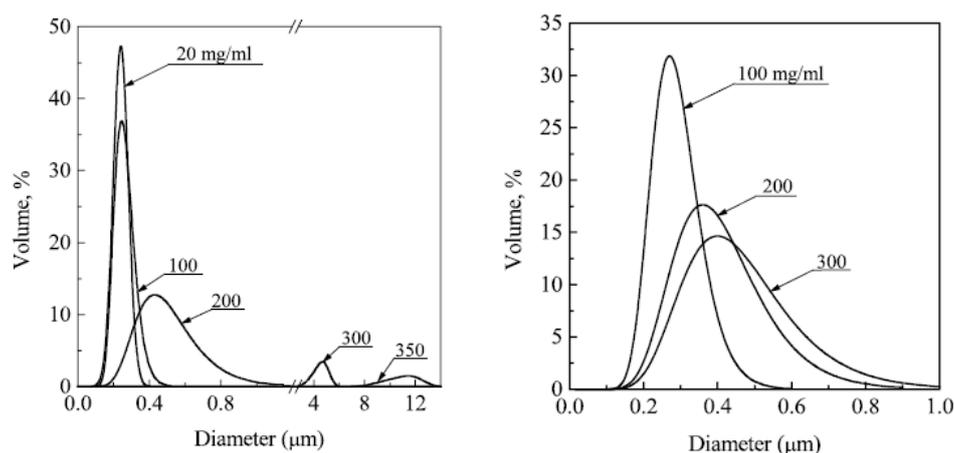


Figure 17 : Distributions en taille des particules de GdAc (à gauche) et de EuAc (à droite) en fonction de la concentration initiale de la solution (Reverchon et al., 2002).

En conclusion, la concentration de la solution initiale peut avoir deux effets opposés. D'un côté, plus la concentration est élevée et plus la sursaturation conduit à une nucléation rapide et homogène, et donc une petite taille de particules et d'étroites distributions en taille. D'un autre côté, une forte concentration peut aussi causer une condensation plus élevée et donc augmenter la taille des particules et leur distribution en taille (Montes et al., 2013).

- **Débits d'injection du solvant et du CO₂ et fraction molaire en CO₂**

Enfin, les débits du sc-CO₂ et de la solution sont d'importants paramètres contrôlant la variation des tailles des particules synthétisées. De manière générale, l'augmentation du débit de CO₂ induit une diminution de la taille des particules, puisque le rapport solvant:anti-solvant varie. À de forts débits, le système présente des écoulements turbulents, améliorant les performances du mélange avec un transfert de masse très marqué. Plus ce débit sera important, plus la sursaturation sera élevée et plus la production de petites particules sera importante (Bakbakhhi et al., 2013; Martín and Cocero, 2004).

- **Géométrie du réacteur**

La taille du réacteur et sa géométrie sont également des facteurs affectant la taille des particules créées. En effet, plus le diamètre de l'injecteur sera petit et plus le jet de la solution sera rapide, favorisant un temps de mélange court. Toutefois, dans certaines études, ce paramètre n'influe pas sur la taille ni sur la morphologie de la particule synthétisée (Reverchon et al., 2003).

Miguel a obtenu des réponses différentes en fonction du système étudié. Dans le cas de la mise en forme du lycopène, aucune variation en taille n'a été observée en modifiant la géométrie du réacteur SAS. En revanche, d'importantes variations en tailles et en morphologies ont été observées dans le cas de la lutéine (Miguel et al., 2008, 2006).

En résumé, le procédé SAS permet d'obtenir de petites particules mais il apparaît que la variation des paramètres opératoires entre plusieurs expériences amène parfois à des résultats contradictoires. Le contrôle des conditions opératoires et donc le contrôle de la qualité du mélange semble être un point sur lequel il est possible de jouer pour améliorer le procédé, toujours dans l'optique de synthétiser les poudres les plus fines et avec une grande reproductibilité pour des applications biologiques. Pour cela, différentes options sont possibles. Nous avons choisi dans ce travail de diminuer la taille du procédé SAS classique. Ce redimensionnement permet d'introduire la technologie microfluidique déjà très utilisée dans l'industrie pharmaceutique. En effet, une diminution de la taille des réacteurs apporte un meilleur contrôle des conditions opératoires et une intensification des transferts.

1.3 Seconde stratégie d'intensification : la microfluidique

Nous avons montré précédemment l'intérêt d'employer les fluides supercritiques afin de bénéficier de leurs propriétés particulièrement intéressantes pour le mélange dans le cas de procédés anti-solvants pour la mise en forme de composés organiques. Afin d'intensifier à nouveau les procédés de cristallisation, nous proposons de les réaliser dans des réacteurs microfluidiques. Cette stratégie d'intensification a montré son intérêt dans de nombreux domaines (Figure 18). Les systèmes microfluidiques sont uniques de par leurs dimensions. La technologie microfluidique est couramment utilisée dans des applications utilisant de faibles volumes de produits chimiques (généralement entre le microlitre [10^{-6} L] et le nanolitre [10^{-9} L], mais parfois même jusqu'à l'attolitre [10^{-18} L]). Les canaux microfluidiques font quelques dizaines à plusieurs centaines de micromètres de diamètre (Fontana et al., 2016; Whitesides, 2006).

Le concept du « lab on a chip » (LOC) propose d'utiliser la microfluidique comme un micro-outil permettant de réunir de manière automatisée toutes les étapes d'une expérience scientifique sur une plateforme de petite taille. Les LOC sont souvent décrits comme une version miniaturisée d'un laboratoire. Ces micro-paillasse permettent de nombreuses opérations comme la synthèse de particules, la séparation de produits, le traitement de matériaux, l'étude d'une cinétique et la caractérisation d'un système.

Contrairement aux méthodes conventionnelles, les réacteurs microfluidiques présentent de nombreux avantages dus à leurs géométries de petites dimensions. Les échanges de matière et de chaleur lors des mélanges des fluides y sont facilités et une meilleure reproductibilité des résultats est constatée pour ces systèmes. Enfin, de nouveaux outils de caractérisation *in situ* sont désormais compatibles avec beaucoup de systèmes microfluidiques constitués de matériaux transparents (Anton et al., 2012; Dev et al., 2011).

1.3.1 Microfluidique & biochimie

La microfluidique s'est démocratisée dans les domaines de la pharmaceutique et de la médecine (Figure 18). Elle a permis l'élaboration de technologies qui sont très utilisées aujourd'hui. Cette technologie est employée dans presque tous les domaines de la recherche. Elle est impliquée dans de très nombreux domaines scientifiques et industriels à la pointe. On retrouve la microfluidique à la fois dans les instituts de recherche publique, dans les entreprises pharmaceutiques et de biotechnologie, ainsi que dans les hôpitaux et les centres médicaux.

Marché de la microfluidique (2019) (en milliard de USD)

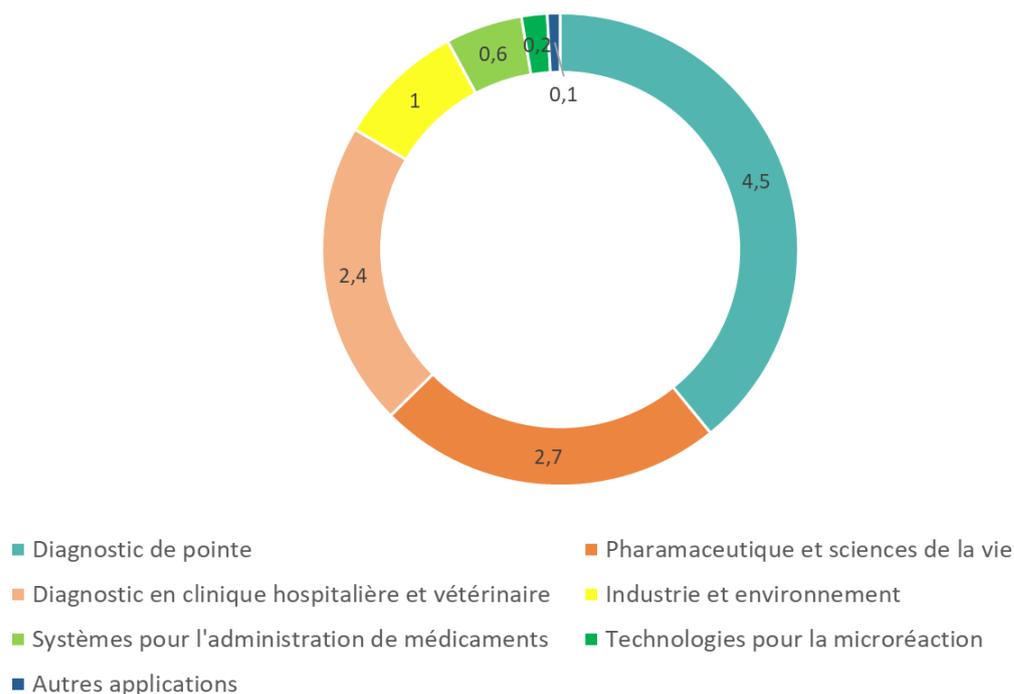


Figure 18 : Marché de la microfluidique (par secteur) (Yole Développement, 2020).

Le marché mondial de la microfluidique devrait atteindre les 44 milliards de dollars américains en 2025 (Figure 19). Cette projection s'explique par les nombreux avantages de la technologie microfluidique. Elle permet de réaliser de nombreux tests en un temps court et elle consomme peu de produits, ce qui la rend plus rentable que d'autres techniques macrométriques. Elle s'insère dans de nombreuses applications : miniaturisation d'équipements pour diagnostic *in vitro*, synthèse de médicaments, étude de réactions chimiques. La nécessité d'effectuer des diagnostics de maladies toujours plus nombreux et toujours plus rapides explique une tendance marquée par une augmentation du marché de la microfluidique de 20 % sur la période 2020-2025.

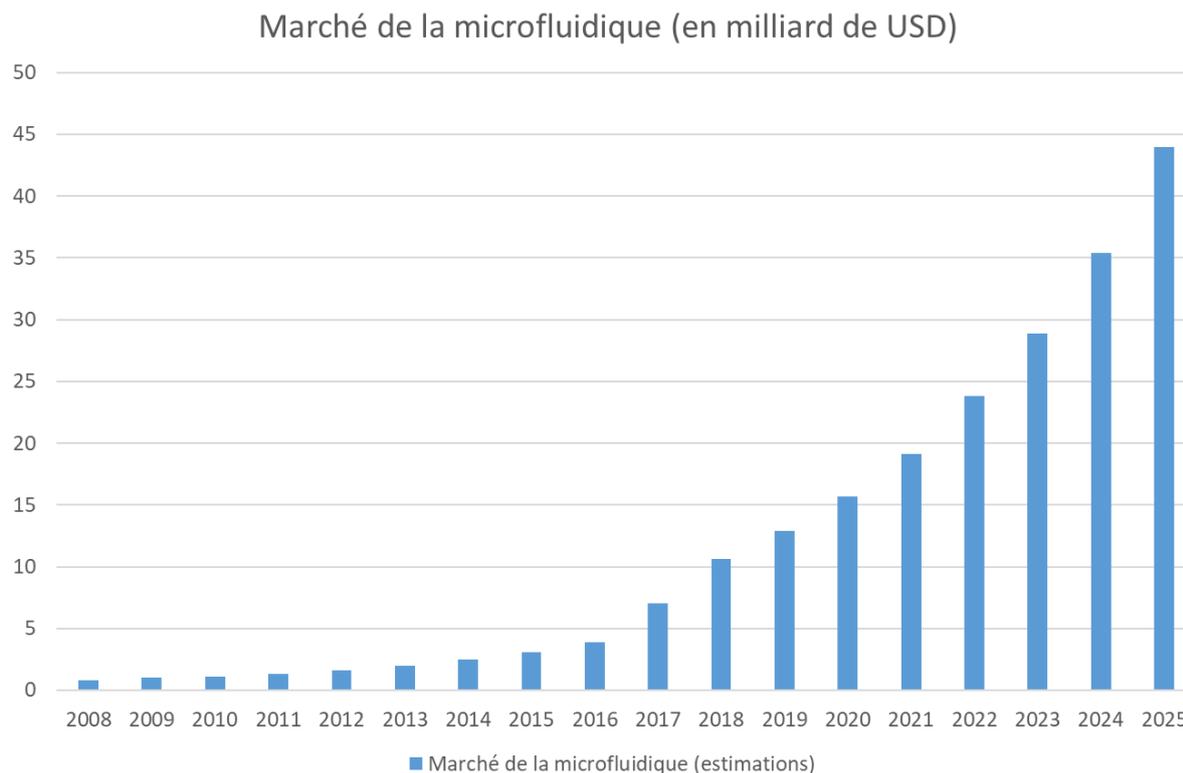


Figure 19 : Marché de la microfluidique (en volume USD) (Markets and Markets, 2019; Yole Développement, 2011).

Certains micro-outils ont été développés dans le but de lutter contre le cancer, le développement de risques cardiovasculaires, les maladies du cerveau, le stress, le diabète. Dans d'autres domaines comme la pharmacologie, ces systèmes sont employés pour la synthèse de principes actifs de petites tailles.

1.3.2 La microfluidique conventionnelle

À basse pression, les systèmes microfluidiques présentent de nombreux avantages par rapport aux réacteurs de grand volume, comme dans le procédé LAS. En effet, on y trouve une plus courte distance de diffusion moléculaire entre les différentes phases en présence, ainsi qu'un meilleur contrôle de la dynamique des fluides injectés. Contrairement aux systèmes conventionnels macrométriques, ce type de dispositif consomme peu de produits et permet une régulation fine et rapide des paramètres opératoires (température, débits, concentration). Enfin, l'accès optique offert par les matériaux constituant la micro-puce basse pression donne la possibilité d'étudier fondamentalement les mécanismes réactionnels qui ont lieu dans ce système microfluidique.

La microfluidique est un outil bien utile pour créer des microgouttelettes de taille et de volume contrôlés. Dans ce genre de procédé, il est courant d'utiliser un système composé de gouttes d'eau qui circulent dispersées dans de l'huile dans un régime laminaire. Les différents fluides sont injectés dans le canal principal où des gouttes de quelques nano-litres de volume sont formées. Des systèmes générant des microgouttelettes (Figure 20) peuvent être considérés comme des micro-chambres à réaction pour la synthèse de nanomatériaux. Les débits du système microfluidique sont bien contrôlés et permettent de générer des gouttes uniformes et stables. La réaction chimique induite par la diffusion des fluides à la surface de la goutte peut induire la précipitation de microcristaux. Il est donc important de noter que le comportement des fluides dans un système microfluidique peut avoir une influence sur les caractéristiques du produit synthétisé. Les cinétiques de réactions peuvent ensuite

être étudiée par analyse *in situ*. Des techniques de détection de fluorescence et de spectroscopie ont été adaptées pour extraire des informations chimiques sur le contenu du micro-canal.

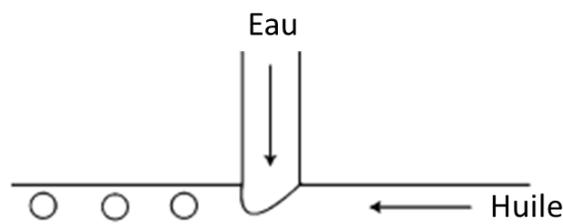


Figure 20: Système microfluidique avec intersection en T pour la formation de gouttelettes d'eau drainées dans de l'huile.

Comme pour le LAS, il est possible de faire se rencontrer deux fluides miscibles, l'un solvant, l'autre anti-solvant. On parle alors de μ LAS. Ce genre de procédé est souvent utilisé pour améliorer la qualité du mélange. Dans ce cas de figure, les deux fluides miscibles sont injectés colinéairement et à des débits différents. Les différentes conditions opératoires ainsi que les composés synthétisés et leurs applications sont autant de facteurs pour le choix du matériau ou des matériaux qui vont composer le réacteur microfluidique. Pour des raisons économiques et de faisabilité, le polydiméthylsiloxane (PDMS) est très largement répandu, principalement pour des expériences de routines. Dans le cas où des températures et des pressions élevées sont nécessaires au bon fonctionnement du système, d'autres composants sont utilisés : le verre (Borofloat, Pyrex), la silice, le silicium,

Les outils développés qui nous intéressent ici ont pour point commun de créer une zone de rencontre localisée entre les différents fluides à mélanger. Il s'agit ici de diriger les fluides en un même endroit pour améliorer le mélange. La grande aisance dans la fabrication des microréacteurs permet aujourd'hui de créer une myriade de géométries (Tableau 5). Les designs les plus courants sont les intersections en Y et en T (Chronopoulou et al., 2014; Zhao et al., 2007). Mais d'autres géométries ont été proposées pour diminuer la zone de diffusion et de mélange des fluides (Figure 21). Un outil très utile pour concevoir un système microfluidique est la simulation CFD. Employée dans la compréhension et l'étude de la dynamique des fluides, elle est essentielle pour fixer les paramètres expérimentaux afin d'obtenir une taille de particule souhaitée.

Tableau 5 : Exemples de systèmes microfluidiques pour la synthèse de particules organiques.
 \varnothing_{AS} : Diamètre du canal d'injection de l'anti-solvant. \varnothing_S : Diamètre du canal d'injection du solvant.

Géométrie du micro-mélangeur	Paramètres : \varnothing_{AS} et \varnothing_S (mm)	Soluté	Taille NPs (nm)	Solvant	Anti-solvant	Référence
Croix	300 / 0,13-0,60	Dexaméthasone /PLGA	59 ± 25	PLGA	H ₂ O	(Chronopoulou et al., 2014)
Croix	0,19/0,10	Cabotégravir	> 2000	H ₂ O	Trifluorotoluène	(Fortt, 2020)
Convection tridimensionnelle	0,2/0,15	PLGA-PEG	130 ± 100	Acétonitrile	Acétonitrile	(Rhee et al., 2011)
T	0,75/0,75	Norfloxacine	260 ± 90	DMSO	H ₂ O	(Panagiotou et al., 2009)
T	0,121/0,32	Griséofulvine	> 500	DMF	sc-CO ₂	(Arora et al., 2020)

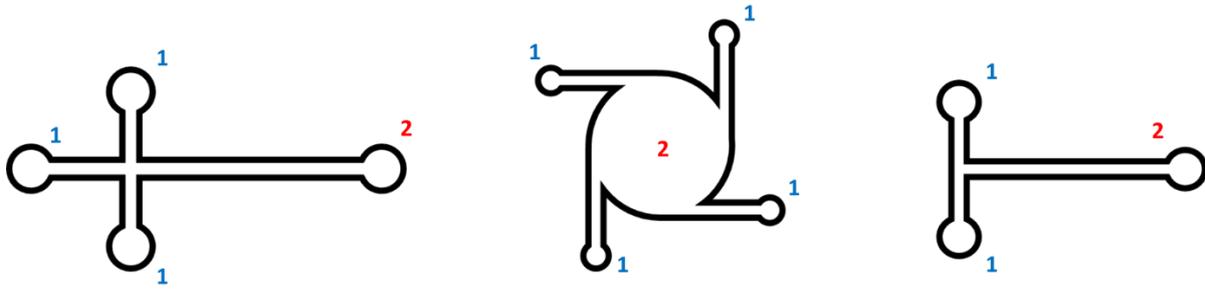


Figure 21 : Schémas des micromélangeurs (a) en croix, (b) par convection tridimensionnelle, (c) en T. En 1 sont représentées les entrées, en 2 les sorties.

La formation de nanoparticules de petite taille et de faible dispersion en taille est possible grâce à un mélange rapide entre la phase du soluté et la phase de l'anti-solvant. Dans ce but, la technologie microfluidique développée doit augmenter l'efficacité du mélange. À noter qu'en fonction des conditions opératoires et du choix dans la géométrie du microréacteur, il est possible de balayer une très large gamme de tailles de particules. Cependant, dans le cas où le système produit des particules de grande taille, des problèmes de bouchons dans le micro-canal peuvent survenir. Ces blocages constituent un désavantage de la microfluidique qui, dans ce cas, ne permet pas un bon contrôle des propriétés des particules synthétisées.

Enfin, certaines expériences peuvent être limitées par le matériau du système microfluidique. Par exemple, les outils à faible coût en PDMS ne peuvent être utilisés qu'à une température et à une pression relativement faibles. De plus, certains solvants organiques ne sont pas compatibles avec ces systèmes. Ces désavantages ont amené à la fabrication de microréacteurs avec des matériaux plus résistants.

1.3.3 La microfluidique à haute pression – Introduction au micro-SAS

Il apparaît évident que de nombreuses réactions sont limitées voire impossible à reproduire avec les outils microfluidiques basse pression qui ont été présentés. C'est pourquoi, de nouveaux matériaux ont été considérés pour fabriquer des microréacteurs de dernière génération. L'intérêt premier de ces nouveaux systèmes est qu'ils peuvent être utilisés à haute pression. Tout comme pour les systèmes à basse pression, il est possible d'utiliser des matériaux transparents afin d'exploiter ces nouvelles plateformes pour des caractérisations *in situ*. On peut citer par exemple, le verre, le saphir ou le CaF₂ qui sont des matériaux permettant à la fois de résister aux hautes pressions (> 100 bar) et qui sont compatibles avec certaines techniques de caractérisation optique (observation dans le visible, spectroscopie infrarouge, spectroscopie ultra-violet, diffraction des rayons X, spectroscopie Raman). La nature des matériaux utilisés apporte un autre avantage aux systèmes à haute pression. Il est en effet possible de réaliser de nombreuses expériences avec le même réacteur. Les cycles de pressurisation et de dépressurisation ont des effets quasi inexistantes sur la durée de vie du système microfluidique. De plus, là où les réacteurs classiques à basse pression posent la limitation de l'emploi de certains solvants organiques, les systèmes à haute pression permettent d'élargir le panel de composés chimiques exploitables.

Comme mentionné précédemment, les systèmes microfluidiques apportent un intérêt dans la qualité du mélange grâce à une meilleure maîtrise des paramètres expérimentaux. Ici aussi, à haute pression les débits sont très bien contrôlés grâce à des pompes d'injection de fluides spécialement créées pour ce type de procédés. De plus, une plus large gamme des débits d'injection est offerte à l'expérimentateur. Les travaux réalisés dans la thèse de Fan Zhang montrent que les microréacteurs employés dans les procédés en conditions supercritiques peuvent considérablement améliorer les

performances de mélange (Figures 22 et 23) (Zhang, 2019). Les simulations suivantes illustrent bien la capacité d'un microréacteur haute pression à augmenter les performances de mélange. L'exemple suivant montre une diminution par 10 du temps de mélange dans le cas b) de la figure 23, ce qui amène plus rapidement à une homogénéité du fluide supercritique.

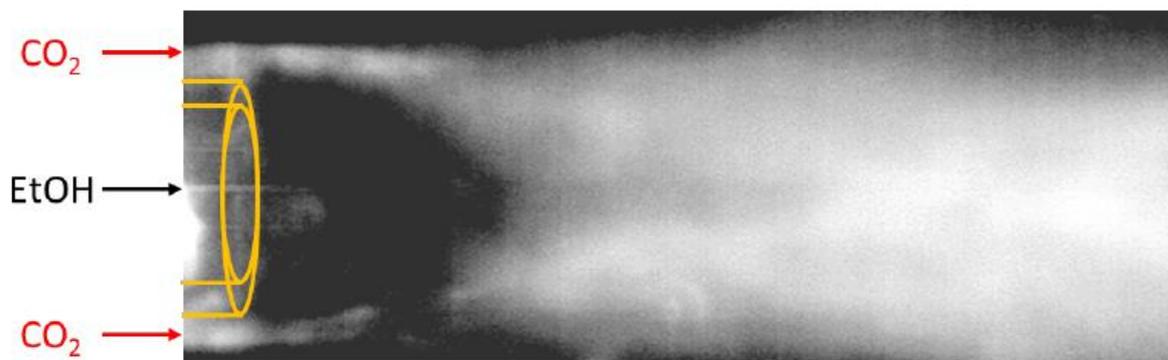


Figure 22 : Image de l'injecteur turbulent coaxial dans un microréacteur par caméra à haute vitesse (Zhang, 2019).

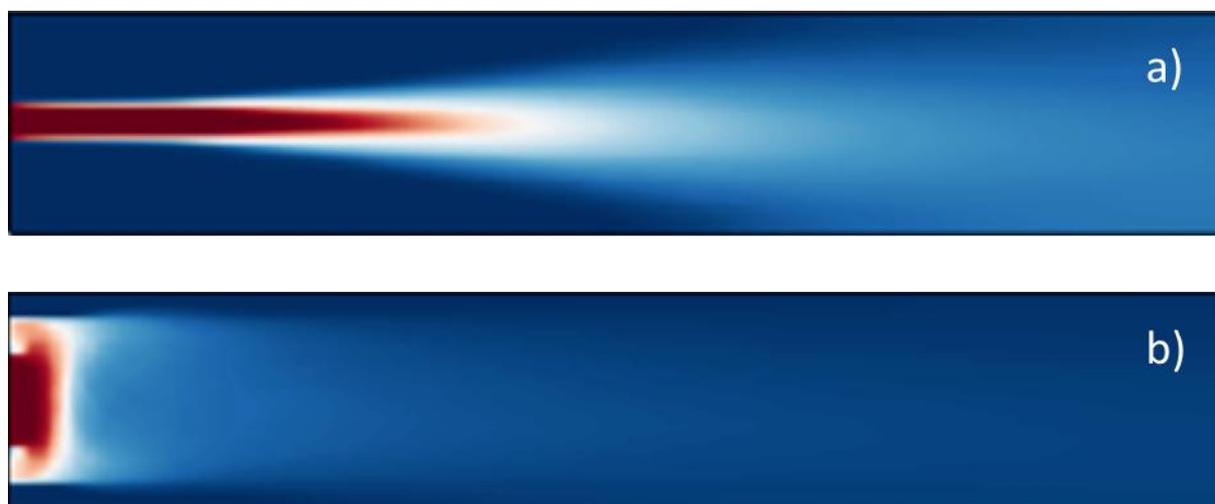


Figure 23 : Simulations de mélange {éthanol/CO₂} dans un microréacteur haute pression pour des temps de mélanges de 0,139 ms (a) et de 0,031 ms (b).

Résumés dans la figure 24, les temps de mélange du microréacteur utilisé à l'ICMCB (carrés oranges et verts) sont diminués de plusieurs ordres de grandeur par rapport aux autres systèmes rapportés dans la littérature. Les performances de mélange apportées par le micro-mélangeur à un procédé de synthèse de particules améliorent le contrôle de la taille des produits formés. En combinant la géométrie de notre microréacteur et les hauts débits d'injection permettant d'accéder à un régime turbulent (carrés bleus), nous atteignons des temps de mélange inférieurs à 10^{-4} s, ce qui offre de très bonnes conditions de mélange.

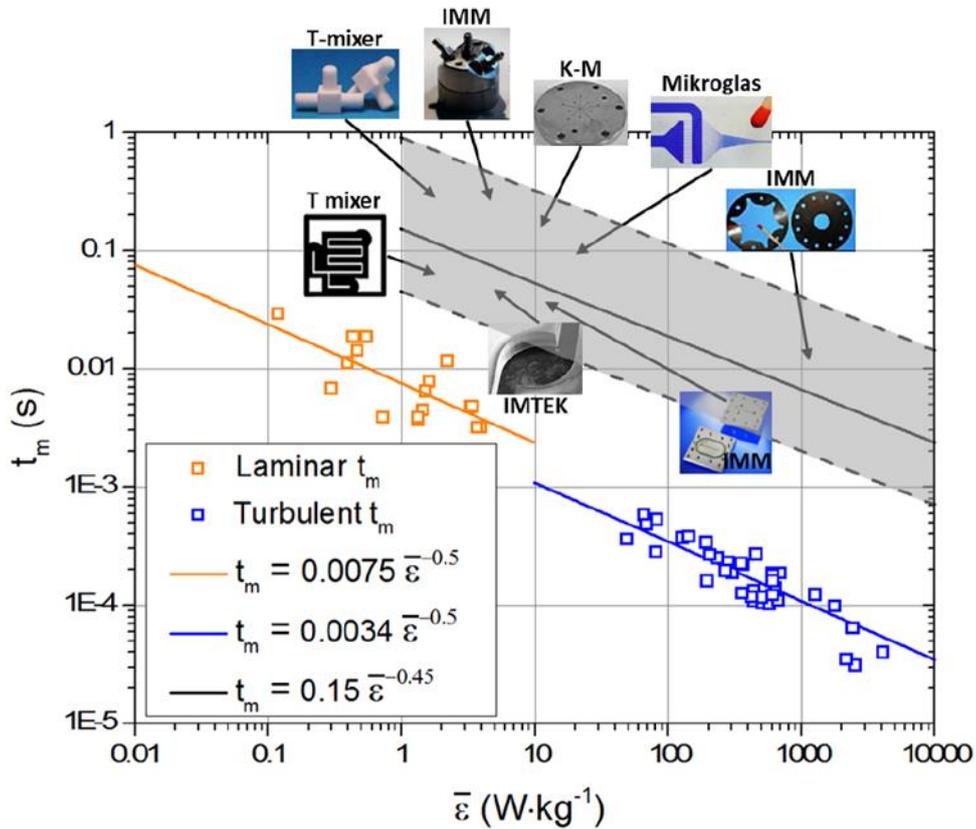


Figure 24 : Exemples de microréacteurs. Les performances du microréacteur haute pression sont représentées par les carrés oranges et bleus (Zhang, 2019).

Tous ces avantages motivent le choix d'utiliser les microréacteurs à haute pression pour la synthèse de nanoparticules. Les nombreux travaux employant la méthode SAS montrent que ce système réunit à lui seul de nombreux atouts (haut degré de sursaturation, courts temps de mélange, rapide transfert de masse entre la solution et l'anti-solvant) qui permettent d'atteindre des tailles de particules nanométriques. Cependant, plusieurs contradictions limitent le contrôle du polymorphisme cristallin des poudres synthétisées. C'est pourquoi l'ajout d'un système microfluidique au procédé SAS est nécessaire pour obtenir des particules de très petite taille et reproductibles, afin de satisfaire le cahier des charges de la fabrication des composés pharmaceutiques.

1.4 Nos contributions

Dans le cadre de cette thèse qui vise à mettre en forme des nanoparticules fluorescentes par un procédé utilisant un fluide supercritique, nous nous focaliserons sur deux objectifs principaux :

- Le premier objectif concerne le développement de procédés intensifiés de mise en forme de FONs dans des dispositifs microfluidiques haute pression adaptés à l'écoulement de fluides supercritiques. Ces dispositifs, combinant les deux voies d'intensification préalablement discutées dans ce chapitre, devront permettre de lever la limitation en taille des nanoparticules obtenues par les approches conventionnelles.
- Le deuxième objectif se focalise sur la compréhension du procédé anti-solvant supercritique. Pour cela, deux technologies seront combinées : la puce haute pression, aux échelles telles qu'elle permet un contrôle très fin des conditions opératoires, permettant la caractérisation *in situ* et les molécules aux effets AIE qui ont l'avantageuse propriété d'émettre de la fluorescence uniquement (ou essentiellement à l'état solide). Le développement d'une telle approche va nous permettre de suivre en temps réel la formation de nanoparticules par spectroscopie de fluorescence. Ces données expérimentales, comparées à la simulation numérique, devraient nous permettre de valider et de nourrir les modèles numériques afin d'affiner la compréhension de nos procédés.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons en détail l'ensemble du dispositif μ SAS, de la fabrication « faite maison » du microréacteur jusqu'à la mise en œuvre de l'opération unitaire. Une attention particulière sera portée sur la microscopie confocale mise en œuvre pour détecter la précipitation des particules *in situ*. L'outil de détermination des solubilités des FONs basé sur la mesure *in situ* par spectroscopie infrarouge effectuée en collaboration avec le laboratoire ISM sera présentée. Les outils de caractérisation *ex situ* utilisés seront également abordés brièvement.

Le troisième chapitre se focalise sur la compréhension du procédé en combinant l'expérience et la simulation numérique. Une étude thermodynamique préliminaire visant à obtenir des données de solubilité du soluté dans le système {solvant/ CO_2 } par spectroscopie infrarouge est proposée. Ces données thermodynamiques sont indispensables pour la simulation de la précipitation des FONs. Nous souhaitons ici valider les simulations effectuées dans le laboratoire et basées sur le couplage CFD/PBE (Computational Fluid Dynamics / Population Balance Equation) par observation *in situ* des champs de nucléation lors de la synthèse de FONs par μ SAS. Pour cela, nous choisissons des FONs aux propriétés AIE afin de visualiser directement la formation de particules fluorescentes. La comparaison des résultats expérimentaux et de simulation apportera des informations pour la compréhension et la détermination des paramètres de nucléation et de croissance.

Dans le quatrième chapitre, plusieurs types de molécules seront synthétisées par μ SAS et caractérisées. Les résultats obtenus (distributions en taille, morphologies, cristallographies, propriétés optiques) seront comparés à ceux obtenus par voie conventionnelle : la précipitation par anti-solvant liquide.

Chapitre 2

Outils et méthodologie

Introduction

Dans ce chapitre, nous présentons les différents outils et méthodologies utilisés au cours de cette thèse. Les méthodologies expérimentales mises en œuvre concernent trois aspects de ce travail de thèse :

(1) l'étude thermodynamique du système {soluté/solvant/anti-solvant}. De nombreux exemples de la littérature ont montré qu'il était favorable de travailler dans un domaine monophasique supercritique afin de bénéficier des propriétés de mélange avantageuses. C'est dans ce domaine que nous nous plaçons pour l'ensemble de nos expériences. Dans ces conditions de haute pression, nous nous proposons d'étudier la solubilité du soluté dans le milieu. Cette donnée est indispensable pour simuler les phénomènes de nucléation et de précipitation du soluté dans le microréacteur. Pour ce faire, nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge *in situ* couplée à une cellule haute pression et haute température ;

(2) la production de FONs. Dans un second temps, nous présenterons le montage expérimental μ SAS pour la synthèse des FONs. Ce système sera décomposé en trois parties : les systèmes haute-pression, le microréacteur et le système de récupération. Ceci permettra de discuter des différentes parties qui composent le procédé μ SAS élaboré à l'ICMCB, à savoir la micro-puce, les outils haute pression et les systèmes de récupération de poudres ;

(3) la caractérisation des particules synthétisées. Enfin, nous décrirons les différentes techniques utilisées pour caractériser la taille (microscopie électronique) et les propriétés de fluorescence (spectrométrie UV) des matériaux synthétisés.

2.1 Étude thermodynamique

2.1.1 Domaine de travail

Le premier travail consiste ici à déterminer la courbe d'équilibre liquide-gaz du système {solvant/anti-solvant} à une température donnée. Le résultat de cette étude donne les coordonnées en pression et en composition molaire pour lesquelles le système {solvant/anti-solvant} transite entre un état monophasique et un état diphasique. En-dessous de cette courbe, deux phases distinctes liquide et gaz subsistent, alors qu'au-dessus de la courbe d'équilibre le système {solvant/anti-solvant} est monophasique (Figure 25). Thermodynamiquement, le point le plus haut de la courbe est appelé point critique du mélange (P_c). À partir de ce point, en augmentant la pression sans faire varier la composition molaire, le système est monophasique supercritique.

Nous présentons ici un exemple des courbes d'équilibre liquide-gaz du système {THF/CO₂} pour des températures allant de 40 °C à 80 °C (Knez et al., 2008) .

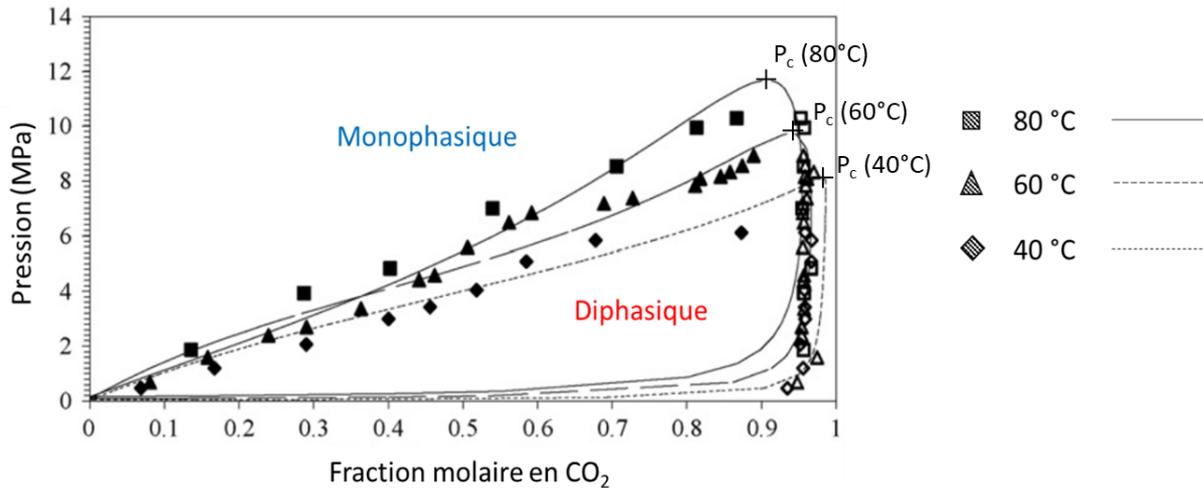


Figure 25 : Courbes d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO₂} à 40 °C, 60 °C et 80 °C.

Différentes techniques sont utilisées pour construire expérimentalement la courbe d'équilibre liquide-gaz. La première étape consiste à introduire un volume de solvant organique dans une cellule haute pression. Ensuite, le CO₂ est injecté dans la cellule, ce qui a pour effet d'y augmenter la pression. La température du mélange doit être correctement contrôlée, car elle a un effet important sur la thermodynamique du système (comme le montrent les courbes d'équilibre liquide-vapeur). Après avoir attendu suffisamment longtemps que l'équilibre du système soit atteint, différents outils permettent d'analyser la composition du mélange pour un couple de pression-température donné.

Il est courant d'utiliser un chromatographe pour analyser la composition de la cellule haute pression à l'équilibre du système. Les phases liquides et gazeuses sont alors séparées et analysées en composition (Duran-Valencia et al., 2001; Li et al., 2007). Il est également possible d'utiliser une cellule optique permettant une visualisation en direct de l'état du système. Plusieurs travaux ont décrit l'équilibre du système DMSO/CO₂ en mesurant la pression à laquelle le ménisque séparant la phase organique de celle riche en CO₂ disparaît, à une température et à un volume de solvant introduit donnés (Andreatta et al., 2007; Lazzaroni et al., 2005). Les outils microfluidiques constituent une autre façon d'obtenir des diagrammes de phase beaucoup plus rapidement (Gavoille et al., 2019; Pinho et al., 2014). Enfin, de nouvelles techniques de caractérisation *in situ* ont été mises en place pour dessiner la courbe d'équilibre liquide-gaz, comme la spectroscopie infrarouge utilisant des cellules optiques à haute pression (HPOC) (Vega Gonzalez et al., 2002).

De nombreuses techniques permettent d'obtenir des résultats *in situ* sur les propriétés du milieu. La spécificité de notre système ici est que nous travaillons en température et à haute pression (100 bar). Plusieurs techniques d'analyse ont été développées lors des dernières décennies. On peut citer par exemple la visualisation optique qui consiste à observer la disparition du « cloud point » - le mélange devient trouble comme un nuage lorsque les phases liquide et gazeuse se mélangent en une seule phase supercritique (Kőrösi et al., 2019). Une technique plus précise utilisant la spectrométrie infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) a été mise en place récemment dans plusieurs laboratoires. Ce principe FTIR est basé sur la visualisation *in situ* des molécules composant le mélange et apporte des informations plus précises quant à la concentration des espèces présentes. Ce système nécessite donc une cellule capable de travailler à haute pression avec un contrôle régulier et précis des conditions opératoires (température et pression). La mesure de la solubilité n'est possible en FTIR qu'à travers un matériau spécial, capable de laisser passer les ondes infrarouges. Généralement, ce genre de système est composé d'une cellule métallique à laquelle ont été ajoutées des fenêtres en silicium.

Ce système est utilisé pour la mesure de la solubilité du soluté dans le système {solvant/anti-solvant}, il est détaillé dans la partie suivante.

Expérimentalement, cette courbe est construite en deux parties. L'étude de la phase liquide permet de construire la partie gauche du graphique, tandis que l'analyse de la phase gazeuse donne les points expérimentaux aux hautes fractions molaires en CO₂, dans la partie droite du graphique. Les lignes dessinées pour chaque température du système sont obtenues à partir des équations d'états proposées par le modèle de Peng-Robinson (Peng and Robinson, 1976) :

$$p = \frac{RT}{V_m - b_m} - \frac{a_m}{V_m^2 + 2V_m b_m - b_m^2} \quad (\text{Eq 2}),$$

où p est la pression, R la constante des gaz parfaits, T la température, a_m le paramètre d'attraction, b_m le paramètre du covolume, V_m le volume molaire.

Les données expérimentales et numériques permettent ainsi de déterminer les couples de coordonnées température-pression pour décrire la courbe d'équilibre liquide-vapeur et obtenir ainsi les paramètres nécessaires aux conditions d'un mélange monophasique. Dans le cadre de nos travaux, nous choisissons de recréer expérimentalement la courbe d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO₂} en utilisant la spectroscopie infrarouge *in situ*.

2.1.2 Outils de caractérisation *in situ* par infrarouge

2.1.2.1 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie est une technique analytique utilisant l'interaction de la matière avec les radiations électromagnétiques qu'elle absorbe, émet ou diffuse. Cette radiation électromagnétique est classifiée selon la fréquence (c'est-à-dire la longueur d'onde, ou encore l'énergie) de l'onde la composant. Pour l'IR, nous travaillons pour des longueurs d'ondes comprises entre 20 et 12500 cm⁻¹.

Les fluides supercritiques (FSC) possèdent des propriétés ajustables par simple variation de la température et/ou de la pression. Leur pouvoir de solvatation peut donc être contrôlé en faisant varier les conditions expérimentales. Les taux de réaction, les mécanismes de réaction ou encore les solubilités des éléments constituant les FSC peuvent être étudiés par des techniques de caractérisation *in situ*. Dans ce contexte, les techniques de spectroscopie, et notamment les spectroscopies vibrationnelles sont très utiles. Parmi elles, on trouve les spectroscopies Raman et infrarouge (Abuzar et al., 2018; Malwade and Qu, 2019; Takebayashi et al., 2014). Ces techniques donnent des informations détaillées sur l'environnement des molécules étudiées, auquel les modes de vibrations internes sont très sensibles. Les fréquences et les largeurs spectrales de ces vibrations sont collectées afin de créer un spectre. Celui-ci détaille les transitions de vibrations de chaque groupe moléculaire présent et décrit donc un bon nombre d'interactions entre les différentes molécules composant le fluide caractérisé. En 1993, dans le domaine des FSC, Akimoto a mesuré le spectre IR des composés carbonylés. Dans cet exemple, il a mis en évidence les effets de l'environnement local des molécules sur les variations des fréquences et de la largeur des bandes des groupes carbonyles (Akimoto and Kajimoto, 1993).

2.1.2.2 Mesure de solubilité

2.1.2.2.1 Montage

Le système développé à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux (ISM) permet de réaliser des mesures FTIR *in situ* jusqu'à 500 bar et 100 °C (Figure 26). Il permet de déterminer la

concentration précise d'un soluté par la mesure de l'intensité de son spectre IR, pour une température et une pression données.

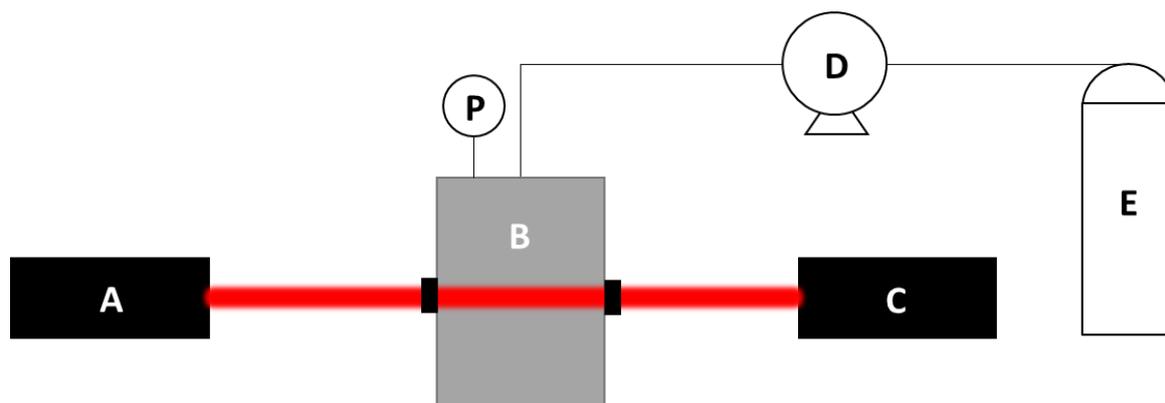


Figure 26 : Schéma expérimental du système de mesure des solubilités par FTIR. A) Source IR, B) cellule optique haute pression, C) détecteur du spectromètre, D) pompe, E) bouteille de CO_2 , P) manomètre.

Il est composé d'une cellule de volume ($V = 2,2 \text{ mL}$) à une entrée par laquelle l'anti-solvant est acheminé (Figure 27). Le CO_2 est graduellement injecté à l'intérieur de la cellule jusqu'à l'obtention de la pression exigée. Un laser émis par le spectromètre traverse deux fenêtres de silicium placées face à face. Quatre cartouches chauffantes ainsi qu'un thermocouple sont insérés dans l'armature de la cellule métallique pour chauffer et contrôler la température de la cellule. Enfin, un aimant et un agitateur magnétique permettent d'homogénéiser constamment la solution.

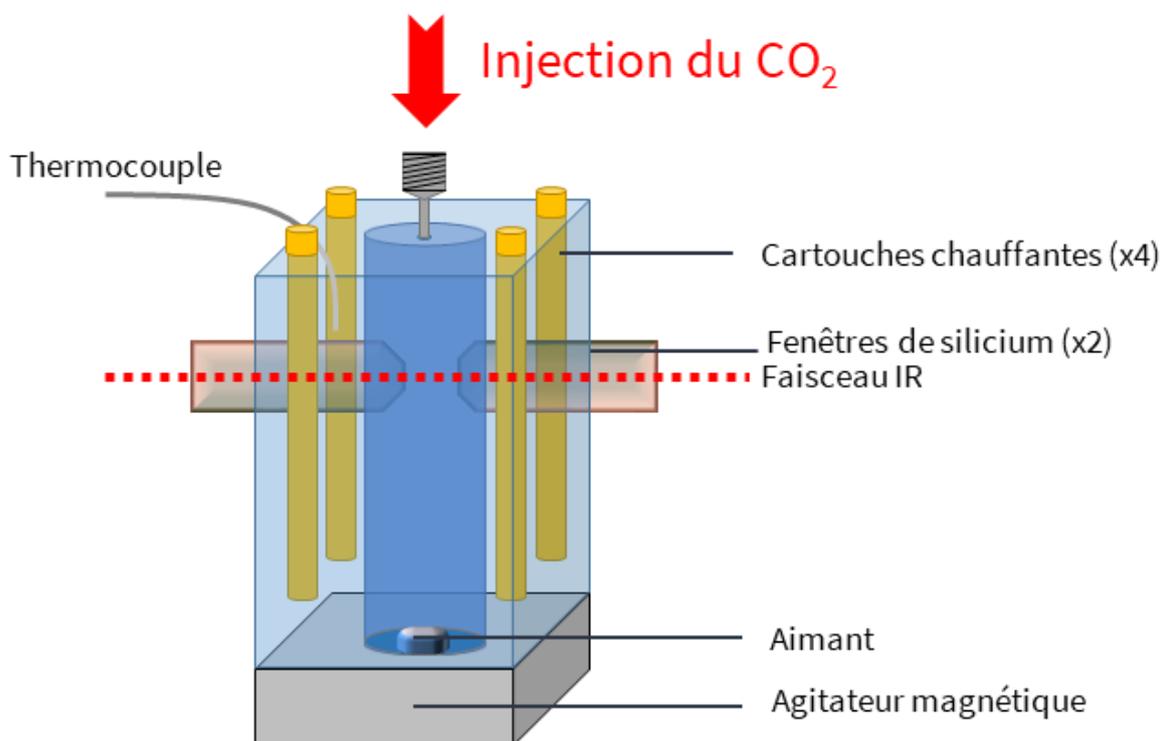


Figure 27 : Cellule optique haute pression FTIR.

Dans l'exemple présenté dans la figure 28, nous avons placé initialement du THF dans la cellule, puis nous avons injecté le CO_2 de manière à augmenter la pression. Ainsi, il nous est possible d'observer l'augmentation de l'intensité de l'absorbance de la bande du CO_2 à 4955 cm^{-1} avec l'augmentation de

la pression. Pendant ce temps, la bande du THF située à 1970 cm^{-1} diminue en intensité lorsque le CO_2 est injecté dans la cellule.

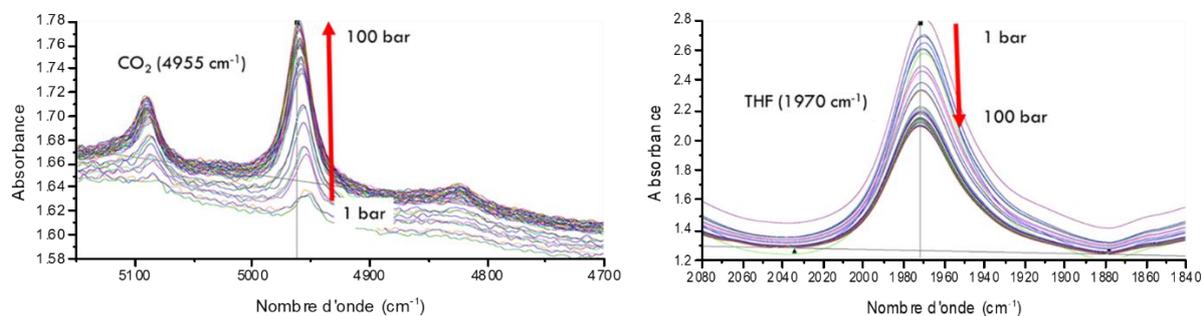


Figure 28 : Spectres IR du CO_2 et du THF pour différentes pressions.

Ces mesures constituent la base des travaux pour déterminer expérimentalement la courbe d'équilibre liquide-vapeur du système {solvant/anti-solvant}. Pour cela, nous avons initialement placé un volume connu de solvant pur dans la cellule. Puis, lors de la mise en pression de la cellule, nous avons observé l'augmentation des bandes caractéristiques du CO_2 s'introduisant dans la cellule tandis que la bande du solvant organique diminue. Ce sont les intensités d'absorbance qui, reliées à la concentration de chaque espèce par la loi de Beer-Lambert, permettent de déterminer les ratios molaires obtenus à différentes pressions.

Dans un second temps, nous utilisons cette même cellule optique haute pression pour mesurer la solubilité du soluté dans le mélange {solvant/anti-solvant}. En effet, il est primordial de trouver les conditions de mélange pour lesquelles le système monophasique supercritique obtenu a un effet très anti-solvant sur le soluté. Cette étude nous permettra de déterminer la gamme en rapport molaire solvant:anti-solvant pour laquelle le soluté a une faible solubilité. Cette composition molaire sera alors fixée comme référence pour les futures expériences menées sur le procédé μSAS . La solubilité du soluté à saturation est également une mesure indispensable pour la simulation de la nucléation du soluté dans le micro-canal.

2.1.2.2 Protocole

Le protocole d'utilisation de la cellule optique haute pression est le suivant :

1. Un spectre IR est réalisé à blanc en utilisant la cellule HP vide et propre. Ce spectre sera utilisé comme « background » pour les mesures effectuées avec cette cellule.
2. Préparation de la solution
 - a. Une quantité de poudre est placée en excès dans un volume de solvant connu et introduit dans la cellule.
 - b. Un agitateur magnétique est placé dans la partie inférieure de la cellule afin d'homogénéiser le mélange rapidement.
3. Mise sous pression de la cellule
 - a. La cellule HP est placée dans le spectromètre, puis est raccordée à la bouteille de CO_2 .
 - b. Un barillet permet de monter la pression graduellement dans la cellule jusqu'à la pression souhaitée en veillant à ne pas la dépasser.

- c. Une fois la pression de consigne atteinte, la cellule est déconnectée de la bouteille. L'expérimentateur veille alors à ce que la pression ne varie pas et à ce qu'aucune fuite n'existe.
4. Une fois ces précautions prises, des spectres IR sont enregistrés à 5 minutes d'intervalle chacun.
5. Le spectre final est enregistré une fois le système stabilisé.

Cependant, plusieurs problématiques se présentent pour effectuer les mesures de solubilité. Etant donné qu'il s'agit là de quantifier les concentrations de chaque composé dans la cellule, leurs spectres IR doivent répondre à deux critères :

- Chaque composé doit présenter une bande IR pour une gamme de longueurs d'onde où les autres n'apparaissent pas. En effet, la superposition des bandes attribuées à différents composés empêche la mesure de l'intensité du spectre. Dans le cas où un composé ne présente pas de bande apparaissant individuellement, le système choisi ne peut être exploité pour mesurer la solubilité du soluté.
- L'intensité de la bande IR ne doit pas être saturée. L'emploi de cellules HP avec des trajets optiques différents permet de pallier cet obstacle facilement. En effet, la loi de Beer-Lambert montre qu'en augmentant le trajet optique, un plus grand nombre de molécules traverseront le laser, ce qui augmentera l'intensité des bandes de vibration des molécules (en augmentant l'absorption).

Après avoir vérifié qu'au moins une bande caractéristique de chaque composé apparaît seule et que le système complet {Soluté/Solvant/Anti-Solvant} peut bien être étudié en IR, nous pouvons procéder aux mesures de solubilité par *in situ*. Les résultats de cette étude nous donnent des informations sur les conditions opératoires optimisées pour la synthèse de petites particules de taille contrôlée par le procédé μ SAS.

2.2 Outils de mise en forme des nanoparticules

Une fois l'étude de solubilité réalisée, et les conditions expérimentales définies, le procédé μ SAS peut être mis en œuvre. La puce silicium/Pyrex élaborée en salle blanche est le cœur du montage, c'est dans cette partie que l'anti-solvant (CO_2) et la solution organique concentrée en soluté se mélangent. Ce micro-mélangeur présente une géométrie co-courant qui doit permettre un bon mélange entre les deux fluides (Zhang, 2019).

2.2.1 Conception du système μ SAS

Dans cette partie nous présentons le montage expérimental μ SAS qui a été introduit dans le premier chapitre de thèse. Nous décrivons le procédé avec un système modèle qui sera l'objet du chapitre 3. Ici, le dioxyde de carbone supercritique joue le rôle de l'anti-solvant. Un soluté est choisi pour être mis en forme dans cette expérience. Il est préalablement dissout dans un solvant organique, dont les critères de choix ont été discutés précédemment.

2.2.2 Choix du réacteur

Pour nos travaux, deux types de réacteurs ont été employés. Le premier utilise une micro-puce en silicium/Pyrex, nous permettant d'observer en *in situ* les mélanges des fluides. Le second type de microréacteur de type « tube dans tube » est un système simplifié et est utilisé pour la mise en forme de poudres en grande quantité, offrant la possibilité de caractériser le produit par d'autres techniques *ex situ*.

2.2.2.1 Micro-puce

2.2.2.1.1 Design

Une micropuce silicium/Pyrex fabriquée à l'ICMCB constitue le réacteur du montage (Figure 29). C'est en son sein que se produit le mélange entre la solution concentrée et le fluide anti-solvant sc-CO₂. Cette puce de longueur 8 cm, de largeur 2 cm et d'épaisseur 3,5 mm est placée horizontalement sur une pièce chauffante rectangulaire. La température de la puce est alors contrôlée par un thermocouple placé au contact de la puce et de la source de chaleur. On considère que la température à l'intérieur du canal est très proche de la valeur mesurée au contact de la puce. Les études publiées sur le SAS et sur d'autres procédés de synthèse choisissent généralement de travailler à 35 °C (voire à 40 °C). Cependant, il a été montré de nombreuses fois que la température fait partie des nombreux facteurs pouvant impacter sur la taille des particules synthétisées (Aoki et al., 2016; Cuadra et al., 2019; Malwade and Qu, 2019). Le montage permet de modifier cette température dans une gamme allant de 20 °C à 70 °C.

Un capillaire en silice d'un diamètre intérieur de 100 μm est préalablement inséré, puis collé dans un canal gravé dans la puce en silicium (Figure 29). Le canal fait environ 200 μm de profondeur. La solution concentrée circule à l'intérieur du capillaire, tandis que le CO₂ est injecté dans le canal par une autre entrée. À l'extrémité du capillaire, dans la micropuce, les deux fluides se rencontrent, c'est le point de mélange. C'est à cet endroit, à température, à pression, aux débits et aux concentrations molaires contrôlés que les premières nucléations du soluté ont lieu. Les deux fluides présentent alors des débits différents mais ont des vecteurs vitesse colinéaires.

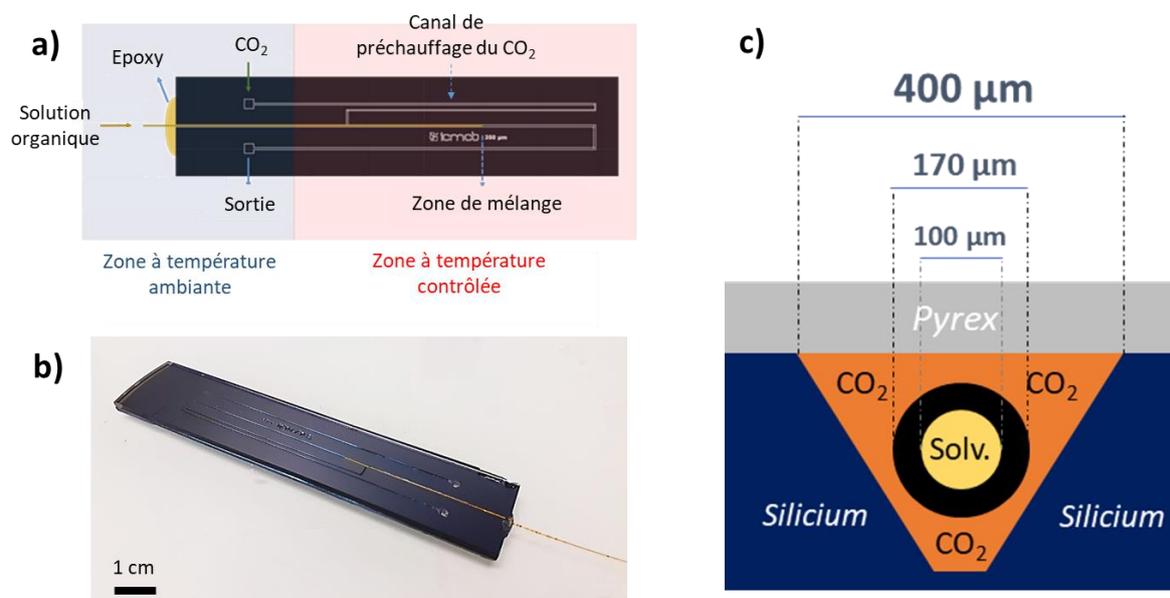


Figure 29 : a) Schéma de la micropuce. b) Image de la micropuce.
c) Vue de coupe de la zone de mélange dans la micro-puce. Rapports métriques respectés.

2.2.2.1.2 Micro-fabrication du réacteur

La micro-puce utilisée comme réacteur à l'échelle microscopique est fabriquée par nos soins à l'ICMCB (Couto et al., 2015; Marre et al., 2010). Elle se compose de deux wafers (galettes) fournis par BT Electronics, l'un en silicium, l'autre en borosilicate transparent. Les deux premières étapes consistent à graver des micro-canaux dans le wafer de silicium, la troisième étape de collage a pour but d'unir les deux wafers pour que l'ensemble tienne à haute pression et pour une température de travail de 40 °C. La quatrième partie vise à découper le wafer pour séparer les différentes puces gravées. Enfin, la dernière étape consiste à coller un capillaire en silice à l'intérieur du micro-canal dont

nous préciserons plus loin l'utilité. Les principales étapes de microfabrication sont schématisées sur la figure 30.

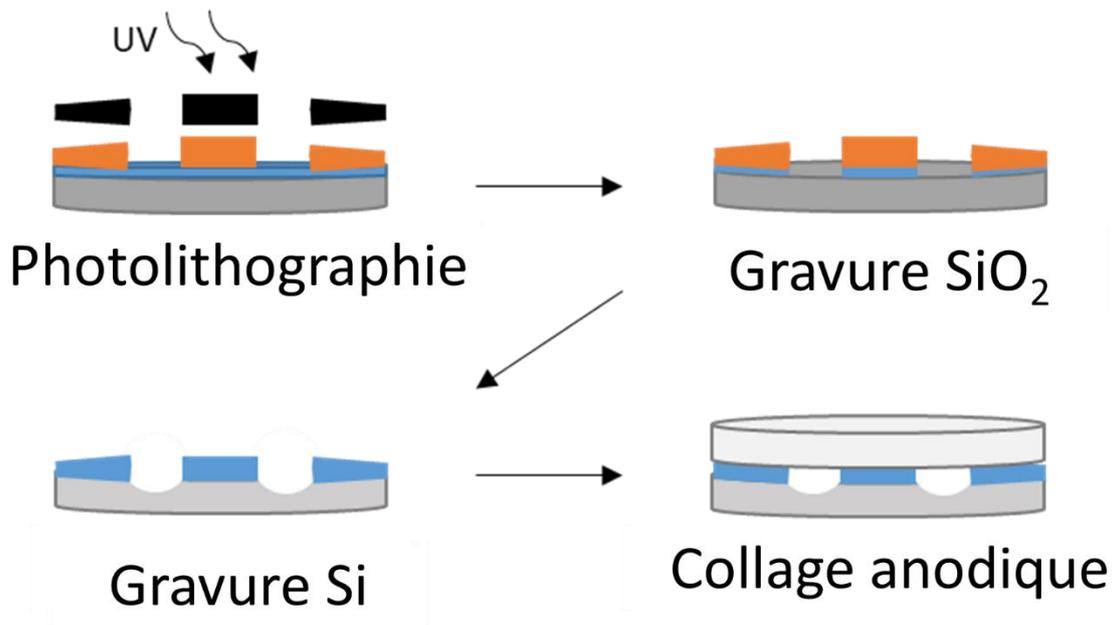


Figure 30 : Schémas des principales étapes de microfabrication

- **Première étape : la photolithographie**

La confection de la micro-puce a lieu en salle blanche de norme ISO 7, car certaines étapes sensibles nécessitent une atmosphère dépourvue de poussières. De nombreux appareils permettant l'élaboration de micro-canaux dans le silicium y sont présents. En effet, plusieurs étapes de photolithographie et gravure composent la première partie du protocole de fabrication des puces silicium/Pyrex.

Un wafer de silicium d'un diamètre de quatre pouces et oxydé sur les deux faces (env. 500 nm de couche d'oxyde par face) sert de base à notre fabrication (Figure 31). Il est ensuite placé sur une « tournette » où une résine positive photosensible (S1818, CTS) est étalée de manière homogène pendant 30 secondes par rotation planaire du wafer. Cette résine va permettre de transférer le design souhaité depuis un masque sur le wafer à graver.

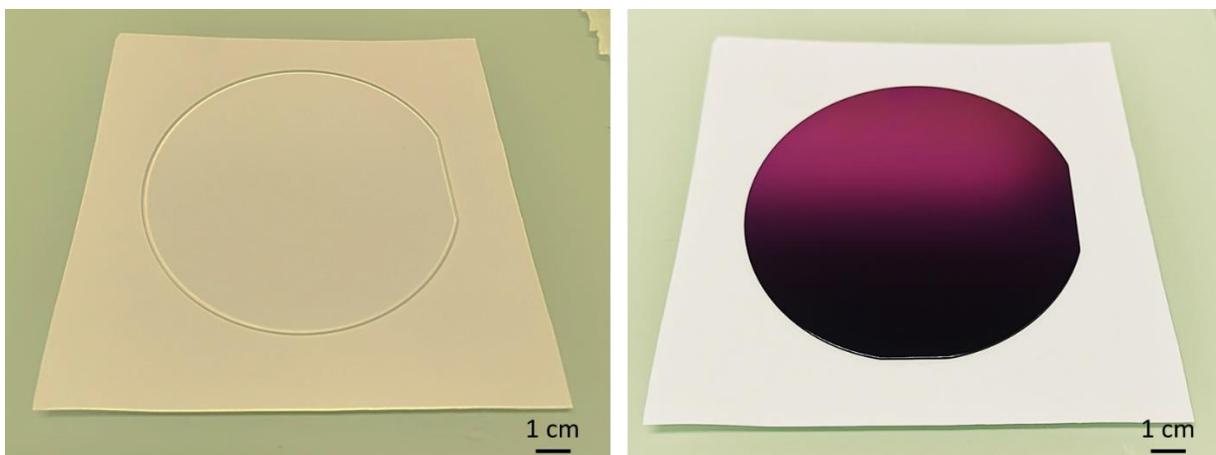


Figure 31 : Images d'un wafer de Pyrex (à gauche) et d'un wafer de silicium (à droite).

La seconde étape consiste à utiliser un masque contenant le design imprimé qui est réalisé sur le logiciel CAO Autocad®. Ce masque est un carré en plastique de cinq pouces de côté recouvrant intégralement le wafer (Figure 32). L'utilisation du masque relève d'un système binaire, la partie noire (avec impression) empêche le passage de rayons UV, tandis que la partie transparente (sans impression) laisse traverser les rayons UV. C'est donc sur le masque que l'on retrouve la géométrie finale de la micro-puce. Les fins canaux transparents du masque correspondent aux canaux qui seront finalement gravés dans le silicium. Cette technique utilisant la transparence du masque, facilite la manipulation. On peut facilement déplacer le masque et ajuster sa position au-dessus du wafer recouvert de résine avant l'étape d'insolation UV.

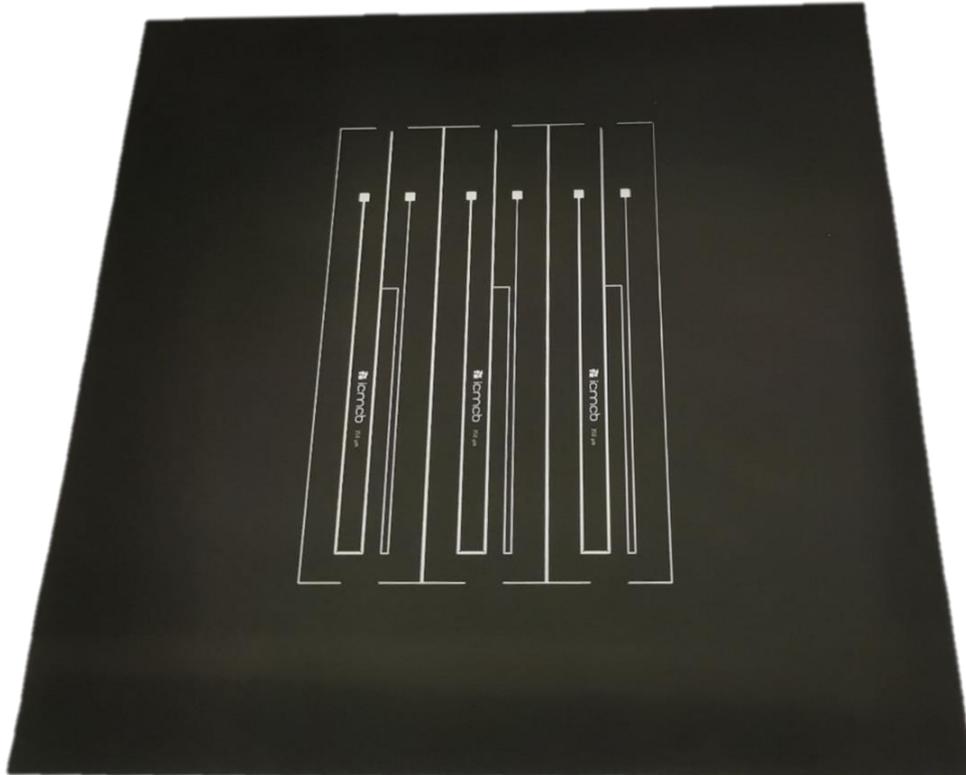


Figure 32 : Image du masque utilisé pour la photolithographie UV.

L'étape suivante est l'insolation de la résine. Cette dernière est exposée pendant 45 secondes aux UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) à une puissance de 40 mW.cm^{-2} , dans le but de casser les liaisons chimiques de la partie de la résine exposée. Une nouvelle étape consiste à enlever complètement la résine attaquée en utilisant un développeur (MF319, Shipley). En agitant le wafer dans un cristalliseur rempli de cette solution, la résine dégradée est enlevée définitivement de la surface du silicium, découvrant ainsi la couche d'oxyde de silicium à l'emplacement des futurs micro-canaux. À noter que le développeur n'aura pas affecté la résine non insolée par les rayons UV, le design du masque est toujours présent à la surface du wafer.

- **Deuxième étape : les gravures**

L'étape d'après consiste à utiliser une solution d'acide fluorhydrique tamponnée. Cet acide va attaquer l'oxyde de silicium pendant dix minutes sans affecter la résine présente sur le reste du wafer. Les quelques centaines de nanomètres d'oxyde recouvrant initialement la surface du wafer de silicium

sont enlevées. Il ne reste donc plus que le silicium lui-même aux emplacements des futurs micro-canaux, le reste étant toujours recouvert par notre résine.

La toute dernière étape consiste à graver chimiquement le silicium à l'aide d'une base forte : l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH). Ce produit est dilué pour en faire une solution concentrée à 25 % dans l'eau, concentration optimale pour une gravure rapide et efficace. La résine est préalablement enlevée du wafer par un rinçage à l'acétone, puis le wafer est plongé dans un bain de TMAH chauffé à 85 °C. La base va donc attaquer le silicium, tandis que la couche protectrice d'oxyde de silicium empêche l'attaque chimique. Une goutte de triton est ajoutée au bain afin d'améliorer la gravure. En effet, ce tensio-actif non réactif à la gravure va s'intercaler brièvement dans les canaux gravés, de manière à enlever les cristaux de silicium déposés au fond des canaux et laisser ainsi propre le micro-canal pour que la base puisse continuer à attaquer le silicium. Dans notre cas, nous souhaitons atteindre une profondeur de canal d'environ 200 μm . Pour cela, une attaque au TMAH de cinq heures est nécessaire. A la fin de la gravure, le wafer est rincé à l'eau et une vérification de la profondeur des canaux est réalisée à l'aide d'un profilomètre mécanique (Figure 33). En appliquant une force constante de la pointe du profilomètre sur le wafer, on peut récupérer le profil de la surface du wafer et donc la profondeur des canaux. Une fois la bonne profondeur obtenue, la partie de gravure en salle blanche est terminée et commence la partie de collage du verre sur le silicium.

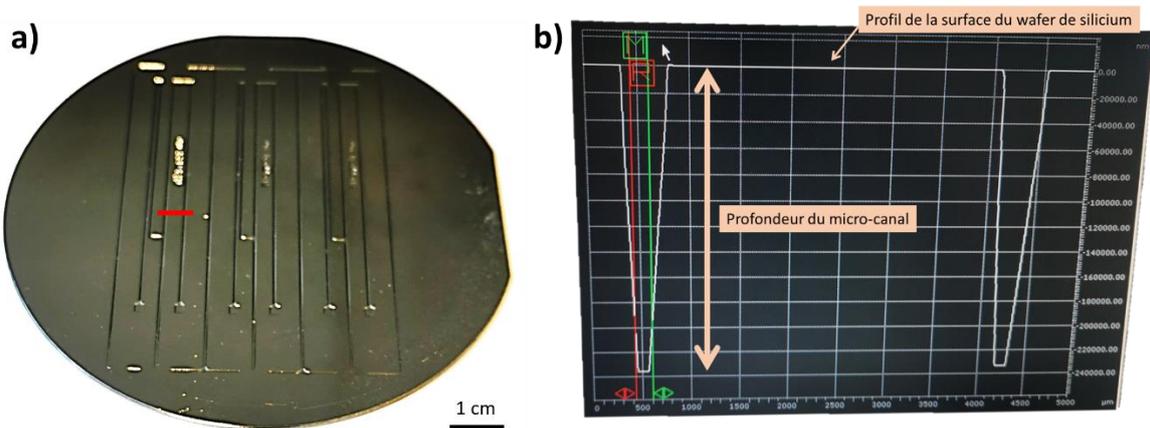


Figure 33 : a) Image d'un wafer de silicium gravé. La géométrie des canaux gravés correspond à celle du masque de la figure 33. Le trait rouge correspond au tracé de la pointe du profilomètre. b) Tracé du profil obtenu par la pointe du profilomètre (capture d'écran).

- **Troisième étape : le perçage et le collage**

Deux techniques permettent de trouser le wafer précisément et sans risque de brisure. La première technique est le forage. A l'aide d'un foret, le wafer est troué en quelques minutes. La seconde méthode est le sablage. Cette technique est légèrement plus longue que la première mais présente une précision de perçage plus importante. Le but ici est d'attaquer la surface du wafer en soufflant des billes de corindon, un oxyde d'aluminium, sur une surface très petite du wafer. Ce flux abrasif permet de trouser le wafer de silicium d'une épaisseur inférieure à 1 mm en moins de trente secondes. Le pistolet de sablage est maintenu perpendiculairement face au wafer à percer pendant ce laps de temps. En amont du perçage, nous plaçons un film adhésif sur le wafer, et nous poinçons le film à l'endroit du futur trou. Ainsi, le sable ne pourra attaquer que la zone découverte du wafer, le reste étant protégé par le film adhésif « mou » et donc inerte vis-à-vis du flux abrasif.

Une fois tous les trous obtenus, nous oxydons la surface du wafer de silicium en le plaçant dans un four à 1000 °C pendant 2 heures et dans des conditions de taux d'humidité élevé. Ceci a pour objectif

de refaire croître une couche de SiO_2 sur les surfaces gravées afin d'obtenir un mouillage homogène des fluides dans les canaux finaux.

À la suite de cette étape d'oxydation, les wafers de silicium et de Pyrex sont traités et nettoyés dans une solution Piranha – un mélange $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ en proportion 3:1 (v:v) – pendant vingt minutes. Ceci a pour effet d'enlever toutes les impuretés (poussières, traces de solvant, matières organiques, ...) de la surface des wafers.

Une fois rincés, les deux disques sont placés l'un face à l'autre pour procéder au collage. L'ensemble est placé sur une plaque chauffante reliée à un thermocouple pour le contrôle en température, mais aussi à un générateur de courant. En effet, le collage que nous souhaitons effectuer est appelé collage anodique, il a pour but de créer des liaisons covalentes entre le silicium et le Pyrex. Dans ce processus, une tension de 1250 V est appliquée à travers l'ensemble silicium/Pyrex. Ainsi, les cations Na^+ du Pyrex migrent vers la cathode, tandis que les anions O_2^- migrent vers l'interface silicium/Pyrex. Notons que la température est montée à 450 °C, c'est-à-dire à 75 °C en-dessous de la transition vitreuse du verre borosilicate, afin d'engendrer une faible déformation du verre et un meilleur collage avec le wafer de silicium. Au final, les ions O_2^- diffusent le long de la surface, scellant le collage des deux wafers. Une fois le système refroidi, la transparence du Pyrex permet d'observer l'homogénéité du collage. L'étape de collage est terminée et il reste à découper les wafers pour récupérer les puces individuellement.

- **Quatrième étape : la découpe**

Cette étape consiste à découper les puces réalisées pour leur mise en œuvre. Nous utilisons une machine à découpe où un disque diamanté est placé au-dessus du wafer à découper (Figure 34). Le disque se déplace selon une direction et dans un seul sens. Le wafer fixé sur une plaque sacrificielle est translaté en x et y de manière à faire coïncider la lame diamantée avec le trait de découpe qui délimite la puce. La lame se déplace à une vitesse constante de 0,5 pouce/min et avec une rotation de 4000 tours.min⁻¹.

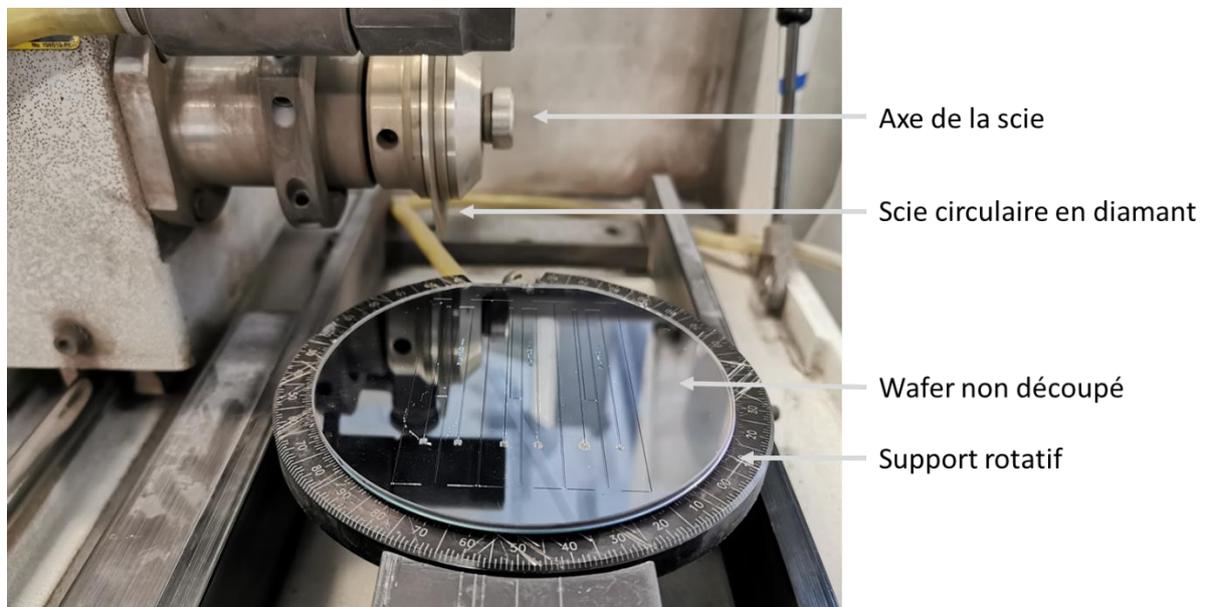


Figure 34 : Photographie de l'outil de découpe des wafers.

- **Cinquième étape : le collage du capillaire**

La dernière étape de fabrication est directement liée à la géométrie 3D du mélangeur que nous avons choisi. En effet, la géométrie co-flow nécessite la présence d'un injecteur tubulaire à l'intérieur

du micro-canal en silicium (Figure 35). Cette étape consiste à insérer un tube en silice d'un diamètre interne de 100 μm et d'un diamètre externe de 170 μm dans le canal en silicium. Une colle époxy assure l'étanchéité là où l'injecteur entre dans la puce. Un séchage d'une nuit à une température d'environ 20 °C permet le bon durcissement de la colle. Ce point de colle est résistant aux hautes pressions (< 100 bar) et aux solvants organiques (éthanol, acétone, THF, ...). Après cette dernière étape de séchage, les puces microfluidiques dotées de leur capillaire sont prêtes à l'emploi.

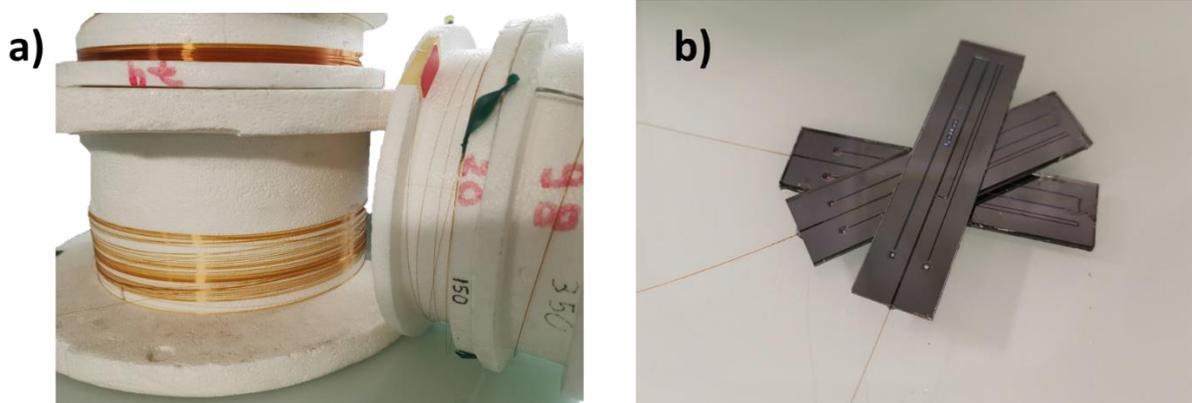


Figure 35 : a) Photo des bobines de capillaires utilisés en microfluidique.
b) Photo d'une micro-puce à la fin des étapes de microfabrication.

2.2.2.2 Microréacteur coaxial

Ce second dispositif consiste à insérer l'injecteur de la solution organique dans un tube de diamètre supérieur dans lequel circule le CO_2 (Figure 36). Le principal avantage de cette nouvelle géométrie est la courte distance entre la zone de mélange (là où les particules solides se forment) et la zone de récupération (le filtre). La voie de CO_2 de séchage est la même que celle qui rencontre la solution concentrée à la sortie de l'injecteur. Le CO_2 dirige alors les particules formées et les focalise rectilignement sur le filtre. De plus, il a été possible d'augmenter les débits de CO_2 ce qui permet à la fois d'être dans de bonnes conditions de sursaturation (fort rapport molaire de CO_2) et dans de bonnes conditions de séchage du solvant.

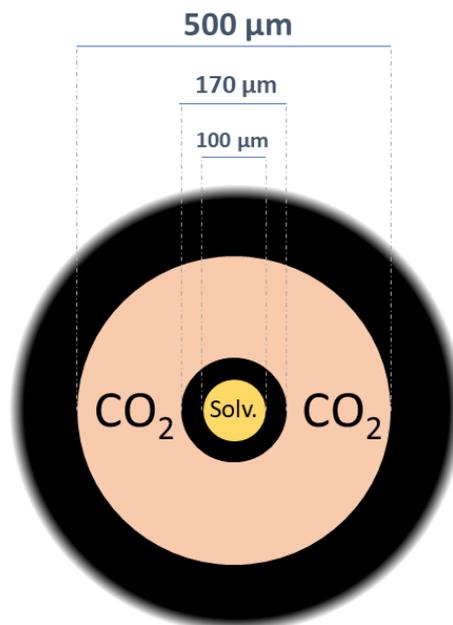


Figure 36 : Vue de coupe du microréacteur coaxial. Rapports métriques respectés.

Une large gamme de capillaires micrométriques permet également de jouer sur l'hydrodynamique du microréacteur. Que ce soit dans la micro-puce ou dans le micro-mélangeur coaxial, nous avons la possibilité de modifier la géométrie de la zone de rencontre en faisant varier les diamètres internes et externes des capillaires. Ce point montre une nouvelle fois l'intérêt d'utiliser un système microfluidique dont il est facile et rapide de modifier la géométrie afin d'en étudier l'impact sur le mélange (Charpentier et al., 2008; Ghoreishi and Komeili, 2009).

Les dimensions de ces deux types de microréacteurs sont du même ordre de grandeur. Cependant, il est nécessaire de vérifier la reproductibilité entre ces deux systèmes. Une fois cela confirmé, il est alors possible à l'expérimentateur de choisir le microréacteur en fonction de l'objet de l'expérience. La micro-puce sera alors utilisée pour l'observation *in situ* de la fluorescence des particules solides formées dans le micro-canal, tandis que le microréacteur coaxial sera préféré pour la production de poudres et leurs caractérisations *ex situ* pouvant nécessiter une masse importante de produits.

Dans le cadre de nos travaux, nous ne considérerons qu'un seul type de capillaire (pour la micro-puce ainsi que pour le micro-mélangeur coaxial). En effet, il est important de garder invariantes les caractéristiques de la géométrie du microréacteur pour étudier d'autres facteurs expérimentaux.

2.2.3 Equipement haute pression

2.2.3.1 Pompes haute pression

Le montage μ SAS est composé de deux pompes Jasco fonctionnant à débit constant. Elles permettent de maintenir le rapport molaire constant durant toute la durée de l'expérience. Elles sont placées en amont du montage et permettent une injection contrôlée de la solution et de l'anti-solvant supercritique. La pompe du sc-CO₂ est composée d'un module Peltier qui refroidit le CO₂ pompé dans la bouteille sous pression. Le CO₂ introduit et refroidi dans la pompe est liquide, c'est alors un fluide incompressible permettant son injection. La pompe Jasco permet d'injecter jusqu'à 10 mL/min de sc-CO₂ et peut travailler jusqu'à 500 bar. La pompe Jasco utilisée pour l'injection de la solution organique est sollicitée pour injecter à faible débit, généralement < 1 mL/min. Elle ne nécessite pas de système de refroidissement et peut fonctionner jusqu'à 500 bar.

2.2.3.2 Cellule de récupération

En sortie de la micropuce, se trouve une cellule de récupération de poudres. Elle a pour but de collecter les nanoparticules synthétisées. Pour cela, nous plaçons un tube de faible diamètre en sortie de la micropuce. Ce tube plonge dans une cellule de plus grand volume qui constitue la cellule de récupération. Cette dernière permet également la réalisation d'une étape de « séchage » en continu en permettant d'extraire le solvant résiduel.

La cellule de récupération possède l'avantage d'être dissociée du microréacteur. Ainsi, les parties « injecteur » et « collecteur » peuvent être opérées indépendamment. En effet, bien que les flux de solvants et d'anti-solvants circulent continuellement dans le système, la poudre ne peut être récoltée qu'en ouvrant la cellule de récupération. Dans le cas simple où une seule cellule de récupération est branchée au système, il est obligatoire de devoir arrêter le système pour récupérer la poudre. On se retrouve alors avec un système semi-continu. Cependant, un système évolué permet de s'affranchir de ce problème. En branchant au moins deux filtres en parallèle, il nous est possible de diriger les particules produites à la sortie du microréacteur vers le filtre n° 1 (Figure 37). Une fois celui-ci rempli, une vanne dévie le flux de particules en direction du filtre n° 2. Pendant ce temps, le premier filtre est nettoyé, les poudres récoltées peuvent être conservées et le filtre est prêt à servir une nouvelle fois.

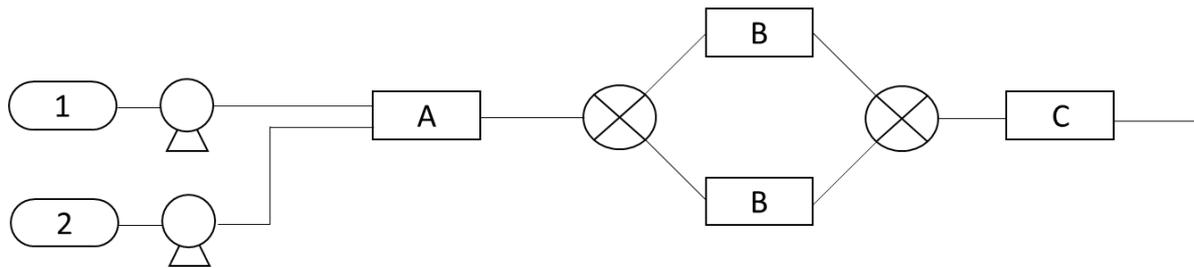


Figure 37 : Schéma du montage μ SAS composé de deux filtres en parallèle.
1 : Bouteille CO_2 ; 2 : Solution organique ; A : Micropuce ; B : Cellule de récupération ; C : BPR.

Deux types de collecteurs ont été utilisés dans ce travail de thèse. Le premier est composé d'une cellule transparente en saphir permettant d'observer en direct l'état monophasique/diphasique du mélange en fonction de la pression. Le second collecteur avec le microréacteur coaxial dans le but de simplifier au maximum le système. Le nouveau système de récupération possède alors un filtre d'une plus grande surface et augmente ainsi la quantité de poudres récupérées.

2.2.3.2.1 Cellule de récupération en saphir

Il s'agit ici d'un cylindre en saphir permettant une visualisation *in situ* du système tout en maintenant la pression désirée (Figure 38). Ce système est capable de tenir à plus de 500 bar. Dans la partie inférieure du cylindre se trouve un filtre en PVDF (PolyVinylidène DiFluoride) avec une taille de pores d'environ 100 nm. C'est sur ce filtre qu'est récoltée la poudre. Ce filtre est récupéré à la fin de la manipulation pour analyse et caractérisation de la poudre récoltée. Le filtre est apposé à un fritté métallique avec une taille de pores d'un micron. La rigidité du fritté prévient ainsi toute déchirure du filtre sous l'effet des débits importants les traversant. Enfin, deux joints toriques en caoutchouc fluoré assurent l'étanchéité de la cellule.

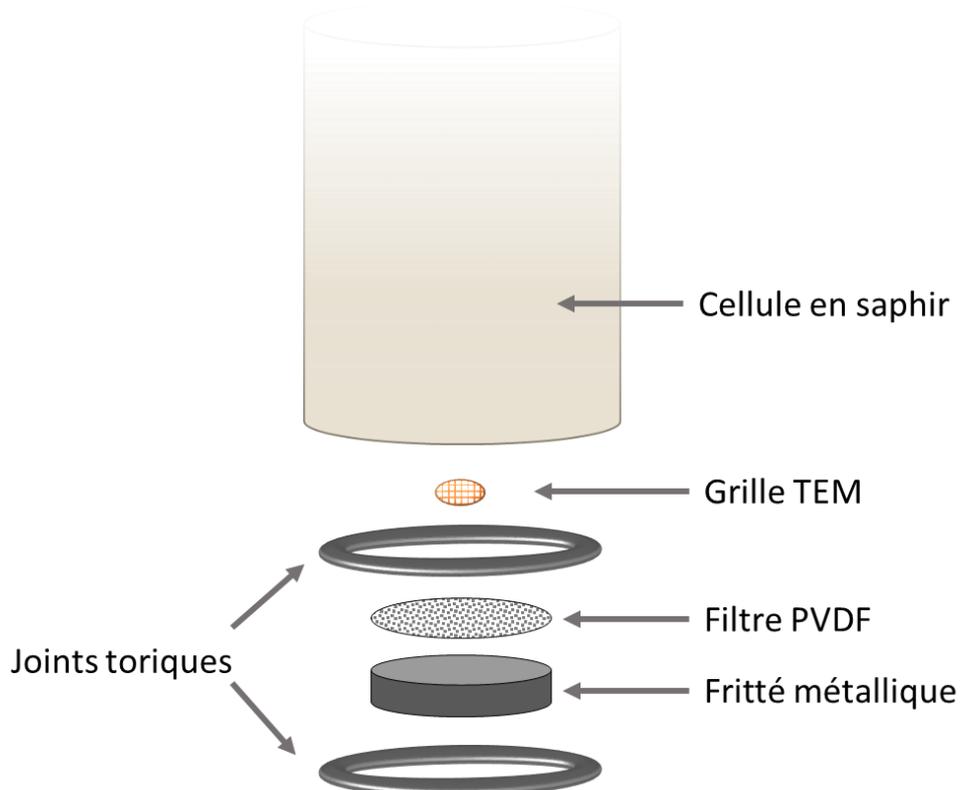


Figure 38 : Schéma des différents constituants de la cellule de récupération.

La cellule de récupération présente plusieurs avantages. En plus d'être le lieu où les particules du soluté sont récoltées tout au long de l'expérience dans des conditions opératoires constantes, la cellule de récupération permet une observation *in situ* du fluide. On peut alors constater que le milieu est bien monophasique pour nos conditions opératoires. Enfin, cette cellule joue un rôle essentiel dans la récupération de poudre dépourvue de solvant. Connectée à une seconde pompe en sc-CO₂, elle est le lieu d'une étape post-SAS lors de laquelle les particules de soluté précipitées et présentes sur le filtre sont séchées par l'anti-solvant sc-CO₂. Ce fluide est introduit à un débit beaucoup plus important que le débit de la pompe de la solution organique (de 2 à 10 fois plus, selon les expériences). Cette étape appelée « séchage » a pour but d'éliminer les traces de solvant résiduel de la poudre sur le filtre à l'aide du sc-CO₂.

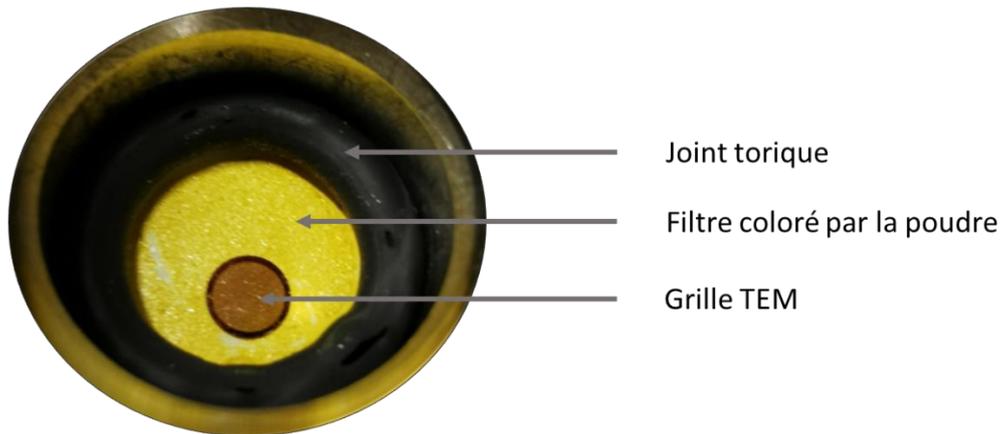


Figure 39 : Photographie du fond de la cellule en saphir pour la récupération de poudre.

Comme montré dans la figure 39, à la fin de l'étape de séchage, la grille TEM peut être récupérée sans avoir subi de dégradation. Dans le cas où la poudre mise en forme est colorée, on peut noter un changement de couleur du filtre de récupération, initialement blanc. Cependant, la quantité de poudre récupérée reste insuffisante pour des techniques de caractérisation autres que le TEM. Il convient donc de modifier la cellule de récupération dans le but d'augmenter le rendement massique en récupération.

2.2.3.2.2 Cellule de récupération en ligne

Dans un second temps, nous avons simplifié la cellule de récupération en enlevant le cylindre de saphir et en raccourcissant le parcours des particules solides avant d'atteindre le filtre. Ici, nous utilisons un filtre métallique cylindrique et creux (Figure 40). La géométrie du filtre permet de récupérer la poudre sur les parois externes du cylindre comme le montre l'image suivante.



Figure 40 : Filtre cylindrique pour la récupération de poudre.

Cette méthode simplifiée permet de récupérer davantage de poudres, puisqu'elle limite les volumes morts dans lesquels les particules peuvent se bloquer. La surface de collecte est même agrandie, ce qui théoriquement doit permettre un temps d'opération plus long. Idéalement, cette durée est limitée par un seul facteur : le remplissage du filtre et la montée en pression du système. La durée moyenne de l'opération du procédé μ SAS est d'une heure. Cette donnée évolue en fonction des paramètres opératoires (concentration de la solution, débits d'injection) et du soluté choisi.

Enfin, comme pour la première cellule de récupération, il est possible de placer une grille TEM pour des analyses ultérieures.

2.2.3.3 Régulateur de pression de sortie

Enfin, un régulateur de pression automatisé (BPR) est connecté à la sortie de la pièce de récupération. Cet outil permet de garder constante la pression en sortie de système en régulant le débit du flux de sortie. Une fois l'expérience terminée, la pression du BPR est lentement diminuée jusqu'à la pression ambiante, de manière à dépressuriser le montage et à garder un maximum de poudre sur filtre. Cette poudre sera ensuite analysée pour caractériser en taille les nanoparticules synthétisées.

Le procédé μ SAS utilisé pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes est décrit au complet dans la figure 41. Dans cet exemple, le microréacteur choisi est la micro-puce et la cellule de récupération en saphir est branchée avant le régulateur de pression de sortie. Cette configuration est typiquement celle choisie pour les analyses *in situ* de fluorescence qui seront détaillées plus loin dans ce chapitre.

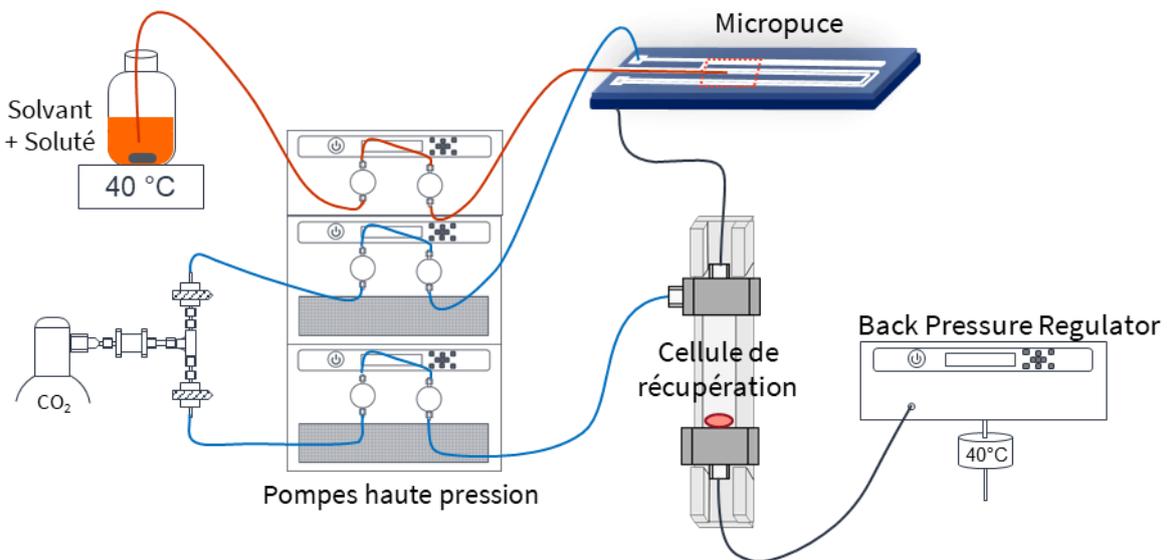


Figure 41 : Schéma du montage expérimental μ SAS.

2.3 Méthodologie pour la caractérisation des matériaux

Dans cette section, nous présentons les différents outils nous permettant de caractériser la poudre synthétisée par μ SAS.

La poudre récupérée dans le filtre du système μ SAS est conservée pour différentes analyses *ex situ* résumées dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Techniques de caractérisation *ex situ* des poudres.

Techniques d'analyse <i>ex situ</i>	Sigle	Informations
Microscopie électronique par transmission	TEM	Taille et morphologie
Microscopie électronique à balayage	SEM	Taille et morphologie
Diffraction de la lumière	DLS	Distribution en taille
Spectroscopie UV	PL/UV	Spectres d'absorption et d'émission

Nous utilisons la fluorescence des FONs afin de les caractériser soit *in situ*, soit *ex situ*. Dans le premier cas, nous utilisons le phénomène AIE du soluté afin d'observer la formation des précipités fluorescents dans le micro-canal. Dans le cadre de cette analyse *in situ*, un dispositif de caractérisation utilisant un microscope confocal est présenté. Quant aux caractérisations *ex situ*, la poudre récupérée est analysée par photoluminescence et par diffraction des rayons X. Il s'agit alors de comparer les spectres d'absorption et d'émission et les diffractogrammes des poudres avant et après avoir été mises en forme par le procédé μ SAS.

2.3.1 Analyses *ex situ* des FONs

2.3.1.1 Microscopie électronique à balayage

Un microscope électronique à balayage (SEM – Scanning Electron Microscope) est un puissant outil qui offre des informations sur la topographie et la morphologie de la surface d'un échantillon. En fonction des microscopes, il est possible d'observer des détails de quelques dizaines de nanomètres. Les poudres organiques peuvent aussi être caractérisées. On peut notamment obtenir des informations sur la taille et la morphologie d'agrégats et de particules individuelles. Le SEM utilise un faisceau d'électrons qui balaie la surface de l'échantillon. L'interaction des électrons envoyés sur les atomes en surface de l'échantillon produit des électrons secondaires de plus faible énergie que les premiers. Un détecteur collecte les électrons secondaires, puis l'image rendue donne des informations sur la morphologie de la surface et sur les caractéristiques chimiques des éléments en surface.

Le SEM est composé de différents éléments présentés ci-dessous. Un filament de tungstène est chauffé à très haute température et émet des électrons. Le filament est placé dans le canon à électrons qui émet un faisceau d'électrons primaires. Ces électrons sont focalisés, puis accélérés en direction du porte échantillon à l'aide d'un diaphragme. Une colonne constituée d'une série de lentilles électromagnétiques permet de focaliser les électrons en un fin faisceau. Une bobine dévie ensuite le faisceau d'électrons pour balayer la surface de l'échantillon observée. Un détecteur collecte les électrons secondaires issus de l'interaction entre les électrons primaires incidents et les atomes en surface de l'échantillon. Ces électrons secondaires de faible énergie (< 100 eV) proviennent essentiellement de la surface de l'échantillon. Ils donnent donc des informations sur la topographie. Une autre catégorie d'électrons peut également être collectée, il s'agit des électrons rétrodiffusés. Ceux-ci sont de bien plus haute énergie (> 1 keV) et résultent de l'interaction quasi élastique avec les noyaux des atomes de surface. Ainsi, leur énergie dépend du numéro atomique de l'atome rencontré,

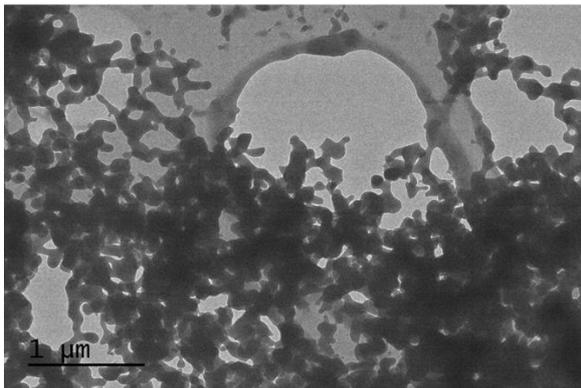
et il est possible d'analyser la composition chimique de la surface de l'échantillon par contraste. On obtient donc une image en noir et blanc, construite en fonction de la masse atomique de l'atome présent à la surface de l'échantillon.

2.3.1.2 Microscopie électronique à transmission

Un microscope électronique à transmission (TEM – *Transmission Electron Microscope*) permet de caractériser des éléments de taille nanométrique. Le TEM est un montage complexe dans lequel un faisceau d'électrons de haute énergie interagit et traverse un très fin échantillon pour son analyse. L'image est formée à partir de l'interaction entre les électrons envoyés et l'échantillon. Cette représentation de l'échantillon en transmission est finalement agrandie, puis focalisée sur un dispositif d'imagerie, comme une caméra CCD (*Charge-Coupled-Device*) ou un écran fluorescent. La grille TEM de caractérisation sur laquelle sont récoltées les nanoparticules synthétisées est composée d'une grille en cuivre. Chaque carré de la grille a pour dimensions $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$. Un fin film de carbone est posé sur la grille pour récolter les particules à analyser au microscope.

Signalons aussi que les nanoparticules déposées sur la grille de caractérisation du TEM peuvent être instables sous l'effet d'un faisceau d'électrons trop intense (Figure 42). On veillera donc à choisir une tension d'accélération basse (60 keV) afin de ne pas dégrader les particules observées. Par conséquent, l'image obtenue est de plus faible qualité puisque moins d'électrons sont collectés par le détecteur. Ceci implique que la diffraction des électrons ne pourra être faite sur ces échantillons.

Faible intensité du faisceau à électrons



Forte intensité du faisceau à électrons

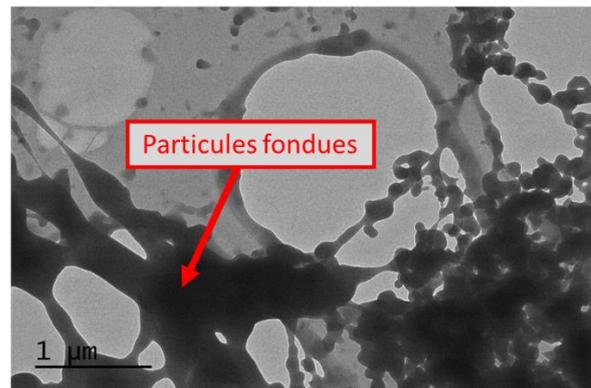


Figure 42 : Images TEM d'une même zone avant et après destruction des particules sous le faisceau du TEM.

Les clichés TEM permettent d'identifier des particules allant jusqu'à quelques nanomètres de diamètre. Ceci permet ainsi de réaliser des mesures de tailles. Les résultats de distribution en taille des particules sont obtenus par un comptage manuel effectué sur plusieurs images de la grille TEM et de même grossissement. Le logiciel ImageJ[®] est utilisé pour mesurer les diamètres des particules observées (Figure 43). Sur cette figure, sont encadrées sur l'image de droite les particules suffisamment bien définies pour la mesure. La photographie de l'échantillon par transmission nous permet d'observer de nombreuses particules, mêmes agrégées entre-elles. Dans de nombreux cas, la superposition des particules n'empêche pas leur visualisation individuelle.

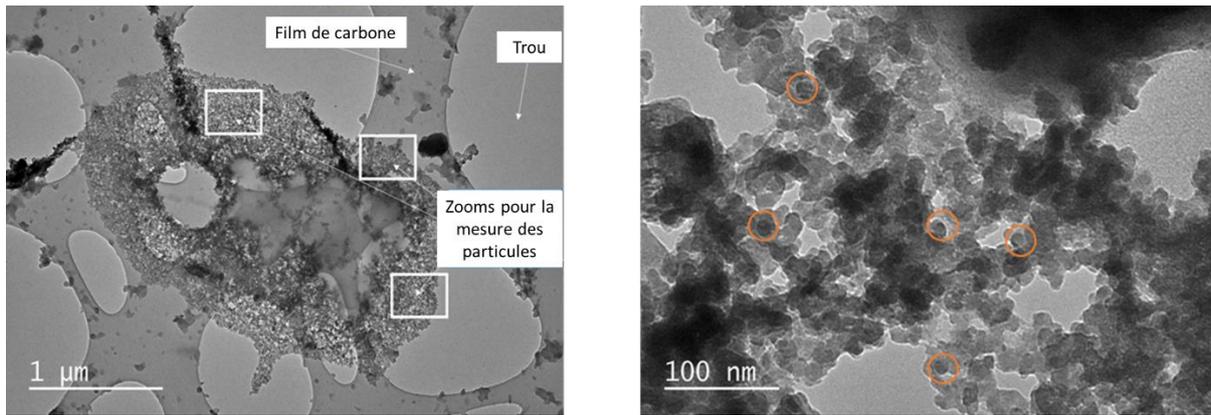


Figure 43 : Images TEM de FONs sur une grille de caractérisation.

2.3.1.3 Dynamic Light Scattering (DLS)

La DLS est une technique de caractérisation en taille basée sur la théorie de Mie qui combine les effets du mouvement Brownien d'une particule avec le comportement d'un laser envoyé sur cette même particule. Cette taille caractéristique calculée correspond à la mesure du rayon hydrodynamique des nanoparticules dispersées dans un liquide.

Il est possible de convertir les mesures d'intensité en nombre de particules ou en volume. Ce puissant outil peut mesurer des tailles de particules très variées : de quelques nanomètres à plusieurs micromètres. Dans le cas de petites particules (dont le diamètre est inférieur à 0,1 fois la longueur d'onde du laser), on peut approximer la théorie de Mie à celle de Rayleigh. Dans ce cas spécifique, la diffusion de la lumière devient isotropique. L'approximation de Rayleigh permet d'obtenir une équation simple reliant l'intensité reçue par rapport à la taille des particules et à la longueur d'onde du laser :

$$I_{Rayleigh} = I_0 \times K(n) \times \frac{d^6}{\lambda^4} \quad (\text{Eq 3}),$$

I_0 : intensité du laser incident

d : diamètre moyen des particules en suspension

λ : longueur d'onde du laser

K : constante dépendant de l'indice de réfraction de la particule (n)

Cette relation met en avant un point important, l'intensité de l'onde émise par une particule de 1 nm est 10^6 (un million) de fois plus petite que celle d'une particule de 10 nm. Ceci explique pourquoi il est généralement difficile d'étudier de petites particules en présence de gros agrégats par les mesures de DLS.

Il est ensuite nécessaire de pouvoir traduire cette intensité en une grandeur plus factuelle, le nombre relatif de particules. Pour cela, on utilise un coefficient de diffusion de Mie, qui découle de la théorie de Mie. Ce coefficient dépend du diamètre des particules et de l'indice de réfraction des particules :

$$I = A \times I_0 \times Mie\ coef_{f(d_i, \theta, n)} \times N_i \quad (\text{Eq 4}),$$

I_0 : intensité du laser incident

A : constante intrinsèque à l'appareil

d_i : diamètre des particules en suspension

θ : angle de diffusion

n : indice de réfraction des particules

Le nombre de particules de diamètre d est alors simplement calculé comme suit :

$$\text{Nombre de particules de diamètre } d = \frac{I_d}{\text{Mie Coeff}_d} \quad (\text{Eq 5}).$$

Enfin, il est aussi possible de caractériser l'échantillon en fonction du volume occupé par les particules :

$$V_{d_i} = \frac{\pi}{6} \times d_i^3 \quad (\text{Eq 6}).$$

Ainsi, un volume occupé par une sphère de diamètre 1 μm est le même que celui occupé par 10^6 sphères de 10 nm de diamètre chacune.

Une source polarisée d'une longueur d'onde connue est émise à travers la cellule liquide dans laquelle se trouvent les particules en suspension. Cette lumière est ensuite diffusée par les nanoparticules en mouvement Brownien, avant d'être collectée à un angle de diffusion connu grâce à un détecteur à comptage de photons de haute sensibilité. Les fluctuations dynamiques de la lumière reçue sont corrélées au mouvement Brownien des nanoparticules en suspension.

La diffusion des fluctuations en intensité est collectée par le détecteur. Puis, elle est corrélée à une fonction, qui une fois convertie et normalisée, est envoyée au logiciel de DLS pour obtenir la taille caractéristique des suspensions. En connaissant la température et la viscosité du liquide, il est possible de calculer le rayon hydrodynamique des particules :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta\Gamma} \times \left(\frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right)^2 \quad (\text{Eq 7}).$$

k_B : constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-2}$)

T : température de la cellule, régulée à $\pm 0.1^\circ\text{C}$

η : viscosité dynamique du solvant (Pa.s)

λ : fixé à 658 nm

n_0 : indice de réfraction du solvant

θ : fixé à 135°

Γ : calculé à partir de la fonction d'autocorrélation de l'intensité de la lumière reçue.

Lors des mesures de DLS, plusieurs facteurs peuvent fortement impacter et fausser les résultats. C'est pourquoi la cellule d'analyse où se trouve l'échantillon est isolée et sa température est régulée au dixième de degré Celsius, à l'aide d'un module de Peltier. Cette cellule présente l'avantage de pouvoir être ajustée en hauteur : une position basse sera plus appropriée aux solutions plus concentrées afin de ne pas saturer le signal ; tandis qu'une position haute est généralement bénéfique aux solutions peu concentrées, de manière à observer un maximum de particules très diffuses dans le milieu.

2.3.2 Analyse *in situ* des FONS

2.3.2.1 La fluorescence

La fluorescence moléculaire a initialement constitué le fondement de certains outils analytiques pour déterminer la concentration d'espèces neutres ou ioniques. Cet outil s'est sans cesse perfectionné jusqu'à l'élaboration de tests très sensibles fondés sur la fluorescence, notamment pour le diagnostic clinique. Le diagramme de Perrin-Jablonski est utile pour visualiser les divers processus mis en jeu : absorption d'un photon, relaxation vibrationnelle, fluorescence, passage intersystème, conversion interne, phosphorescence (Figure 44). Les états électroniques singlets sont notés S_0 (état fondamental), S_1 , S_2 , ... et les états triplets T_1 , T_2 , Des niveaux vibrationnels sont associés à chaque état électronique. Notons que le processus d'absorption est très rapide ($\sim 10^{-15}$ s) par rapport à tous les autres processus (Lakowicz, 2010).

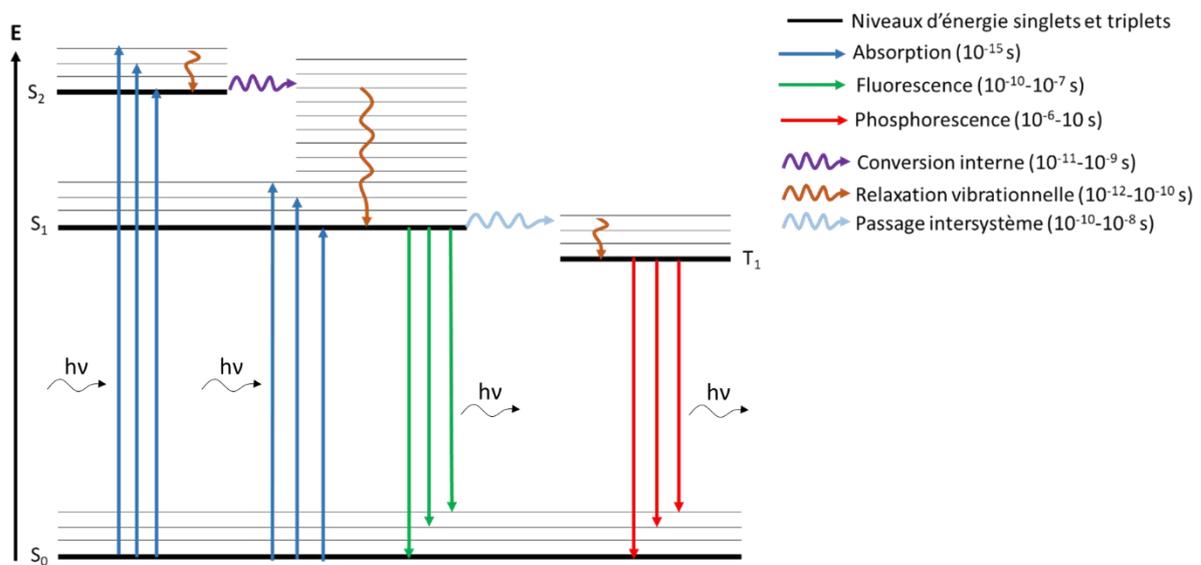


Figure 44 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les modes d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence (avec absorption/émission d'un photon d'énergie $E=h\nu$).

Il est important de remarquer que les écarts d'énergie entre les niveaux vibrationnels sont du même ordre de grandeur dans S_0 et S_1 , de telle sorte que le spectre de fluorescence apparaît souvent comme symétrique du spectre d'absorption (« règle de l'image dans un miroir »). La conversion interne est une transition non radiative entre deux états électroniques de même multiplicité de spin. En solution, ce processus est suivi d'une relaxation vibrationnelle vers le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique final. L'excès d'énergie peut être transféré au solvant lors de collisions de la molécule excitée avec les molécules de solvant environnantes.

L'émission de photons accompagnant la relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ est appelée fluorescence. Le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus grandes (i.e. énergies plus basses) que le spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle dans l'état excité. L'écart (exprimé en nombre d'onde) entre le maximum de la première bande d'absorption et le maximum de fluorescence est appelé déplacement de Stokes. Les molécules excitées restent dans l'état S_1 pendant un temps relativement court (10^{-11} – 10^{-9} s) avant d'émettre un photon ou de se désexciter par d'autres voies. Ainsi, l'intensité de fluorescence d'une population de fluorophores décroît exponentiellement avec un temps caractéristique qui reflète le temps de séjour moyen des molécules dans l'état excité S_1 .

Le passage intersystème est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicités de spin différentes. La probabilité du passage est très faible puisque ce type de transition ($T_1 \rightarrow S_0$) est théoriquement interdite. Cependant, dans certains cas particuliers, le couplage entre le moment magnétique orbital et le moment magnétique de spin peut être suffisamment important pour rendre possible le passage. C'est notamment le cas avec des éléments lourds, dans un milieu rigide ou à basse température. Le passage intersystème ($S_1 \rightarrow T_1$) peut être suffisamment rapide ($10^{-10} - 10^{-7}$ s) pour entrer en compétition avec les autres voies de désexcitation à partir de S_1 . La durée de vie de l'état triplet peut être suffisamment longue pour que l'on puisse observer le phénomène à des échelles de temps allant jusqu'à la seconde, voire plus. Cette désexcitation non radiative de l'état triplet $T_1 \rightarrow S_0$ est appelée phosphorescence.

La fluorescence est un phénomène de luminescence où une substance absorbe une lumière (photons) pour réémettre une lumière provenant d'un état excité, avec une probabilité constante. Les phénomènes de photoluminescence qui sont générés par une excitation sont subdivisés en deux familles : celle de la fluorescence et celle de la phosphorescence. La fluorescence se traduit par l'émission de photons lors d'une transition électronique entre un état singulet excité S_1 vers l'état fondamental S_0 . Avant cette transition dite de relaxation, l'état excité a une durée de vie moyenne de 10^{-9} à 10^{-7} s.

Quant à la phosphorescence, elle a lieu à la suite de l'excitation d'une molécule, mais contrairement à la fluorescence, un autre mécanisme inter-système a lieu avant la relaxation vers l'état fondamental. Dans le cas de la phosphorescence, une transition de l'état singulet excité S_1 vers l'état triplet excité T_1 a lieu. La durée de vie à l'état excité est plus longue (entre 0,1 et 1 seconde). Enfin, la relaxation se traduit par une transition entre l'état triplet excité et l'état fondamental.

Les molécules fluorescentes sont caractérisées par leurs spectres d'absorption et d'émission. Ceux-ci sont uniques pour chaque molécule dans un milieu donné car ils décrivent la distribution de probabilités des transitions énergétiques. Ils dépendent donc de la structure moléculaire, de la nature du solvant, des interactions intermoléculaires dans un solide, etc.

Enfin, les fluorochromes sont également caractérisés par d'autres grandeurs qui permettent d'étudier leur environnement ou encore leur concentration. Le rendement quantique décrit l'efficacité de l'émission de lumière fluorescente d'une molécule. Il est égal au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Il est important que le rendement quantique de fluorescence soit élevé pour optimiser l'efficacité du système dans des applications d'imagerie photoélectrique (Dolgoplova et al., 2016; Turki et al., 2007; Yadav et al., 2015).

2.3.2.2 Technique d'observation par fluorescence en microscopie optique confocale

Un microscope de fluorescence diffère d'un microscope standard par la source lumineuse qui produit de la lumière UV-visible. La fluorescence est enregistrée par une caméra CCD. Pour des échantillons plus épais que la profondeur de champ, les images sont rendues floues par la fluorescence émise hors du plan focal. Dans un microscope confocal, un faisceau de lumière focalisée en un point balaye l'échantillon (Figure 45). La fluorescence émise par celui-ci est séparée du faisceau incident par un miroir dichroïque (séparateur) et est focalisée par une lentille sur diaphragme (sténopé) derrière lequel est placé un photomultiplicateur. La fluorescence émise hors du plan focal au-dessus et en-dessous de l'échantillon ne peut pas passer à travers le diaphragme, ce qui a pour résultat de ne montrer que la fluorescence émise du plan où est focalisé le microscope.

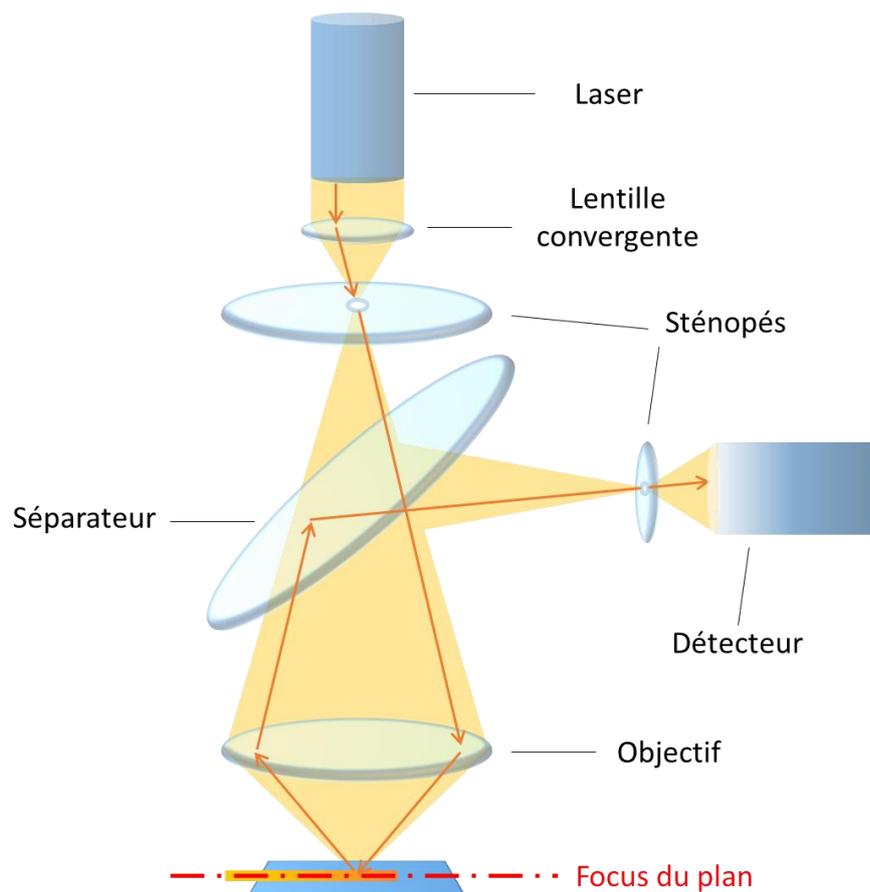


Figure 45 : Schéma d'un microscope confocal.

Utilisant des molécules fluorescentes (aussi appelées « sondes »), la microscopie confocale permet d'accéder à différentes informations : structure de macromolécules (ADN, protéines, ...) ; révélation de réactions immunologiques ; mesure de modifications dans les cellules vivantes (activité enzymatique, perméabilité membranaire) ; mouvements inter- ou intra-cellulaires *in vivo* (Pawley and Masters, 2008). Le principe du confocal a été développé afin de résoudre le problème de co-localisation. Lorsque deux molécules se trouvent dans la même région d'intérêt (zone où est focalisé le microscope), les signaux des deux molécules se mélangent, rendant impossible l'interprétation du faisceau reçu. Employant des sources allant du visible à l'ultra-violet (UV), ce procédé permet une analyse précise de zones profondes dans les tissus ainsi que d'exciter des fluorochromes. Ces fluorochromes sont alors excités à une ou plusieurs longueurs d'onde précises avant de mesurer leur réponse en fluorescence. De récents progrès dans les outils d'analyse par microscopie, dans les interactions entre le microscope et l'objet étudié, dans la reconstruction de l'image finale ont eu lieu. Des techniques avancées de fluorescence ont fait leur apparition dernièrement : citons par exemple la *fluorescence lifetime imaging* (FLIM) ou encore la spectrométrie par corrélation. Des techniques basées sur des lasers performants offrent des analyses à l'échelle nanométrique. Ces techniques dites « nanoscopiques » donnent accès à une résolution sans précédent. Ainsi, les échantillons microbiologiques peuvent être correctement étudiés à l'échelle de molécules ou macromolécules fluorescentes (Ishikawa-Ankerhold, 2012; Liao et al., 2016).

La microscopie confocal par laser a de nombreux avantages : une haute résolution spatiale (xy), un choix de section pour l'observation optique, l'utilisation de plusieurs lasers simultanément ou séquentiellement. En revanche, cette technique présente une faible résolution axiale, elle est limitée par la faible pénétration du laser et seul un scanner hautement performant combiné au microscope

peut offrir une analyse d'image rapide (nécessaire pour la FLIM par exemple). Enfin, notons que le modèle étudié doit être constant dans le temps et dans l'espace pour que la méthode observée par microscopie soit quantitative.

Dans notre cas, la microscopie confocale nous sera utile pour observer la précipitation en 2D des particules fluorescentes aux effets AIE dans notre puce microfluidique en trois dimensions.

2.3.2.4 Observation *in situ* dans le micro-canal

Dans cette partie, nous présentons le montage expérimental développé pour observer *in situ* la fluorescence AIE des particules formées durant une opération μ SAS. Le système se compose des mêmes outils que ceux présentés précédemment. La nouveauté ici réside en l'ajout d'un microscope confocal. La micro-puce est placée sous l'objectif du microscope, sur une platine motorisée (Figure 46). La manœuvrabilité des outils microfluidiques permet de déplacer facilement l'expérience de synthèse par μ SAS vers des plateformes de caractérisation en recourant à peu de transformations du montage expérimental. Le microscope confocal SP8 Leica est doté de quatre objectifs de grossissements différents (de 10x à 63x) pour différentes applications. Quatre lasers d'excitation peuvent être sollicités indépendamment ou en même temps, ils ont pour longueurs d'onde d'émission respectives 405 nm, 488 nm, 552 nm et 638 nm.

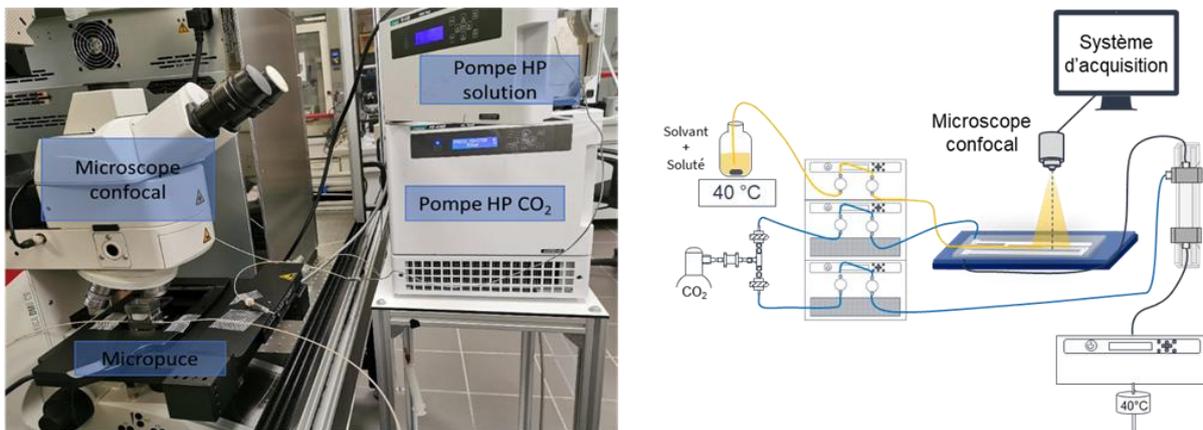


Figure 46 : Représentations du système μ SAS avec le microscope confocal.

Des réglages préliminaires ont pour but d'obtenir la meilleure image du micro-canal (Figure 47). Après avoir focalisé l'injecteur dans le plan de l'objectif et après avoir réglé les paramètres de contraste et de luminosité de l'image rendue, nous pouvons commencer les différentes acquisitions.

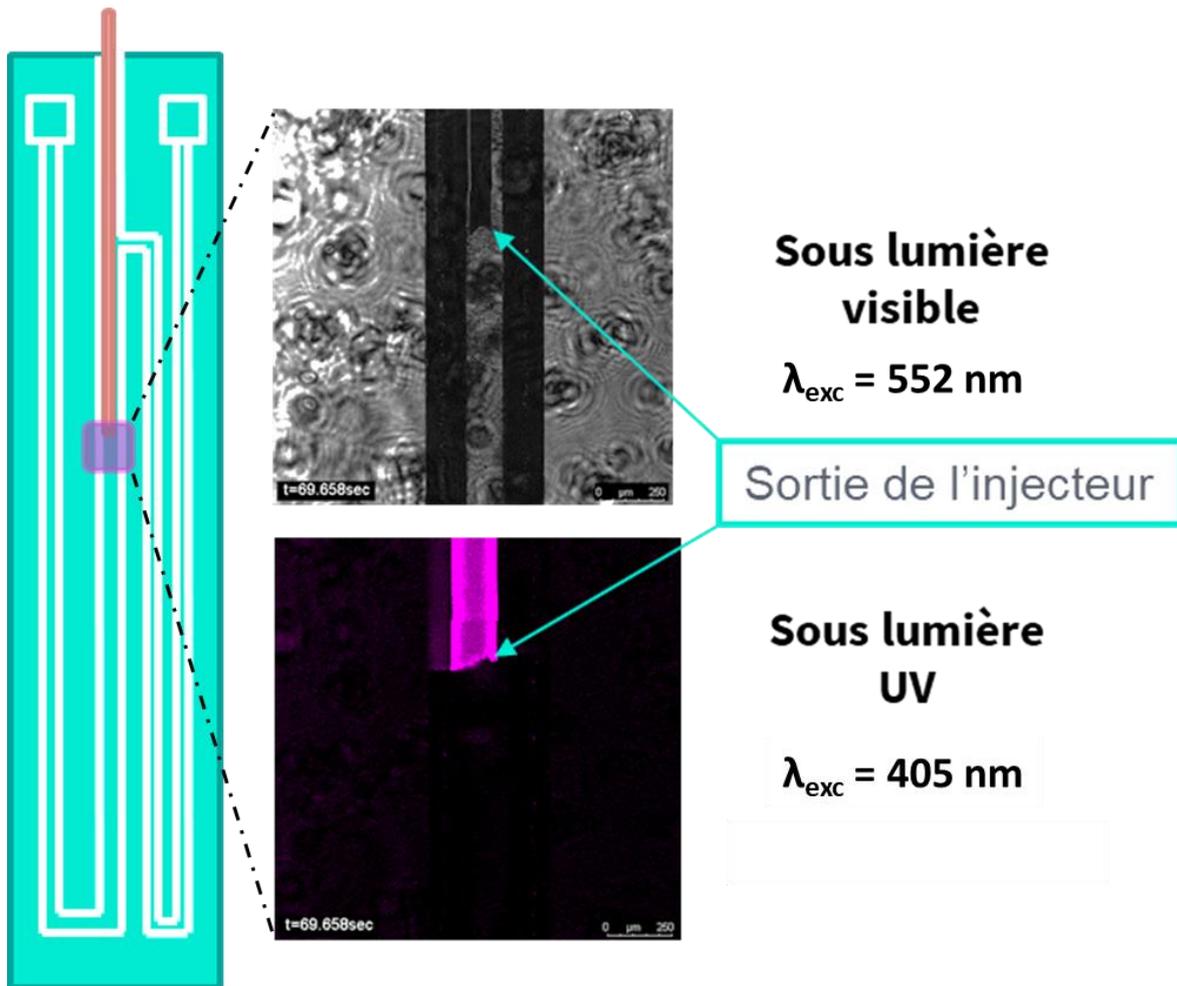


Figure 47 : Images de l'injecteur dans le micro-canal sous différentes sources.

Nous rappelons ici que c'est la fluorescence AIE des particules solides formées dans le microréacteur que nous observons afin de la corréler au champ de nucléation simulé pour les mêmes conditions de synthèse. Ce travail s'effectue en deux parties. La première consiste à enregistrer, pour une durée donnée, la réponse de la zone excitée à 405 nm et pour une longueur d'onde d'émission balayant le spectre visible. La seconde partie est un travail d'analyse des données. Chaque pixel se voit attribuer une longueur d'onde d'émission maximale (qui peut être moyennée en fonction du temps) afin d'obtenir *in fine* une cartographie montrant les variations de longueur d'onde d'émission à différentes zones du micro-canal.

Cette expérience présente de nombreux avantages comme le fait de pouvoir rapidement changer les paramètres opératoires (pression, débits, température) et ainsi compiler des images pour différentes conditions en un temps court. En revanche, le temps d'acquisition du microscope empêche la visualisation des champs de nucléation présentant une rapide variation avec le temps. De plus, la résolution spatiale de l'appareil ne permet pas l'observation de particules individuelles. Au final, nous obtenons la représentation moyennée dans le temps d'un champ de nucléation à partir de la fluorescence des particules.

2.3.2.4.1. Analyse temporelle

Ce premier mode d'analyse est utilisé pour quantifier un champ de concentration en particules fluorescentes. L'analyse temporelle établit une cartographie où l'intensité de chaque pixel est égale à la somme des intensités cumulées dans le temps. Une analyse avec un temps suffisamment long

donnera une moyenne du champ de concentration des particules. Ces images nous renseignent sur les principaux lieux de précipitation. Les différentes tailles de particules obtenues lors des études paramétriques peuvent être corrélées à l'allure des champs de précipitation, afin de mieux comprendre l'effet du mélange sur la qualité de la poudre mise en forme.

Comme le montre la figure 48, il est important d'enregistrer un nombre conséquent d'images. La compilation d'au minimum 100 images nous apporte un résultat satisfaisant de l'émission des particules fluorescentes. Le code de programmation permettant d'obtenir une telle cartographie est présenté en annexe 3.

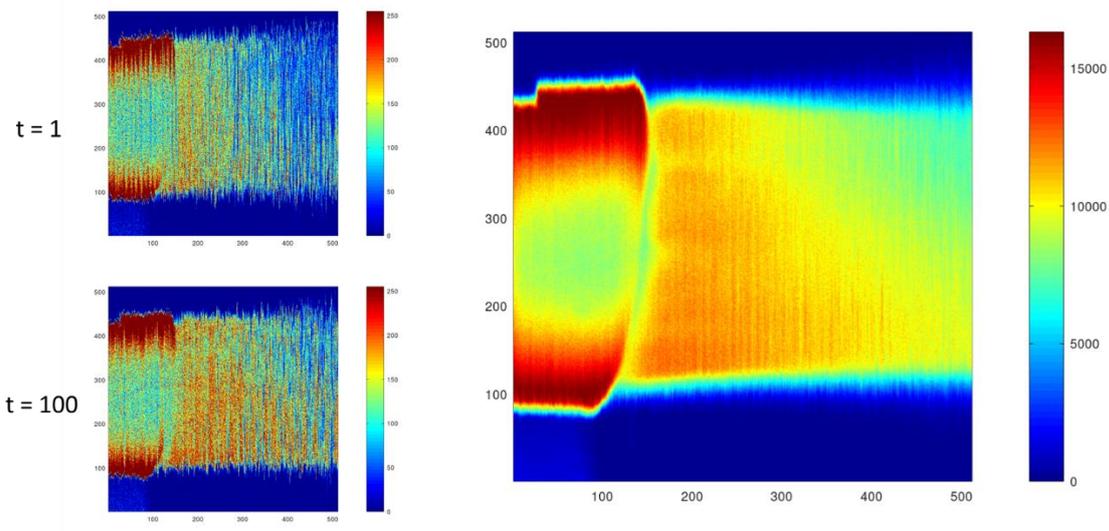


Figure 48 : À gauche : images instantanées à $t = 1$ et à $t = 100$ du micro-canal. L'échelle correspond à l'intensité mesurée. À droite : analyse temporelle (cumul) pour t allant de 1 à 100 et pour la même zone. L'échelle correspond au cumul des intensités.

2.3.2.4.2. Analyse spectrale

Le second mode d'analyse a pour objectif de déterminer un champ de particules fluorescentes en fonction de leurs longueurs d'onde d'émission. Le principe ici est de quantifier la longueur d'onde d'émission maximale pour chaque pixel de la cartographie (Figure 49). Pour ce faire, nous enregistrons l'intensité du spectre d'émission de chaque pixel avec le microscope confocal et ses caractéristiques (pas = 3 nm). Le résultat d'une telle étude peut ensuite être comparé à celui obtenu en analyse temporelle. Ces résultats seront présentés dans le chapitre 3.

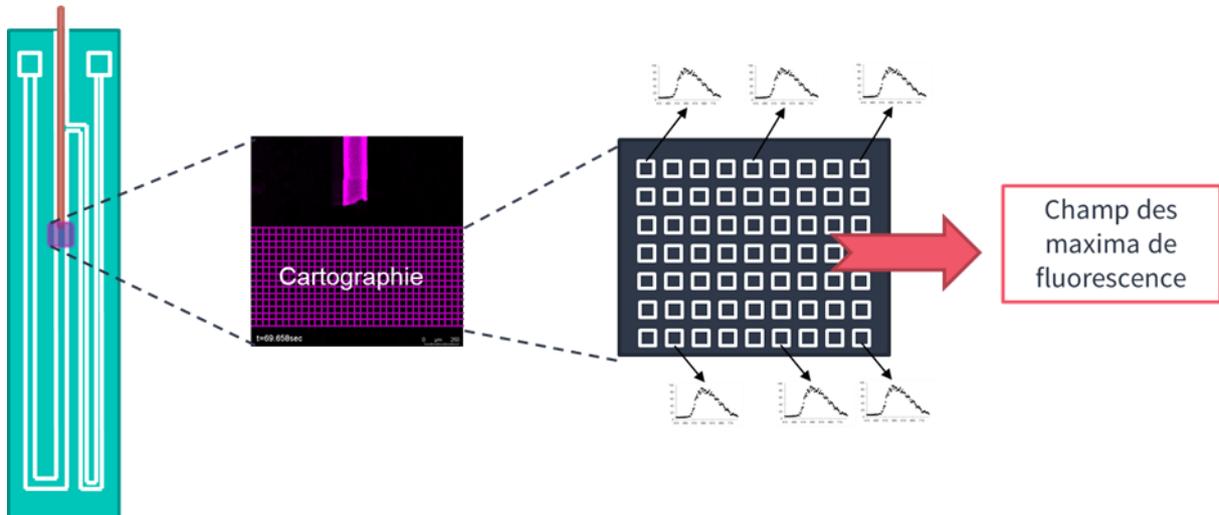


Figure 49 : Schéma des étapes réalisées pour visualiser le champ de nucléation in situ.

La création de la cartographie des longueurs d'onde est relativement complexe. Pour chaque pixel de la carte, une courbe d'émission est mesurée. Un lissage de la courbe de type gaussien est ensuite réalisé pour chacune des courbes de fluorescence mesurées. Un programme informatique (Annexe 4) créé à cette occasion attribue à chaque pixel la longueur d'onde d'émission du maximum de la courbe mesurée sur le pixel. Une nouvelle cartographie est alors créée, elle traduit la variation des maxima des courbes d'émission de fluorescence.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les outils nécessaires à la synthèse et à la caractérisation des FONs par μ SAS. Les mesures de solubilité du soluté dans le milieu {solvant/anti-solvant} sont essentielles pour comprendre les phénomènes de nucléation dans le système à haute pression. C'est à partir d'outils de spectroscopie infrarouge pour les hautes pressions que nous avons pu mesurer l'intensité des bandes d'absorption du soluté. Les conditions expérimentales du μ SAS ont pu être reproduites lors de cette étape en imposant une pression, une température et un rapport molaire en CO_2 qui correspond aux débits des flux injectés dans la micro-puce. En se plaçant à une fraction molaire en CO_2 importante, la spectroscopie infrarouge montre une très faible solubilité du soluté dans le milieu {solvant/anti-solvant}. La précipitation du soluté sera alors aisée et la production de poudre sera conséquente. Enfin, nous rappelons que cette donnée de solubilité à la saturation du soluté dans le milieu {solvant/anti-solvant} est indispensable aux calculs de simulation du champ de nucléation dans le micro-canal.

Nous avons ensuite présenté le montage expérimental développé à l'ICMCB pour la synthèse de FONs par voies supercritrique et microfluidique. Le procédé μ SAS permet l'utilisation des fluides supercritiques dans des réacteurs de petite dimension (canaux de quelques centaines de microns de largeur). Cette technique vise à contrôler finement la taille des particules formées ainsi que leur distribution en taille. Les étapes de fabrication du microréacteur du μ SAS ont été présentées. Cette technologie, acquise dans notre groupe de recherche, est en phase avec les conditions opératoires (notamment la pression) de nos expériences (Figure 50).

Enfin, nous avons montré les différentes techniques de caractérisation des poudres utilisées dans les prochains chapitres, que ce soit pour déterminer la taille des particules ou pour observer leur fluorescence *in situ* et *ex situ*. Le montage expérimental permettant d'examiner les particules formées grâce à leur effet AIE a été décrit. L'intense fluorescence des particules solides formées à la sortie de l'injecteur dans le micro-canal peut être corrélée aux champs de nucléations décrits par la simulation. De plus, le microscope confocal utilisé lors de cette expérience permet de visualiser spatialement la longueur d'onde d'émission des FONs à effet AIE. Ces résultats seront présentés et discutés dans le chapitre suivant.

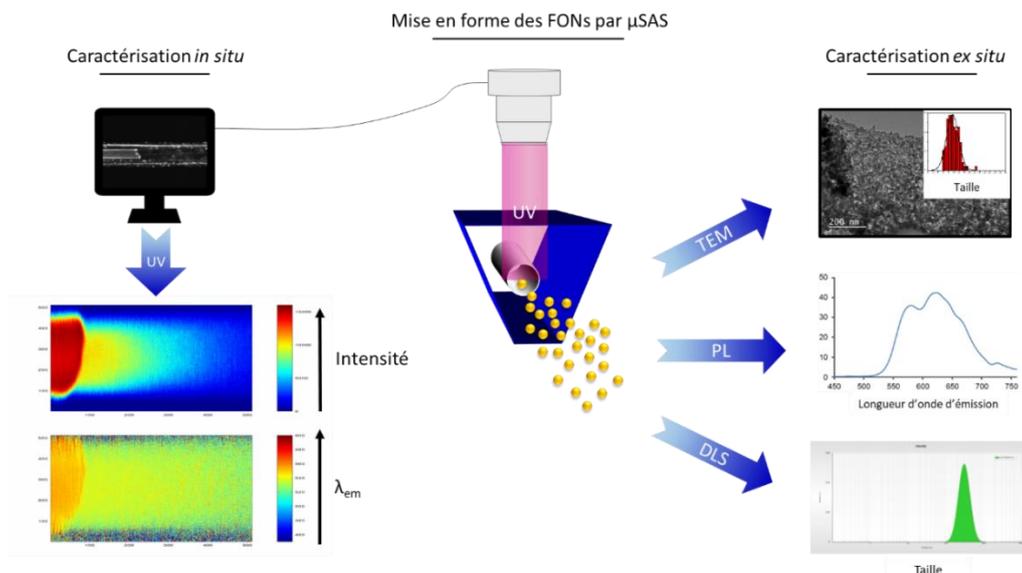


Figure 50 : Illustrations des techniques de caractérisation des poudres mises en place dans cette thèse.

Chapitre 3

Étude des mécanismes mis en jeu dans le cadre du procédé μ SAS

Introduction

Ce chapitre concerne l'étude des mécanismes fondamentaux de notre procédé μ SAS, c'est-à-dire la thermodynamique, l'hydrodynamique et les phénomènes de nucléation et de croissance. Pour cela, une approche couplée expérience/simulation a été utilisée.

Dans un premier temps, nous rappelons quelques notions fondamentales, telle que les phénomènes de nucléation et de croissance qui serviront de base à la discussion. La deuxième partie concerne les mesures *in situ* de solubilité des composés organiques fluorescents que nous cherchons à synthétiser dans un milieu solvant/ CO_2 en conditions supercritiques. Ces résultats sont essentiels afin de pouvoir estimer la sursaturation dans le cadre de la simulation numérique.

Dans la troisième partie, afin de valider le procédé μ SAS, nous étudierons la précipitation du TPE, considéré comme matériau modèle. Les résultats de la simulation numérique prenant en compte l'ensemble des phénomènes physiques (hydrodynamique, thermodynamique, nucléation et croissance) seront comparés avec les résultats de la caractérisation *ex situ* des poudres obtenues dans le microréacteur. Cette comparaison nous permettra de déterminer la tension interfaciale (fluide/particules solides), difficilement mesurable expérimentalement.

La dernière partie, particulièrement originale, consistera à tirer parti de la propriété AIE de ces nanoparticules pour visualiser le champ de précipitation *in situ* dans nos réacteurs. Une molécule sera spécialement choisie pour ses propriétés optiques : il s'agit d'un dérivé de benzoxazole, nommé BZX. Dans un premier temps, nous étudierons le système triparti {BZX/THF/ CO_2 } pour étudier la solubilité du nouveau soluté dans le milieu réactionnel monophasique. L'analyse *ex situ* de la taille des particules de BZX produites par μ SAS sera couplée aux analyses *in situ* obtenues par microscopie confocale. Ces observations expérimentales seront alors confrontées à la simulation numérique.

3.1 PARTIE I : Rappels de notions fondamentales

Dans cette partie nous rappelons la définition de grandeurs qui seront étudiées dans ce chapitre, à savoir la sursaturation directement liée à la solubilité de l'espèce à cristalliser, la nucléation que l'on considère ici comme homogène et primaire et la croissance par diffusion de la particule (amorphe ou cristalline). Nous rappelons également la définition des temps caractéristiques de la précipitation, temps de nucléation et temps de croissance, qui seront comparés au temps de mélange dans nos réacteurs.

3.1.1 Sursaturation

Contrairement à la fusion ou à la solidification, le transfert de chaleur n'est pas l'unique facteur agissant sur la cristallisation. Les propriétés du produit de la cristallisation dépendent principalement de la sursaturation engendrée lors de la réaction ou du mélange. Pour obtenir un produit homogène avec des caractéristiques choisies (taille de grain, distribution en taille, pureté), il est nécessaire de contrôler la sursaturation ainsi que le temps de résidence dans une solution sursaturée. La sursaturation est donc considérée comme la force motrice permettant la précipitation. Cette grandeur adimensionnelle, est définie classiquement par :

$$S = \frac{c}{c_{sat}} \quad (\text{Eq 8}),$$

où C et C_{sat} sont respectivement la concentration de l'espèce à cristalliser et sa concentration dans le milieu. La précipitation a lieu lorsque la concentration du soluté excède la solubilité ($S > 1$). Le processus de sursaturation initie la nucléation et la croissance des particules. Cette capacité à produire plus ou moins de particules est liée à la barrière énergétique que doit dépasser la force de sursaturation. Au regard des potentiels chimiques des phases saturée (μ_s) et sursaturée (μ), on peut écrire :

$$\Delta \mu = \mu - \mu_s = kT \ln\left(\frac{C}{C_{sat}}\right) \quad (\text{Eq 9}).$$

Si $\Delta \mu > 0$, l'énergie du système est suffisante pour que la cristallisation ait lieu.

Si $\Delta \mu < 0$, la barrière énergétique n'est pas franchie, la cristallisation n'a pas lieu.

Il est ici évident que la solubilité est une donnée fondamentale afin d'estimer les niveaux de sursaturation atteignables dans nos réacteurs. Sa détermination, *in situ*, fera l'objet de la partie suivante.

3.1.2 Nucléation

L'étape de nucléation est décrite comme la formation d'un germe cristallin du soluté dans la solution. Elle est suivie par une étape de croissance du germe en une particule plus grande (échelle nanométrique). Ces deux étapes constituent la synthèse classique des nanoparticules par voie ascendante. Dans le cas où la germination et la croissance ont lieu simultanément, on obtient des particules de tailles très variées. Pour obtenir une distribution en taille étroite, les étapes de nucléation et de croissance doivent impérativement avoir lieu séparément.

En postulant que le germe issu de la nucléation est sphérique, son énergie libre de surface s'écrit :

$$\Delta G_S = 4\pi R^2 \sigma \quad (\text{Eq 10}),$$

où σ est la tension de surface de la sphère.

Notons que l'énergie libre (ou énergie de Gibbs) de surface est donnée par la relation :

$$G_S = \sigma S_s \quad (\text{Eq 11}),$$

où S_s est la surface de la sphère. G_S est donc positive, ce qui prouve que thermodynamiquement, un système sera plus stable en minimisant la taille des particules formées.

Considérons maintenant le volume du germe, son énergie libre de volume s'écrit alors :

$$\Delta G_V = \frac{4}{3}\pi R^3 \Delta G_V^* \quad (\text{Eq 12}),$$

où ΔG_V^* est l'énergie libre de formation de volume d'une unité élémentaire.

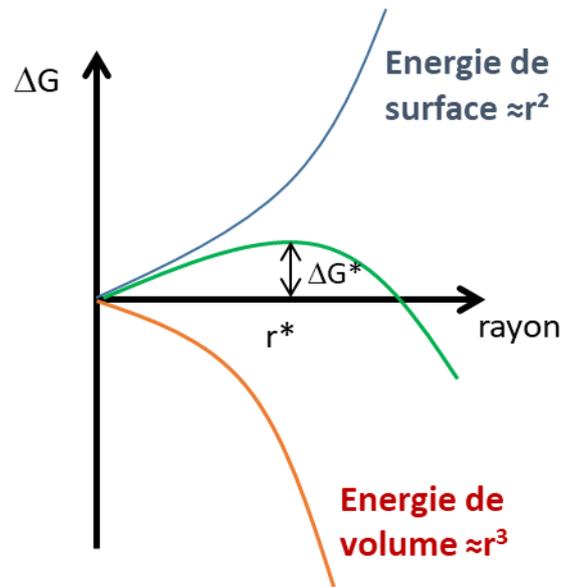


Figure 51 : Energies libres d'activation de nucléation homogène en fonction du rayon du germe (r).

La variation d'énergie libre totale attribuée à la formation du germe sphérique est la somme des variations des énergies libres de surface et de volume du germe. La figure 51 représente les variations d'énergies libres en fonction du rayon du germe. On note que la variation totale d'énergie libre (en vert) passe par un maximum avant de devenir négative et de diminuer. On appellera r^* le rayon critique pour lequel ΔG est maximal. Ainsi, on remarque qu'un germe dont le rayon est inférieur à r^* ne peut se former spontanément. En utilisant les équations de Gibbs-Thompson, on peut réécrire la variation d'énergie libre du germe critique telle que :

$$\Delta G^* = \frac{16\pi\sigma^3 V_m^2}{3 (RT \ln(S))^2} \quad (\text{Eq 13}),$$

où V_m est le volume molaire et S est la sursaturation.

Cette nouvelle écriture nous montre que la température, la sursaturation et la tension interfaciale entre le solide et la phase fluide, sont les paramètres influant sur l'énergie libre de nucléation.

La théorie de la nucléation classique est donnée par Volmer et Weber (Volmer and Weber, 1926), selon lesquels le taux de nucléation est lié exponentiellement à la formation de germes d'une nouvelle phase. Afin que cette nouvelle phase apparaisse, une interface doit impérativement exister. En l'absence d'impuretés en suspension, la nouvelle phase commence par la formation d'un nucléi localisé. Bien que dans le cas d'une solution pure, la nucléation homogène peut être présentée comme l'unique mécanisme participant à la formation des cristaux, il est important de bien contrôler les conditions de mélange. En effet, les propriétés de surface peuvent être modifiées par la température, la pression, le degré de sursaturation, l'hydrodynamique, ce qui peut avoir comme effet de favoriser la nucléation hétérogène. Lors de travaux précédents (Zhang, 2019), nous nous sommes focalisés sur la détermination des meilleures conditions opératoires pour favoriser un mélange très rapide et total, ceci afin de proposer un cadre propice au seul développement de la nucléation primaire et homogène dans nos microsystemes. Nous avons donc considéré dans les simulations la seule nucléation primaire dont la fréquence de nucléation est calculée par la relation 14 (Mersmann).

$$B = 1.5D_{WC}(C_{sat}SN_a)^{7/3} \sqrt{\frac{\sigma}{k_b T} V_M} \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \left[\frac{\sigma}{k_b T}\right]^3 \frac{V_M^2}{\ln^2(S)}\right) \quad (\text{Eq 14})$$

avec N_a le nombre d'Avogadro, D_{wc} le coefficient de diffusion moléculaire calculée par la relation de Wilke and Chang (Zhang, 2019), k_b la constante de Boltzmann et V_M le volume moléculaire.

Un des résultats majeurs de la comparaison expérience/simulation sera d'analyser d'un point de vue qualitatif la dispersion des particules au sein du réacteur afin de valider (ou invalider) l'hypothèse de la seule (ou prédominante) nucléation primaire homogène dans nos systèmes. La comparaison expérience/simulation sera également utilisée pour ajuster le paramètre de tension interfaciale σ très difficile à mesurer directement.

Afin de comparer les temps caractéristiques des différents processus impliqués dans le procédé, mélange, nucléation et croissance, nous introduisons ici le temps de nucléation par la relation suivante (Zhang, 2019) :

$$t_N = \frac{1}{VB_0} \quad (\text{Eq 15}),$$

avec B_0 la fréquence ou cinétique de nucléation (en $m^{-3}s^{-1}$) et V le volume de la cellule du maillage.

3.1.3 Croissance des cristaux

La croissance des cristaux dans une solution sursaturée est un procédé complexe. Nous faisons ici le choix de considérer uniquement la croissance par condensation/diffusion et définissons le terme de croissance G avec le formalisme classique utilisée en génie des procédés faisant intervenir un coefficient de transfert de matière k_g . La relation de croissance s'écrit alors :

$$G = \frac{M_p k_a}{3\rho_p k_v} k_g C_{sat} (S - 1) \quad (\text{Eq 16}),$$

$$\text{avec } k_g = \frac{D_{wc} Sh}{L} \quad (\text{Eq 17}),$$

et avec M_p , ρ_p , k_a , k_v respectivement la masse molaire du soluté, la masse volumique du soluté, le facteur de forme surfacique, le facteur de forme volumique. Le coefficient de transfert de matière, déduit de l'analyse dimensionnelle, est calculé après estimation des nombres adimensionnels de Reynolds de Schmidt et de Sherwood.

Le temps caractéristique de croissance est défini par (Baldyga 2012) :

$$t_G = \left(\frac{M_p}{G\rho_p k_a m_2} \right) C_{sat} (S - 1) \quad (\text{Eq 18}),$$

où m_2 représente le deuxième moment de la distribution, i.e., la surface totale des particules créées dans le volume (en $m^2.m^{-3}$).

3.1.4 Hydrodynamique et simulation numérique

Bien que l'étude hydrodynamique ne fasse pas l'objet de ce travail de thèse, il est important de rappeler que les simulations qui seront comparées à l'expérience ont été effectuées sur plusieurs centaines de processeurs sur le supercalculateur de l'Université de Bordeaux, conférant ainsi une grande précision pour la prédiction des conditions de mélange et formation des particules. Le code de calcul utilisé est le code massivement parallèle Notus développé dans l'équipe Mécanique des Fluides Numérique de l'institut d'Ingénierie et Mécanique de Bordeaux (I2M).

L'ensemble du système d'équations résolues associant la mécanique des fluides numérique (CFD) et l'équation de bilan de population (PBE) sont détaillées dans l'article proposé en annexe 2. La simulation nous permet d'obtenir spatialement et temporellement la distribution des principales grandeurs dans le réacteur : vitesse, concentration, sursaturation, fréquence de nucléation, taux de croissance et moments de la distribution nécessaires à sa reconstruction.

L'efficacité du mélange est décrite en calculant le nombre de Reynolds moyen défini comme :

$$Re = \frac{\bar{u} D_h \bar{\rho}}{\bar{\mu}} \quad (\text{Eq 19}),$$

en considérant le mélange fixé à une composition volumique CO₂:THF de 98:2.

La vitesse du flux d'injection (\bar{u}) est calculée à partir des débits volumétriques (Q_x) du CO₂ et du THF, de leurs densités (ρ_x) aux températures d'injection des pompes ($T_0 = -5$ °C et $T'_0 = 40$ °C), de la densité du mélange à la température d'opération ($T = 40$ °C) et de l'aire trapézoïdale du micro-canal (A) :

$$\bar{u} = \frac{\rho_{CO_2}(T_0) Q_{CO_2} + \rho_{THF}(T'_0) Q_{THF}}{\bar{\rho}(T)A} \quad (\text{Eq 20}).$$

Enfin, le diamètre hydrodynamique du micro-canal nécessaire au calcul du nombre de Reynolds est estimé à 200 μm .

3.2 PARTIE II : Synthèse de nanoparticules de TPE par le procédé μSAS

Le premier système considéré dans ce travail de thèse a été le Tétraphényléthylène (TPE) (Figure 52). Ce composé est à la base de nombreux composés fluorescents organiques. Sa grande disponibilité et son faible coût ont motivé ce choix pour une première étude.

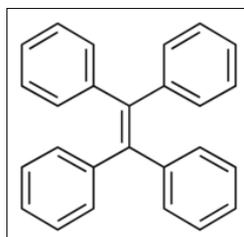


Figure 52 : Structure moléculaire du Tétraphényléthylène (TPE)

Pour les besoins de ces travaux, le TPE et son solvant le THF ont été commandés chez Sigma, le CO₂ a été commandé chez Merck.

3.2.1 Mesure de la solubilité du TPE dans le système THF/CO₂ sous pression

3.2.1.1 Validation du protocole sur les données d'équilibre vapeur THF/CO₂

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur le système THF/CO₂ constituant le milieu de réaction pour la nucléation du soluté.

Dans nos conditions expérimentales à haute pression, il est préférable que le solvant et le CO₂ supercritique forme une seule phase. Pour cela, il est nécessaire d'analyser le diagramme de phase du mélange {solvant/sc-CO₂}. La courbe d'équilibre liquide-vapeur permet de déterminer les conditions pour lesquelles le mélange est monophasique. Au-delà de cette courbe d'équilibre, le système est monophasique. Au regard du diagramme suivant, il est important de choisir un couple température-

pression (T, p) de coordonnées suffisamment élevées pour se placer au-delà du point critique du mélange, dans un système monophasique.

Nos données expérimentales sur la détermination de la courbe d'équilibre-vapeur du système CO_2/THF ont été comparées aux résultats de l'équipe de Knez (Knez et al., 2008). Ces données sont obtenues par une méthode analytique qui consiste à séparer puis à mesurer les phases liquide (THF) et gaz (CO_2) dans le mélange à température et pression fixées (Figure 53).

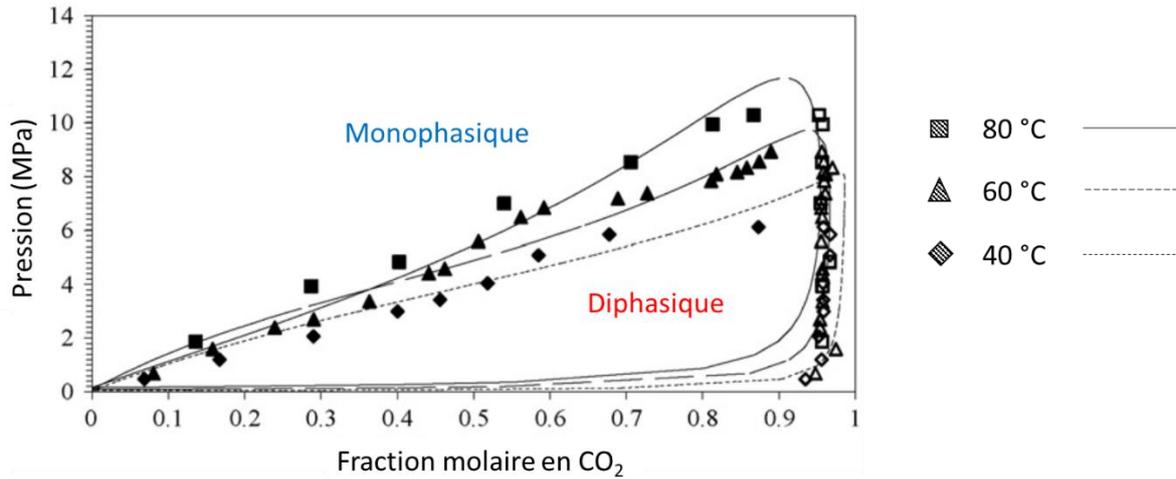


Figure 53 : Courbes d'équilibre liquide-vapeur du système $\{\text{THF}/\text{CO}_2\}$ à 40 °C, 60 °C et 80 °C.

On note dans un premier temps qu'en augmentant la température du système, le point critique du mélange apparaît à une pression plus élevée. Étant donné la faible température de fusion (60-80 °C) des composés organiques que nous souhaitons soumettre à ce système (Gan et al., 2018; Huerta-Aguilar et al., 2016), il nous paraît préférable de choisir une faible température de travail. De plus, le choix d'une faible température nous permet de fixer la pression lors de nos expérimentations à une valeur modérée, ce qui limite les problèmes techniques de tenue en pression du matériel (fuite, rupture, casse).

Nous choisissons donc de nous placer à 40 °C et à 100 bar pour les raisons évoquées ci-dessus ainsi et surtout pour obtenir un système monophasique nécessaire au bon mélange lors du procédé μ SAS. Ces propriétés sont donc choisies comme référence pour les expérimentations de mise en forme des nanoparticules de soluté.

Le système développé à l'ISM est rappelé ici (Figure 54). Contrairement aux travaux de Knez, nous choisissons une méthode d'analyse *in situ* pour obtenir la courbe d'équilibre liquide-vapeur de notre système {solvant/anti-solvant}. La spectroscopie infrarouge (IR) nous permet de mesurer l'intensité de chaque composé en présence dans le mélange et à haute pression, dans le but d'obtenir les concentrations de ces composés. Les fenêtres en saphir incorporées à l'armature métallique de la cellule optique haute pression permettent au spectromètre infrarouge de détecter et de quantifier les molécules du mélange (Champeau et al., 2016).

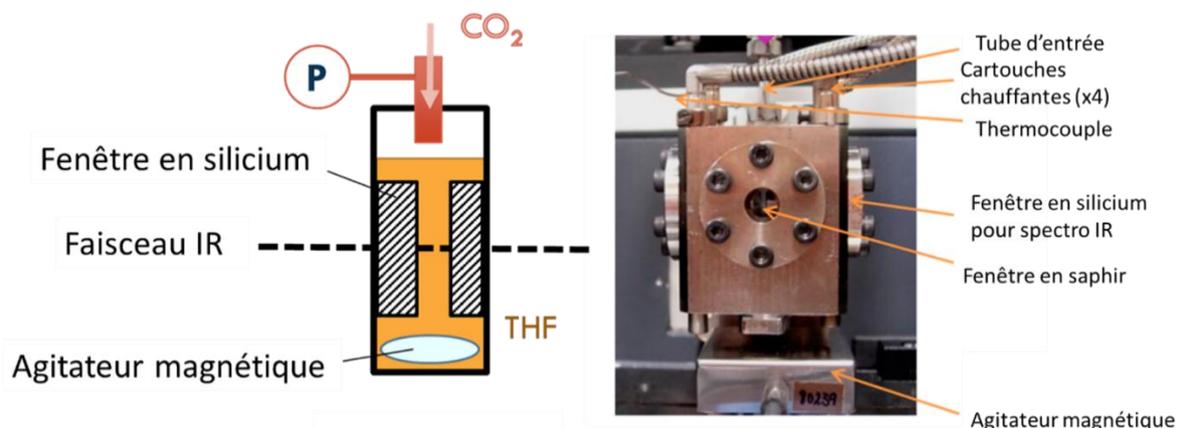


Figure 54 : Schéma et photographie de la cellule optique haute pression.

Comme rappelé dans le protocole donné dans le chapitre 2, nous avons veillé à pouvoir mesurer par IR chaque type de molécule séparément. Nous mesurons ici la bande du THF fixée à 1970 cm^{-1} , qui correspond à une déformation en dehors du plan du cycle aromatique de la molécule. Tandis que le CO_2 est observé au niveau de son triplet autour de 4955 cm^{-1} dont les différentes déformations et vibrations le créant sont représentées dans la figure 55 (Larkin, 2018).

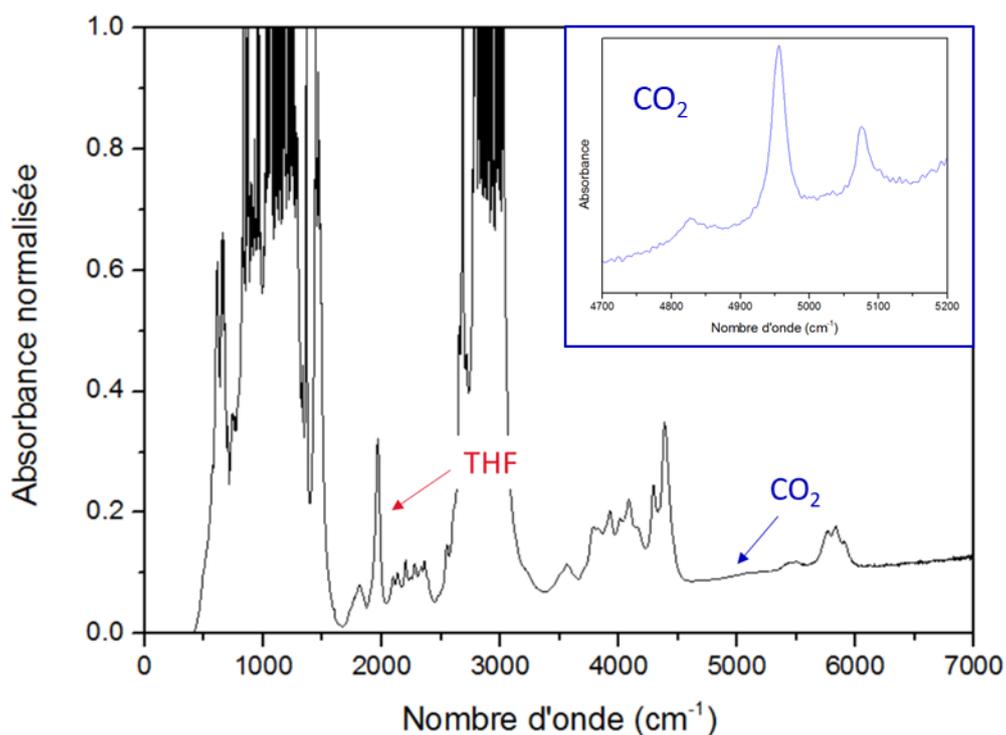


Figure 55 : Bandes IR du CO_2 et du THF exploitées pour ce travail. Un zoom des bandes IR du CO_2 est donné dans la fenêtre.

À partir des intensités d'absorption de chaque élément, la loi de Beer-Lambert (Equation 21) nous permet de déterminer les concentrations du THF et du CO_2 pour différentes pressions et pour une température de 40 °C .

$$A_{\alpha} = \varepsilon_{\alpha} * l * c_{\alpha} \quad (\text{Eq 21}),$$

avec A l'intensité adimensionnelle de l'absorption, ε le coefficient d'extinction molaire de la bande IR ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l le trajet optique de la cellule (cm), c la concentration de l'espèce ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) et α l'espèce décrite par sa bande IR.

Les coefficients d'extinction molaires nécessaires à la détermination de la concentration des composés en présence dans la cellule optique haute pression sont obtenus par des expériences préliminaires. Pour ce faire, une quantité initiale de THF est introduite dans la cellule, puis le système est pressurisé à 100 bar en injectant le CO_2 . Puis, à l'équilibre, la spectrométrie infrarouge nous donne les intensités d'absorbance du THF et du CO_2 . À partir des valeurs des concentrations, du trajet optique de la cellule et de l'absorbance mesurés, la loi de Beer-Lambert nous permet de calculer le coefficient d'extinction molaire.

Trois expériences réalisées avec différentes concentrations initiales de THF aboutissent à des valeurs de coefficients d'extinction molaire similaires. En l'occurrence, la mesure de la bande du CO_2 à 4960 cm^{-1} nous donne $\varepsilon_{\text{CO}_2}^{4960\text{ cm}^{-1}} = 0.19\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La bande du THF observée à 1970 cm^{-1} amène à une valeur du coefficient d'extinction molaire égale à $\varepsilon_{\text{THF}}^{1970\text{ cm}^{-1}} = 0.78\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les différentes expériences menant à ces résultats sont reportées dans la figure 56.

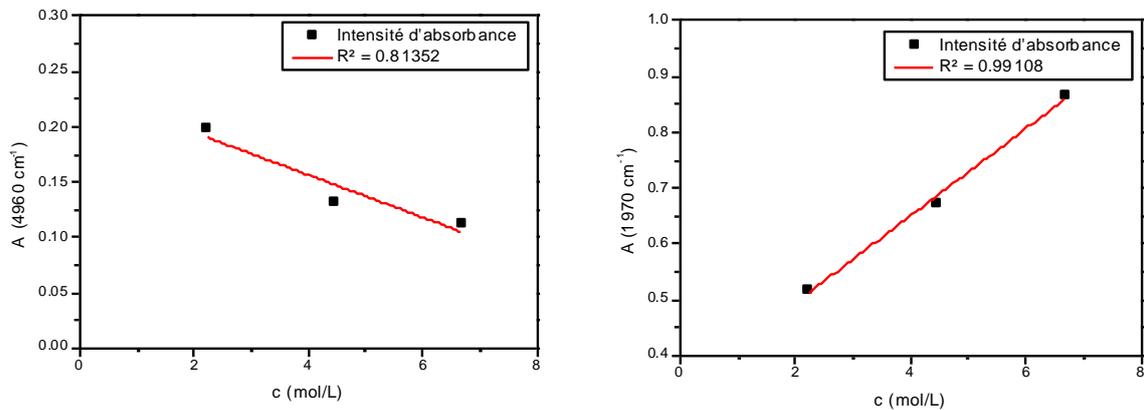


Figure 56 : Absorbance des bandes du CO_2 (gauche) et du THF (droite) en fonction de la concentration du THF.

Connaissant maintenant toutes ces grandeurs (absorbance, coefficient d'extinction molaire, trajet optique), nous pouvons calculer les concentrations des espèces en présence pour chaque expérience. Nous avons reporté dans la figure 57 les points d'équilibre liquide/vapeur mesurées expérimentalement ainsi que les points expérimentaux de la littérature du système $\{\text{THF}/\text{CO}_2\}$ à $40\text{ }^\circ\text{C}$.

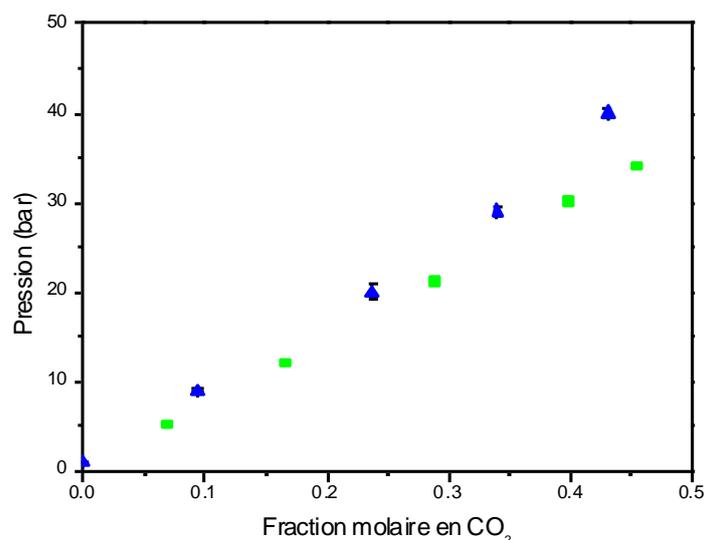


Figure 57 : Courbe d'équilibre liquide-vapeur du système {THF/CO₂} à 40 °C. En vert, les résultats de Knez (2008), en bleu les résultats de nos travaux.

Nos résultats sont similaires aux résultats de la littérature. Ceci nous permet de valider le système de mesure que nous avons choisi.

3.2.1.2 Étude du système {soluté/solvant/anti-solvant}

Dans cette section, nous nous intéressons au système complet {TPE/THF/CO₂}. Ces expériences vont nous permettre de comprendre le comportement du système et notamment de déterminer la gamme en composition dans laquelle nous pouvons avoir un fort effet anti-solvant, nécessaire au procédé μ SAS. Rappelons par ailleurs que les données de solubilité sont essentielles pour la simulation.

La première étape consiste à déterminer la position des trois composés sur le spectre infrarouge. Nous préparons une solution saturée en TPE qui est initialement introduite dans la cellule et dont le volume est préalablement fixé. Le CO₂ est introduit dans la cellule jusqu'à l'obtention de la pression fixée à 100 bar. Un agitateur magnétique assure l'homogénéité du mélange. Une fois la stabilité du système atteinte, nous enregistrons les absorbances des trois composés. De manière à pouvoir mesurer les absorptions de chaque composé, nous choisissons trois bandes d'absorption non superposées pour la suite de l'expérience : 1600 cm⁻¹ pour le TPE ; 1968 cm⁻¹ pour le THF ; 4950 cm⁻¹ pour le triplet du CO₂.

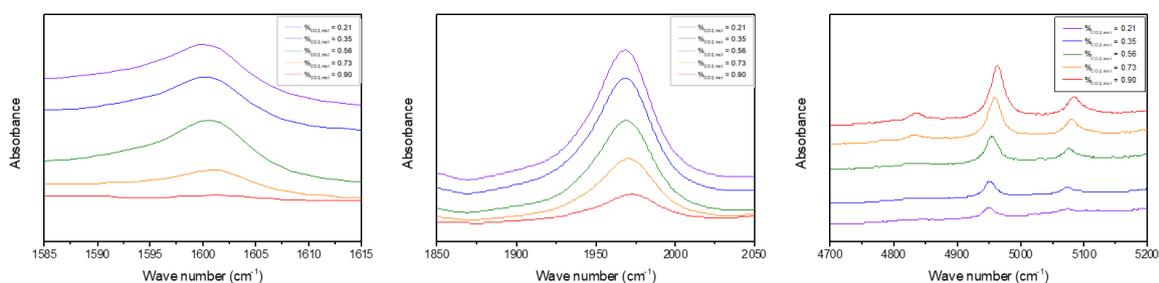


Figure 58 : Bandes IR du TPE, du THF et du CO₂ pour différentes fractions molaires en CO₂. Les spectres sont décalés en absorbance pour faciliter la lecture.

En comparant les résultats, nous observons que la bande du TPE diminue plus rapidement que celle du THF en augmentant le rapport molaire de CO₂ du système. En conclusion, il apparaît clairement que le TPE se solubilise très mal dans le milieu monophasique {THF/CO₂}. Ceci indique donc que le CO₂ a un fort effet anti-solvant sur le TPE.

Les valeurs des solubilités du TPE dans le système {THF/ CO_2 } pour différentes fractions molaires de CO_2 sont présentées dans la figure 59. Un simple relation analytique nous permet d'estimer l'évolution de la solubilité x_{sat} (mol/mol) en fonction de la fraction molaire de CO_2 : x_{CO_2} . Le modèle choisi (modèle de Wubbolts) est rappelé ici :

$$x_{\text{sat}} = 0.0011(1 - x_{\text{CO}_2})^{1.0051 - 2.587x_{\text{CO}_2} - 3.4422x_{\text{CO}_2}^2} + 6.7 \cdot 10^{-6}x_{\text{CO}_2} \quad (\text{Eq 22}),$$

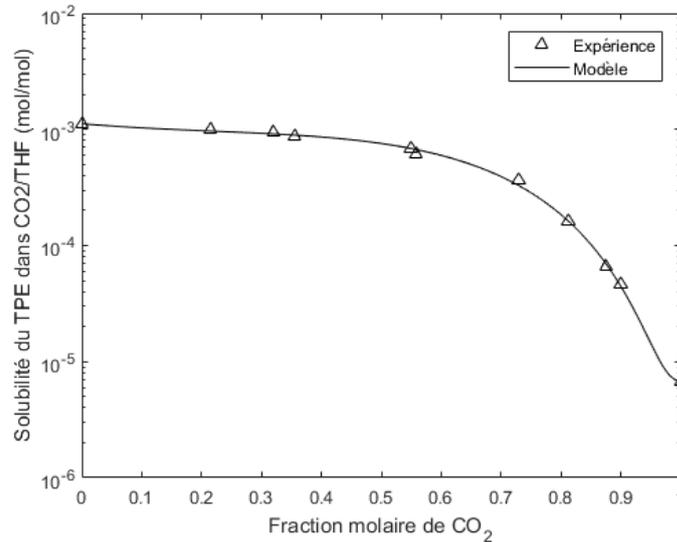


Figure 59 : Solubilité du TPE dans le système {THF/ CO_2 } à 100 bar et à 40 °C

La gamme de fraction molaire de CO_2 entre 90 % et 100 % présente un fort effet anti-solvant de l'ordre d'une décade (Figure 59). Nous avons donc choisi arbitrairement une valeur comprise dans cette gamme : ici 98 % en composition molaire de CO_2 , ce qui correspond à une diminution de la solubilité de deux ordres de grandeur par rapport à la solubilité initiale. Cette composition molaire sera choisie pour toute la suite des expériences.

3.2.2 Synthèse de nanoparticules de TPE par μ SAS

3.2.2.1 Approche expérimentale

Dans cette section, nous présentons les premiers résultats obtenus par notre procédé μ SAS. Nous nous plaçons dans les conditions opératoires pour lesquelles un intense mélange des espèces a été observé dans le cadre du travail de thèse de Fan Zhang. La composition molaire en CO_2 est directement liée aux débits des flux injectés dans le micro-canal. Ce paramètre est fixé à 98 % en maintenant un débit de solution à 0,44 mL/min et un débit de CO_2 à 8 mL/min. Le montage expérimental décrit dans le deuxième chapitre est rappelé par le schéma suivant (Figure 60).

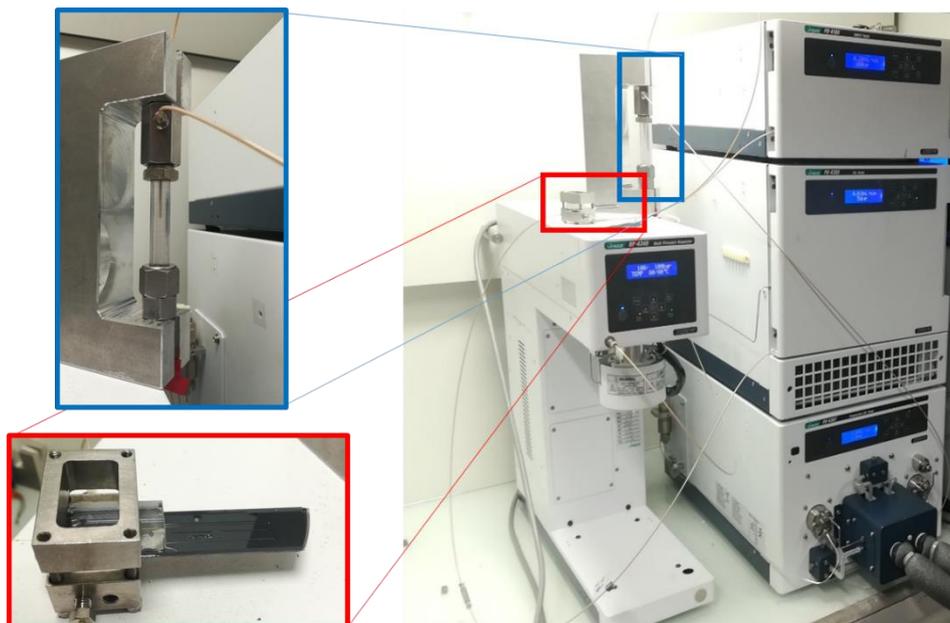


Figure 60 : Photographie du montage μ SAS.

La micropuce silicium/Pyrex fait office de microréacteur. Lors du mélange avec l'anti-solvant CO_2 supercritique, la solubilité du TPE diminue, provoquant sa précipitation dans la micropuce. La cellule de récupération placée en sortie de cette micropuce permet de recueillir les particules solides de TPE. La cellule de récupération spécialement développée nous permet de piéger les nanoparticules de TPE sur un filtre métallique. Le solvant ainsi que le CO_2 sont évacués à travers ce filtre poreux. Enfin, une grille TEM est placée sur le filtre. Une caractérisation *ex situ* de la poudre est donc possible sans qu'aucune étape de rinçage ou de préparation à la caractérisation ne soit nécessaire.

Rappelons qu'une ultime étape de séchage au sc-CO_2 est nécessaire afin d'empêcher toute re-solubilisation de la poudre dans la cellule de récupération. Aucun résultat en microscopie électronique ne montre de trace de solvant à la fin du séchage. Il est important de noter que la fraction molaire en CO_2 de 98 % ainsi que la longue durée de séchage (d'au moins une heure) à un débit équivalent ou supérieur à celui utilisé lors de l'injection de la solution permettent d'éviter toute dégradation par le solvant de la poudre précipitée.

La première expérience a été réalisée à partir d'une solution de TPE concentrée à 2 mg/mL. Elle a permis l'obtention de très petites particules de TPE d'une taille moyenne de $9 (\pm 3)$ nm (Figure 61). Ce résultat est encourageant quant à l'efficacité du procédé. Nous observons que les précipités sont relativement bien définis. Leur morphologie sphérique est caractéristique des molécules organiques à cette échelle. Enfin, nous remarquons que les nanosphères sont regroupées sous forme d'amas ce qui peut parfois limiter le comptage des particules sur la grille TEM. Le comptage choisi ici est manuel car aucune des techniques de comptage automatisé que nous avons testées n'a aboutie à un résultat cohérent. Le protocole créé pour le comptage manuel des particules a été détaillé dans le chapitre 2.

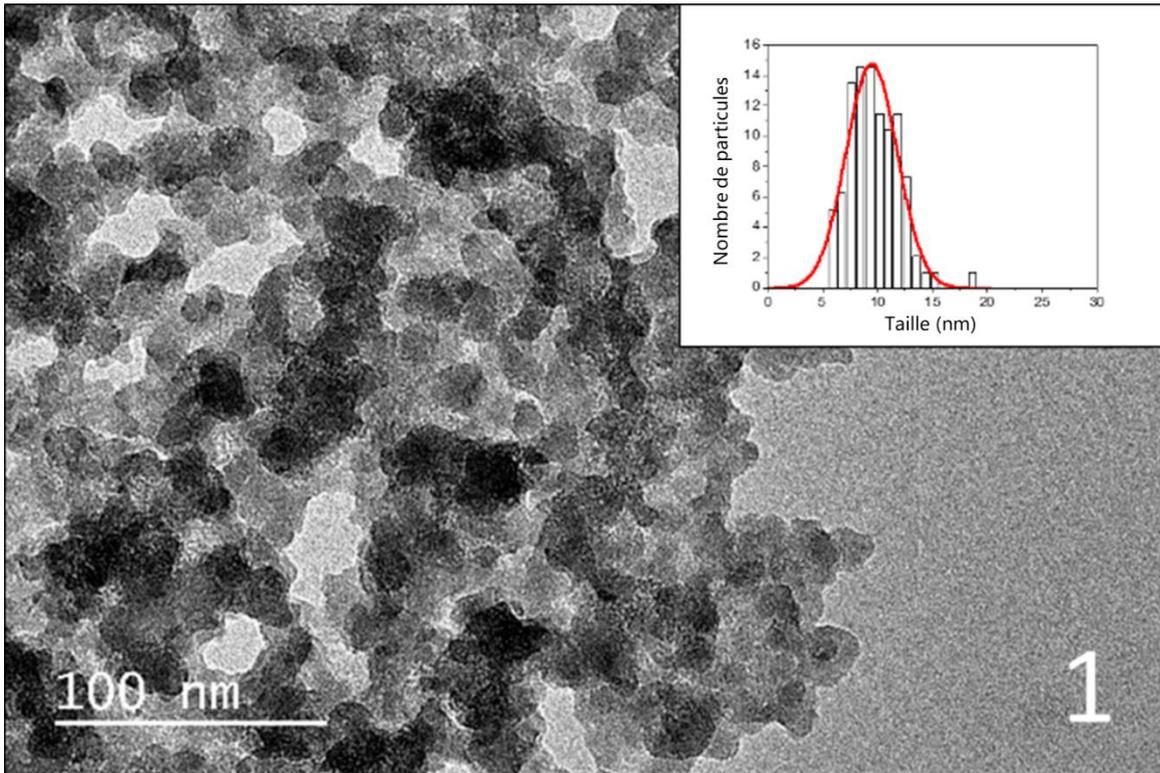


Figure 61 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 1.
Encart : distribution en taille des particules de TPE.

Pour nous assurer de la validité de ces expériences, nous avons étudié leurs répétabilités (Figure 62). Pour chaque combinaison de paramètres, nous avons réalisé 3 expériences. Les résultats montrent à chaque fois des distributions en taille très similaires, ce qui permet de montrer la robustesse du μ SAS. Nous présentons ici les résultats obtenus après avoir répété trois fois l'expérience 1.

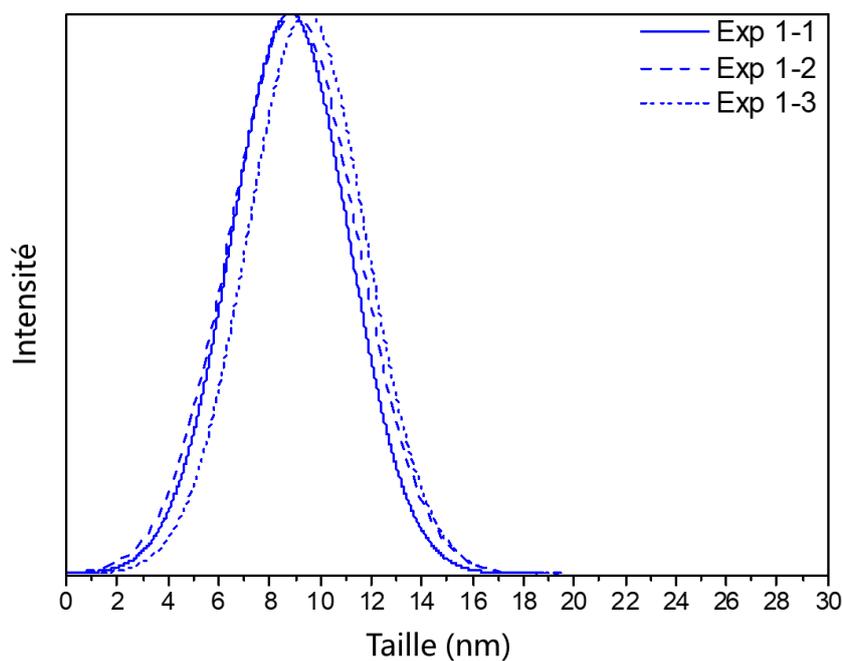


Figure 62 : Distributions en taille pour le triplicata du cas n° 1.

3.2.2.2 Influence de l'effet de concentration et de la vitesse d'introduction

3.2.2.2.1 Influence des conditions de mélange

Plusieurs paramètres expérimentaux ont été choisis afin d'étudier leur impact sur la taille des poudres synthétisées. Les débits varient de 2 à 8 mL.min⁻¹. Enfin, précisons que le nombre de Reynolds (Re) annoncé concerne le mélange des fluides après la zone de rencontre dans le microréacteur.

Tableau 7 : Conditions opératoires du μ SAS pour les cas n° 1, 2 et 3.

# Exp	[TPE] dans THF (g.L ⁻¹)	Débit CO ₂ (mL.min ⁻¹)	Débit solution (mL.min ⁻¹)	Re	Taille moyenne (nm)
1	2	8	0.44	12000	9 ± 3
2	2	2	0.11	3000	14 ± 5
3	3	8	0.44	12000	9 ± 3

Les distributions en taille de particules obtenues pour les trois expériences sont représentées sur la figure 63 :

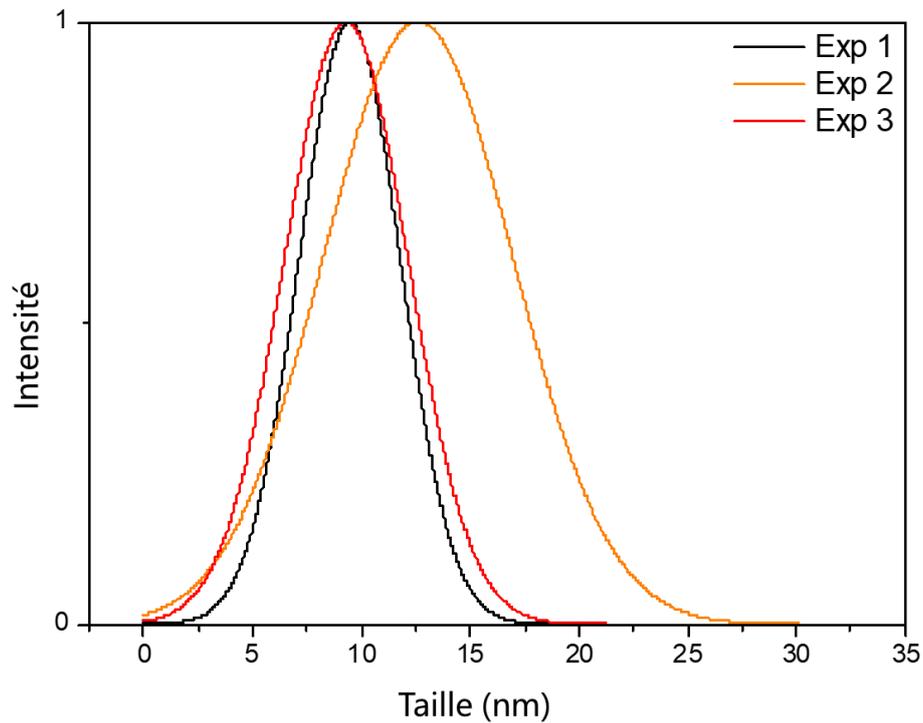


Figure 63 : Résumé des distributions en taille des cas n° 1, 2 et 3.

Dans un premier temps, nous avons choisi de modifier l'efficacité du mélange via la variation des vitesses d'introduction dans le réacteur par rapport à l'expérience 2. Comme le montrent les simulations, une diminution des débits d'injections internes et externes du co-flow amène à une augmentation du temps de mélange. Nous avons décidé de réduire les débits d'injection tout en nous plaçant dans les gammes acceptables de travail des pompes. Les débits d'injection utilisés sont rappelés dans la table résumant les conditions opératoires de chaque expérience. Le nombre de Reynolds passe de 12 000 à 3 000. Ceci a une répercussion directe sur la taille des particules récoltées. En effet, dans l'expérience 2, les nanoparticules de TPE augmentent de 50 % pour atteindre une taille moyenne de $14 (\pm 5)$ nm (Figure 64).

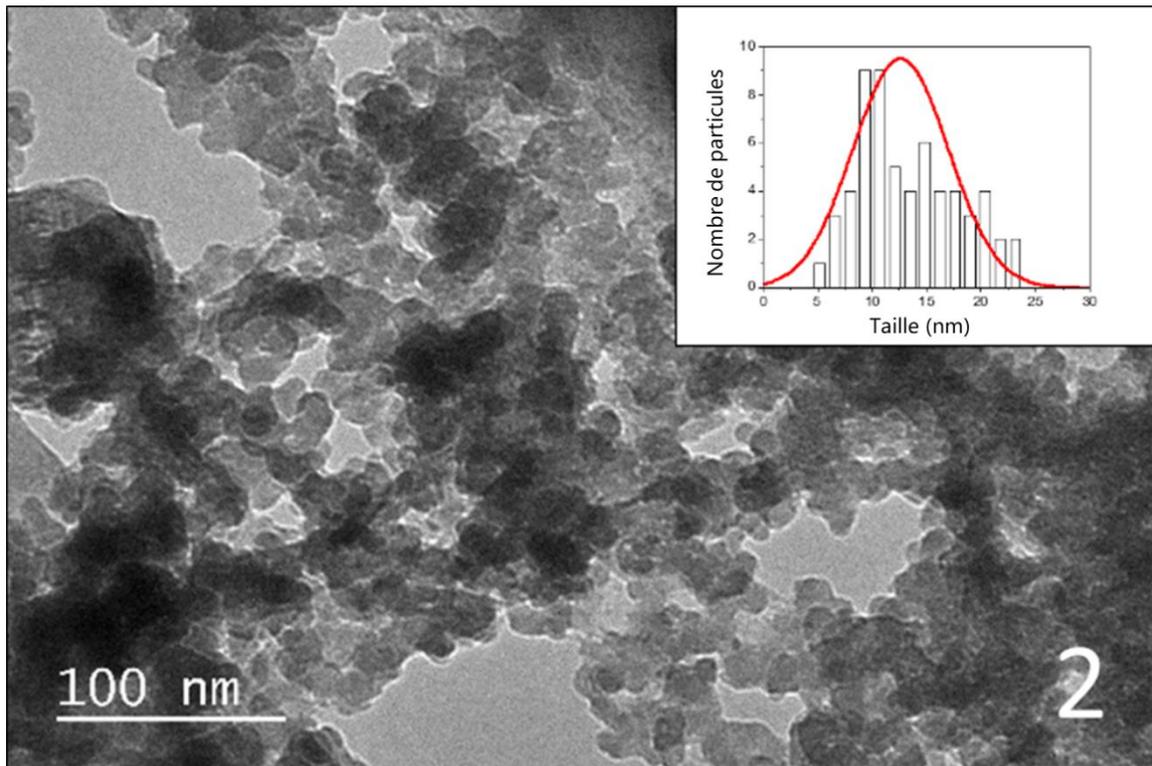


Figure 64 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 2.

3.2.2.2.2 Influence de la concentration initiale en TPE

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la concentration de la solution initiale sur la taille des particules précipitées. Nous avons augmenté de 2 à 3 mg/mL la concentration de TPE dans le THF. Cette expérience n'a montré aucune variation de la taille des nanoparticules de TPE récoltées (Figure 65). De manière générale, une augmentation de la concentration doit amener à une plus grande sursaturation et donc à la formation de nombreuses particules de petite taille. Etant donnée la relative faible solubilité de TPE dans le THF (3,5 mg/mL), l'augmentation de 2 à 3 mg/mL n'est sans doute pas suffisamment significative pour espérer observer un changement dans la taille et la morphologie des particules formées.

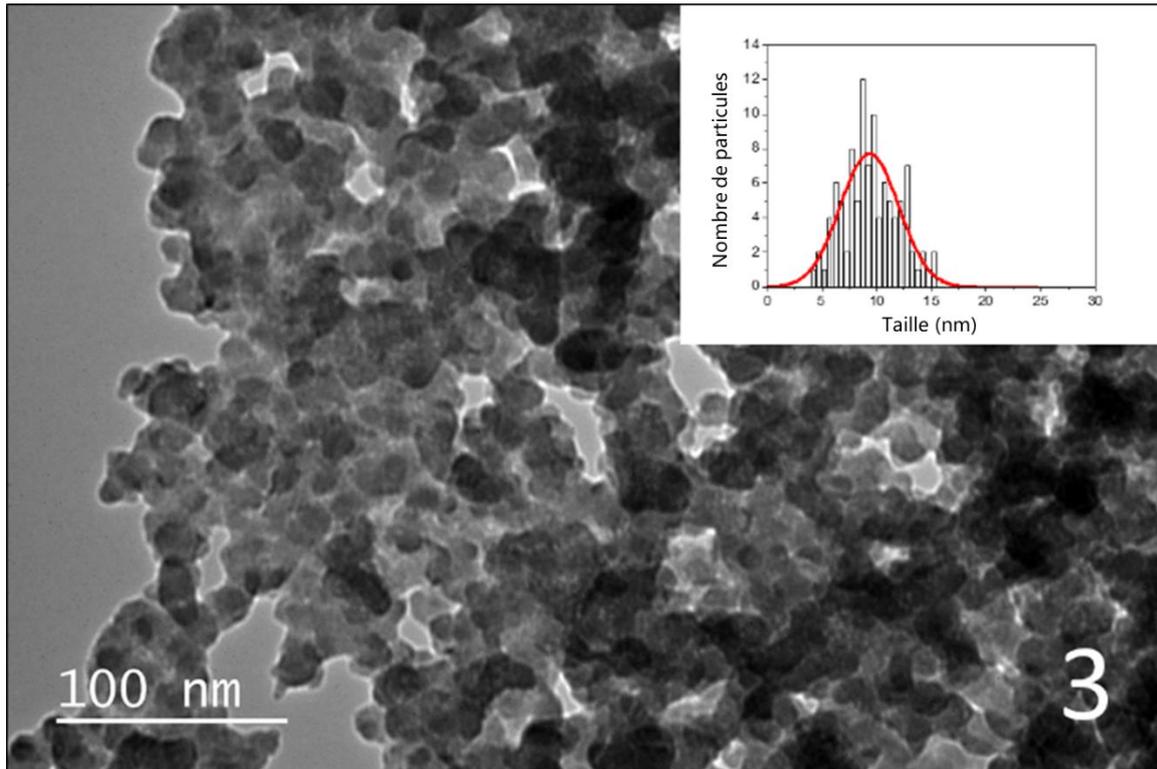


Figure 65 : Image TEM des particules de TPE synthétisées dans le cas n° 3.

3.2.2.3 Comparaison avec la simulation numérique

Les résultats de simulation sont comparés avec ceux expérimentaux avec deux objectifs principaux. Le premier concerne la détermination de la tension de surface, particulièrement difficile à déterminer expérimentalement. Le deuxième consiste à valider l'utilisation des modèles de nucléation et de croissance usuels : nucléation primaire et croissance par diffusion.

3.2.2.3.1 Détermination de la tension de surface du TPE solide avec le mélange supercritique CO_2/THF

Les simulations numériques ont été effectuées pour différentes valeurs de tension interfaciale. Les distributions en taille « numérique » sont comparées avec la distribution expérimentale dans la figure 66. Nous pouvons alors estimer la tension de surface à une valeur de 2,25 mN/m.

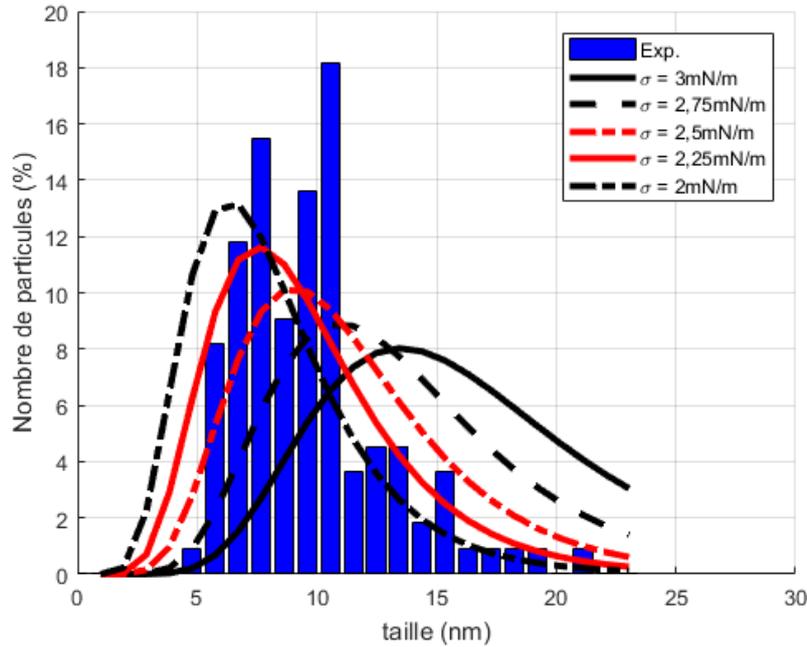


Figure 66 : Histogramme : Distribution en taille obtenue expérimentalement du cas n° 1.
 Courbes : Distributions en taille simulées du cas n° 1 en fonction de la tension de surface.

On observe une très forte influence de la tension de surface σ sur la distribution. En effet, une variation entre 2 et 3 mN/m peut conduire à des distributions de taille et de largeur relativement différentes.

3.2.2.3.2 Détermination des conditions de mélange

Dans la partie expérimentale, nous avons montré que l'intensité de mélange pouvait avoir un effet significatif sur la taille des particules produites. En revanche, la variation de concentration n'a pas conduit à un changement notable de la taille des particules produites. Nous nous focalisons donc dans cette partie uniquement sur l'influence des conditions opératoires sur la qualité du mélange.

La même valeur de tension de surface a été utilisée pour les deux simulations. Nous observons dans la figure 67 les champs instantanés et moyennés des fractions massiques du THF et du TPE à la sortie de l'injecteur. Nous remarquons qu'à moins de quelques centaines de microns de l'injecteur, le mélange des fluides devient homogène, ce qui montre que le mélange effectué dans le réacteur est extrêmement rapide. Ces très bonnes conditions de mélange conduisent à une production de particules de petites tailles.

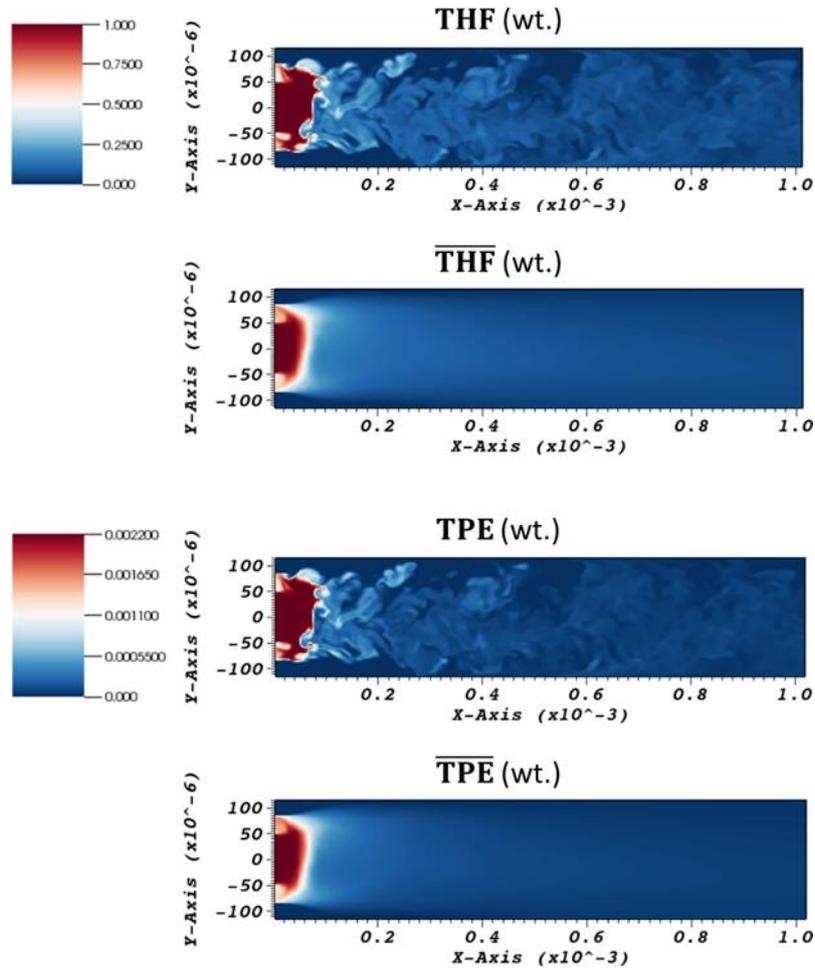


Figure 67 : Champs instantanés et moyennés des fractions massiques du THF et du TPE.

Les simulations ont été également effectuées pour le cas 2, pour lequel les débits ont été réduits. La comparaison des distributions expérimentales et numériques est représentée dans la figure 68.

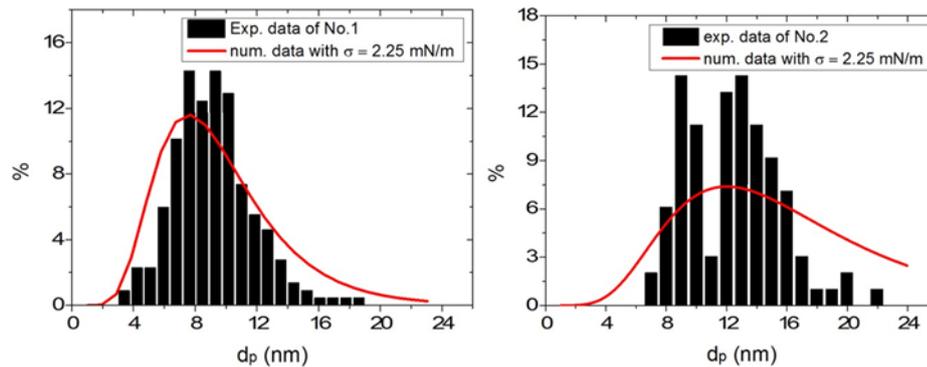


Figure 68 : Histogramme : Distributions en taille des particules de TPE obtenues expérimentalement pour les cas n° 1 et 2. Courbe : Distributions en taille des particules de TPE simulées pour les cas n° 1 et 2 pour une tension de surface égale à 2,25 mN/m.

Les simulations donnent des résultats tout à fait acceptables sur les tailles de particules et leurs distributions en taille pour les deux cas considérés.

Afin de quantifier l'efficacité du mélange, nous avons comparé le temps de mélange caractéristique t_m lors de la précipitation. Le temps de mélange est déduit de l'évolution de l'intensité de ségrégation I_m (ou indice de mélange) qui qualifie l'homogénéité d'un mélange (I_m est compris entre 0 et 1 et

correspond respectivement à un mélange complètement homogène et à une ségrégation totale) (Zhang et al., 2019b, 2019a). Le temps de mélange est considéré comme étant la constante de temps de ce système. Nous avons comparé l'évolution de l'intensité de ségrégation pour les deux expériences. Dans le cas n° 2, les conditions opératoires amènent à un mélange moins efficace, puisque le temps de mélange γ est 20 fois plus grand que dans le cas n° 1 (Figure 69). Les résultats expérimentaux *ex situ* montrent que ces conditions de débits sont essentielles pour obtenir de petites particules avec une étroite distribution en taille.

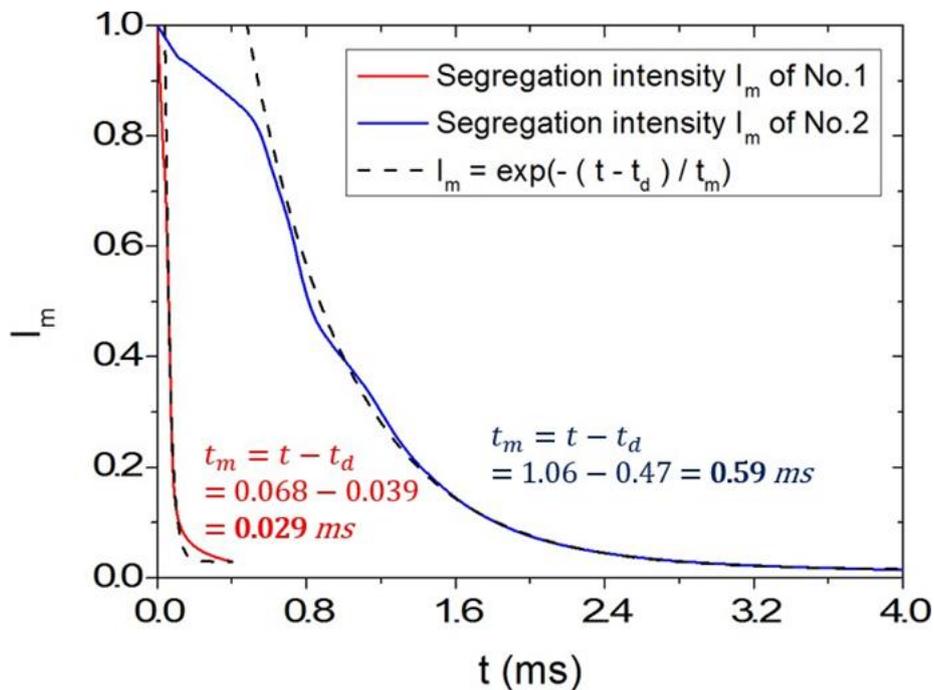


Figure 69 : Temps de mélange obtenus par les intensités de ségrégations des cas n° 1 et 2.

La figure 70 représente l'évolution de la sursaturation dans le plan médian du réacteur. Le maximum de la sursaturation relativement faible est du probablement à la faible solubilité du TPE dans le THF pur. Ceci nous informe que peu de poudre risque d'être créée. Notons qu'une faible quantité de précipité a été récupérée lors de l'expérience, ce qui est cohérent avec les résultats de simulation.

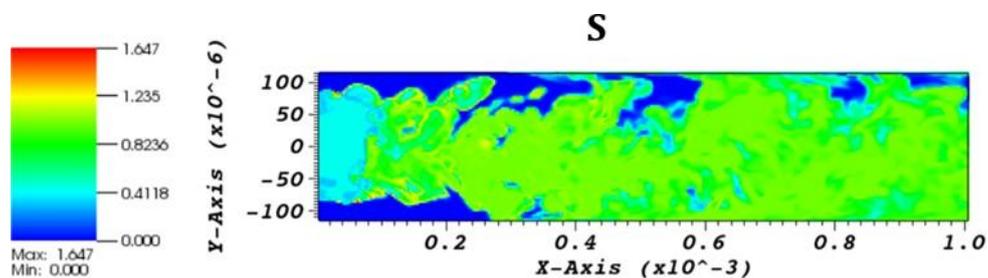


Figure 70 : Champ instantané de la sursaturation pour le cas n° 1.

Ces premiers résultats expérimentaux sont en bon accord avec la simulation et nous permettent de déterminer la tension de surface du TPE solide dans le mélange supercritique THF/CO₂. Par ailleurs, il semble que le choix du modèle de la nucléation homogène soit correctement adapté à ce système. L'ensemble des modèles et analyse de la simulation numérique peuvent être consultés en annexe 2 (article publié dans Chemical Engineering Journal).

Afin d'approfondir la compréhension du procédé, nous avons développé une méthodologie basée sur l'observation *in situ* de la formation des nanoparticules. Celle-ci utilise les propriétés particulières de fluorescence à l'état solide des nanoparticules AIE. Ces résultats sont présentés dans la partie suivante.

3.3 PARTIE III : Cartographie *in situ* par fluorescence

L'objectif de cette troisième partie est de visualiser *in situ* la précipitation de FONs dans le microréacteur et sous pression afin d'être comparée à la simulation numérique. Ce défi technologique a été possible grâce à la micro-puce transparente conçue et fabriquée au laboratoire pour cette expérience. Le réacteur microfluidique est constitué d'une face en Pyrex et d'une autre en silicium, ce qui permet d'observer le micro-canal par réflexion en travaillant sous pression. Le montage de cette expérience a été détaillé dans le chapitre 2.

3.3.1 Choix de la molécule

Le microréacteur utilisé pour la synthèse des FONs est maintenu en-dessous de l'objectif du microscope, de manière à observer son micro-canal par les multiples dispositifs optiques du confocal. Les équipements du montage μ SAS (pompes haute pression, BPR, cellule de récupération, plaque chauffante) sont branchés à la micro-puce de la même manière que lors de la synthèse des nanoparticules de TPE dans la section précédente.

Le microscope confocal est doté d'un laser de longueur d'onde d'excitation de 405 nm. Le laboratoire SPCMIB de Toulouse a synthétisé spécialement une molécule fluorescente (BZX) dont le spectre d'excitation est cohérent avec notre microscope confocal et avec un bon rendement quantique ($\phi = 28\%$). La figure 71 montre l'intérêt d'utiliser la nouvelle molécule fluorescente nommée BZX.

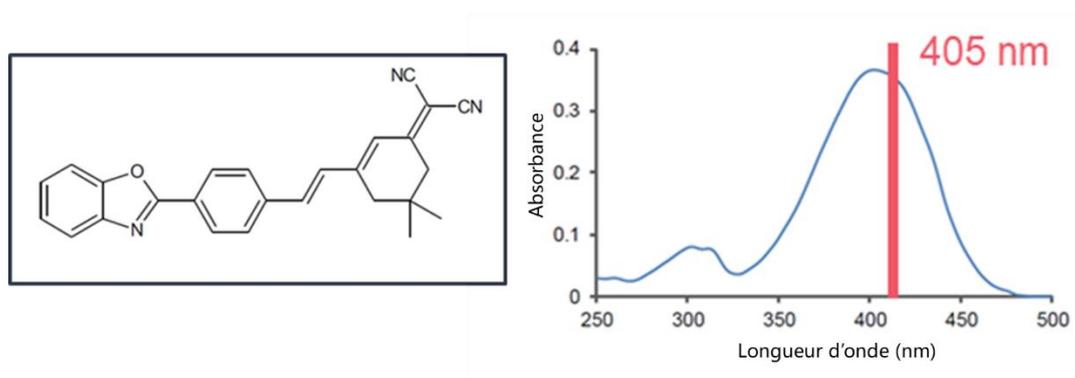


Figure 71 : Structure moléculaire de BZX et sa courbe d'absorption.

Le rendement quantique d'une molécule fluorescente nous donne une information capitale quant à la viabilité du système utilisé pour nos analyses optiques (Wang et al., 2016). En effet, notre objectif est de visualiser le champ de nucléation des particules solides. Pour cela, il est primordial que l'intensité de la fluorescence du soluté en solution soit bien moins importante que l'intensité des particules solides précipitées (Ito and Oka, 2019; Tran et al., 2016). Un premier travail consiste donc à préparer une même quantité de poudre fluorescente AIE ($3,7 \times 10^{-6}$ M) dans un mélange {solvant/anti-solvant}. Dans le cas de BZX, l'acétonitrile joue le rôle du solvant, tandis que comme pour la majorité des molécules organiques fluorescentes à effet AIE, l'eau est choisie comme anti-solvant. Différentes préparations d'eau dans l'acétonitrile allant de 0 à 95 % volumique sont excitées sous lampe UV (365 nm) (Figure 72).

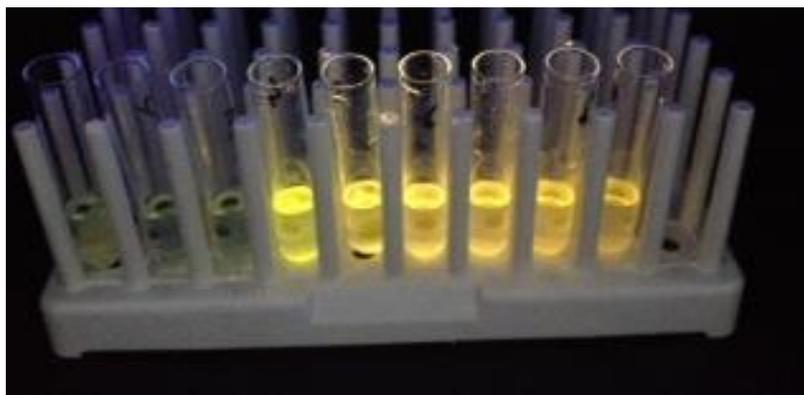


Figure 72 : Image de 9 échantillons de BZX sous illumination par une lampe UV à 365 nm. De gauche à droite, la fraction volumique eau:solvant augmente.

Les spectres d'émission correspondant à ces mélanges sont donnés dans le graphique suivant. Nous observons une très large augmentation de l'intensité de fluorescence due aux particules en suspension présentes dans les solutions riches en eau (Figure 73).

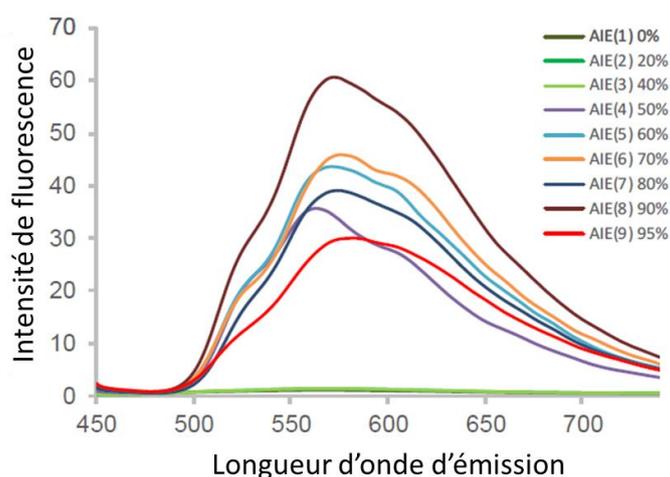


Figure 73 : Spectres d'émission des différentes solutions sous une excitation à 440 nm. Le pourcentage correspond à la fraction volumique d'eau dans le solvant (acétonitrile).

Ces résultats montrent que le système peut être utilisé avec le microscope confocal. Les intensités de fluorescences de BZX devraient être suffisamment éloignées en solution et à l'état agrégé pour observer la zone de précipitation dans le micro-canal.

3.3.2 Mesure de la solubilité de BZX dans le système THF/CO₂

Tout comme pour le TPE, nous avons étudié le composé fluorescent dans le système {THF/CO₂}. L'étude par spectrométrie infrarouge nous permet de mesurer l'absorbance de chaque échantillon dans nos conditions de synthèse : 40 °C et 100 bar. Différentes expériences sont réalisées en faisant varier le volume initial de THF dans la cellule IR. Les résultats de la mesure de la solubilité de BZX sont présentés en fonction de la fraction molaire de CO₂, liée au volume initial de THF (Figure 74).

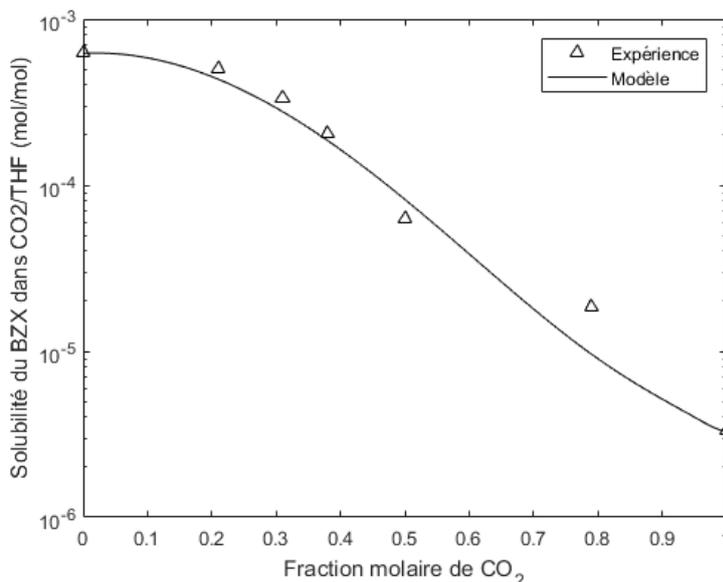


Figure 74 : Solubilité de BZX pour différentes concentrations molaires en CO₂.

Comme pour le TPE, la solubilité de BZX est fortement impactée par la présence du CO₂. Notons également que la diminution de solubilité pour les fortes proportions de solvant est moins forte que pour le cas du TPE. Le nouveau système {BZX/THF/CO₂} à 40 °C et 100 bar est tout de même adapté à notre procédé μ SAS, puisqu'aux fortes fractions molaires en CO₂, la solubilité du soluté est très faible, ce qui est favorable à la précipitation de BZX dans le micro-canal.

3.3.3 Mise en forme de BZX par μ SAS et analyse *ex situ*

Les premières expériences ont été effectuées sur le même dispositif expérimental que précédemment. L'objectif premier est ici d'analyser *ex situ* les poudres produites comme cela a été fait dans la partie précédente. Nous nous sommes basés sur les résultats précédents pour établir les conditions opératoires nécessaires à la production de petites particules de BZX. En effet, les conditions de mélange pour les expériences avec le TPE étant tout à fait satisfaisantes, nous avons choisi de conserver les mêmes débits d'injection. Nous rappelons dans le tableau 8 les conditions opératoires employées pour la synthèse de BZX par μ SAS.

# Exp.	[BZX] (mg/mL)	Débit CO ₂ (mL/min)	Débit solution (mL/min)
1	0,5	8	0,44

Tableau 8 : Conditions expérimentales de la synthèse de BZX par μ SAS.

En sortie de la micro-puce, nous récupérons suffisamment de poudres pour effectuer une caractérisation *ex situ* par microscopie électronique. Les images montrent des particules de taille nanométrique (Figure 75).

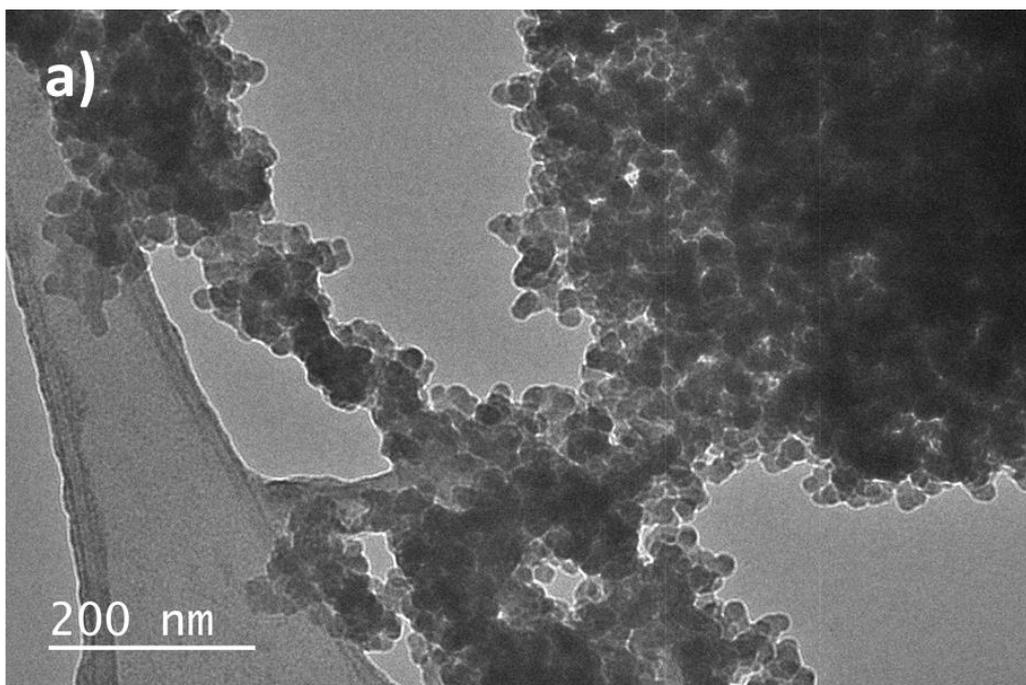


Figure 75 : Images TEM des particules de BZX synthétisées par μ SAS.

Un comptage manuel nous permet d’observer que la distribution en taille semble relativement étroite avec une taille moyenne de moins de 20 nm (Tableau 9 et Figure 76).

Tableau 9 : Résumé des distributions en taille de BZX en fonction des conditions opératoires.

# Exp.	[BZX] (mg/mL)	Débit CO ₂ (mL/min)	Débit solution (mL/min)	Taille moyenne (nm)	
1	0,5	8	0,44	16	± 4

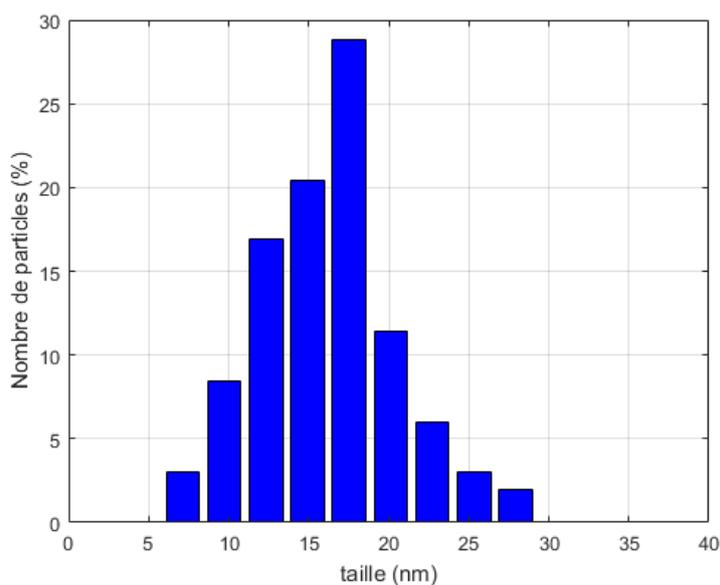


Figure 76 : Distributions en taille de BZX synthétisé par μ SAS pour différents régimes de débits.

3.3.4 Détermination de la tension interfaciale solide/fluide par comparaison avec la simulation numérique

Comme pour la molécule précédente, nous avons procédé à un ajustement de la tension interfaciale dans les paramètres de la simulation numérique afin de déterminer la distribution normale en tailles des particules « numérique » proche de celle expérimentale. Les comparaisons en taille pour trois valeurs de tension interfaciale sont représentées dans la figure 77. Une valeur de 4,75 mN/m semble être satisfaisante. Il est important de noter que si la taille moyenne de la distribution est bien estimée, autour de 15 nm, l'écart type de la distribution « numérique » est beaucoup plus important, conduisant à une distribution « numérique » plus large. Ce résultat non attendu sera discuté après analyse et comparaison des résultats issus des expériences *in situ* et ceux de la simulation.

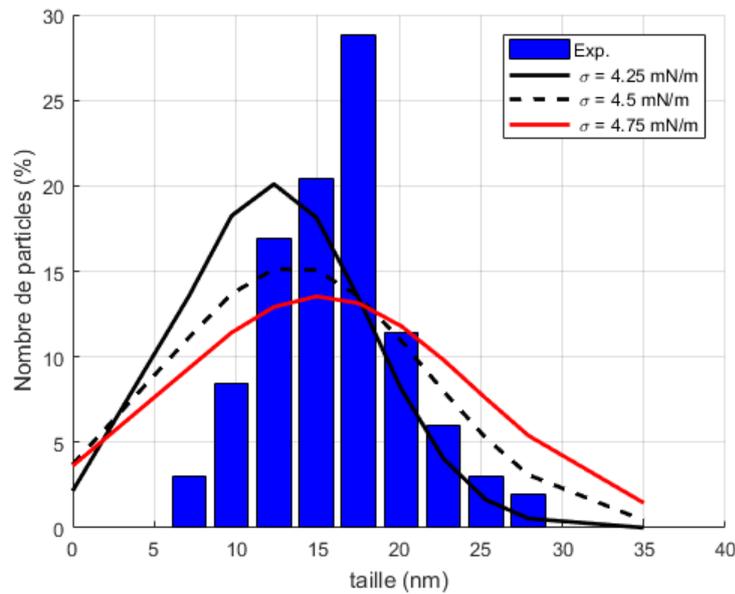


Figure 77 : Comparaison des distributions en taille données par l'expérimental (histogramme bleu) et par la simulation (courbes).

Les mesures expérimentales des tailles de particules ne montrent pas d'effet significatif des débits sur la distribution en taille. Le procédé μ SAS a une nouvelle fois montré sa capacité à produire de petites particules. Ces premiers résultats vont nous permettre d'ajuster la tension interfaciale fluide/solide avec la simulation numérique. Par ailleurs, grâce aux propriétés optiques de la molécule fluorescente choisie, nous pouvons désormais nous focaliser sur l'analyse *in situ* de la précipitation pour mieux comprendre les phénomènes de nucléation et de croissance.

3.3.5 Dispositif expérimental pour la caractérisation *in situ*

La micro-puce placée sous l'objectif du confocal est schématisée dans la figure 78. Le rectangle violet représente la zone du micro-canal observée lors de l'expérience. Une première analyse permet de visualiser le canal vide ou bien rempli d'un fluide sous pression.

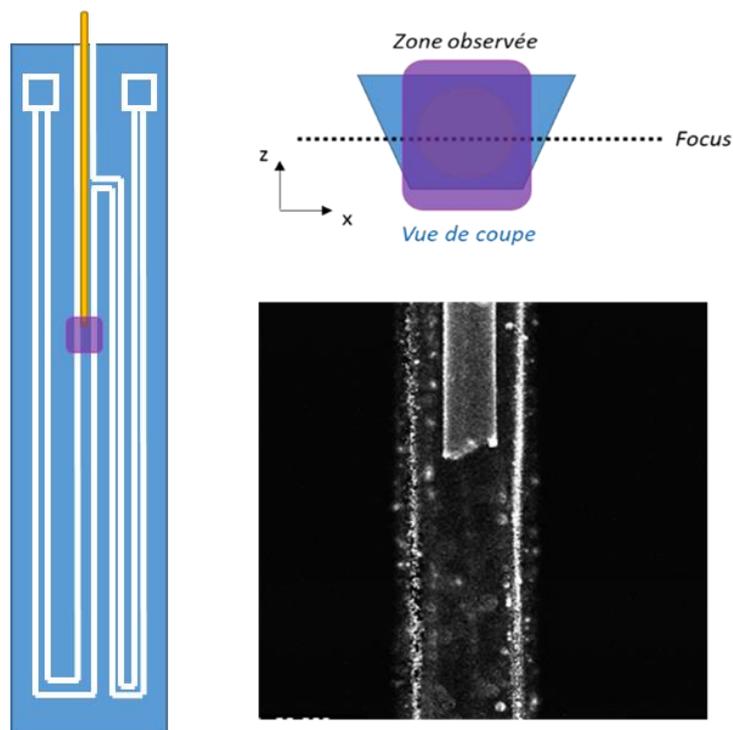


Figure 78 : Schéma de la micro-puce (à gauche), vue de coupe du micro-canal (en haut à droite), image en lumière visible de l'injecteur dans le micro-canal (en bas à droite).

Une fois le système pressurisé à la pression désirée, la pompe HPLC est activée et commence à injecter la solution concentrée en BZX dans le micro-canal par le capillaire. Cette étape est décrite par les images suivantes (Figure 79). Dans un premier temps, nous n'observons pas de signal de fluorescence. Puis, au bout de quelques secondes, les particules de BZX se forment à la sortie de l'injecteur et leur fluorescence est détectée par le microscope confocal.

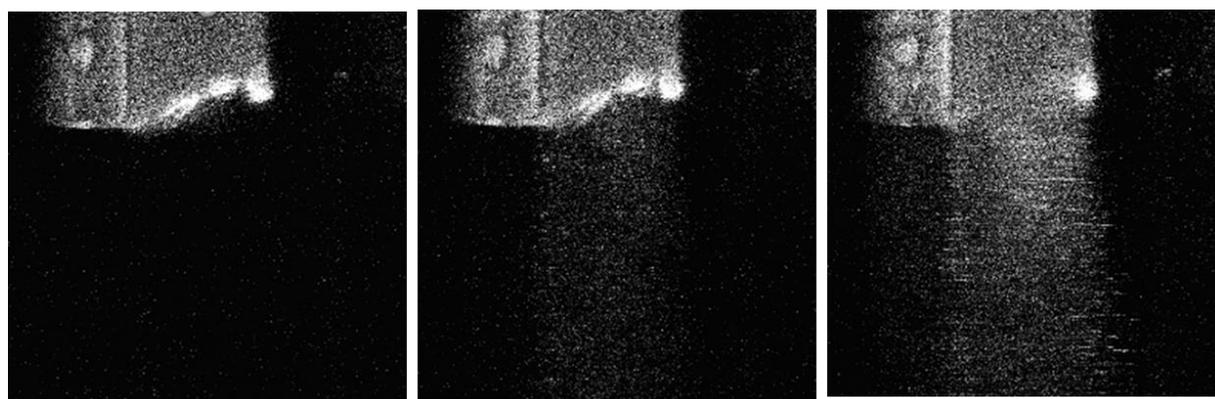


Figure 79 : Images de la sortie de l'injecteur à 0 s, 20 s et 40 s après activation de la pompe HPLC.

Les paramètres expérimentaux utilisés pour cette première étude sont récapitulés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Résumé des paramètres expérimentaux.

Paramètres μ SAS	
Température	40 °C
Pression	100 bar
Concentration	0,5 mg/mL
Débit interne	0,44 mL/min
Débit externe	8 mL/min
Paramètres confocal	
Longueur d'onde d'excitation	405 nm
Puissance du laser	85 %
Longueur d'onde d'émission	410-720 nm
Vitesse d'acquisition	1,92 image.s ⁻¹
Pas d'acquisition	3 nm

Nous présentons ci-après les deux types d'analyses que nous avons réalisées avec le microscope confocal.

3.3.5.1 Analyse temporelle

Ce premier mode d'analyse est utilisé pour quantifier un champ de concentration en particules fluorescentes. L'analyse temporelle établit une cartographie où l'intensité de chaque pixel est égale à la somme des intensités cumulées dans le temps. La figure 80 montre l'intérêt de mesurer un grand nombre d'images pour correctement reconstituer la zone observée.

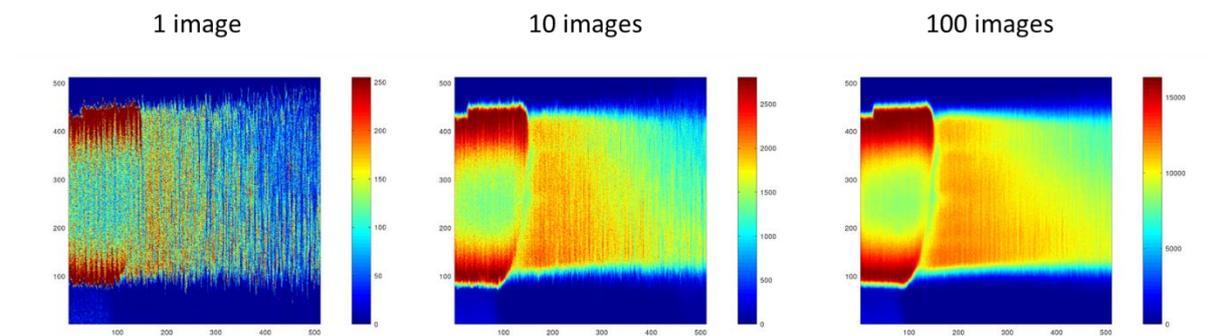


Figure 80 : De gauche à droite : micro-canal reconstitué à partir de l'intensité de fluorescence mesurée pour 1, 10 et 100 images.

Avec le microscope confocal, plus la vitesse d'acquisition est rapide et plus la zone observée est petite, nous avons donc choisi la vitesse d'acquisition la plus grande (1,92 image.s⁻¹) pour observer le micro-canal dans toute sa largeur. Le pas d'acquisition est quant à lui réduit au minimum, ici à 3 nm. Une analyse avec un temps suffisamment long permet d'obtenir une moyenne du champ de concentration des particules. Ce résultat très important est comparé avec le champ de particules calculées par la simulation et permet de localiser les zones importantes de nucléation/précipitation dans le réacteur. Cet élément d'analyse est essentiel dans la validation des modèles de précipitation utilisés.

3.3.5.2 Analyse spectrale

Le second mode d'analyse a pour objectif de déterminer un champ de particules fluorescentes en fonction de leur longueur d'onde d'émission. Le principe ici est de quantifier la longueur d'onde d'émission maximale pour chaque pixel de la cartographie. Pour ce faire, nous enregistrons l'intensité du spectre d'émission de chaque pixel avec le microscope confocal et ses caractéristiques (pas = 3 nm). Le résultat d'une telle étude peut ensuite être discuté en fonction de l'évolution de la taille des particules dans le réacteur.

Quelques travaux ont étudié l'effet de taille sur les propriétés optiques de nanoparticules organiques fluorescentes (Fu and Yao, 2001; Kurokawa et al., 2004). Un décalage vers le bleu du spectre d'absorption est observé pour des particules de petites tailles. Le confinement quantique est généralement évoqué pour expliquer ce phénomène sur les systèmes inorganiques comme CdSe, mais il ne s'applique pas pour les composés organiques. En revanche, la variation des paramètres de maille entre deux particules de tailles différentes peut avoir un effet sur la largeur de la bande interdite de la molécule. C'est cette dernière hypothèse qui est avancée dans les travaux de Kasai (Kasai et al., 1992).

Les premiers résultats sont cohérents avec les longueurs d'onde d'émission du composé fluorescent. Le logiciel du microscope confocal permet de sélectionner une région d'intérêt dans laquelle l'intensité de fluorescence de tous les pixels est moyennée pour chaque longueur d'onde d'émission. Le résultat est présenté à droite de la figure 81.

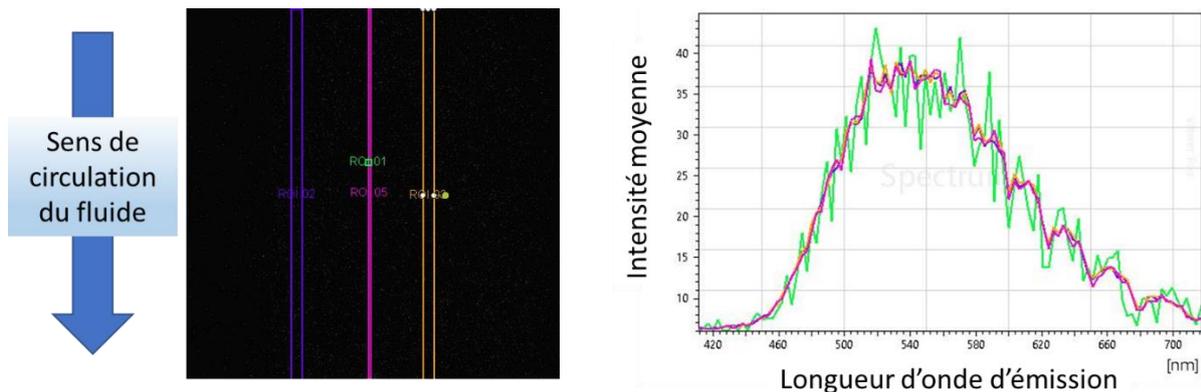


Figure 81 : Image sous excitation à 405 nm du micro-canal avec les régions d'intérêt tracées en couleur (à gauche), courbes d'émission correspondant aux régions d'intérêts (à droite).

Dès lors, nous pouvons noter quelques limitations techniques du procédé. Tout d'abord, le pas d'acquisition le plus petit est de 3 nm. Cela signifie qu'une incertitude sur la longueur d'onde d'émission de l'ordre de ce pas sera à considérer sur la totalité des résultats de cette partie. Ensuite, étant donné les très faibles temps caractéristiques de la précipitation et du mélange, il ne nous sera pas possible de caractériser individuellement une particule précipitée dans le micro-canal.

Il est important de rappeler que le procédé μ SAS est un procédé continu et très bien contrôlé dû notamment à ces échelles spatiales. Par ailleurs, les pompes hautes pressions en amont de la micro-puce et le BPR en aval assurent la stabilité du débit. Ceci nous permet de considérer que le procédé atteint rapidement un régime stationnaire stable. Ainsi, la reconstruction de la cartographie issue de l'analyse locale de chaque longueur d'onde est tout à fait cohérente et représentative du champ moyen de longueurs d'onde d'émission dans le canal. Nous parlons donc ici de champ de nucléation ou champ de précipitation.

3.3.6 Analyse *in situ* de l'intensité de fluorescence de BZX

La première expérience *in situ* a concerné la détermination des champs d'intensité de fluorescence dans le microcanal. Dans la figure 82, nous avons représenté, à gauche, la cartographie d'intensité obtenue expérimentalement. Cette image représente le champ moyen d'intensité obtenue après moyenne de 100 champs instantanés. Ces données permettent de localiser les zones où les particules solides fluorescentes sont présentes. Le champ d'intensité augmente avec la concentration en particules. Le premier résultat obtenu montre un très fort signal de l'intensité à la sortie de l'injecteur. Cela signifie que le BZX précipite dès la sortie de l'injecteur. Nous observons deux régions symétriques par rapport au centre du capillaire où l'intensité de fluorescence est maximale. Il est important de remarquer que l'intensité de fluorescence chute rapidement dès la sortie de l'injecteur, à une distance de l'ordre de 200-300 μm . Nous avons représenté dans la partie droite de la figure 82, plusieurs cartographies de la concentration particulaire dans le canal et ce pour différentes hauteurs obtenues par simulation numérique. Le champ moyen « numérique » est obtenu après moyenne de plus de 10000 champs instantanés. La comparaison des champs « numériques » et « expérimental » fait apparaître une grande cohérence en termes de localisation des zones de nucléation/précipitation. La simulation fait apparaître une forte diminution de l'intensité/concentration particulaire dans une zone comprise entre 200 et 300 μm après sortie de l'injecteur. Notons tout de même que suivant la hauteur dans le capillaire, la zone de cœur potentiel au centre, i.e. la zone contenant uniquement la solution sous forme fluide, varie significativement comme attendu. En revanche, bien qu'un travail préliminaire soit effectué pour focaliser le microscope dans un plan situé au niveau du centre du capillaire, une partie du signal des particules fluorescentes « défocalisées » est certainement enregistré par le microscope confocal. Cette surpopulation de particules observées, notamment dans la zone de cœur potentiel, explique la différence d'allure entre le champ reconstruit expérimentalement et les cartographies numériques.

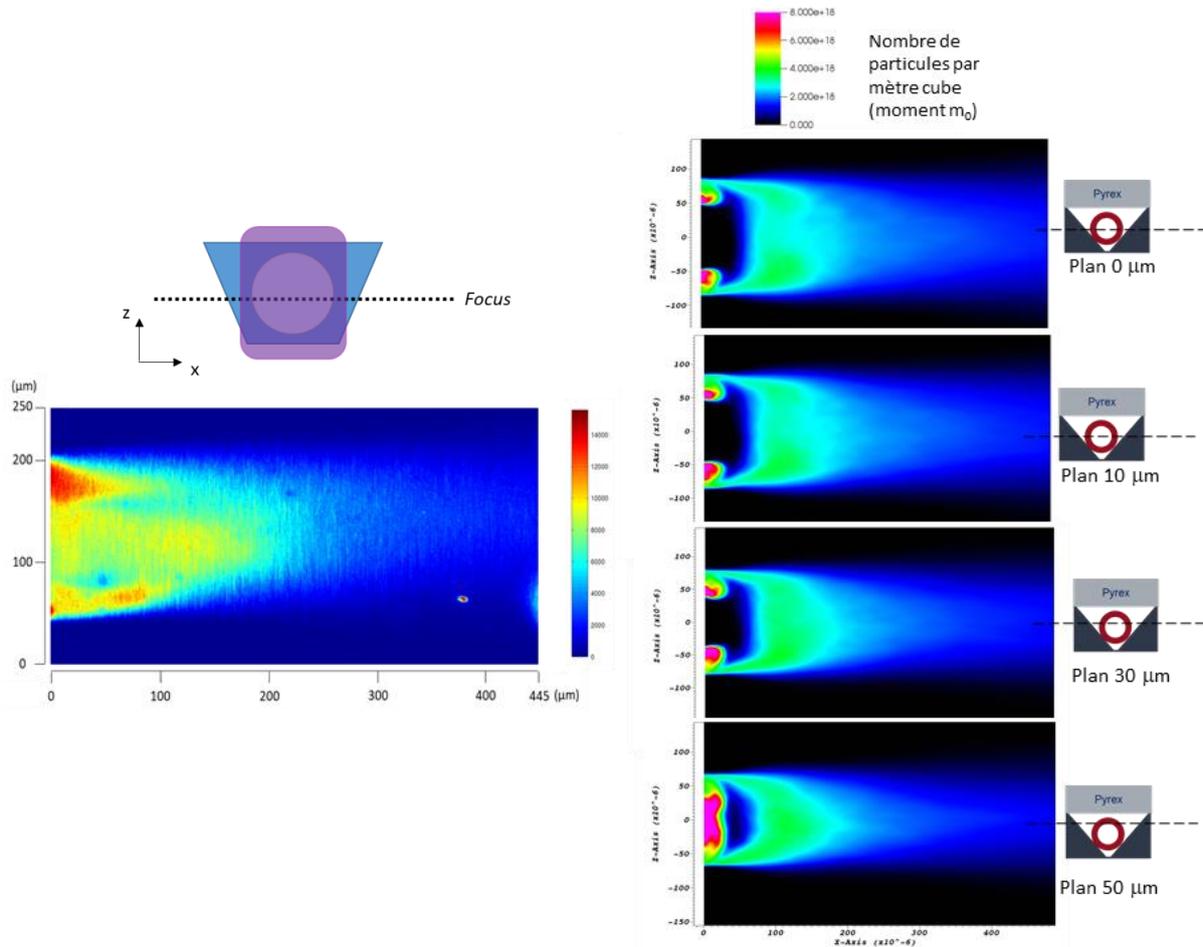


Figure 82 : Cartographie du champ de précipitation de BZX en fonction de l'intensité de la fluorescence mesurée (à gauche). Champ moyenné de la concentration de particules de BZX par simulation numérique à différentes hauteurs du canal (à droite).

La figure 83 montre l'intensité de fluorescence des particules à différentes sections du micro-canal. La première section correspond à la zone de sortie de l'injecteur, très riche en particules. La deuxième zone, de 500 µm à 1 mm, correspond à une zone où l'intensité est beaucoup plus faible. Ceci nous indique que la précipitation a lieu uniquement dans une zone très courte après l'injecteur. Les particules sont ensuite dispersées dans le canal. L'observation expérimentale est confortée par la cartographie numérique (Figure 83). La confrontation expérience/numérique est très bonne et nous permet de considérer que les mécanismes de nucléation et de croissance choisis pour la simulation numérique semblent pertinents. En effet, la nucléation semble ne se faire que dans le volume du réacteur, typique de la nucléation homogène primaire.

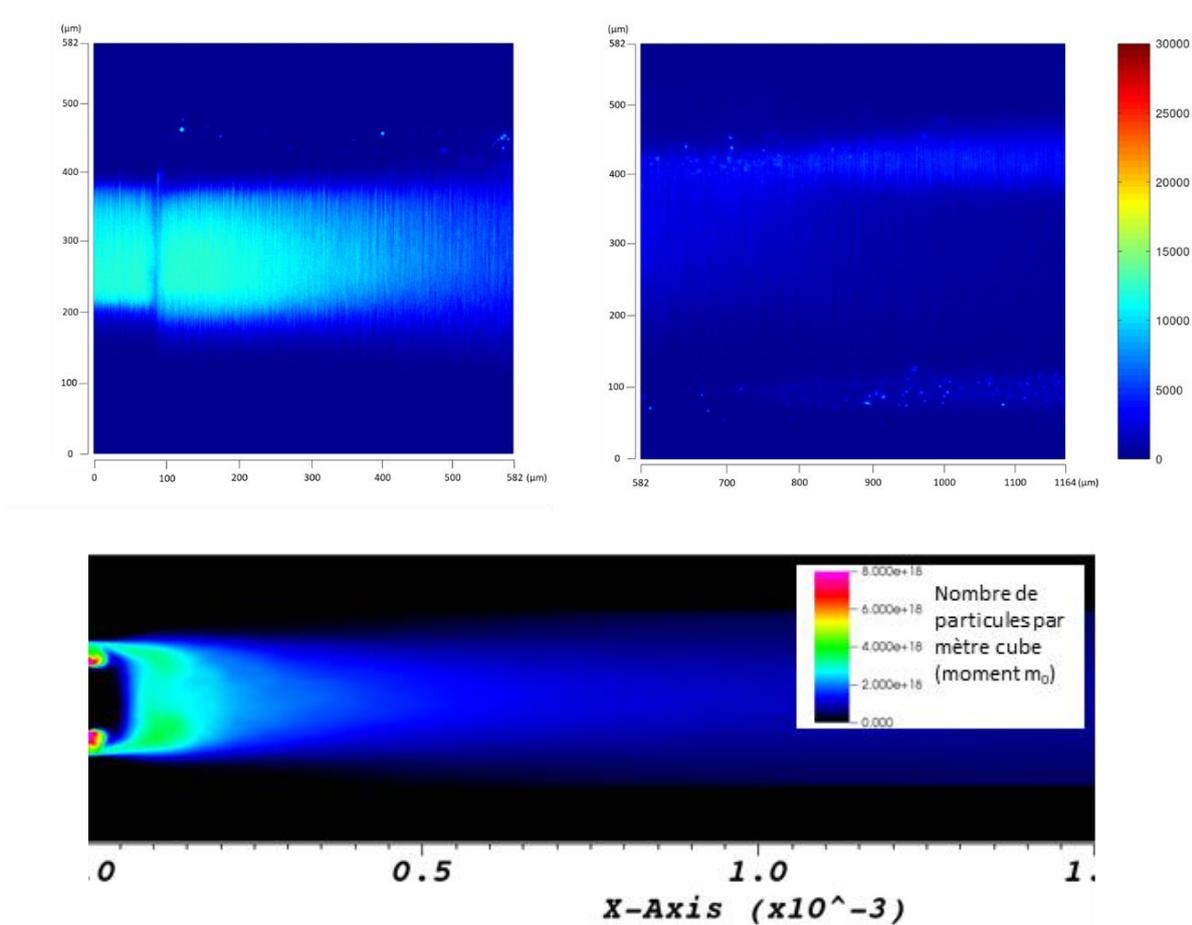


Figure 83 : Cartographie de l'intensité de la fluorescence de BZX sur 1 mm de longueur (par la mesure expérimentale en haut, par la simulation numérique en bas).

Afin de mieux comprendre la précipitation « brutale » dans le micro-canal, nous allons analyser les champs de grandeurs caractéristiques des phénomènes dans le micro-canal obtenus par simulation numérique.

La figure 84 représente les champs instantanés 2D dans le plan médian du réacteur de la concentration de BZX solubilisée (a), la concentration volumique de particules solides de BZX (moment m_3 de la distribution) (b), la sursaturation (c) et le temps de micromélange calculé par le modèle d'engouffrement développé par Baldyga et Bourne (cf. annexe 2) (d). Nous observons un mélange très fort du BZX dès la sortie de l'injection sur une échelle de longueur extrêmement courte donc avec un temps très court. Les particules sont alors créées dans cette zone (figure (b)) ce qui correspond à une zone de sursaturation importante (figure (c)). La figure (d) représentant la cartographie de temps de micromélange local révèle des temps de micromélange très courts, inférieurs à 10^{-4} s, et nous montre que les zones de mélange intense sont localisées en périphérie du jet central. Ces zones remarquables se retrouvent bien à la fois dans les cartographies numériques et expérimentales. Les conditions de mélange sont ici très bonnes, rapides et totales, et montrent l'importance de l'hydrodynamique dans ce type de réacteur.

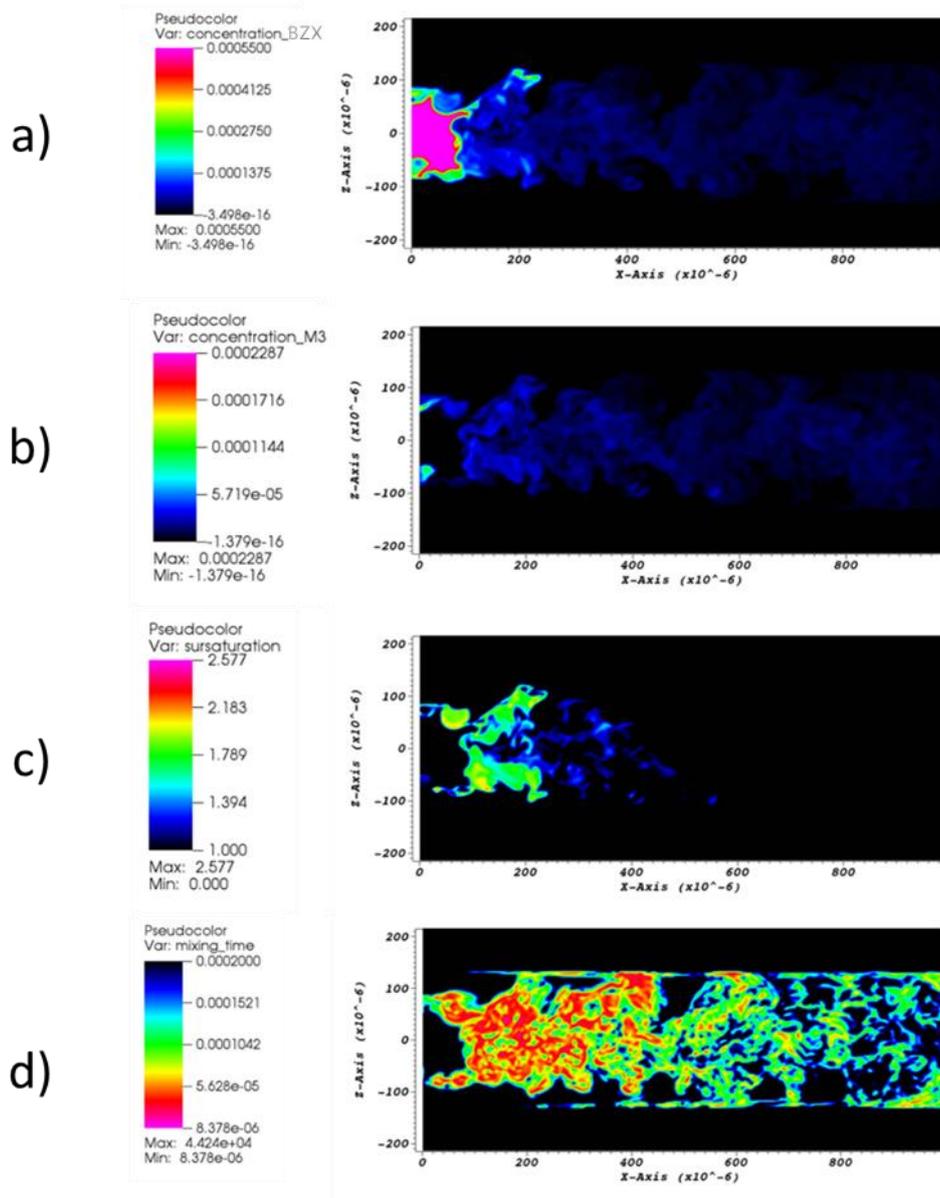


Figure 84 : Champs de concentration du BZX solubilisée (a), champs de la concentration volumique de particules solides de BZX (b), champs de la sursaturation (c) et champs du temps de micromélange de BZX sur 1 mm de longueur.

3.3.7 Analyse statistique des temps caractéristiques

L'analyse précédente des champs d'intensité numériques/expérimentaux a montré que les hypothèses avancées sur les mécanismes de nucléation et de croissance sont tout à fait cohérentes. Pourtant, lors de la confrontation des distributions de taille et de particules menée dans la partie 3.3.4, il est apparu une différence importante en termes d'écart type ou de largeur de la distribution. La distribution numérique a fait apparaître une largeur de distribution presque deux fois plus importante que celle expérimentale. Afin de comprendre pourquoi une telle largeur de distribution numérique, nous allons analyser les différents temps caractéristiques de la précipitation, à savoir le temps de mélange, le temps de croissance et le temps de nucléation. Pour cela, nous avons déterminé les distributions volumiques par échelle de temps dans la zone proche de l'injecteur, là où se déroule majoritairement la précipitation.

La zone mentionnée par le cadre en trait pointillé (Figure 85) délimite la zone pour laquelle l'analyse statistique des temps caractéristiques a été extraite.

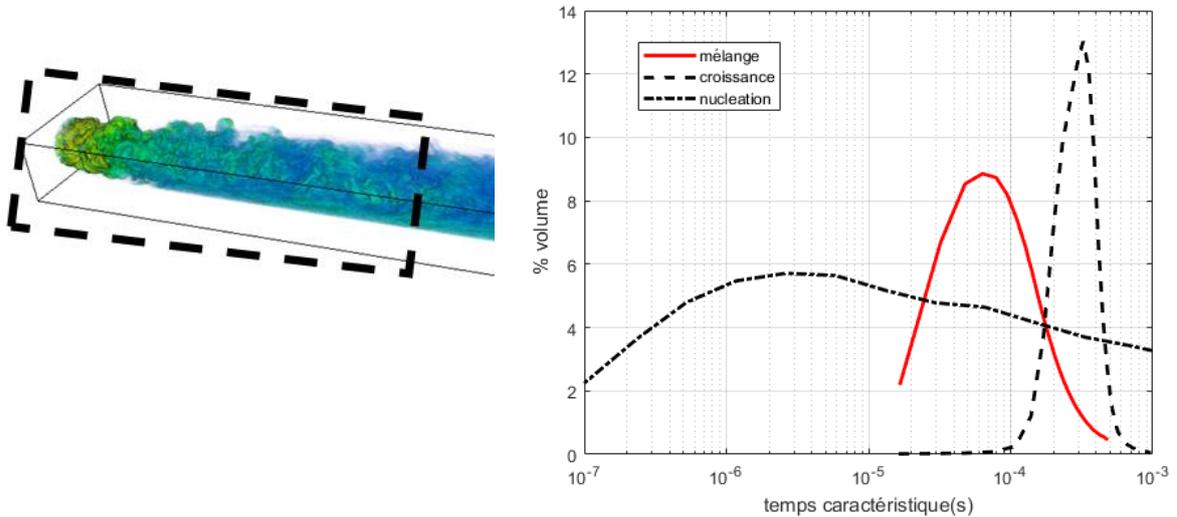


Figure 85 : Evaluations des temps de mélange, de croissance et nucléation de BZX à la sortie de l'injecteur.

Les temps de nucléation et de croissance sont calculés à partir des relations 8 et 10 et le temps de micromélange est calculé par le modèle d'engouffrement (Figure 85). Le temps de mélange, largement inférieur à 10^{-4} s, est très rapide et propice à une précipitation rapide conduisant à de petites particules et à une distribution de particules étroite. Le temps de croissance est supérieur au temps de mélange de l'ordre d'un ordre de grandeur. Ceci est tout à fait favorable à une croissance homogène due à un très bon mélange préalable des espèces. Ici encore, ceci devrait naturellement conduire à une distribution des particules étroite. L'observation de la distribution des temps de nucléation fait apparaître un temps moyen autour d'un ordre de grandeur en-dessous du temps de mélange (entre 10^{-5} et 10^{-6} s). Par contre, cette distribution s'étale sur plus de trois ordres de grandeur. Ce phénomène est *a priori* responsable de l'obtention de distribution de particules larges. Afin de comprendre une telle dispersion des temps de nucléation, correspondant à l'inverse de la fréquence de nucléation, nous avons déterminé la distribution volumique des niveaux de sursaturation dans la zone mentionnée dans la figure 85. La distribution des sursaturations est représentée dans la figure 86. La sursaturation s'étend de 1 à un peu plus de 2,2. Nous remarquons une forte proportion pour des niveaux de sursaturation relativement bas, inférieur à 1,5. Finalement, cette relative dispersité des niveaux de sursaturation (entre 1 et 2) dans le micro-canal conduit à des cinétiques de nucléation pouvant différer jusqu'à plusieurs ordres de grandeur.

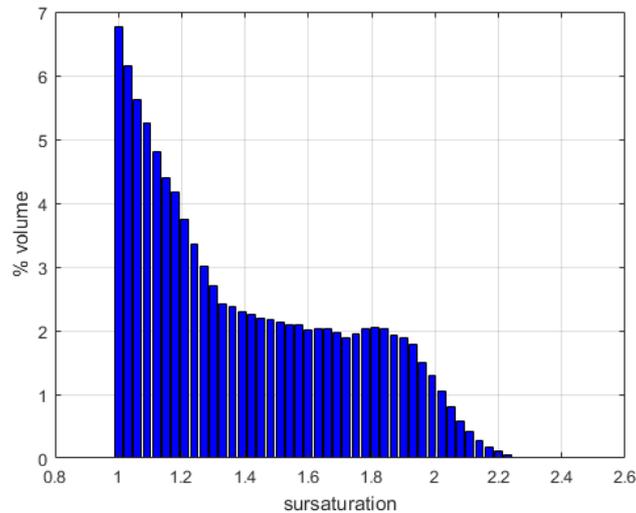


Figure 86 : Distribution des sursaturations à la sortie de l'injecteur.

Ces observations nous amènent à soulever deux points importants de cette étude :

- Le premier point concerne la relation de la théorie classique de la nucléation permettant de calculer la cinétique de nucléation. Bien que l'observation/comparaison des cartographies numériques et expérimentales est très bonne d'un point de vue qualitatif, nous pouvons nous interroger sur la pertinence de ces modèles d'un point de vue quantitatif. En effet, cette relation conduit à des valeurs de cinétique de nucléation très différentes pour des variations de sursaturation relativement faibles. Ceci semble conduire naturellement à surestimer la dispersion en taille des particules.
- Le deuxième point concerne la caractérisation *ex situ* et notamment la mesure des tailles de particules à partir des images TEM. En effet, si l'obtention de la taille moyenne semble tout à fait pertinente, l'estimation des distributions paraît beaucoup moins évidente. En effet, le comptage n'est effectué que sur ce « que l'on peut voir » et constitue un véritable biais dans la détermination des distributions en taille de particules.

3.3.8 Analyse *in situ* de la longueur d'onde d'émission de BZX

En complément de l'analyse en intensité, le microscope confocal nous permet de distinguer la longueur d'onde maximale d'émission pour chaque pixel. À partir des outils d'analyse d'image présentés dans la partie 3.3.5.2, nous pouvons recréer des cartographies du micro-canal afin d'identifier des variations des longueurs d'onde d'émission. Nous avons cherché à corrélérer le shift de l'intensité maximale avec une éventuelle variation de taille de particules. La figure 87 représente le champ de variation de longueurs d'onde corrélé au déplacement du maximum d'émission dans la zone de précipitation. Aucune variation significative de cette longueur d'onde n'est observée. La figure 88 représente l'évolution de la taille moyenne des particules ($d_{10} = \frac{m_1}{m_0}$) dans le réacteur obtenue par simulation numérique. Les oscillations en début de courbe correspondent à une solution non physique due au calcul de moyenne sur chaque plan (zone grisée). Dans les premiers plans transversaux, les domaines CO₂ et solvant sont totalement ségrégués et conduisent à des grandeurs locales extrêmement différentes conduisant alors une estimation en moyenne non physique. Comme attendu et représenté dans la figure 88, l'augmentation de taille moyenne des particules concerne uniquement la zone proche de l'injecteur, jusqu'à 400 μm approximativement. À partir de cette longueur, la taille moyenne

n'évolue plus. Il ne semble donc pas y avoir d'effet de la taille des particules sur une variation de la longueur d'onde à l'intensité maximale.

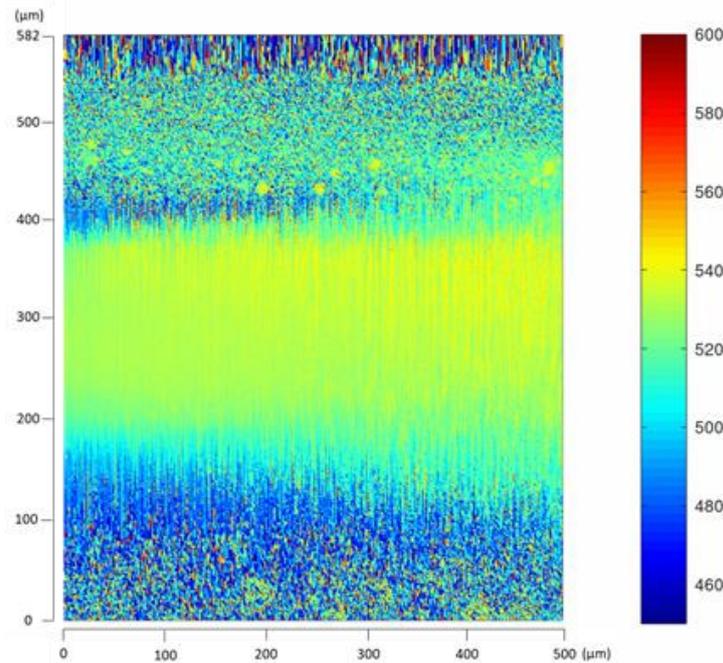


Figure 87 : Cartographie du maximum de la longueur d'onde d'émission de BZX.

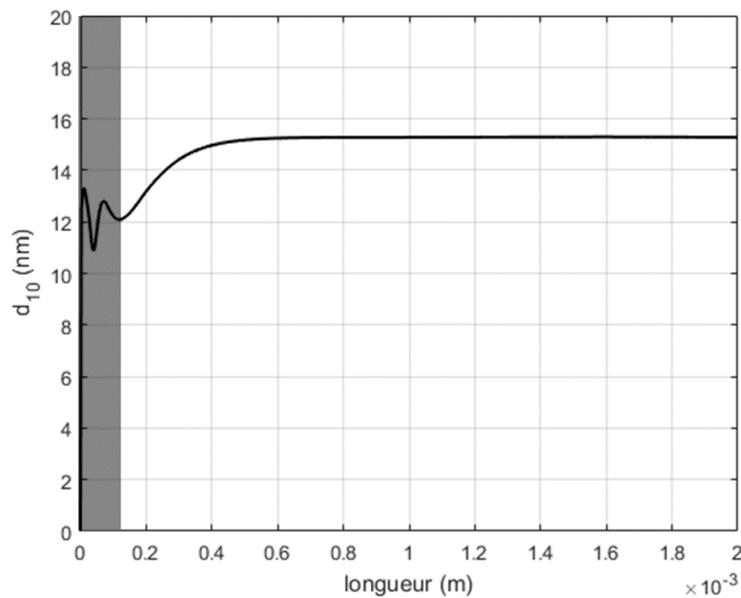


Figure 88 : Evolution de la taille moyenne de particules dans le micro-canal (partie grisée : solution non physique).

Des travaux complémentaires peuvent apporter des informations sur la taille des particules. La précipitation de ces particules organiques peut être observée *in situ* par la microscopie à fluorescence. La FLIM est une approche sensitive qui consiste à mesurer le temps de vie de fluorescence des particules organiques et à détecter les phénomènes de nucléation et de précipitation (Anthony et al., 2014). Tout comme avec notre méthode, cette technique s'adapte très bien aux systèmes microfluidiques. De plus, de nombreux travaux ont permis de distinguer les particules en fonction de

Chapitre 3

leur taille en observant une variation de leur temps de vie (Liao et al., 2016; Tran et al., 2016). La FLIM semble être une approche intéressante pour répondre à notre problématique. La visualisation des phénomènes de nucléation et de croissance, ainsi que la taille des FONS circulant dans notre microréacteur pourront être déterminés expérimentalement et de manière plus précise. Les résultats obtenus par FLIM pourront alors être comparés à ceux obtenus par le modèle numérique afin de le valider.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le procédé μ SAS comme un outil innovant pour la synthèse de FONs. Dans un premier temps, il a été fait un rappel sur les phénomènes de nucléation et de croissance impliqués dans le procédé μ SAS. Les grandeurs liées à l'hydrodynamique du mélange comme le temps de nucléation ou de précipitation ont été présentées. Elles ont ensuite été utilisées dans les calculs numériques effectués en parallèle des expériences.

Dans un deuxième temps, un composé modèle, le TPE, a été choisi pour une première mise en forme par μ SAS. Un travail préliminaire a permis d'étudier la thermodynamique du mélange comprenant le TPE, le THF (son solvant) et le CO_2 (son anti-solvant). Ce travail expérimental a abouti à la mesure de la solubilité du soluté dans le milieu {THF/ CO_2 } dans les conditions de travail souhaitées, c'est-à-dire pour un milieu monophasique et très riche en anti-solvant. Une caractérisation *ex situ* par microscopie électronique a permis de mesurer expérimentalement la taille des particules de TPE synthétisées par μ SAS. Ces premiers résultats ont donné des tailles de particules de 9 ± 3 nm, justifiant l'utilisation du μ SAS pour la synthèse de FONs. La comparaison des résultats expérimentaux et simulés de la distribution en taille de ces particules a permis d'évaluer la tension de surface des nanoparticules dans le fluide supercritique. Il a été montré que l'augmentation des débits d'injection des fluides dans le micro-canal amène à une diminution du temps de mélange et donc à la formation de plus petites particules. Les expériences menées sur le TPE ont montré des temps de mélange très courts, inférieurs à 10^{-4} s, démontrant la performance du mélange du procédé μ SAS.

Les propriétés optiques des FONs aux effets AIE ont été mises à profit dans les dernières expériences réalisées dans ce chapitre. Une étude préliminaire sur la solubilité du composé fluorescent BZX a été réalisée. Les tailles de particules obtenues, inférieures à 50 nm, montrent encore une fois l'efficacité du procédé μ SAS. Le microscope confocal utilisé pour la caractérisation *in situ* a permis de recréer une cartographie des champs de précipitation de BZX dans le microréacteur. Ce résultat expérimental a été comparé avec succès à la prédiction donnée par les calculs numériques et a montré que le mélange est très rapide (inférieur à 10^{-4} s) et s'effectue totalement dans une zone très limitée à la sortie de l'injecteur, amenant à une domination de la nucléation homogène et donc à la formation de petites particules. La distribution en taille des particules, quant à elle, est apparue plus large à partir de la simulation que dans les mesures expérimentales. L'étude du champ de sursaturation dans le micro-canal a montré une certaine fluctuation de la sursaturation, pouvant être à l'origine d'une variation des temps de nucléation, conduisant à la formation de particules aux tailles hétérogènes. Enfin, aucune variation de la longueur d'onde d'émission des particules solides de BZX dans le microréacteur n'a été observée. Toutefois, des approches spectroscopiques comme la FLIM ont déjà montré leur intérêt dans la différenciation de particules en fonction de leur taille. Ainsi, ce genre d'outil appliqué au microréacteur pourrait mener vers plus de compréhension des mécanismes de nucléation et de croissance du procédé μ SAS.

Chapitre 4

Mise en forme des FONs par les procédés anti-solvant

Introduction

Ce dernier chapitre se focalise sur l'application des procédés anti-solvants. Nous allons éprouver la robustesse du procédé μ SAS en proposant de synthétiser différentes molécules difficiles à mettre en forme par voie conventionnelle. Les premières expériences sont réalisées sur la puce microfluidique. Dans l'optique de proposer un système le plus performant possible, nous observerons l'impact de différents facteurs expérimentaux sur la taille et sur la morphologie des particules synthétisées. Les caractérisations par microscopie électronique permettront de mesurer les tailles de particules formées.

Les poudres récupérées seront toutes caractérisées en taille par microscopie électronique (TEM). D'autres caractérisations pourront être utilisées : dans le cas où les particules récoltées sont suffisamment grandes, nous emploierons la DLS pour mesurer leur taille ; dans le cas où la quantité de poudre récupérée est suffisante, nous caractériserons le produit par photoluminescence.

Dans un second temps, nous évaluerons l'efficacité d'un procédé de mise en forme par voie liquide conventionnelle : le LAS. Les conditions de mélange étant très différentes pour les deux procédés, nous nous attendons à un impact sur la taille des particules formées. Nous observerons alors les bénéfices qu'apporte le procédé μ SAS pour une application biomédicale des FONs synthétisés.

Puis, nous nous intéresserons à l'amélioration du montage expérimental du μ SAS dans le but d'augmenter le rendement de production des poudres. Nous nous attacherons à contrôler la taille des particules formées par ce nouveau système. Les tailles des particules issues de ces deux systèmes μ SAS seront comparées.

Enfin, nous étudierons un dernier système pouvant bénéficier d'une haute valeur ajoutée dans le domaine biomédical : la doxorubicine. Celle-ci est un anti-cancéreux pour lequel une diminution en taille permettrait d'augmenter sa biodisponibilité. Sa mise en forme ainsi que celle du polymère lui servant d'agent vectoriel dans le corps humain seront réalisées et commentées. Une dernière étape consistera à étudier un système dans lequel l'agent actif et son polymère sont préalablement dissous dans la même solution mère avant leur mise en forme.

4.1 Procédés de mise en forme

4.1.1 Mise en forme des matériaux par le procédé μ SAS

Le procédé μ SAS mis en place dans le cadre de cette thèse et dont les premiers résultats ont été présentés dans le chapitre précédent est utilisé ici pour mettre en forme différentes poudres organiques fluorescentes (Figure 89). Les hautes performances de mélange offertes par les conditions supercritiques dans lesquelles nous nous situons ainsi que la réduction de la taille du réacteur par rapport au SAS doivent permettre d'atteindre des tailles de particules plus petites avec une distribution en taille étroite. Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus sur cinq molécules (TPE, BZX, NZX-tBu, Pérylène, Doxorubicine).

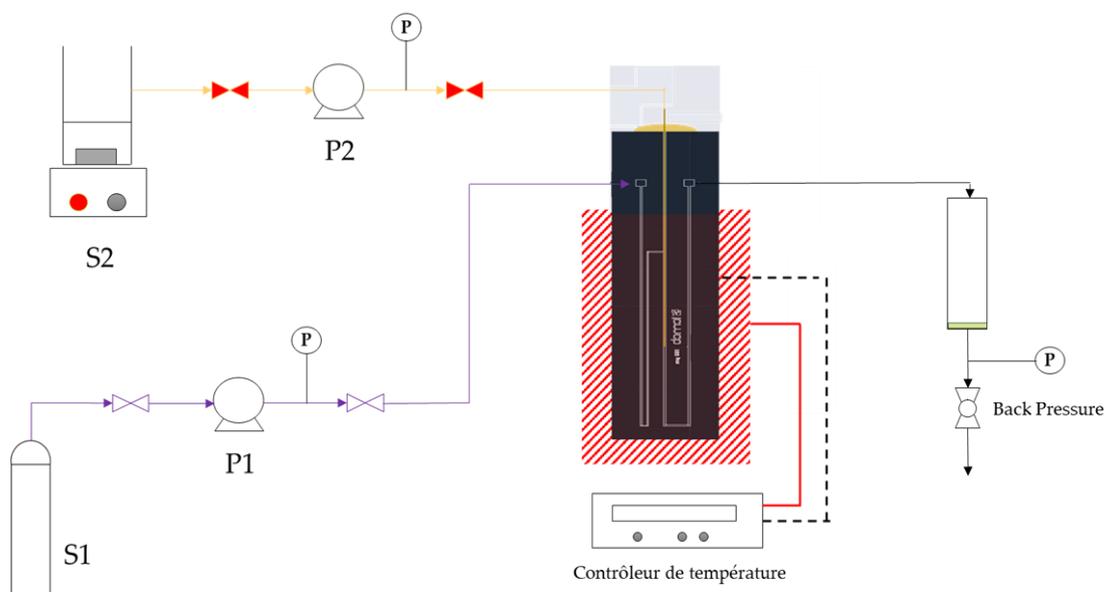


Figure 89 : Schéma du montage expérimental μ SAS avec micro-puce.

P1, P2 : Pompes ; S1 : Bouteille de CO_2 ; S2 : Solution organique concentrée ; P : Capteur de pression.

Afin d'observer les effets des conditions opératoires sur la taille et la morphologie des poudres produites, nous avons fait varier divers paramètres expérimentaux du μ SAS. À la suite de ces expériences, la grille TEM placée dans la cellule de récupération est systématiquement utilisée pour la caractérisation des poudres par microscopie électronique. Ces résultats sont importants pour montrer l'efficacité du procédé μ SAS. Ils peuvent être également comparés à d'autres procédés conventionnels, comme le LAS qui utilise la précipitation par anti-solvant liquide.

4.1.2 Mise en forme des matériaux par le procédé LAS

Dans le but de confirmer l'avantage à utiliser le procédé μ SAS, nous avons mis en forme chaque molécule avec une méthode utilisant un anti-solvant liquide : l'eau. Ce procédé est très couramment utilisé dans la chimie de synthèse (Campardelli et al., 2012; Sheng et al., 2014; Thorat and Dalvi, 2012). Le montage expérimental du LAS est simple. Une solution organique concentrée est chauffée à 40 °C et mise sous agitation. Puis, un volume d'eau également chauffé à 40 °C est versé rapidement dans la solution. La nouvelle solution (d'un volume de 1000 mL) est ensuite placée dans un système à filtration Büchner muni d'une membrane poreuse sur laquelle est placée une grille TEM pour analyse *ex situ*. La poudre est récupérée et analysée par microscopie électronique, de la même manière qu'avec le procédé μ SAS. La taille et la morphologie des poudres synthétisées par LAS sont ensuite comparées aux résultats du μ SAS. Une étude systématique détaille ici les résultats sur différentes poudres organiques fluorescentes.

4.2 Le Tétraphényléthylène (TPE)

4.2.1 μ SAS

Le TPE a été choisi en premier pour sa grande disponibilité et son faible coût chez les principaux fournisseurs en produits chimiques. C'est aussi une molécule à la base des synthèses de nombreux FONs (Jiang et al., 2020; Qi et al., 2013; Yang et al., 2018). Parmi les nombreux solvants organiques que nous avons testés, le Tétrahydrofurane (THF) semble être le meilleur solvant pour le TPE. Nous choisissons donc ce système pour la mise en forme du TPE par μ SAS. Comme il l'a été montré dans le chapitre 3, le système {THF/ CO_2 } est monophasique à 40 °C et 100 bar. Pour ces mêmes conditions, nous avons montré le fort caractère anti-solvant du CO_2 qui s'observe à travers une très forte

diminution de la solubilité du TPE pour des fractions molaires CO₂:THF supérieures à 95 %. Les multiples expériences menées sur le TPE par μ SAS sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par μ SAS.

# Exp	T (°C)	P (bar)	[TPE] (mg/mL)	Débit THF (mL/min)	Débit CO ₂ (mL/min)	Fraction molaire en CO ₂	Taille (nm)	
1	40	100	2	0,44	8	98 %	9	± 3
2	40	100	2	0,11	2	98 %	14	± 5
3	40	100	3	0,44	8	98 %	9	± 3

Les résultats obtenus dans le chapitre 3 sont rappelés brièvement dans cette partie. Avec une taille moyenne de l'ordre de 10 nm (Figure 90), les particules de TPE constituent un premier exemple convaincant, montrant la haute capacité du μ SAS à synthétiser de très petites particules. Ces nanoparticules présentent des tailles intéressantes pour augmenter la biodisponibilité d'une sonde photoluminescente utilisant le TPE. Dans le but de mettre en avant ces résultats innovants, nous optons pour un procédé conventionnel avec lequel le TPE sera mis en forme.

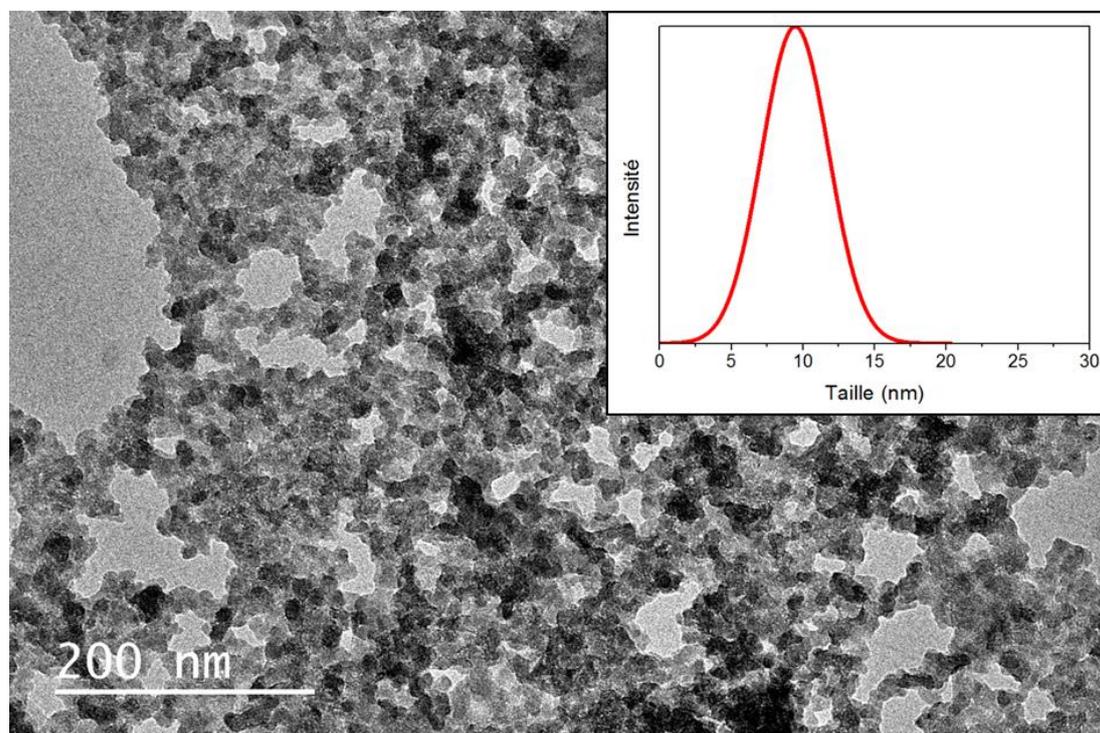


Figure 90 : Image des particules de TPE après mise en forme par μ SAS (Exp #1).

4.2.2 LAS

La température de la solution est maintenue à 40 °C, tout comme la concentration de la solution qui reste à 2 mg/mL (comme dans le cas n° 1 en μ SAS). De plus, le rapport des volumes des solutions organique et aqueuse est calculé de manière à obtenir un rapport molaire en H₂O de 98 % de manière à conserver un fort effet anti-solvant dans le mélange (Tableau 12).

Tableau 12 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par LAS.

T (°C)	[TPE] (mg/mL)	Fraction molaire en H ₂ O
40	2	98 %

Tout comme avec le μ SAS, nous présentons les résultats obtenus par caractérisation TEM (Figure 91).

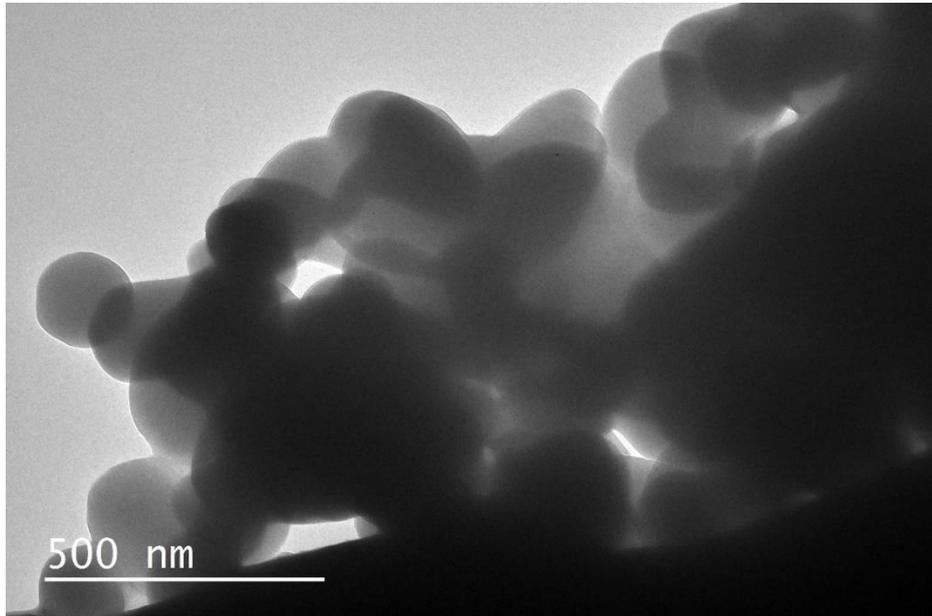


Figure 91 : Image TEM du TPE mis en forme par LAS.

Avec le LAS, nous avons récupéré des particules de tailles beaucoup plus élevées. Il nous a donc été possible d'utiliser un autre type de caractérisation des tailles des particules : la DLS (Figure 92). Les mesures des particules obtenues avec le TEM et en DLS concordent, nous présentons ici les valeurs obtenues par DLS (Tableau 13). La répétabilité de l'expérience a confirmé ce résultat, ce qui nous permet de dire que ce procédé est bien contrôlé.

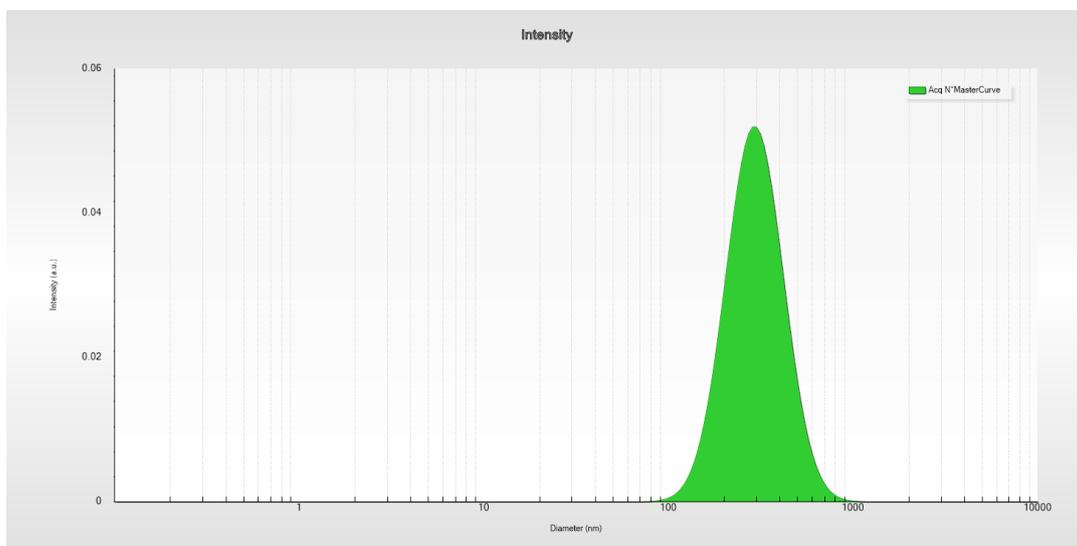
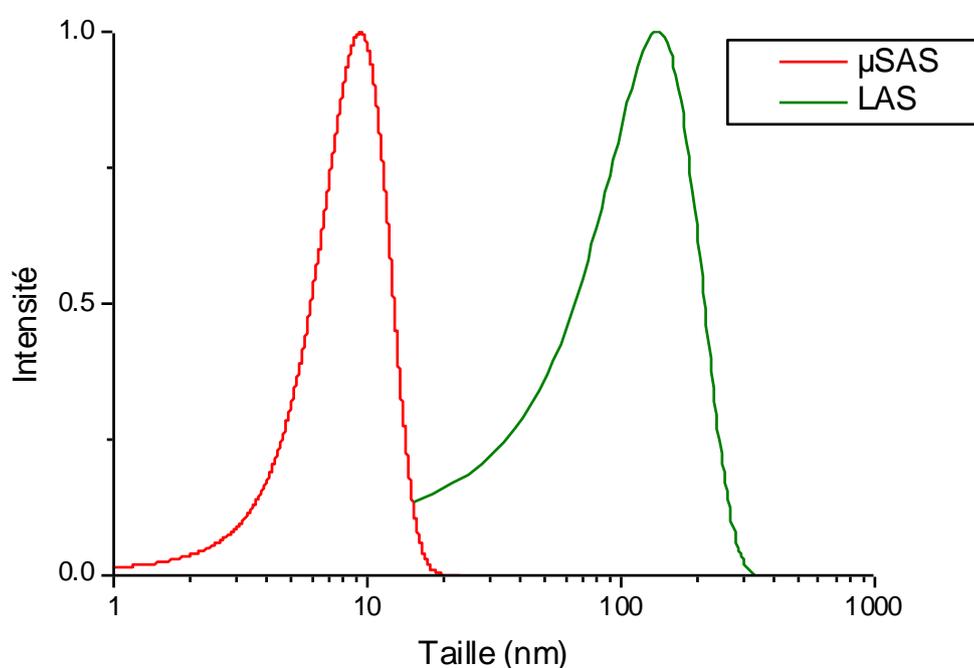


Figure 92 : Distribution en taille de TPE par LAS (DLS).

Tableau 13 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de TPE par LAS.

T (°C)	[TPE] (mg/mL)	Fraction molaire en H ₂ O	Taille (nm)
40	2	98 %	310 ± 40

Les grandes tailles ainsi que l'importante dispersité de la distribution en taille de particules obtenues par LAS montrent qu'il réside une inhomogénéité des espèces en présence dans le réacteur. La croissance semble prévaloir sur la nucléation due à la sursaturation (faible et hétérogène). Dans le bécher, les conditions de mélange ne sont pas optimisées, ce qui amène à la formation de particules de tailles très différentes, allant de quelques dizaines de nanomètres à plusieurs centaines de microns. Ce résultat nous conforte dans l'idée que le μ SAS est une bonne solution pour la production de petites particules homogènes en taille. La figure 93 compare les distributions en taille des particules pour les deux procédés. Le procédé μ SAS permet de diminuer la taille d'un ordre de grandeur.

Figure 93 : Distributions en taille des particules de TPE obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert).

À présent, il est intéressant de regarder les effets de tailles engendrés par le choix du procédé de mise en forme sur d'autres molécules organiques.

4.3 BZX

4.3.1 μ SAS

Cette seconde molécule a été utilisée pour les caractérisations *in situ* de la précipitation de nanoparticules dans le procédé μ SAS. Au-delà de ses propriétés optiques, il nous a semblé utile d'observer l'impact des conditions opératoires sur la taille des particules synthétisées par μ SAS.

Cette molécule déjà présentée dans le chapitre 3 est synthétisée au laboratoire SPCMIB. Elle se présente sous la forme de microcristaux dont la forme révélée par microscopie électronique s'apparente à de plaquettes allongées (Figure 94).

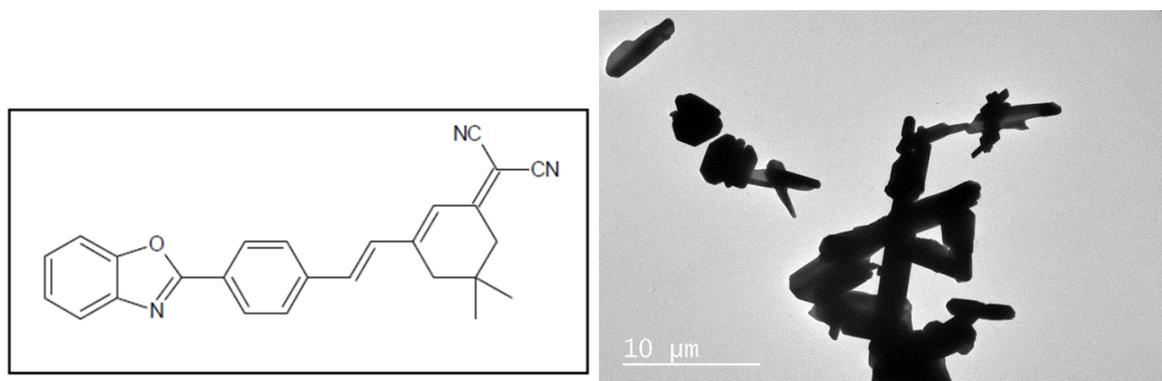


Figure 94 : Structure moléculaire de BZX (gauche),
image TEM de la poudre macrométrique avant mise en forme (droite).

Dans ce travail, nous avons étudié deux paramètres expérimentaux : la concentration initiale de la solution (BZX/THF) et les débits d'injection. Les différentes études réalisées sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de BZX par μ SAS.

#Exp	T (°C)	P (bar)	[BZX] (mg/mL)	Débit CO ₂ (mL/min)	Débit THF (mL/min)	% CO ₂	Taille (nm)	
1	40	100	1	8	0,44	98%	16	± 3
2	40	100	1	2	0,11	98%	15	± 4
3	40	100	0,5	8	0,44	98%	17	± 5
4	40	100	0,5	2	0,11	98%	18	± 4
5	40	100	0,1	8	0,44	98%	17	± 3
6	40	100	0,1	2	0,11	98%	17	± 4
7	40	100	0,05	8	0,44	98%	Pas d'observation	

Dans un premier temps, nous observons que la taille des particules est très faible (inférieure à 20 nm), ce qui nous permet encore une fois de dire que le procédé μ SAS est un outil très performant dans la synthèse des petites particules (Figure 95).

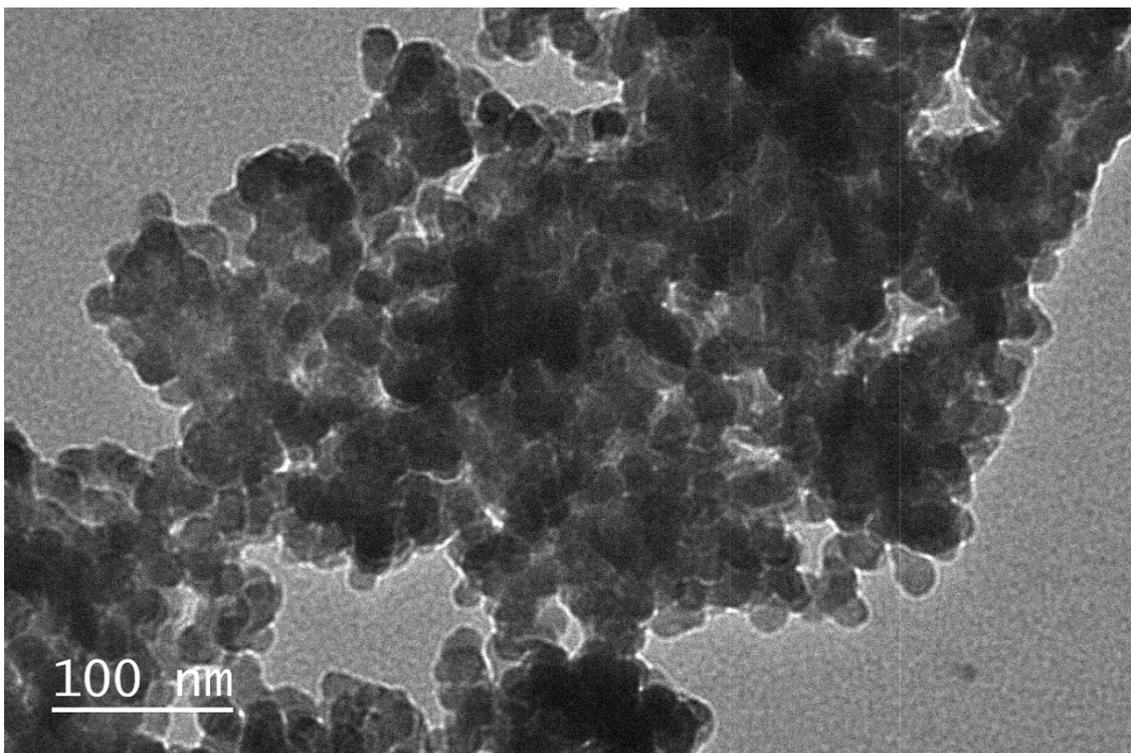


Figure 95 : Image des particules de BZX après mise en forme par μ SAS (Exp #1)

La taille des particules obtenues à la suite de la mise en forme par μ SAS ne présente pas de variation importante d'une expérience à l'autre. La comparaison des résultats (Figure 96) pour différentes concentrations initiales ne montre pas de variations significatives quels que soient les débits d'injection.

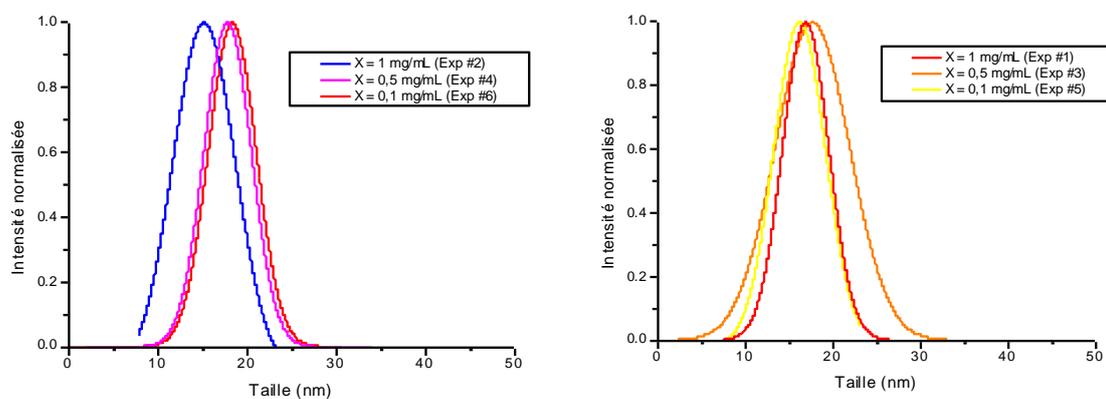


Figure 96 : Distributions en taille de BZX par μ SAS, aux faibles débits (à gauche) et aux forts débits (à droite)

Enfin, l'expérience #7 avec une concentration de 0,05 mg/mL de BZX dans le THF n'a donné aucune observation sur la grille TEM. Il est possible qu'à cette très faible concentration, la sursaturation soit relativement faible (légèrement supérieure à 1) et que trop peu de particules aient été créées durant le temps d'opération.

À la suite des expériences, il nous a été possible de récupérer une quantité de poudre suffisante pour caractériser par fluorescence les particules mises en forme. Une analyse par photoluminescence a été effectuée sur la poudre commerciale ainsi que sur la poudre synthétisée. Les spectres d'émission des deux échantillons sont présentés ici (Figure 97).

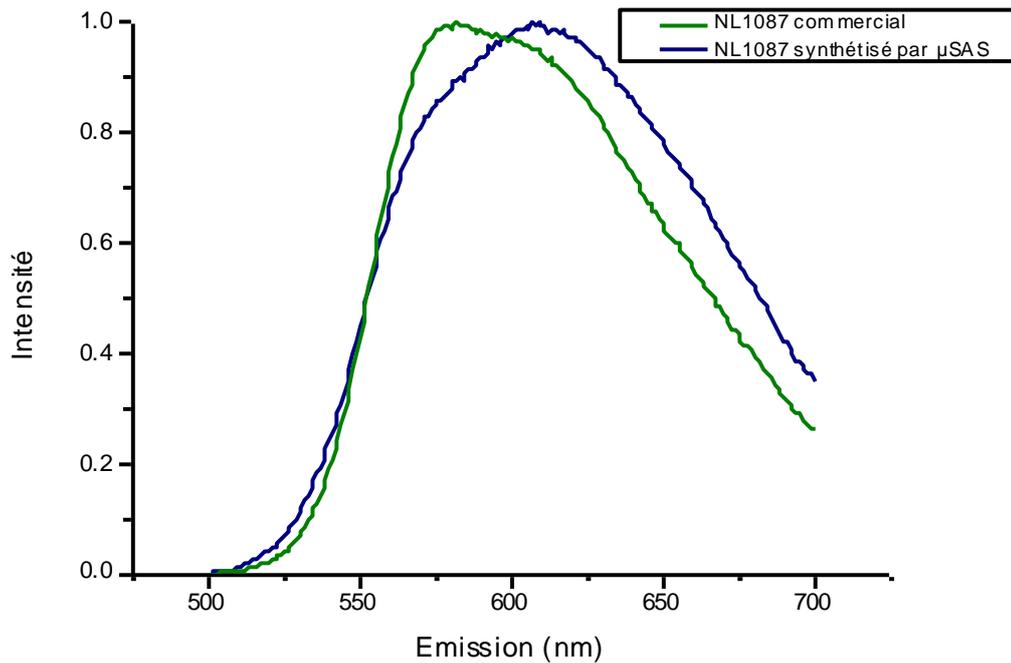


Figure 97 : Spectres d'émission de BZX.

Nous remarquons que la poudre mise en forme par μ SAS présente un léger élargissement de son spectre d'émission d'environ 20 nm. Ceci peut être dû à des défauts de la structure cristalline de la poudre. En effet, étant donnée la nouvelle morphologie sphérique de la poudre obtenue par μ SAS, les photons qui interagissent avec la poudre fluorescente n'utilisent plus le même parcours, ce qui peut avoir une répercussion sur l'allure du spectre d'émission (Kang and Zhu, 2019; Li et al., 2005).

4.3.2 LAS

Le procédé LAS est testé sur le composé BZX dans les conditions présentées dans le tableau 15. Tout comme pour le TPE, nous obtenons des particules beaucoup plus grandes qu'à la sortie du μ SAS (Figure 98).

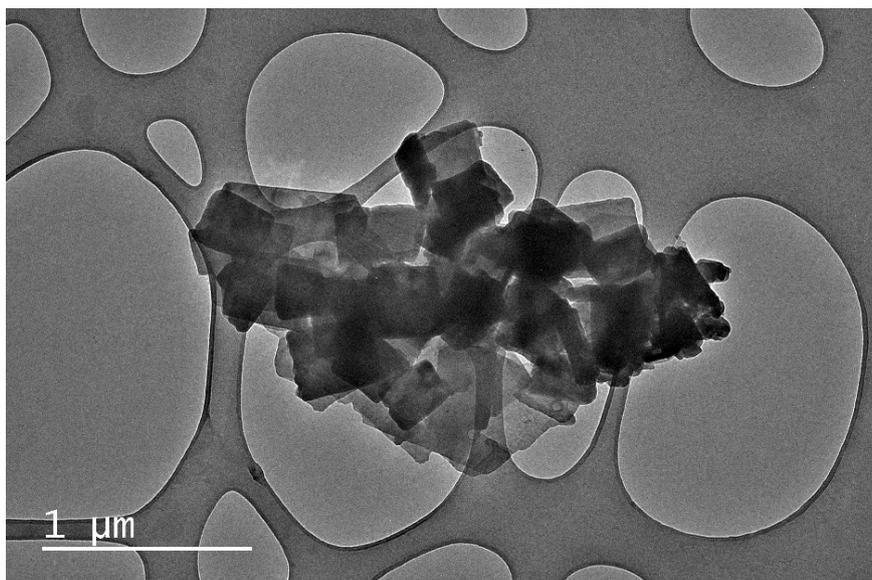


Figure 98 : Image des particules de BZX après mise en forme par LAS.

Tableau 15 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de BZX par LAS.

T (°C)	[BZX] (mg/mL)	Fraction molaire en H ₂ O	Taille (nm)	
40	0,5	98 %	310	± 153

Ici encore, nous observons une variation de la taille des particules de BZX d'un ordre de grandeur en fonction du système de mise en forme choisi (Figure 99). Les particules issues de la synthèse par LAS ont la forme de plaquettes, trahissant une croissance importante le long de chaque direction.

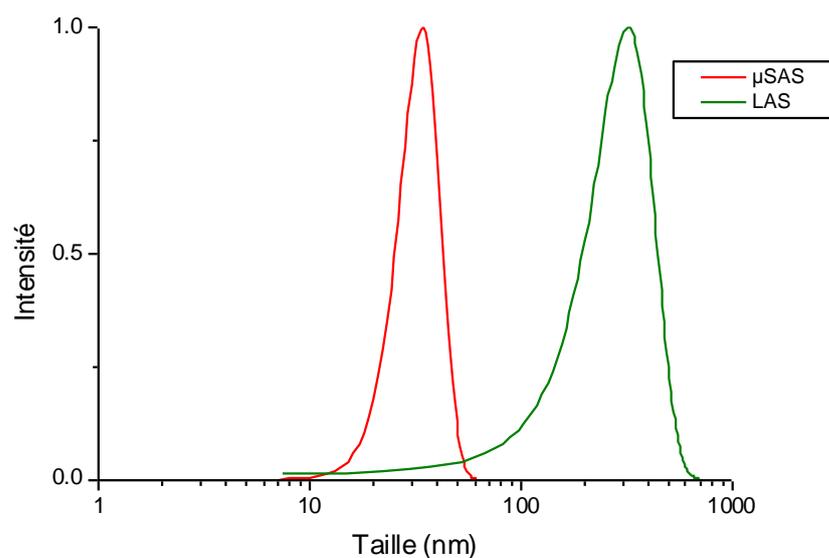


Figure 99 : Distributions en taille des particules de TPE obtenues par μSAS (rouge) et par LAS (vert).

4.4 NZX-tBu

Cette troisième molécule a été spécialement synthétisée par le laboratoire SPCMIB. Elle présente l'avantage d'avoir une très forte solubilité dans le THF, ce qui en fait un bon candidat pour observer les effets de la concentration sur les particules récoltées. Sa structure moléculaire est présentée dans la figure 100. Elle présente une grande aromaticité et comprend un groupement *tertio*-butyle (tBu), lui donnant son nom.

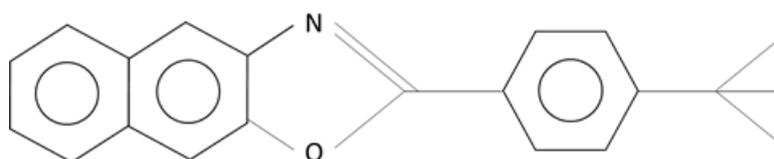


Figure 100 : Structure moléculaire de NZX-tBu.

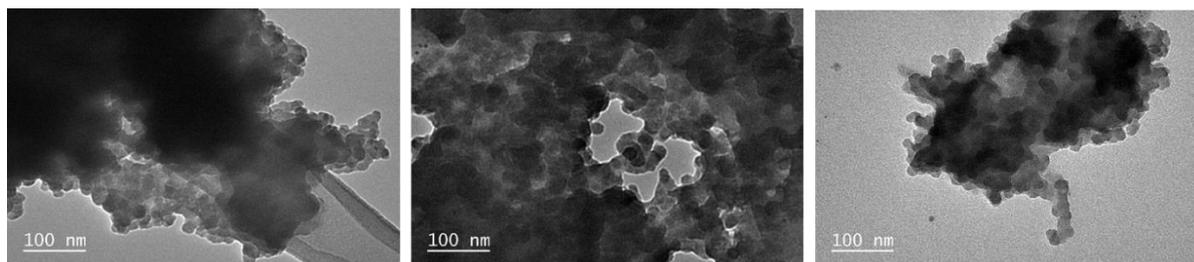
4.4.1 μSAS

Dans cette partie, nous avons balayé la concentration initiale de NZX-tBu dans le THF pour des valeurs allant de 0,6 à 6 mg/mL. Le tableau 16 présente les conditions utilisées pour les différentes expériences en μSAS.

Tableau 16 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de NZX-tBu par μ SAS.

# Exp	T (°C)	P (bar)	[NZX-tBu] (mg/mL)	Débit CO ₂ (mL/min)	Débit THF (mL/min)	% CO ₂	Taille (nm)	
1	40	100	0,6	8	0,44	98%	16	± 5
2	40	100	1	8	0,44	98%	15	± 5
3	40	100	6	8	0,44	98%	14	± 4

Les images TEM de NZX-tBu montrent des particules de taille semblable aux résultats obtenus avec le TPE et le BZX (Figure 101). Une forme sphérique est obtenue comme pour les précédentes molécules.



X = 0,6 mg/mL

X = 1 mg/mL

X = 6 mg/mL

 Figure 101 : Images TEM de particules de NZX-tBu mises en forme par μ SAS.

Tout comme avec le BZX, l'étude paramétrique n'a pas révélé de variation en taille significative. Ce résultat est d'autant plus surprenant que nous avons ici fait varier la concentration d'un ordre de grandeur. Lors de futurs travaux, il serait intéressant d'étudier l'impact d'une concentration encore plus élevée sur la taille des particules mises en forme par μ SAS et d'étudier la solubilité de BZX dans le système {THF/CO₂}.

4.4.2 LAS

Le procédé LAS est utilisé de la même manière que précédemment (Tableau 17). Nous préparons la solution aux mêmes concentration et température que pour le μ SAS.

Tableau 17 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de NZX-tBu par LAS.

T (°C)	[NZX-tBu] (mg/mL)	Fraction molaire en H ₂ O	Taille (nm)	
40	1	98 %	182	± 91

Une fois encore, des particules de très grandes tailles sont observées (Figure 102). Les images TEM montrent la large distribution en taille et la grande diversité de morphologies de particules synthétisées par LAS. Une analyse SEM montre à un plus faible grossissement la structure de la matière produite.

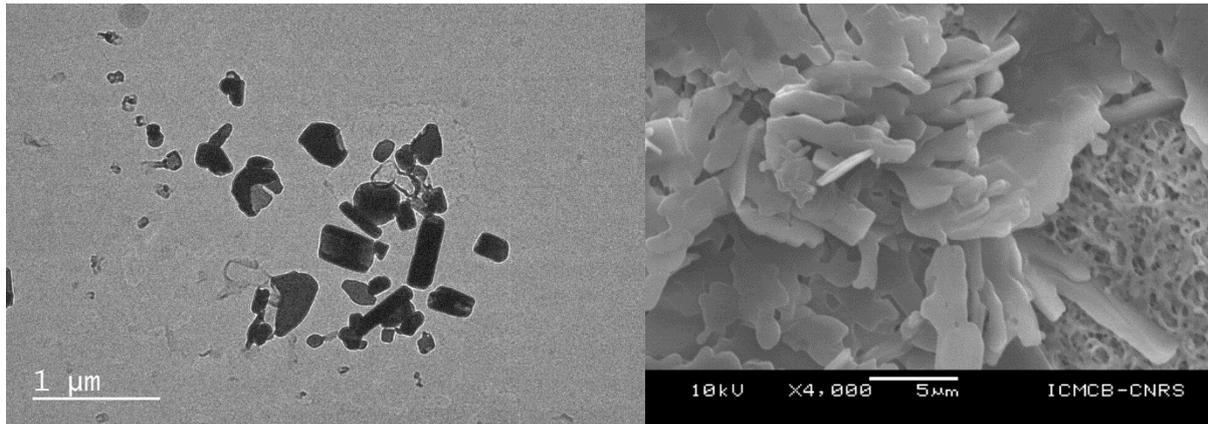


Figure 102 : Images TEM (gauche) et SEM (droite) de NZX-tBu mis en forme par LAS.

Le procédé μ SAS met en forme des particules de NZX-tBu d'environ 15 nm, tandis que le système LAS synthétise des particules de plusieurs centaines de nanomètres, voire de plusieurs microns (Figure 103). Le μ SAS montre pour une troisième fois son fort impact sur le contrôle de la synthèse de FONS.

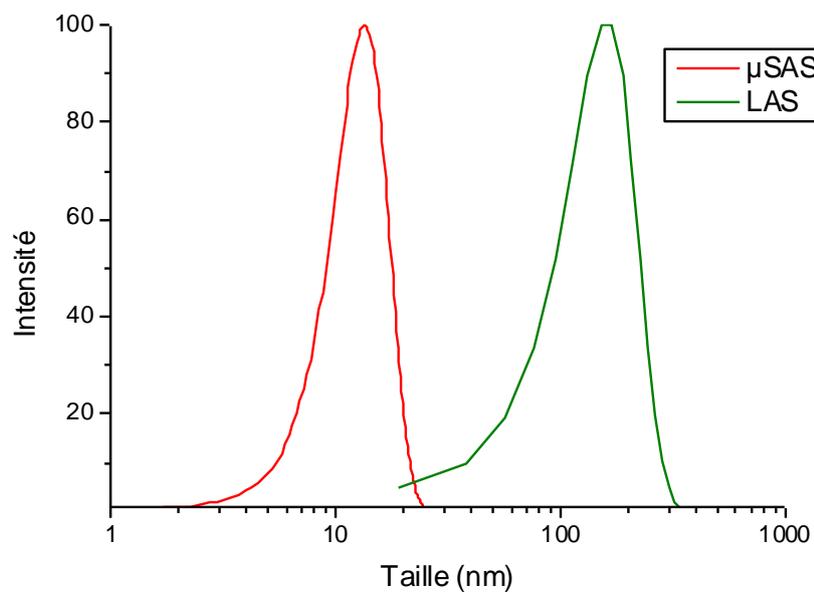


Figure 103 : Distributions en taille des particules de NZX-tBu obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert).

4.5 Le Pérylène

Le Pérylène est une molécule potentiellement utilisable pour des applications biomédicales (Alvino et al., 2007; Zhou et al., 2021). Ce composé a été commandé chez Sigma.

La taille des particules de Pérylène, dont nous donnons la structure moléculaire, impacte sur sa biodisponibilité (Figure 104). Le procédé μ SAS est proposé comme une solution à apporter à ce problème.

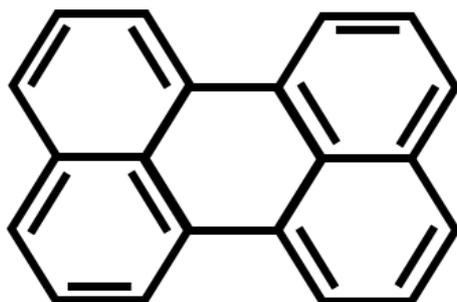


Figure 104 : Structure moléculaire du Pérylène.

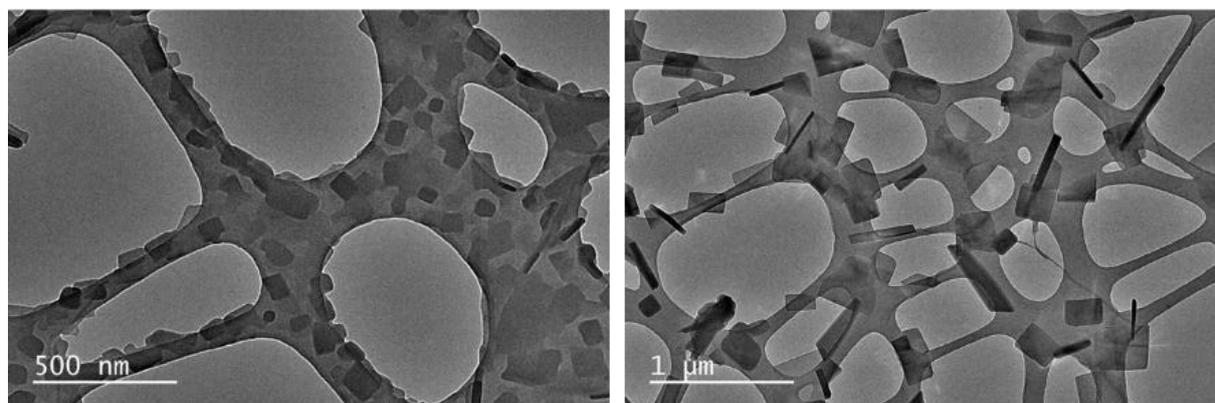
4.5.1 μ SAS

Une concentration de 0,25 mg/mL de Pérylène dans du THF est préparée. Cette concentration relativement faible a été choisie sous la contrainte de problèmes de bouchons répétitifs dans la micro-puce à de plus grandes concentrations. Les conditions opératoires utilisées pour la mise en forme du Pérylène par μ SAS sont résumées dans le tableau 18.

 Tableau 18 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de Pérylène par μ SAS.

T (°C)	P (bar)	[Pérylène] (mg/mL)	Débit CO ₂ (mL/min)	Débit THF (mL/min)	% CO ₂	Taille (nm)
40	100	0,25	8	0,44	98 %	74 ± 26

Contrairement aux trois premières molécules, il ne nous a pas été possible d'atteindre la même taille de particule. Cependant, les particules de Pérylène obtenues sont inférieures à 100 nm, ce qui reste un bon résultat pour une application biologique (Figure 105). En plus de la variation en taille, nous observons que le Pérylène présente une morphologie différente : des plaquettes remplacent les sphères obtenues pour les précédentes molécules.


 Figure 105 : Images TEM de Pérylène mis en forme par μ SAS.

Pour constituer les distributions en taille, nous mesurons les diagonales des particules. La distribution en taille est plus large que dans les cas précédents, notamment à cause de cette nouvelle morphologie (Figure 106). La mise en forme du Pérylène par μ SAS montre des populations de tailles hétérogènes. Ce résultat est semblable à ceux observés à l'issue du LAS et peut laisser croire que l'étape de nucléation est lente, malgré les débits importants imposés dans le procédé μ SAS. Notons que le microréacteur coaxial devrait permettre d'éviter ces difficultés techniques et il nous sera alors possible de procéder à des expériences à plus hautes concentrations.

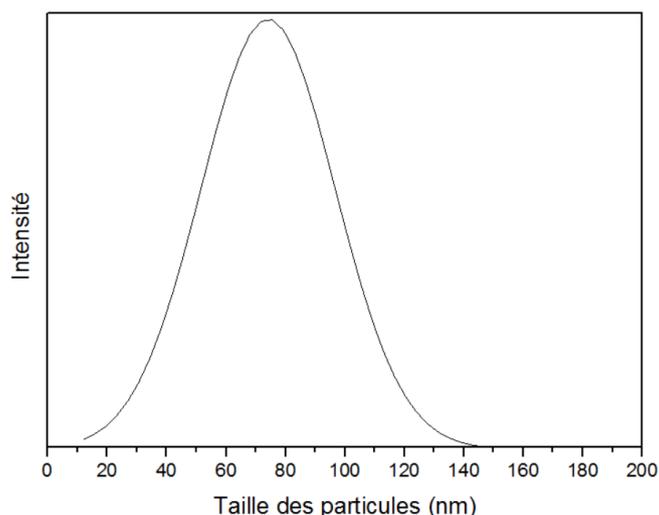


Figure 106 : Distribution en taille de Pérylène mis en forme par μ SAS.

L'analyse des spectres de fluorescence du Pérylène avant et après mise en forme par μ SAS montre une légère variation (Figure 107). Les épaulements à 570 nm et à 650 nm sont déformés. Ceci peut être expliqué par la taille et la morphologie des particules formant la poudre. Tout comme pour le BZX, la structure cristalline de la poudre peut expliquer cette déformation du spectre d'émission.

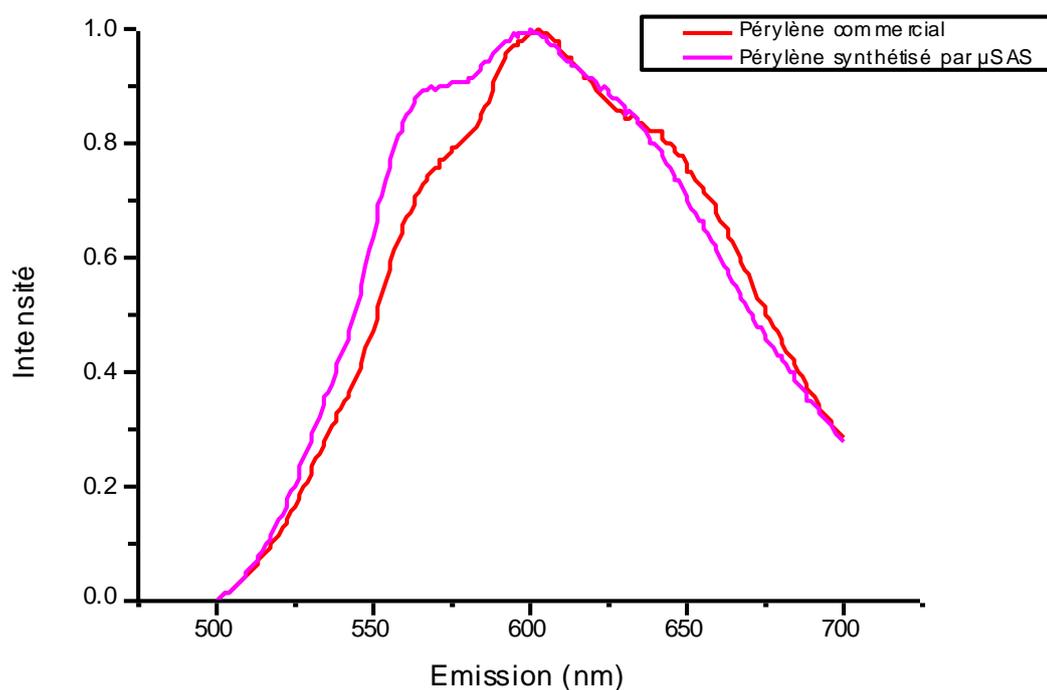


Figure 107 : Spectres d'émission de Pérylène.

4.5.2 LAS

Le procédé LAS, aux conditions présentées dans le tableau 19, a permis de récolter une grande quantité de poudre. Celle-ci a été caractérisée par différentes images de microscopies électroniques (Figure 108 et Tableau 19).

Tableau 19 : Conditions opératoires des expériences de mise en forme de Pérylène par LAS.
Taille mesurée à partir des images TEM.

T (°C)	[Pérylène] (mg/mL)	Fraction molaire en H ₂ O	Taille (nm)	
40	0,25	98 %	205	± 120

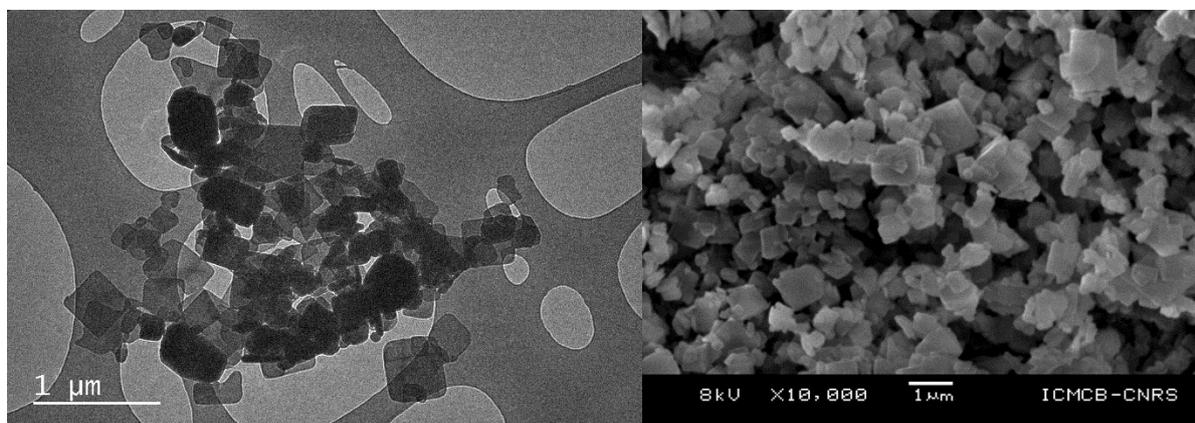


Figure 108 : Images TEM (gauche) et SEM (droite) de Pérylène à la suite d'une mise en forme par LAS.

Dans ce cas particulier, les particules mesurées par microscopie électronique sont de tailles relativement élevées (≈ 200 nm). Ceci nous permet de caractériser ces particules par une méthode plus simple et plus rapide : la DLS. Les particules récoltées sur le filtre sont dispersées dans de l'eau déionisée, milieu dans lequel les nanoparticules de Pérylène ne sont pas solubles. La distribution en taille caractérisée par DLS est présentée dans la figure suivante.

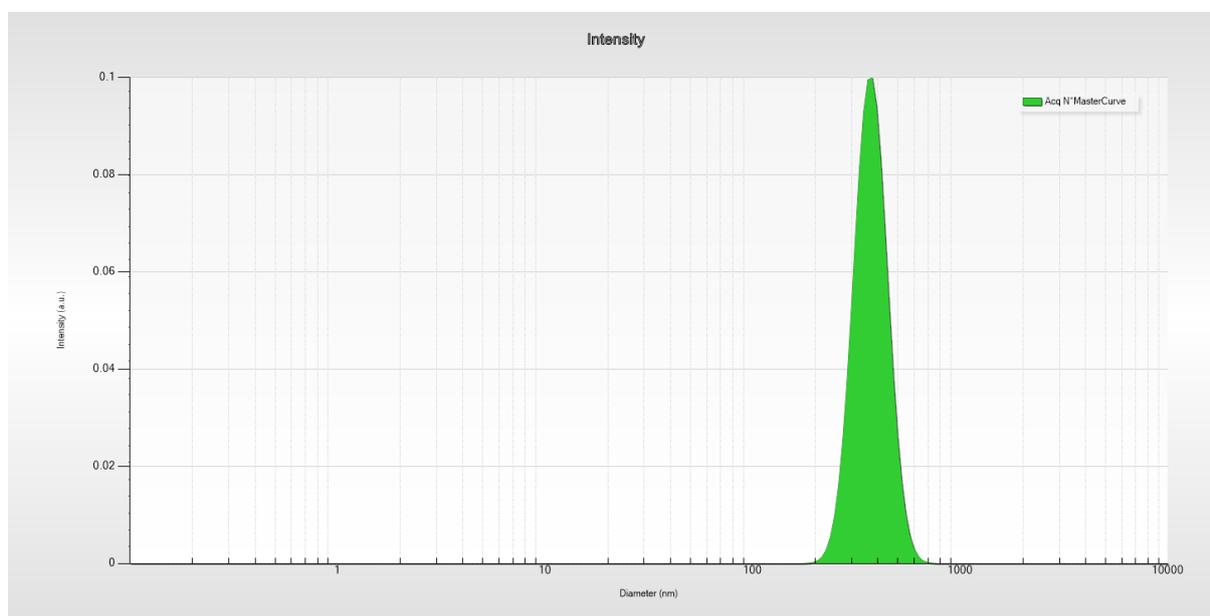


Figure 109 : Distribution en taille de Pérylène mis en forme par LAS (DLS).

La DLS donne une distribution en taille centrée à 375 nm. Cette taille est plus importante que celle observée par microscopie électronique, car la DLS donne le rayon hydrodynamique d'une particule supposée sphérique. La caractérisation par DLS donne ainsi une valeur surestimée de la taille des particules. Quand cela est possible, nous privilégions les mesures obtenues par TEM que par DLS. Pour

la quatrième fois, nous remarquons un décalage très marqué concernant la taille des particules synthétisées par les deux procédés.

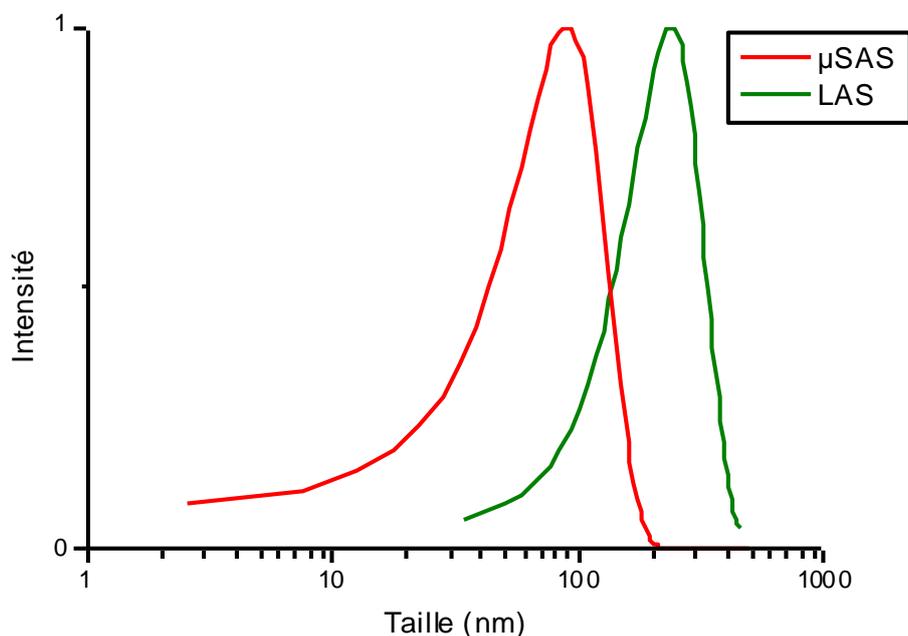


Figure 110 : Distributions en taille des particules de Pérylène obtenues par μ SAS (rouge) et par LAS (vert) (mesures obtenues par TEM).

Enfin, le Pérylène est un candidat idéal pour montrer les performances de productivité du microréacteur coaxial. Avec ce nouveau réacteur, il nous est possible d'augmenter la concentration, ce qui serait une première étape dans le but de diminuer la taille des particules. Ainsi, ces résultats pourraient améliorer l'efficacité des systèmes biochimiques utilisant le Pérylène.

4.6 Discussions sur la taille des FONs par μ SAS

En conclusion de cette première partie, nous souhaitons discuter des tailles des FONs obtenus par μ SAS. Parmi les quatre systèmes étudiés, le Pérylène se distingue avec une taille moyenne de 80 nm, tandis que la mise en forme des trois autres molécules donne des tailles inférieures à 20 nm. Afin de comprendre cette différence de taille, nous pouvons questionner les mécanismes fondamentaux régissant les phénomènes de nucléation/précipitation des FONs : l'hydrodynamique et la thermodynamique. Concernant l'hydrodynamique, les conditions de mélange (débits internes et externes) et la géométrie du micro-mélangeur sont identiques pour les quatre cas étudiés. Donc, l'hydrodynamique ne peut être la raison de cette variation en taille entre le Pérylène et les trois autres composés. La thermodynamique, quant à elle, est liée à la solubilité du composé dans le CO_2 . Une étude spectroscopique du système {Pérylène/THF/ CO_2 } pourrait peut être montrer une plus forte solubilité du Pérylène dans le CO_2 , qui engendrerait une croissance des particules, expliquant ainsi les grandes tailles des plaquettes de Pérylène produites. Une autre hypothèse également liée à la thermodynamique concerne la valeur de tension de surface des particules de Pérylène dans le fluide supercritique qui pourrait être plus élevée qu'avec les trois autres systèmes. Là encore, il serait nécessaire de mesurer la solubilité du Pérylène dans le mélange {THF/ CO_2 } afin d'évaluer numériquement la tension de surface et la comparer aux systèmes précédents (TPE et BZX).

4.7 Comparatif résumé des procédés de mise en forme μ SAS et LAS

Les mises en forme par μ SAS des composés organiques ont systématiquement abouti à la formation de nanoparticules de tailles inférieures à 100 nm, et inférieures à 20 nm pour trois des quatre composés testés. Si on transpose cette technologie à des molécules d'intérêt thérapeutique, les préparations médicamenteuses constituées de ces particules de très petite taille pourront acquérir de meilleures solubilités dans les milieux biologiques. Ainsi, ces nouvelles formulations permettront d'augmenter la biodisponibilité du traitement et son efficacité.

En comparaison, la figure suivante montre bien la robustesse du procédé μ SAS face à une précipitation par voie liquide. Les tailles des particules récoltées à la suite du LAS ne sont pas homogènes et elles sont très importantes (jusqu'à plusieurs microns de diamètre). Le μ SAS apparaît alors l'outil idéal pour les applications pharmacologiques qui nécessitent l'emploi de nanoparticules organiques.

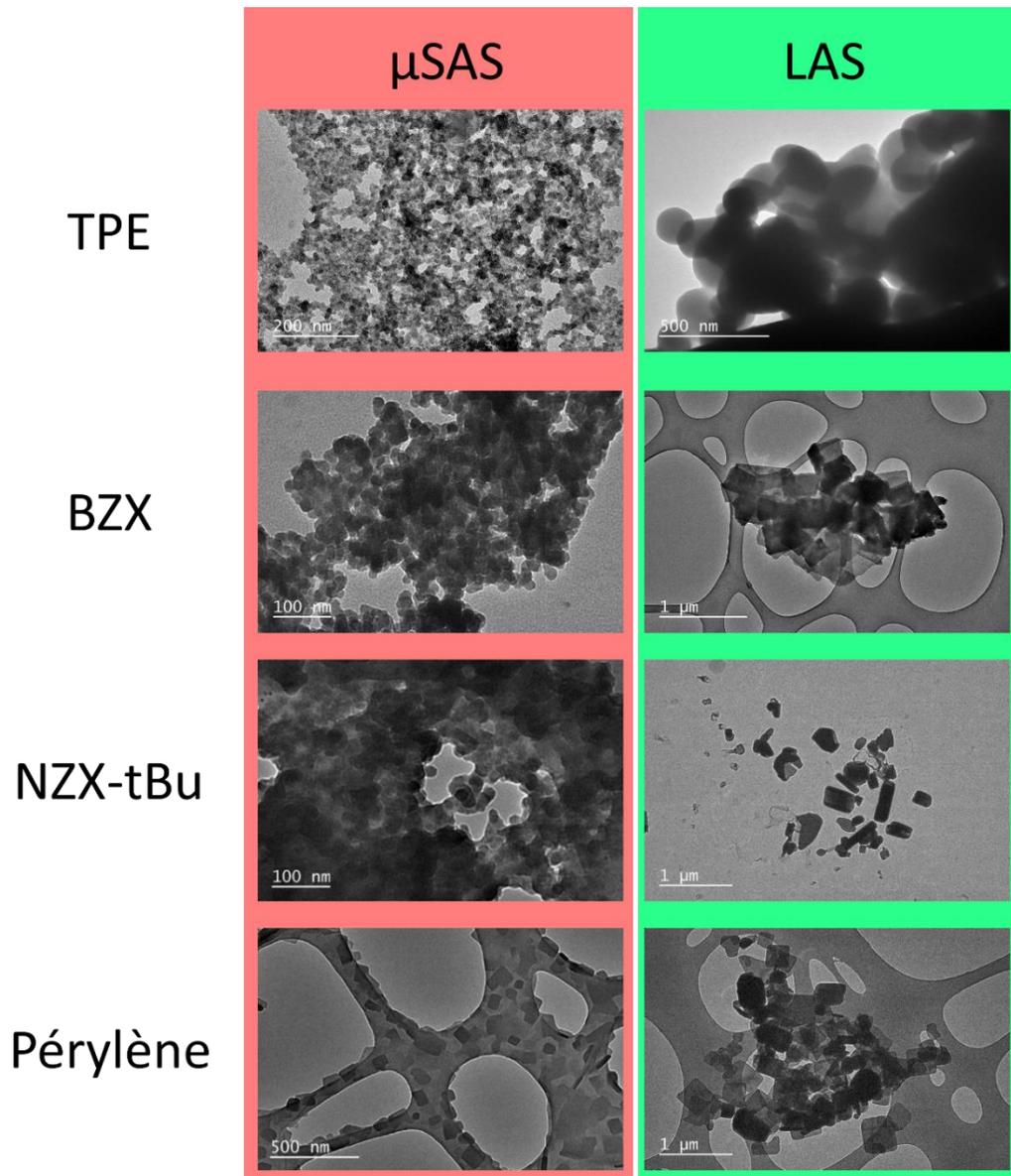


Figure 111 : Images TEM des différents composés mis en forme par μ SAS et LAS.

4.8. Synthèses μ SAS avec le microréacteur coaxial pour le μ SAS

Nous avons vu dans le chapitre précédent que le μ SAS permettait de synthétiser des particules très petites et de taille homogène en distribution. Cependant, un système des procédés comme le μ SAS se doit de produire en grande quantité. Cette partie présente un nouveau système de mise en forme de FONS, présenté en détails dans le chapitre 2. L'objectif ici est d'augmenter le rendement massique du produit en simplifiant au maximum le montage expérimental tout en maintenant une production de poudres de petites tailles (Figure 112). L'injecteur de la solution, de diamètre interne de $100\ \mu\text{m}$, est placé dans un tube de diamètre interne de $500\ \mu\text{m}$ dans lequel le CO_2 est injecté. Les débits d'injection pour ce nouveau système sont rappelés dans le tableau 20, le rapport molaire $\text{CO}_2:\text{THF}$ est toujours à 98 %.

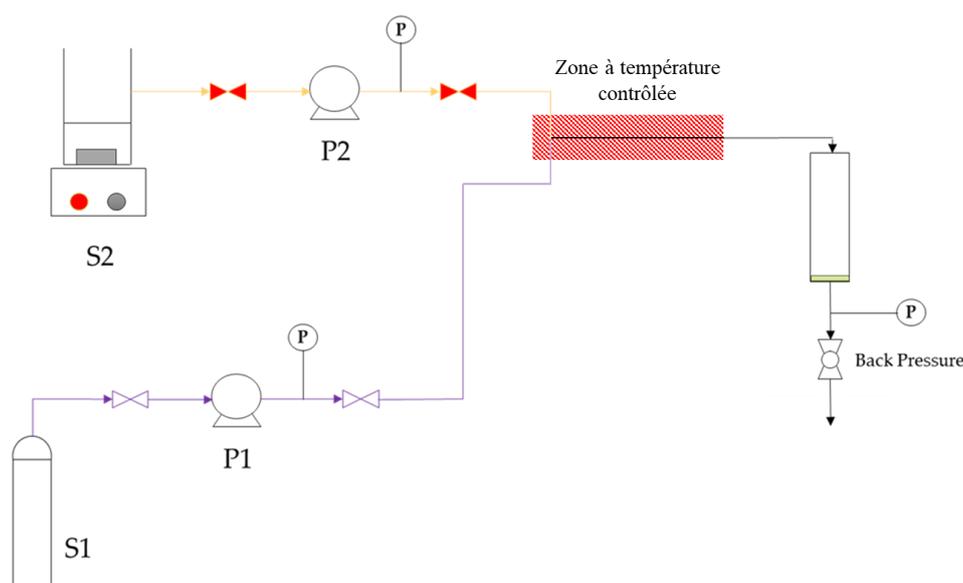


Figure 112 : Schéma du montage expérimental μ SAS avec microréacteur coaxial.
P1, P2 : Pompes ; S1 : Bouteille de CO_2 ; S2 : Solution organique concentrée ; P : Capteur de pression.

Tableau 20 : Conditions opératoires pour le μ SAS utilisant un réacteur coaxial.

Débit interne	Débit externe	Fraction molaire en CO_2
0,2 mL/min	5 mL/min	98 %

Ce réacteur coaxial a été conçu tardivement durant la thèse, c'est pourquoi les quatre premiers composés ont été étudiés principalement sur le système avec la micro-puce. Nous comparons ici les résultats obtenus par les deux systèmes de production de poudres sur les quatre molécules précédemment présentées (Tableau 21).

Tableau 21 : Distributions en taille de plusieurs composés organiques fluorescents mis en forme par μ SAS avec les deux types de microréacteurs.

Soluté	[X] (mg/mL)	Procédé μ SAS	Taille (nm)	
TPE	2	Micro-puce	9	± 4
TPE	2	Coaxial	9	± 5
BZX	0,5	Micro-puce	17	± 5
BZX	0,5	Coaxial	15	± 4
NZX-tBu	1	Micro-puce	15	± 5
NZX-tBu	1	Coaxial	14	± 4
Pérylène	0,25	Micro-puce	74	± 26
Pérylène	0,25	Coaxial	68	± 22

Nous observons que les tailles des particules synthétisées par les deux systèmes de production sont similaires (Figure 113). Ces résultats sont importants car ils montrent que les deux procédés offrent les mêmes performances de mélange avec à la clé des particules de taille très bien contrôlée. Les forts débits introduits dans les systèmes μ SAS sont essentiels pour dépasser la limite en taille présente dans les procédés conventionnels.

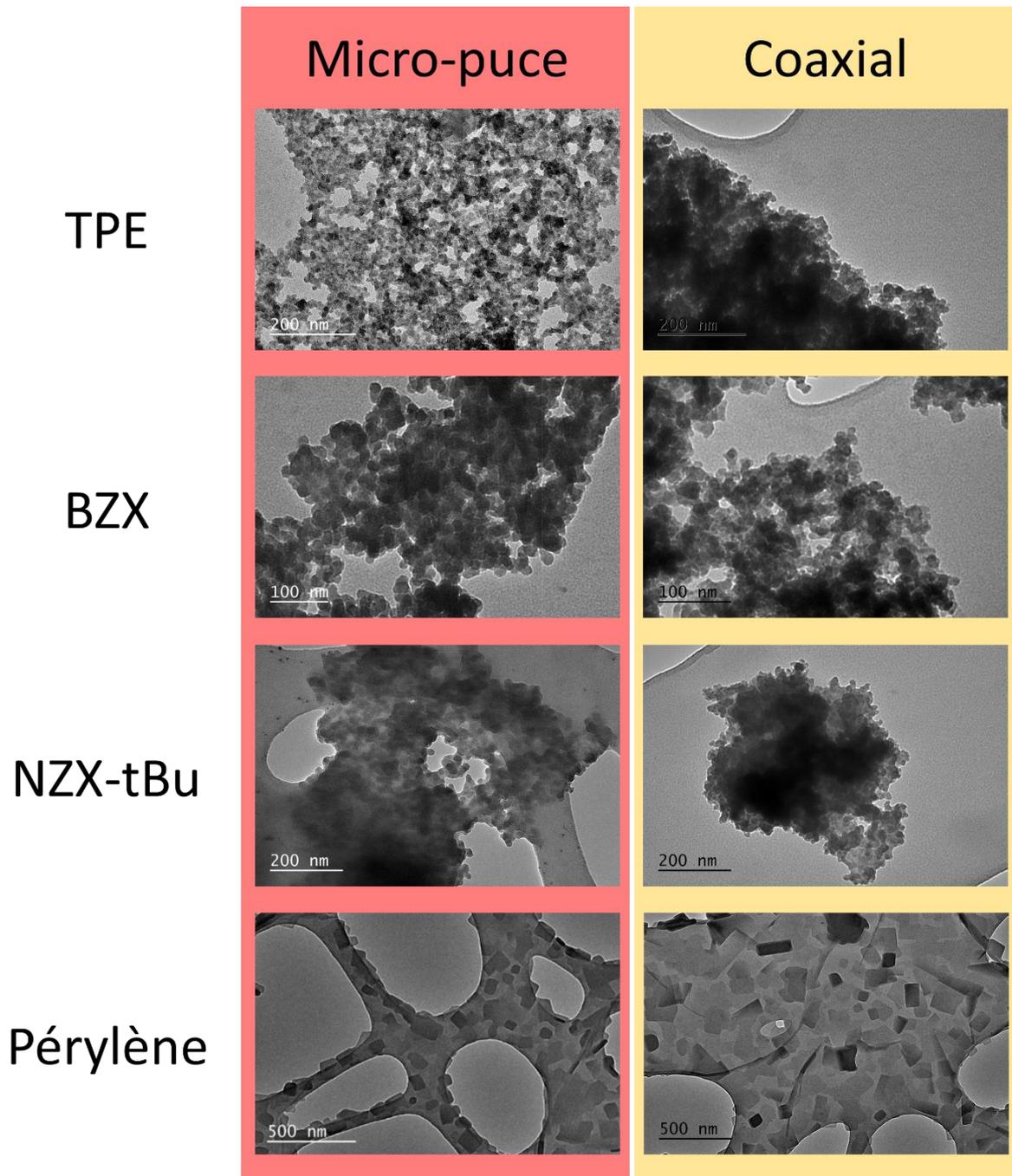


Figure 113 : Images TEM des différents composés mis en forme par μ SAS avec les deux types de microréacteurs.

Dans la suite de ce chapitre, nous ne considérons que le microréacteur coaxial dans le but de produire une plus grande quantité de poudres et améliorer le rendement massique du procédé.

4.9 Application du μ SAS à la mise en forme d'un anticancéreux : la doxorubicine (DOX)

4.9.1 Contexte

Le choix de la dernière molécule testée a été motivé par son grand intérêt pharmaceutique. La doxorubicine (DOX) est un anti-cancéreux utilisé dans le traitement de nombreux cancers des tissus. Cette molécule est employée en médecine depuis les années 1970. Comme pour tout composé

biochimique, la doxorubicine montre une meilleure biodisponibilité si elle est introduite dans le corps humain sous forme de nanoparticules.

La doxorubicine est un anti-cancéreux, car elle participe à l'apoptose des cellules tumorales. En d'autres termes, elle agit au niveau de l'ADN du noyau de la cellule cancéreuse, amorçant la mort de la cellule. La formulation pharmaceutique active est généralement composée de deux éléments :

- Un polymère biodégradable conduisant le principe actif à sa cible : PLA (acide polylactique), PLLA (acide polylactique), PEG (polyéthylène glycol), dextrane, etc.
- Une molécule aux propriétés biochimiques actives incorporée dans la matrice du polymère : la doxorubicine dans notre cas.

Les nanoparticules de doxorubicine sont mélangées à la matrice de polymère, dans laquelle elles s'encapsulent. Cette matrice transporte la doxorubicine jusqu'à la cellule cancéreuse à travers les vaisseaux sanguins (Figure 114). Le principe actif est généralement doté de sites spécifiques en surface permettant sa reconnaissance par la cellule tumorale, favorisant l'étape d'endocytose. Enfin, la doxorubicine diffuse et s'accumule dans le noyau de la cellule ciblée créant une forte activité pro-apoptotique désirée.

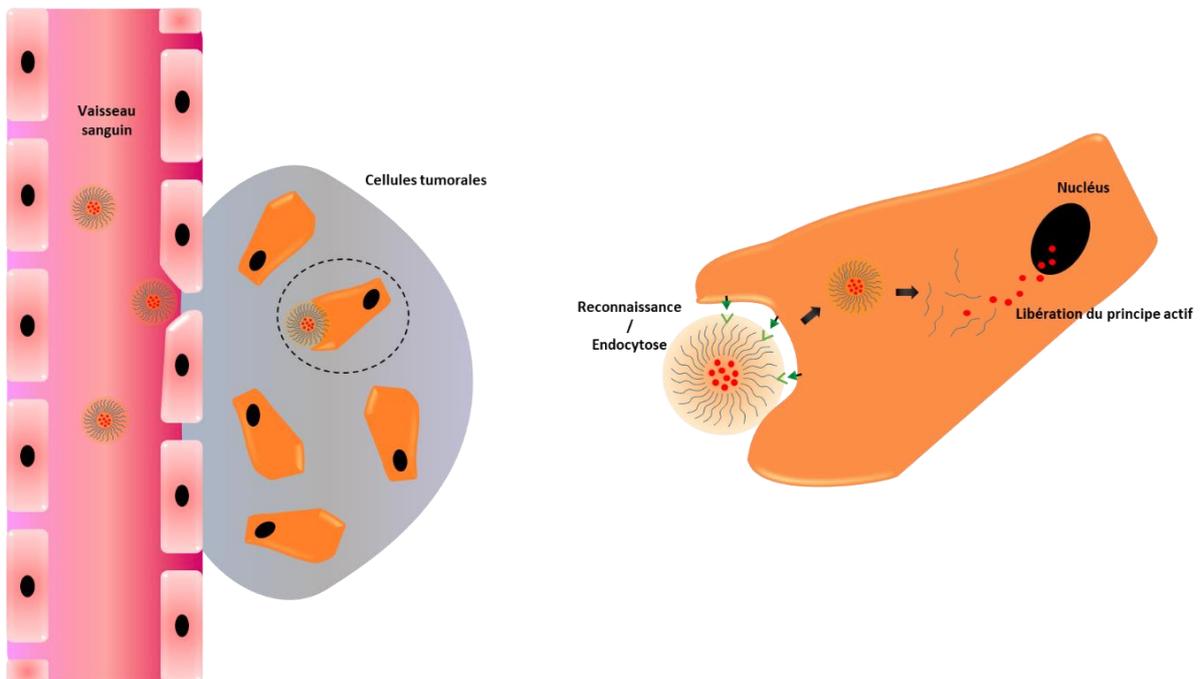


Figure 114 : Illustration du mécanisme de libération d'un principe actif ciblant une cellule cancéreuse.

4.9.2 Mise en forme de la doxorubicine par μ SAS

4.9.2.1 Choix du solvant

Contrairement aux molécules précédentes, le THF n'est pas un assez bon solvant pour solubiliser la doxorubicine. Il a donc été nécessaire de procéder à une étape préliminaire afin de décider du système à étudier (Tableau 22). Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est connu pour être un très bon solvant de la doxorubicine. D'autres solvants organiques ont également été testés (Du et al., 2013; Murakami et al., 2006). Tous les solvants mentionnés dans cette partie ont été commandés chez Sigma. La doxorubicine a été fournie par Carbosynth (UK).

Comme le montre la figure 115, les particules de doxorubicine synthétisées par μ SAS ne sont pas bien définies. Elles sont agrégées et partiellement solubilisées par le solvant, ce qui rend très difficile leur comptage. La haute viscosité du DMSO peut expliquer la mauvaise évacuation de celui-ci par le CO_2 dans le filtre (Tableau 22).

Tableau 22 : Propriétés physico-chimiques des solvants testés.

Solvant	Densité (g/mL)	Viscosité (cP)	Solubilité de la doxorubicine (mg/mL)
DMSO	1,092	1,99	100
Méthanol	0,791	0,54	> 1
Éthanol	0,789	1,07	< 0,1
THF	0,883	0,46	< 0,1
Diméthylformamide (DMF)	0,945	0,79	> 0,2

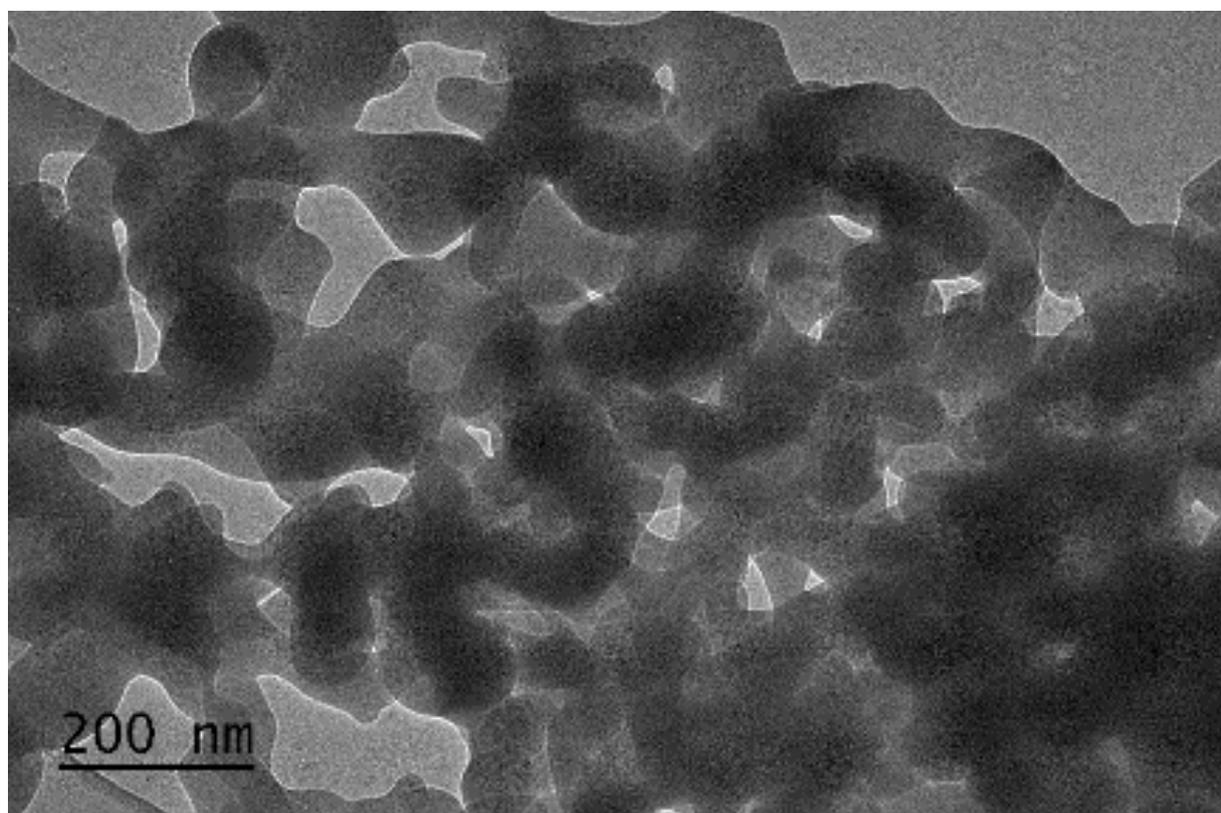


Figure 115 : DOX synthétisée par μ SAS avec du DMSO.

Malgré l'étape finale de séchage au CO_2 , il semble qu'une infime fraction de DMSO reste présente autour des particules de doxorubicine, rendant cet aspect filandrev. Ceci peut s'expliquer en remarquant la haute viscosité du solvant. Pour pallier ce problème, nous choisissons de mélanger le DMSO avec un solvant moins visqueux (Kőrösi et al., 2019). Dans notre cas, nous choisissons de mélanger le DMSO avec l'éthanol.

Les images TEM montrent qu'en effet il est possible d'améliorer la qualité de la poudre récupérée (Figure 116). Cependant, il est encore difficile de mesurer les tailles des particules synthétisées. De

plus, l'ajout d'une fraction d'éthanol dans le mélange réduit drastiquement la solubilité de la doxorubicine.

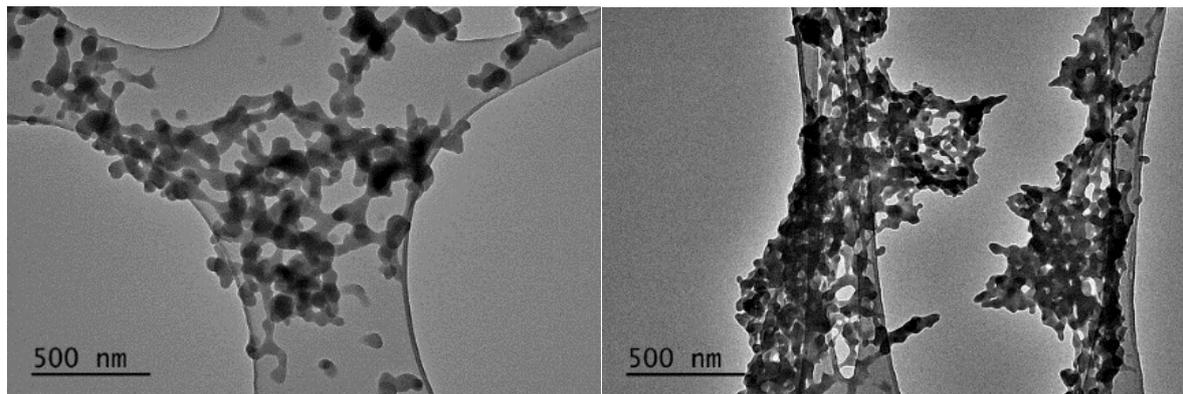


Figure 116 : DOX synthétisée par μ SAS avec différentes fractions volumiques (DMSO:Ethanol) du solvant organique : (a) 1:2 ; (b) 1:10.

Nous avons donc opté pour un autre solvant. Les images suivantes montrent quelques exemples des nombreux solvants qui ont été testés (Figure 117).

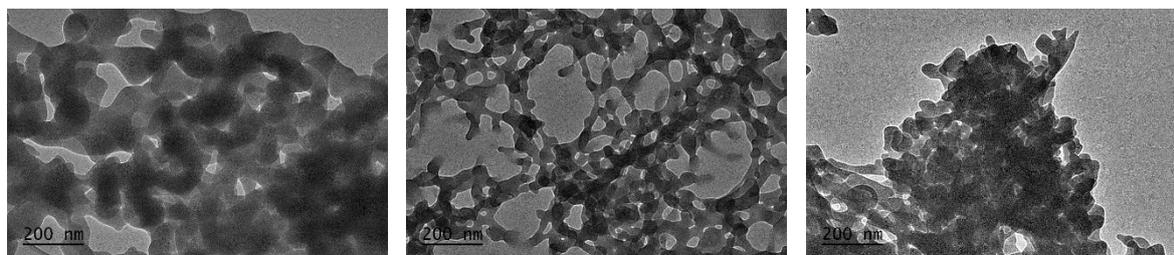


Figure 117 : DOX synthétisée par μ SAS avec différents solvants organiques : (a) DMSO ; (b) Méthanol ; (c) DMF.

Dans le cas du diméthylformamide (DMF), les particules de doxorubicine présentent une meilleure définition sur les images TEM. Leur agglomération s'apparente davantage à ce que nous observions avec les molécules précédentes. De plus, la solubilité de la doxorubicine dans le DMF est acceptable. Nous choisissons donc le DMF comme solvant pour la suite de l'étude.

4.9.2.2 Première mise en forme de la doxorubicine

L'expérience se réalise à 20 °C et 100 bar, coordonnées pour lesquelles le mélange DMF/CO₂ est monophasique comme le montre le diagramme de phase suivant (Figure 118).

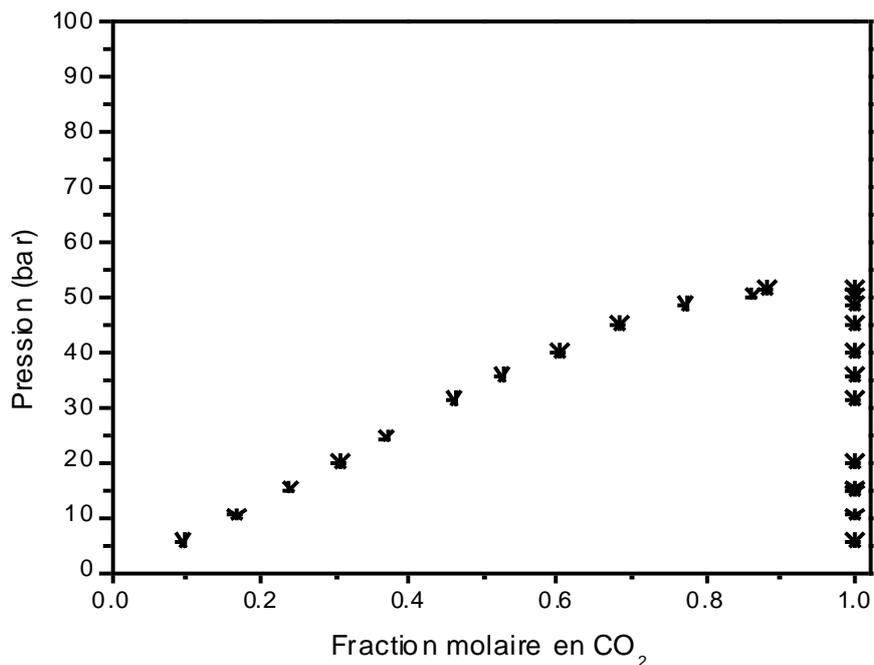


Figure 118 : Diagramme de phase DMF/CO₂ à 20 °C (Duran-Valencia et al., 2001).

Nous réalisons cette première expérience en préparant une solution de DMF concentrée en DOX à 0,2 mg/mL (Tableau 23). Cette valeur de concentration est basée sur de précédents travaux de synthèse de principes actifs à base de doxorubicine (Murakami et al., 2006; Sagnella et al., 2014). Nous nous plaçons dans des conditions nous permettant de bien sécher la poudre à la fin de l'opération (débit de CO₂ à 48 mL/min). Dès lors, les difficultés rencontrées avec les résidus de solvants sont supprimées.

Tableau 23 : Conditions opératoires pour la mise en forme de la DOX par μ SAS.

# Exp	Température	Pression	Concentration solution	Débit interne (solution)	Débit externe (CO ₂)
1	20 °C	100 bar	0,2 mg/mL	0,2 mL/min	48 mL/min

Pour la cinquième fois, il nous est possible d'atteindre de très petites tailles de particules à la suite d'une mise en forme par μ SAS. Les particules récoltées sont très agrégées entre elles, mais leur définition est suffisante pour le comptage. Une taille moyenne de 30 nm est constatée.

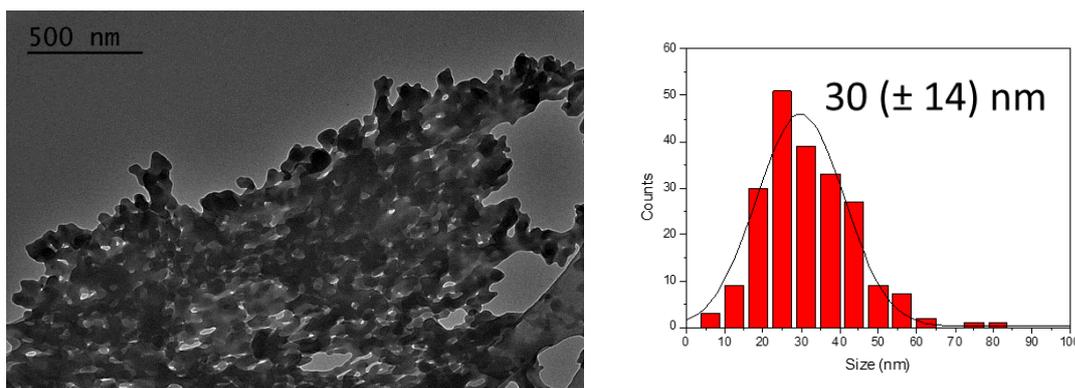


Figure 119 : Image TEM des particules de doxorubicine mises en forme par μ SAS (gauche) et leur distribution en taille (droite).

Ce résultat est très important pour la suite, puisque l'efficacité d'un médicament dépend notamment de la taille des particules du principe actif. Dans notre cas, la faible taille des particules de doxorubicine doit permettre de disperser fortement le médicament. Ceci aura pour effet de promouvoir une meilleure internalisation du principe actif. Le nouveau système μ SAS doté d'un microréacteur coaxial nous a permis de récupérer une plus grande quantité de poudre, comparé au système avec la micro-puce. Pour cette expérience, le rendement de produit s'élève à 20 %, ce qui constitue une première étape dans l'amélioration du procédé μ SAS.

4.9.3 Mise en forme du système DOX+PEG par μ SAS

Nous nous intéressons maintenant à un système plus complexe, en ajoutant comme composé un polymère utilisé dans l'encapsulation de principes actifs : le polyéthylèneglycol (PEG). Dans un premier temps, nous réalisons une mise en forme simple du PEG par μ SAS. Le DMF est un très bon solvant du PEG, nous choisissons une concentration initiale de 4 mg/mL à partir des données de la littérature (Murakami et al., 2006) (Tableau 24).

Tableau 24 : Conditions opératoires pour la mise en forme du PEG par μ SAS.

# Exp	Température	Pression	Concentration solution	Débit interne (solution)	Débit externe (CO ₂)
2	20 °C	100 bar	4 mg/mL	0,2 mL/min	48 mL/min

Après mise en forme par μ SAS, le PEG forme des particules sphériques de quelques dizaines de nanomètres comme nous pouvons l'observer à travers les résultats obtenus par TEM (Figure 121).

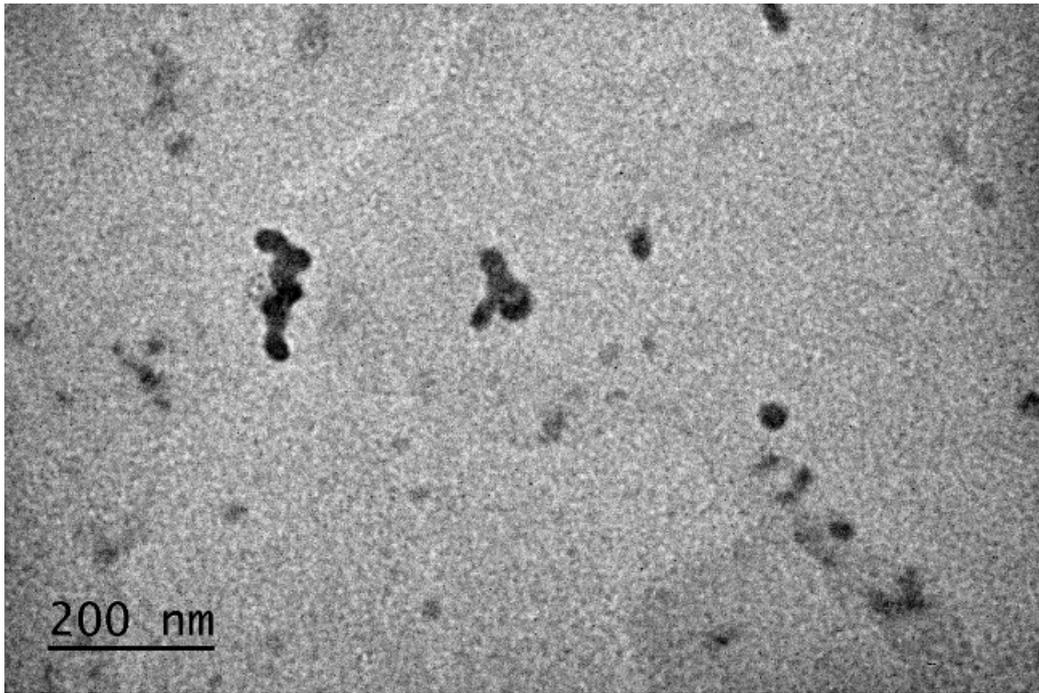


Figure 120 : Synthèse du PEG 5k par μ SAS.

La dernière étape consiste à préparer une solution initiale composée à la fois du PEG et de la DOX. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau 25.

Tableau 25 : Conditions opératoires pour la mise en forme de la DOX et du PEG par μ SAS.

# Exp	Température	Pression	Concentration PEG	Concentration DOX	Débit interne (solution)	Débit externe (CO ₂)
3	20 °C	100 bar	4 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mL/min	48 mL/min

Les images TEM de cette nouvelle synthèse mettent en avant des populations de particules encore jamais observées (Figure 121) :

- Des particules d'environ 5 nm avec une très haute valeur de contraste ;
- Des éléments plutôt sphériques d'une taille de 10 à 20 nm s'apparentant à des tâches faiblement contrastées ;
- Des cubes d'environ 100 nm de côté et possédant un haut degré de cristallinité révélé au champ sombre du TEM.

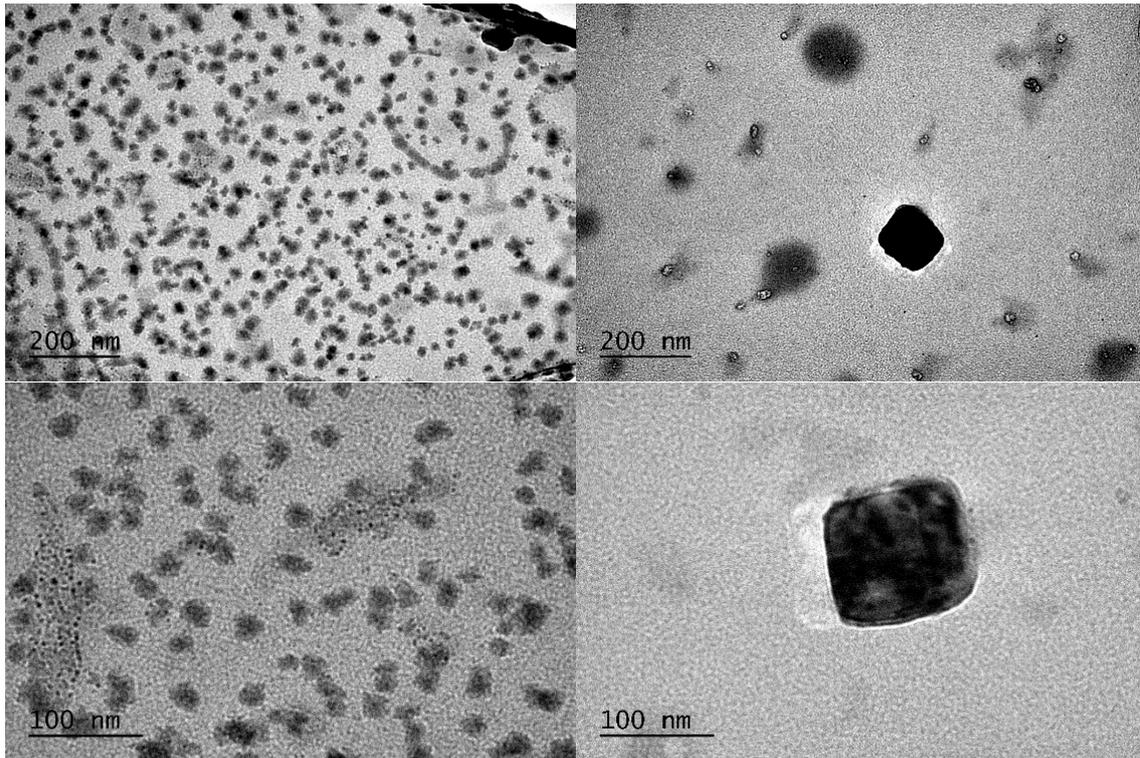


Figure 121 : Synthèse de nanoparticules à partir d'un mélange (DOX+PEG) de différentes zones et à différents grossissements : (haut) x20 000 ; (bas) x50 000.

L'apparition de ces nouvelles morphologies et tailles de particules lors de la synthèse DOX+PEG et l'absence des nanoparticules sphériques obtenues en mettant en forme séparément la DOX et le PEG, met en évidence une différence dans le procédé de précipitation des deux composés dans ces deux cas de figure. En d'autres termes, il est possible que dans le cas de la synthèse DOX+PEG, les deux composés aient des temps de nucléation très différents, dus à des valeurs de solubilités modifiées par la présence d'un second soluté. Ceci a pour répercussion de modifier la taille, et donc la morphologie des particules formées.

Etant donné le haut degré de cristallinité des particules récupérées sur la grille TEM, une étude par diffraction des électrons devra permettre par la suite d'apporter des réponses quant à l'identité des trois types de populations recensés.

La simplification du montage a permis de récolter plus de poudres avec le microréacteur coaxial. Ici encore, nous avons obtenu un rendement plus important que ce qui peut être réalisé avec la micro-puce. Pour cette dernière expérience, le rendement massique s'élève à 18 %. Ce résultat confirme la nécessité à utiliser le microréacteur coaxial pour la production de poudres, tandis que la micro-puce est à privilégier pour les mesures *in situ*.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en pratique le procédé innovant μ SAS pour la mise en forme des FONs. Nous avons sélectionné quatre molécules pour tester l'efficacité du μ SAS en conditions supercritiques. Ces mêmes molécules ont été mises en forme par voie liquide conventionnelle (LAS).

Des analyses par microscopie TEM ont permis de révéler la très faible taille de particules obtenues grâce au μ SAS. Pour les quatre systèmes présentés, il nous a été possible de diminuer drastiquement la taille des particules synthétisées par rapport à une voie conventionnelle de précipitation par anti-solvant liquide. Les propriétés des fluides supercritiques combinées aux qualités de mélange du microréacteur nous ont permis d'atteindre de très petites tailles de particules avec le procédé μ SAS. Une comparaison systématique au procédé LAS a mis en avant l'intérêt du μ SAS dans la synthèse de particules de taille contrôlée.

Enfin, une modification du montage expérimental a permis de récupérer une plus grande quantité de poudre que précédemment. Nous avons montré que ce nouveau système microfluidique doté d'un microréacteur coaxial permet de conserver le contrôle sur la taille des particules créées, tout en augmentant le rendement de production.

Le dernier système étudié est la doxorubicine. Une étude préliminaire a permis de choisir le meilleur solvant pour l'expérience : le DMF. La synthèse de la doxorubicine par μ SAS s'est révélée satisfaisante en mettant en forme des particules d'environ 30 nm. Dans un second temps, un système comportant deux solutés a été créé. Il s'agissait alors de précipiter des particules de doxorubicine et de polyéthylèneglycol préalablement solubilisées dans une même solution. La mise en forme a apporté un résultat inattendu où l'apparition de nouvelles populations de particules a été signalée. Ce résultat a pu être expliqué par la complexité du mécanisme de précipitation pour un système comportant plusieurs solutés. Des analyses de diffraction des électrons permettront de comprendre ce dernier résultat.

Conclusion générale et perspectives

La mise en forme des nanoparticules organiques fluorescentes par un procédé microfluidique supercritique a été au cœur de ces travaux de thèse réalisée dans le cadre du projet ANR SUPERFON. La récente découverte de composés organiques dont la fluorescence à l'état agrégé est plus élevée qu'en solution (effet AIE) offre une plus large palette pour l'imagerie scientifique et médicale. Dans ce contexte, il est intéressant de produire des FONs de petites tailles. Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à atteindre les deux objectifs suivants :

- Le premier a concerné la levée de la limitation en taille des particules synthétisées par voie conventionnelle. Pour cela, nous avons identifié deux stratégies d'intensification de mélange. Tout d'abord, nous avons opté pour une technique de synthèse des composés organiques de petite taille avec un anti-solvant supercritique. Dans ce cadre, nous avons présenté une approche nommée SAS (Supercritical Anti-Solvent) employant le CO₂ (dioxyde de carbone) supercritique comme anti-solvant. Puis, nous avons introduit la technologie microfluidique, un outil développé notamment en biochimie pour la synthèse contrôlée de particules. Ces deux approches nous ont permis d'atteindre des conditions de mélange très favorables à la mise en forme de matériaux. Ce nouveau procédé conçu à l'ICMCB a été nommé μ SAS.
- Le second objectif a visé à bénéficier d'une meilleure compréhension des procédés utilisant des fluides supercritiques comme anti-solvants dans un dispositif microfluidique. La puce haute-pression a été choisie pour réaliser des analyses *in situ*, et grâce à l'effet AIE des composés fluorescents, il nous a été possible de suivre en temps réel la précipitation de ces nanoparticules. La comparaison expérimental/numérique a permis alors de valider et compléter les simulations numériques afin d'affiner la compréhension des phénomènes liés à la précipitation dans notre microréacteur.

La première expérience a été réalisée sur un composé organique fluorescent dit « modèle », le TPE (TétraPhénylÉthylène), avec le THF (TétraHydroFurane) comme solvant et le CO₂ comme anti-solvant. La technique de mesure par spectroscopie infrarouge a été utilisée pour déterminer la solubilité du TPE dans le milieu {THF/CO₂} à haute pression. Celles-ci nous ont permises de déterminer les conditions favorables à la précipitation du soluté en fonction des fractions molaires solvant/anti-solvant. Nous avons utilisé le procédé μ SAS pour la première mise en forme de FONs. Les outils de caractérisation *ex situ* nous ont permis de déterminer expérimentalement une distribution en taille des particules de TPE récupérées. Cette distribution en taille a été associée à celle résultant des travaux de simulation numérique pour obtenir la tension de surface du TPE dans le fluide supercritique, un paramètre très difficile à obtenir expérimentalement.

Un deuxième composé organique fluorescent aux propriétés AIE a été choisi pour visualiser *in situ* la formation des particules fluorescentes avec un microscope confocal. Les travaux expérimentaux ont donné des résultats satisfaisants, corrélant les images observées par le microscope confocal avec celles créées à partir du modèle numérique. Les phénomènes de nucléation et de croissance du composé organique fluorescent ont été discutés à partir des distributions en taille obtenues par simulation et expérimentalement. La confrontation expérience/simulation a montré que les modèles de nucléation primaire et homogène et de croissance par diffusion étaient tout à fait acceptables.

Conclusion générale et perspectives

La robustesse du procédé μ SAS a été testée sur trois différents composés organiques fluorescents (TPE, BZX et NZX-tBu). Leur mise en forme par voie conventionnelle anti-solvant liquide a systématiquement montré des tailles de particules de plus de 100 nm, tandis que celles obtenues par μ SAS ont des tailles inférieures à 20 nm. Dans le cas du Pérylène, il ne nous a pas été possible de descendre en-dessous de 50 nm. La mesure de la solubilité du Pérylène dans le milieu {THF/CO₂} pourrait apporter des informations expliquant cette disparité en taille. En effet, il semble possible que le Pérylène soit partiellement soluble dans le CO₂, rendant finalement ce procédé moins efficace pour ce matériau.

Enfin, une simplification du montage expérimental du μ SAS vers un microréacteur coaxial « tube dans tube » a été appliquée à l'ensemble des poudres déjà étudiées dans la puce microfluidique ainsi qu'à la doxorubicine, une molécule d'un grand intérêt pharmaceutique. Les résultats dans ce système simplifié sont proches de ceux obtenus dans la puce microfluidique et particulièrement prometteurs.

Ces travaux nous amènent à considérer des perspectives à la fois sur le procédé mais également sur l'amélioration de la compréhension des phénomènes de nucléation et de croissance.

Tout d'abord, cette dernière modification de ce procédé plus simple à mettre en œuvre ouvre vers de nouvelles perspectives technologiques :

- Le système coaxial permet l'injection des fluides à des débits plus élevés. Ainsi, il nous est permis d'améliorer l'étape de séchage des poudres et d'augmenter la quantité de poudres récoltées, dans le but d'acquérir de nouvelles caractérisations (taille des particules par DLS, propriétés optiques par photoluminescence).
- Les rendements massiques relativement faibles ($\approx 20\%$) peuvent facilement être améliorés en jouant sur le débit d'injection de la solution ainsi que sur sa concentration initiale. Ces deux paramètres restent donc à optimiser.
- Ces systèmes microfluidiques peuvent être plus évolutifs. En effet, un changement d'échelle de ces tubes semble beaucoup plus simple à réaliser que dans le cas de la puce microfluidique. Par ailleurs, la disposition de plusieurs microréacteurs coaxiaux placés en parallèle permettrait de multiplier la quantité de poudres produites pour une même durée d'opération. Il peut être fait de même avec les filtres de récupération, car ceux-ci peuvent se remplir totalement et créer une surpression dans le système. La duplication de filtres placés en parallèle permet de les vider et récupérer la poudre sans affecter le système. Ceci a pour conséquence d'optimiser le temps de production du procédé μ SAS.

La deuxième perspective concerne l'amélioration de la connaissance des phénomènes de nucléation et de croissance par l'implémentation de méthodes originales de caractérisation *in situ*. En effet, l'outil de caractérisation *in situ* utilisé au cours de cette thèse a présenté une limitation quant à la mesure de la longueur d'onde d'émission des précipités fluorescents. Ainsi, une nouvelle approche expérimentale pourrait être proposée :

- L'emploi de techniques spectroscopiques plus fines comme la FLIM (Figure 122) est une possibilité afin d'obtenir des informations sur la taille des particules formées dans le microréacteur et pour *in fine* mieux comprendre les phénomènes de nucléation et de croissance prédits par la simulation numérique. Ces nouvelles caractérisations par fluorescence pourront par exemple apporter des informations supplémentaires sur la taille (Ito et al., 2015) et sur la cristallinité (Bremond et al., 2020; Ito and Oka, 2019) des particules observées.

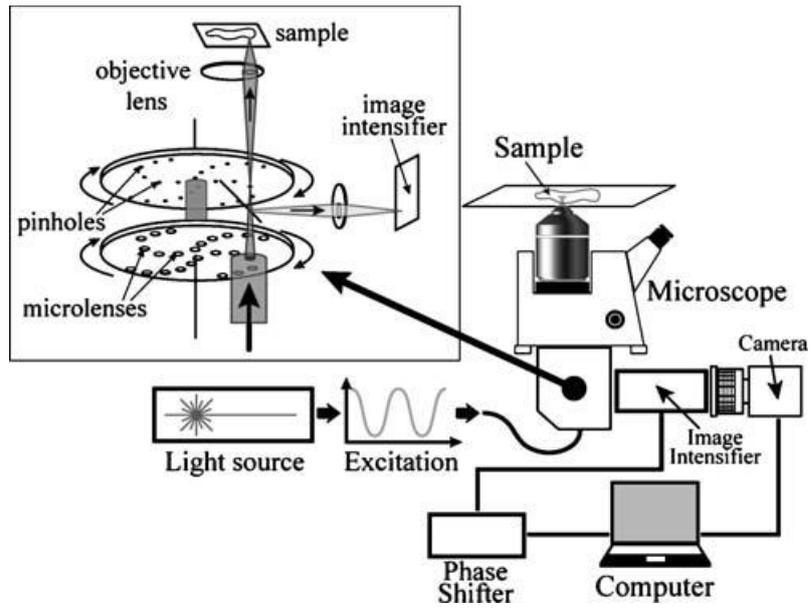


Figure 122 : Montage expérimental d'un microscope confocal associé à la FLIM (Buranachai et al., 2008).

Bibliographie

Bibliographie

- Abuzar, S.M., Hyun, S.-M., Kim, J.-H., Park, H.J., Kim, M.-S., Park, J.-S., Hwang, S.-J., 2018. Enhancing the solubility and bioavailability of poorly water-soluble drugs using supercritical antisolvent (SAS) process. *Int. J. Pharm.* 538, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.041>
- Akimoto, S., Kajimoto, O., 1993. Solvent-induced shift of the Raman spectra in supercritical fluids. *Chem. Phys. Lett.* 209, 263–268. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(93\)80105-X](https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)80105-X)
- Alvino, A., Franceschin, M., Cefaro, C., Borioni, S., Ortaggi, G., Bianco, A., 2007. Synthesis and spectroscopic properties of highly water-soluble perylene derivatives. *Tetrahedron* 63, 7858–7865. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.05.096>
- Amiroudine, S., Caltagirone, J.-P., Erriguible, A., 2014. A Lagrangian–Eulerian compressible model for the trans-critical path of near-critical fluids. *Int. J. Multiph. Flow* 59, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2013.10.008>
- Andreatta, A.E., Florusse, L.J., Bottini, S.B., Peters, C.J., 2007. Phase equilibria of dimethyl sulfoxide (DMSO)+carbon dioxide, and DMSO+carbon dioxide+water mixtures. *J. Supercrit. Fluids* 42, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.12.015>
- Anthony, N.R., Mehta, A.K., Lynn, D.G., Berland, K.M., 2014. Mapping amyloid- β (16-22) nucleation pathways using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Soft Matter* 10, 4162–4172. <https://doi.org/10.1039/C4SM00361F>
- Anton, N., Bally, F., Serra, C.A., Ali, A., Arntz, Y., Mely, Y., Zhao, M., Marchioni, E., Jakhmola, A., Vandamme, T.F., 2012. A new microfluidic setup for precise control of the polymer nanoprecipitation process and lipophilic drug encapsulation. *Soft Matter* 8, 10628. <https://doi.org/10.1039/c2sm25357g>
- Aoki, N., Sato, A., Sasaki, H., Litwinowicz, A.-A., Seong, G., Aida, T., Hojo, D., Takami, S., Adschiri, T., 2016. Kinetics study to identify reaction-controlled conditions for supercritical hydrothermal nanoparticle synthesis with flow-type reactors. *J. Supercrit. Fluids* 110, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.015>
- Arora, D., Sedev, R., Beh, C.C., Priest, C., Foster, N.R., 2020. Precipitation of Drug Particles Using a Gas Antisolvent Process on a High-Pressure Microfluidic Platform. *Ind Eng Chem Res* 9.
- Bakhabkhi, Y., Asif, M., chafidz, A., Ajbar, A., 2013. Supercritical antisolvent synthesis of fine griseofulvin particles. *Adv. Powder Technol.* 24, 1006–1012. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2013.02.004>
- Benz, C., Retzbach, H., Nagl, S., Belder, D., 2013. Protein–protein interaction analysis in single microfluidic droplets using FRET and fluorescence lifetime detection. *Lab. Chip* 13, 2808. <https://doi.org/10.1039/c3lc00057e>
- Beppu, T., Tomiguchi, K., Masuhara, A., Pu, Y.-J., Katagiri, H., 2015. Single Benzene Green Fluorophore: Solid-State Emissive, Water-Soluble, and Solvent- and pH-Independent Fluorescence with Large Stokes Shifts. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 7332–7335. <https://doi.org/10.1002/anie.201502365>

Bibliographie

- Bhatia, S., 2016. Natural Polymer Drug Delivery Systems. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3>
- Bremond, E., Leygue, N., Saffon-Merceron, N., Fery-Forgues, S., 2020. 2-Phenylbenzoxazole derivatives as solid-state fluorescence emitters: Influence of steric hindrance and hydrogen bonding on the optical properties. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 227, 117586. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117586>
- Brunner, G., 1994. Properties of Supercritical and Near-Critical Gases and of Mixtures with Sub- and Supercritical Components, in: *Gas Extraction*. Steinkopff, Heidelberg, pp. 3–57. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07380-3_2
- Buranachai, C., Kamiyama, D., Chiba, A., Williams, B.D., Clegg, R.M., 2008. Rapid Frequency-Domain FLIM Spinning Disk Confocal Microscope: Lifetime Resolution, Image Improvement and Wavelet Analysis. *J. Fluoresc.* 18, 929–942. <https://doi.org/10.1007/s10895-008-0332-3>
- Campardelli, R., Adami, R., Reverchon, E., 2012. Preparation of Stable Aqueous Nanodispersions of β -Carotene by Supercritical Assisted Injection in a Liquid Antisolvent. *Procedia Eng.* 42, 1493–1501. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.542>
- Champeau, M., Thomassin, J.-M., Jérôme, C., Tassaing, T., 2016. Solubility and Speciation of Ketoprofen and Aspirin in Supercritical CO₂ by Infrared Spectroscopy. *J. Chem. Eng. Data* 61, 968–978. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00812>
- Chang, S.-C., Lee, M.-J., Lin, H.-M., 2008. Role of phase behavior in micronization of lysozyme via a supercritical anti-solvent process. *Chem. Eng. J.* 139, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.12.008>
- Charpentier, P.A., Jia, M., Lucky, R.A., 2008. Study of the RESS Process for Producing Beclomethasone-17,21-Dipropionate Particles Suitable for Pulmonary Delivery. *AAPS PharmSciTech* 9, 39–46. <https://doi.org/10.1208/s12249-007-9004-x>
- Chen, S., Wang, H., Hong, Y., Tang, B.Z., 2016. Fabrication of fluorescent nanoparticles based on AIE luminogens (AIE dots) and their applications in bioimaging. *Mater. Horiz.* 3, 283–293. <https://doi.org/10.1039/C6MH00060F>
- Chen, Y., Lam, J.W.Y., Kwok, R.T.K., Liu, B., Tang, B.Z., 2019. Aggregation-induced emission: fundamental understanding and future developments. *Mater. Horiz.* 6, 428–433. <https://doi.org/10.1039/C8MH01331D>
- Chronopoulou, L., Sparago, C., Palocci, C., 2014. A modular microfluidic platform for the synthesis of biopolymeric nanoparticles entrapping organic actives. *J. Nanoparticle Res.* 16, 2703. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2703-9>
- Cormode, D.P., Jarzyna, P.A., Mulder, W.J.M., Fayad, Z.A., 2010. Modified natural nanoparticles as contrast agents for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.005>
- Couto, R., Chambon, S., Aymonier, C., Mignard, E., Pavageau, B., Erriguible, A., Marre, S., 2015. Microfluidic supercritical antisolvent continuous processing and direct spray-coating of poly(3-hexylthiophene) nanoparticles for OFET devices. *Chem. Commun.* 51, 1008–1011. <https://doi.org/10.1039/C4CC07878K>

- Crespo-Otero, R., Li, Q., Blancafort, L., 2019. Exploring Potential Energy Surfaces for Aggregation-Induced Emission—From Solution to Crystal. *Chem. – Asian J.* 14, 700–714. <https://doi.org/10.1002/asia.201801649>
- Cuadra, I.A., Zahran, F., Martín, D., Cabañas, A., Pando, C., 2019. Preparation of 5-fluorouracil microparticles and 5-fluorouracil/poly(l-lactide) composites by a supercritical CO₂ antisolvent process. *J. Supercrit. Fluids* 143, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.027>
- Day, C.-Y., Chang, C.J., Chen, C.-Y., 1996. Phase equilibrium of ethanol+ CO₂ and acetone+ CO₂ at elevated pressures. *J. Chem. Eng. Data* 41, 839–843.
- De Marco, I., Rossmann, M., Prosapio, V., Reverchon, E., Braeuer, A., 2015. Control of particle size, at micrometric and nanometric range, using supercritical antisolvent precipitation from solvent mixtures: Application to PVP. *Chem. Eng. J.* 273, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.100>
- Dev, S., Iyer, K.S., Raston, C.L., 2011. Nanosized drug formulations under microfluidic continuous flow. *Lab. Chip* 11, 3214. <https://doi.org/10.1039/c1lc20666d>
- Djerafi, R., Masmoudi, Y., Crampon, C., Meniai, A., Badens, E., 2015. Supercritical anti-solvent precipitation of ethyl cellulose. *J. Supercrit. Fluids* 105, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.033>
- Djerafi, R., Swanepoel, A., Crampon, C., Kalombo, L., Labuschagne, P., Badens, E., Masmoudi, Y., 2017. Supercritical antisolvent co-precipitation of rifampicin and ethyl cellulose. *Eur. J. Pharm. Sci.* 102, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.016>
- Dolgoplova, E.A., Moore, T.M., Ejegbavwo, O.A., Pellechia, P.J., Smith, M.D., Shustova, N.B., 2017. A metal–organic framework as a flask: photophysics of confined chromophores with a benzylidene imidazolinone core. *Chem. Commun.* 53, 7361–7364. <https://doi.org/10.1039/C7CC02253K>
- Dolgoplova, E.A., Moore, T.M., Fellows, W.B., Smith, M.D., Shustova, N.B., 2016. Photophysics of GFP-related chromophores imposed by a scaffold design. *Dalton Trans.* 45, 9884–9891. <https://doi.org/10.1039/C5DT05063D>
- Du, Y.-Z., Li, Feng, Yu, Hu, F.-Q., Yuan, H., He, S., Jiang, S.P., Lu, X.-Y., 2013. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *Int. J. Nanomedicine* 3141. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47708>
- Duran-Valencia, C., Valtz, A., Galicia-Luna, L.A., Richon, D., 2001. Isothermal Vapor–Liquid Equilibria of the Carbon Dioxide (CO₂)–N,N-Dimethylformamide (DMF) System at Temperatures from 293.95 K to 338.05 K and Pressures up to 12 MPa. *J. Chem. Eng. Data* 46, 1589–1592. <https://doi.org/10.1021/je010055w>
- Fontana, F., Ferreira, M.P.A., Correia, A., Hirvonen, J., Santos, H.A., 2016. Microfluidics as a cutting-edge technique for drug delivery applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 34, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.010>
- Fontana, F., Figueiredo, P., Zhang, P., Hirvonen, J.T., Liu, D., Santos, H.A., 2018. Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 131, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.05.002>
- Fortt, R., 2020. Extractive crystallization of cabotegravir in droplet-based microfluidic devices. *J. Cryst. Growth* 8.

Bibliographie

- Fu, H.-B., Yao, J.-N., 2001. Size Effects on the Optical Properties of Organic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 1434–1439. <https://doi.org/10.1021/ja0026298>
- Gan, X., Wang, H., Lu, L., Li, H., Wang, K., Kong, L., Li, F., Tian, Y., Wu, J., Zhou, H., 2018. Three new water-soluble fluorescent organic nanoparticles with embedded structure: Structure-activity relationship and two-photon bio-imaging application. *Dyes Pigments* 150, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.11.005>
- Gavoille, T., Panacci, N., Bergeot, G., Marre, S., Aymonier, C., 2019. Microfluidic approaches for accessing thermophysical properties of fluid systems 20.
- Ghoreishi, S.M., Komeili, S., 2009. Modeling of fluorinated tetraphenylporphyrin nanoparticles size design via rapid expansion of supercritical solution. *J. Supercrit. Fluids* 50, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.05.007>
- Gierschner, J., Lürer, L., Milián-Medina, B., Oelkrug, D., Egelhaaf, H.-J., 2013. Highly Emissive H-Aggregates or Aggregation-Induced Emission Quenching? The Photophysics of All-Trans *para*-Distyrylbenzene. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 2686–2697. <https://doi.org/10.1021/jz400985t>
- He, J., Li, C., Ding, L., Huang, Y., Yin, X., Zhang, Junfeng, Zhang, Jian, Yao, C., Liang, M., Pirraco, R.P., Chen, J., Lu, Q., Baldrige, R., Zhang, Y., Wu, M., Reis, R.L., Wang, Y., 2019. Tumor Targeting Strategies of Smart Fluorescent Nanoparticles and Their Applications in Cancer Diagnosis and Treatment. *Adv. Mater.* 31, 1902409. <https://doi.org/10.1002/adma.201902409>
- He, W.Z., Suo, Q.L., Hong, H.L., Li, G.M., Zhao, X.H., Li, C.P., A, S., 2006. Supercritical Antisolvent Micronization of Natural Carotene by the SEDS Process through Prefilming Atomization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 2108–2115. <https://doi.org/10.1021/ie050993f>
- Huerta-Aguilar, C.A., Raj, P., Thangarasu, P., Singh, N., 2016. Fluorescent organic nanoparticles (FONs) for selective recognition of Al³⁺: application to bio-imaging for bacterial sample. *RSC Adv.* 6, 37944–37952. <https://doi.org/10.1039/C6RA01231K>
- Ishikawa-Ankerhold, H.C., 2012. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM 86.
- Ito, F., Oka, N., 2019. Use of Aggregation-Induced Emission for Selective Detection of Phase Transformation during Evaporative Crystallization of Hexaphenylsilole. *Chem. – Asian J.* 14, 755–759. <https://doi.org/10.1002/asia.201801563>
- Ito, F., Sagawa, T., Koshiyama, H., 2015. Fluorescence properties of nanoaggregates of pyrene ammonium derivative and its photoinduced dissolution and reaction in tetrahydrofuran/aqueous solutions. *Res. Chem. Intermed.* 41, 6897–6906. <https://doi.org/10.1007/s11164-014-1786-3>
- Jiang, R., Chen, J., Huang, H., Liu, L., Mao, L., Liu, M., Tian, J., Deng, F., Zhang, X., Wei, Y., 2020. Fluorescent copolymers with aggregation-induced emission feature from a novel catalyst-free three-component tandem polymerization. *Dyes Pigments* 172, 107868. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.107868>
- Kalani, M., Yunus, R., 2011. Application of supercritical antisolvent method in drug encapsulation: a review. *Int. J. Nanomedicine* 6, 1429–1442. <https://doi.org/10.2147/IJN.S19021>
- Kang, X., Zhu, M., 2019. Tailoring the photoluminescence of atomically precise nanoclusters. *Chem. Soc. Rev.* 48, 2422–2457. <https://doi.org/10.1039/C8CS00800K>

- Kasai, H., Nalwa, H.S., Oikawa, H., Okada, S., Matsuda, H., Minami, N., Kakuta, A., Ono, K., Mukoh, A., Nakanishi, H., 1992. A Novel Preparation Method of Organic Microcrystals. *Jpn. J. Appl. Phys.* 31, L1132–L1134. <https://doi.org/10.1143/JJAP.31.L1132>
- Kim, H.M., Jeong, B.H., Hyon, J.-Y., An, M.J., Seo, M.S., Hong, J.H., Lee, K.J., Kim, C.H., Joo, T., Hong, S.-C., Cho, B.R., 2008. Two-Photon Fluorescent Turn-On Probe for Lipid Rafts in Live Cell and Tissue. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 4246–4247. <https://doi.org/10.1021/ja711391f>
- Kim, M.-S., Jin, S.-J., Kim, J.-S., Park, H.J., Song, H.-S., Neubert, R.H.H., Hwang, S.-J., 2008. Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 454–465. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.01.007>
- Knez, Ž., Škerget, M., Ilič, L., Lütge, C., 2008. Vapor–liquid equilibrium of binary CO₂–organic solvent systems (ethanol, tetrahydrofuran, ortho-xylene, meta-xylene, para-xylene). *J. Supercrit. Fluids* 43, 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.07.020>
- Kőrösi, M., Béri, J., Sedon, A., Komka, K., Székely, E., 2019. New vapour-liquid equilibrium data on the ternary system carbon dioxide – methanol – dimethyl sulphoxide. *Fluid Phase Equilibria* 497, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.05.024>
- Kumar, S., Singh, M., Gaur, P., Jou, J.-H., Ghosh, S., 2017. Role of Voluminous Substituents in Controlling the Optical Properties of Disc/Planar-Like Small Organic Molecules: Toward Molecular Emission in Solid State. *ACS Omega* 2, 5348–5356. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00832>
- Kurokawa, N., Yoshikawa, H., Hirota, N., Hyodo, K., Masuhara, H., 2004. Size-Dependent Spectroscopic Properties and Thermochromic Behavior in Poly(substituted thiophene) Nanoparticles. *ChemPhysChem* 5, 1609–1615. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400117>
- Lakowicz, J.R., 2010. Principles of fluorescence spectroscopy, Third edition, corrected at 4. printing. ed. Springer, New York, NY.
- Larkin, P.J., 2018. General Outline for IR and Raman Spectral Interpretation, in: *Infrared and Raman Spectroscopy*. Elsevier, pp. 135–151. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804162-8.00007-0>
- Lazzaroni, M.J., Bush, D., Brown, J.S., Eckert, C.A., 2005. High-Pressure Vapor–Liquid Equilibria of Some Carbon Dioxide + Organic Binary Systems. *J. Chem. Eng. Data* 50, 60–65. <https://doi.org/10.1021/je0498560>
- Li, J., Rodrigues, M., Paiva, A., Matos, H.A., de Azevedo, E.G., 2007. Vapor–liquid equilibria and volume expansion of the tetrahydrofuran/CO₂ system: Application to a SAS-atomization process. *J. Supercrit. Fluids* 41, 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.12.004>
- Li, M., Azad, M., Davé, R., Bilgili, E., 2016. Nanomilling of Drugs for Bioavailability Enhancement: A Holistic Formulation-Process Perspective. *Pharmaceutics* 8, 17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020017>
- Li, Z., Dong, Yongqiang, Mi, B., Tang, Y., Häussler, M., Tong, H., Dong, Yuping, Lam, J.W.Y., Ren, Y., Sung, H.H.Y., Wong, K.S., Gao, P., Williams, I.D., Kwok, H.S., Tang, B.Z., 2005. Structural Control of the Photoluminescence of Silole Regioisomers and Their Utility as Sensitive Regiodiscriminating Chemosensors and Efficient Electroluminescent Materials. *J. Phys. Chem. B* 109, 10061–10066. <https://doi.org/10.1021/jp0503462>

Bibliographie

- Liao, Y., Génot, V., Audibert, J.-F., Pansu, R.B., 2016. In situ kinetics study of the formation of organic nanoparticles by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) along a microfluidic device. *Microfluid. Nanofluidics* 20, 59. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1721-6>
- Luo, J., Xie, Z., Lam, J.W.Y., Cheng, L., Tang, B.Z., Chen, H., Qiu, C., Kwok, H.S., Zhan, X., Liu, Y., Zhu, D., 2001. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole. *Chem. Commun.* 1740–1741. <https://doi.org/10.1039/b105159h>
- Malwade, C.R., Qu, H., 2019. Antisolvent Crystallization of Indomethacin from a Ternary Solvent System with High Productivity, Better Polymorphism, and Particle Size Control. *Org. Process Res. Dev.* 23, 968–976. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00052>
- Markets and Markets, 2019. *Microfluidics Market by Product (Devices, Components (Chips, Sensors, Pump, Valves, and Needles), Application (IVD [POC, Clinical, Veterinary], Research, Manufacturing, Therapeutics), End User and Region - Global Forecast to 2025 [WWW Document]*. URL <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/microfluidics-market-1305.html> (accessed 12.9.20).
- Marre, S., Adamo, A., Basak, S., Aymonier, C., Jensen, K.F., 2010. Design and Packaging of Microreactors for High Pressure and High Temperature Applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 11310–11320. <https://doi.org/10.1021/ie101346u>
- Martín, A., Cocero, M.J., 2004. Numerical modeling of jet hydrodynamics, mass transfer, and crystallization kinetics in the supercritical antisolvent (SAS) process. *J. Supercrit. Fluids* 32, 203–219. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.02.009>
- Mei, J., Huang, Y., Tian, H., 2018. Progress and Trends in AIE-Based Bioprobes: A Brief Overview. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 12217–12261. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14343>
- Mei, J., Leung, N.L.C., Kwok, R.T.K., Lam, J.W.Y., Tang, B.Z., 2015. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chem. Rev.* 115, 11718–11940. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00263>
- Miguel, F., Martín, A., Mattea, F., Cocero, M.J., 2008. Precipitation of lutein and co-precipitation of lutein and poly-lactic acid with the supercritical anti-solvent process. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 47, 1594–1602. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2007.07.008>
- Miguel, F., Martín, A., Gamse, T., Cocero, M.J., 2006. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene Effect of the operating parameters 11.
- Montes, A., Bendel, A., Kürti, R., Gordillo, M.D., Pereyra, C., Martínez de la Ossa, E.J., 2013. Processing naproxen with supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 75, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.12.016>
- Montes, A., Williamson, D., Hanke, F., Garcia-Casas, I., Pereyra, C., Martínez de la Ossa, E., Teipel, U., 2018. New insights into the formation of submicron silica particles using CO₂ as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 133, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.10.013>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R.M., Thanh, N.T.K., 2018. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale* 10, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
- Müller, R.H., Keck, C.M., 2012. Twenty years of drug nanocrystals: Where are we, and where do we go? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.09.012>

- Murakami, T., Fan, J., Yudasaka, M., Iijima, S., Shiba, K., 2006. Solubilization of Single-Wall Carbon Nanohorns Using a PEG–Doxorubicin Conjugate. *Mol. Pharm.* 3, 407–414. <https://doi.org/10.1021/mp060027a>
- Nie, H., Huang, J., 2016. Chapitre 7 : Aggregation-Induced Emission Luminogens (AIEgens) for Non-Doped Organic Light-Emitting Diodes, in: *Aggregation-Induced Emission: Materials and Applications Volume 2*, ACS Symposium Series. pp. 173–198.
- Panagiotou, T., Mesite, S.V., Fisher, R.J., 2009. Production of Norfloxacin Nanosuspensions Using Microfluidics Reaction Technology through Solvent/Antisolvent Crystallization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 1761–1771. <https://doi.org/10.1021/ie800955t>
- Pawley, J.B., Masters, B.R., 2008. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Third Edition. *J. Biomed. Opt.* 13, 029902. <https://doi.org/10.1117/1.2911629>
- Peng, D.-Y., Robinson, D.B., 1976. A New Two-Constant Equation of State. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* 15, 59–64. <https://doi.org/10.1021/i160057a011>
- Pinho, B., Girardon, S., Bazer-Bachi, F., Bergeot, G., Marre, S., Aymonier, C., 2014. A microfluidic approach for investigating multicomponent system thermodynamics at high pressures and temperatures. *Lab. Chip* 14, 3843. <https://doi.org/10.1039/C4LC00505H>
- Qi, Q., Liu, Y., Fang, X., Zhang, Y., Chen, P., Wang, Y., Yang, B., Xu, B., Tian, W., Zhang, S.X.-A., 2013. AIE (AIEE) and mechanofluorochromic performances of TPE-methoxylates: effects of single molecular conformations. *RSC Adv.* 3, 7996. <https://doi.org/10.1039/c3ra40734a>
- Rahim, H., Sadiq, A., 2017. DDDT-140626-aceclofenac-nanocrystals-with-enhanced-in-vitro--in-vivo 2443–2452.
- Reverchon, E., Caputo, G., De Marco, I., 2003. Role of Phase Behavior and Atomization in the Supercritical Antisolvent Precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 6406–6414. <https://doi.org/10.1021/ie0302138>
- Reverchon, E., De Marco, I., Della Porta, G., 2002. Tailoring of nano- and micro-particles of some superconductor precursors by supercritical antisolvent precipitation. *J. Supercrit. Fluids* 23, 81–87.
- Reverchon, E., Della Porta, G., 1999. Production of antibiotic micro- and nano-particles by supercritical antisolvent precipitation. *Powder Technol.* 106, 23–29.
- Reverchon, E., Della Porta, G., De Rosa, I., Subra, P., Letourneur, D., 2000. Supercritical antisolvent micronization of some biopolymers. *J. Supercrit. Fluids* 18, 239–245.
- Rhee, M., Valencia, P.M., Rodriguez, M.I., Langer, R., Farokhzad, O.C., Karnik, R., 2011. Synthesis of Size-Tunable Polymeric Nanoparticles Enabled by 3D Hydrodynamic Flow Focusing in Single-Layer Microchannels. *Adv. Mater.* 23, H79–H83. <https://doi.org/10.1002/adma.201004333>
- Sagnella, S.M., Duong, H., MacMillan, A., Boyer, C., Whan, R., McCarroll, J.A., Davis, T.P., Kavallaris, M., 2014. Dextran-Based Doxorubicin Nanocarriers with Improved Tumor Penetration. *Biomacromolecules* 15, 262–275. <https://doi.org/10.1021/bm401526d>
- Sasaki, S., 2015. The effect of regioisomerism on the solid-state fluorescence of bis(piperidyl)anthracenes: structurally simple but bright AIE luminogens. *J. Mater. Chem. C* 11.

Bibliographie

- Schreml, S., Meier, R.J., Weiß, K.T., Cattani, J., Flittner, D., Gehmert, S., Wolfbeis, O.S., Landthaler, M., Babilas, P., 2012. A sprayable luminescent pH sensor and its use for wound imaging *in vivo*. *Exp. Dermatol.* 21, 951–953. <https://doi.org/10.1111/exd.12042>
- Shen, P., Zhuang, Z., Zhao, Z., Tang, B.Z., 2018. AIEgens based on main group heterocycles. *J. Mater. Chem. C* 6, 11835–11852. <https://doi.org/10.1039/C8TC02956C>
- Sheng, F., Chow, P.S., Dong, Y., Tan, R.B.H., 2014. Preparation of β -carotene nanoparticles by antisolvent precipitation under power ultrasound. *J. Nanoparticle Res.* 16, 2772. <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2772-9>
- Shi, J., Aguilar Suarez, L.E., Yoon, S.-J., Varghese, S., Serpa, C., Park, S.Y., Lüer, L., Roca-Sanjuán, D., Milián-Medina, B., Gierschner, J., 2017. Solid State Luminescence Enhancement in π -Conjugated Materials: Unraveling the Mechanism beyond the Framework of AIE/AIEE. *J. Phys. Chem. C* 121, 23166–23183. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b08060>
- Suzuki, S., Sasaki, S., Sairi, A.S., Iwai, R., Tang, B.Z., Konishi, G., 2020. Principles of Aggregation-Induced Emission: Design of Deactivation Pathways for Advanced AIEgens and Applications. *Angew. Chem.* 132, 9940–9951. <https://doi.org/10.1002/ange.202000940>
- Takebayashi, Y., Sue, K., Furuya, T., Hakuta, Y., Yoda, S., 2014. Near-infrared spectroscopic solubility measurement for thermodynamic analysis of melting point depressions of biphenyl and naphthalene under high-pressure CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 86, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.12.007>
- Tenorio, A., Gordillo, M.D., Pereyra, C.M., Martínez de la Ossa, E.J., 2007. Relative importance of the operating conditions involved in the formation of nanoparticles of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 114–123.
- Thorat, A.A., Dalvi, S.V., 2016. Ultrasound-assisted modulation of concomitant polymorphism of curcumin during liquid antisolvent precipitation. *Ultrason. Sonochem.* 30, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.025>
- Thorat, A.A., Dalvi, S.V., 2014. Particle formation pathways and polymorphism of curcumin induced by ultrasound and additives during liquid antisolvent precipitation. *CrystEngComm* 16, 11102–11114. <https://doi.org/10.1039/C4CE02021A>
- Thorat, A.A., Dalvi, S.V., 2012. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. *Chem. Eng. J.* 181–182, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.044>
- Tong, J., Wang, Y., Mei, J., Wang, J., Qin, A., Sun, J.Z., Tang, B.Z., 2014. A 1,3-Indandione-Functionalized Tetraphenylethene: Aggregation-Induced Emission, Solvatochromism, Mechanochromism, and Potential Application as a Multiresponsive Fluorescent Probe. *Chem. - Eur. J.* 20, 4661–4670. <https://doi.org/10.1002/chem.201304174>
- Tran, V.L., Génot, V., Audibert, J.-F., Prokazov, Y., Turbin, E., Zuschratter, W., Kim, H.-J., Jung, J., Park, S.Y., Pansu, R.B., 2016. Nucleation and growth during a fluorogenic precipitation in a micro-flow mapped by fluorescence lifetime microscopy. *New J. Chem.* 40, 4601–4605. <https://doi.org/10.1039/C5NJ03400K>
- Turki, H., Abid, S., Fery-Forgues, S., El Gharbi, R., 2007. Optical properties of new fluorescent iminocoumarins: Part 1. *Dyes Pigments* 73, 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.01.001>

- Vega Gonzalez, A., Tufeu, R., Subra, P., 2002. High-Pressure Vapor–Liquid Equilibrium for the Binary Systems Carbon Dioxide + Dimethyl Sulfoxide and Carbon Dioxide + Dichloromethane. *J. Chem. Eng. Data* 47, 492–495. <https://doi.org/10.1021/je010202q>
- Volmer, M., Weber, A.Z., 1926. Nucleus Formation in Supersaturated Systems. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 277–301.
- Wahsner, J., Gale, E.M., Rodríguez-Rodríguez, A., Caravan, P., 2019. Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers. *Chem. Rev.* 119, 957–1057. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00363>
- Wang, C., Li, Z., 2017. Molecular conformation and packing: their critical roles in the emission performance of mechanochromic fluorescence materials. *Mater. Chem. Front.* 1, 2174–2194. <https://doi.org/10.1039/C7QM00201G>
- Wang, H., Liu, G., 2018. Advances in luminescent materials with aggregation-induced emission (AIE) properties for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* 6, 4029–4042. <https://doi.org/10.1039/C8TB00674A>
- Wang, Y., Zhang, G., Zhang, W., Wang, X., Wu, Y., Liang, T., Hao, X., Fu, H., Zhao, Y., Zhang, D., 2016. Tuning the Solid State Emission of the Carbazole and Cyano-Substituted Tetraphenylethylene by Co-Crystallization with Solvents. *Small* 12, 6554–6561. <https://doi.org/10.1002/smll.201601516>
- Wang, Z., Zhou, Q., Guo, H., Yang, P., Lu, W., 2018. Determination of water solubility in supercritical CO₂ from 313.15 to 473.15 K and from 10 to 50 MPa by in-situ quantitative Raman spectroscopy. *Fluid Phase Equilibria* 476, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2018.08.006>
- Whitesides, G.M., 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wu, J., Ye, Z., Wang, G., Yuan, J., 2007. Multifunctional nanoparticles possessing magnetic, long-lived fluorescence and bio-affinity properties for time-resolved fluorescence cell imaging. *Talanta* 72, 1693–1697. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.03.018>
- Wu, W.-Y., Su, C.-S., 2017. Modification of solid-state property of sulfasalazine by using the supercritical antisolvent process. *J. Cryst. Growth* 460, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2016.12.017>
- Xu, W., He, L., Xia, Q., Jia, C., Geng, L., Yang, M., Xu, Z., Chen, P., Cheng, Y., Zhao, J., Wang, H., Chen, H., Zhang, Y., Gong, S., Liu, R., 2018. A far-red-emissive AIE active fluorescent probe with large stokes shift for detection of inflammatory bowel disease *in vivo*. *J. Mater. Chem. B* 6, 809–815. <https://doi.org/10.1039/C7TB03168H>
- Xu, X., An, H., Zhang, D., Tao, H., Dou, Y., Li, X., Huang, J., Zhang, J., 2019. A self-illuminating nanoparticle for inflammation imaging and cancer therapy. *Sci. Adv.* 5, eaat2953. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat2953>
- Yadav, U.N., Kumbhar, H.S., Deshpande, S.S., Sahoo, S.K., Shankarling, G.S., 2015. Photophysical and thermal properties of novel solid state fluorescent benzoxazole based styryl dyes from a DFT study. *RSC Adv.* 5, 42971–42977. <https://doi.org/10.1039/C4RA12908C>
- Yamaguchi, M., Ito, S., Hirose, A., Tanaka, K., Chujo, Y., 2017. Control of aggregation-induced emission versus fluorescence aggregation-caused quenching by bond existence at a single site in

Bibliographie

boron pyridinoiminate complexes. *Mater. Chem. Front.* 1, 1573–1579.
<https://doi.org/10.1039/C7QM00076F>

Yang, Z., Chi, Zhihe, Mao, Z., Zhang, Y., Liu, S., Zhao, J., Aldred, M.P., Chi, Zhenguo, 2018. Recent advances in mechano-responsive luminescence of tetraphenylethylene derivatives with aggregation-induced emission properties. *Mater. Chem. Front.* 2, 861–890. <https://doi.org/10.1039/C8QM00062J>

Yole Développement, 2020. Emerging Markets for Microfluidic Applications report.

Yole Développement, 2011. Emerging Markets for Microfluidic Applications report.

Zhang, F., 2019. Supercritical Antisolvent (SAS) Process Intensification through the Use of High Pressure (HP) Microfluidic Mixing. Université de Bordeaux.

Zhang, F., Erriguible, A., Marre, S., 2019a. Investigating laminar mixing in high pressure microfluidic systems. *Chem. Eng. Sci.* 205, 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.03.063>

Zhang, F., Marre, S., Erriguible, A., 2019b. Mixing intensification under turbulent conditions in a high pressure microreactor. *Chem. Eng. J.* 122859. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122859>

Zhang, S., Zhan, S., Zhao, Q., Chen, S., Liu, Z., Deng, J., 2013. Synthesis of poly (l-lactide) in supercritical carbon dioxide with PDMS based stabilizers. *J Polym Res* 9.

Zhao, H., Wang, J.-X., Wang, Q.-A., Chen, J.-F., Yun, J., 2007. Controlled Liquid Antisolvent Precipitation of Hydrophobic Pharmaceutical Nanoparticles in a Microchannel Reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 8229–8235. <https://doi.org/10.1021/ie070498e>

Zhao, X., Wang, W., Zu, Y., Zhang, Y., Li, Y., Sun, W., Shan, C., Ge, Y., 2014. Preparation and characterization of betulin nanoparticles for oral hypoglycemic drug by antisolvent precipitation. *Drug Deliv.* 21, 467–479. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.881438>

Zhou, W., Hou, J., Li, Y., Zhou, H., Huang, H., Zhang, L., Hayat Nawaz, M.A., Yu, C., 2021. Protein discrimination based on DNA induced perylene probe self-assembly. *Talanta* 224, 121897. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121897>

Zu, S., Yang, L., Huang, J., Ma, C., Wang, W., Zhao, C., Zu, Y., 2012. Micronization of Taxifolin by Supercritical Antisolvent Process and Evaluation of Radical Scavenging Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8869–8881. <https://doi.org/10.3390/ijms13078869>

Zu, Y., Sun, W., Zhao, X., Wang, W., Li, Y., Ge, Y., Liu, Y., Wang, K., 2014. Preparation and characterization of amorphous amphotericin B nanoparticles for oral administration through liquid antisolvent precipitation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 53, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.12.005>

Annexes

Annexe 1 : Détails complémentaires

Modes de vibration IR du CO₂

Un état électronique est composé de plusieurs états de vibration qui sont eux-mêmes constitués de plusieurs états rotationnels. Le loin-IR concerne les transitions entre différents niveaux rotationnels, tandis que le moyen IR permet d'observer la transition de l'état fondamental de la molécule $v=0$ vers son premier état excité $v=1$. Enfin, pour le proche IR, la molécule passe de son état fondamental $v=0$ à son second état excité d'énergie vibrationnelle $v=2$.

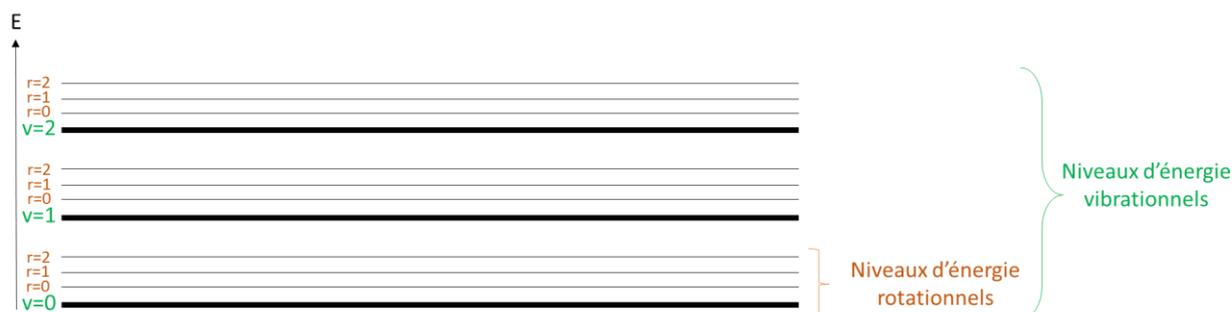


Figure 123 : Niveaux d'énergie vibrationnels et rotationnels d'une molécule

Le nombre d'onde, l'énergie ou la fréquence d'une transition IR dépend principalement de la masse des atomes constituant la liaison chimique observée. Dans le cas d'une molécule diatomique, il n'y a qu'un seul mode vibrationnel correspondant à l'étirement ou à la contraction de la liaison. En revanche, dans le cas d'une molécule poly-atomique, on dénombre plusieurs modes de vibration liés au degré de liberté que possède la molécule. Les mécanismes quantiques n'autorisent que certains déplacements atomiques correspondant à des fréquences bien précises. Dans le cas d'une molécule linéaire à N atomes, on compte $3N - 5$ modes, et $3N - 6$ modes pour une molécule non linéaire. Ces modes sont classifiés en plusieurs catégories. On peut citer par exemple, l'étirement ou la contraction d'une liaison, le « bending » dans le cas de trois atomes liés entre eux par deux liaisons, la déformation hors du plan faisant passer la molécule d'une configuration plane à une géométrie non-planaire.

Dans le cas des fluides supercritiques, le CO₂ est très étudié. Cette molécule linéaire présente alors $3N - 5$ vibrations, c'est-à-dire 4 vibrations. (Amiroudine et al., 2014, p. 2; Brunner, 1994, p. 2; Day et al., 1996, p. 2)

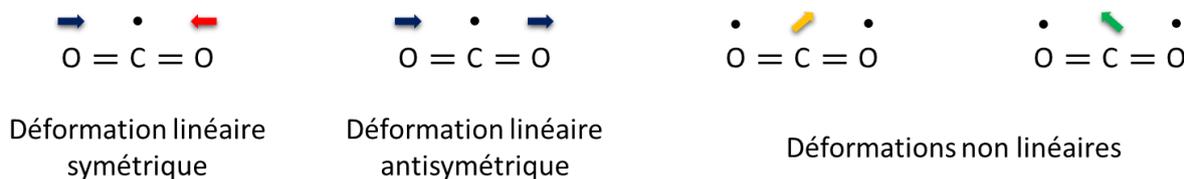


Figure 124 : Modes de vibration du CO₂

Notons également qu'un mode de vibration IR n'est actif que si son moment dipolaire évolue lors de la vibration. Et l'intensité de la bande d'absorption IR dépend du degré de variation du moment dipolaire pendant la vibration (Larkin, 2018; Wang et al., 2018).

Annexe 2 : Process intensification for the synthesis of ultra-small organic nanoparticles with supercritical CO₂ in a microfluidic system



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

Process intensification for the synthesis of ultra-small organic nanoparticles with supercritical CO₂ in a microfluidic system



T. Jaouhari^a, F. Zhang^a, T. Tassaing^b, S. Fery-Forgues^c, C. Aymonier^a, S. Marre^a, A. Erriguible^{a,d,*}

^a CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ICMCB, UMR 5026, F-33600 Pessac Cedex, France

^b CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, ISM, F-33405 Talence Cedex, France

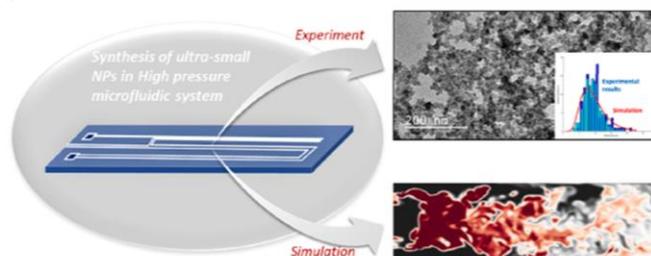
^c SPCMB, UMR CNRS 5068, Université Toulouse III Paul-Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 09, France

^d Bordeaux INP, University of Bordeaux, CNRS, Arts et Metiers Institute of Technology, INRAE, I2M Bordeaux, F-33600 Talence, France

HIGHLIGHTS

- Synthesis of ultra-small organic nanoparticles in high pressure microfluidic systems working under turbulent conditions.
- Determination of solid/supercritical fluid surface tension by coupled numerical/experimental approach.
- Numerical investigation of mixing influence on particle size distribution.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Microfluidic
Supercritical fluid
Nanoparticle synthesis
Numerical simulation
Mixing intensification

ABSTRACT

Submicronization of organic compounds is a challenging requirement for applications in the imaging and pharmaceutical fields. A new Supercritical AntiSolvent process with microreactor (μ SAS) was developed for nanoparticle (NP) synthesis. Tetrahydrofuran (THF) was used to solubilize a model organic molecule, tetraphenylethylene, and supercritical carbon dioxide (sc -CO₂) was used as antisolvent. The solubility of TPE in the THF/CO₂ system was first measured by *in situ* experiments. Then, NPs of TPE were prepared in various experimental conditions and characterized by transmission electron microscopy (TEM). Chosen experimental conditions led to NPs with a mean size of 9 ± 3 nm. Experimental μ SAS results were compared with size distributions obtained by simulation, to obtain surface tension values, which are difficult to access by experiment alone. Simulations coupling Computational Fluid Dynamics (CFD) and Population Balance Equation (PBE) were performed under turbulent conditions in the high pressure microreactors. This coupled experimental and theoretical approach allowed a deep understanding of the μ SAS process and underlined the superior value of this technique for the preparation of NPs.

1. Introduction

Putting pure organic dyes and drugs in the form of nanoparticles

(NPs) is a very efficient way to enhance their solubility, stability and bioavailability, so that these compounds may find a wide range of applications in the fields of imaging, biosensing and medicine [1–4]. It is

* Corresponding author.

E-mail address: erriguible@enscbp.fr (A. Erriguible).

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125333>

Received 27 February 2020; Received in revised form 28 April 2020; Accepted 1 May 2020

Available online 11 May 2020

1385-8947 / © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nomenclature			
B	nucleation rate ($1/(m^3s)$)	p	pressure (Pa)
C	concentration (mol/m^3)	S	supersaturation
D	diffusion coefficient (m^2/s)	T	temperature (K)
g	gravity vector (m/s^2)	t	time (s)
G	growth rate (m/s)	u	velocity vector (m/s)
K_b	Boltzmann constant ($m^2 kg s^{-1} K^{-1}$)	V_m	molecular volume (m^3)
k_g	mass transfer coefficient ($m^4/(mol.s)$)	Greek letters	
L	length of the particles (m)	μ	viscosity (Pa.s)
m_k	k^{th} order moment (m^k/m^3)	σ	surface tension (N/m)
n	particles density function ($1/m^3$)	ρ	density (kg/m^3)
Na	Avogadro number ($1/mol$)	ω	mass fraction

therefore critical to develop advanced processes that allow the preparation of small (*i.e.* less than 50 nm) particles with a narrow size distribution. In this view, supercritical fluids (SCFs) processes [5] offer superior performances compared with conventional techniques, *e.g.* milling [6,7] and solvent evaporation [8,9]. Not only the intrinsic properties of SCFs (*i.e.* liquid-like densities and gas-like viscosities) result in high diffusion coefficients and therefore promote fast mixing, but the operating space is largely extended in terms of pressure and temperature with respect to conventional batch scale processes using liquids. In this context, supercritical carbon dioxide (sc-CO₂) offers distinct advantages for sustainable processes, as it is non-flammable, non-toxic and environmentally friendly. Amongst the myriad of sc-CO₂-based processes, the supercritical antisolvent (SAS) process has been of particular interest for preparing micrometer- [10] and submicrometer-sized [11] particles from various organic materials, such as active pharmaceutical ingredients (APIs) [12] and polymers [13]. The particle morphology and size are affected by experimental parameters like temperature, pressure, molar ratio composition, solution concentration and flow rates, which highlights the importance of the thermo-hydrodynamic phenomena. The general principle consists in mixing a concentrated solution of the compound dissolved in an organic solvent with sc-CO₂, which acts as antisolvent. The solubility of the solute is then dramatically decreased in the final mixture, and this generates high supersaturation, which results in nucleation of the solute. The good solubility of the solute in the organic solvent, its low solubility in sc-CO₂, and the high miscibility of the organic solvent with sc-CO₂ are three essential prerequisites for a successful process. The mixing of the solute solution with sc-CO₂ is a key parameter, because it drives the

supersaturating field. Admittedly, a fast mixing leads to a nucleation burst, resulting in small particles with homogeneous size. In most of the SAS set-ups, sc-CO₂ and the solute solution are co-injected into large high-pressure vessels, previously pressurized with sc-CO₂. The particles thus generated are then recovered continuously on a filter. The main limitations of the current approaches are in the limited control of the operating parameters due to the large size of reactors. Sometimes, this leads to poor reproducibility from batch to batch, attributed to the presence of gradients (temperature, concentration, etc.) that directly affects the thermo-hydrodynamics of the system, and therefore the nucleation and growth processes.

In order to intensify the SAS process, it is highly beneficial to use advanced type of reactors, which allow improved control of the operating parameters. Specifically, because they reduce time and space scales, microfluidic systems have shown their effectiveness in controlling mixing and enhancing the performances of materials synthesis processes [14]. The combination of two ways of intensification, SCFs and microfluidic reactors (μ SAS), can greatly improve the performance and reproducibility of antisolvent processes, as shown in a previous work for conducting organic polymer nanoparticles [15]. More recently, we have proven that turbulent conditions can be achieved in high pressure microfluidic devices [16], resulting in ultra-fast mixing times down to 10^{-4} – 10^{-5} s, highly favorable for synthesizing organic nanoparticles.

In this paper, a coupled numerical/experimental approach was used to explore the μ SAS process used for the preparation of organic nanoparticles. Tetraphenylethylene (TPE) is chosen as a polyaromatic and strongly hydrophobic model compound. This molecule is widely used in

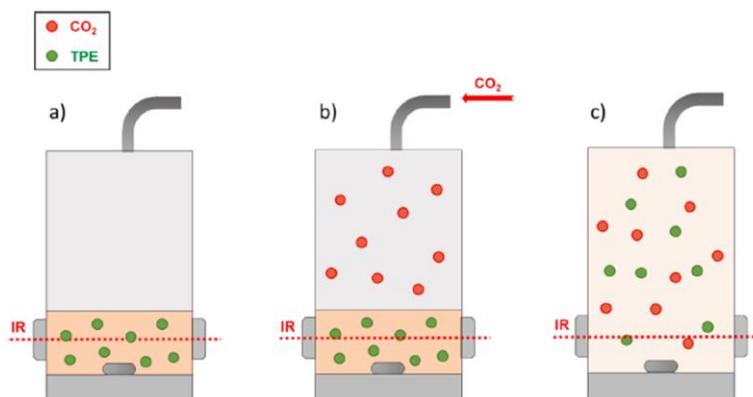


Fig. 1. Schema of the high-pressure optical cell (HPOC). (a) Study of saturated solution of TPE in THF. (b) Pressurization of the cell by CO₂ injection. (c) *In situ* IR measurement of TPE solubility at 40 °C and 100 bar.

the aggregated and NP states [17], and advantage will be taken from its particular fluorescence behavior in a forthcoming work. The synthesis of TPE NPs was achieved with a μ SAS process implemented in a high pressure microreactor, using tetrahydrofuran (THF) and $sc\text{-CO}_2$ as the solvent and antisolvent, respectively. The solubility of TPE in various THF/ $sc\text{-CO}_2$ mixtures was first determined. The size of the synthesized NPs and the size distribution were then estimated using transmission electron microscopy (TEM). In parallel, numerical simulation was used to fit the critical parameter of nucleation, *i.e.* the surface tension (σ), from the experimental results. This parameter is very difficult to measure experimentally. The numerical simulation is based on a high performance computing (HPC) massively parallel code, which takes into account all the coupled physical phenomena (*i.e.* thermodynamics, hydrodynamics, nucleation and growth), for catching all the mixing scale [16]. This coupled experimental/numerical approach allows determining the surface tension with a great confidence for two main reasons. First, the good control of the operating conditions in the microchannel reduces the discrepancies between the “ideal” operating conditions of the simulation, and the experimental ones. Secondly, the reactor dimension and the HPC code allow very precise information about hydrodynamics to be obtained. Indeed, all or almost all the mixing length scales are caught, and so we get rid of the uncertainties related to the estimation of supersaturation. The result is a very deep understanding of the μ SAS process.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

Carbon dioxide was purchased from Messer. Tetrahydrofuran, inhibitor-free, $\geq 99.9\%$, and 1,1,2,2-tetraphenylethylene 98% were purchased from Sigma-Aldrich and used as received.

2.2. High pressure FTIR solubility measurements

As mentioned above, the thermodynamic properties of the $\{\text{CO}_2/\text{solvent/solute}\}$ ternary system are very important in the SAS process. As a first step, the solubility of TPE was measured in various $\text{CO}_2/\text{solvent}$ mixtures, to determine the best operating conditions. To do so, FTIR measurements were carried out under pressure, using a high-pressure optical cell (HPOC) previously described [18] (Fig. 1). The HPOC (internal volume 2.2 mL) was equipped with silicon windows with a path-length of 600 μm . IR beam passed through silicon windows in the top part of HPOC. Four heating cartridges were used to control the cell temperature, while a stirrer bar placed in the bottom of the HPOC ensured a homogenous mix. FTIR measurements were performed through the two silicon windows using a ThermoFisher 6700 FTIR spectrometer (resolution: 4 cm^{-1} , spectral range: 500–6000 cm^{-1}) and analyzed with the OMNIC software.

In a typical measurement, the HPOC was filled under vacuum with a

very concentrated solution of TPE in THF (20 mg of TPE dissolved in 2 mL of THF). The injected solution volume ranged from 0.5 mL to 2.2 mL (total cell volume), depending on the solvent/antisolvent ratio. The cell was then heated up to 40 $^\circ\text{C}$, which was selected as the operating temperature for the final μ SAS experiment, based on the thermodynamic phase behavior of the THF/ CO_2 system. Then, CO_2 (liquefied from the tank through a cryostat set-up at 6 $^\circ\text{C}$) was added into the HPOC using a manual pump (Top Industrie) and the pressure was slowly increased up to 100 bar, a value selected for the same thermodynamic reason as for temperature. The cell was closed and kept under stirring during the measurements. The FTIR spectrum displayed several absorption bands, characteristic from each component of the ternary mixture. Specific bands were selected for each of them. The CO_2 absorption bands at 4950 cm^{-1} corresponds to the combination mode $\nu_1 + 2\nu_2 + \nu_3$ of the bending mode (ν_2), the symmetric (ν_1) and antisymmetric (ν_3) stretching of CO_2 , the THF absorption band located at 1970 cm^{-1} is related to the first overtone of the ring deformation and the TPE absorption band at 1600 cm^{-1} corresponds to the aromatic “quadrant stretching” [19]. The absorbance intensity can be directly linked to molecular concentration through the Beer-Lambert law: $A = \epsilon Lc$, where A is the sample absorbance; ϵ is the molar extinction coefficient ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); L is the optical path length (cm) and c is the sample concentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The CO_2 molar extinction coefficient at 4950 cm^{-1} was determined in a previous work using the same set-up and the same path-length [20]. The THF concentration in the ternary mixture under pressure was indexed on the pure THF concentration and on its absorption at 1 bar, assuming no variation of the molar extinction coefficient with pressure [21]. As the molar extinction coefficient of TPE at 1600 cm^{-1} was unknown, a weighted amount of TPE was dissolved in pure THF at 40 $^\circ\text{C}$ and 1 bar, and the measurement of the absorbance allowed us to deduce the molar extinction coefficient according to the Beer-Lambert law. As previously shown by Ollagnier et al. [22], an inhomogenous mixture leads to a shift of the baseline of the IR spectra toward higher absorbance resulting from an increased scattering of the infrared light. This phenomenon was not observed in our experiments, indicating a homogeneous ternary mixture. Furthermore, the equilibrium was considered to be achieved when no changes in the intensity of the spectral bands were noticed.

2.3. Experimental set-up and protocol

2.3.1. Microreactor

The homemade high-pressure microfluidic reactor [23] developed for this study was built out of silicon (chemically-etched after a photolithography step through a mask, resulting in trapezoidal crossed section channel) and Pyrex for withstanding the high pressure conditions needed for the μ SAS process. The design was similar to the one published in a previous study (Fig. 2) [16]. In a nutshell, it consists in a preheating side channel (width = 200 μm , depth = 130 μm) for CO_2 that reaches a main channel (width = 430 μm , depth = 230 μm) in

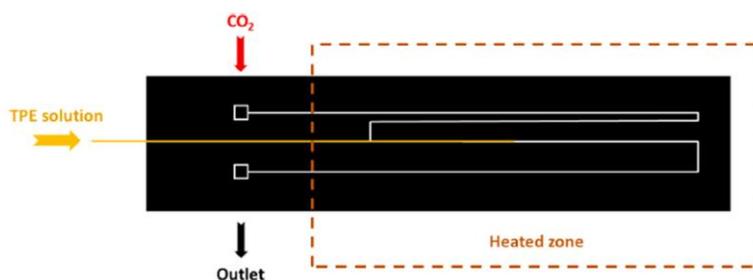


Fig. 2. Schema of a Silicon-Pyrex microchip.

which a silica capillary (I.D. = 100 μm , O.D. = 170 μm) is inserted and further epoxy-glued. This design creates a full 3-D coaxial injection of the solute solution (through the silica capillary) within a CO_2 outer flow (from the side channel). A compression part allows connecting the microchip to the external equipment. A heating tape equipped with an internal thermocouple, placed on the silicon back side of the microreactor, allows the temperature inside the microchannel to be controlled.

2.3.2. Set-up

The microreactor was implemented within a general set-up, presented in Fig. 3. The outlet of the microreactor was connected to a recovery cell made from a sapphire tube (I.D.: 7.3 mm, O.D.: 1/2", length = 10 cm) able to withstand pressure up to 200 bar. The sapphire cell was equipped with a polyvinylidene fluoride (PVDF) filter (Dura-pore membrane filter, hydrophilic PVDF, 0.1 μm pore size, purchased from Sigma-Aldrich) placed on a metallic frit (1 μm pore size). A TEM grid Cu 300 mesh purchased from Sigma-Aldrich was laid on the filter for direct analysis of the produced particles at the end of the μSAS process, without any particular sample preparation step. The whole recovery cell was plunged in a water bath heated at 40 $^\circ\text{C}$.

The initial solution [THF + TPE] was placed inside a vial, stirred (200 rpm) and heated at 40 $^\circ\text{C}$ with a magnetic hot plate. It was directly injected into the microreactor using a PU-4180 continuous Jasco pump. Two other cooled Jasco pumps were used for delivering CO_2 inside the microreactor (PU-4380) and into the recovery cell for the drying step (PU-4387), respectively. The pressure in the whole system was controlled with a Jasco automatic Back Pressure Regulator (BPR) (BP-4380) placed at the outlet of the set-up (100 \pm 1 bar), in which the temperature is fixed at 40 $^\circ\text{C}$ to avoid any dry ice formation during depressurization, which could plug the system.

2.3.3. Experimental protocol

In a typical experimental μSAS process, the temperature of the initial [THF + TPE] solution, microchip, recovery cell and BPR was set at 40 $^\circ\text{C}$. Then, the entire system was pressurized with CO_2 up to 100 bar. The injection of CO_2 was kept continuous at a fixed flow rate and the pressure was stabilized. Then, the [THF + TPE] solution was injected into the microreactor at a constant flow rate, leading to the creation of a co-flow mixing inside the main microchannel of the microfluidic device. The flow rates of CO_2 and [THF + TPE] solution were kept constant during a single experiment. At the end of the experiment, the solution pump was stopped and CO_2 was injected inside the recovery cell in

order to perform the drying step aimed at removing any residues of THF from the synthesized powders. The programmable BPR reduced the pressure from 100 bar to atmospheric pressure within the course of 30 min (3.33 bar.min⁻¹).

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

The TEM grids placed inside the recovery cell were collected, dried, and directly analyzed with a JEOL JEM-1400 + transmission electron microscope for the characterization of organic NPs. A working tension of 60 kV was chosen to avoid any issue with the potential deterioration or melting of the organic NPs during characterization. The Cu 300 mesh grids were purchased from Sigma Aldrich and the obtained TEM images were processed with ImageJ software for size measurements. Careful attention was brought to the measurement of the particle size, because the determination of surface tension requires to compare simulation results with very precise experimental particle size distribution. Therefore, only well-defined particles (with a clear and complete round shape, see orange circles in Fig. 4b) were considered. Thanks to the large number of recovered particles (see Fig. 4a), it was possible to use several images from the same TEM grid with the same magnification ($\times 50,000$) to count more than 100 particles per experiment.

3. Numerical section

3.1. Modeling

The numerical approach allows taking into account all the physical phenomena involved in the process. The method consists in the coupling between a computational fluid dynamics (CFD) code, to consider the thermo-hydrodynamic effects, and a population balance equation (PBE) to take into account the nucleation and growth of particles [24–26]. All the equations, established in previous studies by our group, are presented in the appendix. It was chosen here to point out only the main aspects of the model.

The hydrodynamics equations (continuity and Navier Stokes equations [16]) are solved for a completely miscible fluid. Furthermore, the isothermal fluid is far from the mixture critical point, so the isothermal compressibility is relatively low (between 10^{-8} and 10^{-9} Pa⁻¹). In this case, even if the density depends on the composition of the mixture, the thermo-compressible effects are negligible. The comparison of simulations between an incompressible and a compressible formulation [27] has shown that the results were not significantly different. Because CPU

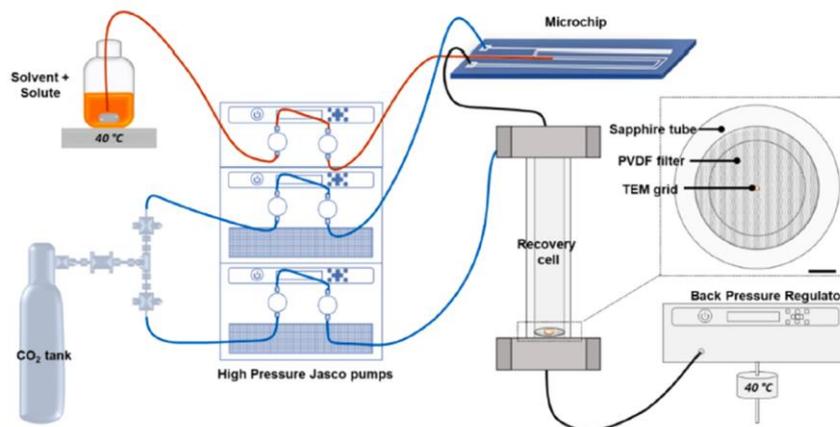


Fig. 3. Scheme of the μSAS set-up.

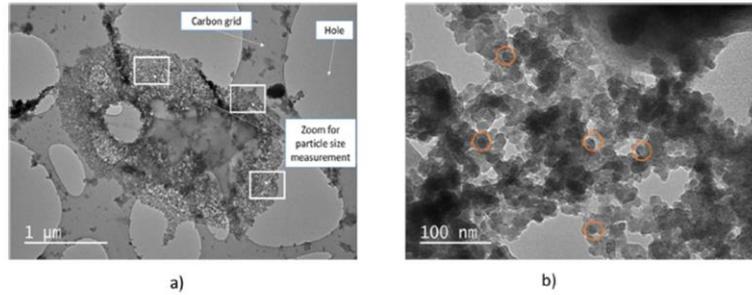


Fig. 4. Cu 300 mesh grid (a) and representative TEM images (b) for manual counting.

time is much shorter, the incompressible formulation is chosen. The gravity is neglected in the confined microchip because of the small value of the Bond number. The Reynolds number of the simulation varies from 3000 to 12,000. One of the originality of the simulation is to perform Direct Numerical Simulation down to the Kolmogorov scale, in this way we do not need any turbulence model. The evolution of each species is calculated by the resolution of the classical species conservation equations by considering advection and ideal diffusion [16]. The density is estimated by the Peng Robinson EOS, coupled with the Van der Waals mixing rule. A binary interaction parameter k_{ij} equal to -0.0027 is considered [28]. The diffusion coefficients are calculated by the Hayduck and Minhas correlation [16]. The mixture viscosity is computed by classical logarithmic mixing rules. The viscosities of the pure fluids, CO_2 and THF, are obtained from the NIST database for the considered experimental conditions.

The formation of the solid particles is taken into account by a population balance equation. As the precipitated particles obtained experimentally in the microreactor are very small, we assume that the effect of the breakage and the agglomeration can be neglected. In order to solve numerically the population balance equation, we introduce the standard method of moments (SMOM). Based on its definition, the four first moments ($j = 0, 1, 2, 3$) have physical meanings and are solved in the simulation (m_0 is the total particle number; m_1 the total particle length; m_2 the total particle surface area; m_3 the total particle volume).

The supersaturation S , driving force of the precipitation, is simply defined as the ratio between the concentration of species C [29], deduced by the resolution of the hydrodynamic equations, and the solubility of TPE (C_{sat}) that was experimentally determined:

$$S = \frac{C}{C_{sat}} \quad (1)$$

In this work, we have considered that the primary homogeneous nucleation B is the main mechanism of the nuclei formation and it is expressed by [24]:

$$B = 1.5D_{wc}(C_{sat}S N_a)^{2/3} \sqrt{\frac{\sigma}{k_b T}} V_m \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \left[\frac{\sigma}{k_b T}\right]^3 \frac{V_m^2}{\ln^2(S)}\right) \quad (2)$$

with N_a the Avogadro constant, σ the solid-fluid interfacial tension, k_b the Boltzmann constant and V_m the solute molecular volume, D_{wc} the solute diffusion coefficient calculated by the correlation proposed by Wilke and Chang [30]. As the solid-fluid interfacial tension σ in Eq. (2) is unknown, its value is fitted with the experimental results. The growth rate is calculated as a function of the supersaturation and a mass transfer coefficient k_s deduced from the Sherwood number which is estimated thanks to the Froessling correlation.

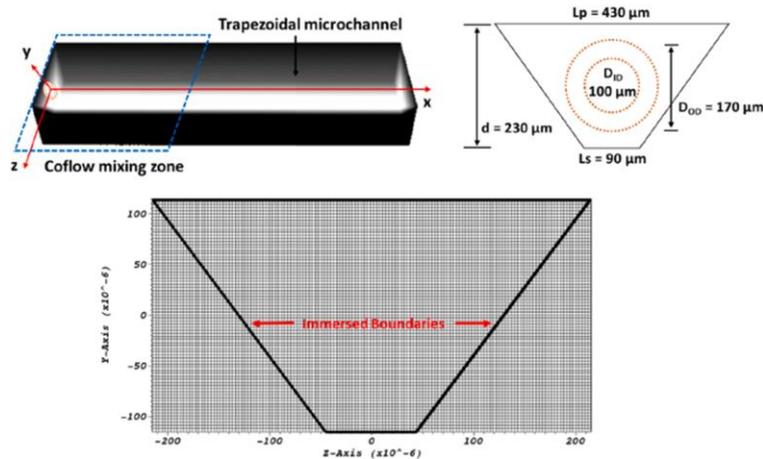


Fig. 5. The geometry of the numerical microchannel for the turbulent mixing simulations showing the three dimensional trapezoidal microchannel, the dimension of the cross-section at $x = 0$ and the mesh in the yz plane and location of immersed boundaries.

3.2. Numerical methods

The system of the partial derivative equations (detailed in appendix) is numerically solved by the homemade Fortran CFD code "Notus" (<https://notus-cfd.org/>), developed at the Institute of Mechanical Engineering (I2M-TREFLE). Notus is an open source software based on the finite volume method. The variable fields are solved on a fixed staggered grid. Since Notus is massively parallel, it allows simulating 3D configuration with great precision. The formulation employed is totally explicit, except the pressure correction step in the velocity-pressure coupling algorithm which is solved implicitly. The Navier-Stokes equation is solved in two steps by the time-splitting algorithm of Goda [31]. The advection term is discretized by the second order scheme in space (total variation diminishing with superbee flux limiter function (TVD superbee)) [32] and an explicit second order central discretization is applied in space for the diffusion term. The trapezoidal shape (Fig. 5) of the domain is taken into account by an immersed boundary method [33]. At the inflow boundary, a flat constant profile is imposed in the coflow and a laminar Poiseuille flow profile for the injector. A zero-gradient boundary condition is applied to the outlet boundary, and no-slip boundary conditions for the remaining boundary conditions.

Due to the trapezoidal asymmetrical geometry (Fig. 5), a three-dimensional simulation is required. As demonstrated in our previous study [16], the Kolmogorov and Batchelor scales in our system are in the micrometer range. So we chose an uniform mesh, the grid size of which is $\Delta x = \Delta y = \Delta z = 3 \mu\text{m}$ for a total number of nodes of 14.5 millions for a channel length of 4 mm. This is a good compromise between precision and CPU time.

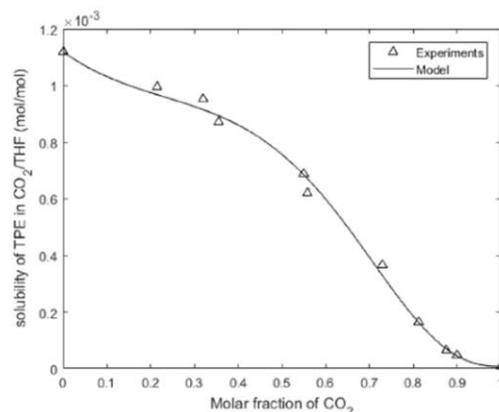


Fig. 7. TPE solubility in the binary (THF + CO₂) system at 40 °C and 100 bar as a function of the molar fraction of CO₂ in the mixture.

4. Results and discussion

4.1. TPE solubility in the [CO₂ + THF] mixture at 40 °C and 100 bar

The solubility of the TPE in the [THF + CO₂] mixture was determined for different solvent/antisolvent ratio at fixed conditions of pressure and temperature, selected for the final μSAS process (100 bar and 40 °C). The FTIR spectra, for different molar ratio, are obtained (Fig. 6) in order to determine the species concentration at equilibrium. The solubility values deduced from the experimental measurements

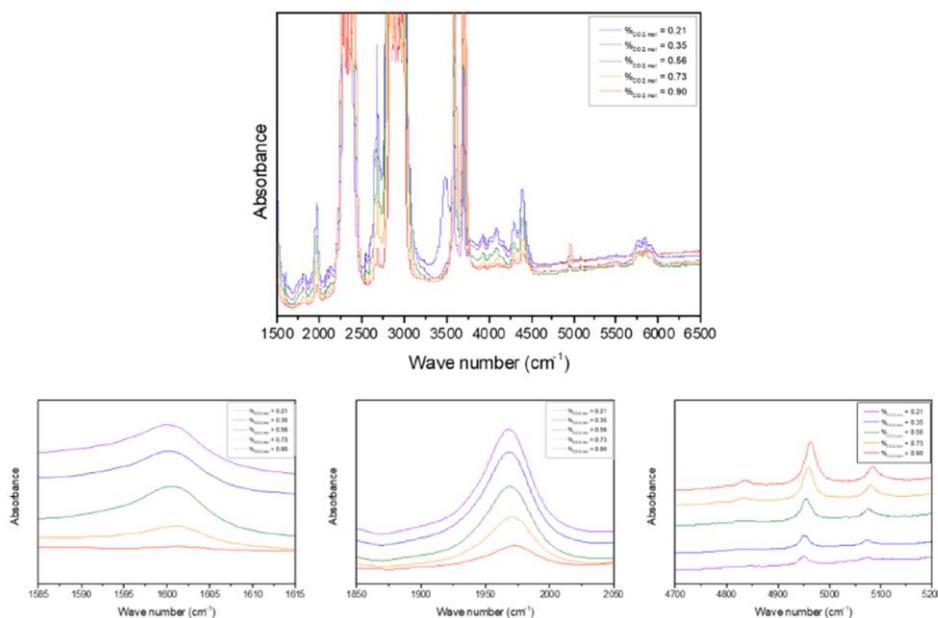


Fig. 6. Selected regions of the FTIR spectra of (CO₂/THF/TPE) system from different CO₂ molar ratios at T = 40 °C and p = 100 bar. Bottom, from left to right: 1: TPE absorption band, 2: THF absorption band, 3: CO₂ absorption band.

are presented in Fig. 7 and fitted with a simple analytical model. The latter estimates the evolution of the solubility x_{sat} (mol/mol) in function of the CO_2 molar fraction x_{CO_2} :

$$x_{\text{sat}} = 0.0011(1 - x_{\text{CO}_2})^{1.0051 - 2.5871x_{\text{CO}_2} + 3.4422x_{\text{CO}_2}^2} + 6.7 \cdot 10^{-6}x_{\text{CO}_2} \quad (3)$$

As seen, the solubility of TPE (mol TPE/(mol CO_2 + mol THF)) decreased continuously with increasing the proportion of CO_2 into the binary solvent system [THF + CO_2] mixture, ranging from 1.1×10^{-3} mol/mol in pure THF to 6.7×10^{-6} mol/mol in pure CO_2 . Interestingly, no noticeable co-solvent effect was detected, showing that CO_2 actually acts as an antisolvent for all the considered compositions. To generate high supersaturation and access good mixing conditions in the μSAS process, it was chosen to work with a CO_2 molar fraction of 98%, at 40 °C and under an operating pressure of 100 bar.

4.2. Processing of TPE NPs with the μSAS process

Nanoparticles of TPE were then prepared using the μSAS device. Some experimental parameters were allowed to vary, in order to observe their impact on the shape, size and size distribution of the synthesized NPs. More precisely, three μSAS experiments were conducted by changing the initial TPE concentration in the THF solution (2 g.L^{-1} and 3 g.L^{-1}), as well as the CO_2 and solution flow rates (passing from 8 and 0.4 mg/min, respectively, to 2 and 0.1 mg/min), for the same solvent/antisolvent ratio. For the latter parameter, the objective was to compare the effect of the mixing regime, determined by the mean Reynolds number – Re [16] (laminar – $Re = 3000$ or turbulent – $Re = 12000$), on the NP size. Indeed, high Reynolds number flow allows reaching very fast mixing, as reported in a former study [16]. The shape and size of the NPs were observed by TEM. Typical TEM pictures are shown in Fig. 8, displaying small NPs slightly agglomerated on the grids. All NPs exhibited spherical shapes, with a very small mean diameter ranging from 9 to 14 nm. The size dispersion was calculated (Fig. 9). All experiments have been repeated three times to validate the reproducibility of the process. Table 1 summarizes all the considered conditions along with the TPE NPs characteristics.

The comparison of samples 1 and 3 showed that the initial concentration of TPE, in the studied range, had no effect on the particle size, and only a slight effect on size distribution. In contrast, the effect of the mixing regime is obvious when comparing samples 1 and 2. The NPs were significantly smaller in sample 1 ($9 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$) than in sample 2 ($14 \pm 5 \text{ nm}$), and their size distribution was much narrower. This behavior was expected because very fast mixing is achieved at high Reynolds number flows (in particular in turbulent conditions), leading to a high burst of nucleation in a very short period of time, and leaving almost no dissolved TPE for the growth. This results in small NPs, and narrow particle size distribution. Oppositely, in the case of sample 2, the flow rates are reduced four times, and so the mixing time is increased, as numerically demonstrated in the next section. Hence, due to less favorable mixing, the nucleation rate is lower, so growth is promoted consequently leading to bigger particles.

4.3. μSAS simulation results

The simulations were only carried out for the experimental conditions (1) and (2) reported in Table 1 in order to demonstrate the influence of the mixing conditions for NPs synthesis. Concerning the influence of the concentration, no significant influence was observed experimentally. This is due to the very low solubility of the TPE in the THF. As discussed in the introduction, all parameters of the numerical simulation can be estimated except the interfacial tension σ between the solid and the fluid phase. Because of the lack of knowledge of this crucial parameter, its value was estimated by fitting the simulation results to the experimental data.

4.4. Determination of the interfacial tension σ

The particle size distribution was calculated by applying a log-normal distribution according to the time average values of the moments [25]. The interfacial tension σ was estimated to be 2.25 mN/m for experiment No. 1. This value resulted in the best agreement with the particle size and size distribution obtained from the μSAS experiment. The comparison between the numerical particle size distributions and the experimental one is represented in Fig. 10. We can observe a very strong influence of the surface tension σ on the distribution. Indeed, a variation between 2 and 3 mN/m can lead to very different size distributions and width.

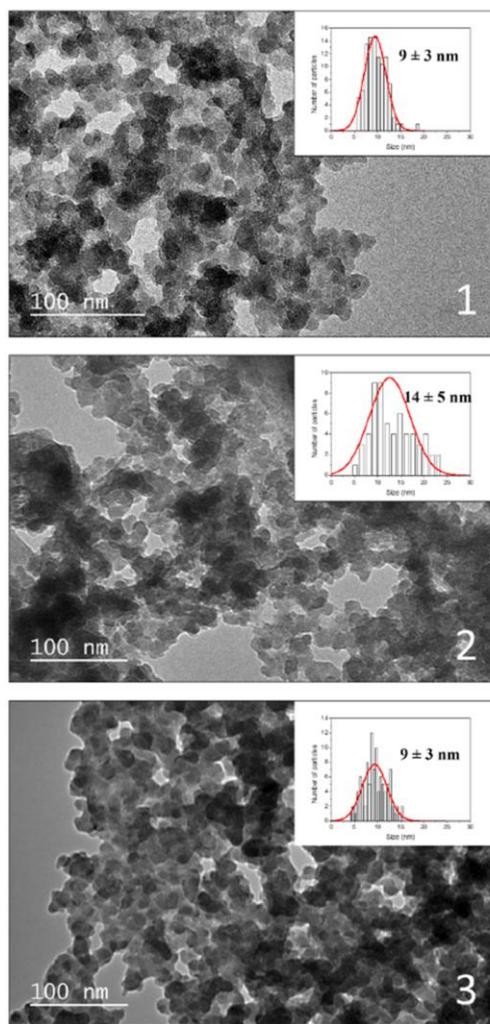


Fig. 8. TEM images of TPE NPs synthesized by μSAS at 40 °C and 100 bar. Experiment number is integrated on the image. Inset: corresponding size distribution.

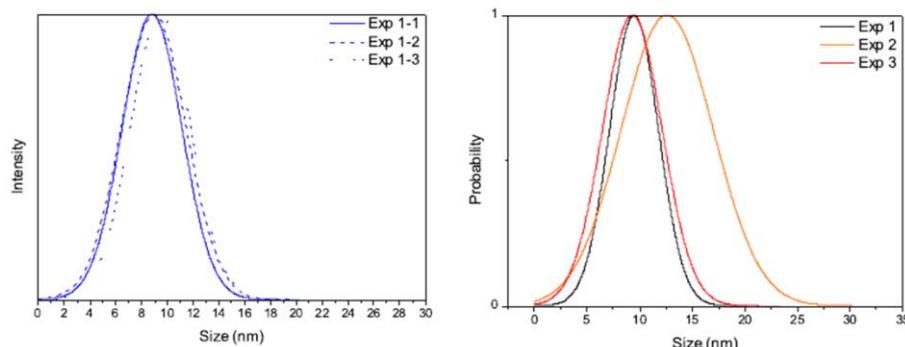


Fig. 9. a) Size distributions of TPE NPs obtained from experiment No. 1 repeated three times (Reproducibility); b) Normalized size distributions of the TPE NPs prepared under the three experimental conditions.

Table 1

Process parameters (initial TPE concentration $[TPE]_0$, mass flow rates Q_m) for TPE synthesis by μ SAS ($T = 40$ °C, $P = 100$ bar), Reynolds numbers Re , and mean size of the NPs measured from TEM images.

Exp. No.	$[TPE]_0$ in THF	Q_m CO ₂ mg.min ⁻¹	Q_m THF mg.min ⁻¹	Re	Mean size (nm)
1	2 g.L ⁻¹	8	0.4	12,000	9 ± 3 nm
2	2 g.L ⁻¹	2	0.1	3000	14 ± 5 nm
3	3 g.L ⁻¹	8	0.4	12,000	9 ± 3 nm

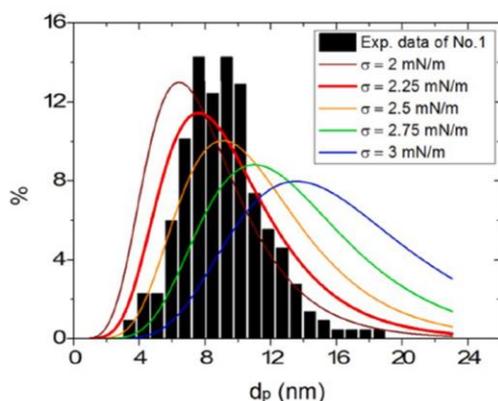


Fig. 10. Bar chart: Size and size distribution of TPE particles prepared experimentally using the μ SAS process according to the reference test case No. 1 (Table 1). Colored curves: simulated particle distributions as a function of the interfacial tension σ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4.5. General analysis of the reference case (No. 1)

Several fields of important variables were illustrated and analyzed for case No. 1 (Table 1). The effects of the operating parameters are presented after this general analysis.

In order to illustrate the general mixing quality of the μ SAS process, we examined first the instantaneous and time averaged fields of mass

fractions of THF and TPE in the plane of $z = 0$ in Fig. 11 (which represents the depth of the channel). The species transport is very fast for both solute and solvent in the conditions of the reference test case No. 1 and a homogeneous mixture is obtained within 1 mm from the capillary outlet, according to the time averaged fields. We observed that the solute TPE dissolved in the fluid mixture is consumed by the particle formation. Although the diffusivities of TPE and THF in CO₂ are different, a similar behavior is observed between the solute TPE and the solvent THF mass fractions, resulting from much stronger effects of convection compared to the diffusion for the operating conditions.

After the first observation on the mixing quality by the mass fraction distributions, we analyzed quantitatively the fluid mixing by providing the instantaneous and mean time fields of the engulfment micromixing time [34] $t_{mE} = 17.24 \sqrt{\frac{\nu}{\epsilon}}$ in the plane $z = 0$ (Fig. 12). The dissipation rate of the turbulent kinetic energy ϵ was calculated by the following relation:

$$\epsilon = 2\nu \left[\left(\frac{\partial u}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 + \left(\frac{\partial v}{\partial z} \right)^2 + \left(\frac{\partial w}{\partial z} \right)^2 + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial v}{\partial x} \right) + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial w}{\partial x} \right) + 2 \left(\frac{\partial v}{\partial x} \frac{\partial w}{\partial x} \right) + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial y} \frac{\partial v}{\partial y} \right) + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial y} \frac{\partial w}{\partial y} \right) + 2 \left(\frac{\partial v}{\partial y} \frac{\partial w}{\partial y} \right) + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial z} \frac{\partial v}{\partial z} \right) + 2 \left(\frac{\partial u}{\partial z} \frac{\partial w}{\partial z} \right) + 2 \left(\frac{\partial v}{\partial z} \frac{\partial w}{\partial z} \right) \right] \quad (4)$$

The engulfment micromixing time t_{mE} is in the order of magnitude of 10^{-5} s (0.01 ms) for the examined conditions, illustrating that the mixing rate is extremely high, especially at the beginning of the mixing close to the capillary outlet. This result is related to the high velocity fluctuations of fluid mixture in this zone, creating high turbulent energy dissipation rate up to $10,000$ W.kg⁻¹ locally in certain cells (Fig. 13). According to the mean field of the engulfment micromixing time t_{mE} , its value drops to 0 at a distance of 1 mm from the injector tip. This means that the mixing is completed due to no more energy dissipation, and the fluid mixture becomes homogeneous, corresponding well to the mass fraction field of the THF solvent in Fig. 11.

In order to quantify the mixing efficiency with a single representative value, the characteristic mixing time was determined by the method presented in our previous study [16,35]. The characteristic mixing time is considered as the time constant of a function representing the global evolution of the mixing in the reactor which can be easily modeled by a first order dynamic model $f \propto e^{-\frac{t}{\tau}}$ with τ and t_r being respectively the time constant and the time delay. The global evolution of the well-known segregation intensity [36] is used to characterize the mixing. If the segregation intensity is equal to 1, the

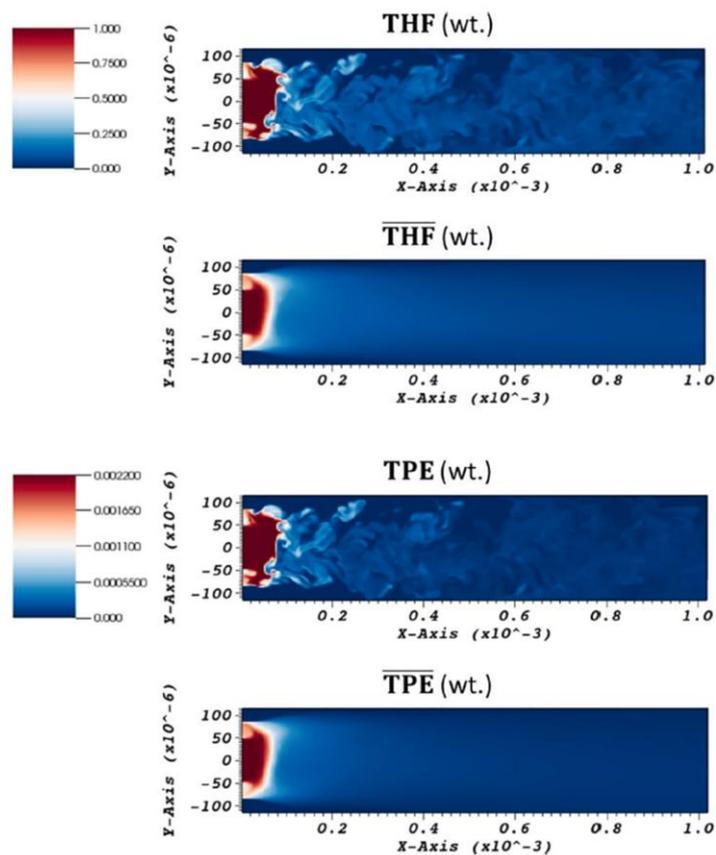


Fig. 11. The instantaneous and mean time fields of the solvent THF and the dissolved solute TPE mass fractions in the microchannel of the plane $z = 0$ (with the unit of meter for x and y axis) for the reference case No. 1.

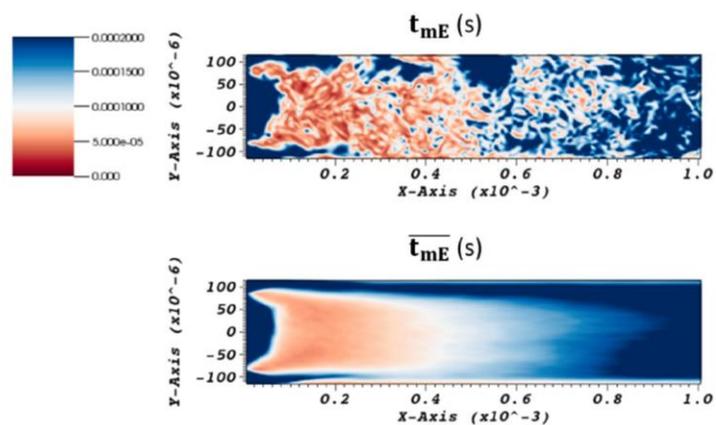


Fig. 12. Engulfment micromixing time in the microchannel of the plane $z = 0$ (with the unit of meter for x and y axes) for the reference test No.1.

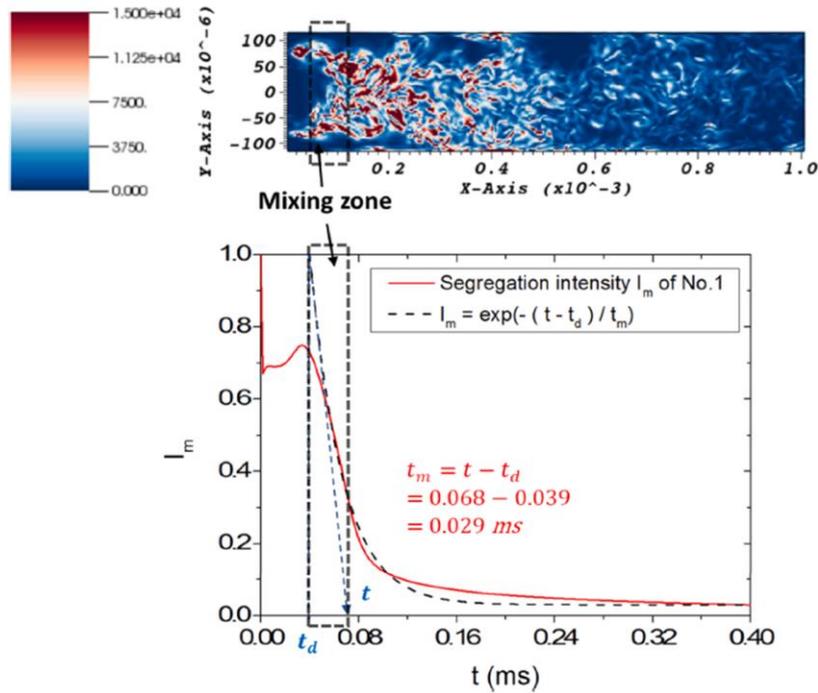


Fig. 13. Instantaneous field of the energy dissipation rate ϵ of the plane $z = 0$ (with the unit of meter for x and y axis) and the characteristic mixing time t_m determined by the segregation intensity I_m for the reference test No. 1.

segregation between species is total, whereas a value of 1 indicates a perfect mixing. The segregation intensity I_m is calculated for each abscissa x and is defined by:

$$I_m = \frac{\sum_{i=1}^N (\omega_i - \bar{\omega}_i)^2}{N(\bar{\omega}_i(1 - \bar{\omega}_i))} \quad (5)$$

with ω_i the mass fraction of the solvent THF and $\bar{\omega}_i$ the mean mass fraction of THF calculated in the plane yz for each abscissa x .

A characteristic mixing time of 0.029 ms was obtained. This very low value emphasized the excellent mixing efficiency in our micro-reactor under the μ SAS conditions.

The influence of the fast mixing of the test No.1 can be reflected on the instantaneous fields of the supersaturation S , nucleation B and growth rate G . As the driving force of the precipitation, the

supersaturation $S = C/C_{sat}$ was calculated in the microchannel. The instantaneous field of supersaturation is shown in Fig. 14. Thanks to the efficient mixing in this case, no effective gradient was observed in the microchannel. However, the value of supersaturation was generally low with a maximum of 1.647. The first explanation is the low TPE concentration even in the initial solution. TPE cannot be dissolved in large quantities in THF, although its solubility in THF is higher than in other common organic solvents. So, the low concentration of TPE cannot offer a high value of supersaturation. The low value of supersaturation is also linked to the nucleation rate B and to the particle growth rate G . In order to clearly present the relationship between nucleation and supersaturation in Fig. 15, the instantaneous field of supersaturation is reset with a superior limit at 1.3 and an inferior boundary at 1 because the precipitation occurs only while the supersaturation degree is higher than 1.

The evolution of the supersaturation can be considered as a

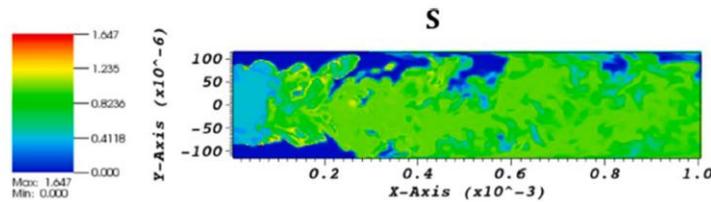


Fig. 14. Instantaneous fields of supersaturation S in the plane $z = 0$ of test case No. 1.

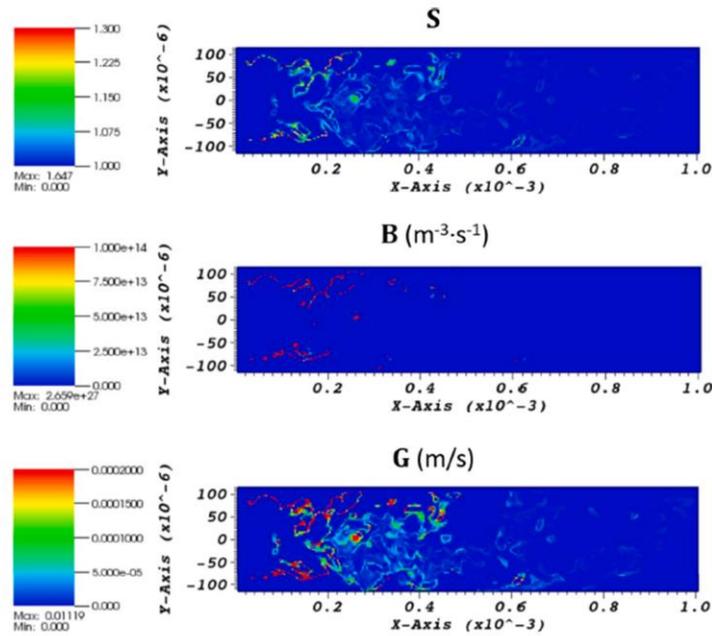


Fig. 15. Instantaneous field of supersaturation S , nucleation rate B and particle growth G in the plane $z = 0$ of test case No. 1.

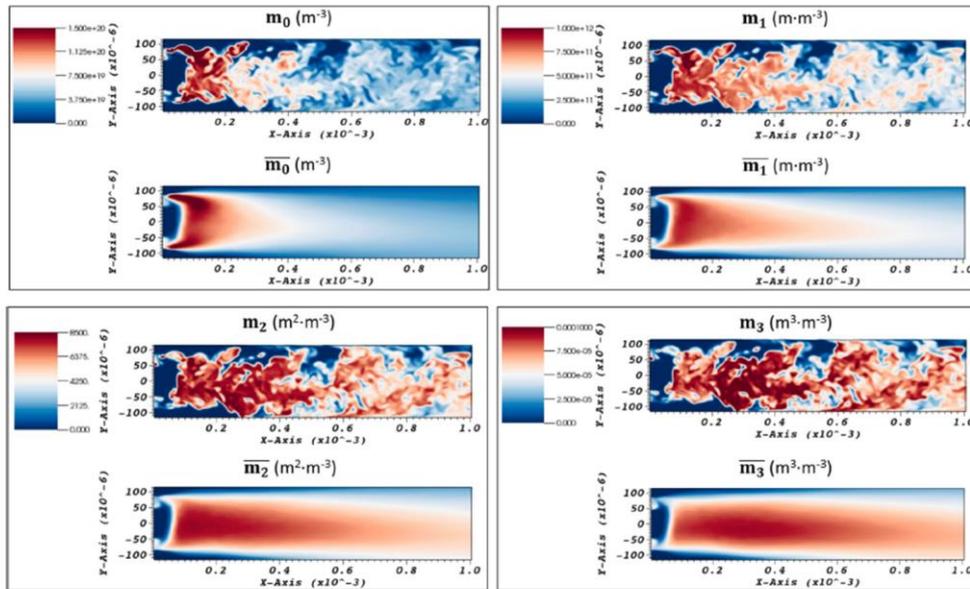


Fig. 16. Instantaneous and averaged fields of the moments m_0 (total number of particles per volume), m_1 (total length of particles per volume), m_2 (total surface of particles per volume) and m_3 (total volume of particles per volume) of test No. 1.

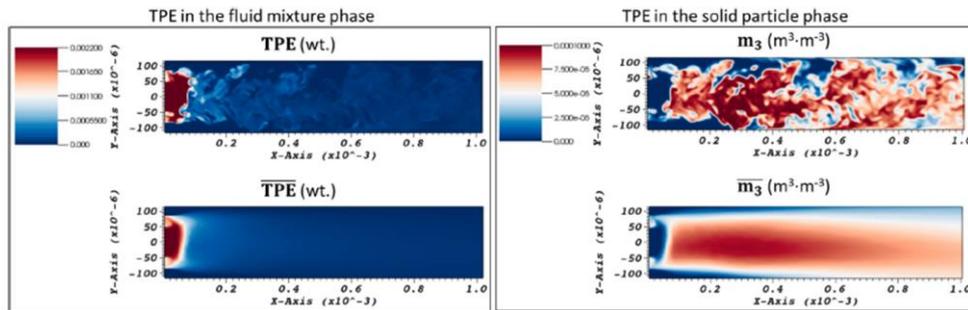


Fig. 17. TPE mass fractions in the fluid phase (left) and in the solid phase (right), represented by the moment m_3 of the total volume.

combination of its generation by fluid mixing and its consumption by the nucleation and the particle growth (for $S > 1$). The extremely high rate of nucleation leads to a fast decrease of the supersaturation degree once it exceeds 1. The similarity of these two fields can be observed in Fig. 15, as well as the relationship between the supersaturation and growth rate. However, the nucleation is favorable because of the fast fluid mixing. The supersaturation S drops quickly after nucleation, leaving a weak driving force for particle growth. The high nucleation rate results from the small value of the surface tension ($\sigma = 2.25$ mN/m) and a significant diffusion coefficient for TPE particle D_{WC} (up to 1.4×10^{-8} m² s⁻¹) under the supercritical mixture conditions due to a gas-like viscosity of the fluid mixture (about 43 μ P.s). Indeed, these two parameters affect decisively the nucleation process and contribute to fast rates in the simulation case No. 1.

The moments m_0 , m_1 , m_2 and m_3 represent, per volume of the reactor, the total number of particles, the sum of the particle length, the sum of the particle surface and the total particle volume, respectively. These moments are displayed in Fig. 16 with their instantaneous and time averaged fields.

As expected, the mean fields of the moments also show that the fast fluid mixing contributes to reaching homogeneity at 1 mm from the injector outlet. Fig. 17 illustrates qualitatively the solute TPE in the

fluid and solid phases, which can be considered as the moment m_3 for the total particle volume. This consistency proves the robustness of the numerical modeling.

The averaged values of the moments allow to estimate the particle size mean value. The first two moments are chosen to express the mean particle size $\bar{d}_p = \frac{m_1}{m_0}$. The fields of both the instantaneous and mean particle sizes can be seen in Fig. 18.

By monitoring the instantaneous particle size d_p , the particle growth at different locations in the microchannel was observed. The sizes varied from 6 to 15 nm, corresponding well to the experimental measurements of the test case No. 1. The mean values of the particle sizes \bar{d}_p became stable at 1 mm from the capillary tip, which is a coherent result regarding the other time averaged fields.

4.6. Effects of the mixing conditions

After the analysis of the reference case No. 1, another test case with different flowrates was investigated in order to clarify the influence of the mixing conditions. The test case No. 2 for lower flow rates was simulated using the same surface tension $\sigma = 2.25$ mN/m as that obtained from the reference simulation No. 1. The main information are reported in Table 2.

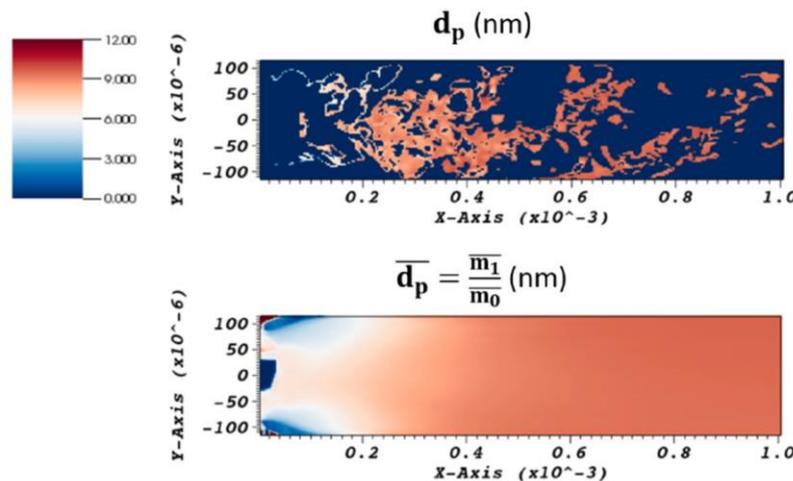


Fig. 18. The instantaneous particle size field and its mean time value in the plane $z = 0$ of test case No. 1.

Table 2

The TPE particle mean sizes originating from experiments ($d_{p,exp}$) and simulations ($d_{p,num}$), the surface tension used in the simulations σ , the mixing times t_m at fixed temperature (40 °C) and pressure (100 bar) under tested μ SAS conditions (initial concentration of TPE [TPE]_i, mass flow rates Q_m , velocities u and Reynolds number).

No.	[TPE] _i g/l	Q_m CO ₂ mg.min ⁻¹	Q_m THF mg.min ⁻¹	u_{CO_2} m/s	u_{THF} m/s	Re	σ mN/m	t_m ms	$d_{p,exp}$ nm	$d_{p,num}$ nm
1	2	8	0.4	6.35	0.95	12,000	2.25	0.59	9.1	9.5
2	2	2	0.1	1.59	0.23	3000	2.25	0.029	14.4	16.6

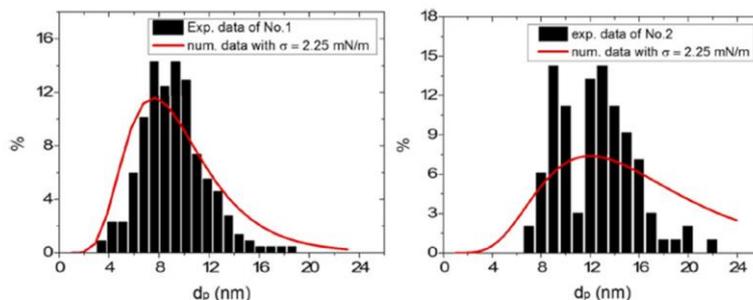


Fig. 19. Comparison between experimental and simulated particle size distributions for the two tested cases.

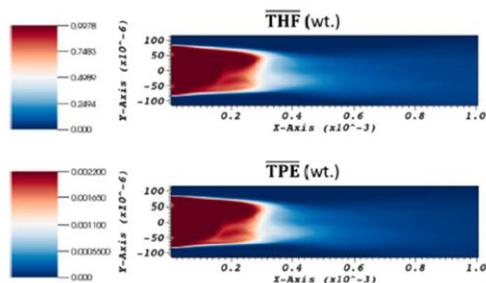


Fig. 20. The mean time fields of the THF and TPE mass fractions in the test case No. 2 with low flow rates.

The results of the comparison between experimental and simulated distributions are shown in Fig. 19. The simulations yield generally acceptable results on the particle sizes and size distributions for the two test cases.

While the flow rates of No. 2 were reduced to 0.11 mL.min⁻¹ and 2 mL.min⁻¹, respectively, for the TPE/THF solution and the antisolvent CO₂, compared to the reference test case No. 1, the mean size of TPE was increased from 9.1 nm to 14.4 nm, according to the experimental results, with the same total CO₂ mass fraction at 98%. In fact, a relative “inefficient” mixing in case No. 2 can be represented by the mean time mass fractions of THF and TPE (Fig. 20). A long length of solvent jet can be observed. In spite of a mixture homogeneity at $x = 1$ mm, the fluid is quite heterogeneous in the vicinity of the injector tip.

More specifically, in order to analyze the velocity effect on the mixing time t_m , this value was deduced from the evolution of the segregation intensity (Fig. 21). The decrease of fluid flow rates in test No. 2 leads to slow mixing compared to the reference test No. 1, with a mixing time of 0.59 ms, one order of magnitude higher than in test No.

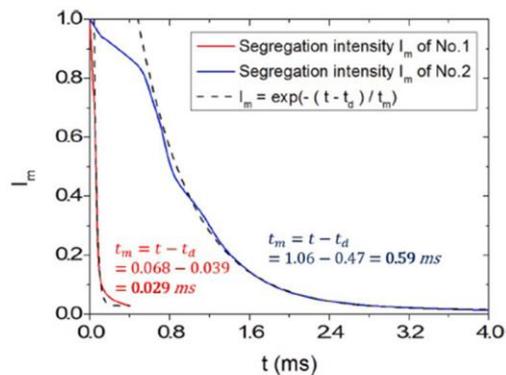


Fig. 21. Intensity of segregation curves of tests No. 1 and No. 2 as a function of time with the determination of mixing time.

1 (0.029 ms). This less efficient mixing influences the supersaturation degree, which is slightly smaller in No. 2 than in No. 1, especially at the outlet of the injector. It also generates a quite heterogeneous field of the supersaturation around the long jet of the TPE/THF solution. This less uniform supersaturation field promotes particle growth instead of nucleation. In other words, in the test No. 1, supersaturation is mainly consumed by nucleation close to the injector outlet once the fluids encounter each other. In contrast, in the test No. 2, the length of the region where supersaturation is more than 1 is two times (1 mm) that of the reference test No. 1 (0.5 mm), resulting in a longer distance and more time for the growth of the nuclei formed upstream. The slower mixing in the case No. 2 can explain the increase of the mean TPE particle size.

The comparison between tests No. 1 and No. 2 confirmed the

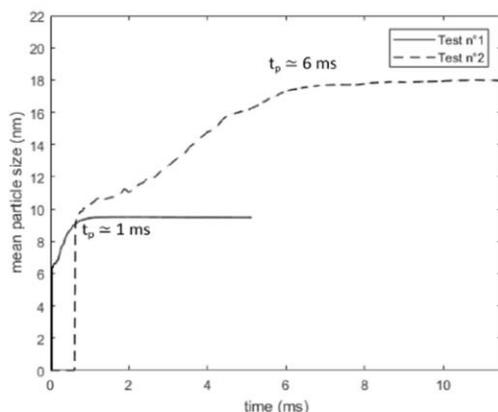


Fig. 22. Determination of precipitation time t_p according to the mean particle size.

importance of the hydrodynamic behavior of mixing in the microreactor that we emphasized in our previous study [35]. High flow rates (fluid velocities) lead to fast mixing, and so to small particle sizes and narrow size distributions.

4.7. Characteristic times of the precipitation

In order to compare the characteristic time of precipitation and fluid mixing, the time of precipitation t_p has been estimated. In Fig. 22, we have represented the evolution on the center line of the mean particle size d_p as a function of time. The time axis t is defined as: $t = x/u_{\text{cin}}$, the same as that used for the turbulent mixing analysis in our previous study [16], with L the length of microchannel, u_{cin} the average velocity of the inner fluid TPE/THF solution, depending on its flow rate and on the inner surface of the capillary.

The characteristic time of precipitation t_p is defined in this study as the time when the mean particle size d_p reaches a stable value (Fig. 22). Another important characteristic time for the particle precipitation process is the nucleation time, which is generally not well defined. The different characteristic times are reported in Table 3 in order to compare their orders of magnitude.

The nucleation time is directly related to the average value of the nucleation rate B . It is the global mean value of space and time in the simulated microchannel, also given in Table 3 for all tested cases. The volume of the discretized cell ($V_{\text{cell}} = 3 \times 3 \times 3 \mu\text{m}^3$) has been considered, and the characteristic nucleation time t_n can be estimated as:

$$t_n = \frac{1}{BV_{\text{cell}}} \quad (6)$$

This method provides nucleation times in the reasonable order of magnitude of 10^{-5} s. The values of the two test cases are close due to the same range of supersaturation and constant surface tension. To compare the characteristic times of the fluid mixing and nucleation, we

introduced here the dimensionless Damköhler number Da , often used to relate the reaction rate to the species transport rate:

$$Da = \frac{\text{mixing time}}{\text{reaction time}} \quad (7)$$

The Da number was calculated for both TPE precipitation (Da_p) and nucleation (Da_n), with t_m , t_p and t_n in Table 3. We confirm and emphasize that our microreactor can provide a high efficient fluid mixing under μSAS conditions with a very low Da number of precipitation Da_p , even for a relatively slow mixing (test No. 2), indicating that the fluid mixing is much faster than the entire precipitation process. The mixture becomes homogeneous much before the end of particle growth. Regarding the nucleation time t_n , the Da number is in the order of magnitude $O(1)$ for the tests of high flow rates No. 1. The slower mixing due to the lower flow rates in No. 2 results in a high value of Da number, implying that when nucleation occurs, the fluid mixture is far from being homogeneous. In general, an extremely fast mixing can be reached in our microreactor for the μSAS process with a mixing time in the order of magnitude of 10^{-5} s (0.01 ms). The same order of time is found for nucleation but much smaller than the global precipitation time. Consequently, these conditions are very favorable to precipitate, through μSAS conditions, the nanoparticles of TPE with a narrow particle size distribution.

5. Conclusion

In this paper, the experimental system to produce TPE nanoparticles by the μSAS process in our microreactor was introduced. μSAS offers the possibility to obtain sizes below 15 nm. Narrow dispersion size (± 3 nm) was obtained. The variation of experimental parameters strongly impacts the hydrodynamics of the mixing process. In particular, decreasing the flow rates increased the mean size of the recovered NPs. By comparing the simulation results to the experimental data, we have determined the solid-fluid interfacial tension σ , which is difficult to access by experimental measurements. The numerical model provided appropriate particle size d_p and size distribution, in good accordance with the experimental results. In order to have a deep insight in the mixing zone of the precipitation, some important fields have been analyzed numerically, namely: the mass fractions, the mixing time, the supersaturation and the mean particle size. The effects of fluid hydrodynamics on the particle size were discussed. At last, the characteristic times of precipitation and nucleation were determined, and compared to the mixing time measured under corresponding conditions in the microreactor. It has been demonstrated that the fluid mixing plays an essential role in μSAS precipitation and that our microreactor can offer an extremely fast mixing with a mixing time down to 0.01 ms, of the same order of magnitude as the nucleation time. This coupled experimental and numerical modeling approach highlights the high performance of the microreactor for fluid mixing and particle precipitation by μSAS process. It underlines the value of this technique for the controlled production of very small organic NPs, potentially paving the way of practical applications for a large number of organic compounds.

Table 3

Characteristic times (precipitation time t_p , estimated nucleation time t_n) with the average nucleation rate B , the mean particle growth rate G and the Da numbers (Da_p for fluid mixing and precipitation, Da_n for fluid mixing and nucleation).

Test No.	t_p (ms)	r^* (nm)	$G \cdot 10^5$ (m s^{-1})	$B \cdot 10^{-21}$ ($\text{m}^{-3} \text{s}^{-1}$)	t_n (ms)	t_m (ms)	Da_p	Da_n
1	1	1.59	5.28	2.15	0.017	0.59	0.029	1.7
2	6	2.15	3.43	1.72	0.021	0.59	0.098	28.1

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We acknowledge the French National Research Agency for its support (ANR-17-CE07-0029 - SUPERFON), the University of Bordeaux for the Ph.D. funding of the author Fan Zhang, the MCIA (Mésocentre de Calcul Intensif Aquitaine) and GENCI (DARI project number A0062A10815) for the HPC resources.

Appendix**Hydrodynamic and thermodynamical contributions**

The flow is considered as incompressible, monophasic and turbulent. As the simulation is performed down to the Kolmogorov scale, no turbulence model is needed, it reads:

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (8)$$

$$\rho \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \nabla \cdot \mu [\nabla \mathbf{u} + \nabla^t \mathbf{u}] \quad (9)$$

in which p is the pressure, ρ the density of the fluid, g the gravity vector, μ the dynamic viscosity, t the time and \mathbf{u} the velocity vector. The Peng Robinson equation of state (PR-EOS) with quadratic mixing rules is chosen to calculate the density of the fluid.

The species continuity equations are expressed by taking into account the diffusion of species according to the Fick's law:

$$\rho \frac{\partial \omega_a}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \omega_a \mathbf{u} - \rho D_a \nabla \omega_a) = 0 \quad (10)$$

$$\rho \frac{\partial \omega_s}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \omega_s \mathbf{u} - \rho D_s \nabla \omega_s) = -3\rho_p k_v G m_2 \quad (11)$$

with ω_s and ω_a the mass fractions of solvent and solute, respectively, D_a and D_s the diffusion coefficients of solvent and solute in solvent/CO₂, respectively. ρ_p is the density of the solid solute and k_v the volume shape factor of the particles that is based on the morphology of produced particles ($k_v = \pi/6$).

The population balance equation

As in our case, the precipitated particles obtained experimentally in the microreactor are very small, we assume that the effects of the breakage and the agglomeration can be neglected. According to the conservation law, the general equation of population balance is defined by:

$$\rho \frac{\partial n(L, X, t)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} n(L, X, t)) + \rho \frac{\partial n(L, X, t)G}{\partial L} = 0 \quad (12)$$

In this equation n represents the number density function which depends on internal coordinates (particle size L) and external coordinates (space coordinates $X(x,y,z)$). \mathbf{u} and ρ are respectively the velocity and the density of the fluid and G is the growth rate of the particles. The population balance equation is solved with the standard method of moments. Only the four first moments are solved, the system of equations to be solved remains [37]:

$$\rho \frac{\partial m_j}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u} m_j) = \rho (0^j B + j G m_{j-1}) \quad \text{for } j = 0, 1, 2, 3 \quad (13)$$

where m_j is the j th moment defined by:

$$m_j = \int_0^{\infty} n(L, X, t) L^j dL$$

where m_j is the j th moment of the distribution. B and G represent the nucleation and the growth rates.

Assuming that the distribution is log-normal, the following relationship [37] is used to build the simulated particle size distribution with the calculated moments:

$$N(L) = \frac{1}{\text{Ln}(\sigma) \sqrt{2\pi}} \left(\frac{-\ln^2\left(\frac{L}{\bar{L}}\right)}{2\text{Ln}^2(\sigma)} \right) \quad \text{with } \text{Ln}^2(\sigma) = \ln\left(\frac{m_0 m_2}{m_1^2}\right) \quad (14)$$

Nucleation and Growth parameters

We consider that particle formation is only due to primary nucleation:

$$B = 1.5 D_{wc} (C_{sat} S N_0)^{2/3} \sqrt{\frac{\sigma}{k_b T}} V_m \exp\left(-\frac{16\pi}{3} \left[\frac{\sigma}{k_b T}\right]^3 \frac{V_m^2}{\text{Ln}^2(S)}\right) \quad (15)$$

with N_0 the Avogadro constant, σ the solid-fluid interfacial tension, k_b the Boltzmann constant and V_m the solute molecular volume, D_{wc} the solute diffusion coefficient calculated by the correlation proposed by Wilke and Chang [30].

The growth rate, assuming that the main mechanism for growth is diffusion, is calculated by:

$$G = k_g C_{sat} (S - 1) \quad (16)$$

where k_g represents the mass transfer coefficient deduced from the local Sherwood number estimated by the Froessling equation.

References

- [1] W. Wani, M. Shahid, A. Hussain, M. Fahad AlAjmi, *Fluorescent Organic Nanoparticles*, Springer, Singapore, 2018.
- [2] S. Fery-Forgues, *Fluorescent organic nanocrystals and non-doped nanoparticles for biological applications*, *Nanoscale* 5 (2013) 8428, <https://doi.org/10.1039/c3nr02657d>.
- [3] J. Zhang, Z. Xie, J. Zhang, J. Zhong, *Nanosuspension drug delivery system: preparation, characterization, postproduction processing, dosage form, and application*, *Nanostructures Drug Deliv. E Andronescu Grumezescu Eds.* (2017) 413–443.
- [4] S. Kalepu, V. Nekkanti, *Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects*, *Acta Pharm. Sin. B* 5 (2015) 442–453, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- [5] L. Padrela, M.A. Rodrigues, A. Duarte, A.M.A. Dias, M.E.M. Braga, H.C. de Sousa, *Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – a comprehensive review*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 131 (2018) 22–78, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.010>.
- [6] M. Li, M. Azad, R. Davé, E. Bilgili, *Nanomilling of drugs for bioavailability enhancement: a holistic formulation-process perspective*, *Pharmaceutics* 8 (2016) 17, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020017>.
- [7] J.P. Möschtler, *Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process*, *Int. J. Pharm.* 453 (2013) 142–156, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.034>.
- [8] H. Chen, C. Khebtong, X. Yang, X. Chang, J. Gao, *Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs*, *Drug Discov. Today* 16 (2011) 354–360, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.02.009>.
- [9] A.A. Thorat, S.V. Dalvi, *Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: recent developments and future perspective*, *Chem. Eng. J.* 181–182 (2012) 1–34, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.044>.
- [10] V. Prosapio, E. Reverchon, I. De Marco, *Formation of PVP/nimesulide microspheres by supercritical antisolvent coprecipitation*, *J. Supercrit. Fluids* 118 (2016) 19–26, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.07.023>.
- [11] I.A. Cuadra, F. Zahran, D. Martín, A. Cabañas, C. Pando, *Preparation of 5-fluorouracil microparticles and 5-fluorouracil/poly(l-lactide) composites by a supercritical CO₂ antisolvent process*, *J. Supercrit. Fluids* 143 (2019) 64–71, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.027>.
- [12] I. De Marco, M. Rossmann, V. Prosapio, E. Reverchon, A. Brauer, *Control of particle size, at micrometric and nanometric range, using supercritical antisolvent precipitation from solvent mixtures: application to PVP*, *Chem. Eng. J.* 273 (2015) 344–352, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.100>.
- [13] G. Bibi, Y. Jung, J.C. Lim, S.H. Kim, *A faster approach to stereocomplex formation of high molecular weight polylactide using supercritical dimethyl ether*, *Polym. Korea* 39 (2015) 453–460, <https://doi.org/10.7317/pk.2015.39.3.453>.
- [14] L. Zhang, H. Nakamura, C. Lee, M. Uehara, H. Maeda, *Determination of kinetic effects on particle size and concentration: instruction for scale up*, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 18 (2011) 082027, <https://doi.org/10.1088/1757-899X/18/8/082027>.
- [15] R. Couto, S. Chambon, C. Aymonier, E. Mignard, B. Pavageau, A. Erriguible, S. Marre, *Microfluidic supercritical antisolvent continuous processing and direct spray-coating of poly(3-hexylthiophene) nanoparticles for OFET devices*, *Chem. Commun.* 51 (2015) 1008–1011, <https://doi.org/10.1039/C4CC07878K>.
- [16] F. Zhang, S. Marre, A. Erriguible, *Mixing intensification under turbulent conditions in a high pressure microreactor*, *Chem. Eng. J.* 122859 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122859>.
- [17] J. Mei, N.L.C. Leung, R.T.K. Kwok, J.W.Y. Lam, B.Z. Tang, *Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar!*, *Chem. Rev.* 115 (2015) 11718–11940, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00263>.
- [18] M. Champeau, J.-M. Thomassin, C. Jérôme, T. Tassaing, *Solubility and speciation of ketoprofen and aspirin in supercritical CO₂ by infrared spectroscopy*, *J. Chem. Eng. Data* 61 (2016) 968–978, <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00812>.
- [19] P.J. Larkin, *General outline for IR and Raman spectral interpretation*, *Infrared Raman Spectrosc.* Elsevier, 2018, pp. 135–151, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804162-8.00007-0>.
- [20] S. Foltran, E. Cloutet, H. Cramail, T. Tassaing, *In situ FTIR investigation of the solubility and swelling of model epoxides in supercritical CO₂*, *J. Supercrit. Fluids* 63 (2012) 52–58, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.12.015>.
- [21] T. Onfroy, O. Marie, *Determination of integrated molar absorption coefficients for gaseous phenol infrared bands and influence of water vapor on their values*, *Am. J. Anal. Chem.* 10 (2019) 9–22, <https://doi.org/10.4236/ajac.2019.101002>.
- [22] J.-N. Ollagnier, T. Tassaing, S. Harrison, M. Destarac, *Application of online infrared spectroscopy to study the kinetics of precipitation polymerization of acrylic acid in supercritical carbon dioxide*, *React. Chem. Eng.* 1 (2016) 372–378, <https://doi.org/10.1039/C6RE00022C>.
- [23] S. Marre, A. Adamo, S. Basak, C. Aymonier, K.F. Jensen, *Design and packaging of microreactors for high pressure and high temperature applications*, *Ind. Eng. Chem. Res.* 49 (2010) 11310–11320, <https://doi.org/10.1021/ie101346u>.
- [24] A. Erriguible, T. Fadli, P. Subra-Paternault, *A complete 3D simulation of a crystallization process induced by supercritical CO₂ to predict particle size*, *Comput. Chem. Eng.* 52 (2013) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2012.12.002>.
- [25] C. Neurohr, A. Erriguible, S. Laugier, P. Subra-Paternault, *Challenge of the supercritical antisolvent technique SAS to prepare crystal-pure powders of naprofen-nicotinamide*, *Chem. Eng. J.* 303 (2016) 238–251, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.129>.
- [26] J. Sierra-Pallares, D.L. Marchisio, M.T. Parra-Santos, J. García-Serna, F. Castro, M.J. Cocero, *A computational fluid dynamics study of supercritical antisolvent precipitation: mixing effects on particle size*, *AIChE J.* 58 (2012) 385–398, <https://doi.org/10.1002/aic.12594>.
- [27] S. Amiroudine, J.-P. Caltagirone, A. Erriguible, *A Lagrangian-Eulerian compressible model for the trans-critical path of near-critical fluids*, *Int. J. Multiphase Flow* 59 (2014) 15–23, <https://doi.org/10.1016/j.ijmultiphaseflow.2013.10.008>.
- [28] J. Im, W. Bae, J. Lee, H. Kim, *Vapor-liquid equilibria of the binary carbon dioxide-tetrahydrofuran mixture system*, *J. Chem. Eng. Data* 49 (2004) 35–37, <https://doi.org/10.1021/je0202228>.
- [29] T. Voisin, A. Erriguible, G. Philippot, D. Ballenghien, D. Mateos, F. Cansell, B.B. Iversen, C. Aymonier, *Investigation of the precipitation of Na₂SO₄ in supercritical water*, *Chem. Eng. Sci.* 174 (2017) 268–276, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.09.009>.
- [30] C.R. Wilke, P. Chang, *Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions*, *AIChE J.* 1 (1955) 264–270, <https://doi.org/10.1002/aic.690010222>.
- [31] K. Goda, *A multistep technique with implicit difference schemes for calculating two- or three-dimensional cavity flows*, *J. Comput. Phys.* 30 (1979) 76–95, [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(79\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0021-9991(79)90088-3).
- [32] P.L. Roe, *Characteristic-based schemes for the Euler equations*, *Annu. Rev. Fluid Mech.* 18 (1986) 337–365, <https://doi.org/10.1146/annurev.fl.18.010186.002005>.
- [33] J. Picot, S. Glockner, *Reduction of the discretization stencil of direct forcing immersed boundary methods on rectangular cells: the ghost node shifting method*, *J. Comput. Phys.* 364 (2018) 18–48, <https://doi.org/10.1016/j.jcp.2018.02.047>.
- [34] J. Baldyga, J.R. Bourne, *Simplification of micromixing calculations. I. Derivation and application of new model*, *Chem. Eng. J.* 42 (1989) 83–92, [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(89\)85002-6](https://doi.org/10.1016/0300-9467(89)85002-6).
- [35] F. Zhang, A. Erriguible, S. Marre, *Investigating laminar mixing in high pressure microfluidic systems*, *Chem. Eng. Sci.* 205 (2019) 25–35, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.03.063>.
- [36] P.V. Danckwerts, *The effect of incomplete mixing on homogeneous reactions*, *Chem. Eng. Sci.* 8 (1958) 93–102, [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(58\)80040-8](https://doi.org/10.1016/0009-2509(58)80040-8).
- [37] A.D. Randolph, M.A. Larson, *Theory of Particulate Processes: Analysis and Techniques of Continuous Crystallization*, Academic Press, 1971.

Annexe 3 : Code de programmation pour la cartographie des intensités

```
1 clear all
2 clc
3
4 % Addition des intensités de chaque pixel pour toutes les images considérées.
5 filelist = readdir (pwd);
6 numfiles=numel(pwd);
7 A=[];
8 B=zeros(512,512);
9 for ii=3:(numfiles-1);
10     F=filelist{ii,:};
11     A=load(F);
12     A=A';
13     B=A+B;
14 end
15
16 % Création de la cartographie.
17 pcolor(B);
18 colormap('jet');
19 colorbar();
20 shading('interp');
21 caxis([0 25000]);
```

Annexe 4 : Code de programmation pour la cartographie des maxima des longueurs d'onde d'émission

```

1 clear all
2 clc
3
4 % Association de chaque courbe d'émission à une case de la cartographie.
5 filelist = readdir (pwd);
6 numfiles=numel(filelist);
7 A=[];
8 AA=[];
9 M=[];
10 m=[];
11 I=[];
12 c=1;
13 N=1;
14 a=1;
15 BBB=zeros(1,101);
16 AAA=[];
17
18 for ii=1:100
19 F=filelist[ii,:];
20 AA=load(F);
21 A=[A,AA];
22 endfor
23
24 for t = 1:512 % Longueur du canal en pixel
25 for s = 1:512 % Largeur du canal en pixel
26 BBB=vertcat(BBB,AAA);
27 AAA=[];
28 for r = 1:118 % Nombre de scans en longueurs d'onde
29 aa=A(t, (s+(512*r)));
30 AAA=[AAA,aa];
31 endfor
32 endfor
33 endfor
34 BBB=vertcat(BBB,AAA);
35 BBB([1],:)=[];
36 BBB=BBB';
37
38 % Création d'un fit gaussien à partir du spectre d'émission.
39 % Association des maxima de la courbe d'émission à une case de la cartographie.
40 [i j]=size(BBB);
41 x=(1:118);
42 xx=(410:3:764);
43 y=BBB;
44 c=0;
45 m=[];
46 a=1;
47 N=1;
48
49 for u=1:262144
50 y=BBB(:,u);
51 [sigma, mu] = gaussfit( x, y);
52 Y(:,u)=1./ (sqrt(2.*pi).*sigma).*exp((- (x-mu).^2) ./ (2.*(sigma.^2)));
53 for v=1:(i-1);
54 if gt((Y((v+1),u)), (Y(v,u)))==0
55 b=0;
56 c=Y(v,u);
57 else
58 a=v;
59 N=c;
60 endif
61 endfor
62 M=xx(a);
63 m=[m,M];
64 I=[I,N];
65 dlmwrite ('m.txt', m);
66 dlmwrite ('I.txt', I);

```

Annexes

```
67 | endfor
68 |
69 | % Création de la cartographie à partir des maxima enregistrés.
70 | YY=512;
71 | XX=512;
72 | B=[];
73 | C=[];
74 |
75 | for u=0:(YY-1);
76 |     B=m((1+(XX*u):(XX*(u+1))));
77 |     C=vertcat(B,C);
78 | endfor
79 |
80 | C=flip(C);
81 | C=C';
82 | pcolor(C);
83 | colormap('jet');
84 | colorbar();
85 | shading('interp');
86 | caxis([450 600]);
```


Titre : Procédé anti-solvant microfluidique pour la synthèse de nanoparticules organiques fluorescentes en conditions supercritiques

Résumé :

Les nanoparticules organiques fluorescentes (FONs) sont aujourd'hui utilisées dans de nombreuses applications biomédicales d'imagerie cellulaire. Réduits à une échelle nanométrique, les FONs présentent un meilleur taux de dissolution dans le milieu biologique, ils peuvent notamment traverser plus facilement les membranes des tissus et être plus efficacement assimilés dans l'organisme. La plupart des molécules utilisées pour la fabrication des FONs sont très peu solubles dans les milieux aqueux, limitant ainsi leur biodisponibilité. Ainsi, une des stratégies considérées par les industries pharmaceutiques pour répondre à ces limitations consiste à diminuer la taille des particules d'ingrédients pharmaceutiques actifs (APIs). Dans cette thèse, nous proposons de combiner deux techniques d'intensification pour la synthèse des FONs, à savoir les procédés SAS (Supercritical Anti-Solvent) utilisant le dioxyde de carbone supercritique (sc-CO₂) et la technologie microfluidique (μF). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons testé différentes molécules organiques fluorescentes qui ont été mises en forme à l'aide du procédé μSAS. Des études paramétriques ont été réalisées dans le but de déterminer les conditions optimales pour la synthèse de nanoparticules. Enfin, des FONs dont l'intensité de fluorescence augmente à l'état agrégé (AIE) ont été choisies dans le but d'analyser *in situ* de manière originale les champs de nucléation de particules dans le système μSAS, pour pouvoir comparer ces résultats à la simulation.

Mots clés :

Procédé anti-solvant ; Microfluidique ; Fluides supercritiques ; Nanoparticules organiques fluorescentes (FONs)

Title: Process intensification for the synthesis of fluorescent organic nanoparticles by microfluidic supercritical anti-solvent

Abstract:

Nowadays, Fluorescent Organic Nanoparticles (FONs) are involved for cell imaging applications. After reducing the particle size to the nanosize range, FONs increase their dissolution rate in biological media. Thus, they present a high penetration in cell membranes and can be assimilated more efficiently. As is usual, poor water-soluble organic molecules encounter low oral bioavailability. To overcome the solubility problems, pharmaceutical companies develop approaches to decrease active pharmaceutical ingredient (API) particle size. During this thesis, we propose to combine two intensification strategies for FONs synthesis. First, we employ the Supercritical Anti-Solvent (SAS) process using supercritical carbon dioxide (sc-CO₂). The other point is that we add microfluidics (μF). We suggest to test various organic molecules and to process them by μSAS system. Parametric studies are performed to find optimal conditions for small particle size. Finally, specific FONs with Aggregation Induced Emission (AIE) effect are employed for the *in situ* characterization of nucleation field in μSAS. Experimental and simulation results are both compared and discussed.

Key words:

Anti-solvent process; Microfluidics; Supercritical fluids; Fluorescent Organic Nanoparticles (FONs)

ICMCB

Institut de la Chimie et de la Matière Condensée de Bordeaux, UMR5026,
87 avenue du Docteur Albert Schweitzer, 33600 Pessac