



**HAL**  
open science

# Approche microfluidique pour cristalliser les différentes phases d'un principe actif pharmaceutique

Mathilde F., M. Lambert

## ► To cite this version:

Mathilde F., M. Lambert. Approche microfluidique pour cristalliser les différentes phases d'un principe actif pharmaceutique. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Aix-Marseille Université, France, 2023. Français. NNT: . tel-04061781

**HAL Id: tel-04061781**

**<https://hal.science/tel-04061781v1>**

Submitted on 7 Apr 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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

# THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université  
le 29 mars 2023 par

## Mathilde Lambert

### Approche microfluidique pour cristalliser les différentes phases d'un principe actif pharmaceutique

#### Discipline

Physique et sciences de la matière

#### Spécialité

Matière condensée et Nanosciences

#### École doctorale

ED352 Physique et sciences de la matière

#### Laboratoire/Partenaires de recherche

Centre Interdisciplinaire de Nanosciences  
de Marseille CINaM-CNRS – UMR7325  
Sanofi Aventis R&D

Composition du jury	
Valérie DUPRAY	Rapporteuse
SMS – Université de Rouen Normandie (Rouen)	
François PUEL	Rapporteur
CentraleSupélec – Université Paris Saclay (Gif-sur-Yvette)	
Alexandra PEÑA REVELLEZ	Examinatrice
Institut Néel – CNRS (Grenoble)	
Pierrette GUICHARDON	Présidente du jury
Centrale Marseille (Marseille)	
Stéphane VEESLER	Directeur de thèse
CINaM-CNRS (Marseille)	
Nadine CANDONI	Codirectrice de thèse
Aix-Marseille Université (Marseille)	
Benoît ROBERT	Invité
Sanofi-Aventis R&D (Vitry-sur-Seine)	
Romain GROSSIER	Invité
CINaM-CNRS (Marseille)	



# Remerciements

A l'issue de ces trois années de thèse, je souhaite remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse Stéphane Veesler et Nadine Candoni, ainsi que Romain Grossier pour leur écoute, leurs conseils et les discussions que l'on a pu avoir et qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je voudrais également remercier Valérie Dupray et François Puel pour le temps qu'ils ont pris pour relire et commenter ce travail, ainsi que Pierrette Guichardon et Alexandra Peña-Revellez qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance de thèse.

D'autre part je remercie Sanofi Aventis, en particulier Benoît Robert et le département Early Development France pour le financement de ce projet, ainsi que le CINaM et en particulier l'équipe SSP pour leur accueil.

Je remercie tout particulièrement Mehdi Lagaize pour son important travail sur la plateforme microfluidique et sur les impressions 3D, Thirou Bactivelane pour l'instrumentation et la programmation des logiciels de contrôle de la caméra et des bains et Vasile Heresanu pour les mesures de diffraction des rayons X.

Merci également aux doctorants et postdocs avec qui j'ai passé ces trois années, en particulier Djouher Bedrane, Guillem Peybernès, Julien Lévêque et tous les autres.

Enfin, un grand merci à mes parents, ma famille et mes amis qui m'ont entourée et encouragée pendant toutes ces années.

# Affidavit

Je soussignée, Mathilde Lambert, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Stéphane Veesler et Nadine Candoni, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 23 janvier 2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

# Affidavit

I, undersigned, Mathilde Lambert, hereby declare that the work presented in this manuscript is my own work, carried out under the scientific direction of Stéphane Veesler and Nadine Candoni, in accordance with the principles of honesty, integrity and responsibility inherent to the research mission. The research work and the writing of this manuscript have been carried out in compliance with both the French national charter for Research Integrity and the Aix-Marseille University charter on the fight against plagiarism.

This work has not been submitted previously either in this country or in another country in the same or in a similar version to any other examination body.

Place Marseille, date January 23<sup>rd</sup>, 2023



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

# Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

M. Lambert, R. Grossier, M. Lagaize, T. Bactivelane, V. Heresanu, B. Robert, N. Candoni and S. Veessler, “Modular microfluidic platform for solubility measurement, nucleation statistics and polymorph screening of active pharmaceutical ingredients: Irbesartan, Rimonabant, Aripiprazole and Sulfathiazole”, *Journal of Crystal Growth*, soumis.

2) Participation aux conférences et écoles d’été au cours de la période de thèse :

1. Rencontres nationales Cristech, 2020 (Ecully) – Poster
2. R&D week Sanofi, 2020 (en ligne) – Poster
3. R&D week Sanofi, 2021, Vitry-sur-Seine - Poster
4. Cristal10, 2022 (Lyon) – Présentation orale
5. 7th European Conference on Crystal Growth (ECCG7), 2022 (Paris) – Poster
6. 14<sup>th</sup> International Conference on Crystal Growth of Organic Materials (CGOM14), 2022 (Bruxelles) – Poster
7. Rencontres nationales Cristech, 2022 (Ecully) – Présentation orale
8. R&D week Sanofi, 2022, Vitry-sur-Seine - Poster

# Résumé

La plupart des principes actifs pharmaceutiques peuvent exister à l'état solide sous différentes phases cristallines (polymorphes, solvates, cocristaux...). Celles-ci ont des propriétés physico-chimiques différentes, pouvant affecter l'efficacité d'un médicament, ainsi que son procédé de fabrication. Dans l'industrie pharmaceutique, un criblage de l'état solide a donc lieu dès les premières étapes du développement d'un médicament, afin d'identifier les phases existantes et choisir celle qui sera développée. A ce stade du développement, seulement une petite quantité de produit est disponible, limitant ainsi le nombre de tests réalisés. La microfluidique à base de gouttes permet de réduire les volumes de cristallisation à quelques nL, et donc les quantités de matière nécessaires. Il est ainsi possible de multiplier les expériences, apportant un point de vue statistique afin de répondre à la stochasticité du phénomène de nucléation.

Cette thèse présente le développement d'une plateforme microfluidique modulable utilisant des composants compatibles avec la majorité des solvants et facile d'utilisation, pour le criblage de l'état solide de molécules pharmaceutiques et des études fondamentales sur la nucléation. Elle permet de générer des solutions saturées et des gouttes à partir de poudre et de les caractériser, mesurer des solubilités, cristalliser des principes actifs dans les gouttes par refroidissement ou ajout d'un non-solvant et suivre la nucléation au cours du temps et de la température afin d'établir des statistiques globales de nucléation (toutes phases confondues). Enfin, les différentes phases obtenues sont caractérisées *in situ* par spectroscopie Raman afin d'établir des statistiques de nucléation phase par phase.

Mots clés : microfluidique, polymorphisme, cristallisation, nucléation, statistiques, solubilité, criblage, principes actifs pharmaceutiques.

# Abstract

Most of the active pharmaceutical ingredients (API) can exist, in the solid state, under several crystalline phases (polymorphs, solvates, cocrystals...). These phases have different physicochemical properties, which can affect the drug efficacy and its manufacturing process. In the pharmaceutical industry, a solid-state screening is thus carried out in the early stages of a drug development, to identify the existing phases and choose the one to develop. At this step, only a small amount of raw material is available, reducing the number of experiments. Droplet microfluidics is used to reduce the crystallization volumes to nanoliter scale, and thus the amount of product. This makes it possible to increase the number of experiments, bringing a statistical approach to address the stochasticity of nucleation.

This thesis presents the development of a modular microfluidic platform, easy to use and compatible with most solvents, for solid-state screening of active pharmaceutical ingredients and fundamental nucleation studies. It enables to generate saturated solutions and droplets starting from powder and their characterization, to measure solubility, to crystallize API by cooling or non-solvent addition processes and to monitor nucleation in time and as a function of the temperature to establish global statistics on nucleation (all phases included). Lastly, the different phases are identified *in situ* by Raman spectroscopy to perform phase to phase statistics.

Keywords: microfluidics, polymorphism, crystallisation, nucleation, statistics, solubility, screening, active pharmaceutical ingredients.

# Table des matières

<b>AFFIDAVIT</b>	<b>1</b>
<b>AFFIDAVIT</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DE PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES</b>	<b>3</b>
<b>RESUME</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>11</b>
<b>PARTIE A : BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>14</b>
<b>1. CRISTALLISATION EN SOLUTION</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Généralités sur la cristallisation en solution</b>	<b>15</b>
1.1.1. Aspects thermodynamiques	15
1.1.2. Nucléation	19
1.1.3. Croissance	22
1.1.4. Phases cristallines	23
<b>1.2. Etude du solide dans l'industrie pharmaceutique</b>	<b>25</b>
<b>2. MICROFLUIDIQUE POUR LA CRISTALLISATION</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Types de systèmes</b>	<b>28</b>
2.1.1. Puces microfluidiques	29
2.1.2. Microfluidique en capillaires	30
2.1.3. Gouttes déposées sur une surface	30
<b>2.2. Hydrodynamique</b>	<b>31</b>
2.2.1. Ecoulements en microfluidique	32
2.2.2. Génération des gouttes	33
<b>2.3. Nucléation en microfluidique</b>	<b>37</b>
2.3.1. Influence thermodynamique	37
2.3.1. Influence cinétique	38
<b>3. TECHNIQUES DE CARACTERISATION</b>	<b>39</b>
<b>3.1. Spectroscopie UV</b>	<b>39</b>
<b>3.2. Microscopie</b>	<b>40</b>
<b>3.3. Analyses thermiques</b>	<b>41</b>
3.3.1. DSC	41
3.3.2. TGA	43
<b>3.4. Diffraction des Rayons X</b>	<b>44</b>
<b>3.5. Spectroscopie Raman</b>	<b>46</b>
3.5.1. Principe de la spectroscopie Raman	46
3.5.2. Description d'un système Raman à fibres optiques	48

<b>CONCLUSION DE LA BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>53</b>
<b>PARTIE B : MATERIEL ET METHODES</b>	<b>55</b>
<b>1. PRODUITS</b>	<b>56</b>
<b>1.1. Principes actifs</b>	<b>56</b>
1.1.1. Rimonabant	56
1.1.2. Irbesartan	56
1.1.3. Aripiprazole	57
1.1.4. Sulfathiazole	59
<b>1.2. Solvants</b>	<b>61</b>
<b>1.3. Huile</b>	<b>61</b>
<b>2. MATERIEL MICROFLUIDIQUE</b>	<b>63</b>
<b>2.1. Gestion des débits</b>	<b>63</b>
2.1.1. Seringues	63
2.1.2. Pousse-seringues	63
2.1.3. Contrôle des débits	64
<b>2.2. Circuit microfluidique</b>	<b>64</b>
2.2.1. Capillaires	64
2.2.1. Connectique	65
<b>3. MATERIEL COMPLEMENTAIRE</b>	<b>66</b>
<b>3.1. Monopuits</b>	<b>66</b>
<b>3.2. Réacteurs EasyMax</b>	<b>67</b>
<b>3.3. Microscopie Raman</b>	<b>67</b>
<b>3.4. Analyses thermiques</b>	<b>68</b>
3.4.1. DSC	68
3.4.2. TGA	68
<b>3.5. DRX</b>	<b>68</b>
<b>3.6. Energie interfaciale - OCA20</b>	<b>70</b>
<b>3.7. Impression 3D</b>	<b>71</b>
<b>4. METHODES</b>	<b>72</b>
<b>4.1. Mesure d'énergie interfaciale</b>	<b>72</b>
<b>4.2. Mesures de solubilité</b>	<b>74</b>
4.2.1. En microfluidique	74
4.2.2. En Monopuits	76
<b>4.3. Génération des gouttes</b>	<b>76</b>
4.3.1. Description de la méthode	76
4.3.2. Analyse de la taille et la fréquence des gouttes	77
<b>4.4. Criblages</b>	<b>82</b>
4.4.1. En vials	82
4.4.2. En microfluidique	83
<b>CONCLUSION</b>	<b>84</b>

<b>PARTIE C : DEVELOPPEMENT DE LA PLATEFORME</b>	<b>85</b>
<b>1. GENERATION DE SOLUTIONS ET DE GOUTTES</b>	<b>86</b>
<b>1.1. Boite thermostatée</b>	<b>86</b>
<b>1.2. Circuit microfluidique</b>	<b>88</b>
1.2.1. Lit de poudre	88
1.2.2. Régulation de la pression	89
<b>2. CARACTERISATION UV DES SOLUTIONS ET DES GOUTTES</b>	<b>91</b>
<b>2.1. Description du module</b>	<b>91</b>
<b>2.2. Optimisation du signal</b>	<b>92</b>
2.2.1. Choix de la gamme spectrale	92
2.2.2. Choix de la concentration	93
2.2.3. Choix du capillaire	93
2.2.4. Comparaison des spectromètres	94
<b>2.3. Amélioration du support</b>	<b>95</b>
<b>3. STOCKAGE ET REFROIDISSEMENT DES GOUTTES</b>	<b>97</b>
<b>3.1. Description du module</b>	<b>97</b>
3.1.1. Spirale de stockage	97
3.1.2. Régulation de température	98
<b>3.2. Considérations thermiques</b>	<b>100</b>
3.2.1. Calibration de la température dans la cuve	100
3.2.2. Refroidissements lents	101
3.2.3. Trempes	102
<b>3.3. Simplification du module</b>	<b>106</b>
<b>4. OBSERVATION DES GOUTTES</b>	<b>107</b>
<b>4.1. Système optique</b>	<b>107</b>
<b>4.2. Prise de photos</b>	<b>108</b>
4.2.1. Définition d'une matrice	108
4.2.2. Réduction du temps d'acquisition	111
4.2.3. Choix des paramètres d'acquisition	111
<b>4.3. Traitement</b>	<b>112</b>
4.3.1. Reconstruction de l'image globale	112
4.3.2. Réduction du nombre d'images	115
4.3.3. Positions réelles des gouttes	117
4.3.4. Comptage des cristaux	119
<b>5. CARACTERISATION RAMAN</b>	<b>120</b>
<b>5.1. Choix du laser</b>	<b>120</b>
<b>5.2. Choix du spectromètre</b>	<b>120</b>
5.2.1. Spectromètres testés	120
5.2.2. Comparaison des spectromètres	121
5.2.3. Choix de la fente d'entrée	121

<b>5.3. Choix de la sonde</b>	<b>122</b>
<b>5.4. Adaptation à la microfluidique</b>	<b>124</b>
5.4.1. Support de sonde	124
5.4.2. Choix du capillaire	126
<b>5.5. Preuve de concept de l'analyse Raman</b>	<b>127</b>
5.5.1. Analyse <i>in situ</i>	127
5.5.2. Distinction de polymorphes <i>in situ</i>	128
5.5.3. Analyse statique d'une série de gouttes ( <i>offline</i> )	129
5.5.4. Analyse dynamique d'une série de gouttes ( <i>online</i> )	131
<b>6. UNE PLATEFORME MODULABLE</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>134</b>
<b>PARTIE D : RESULTATS – DISCUSSION</b>	<b>136</b>
<b>1. GENERATION DES GOUTTES</b>	<b>137</b>
<b>1.1. Mesure des énergies interfaciales</b>	<b>137</b>
<b>1.2. Génération des gouttes</b>	<b>138</b>
1.2.1. Analyse des tailles et des fréquences	139
1.2.2. Ajout d'un non-solvant dans les gouttes	140
<b>2. MESURES DE SOLUBILITE</b>	<b>144</b>
<b>2.1. Irbesartan</b>	<b>145</b>
<b>2.2. Rimonabant</b>	<b>145</b>
<b>2.3. Aripiprazole</b>	<b>146</b>
<b>2.4. Sulfathiazole</b>	<b>148</b>
<b>3. STATISTIQUES DE NUCLEATION</b>	<b>149</b>
<b>3.1. Sulfathiazole</b>	<b>149</b>
3.1.1. Dans l'eau	149
3.1.2. Dans l'acétonitrile	151
<b>3.2. Rimonabant</b>	<b>154</b>
3.2.1. Dans l'acétonitrile	154
3.2.2. Dans l'éthanol	160
<b>3.3. Aripiprazole</b>	<b>163</b>
3.3.1. Dans l'acétonitrile	163
3.3.2. Criblage des solvants	163
<b>3.4. Bilan sur les statistiques globales de nucléation</b>	<b>164</b>
<b>4. CRIBLAGES DES PHASES</b>	<b>166</b>
<b>4.1. En vials (volume du mL)</b>	<b>166</b>
4.1.1. Aripiprazole	166
4.1.2. Rimonabant	168
<b>4.2. En microfluidique (volume du nL)</b>	<b>170</b>
4.2.1. Rimonabant	171
4.2.2. Sulfathiazole	173

<b>CONCLUSION</b>	<b>181</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>184</b>
<b>CONCLUSION GENERALE DE LA THESE</b>	<b>185</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>188</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>195</b>
<b>ANNEXE 1 : COMPOSANTS MICROFLUIDIQUES</b>	<b>196</b>
<b>ANNEXE 2 : CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LE CIBLAGE EN VIALS DU RIMONABANT</b>	<b>197</b>
<b>ANNEXE 3 : METHODE DE CALIBRATION DE LA CAMERA</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXE 4 : CARACTERISTIQUES DES SYSTEMES RAMAN TESTES</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE 5 : POSITIONNEMENT DE LA SONDE RAMAN</b>	<b>200</b>
<b>ANNEXE 6 : DIFFRACTOGRAMME RX DES CRISTAUX D'ARIPRAZOLE</b>	<b>201</b>

# Introduction

Ce manuscrit présente le travail effectué pendant ma thèse intitulée « *Approche microfluidique pour cristalliser les différentes phases d'un principe actif pharmaceutique* ». Cette thèse est une collaboration entre le Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille (CINaM) et Sanofi R&D de Vitry-sur-Seine. L'objectif principal est le développement d'un outil pour le criblage de l'état solide de molécules d'intérêt pharmaceutique en microfluidique, et son implémentation dans le laboratoire industriel de Sanofi. D'un point de vue plus fondamental, cet outil a notamment pour but d'étudier la nucléation des différentes phases cristallines afin de répondre à la stochasticité du phénomène de nucléation.

L'état solide a depuis toujours été un point d'intérêt pour l'Homme. George Bauer, dit Agricola (XVI<sup>ème</sup> siècle), est cependant considéré comme le père de la minéralogie grâce à son œuvre *De Re Metallica*. Il faudra ensuite attendre le XVII<sup>ème</sup> siècle pour que la minéralogie soit considérée comme une science, et le XVIII<sup>ème</sup> siècle, grâce aux travaux de Romé de l'Isle et de son élève René-Just Haüy, pour voir apparaître la notion de cristal. A cette époque, Haüy suppose qu'un cristal résulte de l'arrangement périodique de « molécules intégrantes ». [1]

Cette hypothèse ne pourra être testée expérimentalement qu'au XX<sup>ème</sup> siècle, suite à la découverte en 1895 des rayons X par Röntgen, de longueur d'onde de l'ordre de l'angström (0,1 nm), soit du même ordre de grandeur que la distance interatomique. Les physiciens von Laue et W.H. et W.L. Bragg se servent de cette propriété pour étudier la diffraction des rayons X par un cristal, et ainsi confirmer la périodicité de l'arrangement cristallin prédite par Haüy et résoudre les premières structures cristallines [2].

C'est également à la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle que Klaproth (1788) observe que le carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) peut cristalliser à la fois sous forme de calcite et d'aragonite. Cela constitue le premier cas observé de polymorphisme, bien que la notion n'ait été introduite que dans les années 1820 par Mitscherlich. Un autre exemple bien connu de polymorphisme est celui du carbone. En effet, en 1809, H. Davy a mis en évidence que le graphite et le diamant n'étaient en fait que deux arrangements différents d'atomes de carbone [3]. Dans le cas d'un atome seul et non d'une molécule, on parle plus exactement d'allotropie.

Bien que le polymorphisme de molécules organiques soit connu depuis 1832, avec le cas de la benzamide, découvert par Wöhler et Liebig, il a fallu attendre la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, notamment suite à l'incident du Ritonavir en 1998 qui a conduit à un retardement de la mise sur le marché du médicament, pour qu'une étude approfondie de l'état solide soit systématiquement menée dans les laboratoires pharmaceutiques [4], [5]. En effet, une proportion importante des molécules de principes actifs présente du polymorphisme. Or deux phases cristallines d'une même molécule possèdent des propriétés physico-chimiques différentes, ce qui peut avoir un fort impact sur les propriétés du médicament ainsi que sur sa production.

Cette étude de l'état solide a lieu dès les premières phases de développement du médicament, sous forme de criblage : de nombreuses conditions expérimentales sont testées afin d'obtenir le plus de formes cristallines différentes. Cependant, à ce stade du développement, seulement une petite quantité de produit est disponible (quelques grammes), limitant ainsi le nombre de tests réalisés. La microfluidique, qui se développe déjà depuis la fin du XX<sup>ème</sup> siècle dans de nombreux domaines, est donc apparue comme technique de choix pour palier à ce problème, car elle met en jeu de faibles quantités de matière et permet ainsi de multiplier les expériences. Cependant, bien que de nombreuses techniques aient été développées pour la cristallisation, peu d'entre elles sont actuellement utilisées en industrie pour différentes raisons, notamment leur coût et leur difficulté d'utilisation.

Le CINaM a donc développé depuis quelques années un système microfluidique à base de gouttes utilisant principalement du matériel disponible commercialement et facile d'utilisation, permettant à terme de mener une étude approfondie de l'état solide en laboratoire industriel.

Au début de ce travail de thèse, le système microfluidique permettait de générer des solutions saturées et des gouttes à partir de poudre de principe actif. Des premiers essais de criblage de polymorphes avaient également été menés par refroidissement de quelques dizaines de gouttes saturées. Les cristaux obtenus étaient ensuite caractérisés par diffraction des rayons X ou spectroscopie Raman après isolement [6], [7].

L'objectif de ce travail de thèse a donc été de développer une plateforme de cristallisation en microfluidique à base de gouttes facile d'utilisation et transposable en industrie pour le criblage de polymorphes. La plateforme doit permettre à la fois de nucléer de nombreux cristaux (dans plusieurs centaines de gouttes qui sont autant de nanocristalloirs), en utilisant différents procédés de cristallisation, et à la fois de les caractériser directement sur la plateforme. Le nombre de gouttes générées, et donc d'expériences indépendantes permet d'effectuer des statistiques globales sur la nucléation (toutes phases confondues) et des statistiques sur chaque phase cristalline, afin de répondre à la stochasticité du phénomène de nucléation. Une fois développée, la plateforme a également été implémentée sur le site de recherche de Sanofi à Vitry-sur-Seine. Ce manuscrit a pour but d'expliquer le travail effectué au cours de ma thèse. Il se décompose en quatre parties.

La première partie est un état de l'art présentant les principaux aspects de la cristallisation et son impact dans l'industrie pharmaceutique. Ensuite, les généralités sur la microfluidique pour la cristallisation et la mécanique des fluides (hydrodynamique) à cette échelle sont abordées, avant de souligner l'influence de la réduction du volume sur la cristallisation. Enfin, une description des principales techniques de caractérisation des solutions et des solides utilisées durant cette thèse sont présentées.

La deuxième partie présente les différents produits (principes actifs, solvants et huiles) ainsi que les principaux composants microfluidiques et les équipements externes à la plateforme qui ont été utilisés lors de cette thèse. Les méthodes expérimentales pour les mesures

d'énergies interfaciales, les mesures de solubilité, la génération des gouttes et le criblage des polymorphes y sont également décrites.

La troisième partie du manuscrit décrit la plateforme développée au cours de cette étude. Elle présente l'ensemble des améliorations apportées sur la plateforme au cours de cette thèse, sur la génération des solutions et des gouttes, leur caractérisation par spectroscopie UV, le stockage et le refroidissement des gouttes pour la cristallisation et le module d'observation. Le choix d'un système de spectroscopie Raman pour la caractérisation des cristaux dans les gouttes (*in situ*) est également détaillé, ainsi que l'implémentation de ce système sur la plateforme microfluidique.

La dernière partie présente les différents résultats obtenus dans le cadre de la thèse. Un premier chapitre est consacré à la génération des gouttes, puis je présenterai des mesures de solubilité dans des cas faisant intervenir différentes phases cristallines. Enfin, des criblages de phases (polymorphes) en microfluidique sont décrits, avec à la fois des statistiques globales de nucléation (statistiques sur le nombre de cristaux apparus, toutes phases confondues) et des statistiques sur chacune des phases cristallines obtenues, en comparant notamment l'influence du profil de refroidissement utilisé.

---

## Partie A : Bibliographie

---

*Cette partie se décompose en trois chapitres. Le premier chapitre s'intéresse à la cristallisation en solution. Il présente les principales notions de thermodynamique et de cinétique sur la nucléation et la croissance des cristaux en solution, ainsi que le polymorphisme, et son impact dans l'industrie pharmaceutique. Le second chapitre porte sur la microfluidique pour la cristallisation, en décrivant les principaux types de systèmes microfluidiques existants, l'hydrodynamique mise en jeu à cette échelle et l'impact de la réduction du volume (de l'ordre du nanolitre) sur la cristallisation. Enfin, le dernier chapitre décrit les principales techniques de caractérisation des solutions et des solides utilisées durant cette thèse.*

# 1. Cristallisation en solution

Un cristal correspond à un état solide organisé d'un matériau, défini par un arrangement périodique dans l'espace des atomes ou molécules qui le composent. Le procédé de fabrication de tels solides s'appelle la cristallisation. Il s'agit d'un phénomène thermodynamique. Il existe différentes méthodes pour cristalliser un composé : par passage de l'état gazeux à l'état solide, par cristallisation en liquide fondu (passage de l'état liquide à l'état solide), comme lors du refroidissement de l'eau pour former de la glace ou par cristallisation en solution. Dans cette thèse, on ne s'intéressera qu'à la cristallisation en solution, qui est la plus répandue dans l'industrie pharmaceutique.

Ce chapitre présente les généralités sur la cristallisation en solution, avec la définition des principales notions thermodynamiques et du polymorphisme, puis son application dans l'industrie pharmaceutique.

## 1.1. Généralités sur la cristallisation en solution

### 1.1.1. Aspects thermodynamiques

Dans ce chapitre, nous définirons les principales notions de thermodynamique nécessaires à la compréhension de la cristallisation en solution. Les notions présentées ici s'appliquent sur des systèmes considérés comme fermés (sans évaporation) à pression atmosphérique supposée constante. Ainsi, on ne considère que le système binaire solvant-soluté, considéré comme idéal. En réalité, la solution est également en équilibre avec son environnement, notamment l'air.

#### 1.1.1.1. Solubilité

La première notion à définir lorsque l'on parle de cristallisation en solution est la solubilité  $C_s$ . Elle correspond à la quantité de produit (soluté) que l'on peut dissoudre dans un solvant donné à température et pression données. Il s'agit d'un équilibre thermodynamique, c'est à dire un état dans lequel le système solvant-soluté a une énergie minimale. Il peut s'agir d'un minimum global (stable) ou local (métastable).

A pression constante, si la solubilité augmente avec la température (Figure 1a), on parle de solubilité directe. C'est le cas de la majorité des composés, notamment parmi les molécules pharmaceutiques. Au contraire, si la solubilité diminue lorsque la température augmente (Figure 1b), on parle de solubilité inverse. C'est le cas du calcaire  $\text{CaCO}_3$  par exemple.

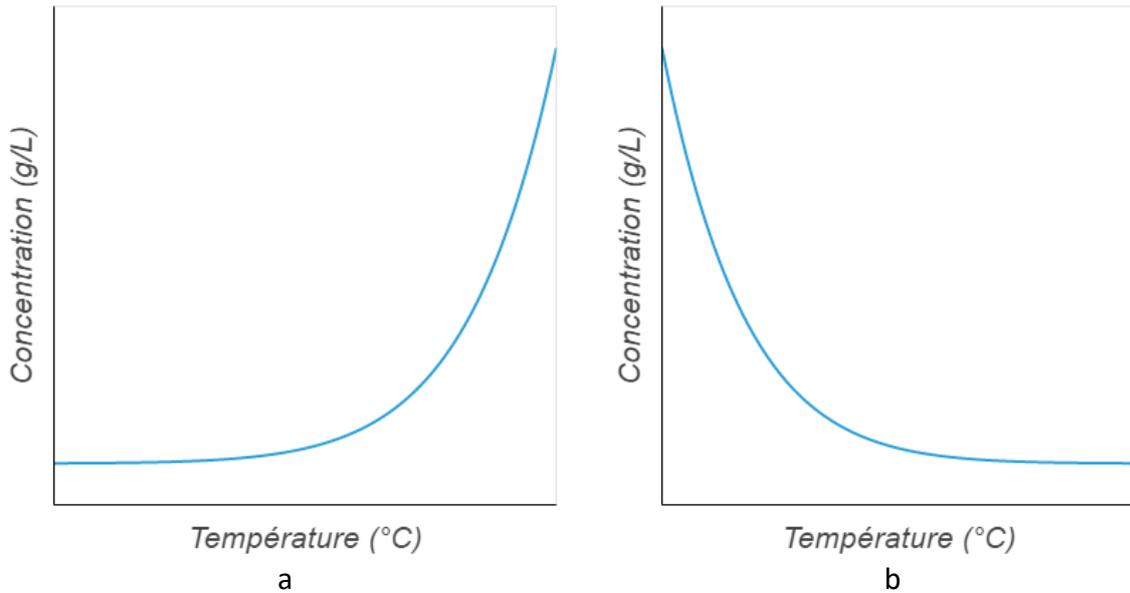


Figure 1 : Allure des courbes de solubilité dans le cas (a) d'une solubilité directe et (b) d'une solubilité inverse.

Différents modèles ont été proposés pour modéliser la concentration en fonction de la température [8]. Le modèle le plus utilisé est celui de van't Hoff, à pression et volume considérés comme constants. Ce modèle s'appuie sur la relation de van't Hoff isobare et isochore qui relie la constante d'équilibre d'une réaction chimique  $K$  à la température  $T$  par :

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H_s}{RT^2} \quad (1)$$

Où  $\Delta H_s$  est l'enthalpie molaire partielle du soluté en solution et  $R$  la constante des gaz parfaits.

De plus,  $K$  est défini par :

$$K = \prod_{i=1}^N \alpha_i(eq.)^{\nu_i} \quad (2)$$

Où les coefficients  $\alpha_i(eq.)$  sont les activités des espèces du système à l'équilibre, ici le solvant et le soluté, et  $\nu_i$  les coefficients des différentes espèces dans la réaction chimique considérée (ici  $\nu_i=1$  pour le solvant et le soluté). En solution, le solvant est majoritaire et est ainsi considéré comme une phase pure, d'activité  $\alpha_{solvant}(eq.) = 1$ . De plus, l'activité du soluté est directement reliée à sa concentration à l'équilibre, c'est-à-dire sa solubilité  $C_s$  par :

$$\alpha_{soluté} = \gamma_s \frac{C_s}{C^\circ} \quad (3)$$

Où  $\gamma_s$  est le coefficient d'activité du soluté, proche de 1 en solution diluée idéale, et  $C^\circ$  la concentration de référence, égale par convention à 1 mol/L, permettant d'adimensionnaliser

la valeur de l'activité. Pour des questions pratiques, ce terme n'est pas toujours écrit, et nous nous en affranchirons dans la suite, en considérant  $C_S$  sans unités.

Par simplification, on a donc l'approximation :

$$\alpha_{\text{soluté}} = C_S \quad (4)$$

La relation de van't Hoff (1) devient alors :

$$\frac{d \ln C_S}{dT} = \frac{\Delta H_S}{RT^2} \quad (5)$$

Certains modèles considèrent  $\Delta H_S$  comme dépendante de la température [8]. Cependant dans le modèle de van't Hoff, cette enthalpie est considérée comme indépendante de la température, ce qui permet d'intégrer la relation (5) pour donner une relation linéaire de la forme :

$$\ln(C_S) = -a \frac{1}{T} + b \quad (6)$$

Avec  $a = \frac{\Delta H_S}{R}$  et  $b = \frac{\Delta S_S}{R}$  où  $\Delta S_S$  est l'entropie de dissolution.

Bien qu'elle soit issue de plusieurs approximations (idéalité de la solution, pression constante, volume constant...), cette relation permet généralement de bien modéliser la courbe de solubilité des principes actifs par rapport aux données expérimentales, et est de ce fait fortement utilisée pour tracer les courbes de solubilité. En effet, la linéarisation des données expérimentales permet de facilement remonter aux coefficients a et b, et ainsi tracer la concentration en fonction de la température avec :

$$C_S = \exp \left( -a \frac{1}{T} + b \right) \quad (7)$$

Cette relation sera donc utilisée dans cette thèse pour représenter les courbes de solubilité.

### 1.1.1.2. Sursaturation

En thermodynamique, un système tend toujours à se retrouver dans un état d'équilibre, selon le principe de Le Chatelier. La force motrice permettant d'aller d'un état instable vers un état stable réside dans la différence des potentiels chimique entre les deux états :

$$\Delta\mu = \mu - \mu_S \quad (8)$$

Où  $\mu$  est le potentiel chimique du système de départ (J), ici d'une solution de concentration  $C$ , et  $\mu_S$  le potentiel chimique du système à l'équilibre (J), ici d'une solution de concentration  $C_S$ , éventuellement en équilibre avec une phase solide.

En solution, on a :

$$\Delta\mu = kT \ln \left( \frac{C}{C_S} \right) \quad (9)$$

Où  $k$  est la constante de Boltzmann et  $T$  la température.

En cristallisation, on définit ainsi la sursaturation par :

$$\beta = \frac{C}{C_S} \quad (10)$$

Ainsi, la sursaturation  $\beta$  est souvent plus utilisée que  $\Delta\mu$  car accessible directement avec les solubilités. Elle représente l'excès par rapport à la solubilité.

A l'équilibre thermodynamique, on a  $\beta=1$ , et donc  $\Delta\mu=0$ , ce qui signifie que le système n'évolue pas. Si la concentration de la solution est inférieure à la solubilité, c'est à dire  $\beta < 1$  et donc  $\Delta\mu < 0$ , on parle d'un état sous-saturé. Si l'on rajoute du produit solide dans cette solution, il va se dissoudre jusqu'à ce que la concentration soit égale à la solubilité.

Au contraire, si la concentration de la solution est supérieure à la solubilité, c'est-à-dire  $\beta > 1$  et donc  $\Delta\mu > 0$ , l'excès de produit va cristalliser, pour que la concentration de produit en solution diminue, jusqu'à atteindre la solubilité (Figure 2).

On rencontre aussi le terme  $(C - C_S)$  pour des questions de facilité de lecture, cette différence permet en réalité de revenir à la quantité de produit qui va nucléer pour arriver à l'équilibre thermodynamique (Figure 2).

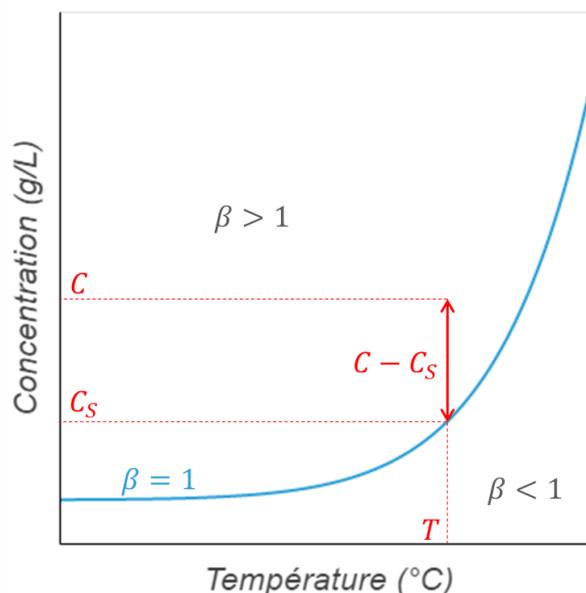


Figure 2 : Allure d'une courbe de solubilité ( $\beta = 1$ ) et des zones sous-saturée ( $\beta > 1$ ) et sursaturée ( $\beta < 1$ ). Si l'on considère une solution sursaturée de concentration  $C$  à température  $T$ , la quantité de produit pouvant cristalliser est donnée par  $C - C_S$  où  $C_S$  est la solubilité du produit à cette température.

En pratique, il existe différentes techniques pour générer de la sursaturation en solution :

- La cristallisation par évaporation du solvant permet d'augmenter la concentration du produit en solution. Ce procédé est utilisé dans les marais salants par exemple, dans lesquels l'eau est évaporée afin de récupérer le sel.
- L'ajout d'un solvant dans lequel le soluté est peu soluble permet de réduire sa solubilité dans le mélange global et donc le faire cristalliser.

- Sur le même principe l'ajout d'un additif ou d'un réactif chimique peut également permettre de réduire la solubilité du produit d'intérêt, par réaction ou modification des propriétés de la solution comme son pH.
- Enfin, on peut diminuer la valeur de la solubilité par variation de la température, en refroidissant la solution dans le cas d'une solubilité directe, ou en la chauffant dans le cas d'une solubilité indirecte.

Dans cette thèse, j'utiliserai principalement la cristallisation par refroidissement et je présenterai quelques expériences avec ajout d'un non-solvant.

## 1.1.2. Nucléation

### 1.1.2.1. Généralités sur la nucléation

La nucléation est définie comme la « naissance » d'un cristal. Elle correspond à la formation d'un premier germe (ou nucléus), de taille suffisante pour continuer de croître. On parle de nucléation primaire lorsque le système ne contient aucun cristaux de la phase qui va apparaître avant la nucléation. La nucléation primaire est dite homogène si elle n'est pas influencée par une surface (impuretés, parois...) et hétérogène sinon. On parle de nucléation secondaire lorsque le système contient déjà des cristaux de la même phase [9]. Ce type de nucléation a lieu principalement dans les réacteurs agités, où les cristaux sont soumis à divers phénomènes tels que l'attrition (chocs de cristaux entre eux ou avec une paroi) ou le cisaillement de la solution, qui peuvent donner naissance à de nouveaux germes. La nucléation secondaire est couramment utilisée dans l'industrie, où les solutions saturées sontensemencées (une petite quantité de poudre de phase souhaitée est ajoutée dans la solution) afin d'amorcer et contrôler la nucléation. Cela permet aussi de contrôler la phase obtenue.

Dans le cadre de cette thèse, on considèrera que l'on observe uniquement de la nucléation primaire. Le modèle le plus utilisé pour décrire ce phénomène est la théorie classique de la nucléation (TCN)[10]. Ce modèle considère des agrégats de molécules qui se forment et se défont par ajout ou perte d'une molécule de manière aléatoire en fonction de fluctuations locales d'énergie, ce qui fait de la nucléation un phénomène stochastique. Lorsque l'agrégat atteint une taille suffisamment importante, on parle de germe. La formation d'un germe nécessite une énergie suffisante, appelée énergie libre d'activation de germination. Celle-ci est donnée par :

$$\Delta G = -n(\mu - \mu_s) + S\gamma \quad (11)$$

Où :

$n$  : nombre de molécules constituant le germe,

$\mu$  : potentiel chimique d'une molécule en solution sursaturée (J),

$\mu_s$  : potentiel chimique d'une molécule à l'équilibre solution-cristal (J),

$S$  : surface du germe (m<sup>2</sup>),

$\gamma$  : énergie interfaciale entre le cristal et la solution (J/m<sup>2</sup>).

En modélisant le germe par une sphère de rayon  $r$  composée de molécules de volume  $\Omega$ , on a donc :

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} \Delta\mu + 4\pi r^2 \gamma \quad (12)$$

Cela permet d'observer facilement que le terme de volume  $-n\Delta\mu$  diminue lorsque la taille du germe ( $r$ ) augmente, tandis que le terme de surface  $S\gamma$  augmente avec la taille du germe. Sur la Figure 3, ces deux contributions ainsi que  $\Delta G(r)$  sont représentées pour un germe sphérique. On observe ainsi qu'il y a compétition entre le terme surfacique, majoritaire pour les petits rayons, et le terme volumique, dont l'influence devient majoritaire pour les germes de taille plus importante.

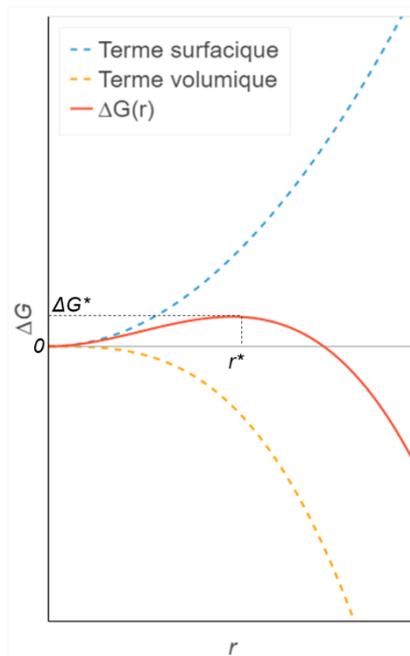


Figure 3 : Energie d'activation de germination  $\Delta G$  en fonction de la taille du germe, pour un germe sphérique de rayon  $r$ . Les composantes surfaciques et volumiques sont représentées en pointillés. L'état d'équilibre instable correspond au germe critique de rayon  $r^*$  et d'énergie d'activation  $\Delta G^*$ . (d'après [9])

On voit également que  $\Delta G$  atteint une valeur maximale  $\Delta G^*$  pour un rayon  $r^*$ , qui correspondent à un état d'équilibre instable, avec :

$$\Delta G^* = -\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3\Delta\mu^2} \quad (13)$$

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{\Delta\mu} \quad (14)$$

Si on enlève ou on rajoute une molécule à ce germe critique, le germe va sortir de l'état d'équilibre et le système va chercher à minimiser son énergie  $\Delta G$ . Ainsi, pour  $r < r^*$ , le germe va se dissoudre, tandis que pour  $r > r^*$ , il va croître jusqu'à arriver à un nouvel état d'équilibre, une fois que la sursaturation aura été consommée ( $\Delta\mu = 0$ ).

### 1.1.2.2. Aspect cinétique de la nucléation

Nous venons de décrire l'aspect thermodynamique de la cristallisation. Cependant, lorsque l'on parle de nucléation, on ne peut pas négliger l'aspect cinétique, en compétition avec la thermodynamique, et qui est déterminant pour la qualité des cristaux (taille, nombre, phase...).

On définit donc la fréquence de nucléation comme le nombre de cristaux qui nucléent dans la solution par unité de temps et de volume, par [9], [11]:

$$J = A \exp\left(\frac{-\Delta G^*}{kT}\right) \quad (15)$$

Où  $A$  est un facteur cinétique dépendant du système cristal-solution, en particulier de sa concentration.

Pour un germe sphérique, on peut relier  $J$  à la sursaturation par une expression de la forme :

$$J = A \exp\left(\frac{B}{\ln^2(\beta)}\right) \quad (16)$$

Où  $B$  est un terme thermodynamique dépendant de la température et du système cristal-solution, en particulier de l'énergie interfaciale entre le cristal et la solution, du volume du cristal et de sa densité.

Pour des faibles valeurs de  $\beta$ , la fréquence de nucléation peut ainsi être très faible, ce qui signifie qu'un cristal ne peut pas apparaître dans une échelle de temps raisonnable. On peut ainsi définir une limite de zone métastable (Figure 4), dans laquelle, bien que le système soit sursaturé, on n'observera pas de nucléation. La largeur de cette zone dépend de nombreux facteurs, notamment du système solvant-soluté et de son volume.

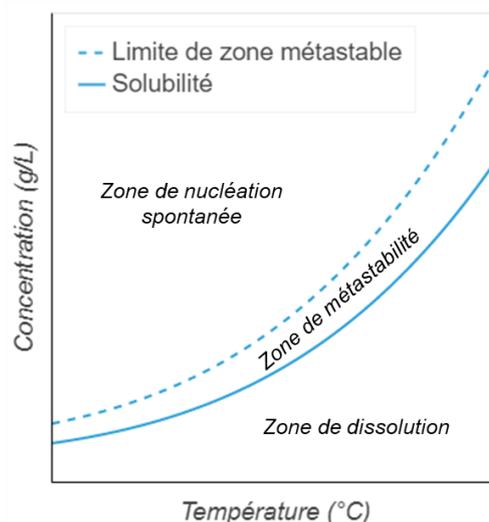


Figure 4 : Allure d'une courbe de solubilité en fonction de la température et de la limite de zone métastable (pointillés).

On peut relier la fréquence de nucléation  $J$  au volume  $V$  par :

$$J = \frac{N}{V\Delta t} \quad (17)$$

Où  $N$  est le nombre de cristaux apparus pendant  $\Delta t$ , l'intervalle de temps considéré.

On peut ainsi définir le temps d'induction de la nucléation  $t_n$  comme le temps nécessaire pour obtenir un cristal par :

$$t_n = \frac{1}{JV} \quad (18)$$

On constate que plus le volume est important, plus  $t_n$  est faible, mais au contraire, en diminuant le volume, on augmente, parfois fortement, ce temps d'induction. Ainsi, dans des petits volumes, la zone métastable est élargie et la compétition entre la cinétique et la thermodynamique est d'autant plus visible.

### 1.1.3. Croissance

Une fois le germe cristallin formé ( $r > r^*$ ), de nouvelles molécules vont s'ajouter à ce germe jusqu'à ce que toute la sursaturation ait été consommée et que l'on arrive à l'état d'équilibre entre le cristal et la solution, c'est-à-dire à la solubilité (pour  $\Delta\mu = 0$ ). On parle de croissance du cristal. Le cristal possède différentes faces, dépendantes des éléments de symétrie de celui-ci, qui définissent sa morphologie (cubique, octaédrique...). Ces différentes faces ont des vitesses de croissances différentes, dépendant du milieu (solvant, concentration, présence d'impuretés...), ce qui donne la forme finale observable du cristal, appelée faciès [12]. Ainsi, deux cristaux pourront avoir la même morphologie mais des faciès différents. Sur la Figure 5, les trois cristaux présentent les mêmes faces, d'une morphologie cubique, mais n'ont pas le même faciès.

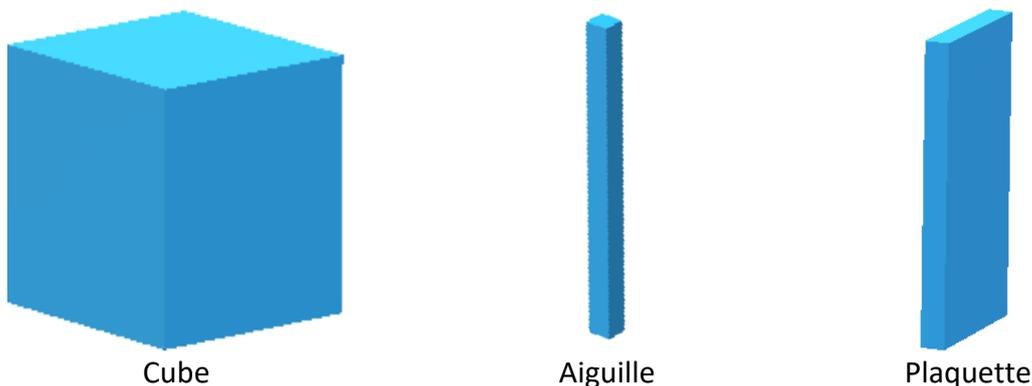


Figure 5 : Cristaux de morphologie cubique et faciès (a) cubique, (b) aciculaire et (c) en plaque.

## 1.1.4. Phases cristallines

### 1.1.4.1. Définitions cristallographiques

Un cristal est un arrangement périodique dans les 3 dimensions de l'espace des molécules qui la composent. On définit une maille élémentaire comme le plus petit volume, contenant un nombre entier de molécules ou d'atomes, qui se répète par translation dans toutes les directions dans le cristal, pour former le réseau cristallin. Il existe 14 types de réseaux en trois dimensions, les réseaux de Bravais (Figure 6).

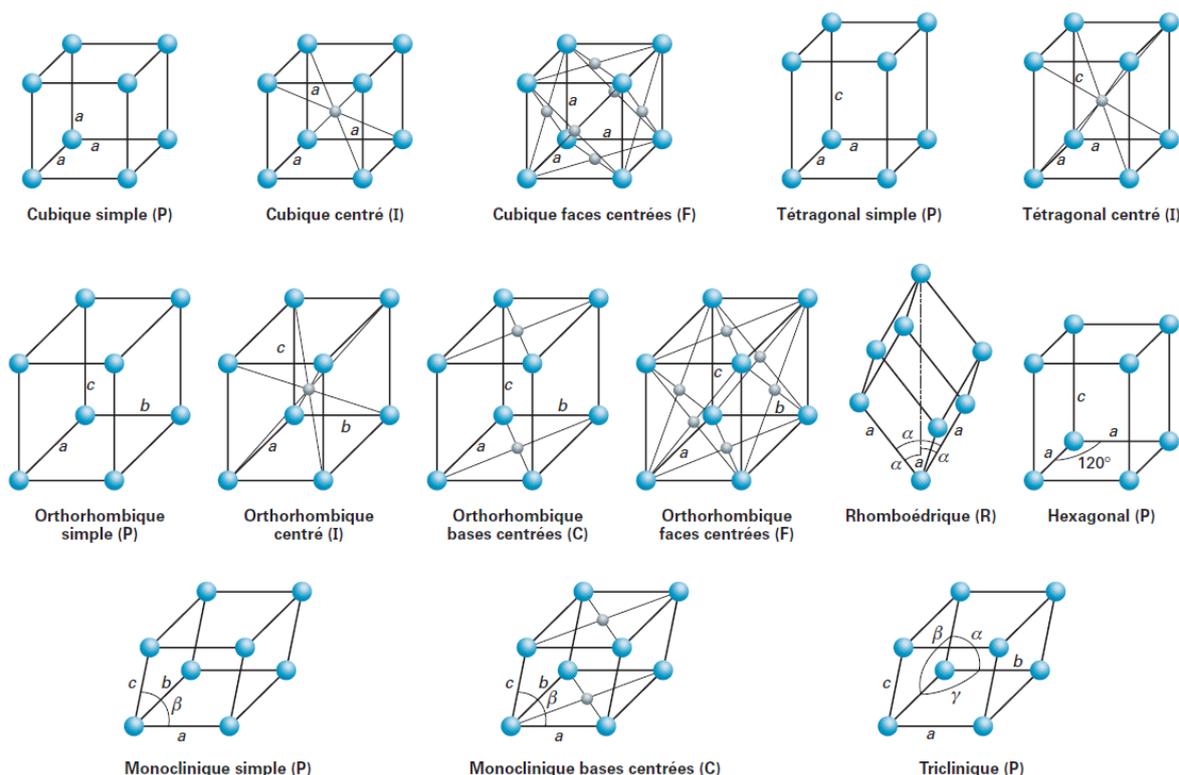


Figure 6 : Mailles élémentaires composant les 14 réseaux de Bravais. [1]

A l'état solide, une même molécule peut s'arranger dans l'espace de différentes manières (Figure 7). On parle dans ce cas de polymorphisme. Deux polymorphes ont ainsi des mailles cristallines différentes, mais peuvent être organisés selon le même type de réseau. S'il s'agit d'un atome seul et non d'une molécule, on parle d'allotropie. Le cas le plus connu d'allotropie est celui du carbone, qui se retrouve à l'état solide sous forme de graphite ou de diamant par exemple.

D'autres types de structures cristallines existent également, souvent regroupées sous le terme de pseudo-polymorphisme, auquel nous préférons phases différentes. Ainsi, on peut trouver des cristaux incluant une ou plusieurs molécules de solvant dans la maille cristalline : on parle dans ce cas de solvates (hydrate pour l'eau, éthanolate pour l'éthanol...). Si la molécule est ionisée, c'est-à-dire que la maille cristalline contient une molécule chargée et son contre-ion, on parlera de sel. Si le cristal est composé de deux molécules différentes, on parlera de cocrystal. Un autre cas, que l'on retrouvera dans cette thèse, est celui de

l'Irbesartan, qui possède deux tautomères (déplacement d'un proton sur un cycle tétrazole, cf. Partie B – 1.1.2) qui cristallisent selon des structures différentes : c'est le phénomène de desmotropie [13].

Ainsi, deux polymorphes ou deux allotropes ont exactement la même composition chimique, donc les mêmes propriétés chimiques (une fois dissous), mais des propriétés physiques différentes. De même, des phases différentes peuvent avoir des propriétés chimiques différentes des formes polymorphiques au sens strict, et ont également des propriétés physiques différentes.

Bien qu'il existe une nuance entre ces deux termes, dans cette thèse on utilisera les termes formes et phases sans distinction pour parler des polymorphes et des différentes phases.

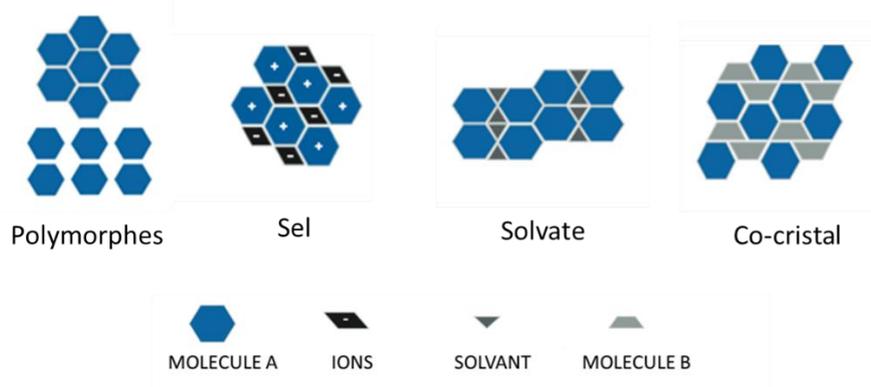


Figure 7 : Schéma des différents types de formes cristallines. [14]

### 1.1.4.2. Stabilités relatives

D'un point de vue thermodynamique, les différentes formes cristallines d'une molécule possèdent des énergies libres, et donc des stabilités différentes. La forme dont l'énergie libre est la plus basse est la forme stable, les autres sont dites métastables.

La stabilité d'une forme peut être valable sur l'ensemble du domaine pression-température (P-T) ou seulement sur une partie. A pression constante, si une forme est stable sur l'ensemble du domaine de température, on parle de monotropie. En revanche, si une forme est stable jusqu'à une certaine température, appelée température de transition, mais qu'une autre forme devient stable à partir de cette température, on parle alors d'énantiotropie. Cela est également valable en fonction de la pression, à température constante.

En solution, le polymorphe le plus stable possède la solubilité la plus basse, quel que soit le solvant. La Figure 8a représente les courbes de solubilité dans le cas où les polymorphes sont dans une relation de monotropie. Dans cet exemple, la forme I est la plus stable sur l'ensemble du domaine de température. La Figure 8b représente le cas où les polymorphes sont dans une relation d'énantiotropie, avec la forme I stable en dessous de la température de transition  $T_r$  et la forme II stable pour les températures plus élevées que  $T_r$ . Cette température de transition est déterminée grâce à la linéarisation de van't Hoff : il s'agit de la température à laquelle les deux droites d'équation (6) se croisent. Si cette température est

supérieure à la température de fusion d'une des formes ou la température d'ébullition du solvant, on est dans un cas de monotropie.

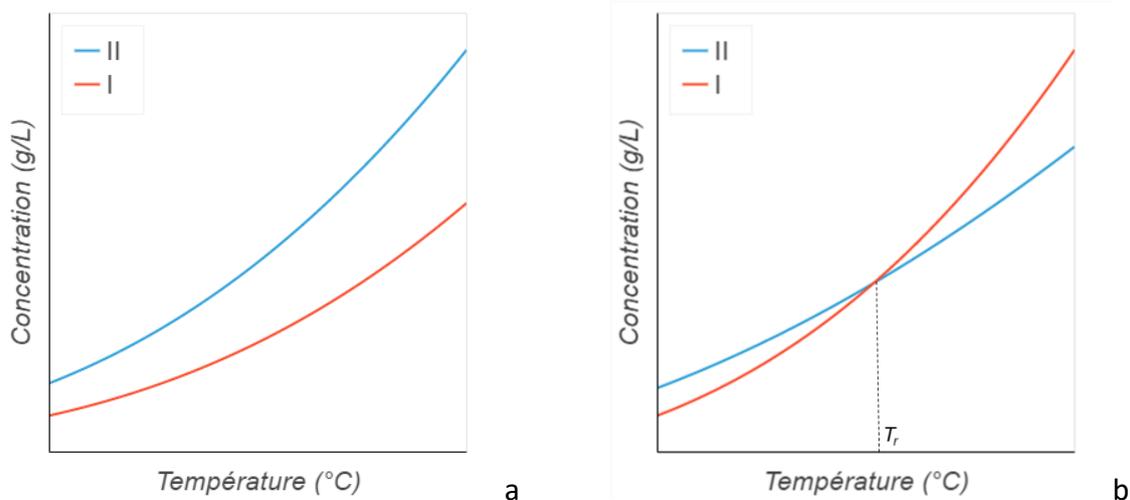


Figure 8 : Courbes de solubilité de deux polymorphes, I et II dans le cas (a) d'une monotropie avec la forme I stable sur l'ensemble du domaine de température et (b) d'une énantiotropie avec la forme I stable à basse température et la forme II stable à haute température, avec l'inversion des stabilités à la température de transition  $T_r$ .

La solubilité ne peut être utilisée pour conclure sur les stabilités relatives que dans le cas de polymorphes stricts. En effet, dans les autres cas, les interactions entre les molécules et le solvant peuvent entrer en compte dans la solubilité du cristal. Ainsi, un solvate pourra être stabilisé en solution par des liaisons H avec un solvant, alors que la forme anhydre est thermodynamiquement plus stable en absolu.

## 1.2. Etude du solide dans l'industrie pharmaceutique

La plupart des principes actifs (ou *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) existent sous différentes formes cristallines. Dans l'industrie pharmaceutique, le choix de la forme à développer aura une importance pour de nombreuses raisons. D'un point de vue de la fabrication tout d'abord, le procédé de cristallisation sera différent selon la forme à développer. Il est généralement préféré de développer une forme stable, afin de diminuer le risque d'observer une transition de phase lors de la fabrication. Cependant cela n'est pas toujours possible, et dans certains cas, une forme métastable est fabriquée. D'autre part, les propriétés physiques de la poudre (mouillabilité, solubilité, hygroscopicité, activité pharmacologique, biodisponibilité...) seront différentes selon la forme et pourront influencer la formulation et l'efficacité du médicament final. D'un point de vue plus économique également, chaque forme cristalline pourra être brevetée. Pour toutes ces raisons, il est indispensable de connaître, le plus tôt possible, la majorité des formes cristallines pouvant exister pour un principe actif, et de déterminer laquelle est la plus stable et/ou laquelle sera utilisée dans le médicament. Pour cela, on effectue un criblage afin d'identifier le plus de

formes possibles, et de comprendre la compétition de nucléation entre ces différentes formes, pour différentes conditions de cristallisation.

Certains outils permettent de faire un premier criblage théorique, permettant, par simulation, d'arriver à un grand nombre de formes pouvant exister thermodynamiquement [15]. Cependant, ces modèles ne sont que prédictifs et sont toujours en cours de développement, afin de prendre en compte de plus en plus de paramètres pouvant influencer la cristallisation (température, solvant...). Actuellement, ils ne sont donc utilisés qu'à titre informatif, par exemple pour déterminer la stabilité relative de deux formes obtenues au laboratoire, mais doivent être complétés par un criblage expérimental. Pour cela, on peut faire varier trois principaux paramètres de cristallisation en solution : la température, la concentration et la composition. Ainsi, différentes méthodes de cristallisation peuvent être utilisées (évaporation, variation de température, ajout d'un non-solvant...), et pour chaque méthode, différentes conditions vont être testées (solvant, vitesse de refroidissement...) (Figure 9).

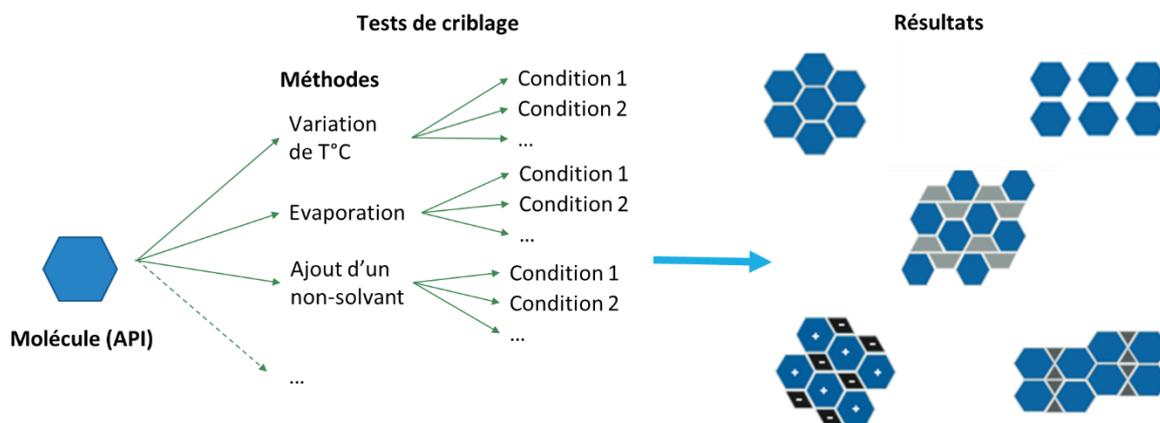


Figure 9 : Principe d'un criblage de formes en solution.

Comme nous l'avons vu plus haut, la nucléation est un phénomène stochastique. Dans l'idéal, il faudrait tester un grand nombre de fois chaque condition. Cependant, un criblage classique se fait actuellement dans des réacteurs de l'ordre du mL, donc consomme de la dizaine à la centaine de milligramme de produit par expérience. Or lors des premières étapes du développement d'un médicament, seuls quelques grammes sont disponibles pour l'ensemble des études. De ce fait, seules quelques conditions peuvent être testées, et généralement non répétées, ce qui réduit les chances d'obtenir l'ensemble des formes cristallines, et l'aspect statistique n'est pas du tout pris en compte. Ainsi, une forme métastable peut cristalliser dans un unique essai, alors qu'elle serait statistiquement moins représentée sur un plus grand nombre d'expériences (faux positif) et inversement pour une forme stable qui n'aurait pas nucléé dans un essai seul mais qui est majoritaire statistiquement sur un échantillonnage plus large (faux négatif). Une solution est l'utilisation de la microfluidique, afin de réduire les volumes des cristallisoirs à quelques nanolitres (nanocristallisoirs). Différents types de systèmes microfluidiques utilisés pour la cristallisation seront présentés dans le chapitre suivant.

## 2. Microfluidique pour la cristallisation

Un des principaux enjeux technologiques du monde moderne est la miniaturisation, c'est à dire la réduction de la taille des objets. Les exemples les plus connus sont ceux des appareils électroniques.

La microfluidique, apparue à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, est un autre exemple de miniaturisation, largement utilisé dans les domaines de la chimie, la biologie et la médecine [16]. Whitesides la définit comme « la science et la technologie de systèmes qui manipulent des petites quantités de fluides ( $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  litres), utilisant des canaux de la dizaine à la centaine de micromètres » [17]. D'autres définitions supposent que l'une au moins des dimensions caractéristiques du système est de l'ordre du micromètre.

Whitesides attribue plusieurs origines à la microfluidique. Tout d'abord la chromatographie en phase gazeuse (CPG), puis la chromatographie liquide (HPLC), qui ont révolutionné l'analyse chimique par l'utilisation de capillaires et donc la réduction de la quantité d'analyte nécessaire. Ensuite, le domaine de la biodéfense, avec le développement de systèmes microfluidiques utilisés pour détecter une menace chimique ou biologique sur le terrain. Les besoins en biologie moléculaire, notamment pour le séquençage de l'ADN (tests PCR) ont également constitué une motivation pour le développement de systèmes microfluidiques. Enfin, les avancées en microélectronique ont majoritairement inspiré les systèmes microfluidiques actuels, notamment les systèmes à base de puces [17].

La microfluidique pour la cristallisation est également de plus en plus répandue, pour différents types de molécules (protéines, principes actifs pharmaceutiques, nanomatériaux...) et pour diverses applications (criblage de polymorphes, études de fréquences de nucléation, croissance de monocristaux pour la résolution de structures...)[18]. Elle permet par exemple d'atteindre des sursaturations beaucoup plus importantes que dans des volumes macroscopiques, d'utiliser moins de matière première et d'observer des phénomènes de nucléation localisés.

Dans ce chapitre, je présenterai différents types de systèmes microfluidiques utilisés pour la cristallisation, puis je présenterai quelques notions d'hydrodynamique pour la microfluidique à base de gouttes, et je terminerai en soulignant les aspects de la nucléation qui sont modifiés en microfluidique (milieu confiné dû au volume des gouttes de l'ordre du nL) rapport aux expériences macroscopiques (vials, béchers, macrocristallisoirs industriels).

## 2.1. Types de systèmes

En réponse à la multitude d'applications en cristallisation, il existe de nombreux types de systèmes microfluidiques, présentant des avantages et des inconvénients adaptés à leur utilisation [18]. Ainsi, on trouve des systèmes microfluidiques soit en flux continu, soit en volumes restreints. Dans ce dernier cas, il existe des systèmes à base de puits ou de gouttes, utilisant parfois des vannes [19], [20]. La Figure 10 présente un exemple de puce microfluidique sophistiqué à base de puits, de type « slip-chip », composé d'une plaque inférieure contenant des puits et une partie du canal, d'une plaque supérieure coulissante contenant l'autre partie du canal pouvant compléter le puits selon la position de la plaque. Chaque puits est prérempli avec un fluide différent (Fluide 1 sur la Figure 10a), par exemple un non-solvant pour la cristallisation, puis dans une deuxième position de la puce (Figure 10b), les canaux sont remplis par le Fluide 2, par exemple la solution à cristalliser. Enfin, les deux fluides sont mélangés avec une troisième position de la puce (Figure 10b) pour la cristallisation.

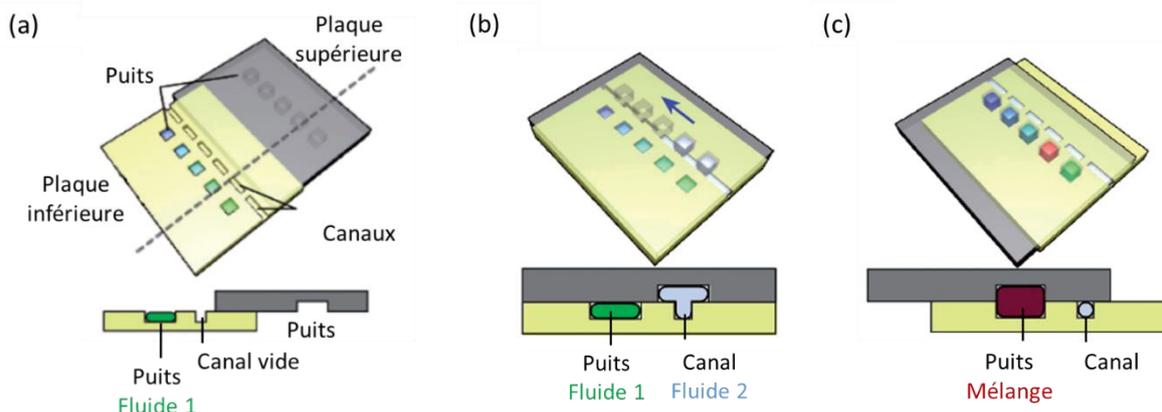


Figure 10 : Schémas d'un système microfluidique à base de puits, de type « slip-chip », en position (a) ouvert pour le remplissage des puits par une solution (Fluide 1), (b) fermé pour le chargement du réactif (Fluide 2) dans les canaux et (c) fermé pour le mélange dans les puits des deux fluides (adapté de [21]).

Les systèmes microfluidiques à base de gouttes sont très prisés, car ils permettent de travailler dans une large gamme de volumes, du femtolitre au microlitre, ajustables selon la géométrie des canaux et les débits utilisés. La manipulation des fluides en microfluidique dépend fortement des propriétés des fluides et des canaux (énergies interfaciales, viscosité...), ce qui rend l'utilisation de tensioactifs quasiment systématique dans la communauté, bien que ceux-ci puissent interférer dans le phénomène de nucléation [24]. Chaque goutte représente un cristalliseur indépendant, particulièrement intéressant pour générer rapidement une importante quantité de données pour un criblage.

La plateforme microfluidique d'intérêt pour cette thèse utilise la microfluidique à base de gouttes. Cette dernière peut être soit intégrée sous forme de « puces », soit « éclatées » grâce à l'utilisation de capillaires et de jonctions, ou encore de gouttes déposées sur une surface.

### 2.1.1. Puces microfluidiques

Les systèmes les plus répandus sont ceux à base de puces microfluidiques, qui ont donné naissance à la notion de « Lab on a chip ». Le principe des puces repose sur des canaux de quelques micromètres de diamètre dessinés, avec une géométrie plus ou moins complexe, dans une puce en matériau adapté à son application. Ainsi, on trouve par exemple des puces en verre, silicone, polydiméthylsiloxane (PDMS), Teflon (perfluoroalkoxy (PFA) ou éthylène-propylène fluoré (PFE)), polychlorure de vinyle (PVC) ou autres polymères. Le matériau le plus répandu est le PDMS, qui présente les avantages d'être peu coûteux et d'être optiquement transparent, ce qui facilite l'observation des gouttes [18], [22]. Cependant, ce matériau est incompatible avec les solvants organiques, et nécessite des traitements supplémentaires, souvent coûteux, afin de rendre la puce utilisable avec ce type de solvants [18]. Abate et al. ont par exemple développé une méthode permettant d'ajouter une couche de verre sur une puce en PDMS avec un procédé sol-gel afin d'augmenter sa résistance aux solvants organiques [23]. De plus, l'inconvénient principal des puces microfluidiques est leur géométrie fixe. Ainsi, les puces sont utilisées pour une application définie et la fabrication d'une nouvelle puce est nécessaire pour toute modification du circuit. Or, une telle fabrication utilise des techniques parfois complexes (lithographie douce, stéréolithographie, impression 3D...) qui nécessitent une expertise et des équipements adaptés, souvent chers. La fabrication de puces est donc souvent effectuée par un tiers (puces commerciales), ce qui peut être coûteux tant financièrement qu'en temps, d'autant plus que dans la plupart des cas, les puces sont à usage unique, car les cristaux obtenus bouchent facilement les canaux. Enfin, la manipulation des fluides en microfluidique dépend fortement des propriétés des fluides et des canaux (énergies interfaciales, viscosité...), ce qui rend l'utilisation de tensioactifs quasiment systématique dans la communauté, bien que ceux-ci puissent interférer dans le phénomène de nucléation [24].

La Figure 11 présente un exemple de puce microfluidique en PDMS, régulée en température par éléments Peltier et utilisée pour la cristallisation en gouttes de protéines.

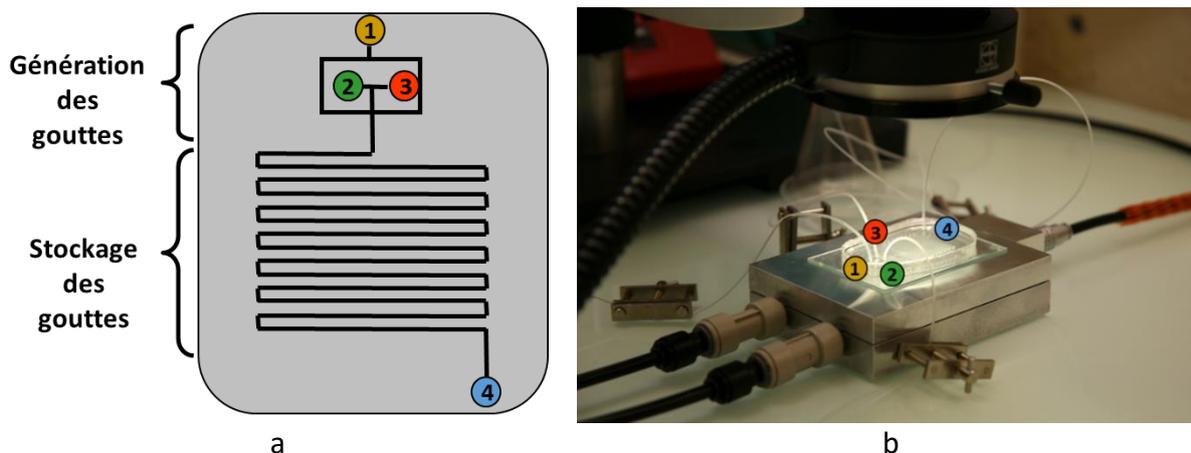


Figure 11 : Schéma (a) et photo (b) d'une puce microfluidique en PDMS à géométrie simple (canaux de  $500\ \mu\text{m}$ ) thermostatée par éléments Peltier, utilisée pour la cristallisation de protéines. Les points 1, 2 et 3 correspondent respectivement aux entrées de la puce pour l'huile, une solution de protéine et une solution de NaCl ; le point 4 correspond à la sortie de la puce. (d'après [25]).

### 2.1.2. Microfluidique en capillaires

Nous répondons aux inconvénients de la microfluidique à base de puces par l'utilisation de matériel d'HPLC, avec des capillaires en Teflon (PFA) et des connexions en polyétheréthércétone (PEEK) disponibles dans le commerce. Ces matériaux présentent l'avantage d'être compatibles à la fois avec les solvants aqueux et les solvants organiques. De plus, cela permet de fabriquer des circuits de type « *Plug and Play* », facilement modifiables par ajout, modification ou suppression d'une jonction, et modification du diamètre interne ou de la longueur des capillaires [24]. Au CINaM, ce type de système a déjà été utilisé pour diverses applications, comme la fabrication de microparticules par évaporation (Figure 12) [26], la cristallisation de protéines [27] ou encore la mesure de solubilité [6].

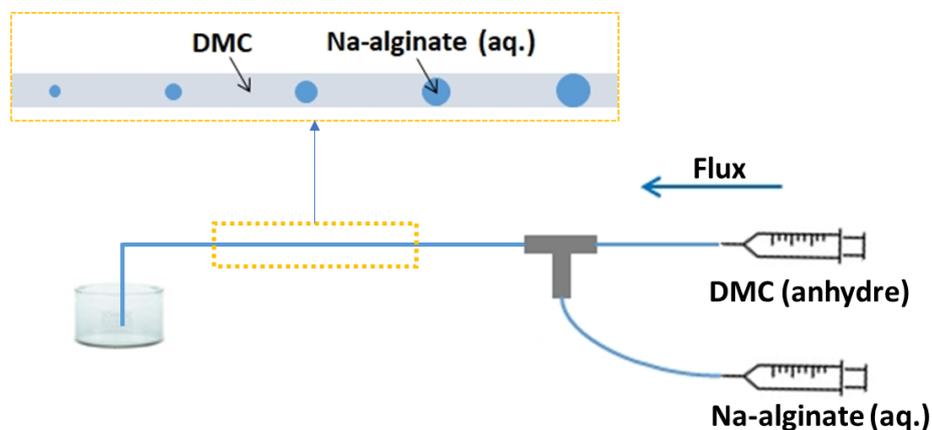


Figure 12 : Schéma du montage microfluidique pour la fabrication de nanoparticules d'alginate par évaporation d'eau dans le DMC. (d'après [26])

### 2.1.3. Gouttes déposées sur une surface

D'autres types de systèmes microfluidiques à base de gouttes utilisent des gouttes déposées sur une surface. Parmi les plus répandus, on peut citer divers exemples de systèmes digitaux, qui permettent de contrôler les gouttes indépendamment en utilisant des rangées d'électrodes pour les déplacer par électromouillage [18], [19], [28], [29].

Au CINaM, Grossier et al. ont également développé un système de génération de gouttes aqueuses de quelques micromètres de diamètre, déposées sur une surface hydrophobe et recouvertes d'huile [30]. Ce montage est utilisé pour mesurer des fréquences de nucléation par analyse d'image lors de l'évaporation de l'eau dans l'huile [31], [32] (Figure 13).

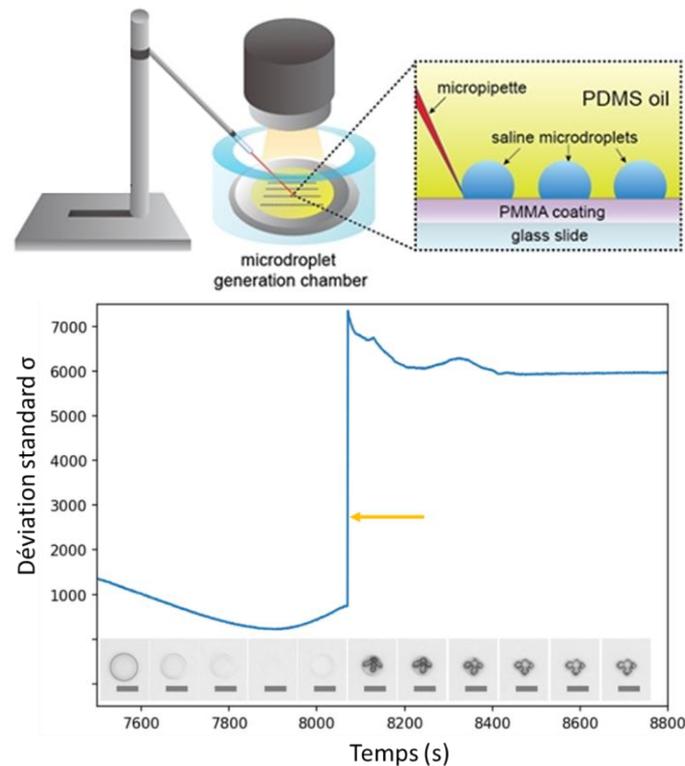


Figure 13 : (a) Schéma du montage pour la génération de microgouttes de solution saline (aqueuse) sur une surface hydrophobe (lamelle de verre avec revêtement en PMMA) dans de l'huile à l'aide d'une micropipette motorisée. (b) Evolution de l'écart type du niveau de gris d'images prises lors de l'évaporation d'une microgoutte de solution saline. Le saut, indiqué par la flèche, correspond au temps de nucléation  $t_n$ . La barre d'échelle correspond à 50  $\mu\text{m}$ . (a) et (b) ont été adaptées de [31].

Afin de s'affranchir de l'influence de la surface de dépôt sur la nucléation, des méthodes ont été développées afin d'étudier la nucléation dans des gouttes en lévitation [33], [34]. Cependant dans ce cas-là la nucléation a lieu dans une unique goutte.

## 2.2. Hydrodynamique

Dans ce paragraphe, je présenterai les principales notions d'hydrodynamique pour la génération de gouttes en microfluidique dans des canaux (puces et capillaires) qui seront utilisés lors de cette thèse.

Les gouttes sont formées par émulsion entre deux fluides non miscibles : un fluide dispersé, composant les gouttes, et un fluide continu permettant de séparer les gouttes. Le fluide continu est celui qui a le plus d'affinité avec la paroi des canaux (généralement une huile). Chaque goutte de fluide dispersé représente un réacteur ou cristalliseur indépendant et donc une expérience de cristallisation. Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans chacune des gouttes, on cherche idéalement à obtenir des gouttes de même volume (monodispersées), de même composition, séparées par le même volume de fluide continu (fréquence spatiale régulière), et qui ne coalescent pas (stables). Pour cela, l'ajout de tensioactif au fluide dispersé permet de faciliter la génération des gouttes et de les stabiliser en s'adsorbant à l'interface des gouttes avec le fluide continu. Cependant, la cristallisation est

également un phénomène qui se passe à l'interface des gouttes. Par conséquent, les tensioactifs peuvent induire la nucléation, ou au contraire l'inhiber, et potentiellement favoriser une phase cristalline plutôt qu'une autre. On cherchera donc à éviter leur utilisation pour la génération des gouttes.

### 2.2.1. Ecoulements en microfluidique

Les écoulements dans les systèmes microfluidiques sont régis par les mêmes lois de la mécanique des fluides qu'à l'échelle macroscopique. Cependant, certaines forces, négligeables à l'échelle macroscopique, sont prépondérantes à l'échelle microscopique [16]. La mécanique des fluides définit ainsi plusieurs nombres caractéristiques afin de comparer ces forces entre elles.

- Tout d'abord, le nombre de Reynolds  $Re$  (équation (19)) permet de décrire le régime d'écoulement, en comparant les forces inertielles et visqueuses.

$$Re = \frac{\rho v W}{\mu} \quad (19)$$

Où  $\rho$  ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) est la masse volumique du fluide,  $v$  ( $\text{m.s}^{-1}$ ) la vitesse caractéristique du fluide dans le canal,  $W$  (m) le diamètre du canal et  $\mu$  ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) la viscosité dynamique du fluide. Le régime d'écoulement est turbulent pour les grandes valeurs de  $Re$  ( $>2000$ ), laminaire si  $Re \ll 1$  et transitoire sinon. En microfluidique, les vitesses et les dimensions sont faibles. Le régime d'écoulement est donc laminaire.

- On peut ainsi définir une vitesse moyenne du fluide par :

$$v = \frac{Q}{\pi \left(\frac{W}{2}\right)^2} \quad (20)$$

Où  $Q$  ( $\text{m}^3/\text{s}$ ) est le débit du fluide.

- Ensuite, le nombre de Bond compare les forces gravitationnelles et interfaciales.

$$Bo = \frac{\Delta\rho g W^2}{\gamma_{CD}} \quad (21)$$

Où  $\Delta\rho$  ( $\text{kg.m}^{-3}$ ) est la différence de densité entre les fluides continu et dispersé,  $g$  ( $\text{m.s}^{-2}$ ) l'accélération de la force de pesanteur,  $W$  (m) le diamètre du capillaire, et  $\gamma_{CD}$  ( $\text{J.m}^{-2}$ ) l'énergie interfaciale entre les fluides continu (C) et dispersé (D).

On peut également définir la longueur capillaire :

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma_{CD}}{\Delta\rho g}} \quad (22)$$

On peut ainsi relier  $l_c$  à  $Bo$  par :

$$\frac{W}{l_c} = \sqrt{Bo} \quad (23)$$

Cela signifie donc que si le diamètre du canal  $W$  est inférieur à  $l_c$ , les forces de surface sont prédominantes par rapport à la gravité. Cela s'observe facilement par le fait que les gouttes remplissent tout le canal, et ne sont pas aplaties sur sa paroi inférieure.

- Enfin, le nombre capillaire  $Ca$  permet de comparer les forces de viscosité (cisaillement imposé par le fluide continu) et interfaciales entre les deux fluides. Il est défini par :

$$Ca = \frac{\mu_c v_c}{\gamma_{CD}} \quad (24)$$

Où  $\mu_c$  ( $\text{kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) est la viscosité dynamique du fluide continu et  $v_c$  ( $\text{m.s}^{-1}$ ) sa vitesse. La valeur de  $Ca$  va donc fortement dépendre des débits utilisés, ainsi que du fluide continu choisi.

## 2.2.2. Génération des gouttes

Dans ce paragraphe, je décrirai les différentes méthodes de génération des gouttes, puis je présenterai les différents types de régimes que l'on retrouve en microfluidique, dont la méthode du cross-flowing utilisée pendant cette thèse. Je présenterai ensuite le modèle proposé par Zhang [35] afin de contrôler les tailles et les fréquences des gouttes et je finirai en présentant les phénomènes de mélange intervenant à l'intérieur des gouttes.

### 2.2.2.1. Méthodes de génération

On compte trois méthodes de génération des gouttes en microfluidique [18], [36]:

- Par co-flowing (flux parallèles) (Figure 14a) : le flux de fluide dispersé est injecté à l'intérieur du flux de fluide continu, parallèlement à celui-ci. L'accélération du fluide dispersé lors de son entrée dans le fluide continu permet la formation de gouttes.
- Par flow-focusing (focalisation de flux) (Figure 14b) : le flux de fluide dispersé est « pincé » entre deux flux de fluide continu. Les gouttes se forment ainsi par rupture du fluide dispersé, dans la même direction que le flux d'entrée de ce fluide.
- Par cross-flowing (flux transversaux) (Figure 14c) : les gouttes sont formées perpendiculairement à l'entrée du fluide dispersé, lors de son croisement avec le fluide continu. Cette méthode est possible à la fois dans une jonction en croix (Figure 14c<sub>1</sub>) et dans une jonction en T (Figure 14c<sub>2</sub>).

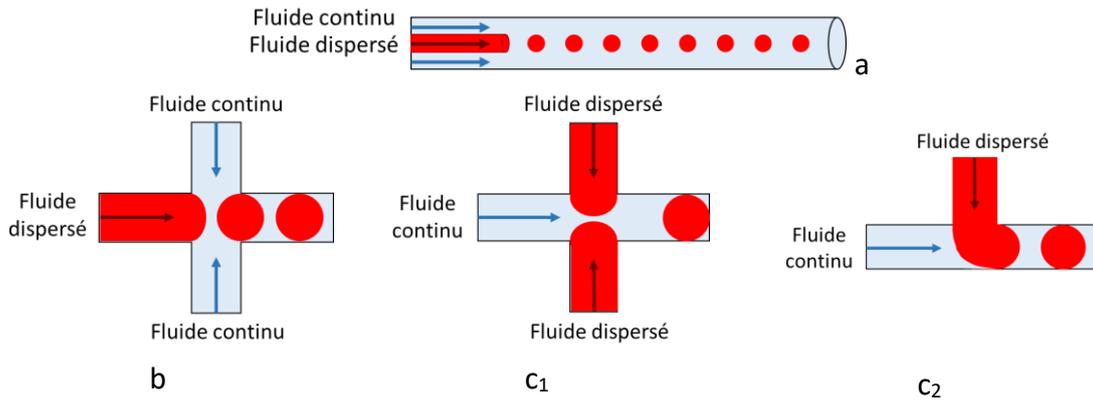


Figure 14 : Différentes méthodes de génération de gouttes en microfluidique. (a) par co-flowing, (b) par flow-focusing dans une jonction en croix, (c) par cross-flowing dans (c<sub>1</sub>) une jonction en croix et (c<sub>2</sub>) une jonction en T.

Dans cette thèse, nous utiliserons uniquement la méthode du cross-flowing, principalement dans une géométrie en T. Seule cette méthode sera donc décrite dans la suite.

### 2.2.2.2. Types de régimes du cross-flowing

Avec la méthode cross-flowing, on peut définir trois principaux types de régimes, définis selon la valeur de  $Ca$  (défini par l'équation (24)) et le ratio des débits [37], [38]:

- Le régime squeezing (Figure 15a) est défini pour les plus faibles valeurs de  $Ca$ . Dans ce régime, la goutte se remplit jusqu'à atteindre au moins le diamètre du capillaire, puis se détache du fait de la pression interne de la goutte. La longueur de la goutte est supérieure au diamètre du canal de sortie. On parle dans ce cas de plug.
- Le régime dripping (Figure 15b), observé pour des valeurs intermédiaires de  $Ca$ , est un régime pour lequel la contrainte de cisaillement du fluide continu empêche les gouttes d'atteindre le diamètre du canal avant de se détacher, résultant en gouttes de petite taille.
- Le régime jetting (Figure 15c), observé pour des valeurs élevées de  $Ca$  est caractérisé par un écoulement du fluide dispersé sous forme de jet (flux parallèle au fluide continu), qui se déstabilise pour former des gouttes loin de la jonction.

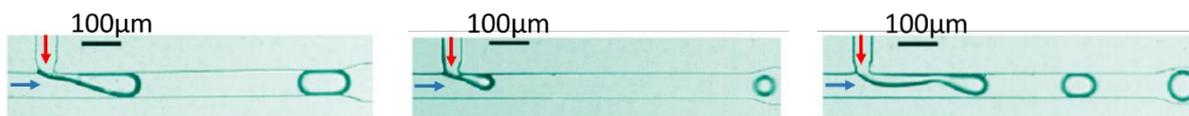


Figure 15 : Régime de formation des gouttes dans une jonction en T (a) squeezing, (b) dripping et (c) jetting. Les flèches bleues et rouges indiquent respectivement le sens du flux du fluide continu et du fluide dispersé. (adapté de [38])

### 2.2.2.3. Contrôle de la taille et de la fréquence

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la taille des gouttes était étroitement liée au régime de génération des gouttes. La formation des gouttes peut donc être contrôlée par les débits utilisés, qui vont définir la valeur de Ca et donc le type de régime.

Zhang et al.[35] ont proposé un modèle permettant de relier la taille des gouttes L et la fréquence des gouttes  $f_D$  à Ca avec les équations (25) et (26).

$$\frac{L}{W} = \frac{v_{TOT}}{K_1 Ca^{\frac{4}{3}}} \quad (25)$$

$$f_D = \frac{K_2 Ca^{\frac{4}{3}}}{W} \times \frac{v_D}{v_{TOT}} = \frac{K_2 Ca^{\frac{4}{3}}}{W} \times \phi_D \quad (26)$$

Où :

$f_D$  ( $s^{-1}$ ) : fréquence des gouttes

L (m) : longueur des gouttes

$v_D$  ( $m.s^{-1}$ ) : vitesse du fluide dispersé

$v_{TOT}$  ( $m.s^{-1}$ ) : vitesse totale (somme des vitesses des fluides dispersé et continu)

$K_1, K_2$  ( $m.s^{-1}$ ) : constantes dépendantes du système

W (m) : diamètre du capillaire

$\phi_D$  (sans dimension) : fraction de fluide dispersé ( $\frac{v_D}{v_{TOT}}$ )

Sur la Figure 16a et la Figure 16b, le rapport L/W et la fréquence  $f_D$  respectivement ont été tracés pour des capillaires de 1 mm de diamètre interne, pour différents ratios de vitesses, d'après l'étude de Zhang et al. [35].

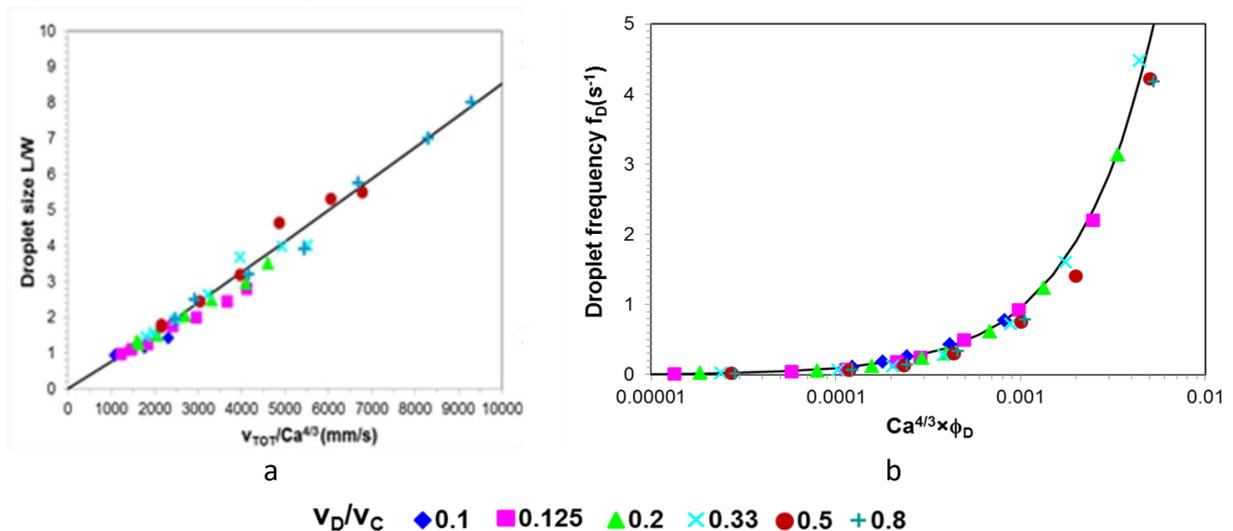


Figure 16 : (a) Rapport L/W en fonction de  $v_{TOT}/Ca^{\frac{4}{3}}$  et (b) fréquence des gouttes  $f_D$  en fonction de  $Ca^{\frac{4}{3}} \times \phi_D$  pour un canal de 1 mm de diamètre, pour un système éthanol (fluide dispersé)-huile FC-70 (fluide continu). [35]

### 2.2.2.4. Mélanges

Lors du transport des gouttes le long du canal, l'écoulement, laminaire en fluide monophasique, est contrôlé par la présence d'interfaces entre le fluide continu et le fluide dispersé. En effet, il y a un effet de cisaillement entre ces deux fluides, induisant une recirculation (Figure 17) du fluide dispersé à l'intérieur de la goutte, et du fluide continu entre les gouttes [39].

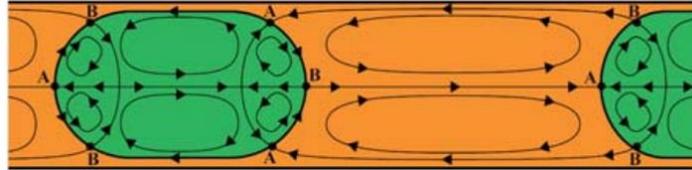


Figure 17 : Lignes de champs de vitesses lors de la recirculation à l'intérieur des gouttes (vert) et du fluide continu (orange) due à la présence d'une interface, lors du transport des gouttes. Les points A et B sont des points de stagnation à l'interface. [39]

Comme on peut le voir sur la Figure 17, la circulation se fait séparément entre la moitié haute et la moitié basse de la goutte. Le mélange entre ces deux moitiés se fait donc principalement par diffusion [40]. Cependant, le temps de mélange par diffusion est donné par :

$$t_{mix} = \frac{stl^2}{2D} \quad (27)$$

Où  $stl$  (*striation length*) (m) est la distance sur laquelle peut avoir lieu le mélange par diffusion, ici la longueur de la goutte, et  $D$  ( $m^2/s$ ) la constante de diffusion du soluté ( $D = 10^{-10} m^2/s$ ). Ainsi, plus la longueur de la goutte est importante, plus le temps nécessaire au mélange sera long. Cela est mis en évidence sur la Figure 18, sur laquelle on observe que les plugs de petites tailles (quasi-sphériques) sont quasiment immédiatement homogènes, tandis que les plugs plus longs mettent de plus en plus de temps à s'homogénéiser. [40]

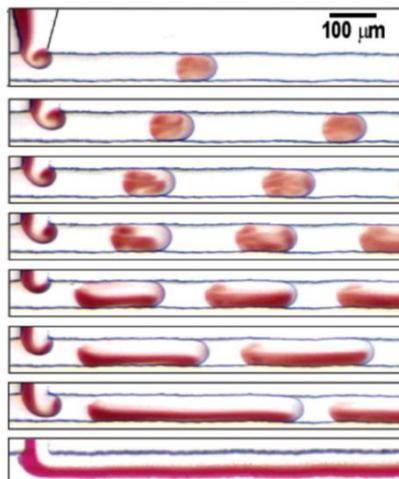


Figure 18 : Microphotographies de plugs de différentes tailles autour de la zone de génération. Les plugs se déplacent à une vitesse de  $50 \text{ mm.s}^{-1}$ . [40]

Pour répondre à ce phénomène de diffusion assez lent, la plupart des circuits microfluidiques comprennent des serpentins, qui modifient le motif de recirculation à l'intérieur des gouttes et favorisent (accélèrent) le mélange [41]. Cependant, cela peut entraîner la coalescence des gouttes ou des plugs, en particulier lorsqu'aucun tensioactif n'est utilisé pour les stabiliser, comme c'est le cas dans cette thèse. De ce fait, nous préférons générer des gouttes quasi-sphériques, du diamètre du capillaire, afin de réduire le temps de diffusion à l'intérieur de la goutte et d'assurer l'homogénéité des gouttes, à la fois en mouvement, lors de leur génération, et à l'arrêt, lors de leur refroidissement pour la cristallisation.

## 2.3. Nucléation en microfluidique

Dans le premier chapitre bibliographique, nous avons vu les principes de base de la cristallisation. Cependant, comme pour la mécanique des fluides, la cristallisation est affectée par la réduction du volume en microfluidique. On parle d'effet de confinement. Cela se traduit à la fois d'un point de vue thermodynamique et d'un point de vue cinétique.

### 2.3.1. Influence thermodynamique

La théorie classique de la nucléation considère la sursaturation constante lors de la nucléation. En effet, à l'échelle macroscopique, l'appauvrissement d'une solution d'une ou quelques molécules permettant la formation d'un germe de taille critique a une influence négligeable sur la concentration totale de la solution. Cependant, à l'échelle de la microfluidique, cette hypothèse n'est plus valable, et l'appauvrissement de la solution d'une molécule peut devenir significatif [42].

La sursaturation effective est alors donnée par :

$$\beta(n) = \frac{\beta_0 N_s - n}{N_s} \quad (28)$$

Où :

$\beta_0 N_s$  : nombre total de molécules dans la goutte

$N_s$  : nombre de molécules à saturation (état d'équilibre) dans la goutte

$n$  : nombre de molécules constituant le germe

Sur l'équation (28) on constate donc que  $\beta$  diminue lorsque le nombre de molécule dans le germe augmente, c'est-à-dire lorsque la solution s'appauvrit. Cet effet sera d'autant plus fort que  $N_s$  diminue, c'est-à-dire que le volume diminue ou que la solubilité diminue. Or, la taille du germe critique (équation (14)) dépend de la sursaturation. En effet, on peut réécrire l'équation (14) par :

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT\ln\beta} \quad (29)$$

Ainsi, plus le nombre de molécules en solution diminue, plus la sursaturation  $\beta(n)$  diminue et plus la taille critique est élevée, et donc difficile à atteindre. Ainsi, en volume fini, il est en théorie possible de ne jamais atteindre cette taille critique [42]. On peut ainsi définir une sursaturation initiale critique  $\beta_{crit}$ , dépendante du système, en dessous de laquelle il ne peut pas y avoir de nucléation. Même sans atteindre  $\beta_{crit}$ , la réduction du volume crée un effet de confinement qui rend la nucléation en volume réduit plus difficile [43]. Il y est donc possible d'atteindre des sursaturations beaucoup plus élevées, avant nucléation, que dans des volumes macroscopiques.

Différentes techniques peuvent être utilisées afin de déclencher la nucléation de ces solutions sursaturées [44], comme l'induction d'un champ électrique [45], [46], magnétique [47], ou une excitation laser [48], [49].

### **2.3.1. Influence cinétique**

En plus de l'aspect thermodynamique, le confinement a un effet sur la cinétique de nucléation. En effet, dans l'équation (18), nous avons vu que le temps de nucléation, c'est à dire le temps nécessaire pour obtenir un cristal, était inversement proportionnel au volume et à la fréquence de nucléation  $J$ . Ainsi, à  $J$  et donc  $\beta$  données, plus le volume du cristalliseur (ici la goutte) est réduit, plus le temps de nucléation est long si le mécanisme de nucléation est inchangé.

### 3. Techniques de caractérisation

Afin de caractériser les solutions, saturées ou diluées, les gouttes et les cristaux, diverses techniques sont couramment utilisées. Dans ce chapitre, je présenterai brièvement les techniques qui ont été utilisées durant cette thèse. La spectroscopie UV a été utilisée sur les solutions et les gouttes, tandis que les cristaux ont été observés par microscopie et caractérisés par analyses thermiques, spectroscopie Raman et diffraction des rayons X.

#### 3.1. Spectroscopie UV

Le principe de la spectroscopie UV repose sur l'absorption de photons par un matériau, ici une solution, lors de l'excitation des électrons vers des niveaux d'énergie plus élevés. Les longueurs d'onde absorbées dépendent des différences entre deux niveaux d'énergie électroniques des molécules de la solution. Ainsi, une lumière polychromatique, ici de longueurs d'ondes  $\lambda$  dans l'UV, est envoyée à travers la solution avec une intensité  $I_0(\lambda)$ . L'intensité transmise en sortie de la solution  $I(\lambda)$  est mesurée. Classiquement en spectroscopie UV, on définit alors l'absorbance  $A$  par l'équation (30).

$$A(\lambda) = \log \left( \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right) \quad (30)$$

L'absorbance est utilisée pour mesurer des concentrations de solutions diluées grâce à la loi de Beer-Lambert (équation (31)).

$$A(\lambda) = \varepsilon_\lambda l C \quad (31)$$

Où  $\varepsilon_\lambda$  ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) est le coefficient d'extinction molaire de la solution, dépendant de la température, de la longueur d'onde et de la nature de la solution (solvant et soluté) et  $l$  (cm) est la longueur du chemin optique (épaisseur de la solution).

Pour une telle mesure, un étalonnage est nécessaire pour déterminer le produit  $\varepsilon_\lambda l$  à une longueur d'onde donnée, généralement la longueur d'onde  $\lambda_{max}$  pour laquelle l'absorbance est maximale. Pour cela, l'absorbance de plusieurs solutions de différentes concentrations est mesurée, afin de tracer la droite d'équation (31), dont la pente est le produit  $\varepsilon_\lambda l$ .

Cependant, la préparation de ces solutions pour l'étalonnage et la mesure à différentes températures nécessitent l'utilisation d'une quantité significative de produit. De ce fait, Peybernès [6] a développé une méthode de mesure de concentration en microfluidique par absorption UV ne nécessitant la préparation que d'une seule solution de concentration connue. Cette méthode, qui sera décrite dans la partie B, permet de mesurer la solubilité de principes actifs rapidement (environ 1 h par point de solubilité) en utilisant peu de produit (quelques dizaines à quelques centaines de milligrammes selon la solubilité).

La différence d'absorption entre une solution et une huile permet également de caractériser un flux de gouttes. En effet, lors du passage de celles-ci en UV, le signal transmis

sera modifié par rapport à celui du fluide continu (huile). Ainsi, le signal caractéristique d'une goutte pourra être analysé afin de déterminer la longueur de la goutte et la fréquence spatiale entre les gouttes en fonction de la vitesse (Figure 19) [50].

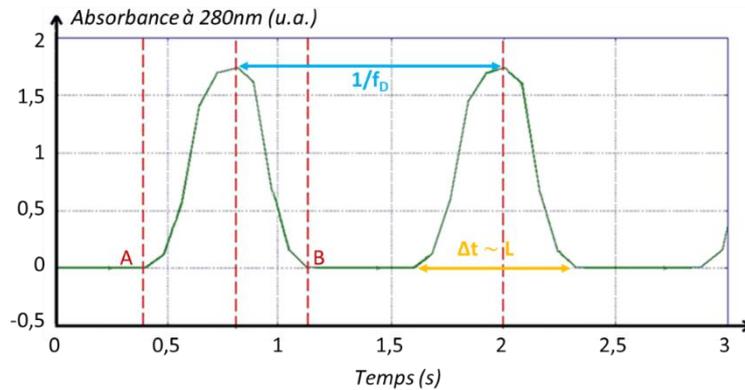


Figure 19 : Absorbance in situ au cours du temps à 280 nm lors du passage de deux gouttes en UV. Le temps d'intégration est de 80 ms. Les points A et B respectivement au début et à la fin de la goutte. La fréquence entre les gouttes est obtenue par le temps entre les pics, et la longueur des gouttes  $L$  est obtenue à partir du temps de passage d'une goutte devant le faisceau  $\Delta t$ . Adapté de [50].

La largeur du pic correspond à un temps de passage  $\Delta t$  de la goutte devant le faisceau UV de 400  $\mu\text{m}$  de diamètre. La longueur de la goutte se déplaçant à la vitesse  $v_{tot}$  est donnée par :

$$L = v_{tot} \times \Delta t \quad (32)$$

La fréquence de passage des gouttes  $f_D$  ( $\text{s}^{-1}$ ) devant le faisceau est directement lisible sur le signal UV, grâce à la différence temporelle entre les pics. La fréquence spatiale  $f_{D,spatiale}$  ( $\text{m}^{-1}$ ) entre les centres des gouttes est donc donnée par :

$$f_{D,spatiale} = \frac{f_D}{v_{tot}} \quad (33)$$

La valeur de  $f_{D,spatiale}$  doit être suffisamment grande afin que les gouttes ne coalescent pas.

## 3.2. Microscopie

La méthode la plus utilisée pour observer un objet, que ce soit une goutte ou un cristal, est la microscopie. La plus courante et la plus simple à mettre en place est la microscopie optique. Dans le cas d'un cristal, elle permet d'obtenir une première information sur le faciès du cristal, et peut permettre d'avoir une première idée du polymorphisme. En effet, comme nous l'avons vu, plusieurs formes cristallines peuvent présenter des faciès différents. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. De plus, deux cristaux d'un même polymorphe peuvent également présenter des faciès complètement différents. De ce fait, cette technique doit être complétée par une autre technique d'analyse du solide.

D'autres techniques de microscopie peuvent être utilisées, comme la microscopie électronique à balayage, qui renvoie une image de la surface grâce aux interactions entre un faisceau d'électrons envoyé sur l'échantillon et la surface observée. Ce type de microscopie permet d'avoir des images avec une meilleure résolution qu'en microscopie optique (Figure 20). Cependant, elle est plus complexe d'utilisation et nécessite une préparation spécifique de l'échantillon. De plus, cette technique ne permet pas une analyse *in situ* et n'a été utilisée dans le cadre de cette thèse que pour l'analyse de poudres, et non de cristaux issus des gouttes. La microscopie optique a donc été privilégiée.

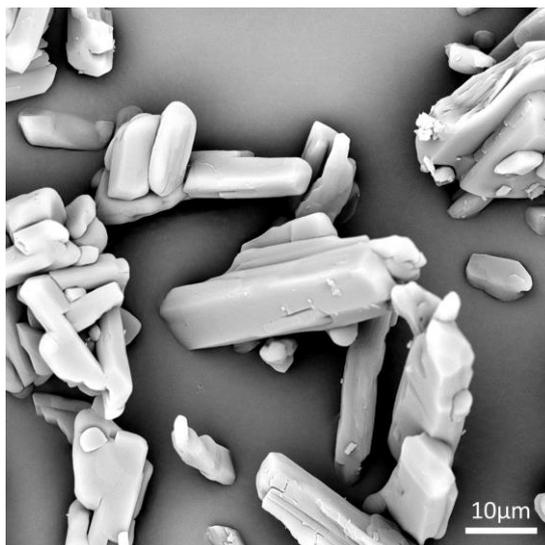


Figure 20 : Image d'une poudre de Rimonabant observée par microscopie électronique à balayage (x3500, 1 Pa, 15 kV).

### 3.3. Analyses thermiques

Afin d'obtenir des informations sur les solides, diverses techniques d'analyses thermiques sont souvent utilisées sur des poudres. Les principales, qui ont été utilisées lors de cette thèse sont la calorimétrie différentielle à balayage (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) et l'analyse thermogravimétrique (TGA, *Thermogravimetric Analysis*). Ces deux techniques sont complémentaires et sont généralement mises en parallèles afin d'obtenir des informations sur les phénomènes thermiques observés lors d'une variation de température de l'échantillon (fusion, désolvatation, recristallisation...).

#### 3.3.1. DSC

La calorimétrie différentielle à balayage (*Differential Scanning Calorimetry*) est une technique d'analyse thermique permettant d'étudier la différence de flux d'énergie thermique en fonction de la variation de température entre un échantillon et une référence.

L'appareil est constitué d'un four, chauffé par effet Peltier à l'aide d'une résistance et relié à un ordinateur permettant de programmer différentes rampes de chauffage et/ou refroidissement auquel sera soumis l'échantillon pour la mesure. Deux coupelles, l'une

contenant le produit, l'autre vide, servant de référence, sont placées sur deux thermocouples à l'intérieur du four (Figure 21).

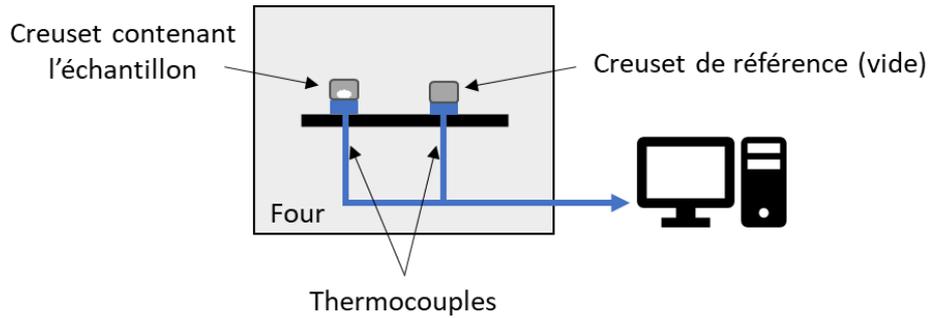


Figure 21 : Schéma d'un appareil de DSC.

Le système mesure l'intensité électrique ou la de chaleur fournies pour maintenir les deux coupelles à la même température. A partir de ces mesures, on peut calculer la puissance électrique fournie, et ainsi retrouver les enthalpies liées aux phénomènes observés. Ce calcul est cependant à interpréter avec précaution, car la DSC fournit une information avec une mesure dynamique lors d'un profil de température imposé pouvant biaiser les valeurs mesurées par rapport aux valeurs thermodynamiques réelles (T et H).

Lors d'un phénomène exothermique (cristallisation, solidification), l'intensité à fournir à la coupelle de l'échantillon sera moins importante. Au contraire, pour un phénomène endothermique (fusion, évaporation, transition de phase solide/solide), l'appareil devra fournir plus d'intensité électrique pour maintenir l'échantillon à la même température que la référence (Figure 22).[51]

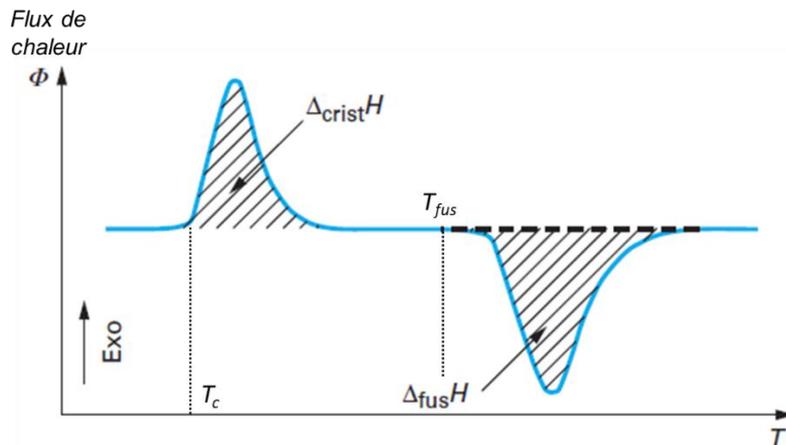


Figure 22 : Exemple de thermogramme DSC présentant un exotherme de cristallisation ( $T_c$ ,  $\Delta_{crist}H$ ) et un endotherme de fusion ( $T_{fus}$ ,  $\Delta_{fus}H$ ). [51]

### 3.3.2. TGA

L'analyse thermogravimétrique (*Thermogravimetric Analysis*, TGA) permet de mesurer la perte de masse d'un échantillon lors d'un phénomène thermique. Dans le cas des études de polymorphisme, elle est principalement utilisée pour étudier la désolvatation d'une poudre.

L'appareil est constitué d'un four, sous atmosphère inerte, généralement avec un léger balayage d'azote, et d'un module de pesée. La température du four est programmée afin d'effectuer une rampe ou des cycles de température, ou de maintenir une température fixe dans le cas d'une mesure statique. L'échantillon est relié au module de pesée grâce à une microbalance (Figure 23). [52]

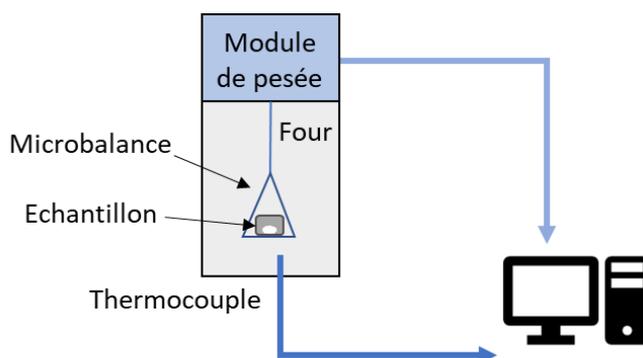


Figure 23 : Schéma simplifié d'un appareil de TGA, dans le cas d'une balance suspendue.

Grâce au thermogramme obtenu (Figure 24), il est possible de quantifier la perte de masse observée. Cela permet de compléter l'interprétation de certains phénomènes thermiques observés en DSC.

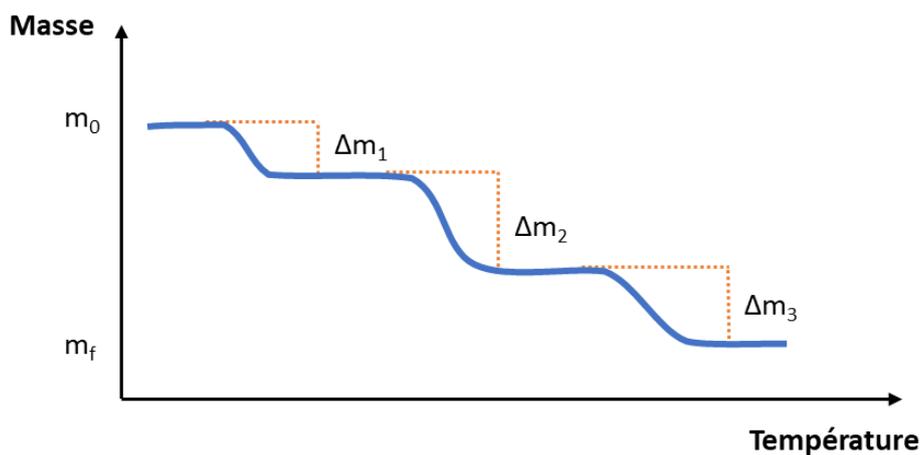


Figure 24 : Exemple de thermogramme TGA présentant 3 phénomènes de perte de masse ( $\Delta m_1$ ,  $\Delta m_2$  et  $\Delta m_3$ ) lors d'un cycle de chauffage sur un échantillon de masse initiale  $m_0$  et de masse finale  $m_f$ .

### 3.4. Diffraction des Rayons X

La technique la plus répandue afin de caractériser des cristaux est la diffraction des rayons X (DRX), qui permet d'obtenir des informations sur la structure cristalline du cristal.

Cette technique d'analyse est généralement non destructive (il existe plusieurs exceptions, comme les solvates, qui peuvent être désolvatés lors de l'analyse). Elle est basée sur la diffraction d'un faisceau de rayons X monochromatique par les électrons des atomes d'une maille cristalline. Le faisceau a une longueur d'onde proche de l'Angström, c'est-à-dire proche des distances interatomiques. [53]

Un diffractomètre est composé d'une source de rayons X, fixe ou mobile, de différentes optiques, d'un porte échantillon et d'un détecteur, fixe ou mobile également (Figure 25).

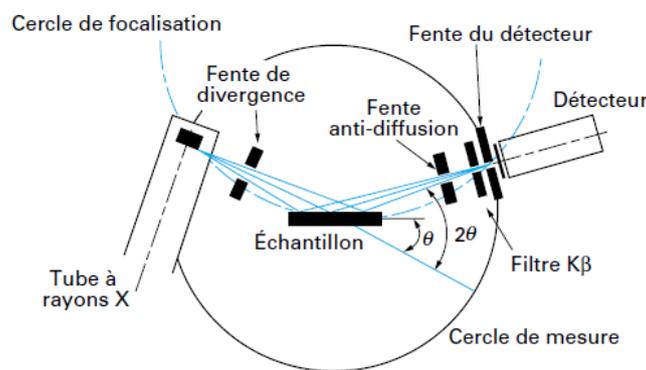


Figure 25 : Schéma d'un dispositif de diffraction des rayons X. [2]

Un cristal est la répétition périodique d'atomes ou molécules dans les trois dimensions de l'espace. L'échantillon, soit un monocristal, soit une poudre, est irradié avec un certain angle  $\theta$ . Sur la Figure 26, les molécules ou les atomes sont représentés par les points noirs. Chaque couche (plan réticulaire) est séparée par une distance  $d$ . Les faisceaux incidents seront diffractés selon la loi de Bragg :

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (34)$$

Où  $n$  est un nombre entier (ordre de diffraction) et  $\lambda$  la longueur d'onde du faisceau.

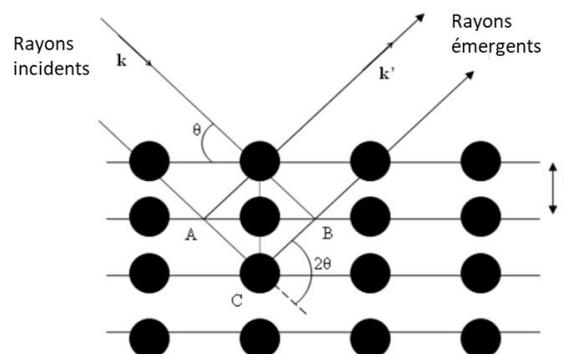


Figure 26 : Diffraction des rayons X par un cristal dont les plans réticulaires sont séparés d'une distance  $d$ .

Les faisceaux ainsi diffractés vont interférer, pour former une figure de diffraction. Dans le cas d'un monocristal, cette figure sera composée de taches de diffraction réparties à une même distance du centre de la figure pour un angle  $\theta$  donné, contenant les informations sur les paramètres de maille, les éléments de symétrie du réseau et la position des atomes dans la maille. En revanche, dans le cas d'une poudre, du fait de la multitude de cristaux contenus dans celle-ci et orientés dans différentes positions, l'ensemble des tâches de diffraction obtenues forme un cercle de diffraction, dont le rayon dépend de l'angle  $\theta$ .

La mesure DRX se fait ainsi pour différents angles  $\theta$ , afin d'obtenir des figures de diffraction similaires à celles présentées sur la Figure 27a pour un monocristal et Figure 27b pour une poudre.

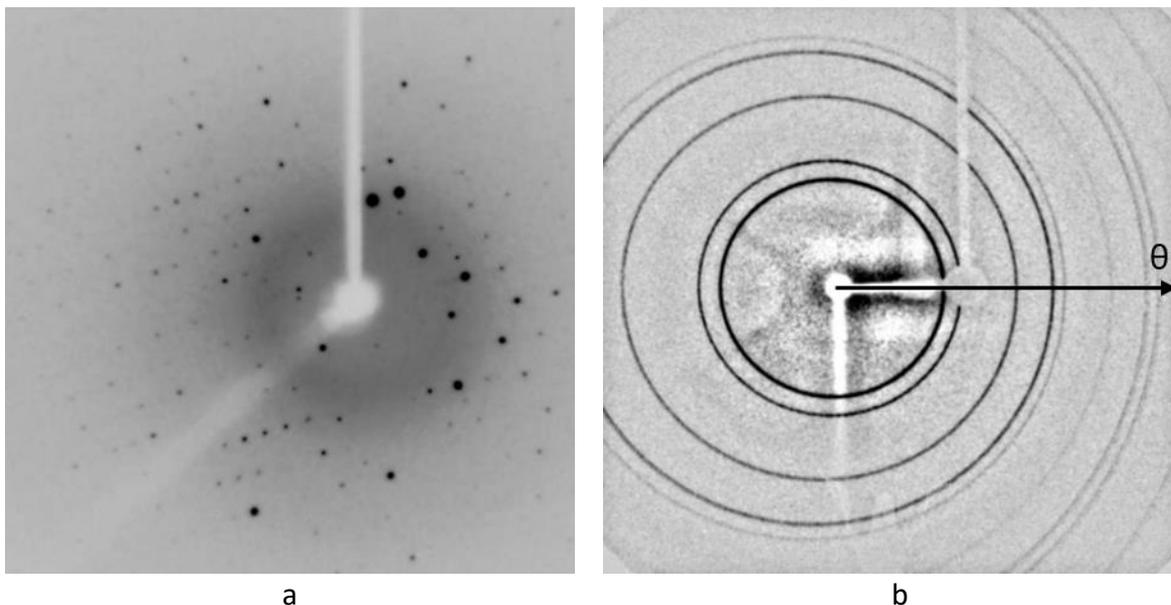


Figure 27 : Figures de diffraction des rayons X obtenues sur (a) un monocristal et (b) une poudre. Le centre des figures correspond à l'angle  $\theta=0$ , et la distance par rapport au centre correspond à différentes valeurs de  $\theta$ . [53]

L'intensité des tâches ou des cercles est proportionnelle aux densités électroniques. L'analyse de la figure de diffraction d'un monocristal permet de remonter aux positions des différents atomes et molécules dans la maille cristalline et donc de déterminer la structure du cristal. Sur un diffractogramme de poudre, ces informations de position ne sont pas visibles, et ne permettent pas de déduire la structure cristalline, bien que des programmes existent pour prédire la structure cristalline d'un matériau à partir de son diffractogramme de poudre [54]. Cependant, l'intégration des cercles selon un axe donné permet de remonter à un diffractogramme (Figure 28), qui sera caractéristique du matériau et de sa structure cristalline. Ainsi, deux polymorphes présenteront des diffractogrammes de poudre différents (Figure 28).

Pour l'analyse en microfluidique dans des capillaires, les gouttes et/ou les cristaux doivent être transférés dans un support adapté, par exemple un capillaire en verre. En effet, le matériau (PFA) utilisé pour les capillaires présente un fort signal RX, qui masque les pics du cristal analysé. [55], [56]

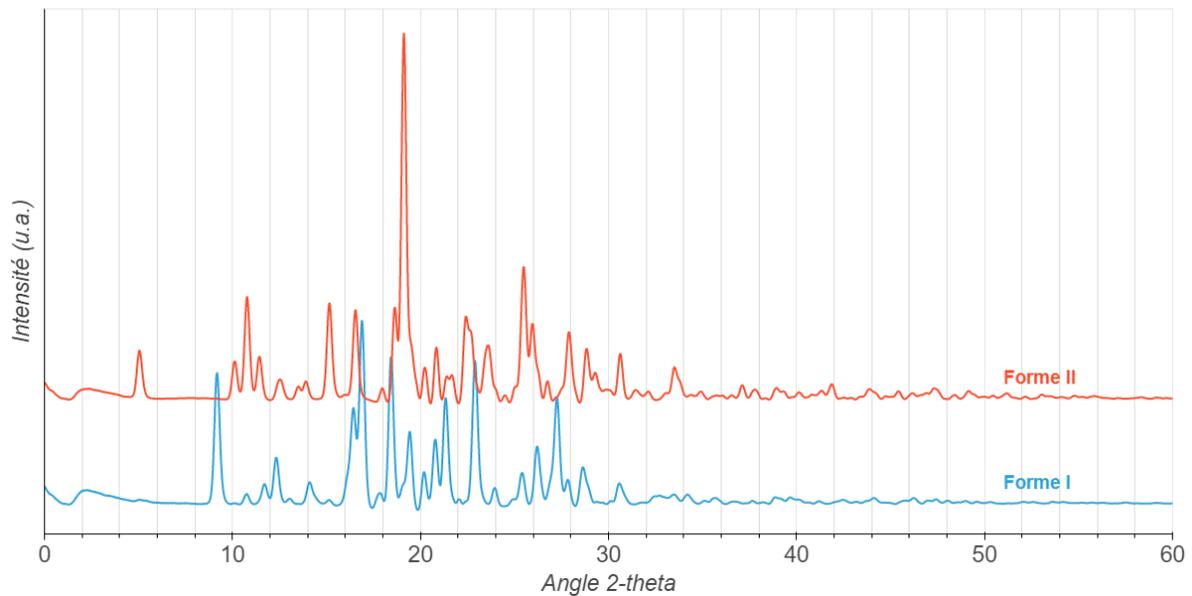


Figure 28 : Diffractogrammes RX des deux polymorphes du Rimnabant (Forme I et Forme II).

## 3.5. Spectroscopie Raman

Des techniques de spectroscopie vibrationnelle, comme la spectroscopie Raman et la spectroscopie infrarouge sont également utilisées pour la caractérisation des polymorphes. Ces techniques non destructives permettent en effet d'obtenir des spectres caractéristiques des niveaux d'énergie vibrationnels d'un matériau. Deux polymorphes pourront ainsi présenter des spectres légèrement différents. Cependant, les différences sont moins évidentes que pour la DRX. De plus, des artefacts, comme la fluorescence induite par le laser en spectroscopie Raman, peuvent perturber la mesure. Ces techniques sont donc généralement complétées par une analyse DRX. Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé la spectroscopie Raman afin de caractériser les différentes formes cristallines.

### 3.5.1. Principe de la spectroscopie Raman

Lors de la diffusion de la lumière sur un matériau, les photons incidents n'ont pas l'énergie suffisante pour induire une transition électronique vers un état excité "stable" : ils perturbent donc les électrons vers des états instables "virtuels". La majorité des photons incidents est diffusé avec la même énergie : c'est la diffusion de Rayleigh. Cependant, une fraction des photons ( $1$  pour  $10^6$ ) est diffusée avec un changement d'énergie  $\Delta E$  : il s'agit de l'effet Raman (Figure 29a). La différence d'énergie peut être attribuée à un gain ou une perte dans l'énergie vibrationnelle de la molécule [57]. On parle de diffusion Raman Stokes dans le cas d'une perte d'énergie et de diffusion Raman anti-Stokes dans le cas d'un gain d'énergie (Figure 29b). En spectroscopie Raman classique, seule la diffusion Raman Stokes est considérée.

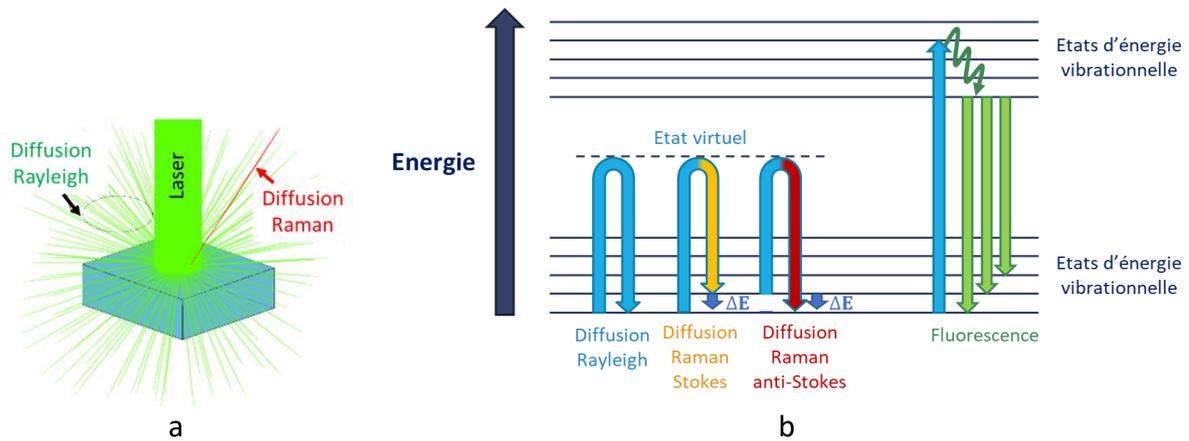


Figure 29 : (a) Diffusion de la lumière par un matériau. (b) Diagramme des niveaux d'énergie électronique impliqués dans les diffusion Rayleigh et Raman et la fluorescence (d'après [58]).

Dans certains cas, l'énergie des photons incidents peut être suffisante pour exciter les électrons du matériau vers des états d'énergie vibrationnels excités de la molécule par absorption d'un photon. La désexcitation vers les états d'énergie fondamentaux va engendrer l'émission d'un photon. C'est le phénomène de fluorescence (Figure 29b). En spectroscopie Raman, ce phénomène peut être observé, notamment pour les faibles longueurs d'onde. Cependant, il est souvent plus intense que la diffusion Raman et masque donc le signal Raman.

La spectroscopie Raman étant non destructive, et ne nécessitant pas de préparation particulière de l'échantillon, elle est utilisée pour de nombreuses applications aussi bien à l'échelle macroscopique qu'en microfluidique [57]. Les systèmes les plus répandus sont des systèmes de microscopie Raman. En microfluidique, on trouve également des systèmes Raman à fibres optiques. Dans les deux cas, le principe de la mesure reste le même : un faisceau monochromatique (laser) est envoyé sur l'échantillon par l'intermédiaire de divers éléments d'optique. Le signal diffusé est ensuite collecté et filtré afin de ne récupérer que les longueurs d'onde correspondant au signal Raman. Il est ensuite envoyé dans un spectromètre afin de séparer et d'analyser les longueurs d'onde récupérées. Celles-ci sont directement liées à la différence d'énergie  $\Delta E$  (eV) par l'équation (35).

$$\Delta E = \left( \frac{hc}{\lambda_0} - \frac{hc}{\lambda_1} \right) \quad (35)$$

Où :

$\lambda_0$  (nm) : longueur d'onde d'excitation (longueur d'onde du laser)

$\lambda_1$  (nm) : longueur d'onde Raman

$h$  (J.s) : constante de Planck

$c$  (m.s<sup>-1</sup>) : vitesse de la lumière dans le vide

La longueur d'onde Raman dépend de la longueur d'onde d'excitation. Afin d'uniformiser les spectres Raman mesurés, on définit le décalage Raman, en nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) par :

$$\Delta w(\text{cm}^{-1}) = \left( \frac{10^7}{\lambda_0(\text{nm})} - \frac{10^7}{\lambda_1(\text{nm})} \right) \quad (36)$$

Le signal récupéré par le spectromètre est donc représenté sur un spectre comme sur la Figure 30. A l'état solide, il peut exister une différence dans les niveaux d'énergie vibrationnels de deux polymorphes d'une même molécule. Cela se traduit par une modification du spectre Raman (apparition ou disparition d'un pic (Figure 30a), décalage d'un pic (Figure 30b)).

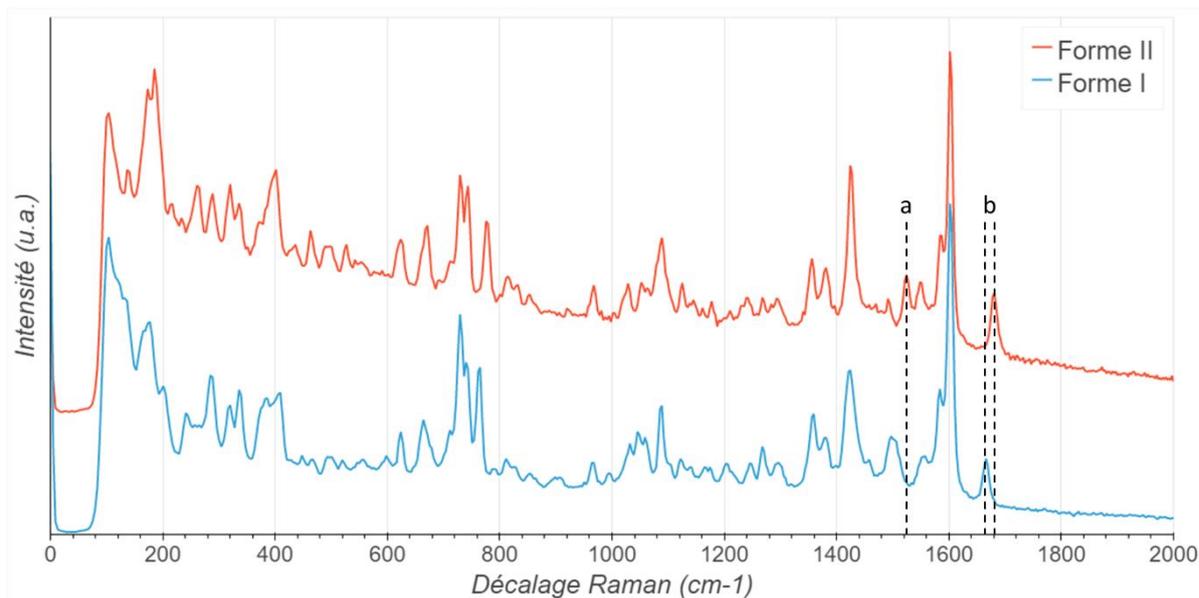


Figure 30 : Spectres Raman des deux polymorphes du Rimnabant (Forme I et Forme II). (a) Présence d'un pic supplémentaire sur le spectre de la forme II par rapport à celui de la forme I. (b) Décalage d'un pic entre les spectres Raman de la forme I et de la forme II.

### 3.5.2. Description d'un système Raman à fibres optiques

Le choix d'un système Raman dépend notamment de l'application. Dans ce paragraphe, je présenterai les principales caractéristiques à prendre en compte, en utilisant l'exemple d'un système Raman à fibres optiques, similaire à celui que j'ai implémenté sur la plateforme microfluidique dans le cadre de cette thèse. Cependant, la majorité des points abordés dans ce paragraphe s'applique également aux autres types de systèmes Raman.

La Figure 31 schématise un système Raman à fibres optiques, composé d'un laser, d'un spectromètre, de fibres optiques de collection et d'excitation et d'une tête de mesure (sonde). Ces différents éléments seront décrits indépendamment dans la suite du paragraphe.

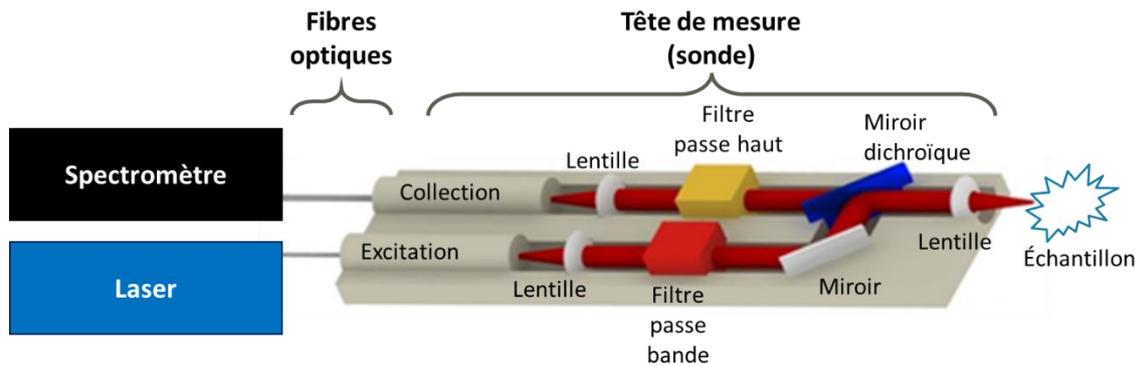


Figure 31 : Schéma d'un système Raman à fibres optiques, composé d'un laser, un spectromètre, deux fibres optiques et une tête de mesure (sonde) composée de différentes optiques (miroirs, filtres, lentilles) Adaptation du schéma de la sonde RPB (InPhotonics - OceanInsight) d'après [58].

### 3.5.2.1. Laser

Le premier paramètre à prendre en compte dans le choix d'un système Raman est la longueur d'onde de travail. Certains systèmes offrent la possibilité d'utiliser plusieurs longueurs d'onde. Cependant, cela nécessite d'avoir des optiques adaptées à chacune d'elles, ce qui peut être compliqué à mettre en place, notamment dans des systèmes à fibres optiques comme celui présenté en Figure 31, et coûteux. Pour ces systèmes, les solutions commerciales sont donc définies pour une longueur d'onde fixe.

Les longueurs d'onde  $\lambda$  couramment utilisées en Raman sont 532 nm, 638 nm, 785 nm et 1064 nm. Comme nous l'avons vu précédemment, plus la longueur d'onde est faible, plus l'énergie des photons est élevée et donc plus il y a risque de fluorescence. Cela est illustré par la Figure 32, qui présente les spectres Raman de la cellulose enregistrés pour 532 nm, 785 nm et 1064 nm. On voit qu'à 532 nm, le signal Raman est totalement masqué par la fluorescence (absence de pics). A 785 nm, le signal possède une ligne de base élevée due à la fluorescence, mais il est possible de distinguer des pics. Enfin, à 1064 nm, on n'est plus gêné par la fluorescence.

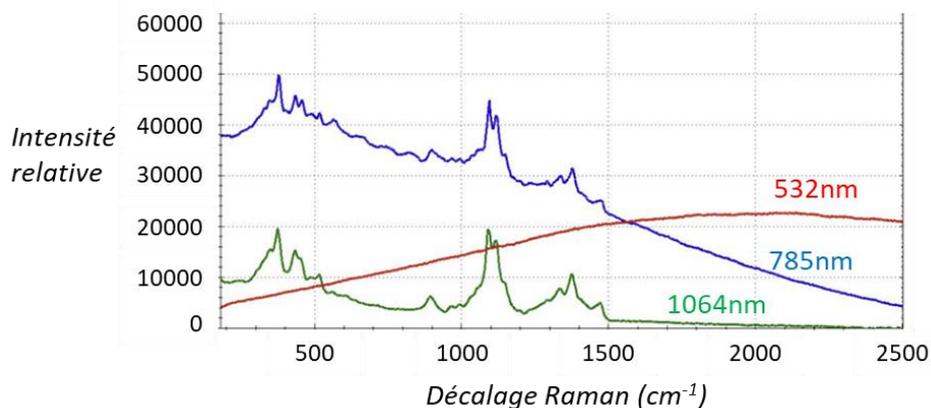


Figure 32 : Spectres Raman de la cellulose à 532 nm, 785 nm et 1064 nm. Adapté de [59].

En contrepartie, la puissance du signal Raman diffusé est inversement proportionnelle à  $\lambda^4$ , toutes choses égales par ailleurs.

$$P_{scattered} \propto \frac{I_0}{\lambda^4} \quad (37)$$

Ainsi, plus la longueur d'onde est élevée, moins le signal sera intense. Il faudra donc travailler avec des temps d'intégration plus élevés ou des puissances plus importantes, risquant de dégrader l'échantillon. Ainsi, un compromis doit être trouvé entre risque de fluorescence et intensité du signal. Ce compromis dépend du type de matériau analysé. La longueur d'onde la plus utilisée pour les molécules pharmaceutiques est 785 nm, pour laquelle peu de ces molécules fluorescent, et qui permet d'obtenir un signal d'intensité suffisante pour travailler à des temps d'intégration raisonnables.

### 3.5.2.1. Fibres optiques

Le faisceau laser est envoyé dans une fibre optique (fibre d'excitation) vers la sonde. En sortie de sonde, le signal Raman est également récupéré par une fibre optique (fibre de collection) et envoyé vers le spectromètre. La qualité et la géométrie des fibres optiques ont une influence sur le signal Raman. En particulier, la géométrie de la fibre de collection en entrée du spectromètre peut jouer sur l'intensité du signal.

La Figure 33 présente deux types de géométries de collection :

- une géométrie « classique » (Figure 33a), qui aligne une unique fibre optique sur la fente d'entrée du spectromètre
- une géométrie « circle-to-line » (Figure 33b), composée de plusieurs fibres optiques alignées avec la fente en entrée du spectromètre, afin de minimiser les pertes de signal et maximiser l'intensité reçue par le spectromètre.

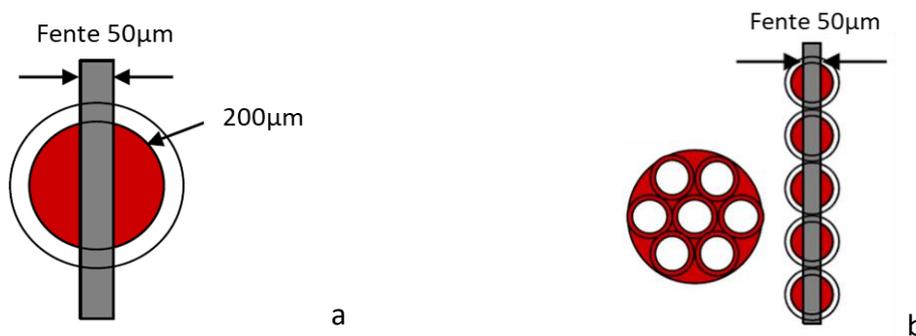


Figure 33 : Différentes géométries de fibres de collection : (a) géométrie « classique », (b) géométrie « circle-to-line ».

### 3.5.2.2. Sonde

Une sonde Raman contient de nombreux éléments optiques, adaptées à la longueur d'onde du laser. Le signal laser arrivant de la fibre optique d'excitation est d'abord collimaté à l'aide d'une lentille (Figure 31 et 34). Le faisceau parallèle ainsi formé est ensuite filtré. En effet, lors de son passage dans la fibre optique, le faisceau laser a été diffusé par les parois de la fibre, et un potentiel signal Raman de la fibre est alors contenu dans le faisceau arrivant dans la sonde. Un filtre passe bande (Figure 31), le plus fin possible, est donc utilisé afin d'obtenir un signal quasi-monochromatique à la longueur d'onde du laser. Ce signal est ensuite envoyé, à l'aide de miroirs, en sortie de sonde, sur une lentille convergente qui permet de focaliser le faisceau sur l'échantillon (Figure 31 et 34). Les propriétés de la lentille (distance focale  $f$  et diamètre  $D$ ) sont adaptées à la distance de travail et au volume de détection souhaités (Figure 34). Ce dernier est défini par la taille de point  $d$  et la profondeur de champ  $2\sqrt{2}d$ , avec :

$$d \propto \frac{f\lambda}{D} \quad (38)$$

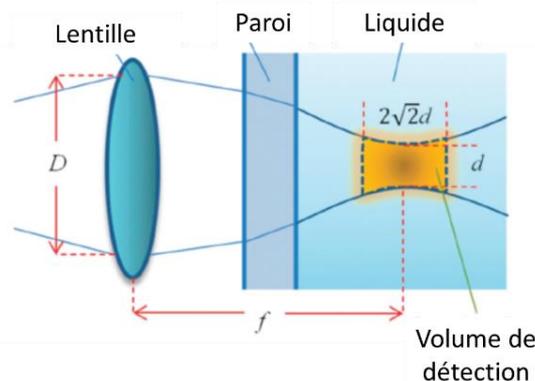


Figure 34 : Schéma d'un système optique pour la définition de la taille de point ( $d$ ) et la profondeur de champ ( $2\sqrt{2}d$ ) avec une lentille de distance focale  $f$  et de diamètre  $D$ . [57]

Une partie du signal diffusé par l'échantillon est ensuite collectée par cette même lentille. Ce signal contient à la fois les faisceaux diffusés par diffusion Rayleigh (à la longueur d'onde du laser) et Raman. Un premier filtrage est donc fait à l'aide d'un miroir dichroïque, qui permet de renvoyer le signal laser vers l'échantillon et de récupérer le signal Raman. Cependant, selon la qualité du miroir, le signal récupéré peut toujours contenir des faisceaux de la longueur d'onde du laser, et l'utilisation d'un second filtre, passe haut ou Notch (coupe-bande), permet de filtrer ces longueurs d'onde. Enfin, le faisceau contenant le signal Raman est focalisé à l'aide d'une dernière lentille sur l'entrée de la sonde de collection.

Dans le cas d'un microscope Raman classique, le chemin optique du faisceau est similaire à celui décrit ici. En pratique, le microscope est ainsi réglé optiquement sur la zone à analyser et le laser est focalisé au même point que celui déterminé optiquement.

### 3.5.2.3. Spectromètre

Une fois le signal Raman collecté par la fibre de collection, il est envoyé dans le spectromètre (Figure 35) à travers une fente d'entrée, qui permet d'élargir le faisceau. Plus la fente sera fine, meilleure sera la résolution. En contrepartie, l'intensité du signal diminue avec la largeur de la fente. Un premier compromis doit donc être trouvé entre résolution et intensité.

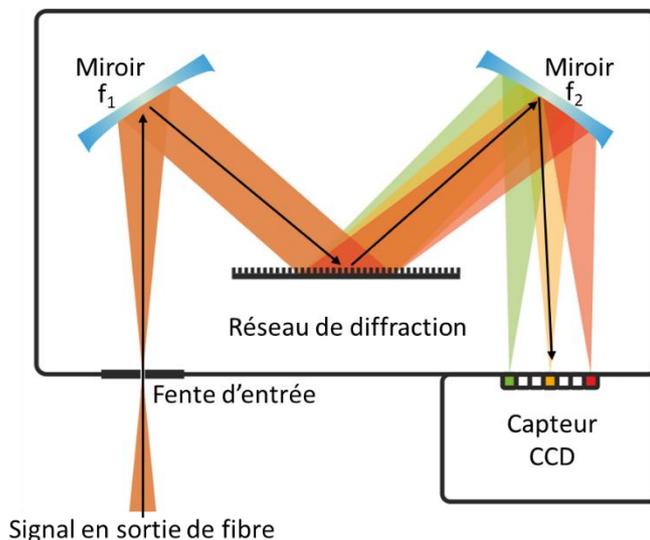


Figure 35 : Schéma de principe d'un spectromètre. Adapté de [60].

Le faisceau est ensuite collimaté (par le miroir concave  $f_1$  sur la Figure 35) et envoyé sur un système dispersif (réseau de diffraction sur la Figure 35) qui permet de séparer les longueurs d'onde. Pour un réseau, plus le nombre de traits sera élevé, meilleure sera la séparation et donc la résolution. Enfin, les faisceaux des différentes longueurs d'onde sont récupérés et collimatés (par le miroir concave  $f_2$  sur la Figure 35) sur un capteur (CCD sur la Figure 35). La qualité (taille et sensibilité) ainsi que la position du capteur sont primordiales pour l'analyse. Tout d'abord, sa sensibilité permet de détecter des signaux de plus ou moins faible intensité. La plupart des capteurs sont refroidis afin d'augmenter leur sensibilité. Ensuite, la position du capteur permet de choisir la gamme de longueurs d'onde analysées (largeur spectrale). Enfin, sa taille intervient également dans la résolution, chacun de ses pixels correspondant à une longueur d'onde. La résolution dépend donc de la combinaison des trois éléments : la fente d'entrée, le réseau de diffraction et le capteur. Cette combinaison est généralement prédéfinie par le fabricant du spectromètre.

## Conclusion de la bibliographie

Dans cette partie, j'ai présenté les principaux aspects de la cristallisation en solution, aussi bien d'un point de vue thermodynamique que cinétique, intervenant dans les deux étapes du mécanisme que sont la nucléation et la croissance. La notion de polymorphisme a été introduite, pour décrire un système pouvant cristalliser sous différentes phases, ayant des propriétés physico-chimiques différentes. Cela a permis de souligner l'intérêt pour l'industrie pharmaceutique d'étudier l'état solide le plus tôt possible et de manière la plus exhaustive possible lors du développement d'un nouveau médicament.

Ces criblages sont coûteux en termes de matière première, alors que cette dernière n'est disponible qu'en faible quantité (quelques grammes) au début du développement d'un médicament. La microfluidique est alors apparue comme solution pour réduire les volumes mis en jeu lors du criblage de l'état solide et donc les quantités de produit nécessaires. Parmi les différents types de systèmes existants, la microfluidique à base de gouttes est particulièrement intéressante pour le criblage car elle permet d'utiliser un nombre important de gouttes en tant que nanocristalloirs indépendants, et donc d'apporter une approche statistique sur la nucléation par rapport à un criblage classique.

Bien que la microfluidique sur puces soit utilisée dans de nombreux domaines, les matériaux utilisés nécessitent souvent un traitement supplémentaire afin d'être compatibles avec les solvants organiques intervenant dans le criblage. De plus, les puces ont une géométrie fixe et sont fabriquées par des procédés spécifiques, souvent complexes et coûteux. Des systèmes « *Plug and Play* » à base de capillaires et jonctions en Téflon ont donc été proposés pour diverses applications, grâce à leur grande résistance chimique, leur facilité d'utilisation et leur modularité.

Une autre contrainte de la microfluidique à base de gouttes est la stabilité des gouttes. Dans la majorité des cas, des tensioactifs s'adsorbant à l'interface avec le fluide continu sont ainsi utilisés afin d'éviter que les gouttes ne coalescent. Cependant, cela peut affecter la nucléation qui a également lieu à cette interface. Afin de s'en affranchir, une attention particulière doit être portée sur le choix de l'huile utilisée, et des conditions de génération des gouttes. Enfin, un autre effet induit par l'utilisation de la microfluidique à base de gouttes pour la cristallisation est l'effet de confinement, lié à la réduction du volume de cristallisation. Cet effet intervient à la fois sur la thermodynamique, par l'augmentation des sursaturations et des tailles critiques, et sur la cinétique, en augmentant fortement les temps de nucléation.

Pour finir, nous avons vu qu'il existe des techniques variées permettant de caractériser les solutions et les solides, et que certaines d'entre elles, comme la microscopie optique ou les spectroscopies Raman et UV sont facilement mise en œuvre en microfluidique.

L'objectif de la thèse est donc de développer une plateforme microfluidique complète, facile d'installation et d'utilisation en industrie pour le criblage de l'état solide de molécules d'intérêt pharmaceutique, afin de réduire le coût en matière première tout en augmentant le nombre de répétitions des expériences. L'aspect statistique sur la nucléation des différentes

phases est en particulier étudié, afin de comprendre la compétition de nucléation (concurrentielle, voire concomitante) des différentes phases selon les conditions appliquées. Ainsi, la caractérisation en ligne des gouttes et des cristaux est notamment un aspect majeur qui sera étudié lors de cette thèse afin de distinguer ces phases.

---

## *Partie B : Matériel et méthodes*

---

*Cette partie présente les différents produits (principes actifs, solvants et huiles) ainsi que les principaux composants microfluidiques et les équipements externes à la plateforme qui ont été utilisés lors de cette thèse. Les méthodes expérimentales pour les mesures d'énergies interfaciales, les mesures de solubilité, la génération des gouttes et le criblage des polymorphes y sont également décrites.*

*Note : de nombreux codes Python ont été développés durant cette thèse et mentionnés dans cette partie. Ils sont disponibles sur demande.*

# 1. Produits

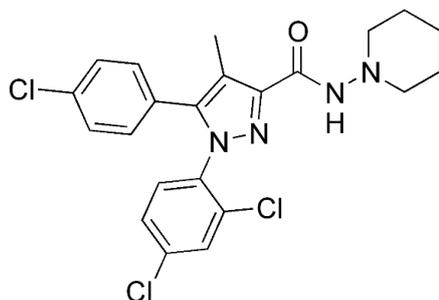
## 1.1. Principes actifs

Quatre molécules ont été étudiées durant cette thèse : le Rimonabant, l'Irbesartan, l'Aripiprazole et le Sulfathiazole. Chacune d'elles présente du polymorphisme, ou de la desmotropie dans le cas de l'Irbesartan.

### 1.1.1. Rimonabant

Le Rimonabant (*5-(4-Chlorophényl)-1-(2,4-dichlorophényl)-4-méthyl-N-(pipéridin-1-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide*) (Figure 36) est un antagoniste spécifique des récepteurs CB<sub>1</sub>, développé par Sanofi-Aventis pour le traitement de l'obésité (nom commercial : Acomplia). Bien qu'il ait été retiré du marché, il est toujours étudié pour son polymorphisme. En effet, le Rimonabant possède deux polymorphes I et II, ce dernier étant le polymorphe commercialisé. Ces deux polymorphes présentent des stabilités thermodynamiques similaires. Fours [61] a conclu à un système énantiotrope avec la forme I stable sous une température de transition estimée entre 50 et 58 °C, tandis que Perrin et al. [62] a établi un diagramme pression-température indiquant un système monotrope avec la forme II stable sur tout le domaine de pression et de température. Le Rimonabant forme également de nombreux solvates, en particulier dans les alcools [61].

Pour cette thèse, les deux formes du Rimonabant ont été fournies par Sanofi (SR141716, Forme I : lot FFT.REX1.150.0031 / Forme II : lot CL11469).



Formule brute : C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O  
 Masse molaire : 463,8 g/mol  
 N° CAS : 158681-13-1

Figure 36 : Formule topologique du Rimonabant.

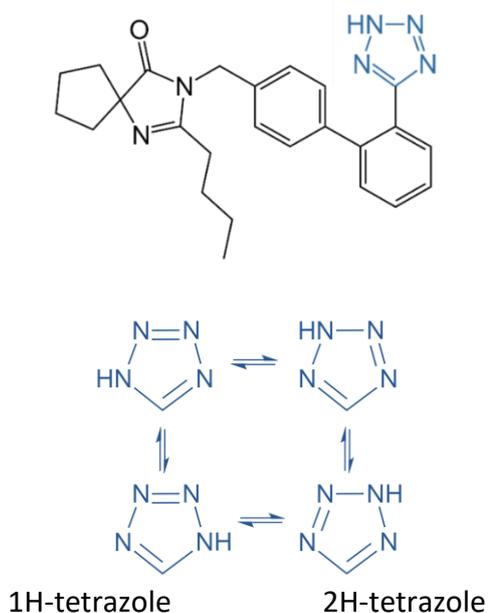
### 1.1.2. Irbesartan

L'Irbesartan (*8-butyl-7-((4-(2-(2H-tétrazol-5-yl)phényl)phényl)méthyl)-7,9-diazaspiro[4.4]non-8-én-6-one*) (Figure 37) est un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II utilisé dans le traitement de l'hypertension (nom commercial : Aprovel).

Un transfert réversible d'un proton a lieu sur le cycle tétrazole (on parle de tautomérie prototropique). Comme la vitesse de transfert du proton est rapide, on peut considérer que seuls deux tautomères existent (1-H et 2-H), les deux autres possibilités étant équivalentes.

Ces tautomères cristallisent selon deux structures différentes : forme A pour le tautomère 1-H et forme B pour le tautomère 2-H [13], [63]. Dans ce cas rare, on parle de desmotropie et non de polymorphisme. La stabilité de chaque forme dépend de son environnement [64]. En effet, le tautomère 2H est stabilisé dans les solvants polaires (eau, acétonitrile, ...) par la formation de liaisons H avec ceux-ci. Les liaisons H se retrouvent à l'état solide dans la forme B, entre deux molécules voisines d'Irbesartan (interaction entre le proton du tétrazole et de cycle imidazole de la molécule voisine). Au contraire, la forme A est plus stable dans les solvants apolaires (alcools, chloroforme, acétone...)[13].

Les formes A et B ont été fournies par Sanofi.

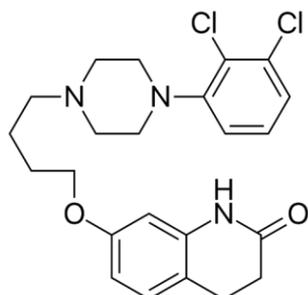


Formule brute :  $C_{25}H_{28}N_6O$   
 Masse molaire : 428,5 g/mol  
 N° CAS : 138402-11-6

Figure 37 : Formule topologique de l'Irbesartan et tautomérisation sur le cycle tétrazole (en bleu).

### 1.1.3. Aripiprazole

L'Aripiprazole (7-[4-[4-(2,3-dichlorophényl)piperazin-1-yl]butoxy]-3,4-dihydro-1H-quinolin-2-one) (Figure 38) est un antipsychotique utilisé dans le traitement de la schizophrénie et des troubles bipolaires (nom commercial : Abilify).



Formule brute :  $C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$   
 Masse molaire : 448,4 g/mol  
 N° CAS : 129722-12-9

Figure 38 : Formule topologique de l'Aripiprazole.

Il s'agit d'une des molécules pharmaceutiques avec le plus de polymorphes identifiés : neuf polymorphes dont les structures cristallines ont été résolues et plusieurs autres dont les structures n'ont pas été résolues à ce jour [65], [66]. Ce nombre important de polymorphes est dû à la mobilité de la molécule autour des liaisons C-C indiquées par des flèches jaunes sur la Figure 39, résultant en une multitude de conformations possibles et donc d'arrangement cristallins. On parle dans ce cas de polymorphisme de conformation.

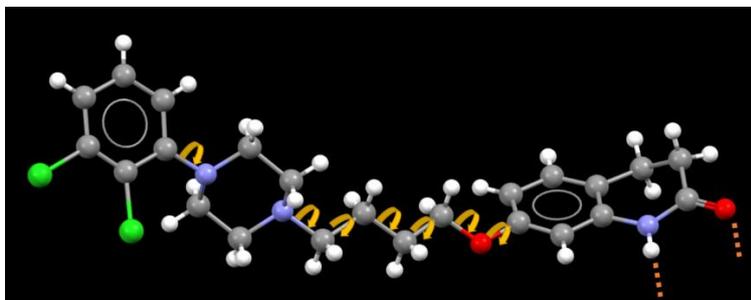


Figure 39 : Structure moléculaire de l'Aripiprazole : les angles de torsion de la molécule sont indiqués par les flèches jaunes et les liaisons hydrogène potentielles en lignes pointillées oranges. (adapté d'après [66] et Mercury (CSD))

Braun et al. [67] ont établi un ordre des stabilités pour les cinq premiers polymorphes à partir des règles des enthalpies de fusion et des températures de fusion de Burger et Ramberger [68], [69]. Selon cette classification, la forme V (ou X° selon les notations) est la forme la plus stable à basse température, jusqu'à environ 62 °C, puis la forme II est la plus stable entre 62 et 77 °C et enfin la forme I devient la plus stable au-dessus de 77 °C. De 0K à la température ambiante, l'ordre de stabilité des formes est le suivant : I<III<IV<II<V.

Plus récemment, Delaney et al. ont calculé les énergies électroniques totales à 0K de sept polymorphes (I à VII) par la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (*Density Functional Theory*, DFT) et ont obtenu l'ordre I<II<IV<V<III<VI<VII [70]. Ils ont complété leurs études par des mesures de solubilité qui ont abouti à l'ordre I<III<II<IV<V<VII à température ambiante, qui se rapproche un peu plus de l'ordre établi par Braun et al. Ultérieurement, ils ont étudié le polymorphe VIII et ont établi une relation d'énantiotropie avec la forme II, la forme VIII devenant plus stable à basse température (<48 °C) [71]. Enfin, Zeidan et al. [65] ont montré que la forme IX était plus métastable que les formes identifiées antérieurement.

La complexité du système polymorphique de l'Aripiprazole vient à la fois du nombre de polymorphes, de l'enchevêtrement de relations de monotropie et d'énantiotropie entre ces polymorphes, et de la multiplicité de conformères qui les composent, donnant lieu à des interactions variées. Ainsi, l'étude des stabilités est compliquée et approximative, notamment sur l'ordre des phases métastables, d'où les différences observées parmi les auteurs.

Bien que dans tous les cas la forme III soit métastable, elle a historiquement été choisie pour être commercialisée, notamment à cause de sa plus faible hygroscopicité en comparaison d'autres formes, ce qui permet de limiter sa transformation en monohydrate.

Pour cette thèse, l'Aripiprazole a été acheté chez Thermoscientific (lot A0417885) et se présente comme un mélange des formes II et III d'après l'analyse DRX de la poudre de départ (Figure 40).

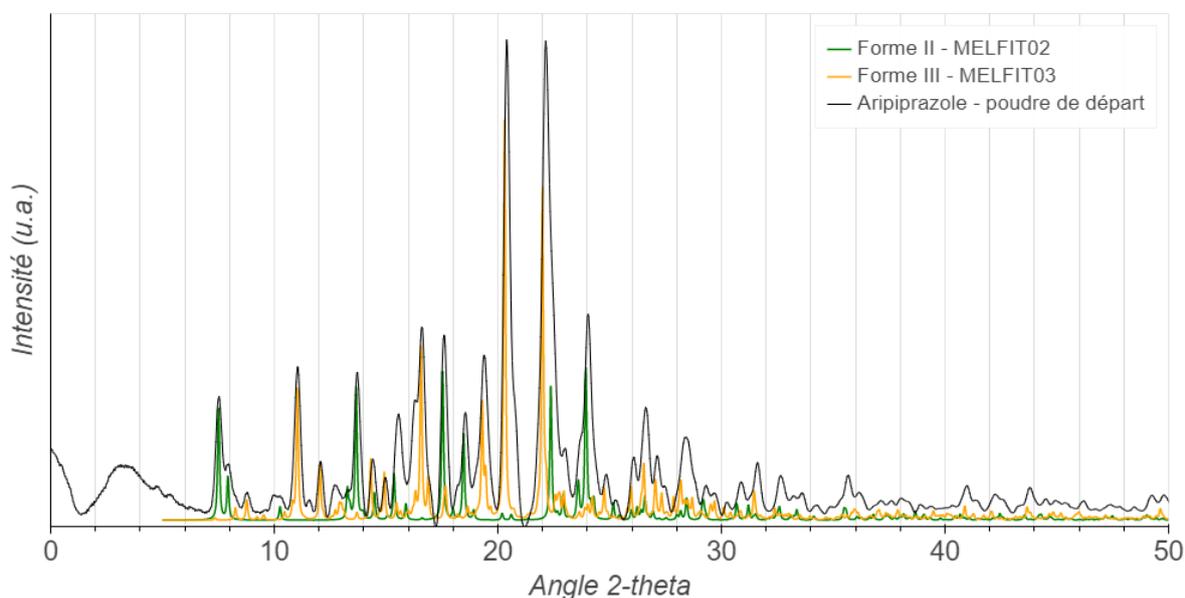


Figure 40 : Diffractogramme RX de la poudre de départ d'Aripiprazole (lot A0417885, Thermoscientific) comparé aux références des formes II (MELFIT02) et III (MELFIT03) répertoriées dans la Cambridge Structural Database.

#### 1.1.4. Sulfathiazole

Le Sulfathiazole (*4-Amino-N-(2-thiazolyl)benzenesulfonamide*) (Figure 41) est un antimicrobien couramment utilisé dans la littérature pour son polymorphisme. [72], [73]. En effet, il possède cinq polymorphes [74] et de nombreux solvates [75]. Toutefois, une confusion existe dans les noms des polymorphes. Dans cette thèse, nous reprendrons les mêmes notations que Blagden et al. [76], Munroe et al. [72] et Peybernès et al. [7], [56], conformes à la nomenclature utilisée par la Cambridge Structural Database (CSD).

De même que l'Irbesartan, le Sulfathiazole possède deux tautomères, un imine (Figure 41a) et un amine (Figure 41b), sur son cycle thiazole. Cependant, le tautomère imine est plus stable que l'amine [77] et c'est le seul présent dans les structures cristallines des cinq polymorphes connus [76].

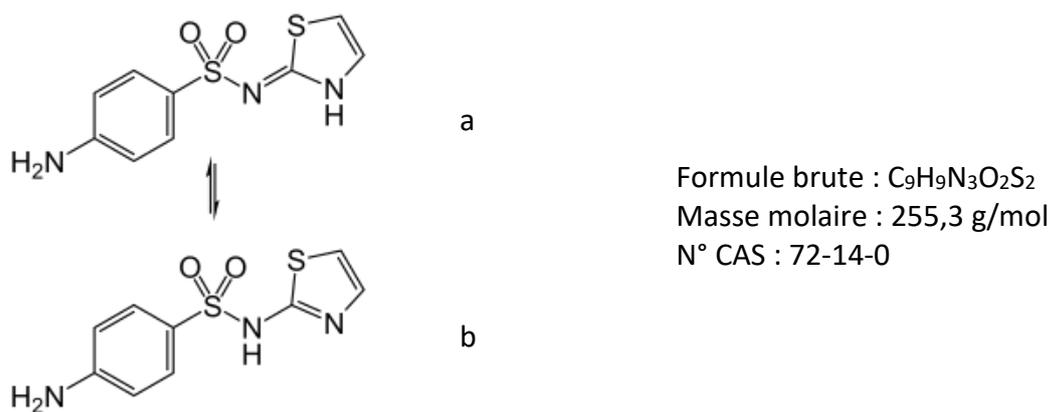


Figure 41 : Formule topologique des deux tautomères du Sulfathiazole (a) imine et (b) amide.

La stabilité relative des cinq polymorphes n'est pas clairement établie dans la littérature. En mesurant les solubilités, Khoshkhoo et al.[78] proposent l'ordre suivant : I<II<IV<III. En se basant sur des expériences de maturation (mûrissement d'Ostwald), Blagden et al.[76] suggèrent que l'ordre des stabilités suit l'ordre des densités calculées, à savoir I<II<III<IV. En combinant des mesures de solubilité et des expériences de murissement de différents mélanges de formes, Munroe et al. [72] établissent l'ordre suivant: I<V<IV<II<III. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les solubilités des formes II, III et IV sont relativement proches, ce qui peut rendre l'interprétation des mesures compliquée.

Le Sulfathiazole utilisé pendant cette thèse a été fourni par Fluka Analytical (lot MKBQ0002V) et est un mélange des formes II et IV d'après une analyse par DRX.

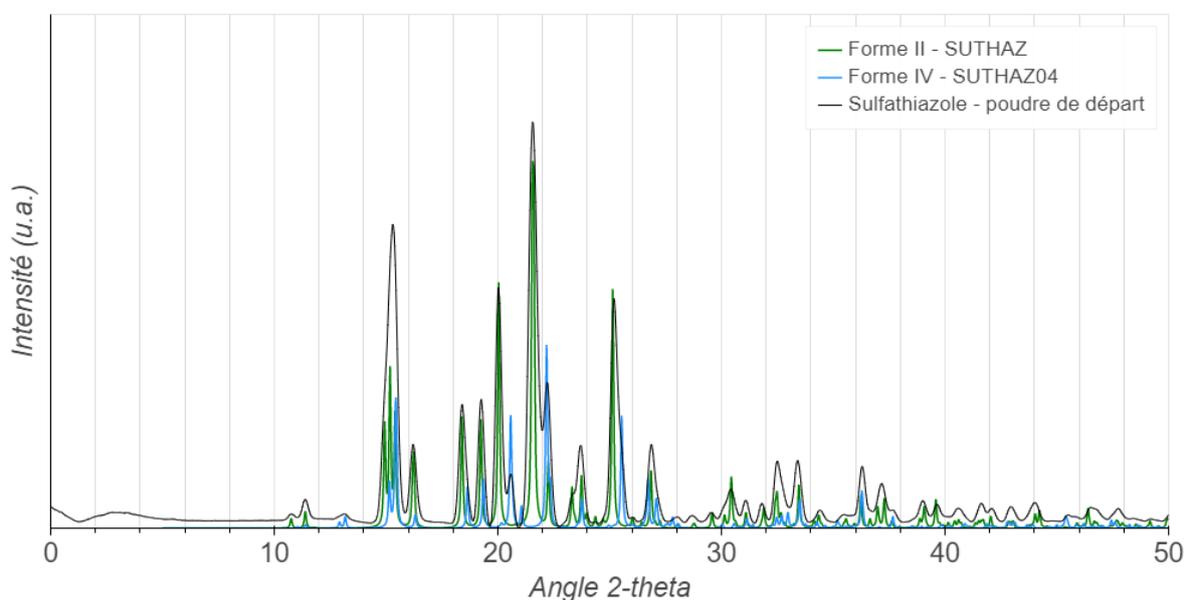


Figure 42 : Diffractogramme RX de la poudre de départ de Sulfathiazole (lot MKBQ0002V, Fluka Analytical) comparé aux références des formes II (SUTHAZ) et IV (SUTHAZ04) répertoriées dans la Cambridge Structural Database.

## 1.2. Solvants

L'eau utilisée est de l'eau ultrapure de type MilliQ. Les solvants, présentés dans le Tableau 1, sont des solvants de qualité analytique (pureté supérieure à 99,9%).

Solvant	Formule chimique	N°CAS	Masse volumique à 20 °C (kg/m <sup>3</sup> )	Masse molaire (g/mol)	Température d'ébullition à pression atmosphérique (°C)
Acétonitrile	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	75-05-8	786	41,1	82
Butan-1-ol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	71-36-3	810	74,1	118
Diméthylformamide (DMF)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO	68-12-2	944	73,1	153
Diméthylsulfoxyde (DMSO)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	67-68-5	1100	78,1	189
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	64-17-5	789	46,1	78
Isopropanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>	67-63-0	786	60,1	83
Méthanol	CH <sub>4</sub> O	67-56-1	792	32,0	65
3-méthylbutan-1-ol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	810	88,1	131
Méthylcyclohexane	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub>	108-87-2	770	98,2	101
N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	872-50-4	1030	99,1	202
2-pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	6032-29-7	812	88,1	119
Toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	108-88-3	867	92,1	111

Tableau 1 : Propriétés des solvants utilisés.

## 1.3. Huile

Le choix de l'huile comme fluide continu est déterminant pour la fabrication de gouttes régulières et stables, d'autant plus que l'on n'utilise pas de tensioactif. Plusieurs huiles ont été étudiées lors de travaux antérieurs à cette thèse pour la formation des gouttes [56]. Pour cette thèse, j'ai choisi l'huile GPL107 (Krytox™) qui est une huile synthétique à base de polyetherperfluoré (PFPE) (Figure 43), inerte chimiquement et non miscible avec la plupart des solvants, notamment avec les solvants organiques que j'ai utilisés.

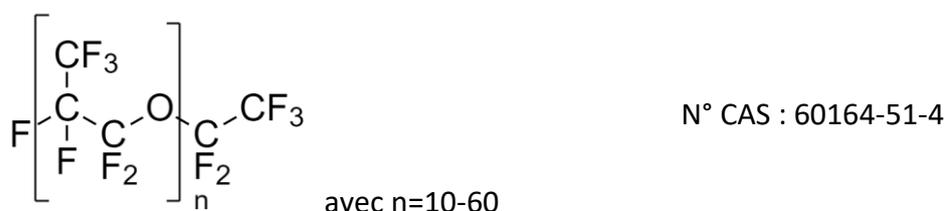


Figure 43 : Formule chimique du polyetherperfluoré (PFPE).

Elle a également été choisie pour sa viscosité élevée, qui permet de se passer de tensioactifs tout en évitant la coalescence des gouttes formées. Sa viscosité et sa densité à

différentes températures sont présentées dans le Tableau 2. J’y ai également regroupé son énergie interfaciale avec l’air, l’eau, l’éthanol et l’acétonitrile, que j’ai mesurée avec la méthode de la goutte pendante (Partie B – 4.1).

L’huile GPL107 a été fournie par Chemours (lot K4468).

Gamme utile de température estimée (°C) <sup>a</sup>		-30 to 288
Viscosité (cSt) <sup>a</sup>	20 °C	1535
	40 °C	450
	100 °C	42
	204 °C	6
	260 °C	3,3
Indice de viscosité <sup>a</sup>		145
Densité (g/mL) <sup>a</sup>	0 °C	1,95
	100 °C	1,78
Energie interfaciale mesurée (mJ/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	Air	18-20
	Acétonitrile	13-15
	Ethanol	9
	Eau	52-55

Tableau 2 : Propriétés de l’huile GPL107. (a) données par Krytox<sup>TM</sup>, (b) mesurées par la méthode de la goutte pendante à 20 °C (Partie B – 4.1).

## 2. Matériel microfluidique

Ce paragraphe présente les principaux composants du circuit microfluidique. Les améliorations apportées sur la plateforme lors de cette thèse seront présentées en Partie C. Un tableau récapitulatif des références des principaux composants microfluidiques est donné en Annexe 1.

### 2.1. Gestion des débits

#### 2.1.1. Seringues

Les solvants et l'huile sont chargés dans des seringues en verre (Hamilton ou Cetoni), compatibles chimiquement avec les solvants aqueux et organiques, ainsi qu'avec les huiles. Initialement, les seringues utilisées possédaient un embout de type Luer Lock. Cependant, ceux-ci ne sont pas parfaitement étanches, notamment à cause des pressions relativement élevées mises en jeu (environ 1,3 bar pour une conduite de 1mm de diamètre et 1m de long, avec un débit d'huile GPL107 de 1  $\mu\text{L/s}$  à 20°C). De ce fait, j'ai préféré utiliser des seringues avec une terminaison en pas de vis de type ¼"-28UNF (seringue série 1000 Chemseal, Hamilton) (Figure 44).

Plusieurs tailles de seringues sont disponibles. Ici, j'ai utilisé des volumes de 5 mL et 10 mL. Pour les mesures de solubilité, il est préférable d'utiliser des seringues de 10 mL, car les volumes nécessaires pour la dilution peuvent être relativement importants, notamment pour des produits fortement solubles ou très absorbants.



Figure 44 : Seringues avec embout (a) Luer-Lock ; (b) Chemseal.

#### 2.1.2. Pousse-seringue

Les seringues sont placées sur des pousse-seringues de précision (Nemesys Low Pressure, Cetoni) (Figure 45a). Ceux-ci sont résistants jusqu'à 3bar (43,5psi) et permettent de générer des débits stables pouvant aller de 0,002 $\mu\text{L/s}$  à 5274 $\mu\text{L/s}$ , selon les volumes de seringues utilisés. Un support bloquant (Figure 45b) est ajouté afin d'éviter le glissement des seringues sur les supports en caoutchouc à cause de la pression, et ainsi d'assurer l'exactitude des débits.

Pour l'installation sur le site Sanofi de Vitry-sur-Seine, la nouvelle version du pousse-seringue a été utilisée (Nemesys S, Cetoni). Celle-ci permet de travailler à des pressions plus élevées, jusqu'à 10bar, et de générer des débits de 0,03 nL/s à 5 mL/s sans pulsation selon les seringues. Pour une seringue de 10 mL, les débits sont stables à partir de 28 nL/s et peuvent aller jusqu'à 1 mL/s.

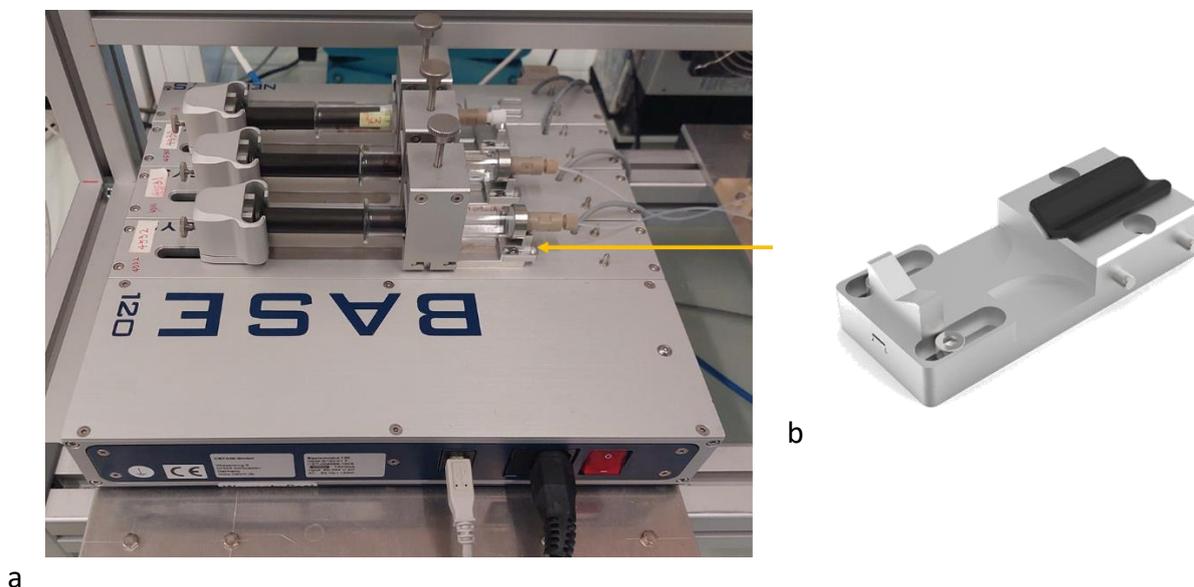


Figure 45 : (a) Pousse-seringues Nemesys Low Pressure composés d'une Base 120 et de quatre pompes Nemesys Low Pressure munies de supports bloquants. (b) Support bloquant.

### 2.1.3. Contrôle des débits

Les débits sont contrôlés par l'intermédiaire du logiciel NEMESYS UserInterface (Cetoni) ou sa nouvelle version Cetoni Elements (Cetoni). La taille et le type de seringue sont indiqués dans le logiciel. Les débits peuvent être enregistrés au cours du temps. Les débits utilisés dans cette thèse sont compris entre 0,2 $\mu$ L/s et 2 $\mu$ L/s. Ils dépendent de la dilution souhaitée, dans le cas des mesures de solubilité, ou des longueurs et fréquences souhaitées dans le cas de la génération de gouttes.

## 2.2. Circuit microfluidique

### 2.2.1. Capillaires

Les fluides circulent dans des capillaires en perfluoroalkoxy (PFA ou Teflon-PFA) classiquement utilisés en HPLC. Ce polymère présente l'intérêt d'être à la fois résistant en température dans nos gammes de travail (température maximum recommandée de 80 °C) et compatible avec la majorité des composés chimiques, ce qui permet de travailler avec des solvants organiques aussi bien qu'avec de l'eau. On trouve des capillaires de diamètres internes variés, de la dizaine de micromètres à l'ordre du centimètre. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé des capillaires de 1 mm de diamètre interne (ref. 1507L, IDEX Health & Science).

## 2.2.1. Connectique

Les capillaires d'huile et de solvant sont connectés aux seringues grâce à des connexions de type P-703 (Idex Health & Science). Le capillaire de solvant est ensuite connecté à une colonne UHPLC en acier inox qui contient la poudre à dissoudre. Puis une jonction T de 1,3 mm de diamètre interne (ref. P-728, Idex Health & Science) est utilisée en sortie de colonne afin de connecter la solution saturée au flux d'huile, pour la génération de gouttes. Pour une dilution, le flux d'huile peut également être remplacé par un flux de solvant. Aux extrémités de la colonne, ainsi que sur la jonction T, les capillaires sont reliés avec des connecteurs de type F-120 (Idex Health & Science).

Pour les mesures de solubilité, le capillaire de PFA en sortie du T est relié à un capillaire en quartz de 1 mm de diamètre interne (CMSL Q#8174, VitroCom, cf. Partie B – 4.2) grâce à une jonction droite de type P-760 de 1,3 mm de diamètre interne.

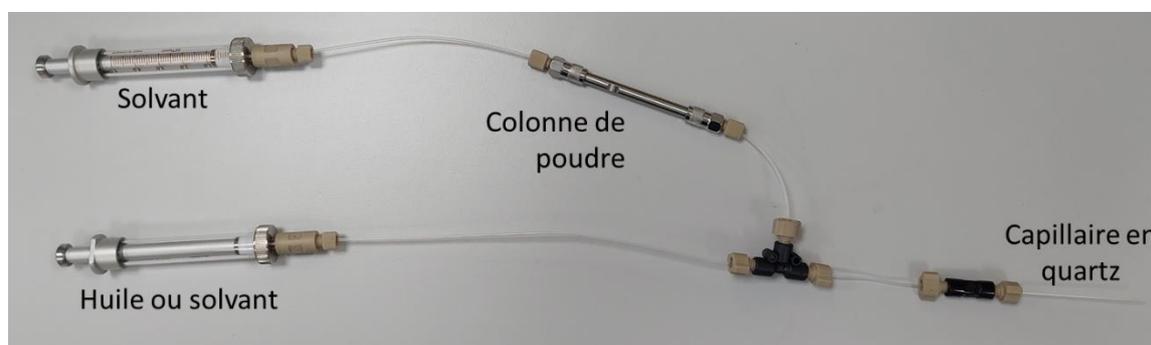


Figure 46 : Photo d'un circuit microfluidique pour la génération de gouttes ou de solutions saturées et diluées à partir de poudre.

### 3. Matériel complémentaire

Différentes techniques complémentaires à la plateforme microfluidique ont été utilisées lors de cette thèse afin de cristalliser les molécules d'intérêt, de mesurer des solubilités ou d'analyser les cristaux et les poudres. L'impression 3D qui a largement participé à l'amélioration de la plateforme microfluidique est également présentée ici.

#### 3.1. Monopuits

Des expériences de cristallisation ont été réalisées en vials en complément de la microfluidique.

Au CINaM, j'ai utilisé le dispositif Monopuits (Anacrismat) (Figure 47) qui est composé d'une platine thermostatée par effet Peltier (Figure 47a), refroidie par circulation d'eau, dans laquelle est introduit un vial de 1 mL contenant la solution ou la suspension (Figure 47b). Le fond du vial est observé par un microscope optique à transmission (Nikon, objectif x4) (Figure 47c) muni d'une caméra (DFK 31BF03, The Imaging Source) (Figure 47d). L'ensemble est piloté par une interface (programme LabVIEW) qui permet notamment de programmer des profils de température et des acquisitions séquentielles d'images (Figure 47e).

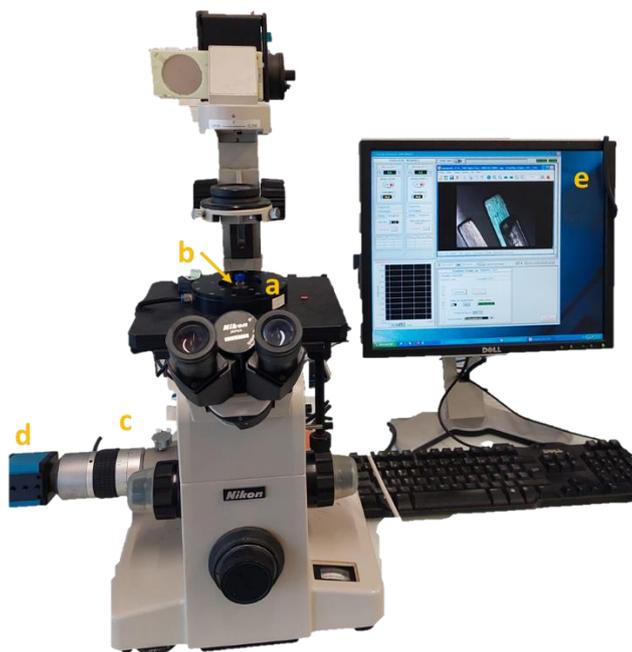


Figure 47 : Dispositif Monopuits : (a) platine thermostatée par effet Peltier ; (b) vial de 1 mL contenant la solution ou la suspension ; (c) microscope ; (d) caméra ; (e) logiciel de pilotage.

## 3.2. Réacteurs EasyMax

Pour la cristallisation des solvates de Rimonabant par refroidissement, j'ai utilisé des réacteurs automatisés de 8 mL (EasyMax 102, Mettler Toledo) à Sanofi (Figure 48). La température des réacteurs est programmée directement dans l'interface du système EasyMax. J'ai également effectué des expériences de maturation en vials de 8 mL à température sur des plaques d'agitation magnétique.

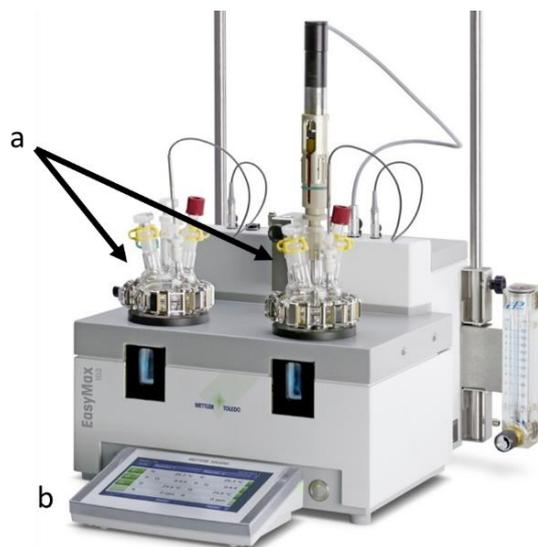


Figure 48 : Système EasyMax 102 (Mettler Toledo), composé de deux réacteurs thermostatés (a), programmés par une interface (b).

## 3.3. Microscopie Raman

Au CINaM, j'ai utilisé un spectromètre Raman à microscopie (RXN1, Kaiser) en complément de celui implémenté sur la plateforme microfluidique (décrit en Partie C - 5). Il est composé d'un laser à 785 nm (Invictus) relié à un microscope (DMLP, Leica) muni d'une platine motorisée en XY et d'un objectif x10. L'ensemble est piloté par le logiciel Holograms.

Des mesures ont également été réalisées au CINaM sur un second système de microscopie Raman plus performant (InVia Reflex, Renishaw) de 785 nm avec réseau de  $1200 \text{ l.mm}^{-1}$ , muni d'un microscope confocal (DM2500M, Leica) avec des objectifs x5, x20 et x50.

A Sanofi, j'ai utilisé un spectromètre Raman à microscopie (HR800, Horiba), piloté par le logiciel LabSpec6 et disposant d'un laser à 785 nm et d'objectifs x10 et x50.

## 3.4. Analyses thermiques

### 3.4.1. DSC

J'ai analysé les échantillons produits à Sanofi par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). L'appareil utilisé (Q1000, TA Instruments) est piloté par le logiciel Qseries. J'ai ensuite traité les données obtenues avec le logiciel Universal Analysis.

Les échantillons sont préparés par introduction d'une faible quantité de poudre dans des coupelles fermées et serties avec un couvercle percé. Ils sont ensuite soumis à une rampe de température de 20 °C à 200 °C à une vitesse de 5 °C/min.

### 3.4.2. TGA

J'ai analysé les échantillons produits à Sanofi par thermogravimétrie (TGA). L'appareil utilisé (Q5000, TA Instruments) est piloté par le logiciel Qseries. Les données sont ensuite retraitées avec le logiciel Universal Analysis. Ils sont soumis à une rampe de température de 25 °C à 250 °C à une vitesse de 10 °C/min.

## 3.5. DRX

Au CINaM, les échantillons ont été analysés par diffraction des rayons X (DRX) à l'aide d'un diffractomètre composé d'une source de rayons X à anode tournante à haute brillance (Figure 49) Rigaku RU 200BH (Puissance 50 kV - 50 mA), d'un système optique de type multicouches, Osmic, et d'un détecteur 2D, Mar345 (Figure 49). Pour les mesures, les échantillons de poudre ou les cristaux extraits directement des gouttes sont introduits dans des capillaires en verre Lindeman de type Mark-tube de 0,2 à 0,7 mm de diamètre (Hilgenberg). Les analyses ont été réalisées par Vasile Heresanu, responsable du service RX du CINaM.

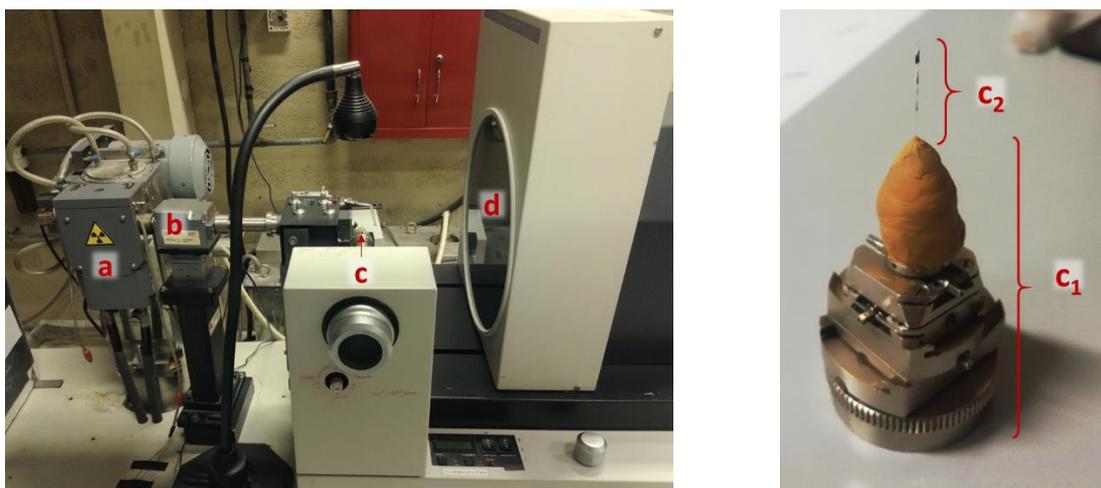


Figure 49 : Dispositif de diffraction des rayons X. (a) Source de rayons X ; (b) Système optique ; (c) Porte échantillon : (c<sub>1</sub>) support d'échantillon ; (c<sub>2</sub>) capillaire en verre contenant l'échantillon ; (d) détecteur 2D.

A Sanofi, j'ai analysé les échantillons de poudre à l'aide un diffractomètre de poudres de type D4 Endeavor (Bruker) piloté par le logiciel EVA. L'analyse est effectuée à température ambiante sur des angles compris entre 1 et 40° (2θ) en 45 min.

Les diffractogrammes obtenus sont ensuite comparés avec ceux des structures cristallines répertoriées dans la Cambridge Structural Database (CSD), listées en gras dans le Tableau 3.

<b>Produit</b>	<b>Forme polymorphique</b>	<b>Formes équivalentes CSD</b>
<i>Aripiprazole</i>	I	<b>MELFIT01</b>
	II	<b>MELFIT02</b> , MELFIT08, MELFIT15, MELFIT16, MELFIT17
	III	MELFIT, <b>MELFIT03</b>
	IV	<b>MELFIT04</b>
	V ou X°	<b>MELFIT05</b>
	VI	<b>MELFIT06</b>
	VII	<b>MELFIT07</b>
	VIII	<b>MELFIT09</b> , MELFIT10, MELFIT11, MELFIT12, MELFIT13, MELFIT14, MELFIT18
	IX	<b>MELFIT19</b>
	Monohydrate	<b>MELFUF</b> , MELFUF01
<i>Sulfathiazole</i>	I	<b>SUTHAZ01</b> , SUTHAZ07, SUTHAZ08, SUTHAZ16, SUTHAZ23, SUTHAZ28, SUTHAZ29, SUTHAZ43, SUTHAZ47
	II	<b>SUTHAZ</b> , SUTHAZ03, SUTHAZ09, SUTHAZ10, SUTHAZ18, SUTHAZ20, SUTHAZ24, SUTHAZ30, SUTHAZ31, SUTHAZ32, SUTHAZ48
	III	<b>SUTHAZ02</b> , SUTHAZ11, SUTHAZ12, SUTHAZ17, SUTHAZ21, SUTHAZ25, SUTHAZ33, SUTHAZ34, SUTHAZ35, SUTHAZ49
	IV	<b>SUTHAZ04</b> , SUTHAZ13, SUTHAZ14, SUTHAZ19, SUTHAZ22, SUTHAZ26, SUTHAZ36, SUTHAZ37, SUTHAZ38, SUTHAZ50
	V	<b>SUTHAZ05</b> , SUTHAZ06, SUTHAZ15, SUTHAZ27, SUTHAZ51
<i>Irbesartan</i>	A	/
	B	<b>NOZWII</b>
<i>Rimonabant</i>	I	<b>RIFBAL01</b>
	II	<b>RIFBAL</b>

Tableau 3 : Formes répertoriées dans la Cambridge Structural Database (CSD) pour les différents produits étudiés au cours de la thèse. Les formes indiquées en gras sont celles utilisées comme références ici.

### 3.6. Energie interfaciale - OCA20

J'ai mesuré les énergies interfaciales entre deux fluides (solvant/huile, solvant/air ou huile/air) par la méthode de la goutte pendante en utilisant un appareil de mesure de type OCA-20 (Dataphysics), représenté en Figure 50, et contrôlé par le logiciel SCA20\_U.

Une seringue de 1 mL (Figure 50a) contenant le fluide le plus dense est positionnée sur un bras mobile (Figure 50b) et son piston est fixé à un pousse seringue (Figure 50c). Elle est terminée par une aiguille sans biseau (Nordson, diamètre extérieur 0,82 mm) plongée dans le fluide le moins dense, contenue dans une cellule transparente (Figure 50d). L'extrémité de la seringue et les gouttes générées sont alignées à un objectif réglable (Figure 50e) relié à une caméra (Figure 50f).

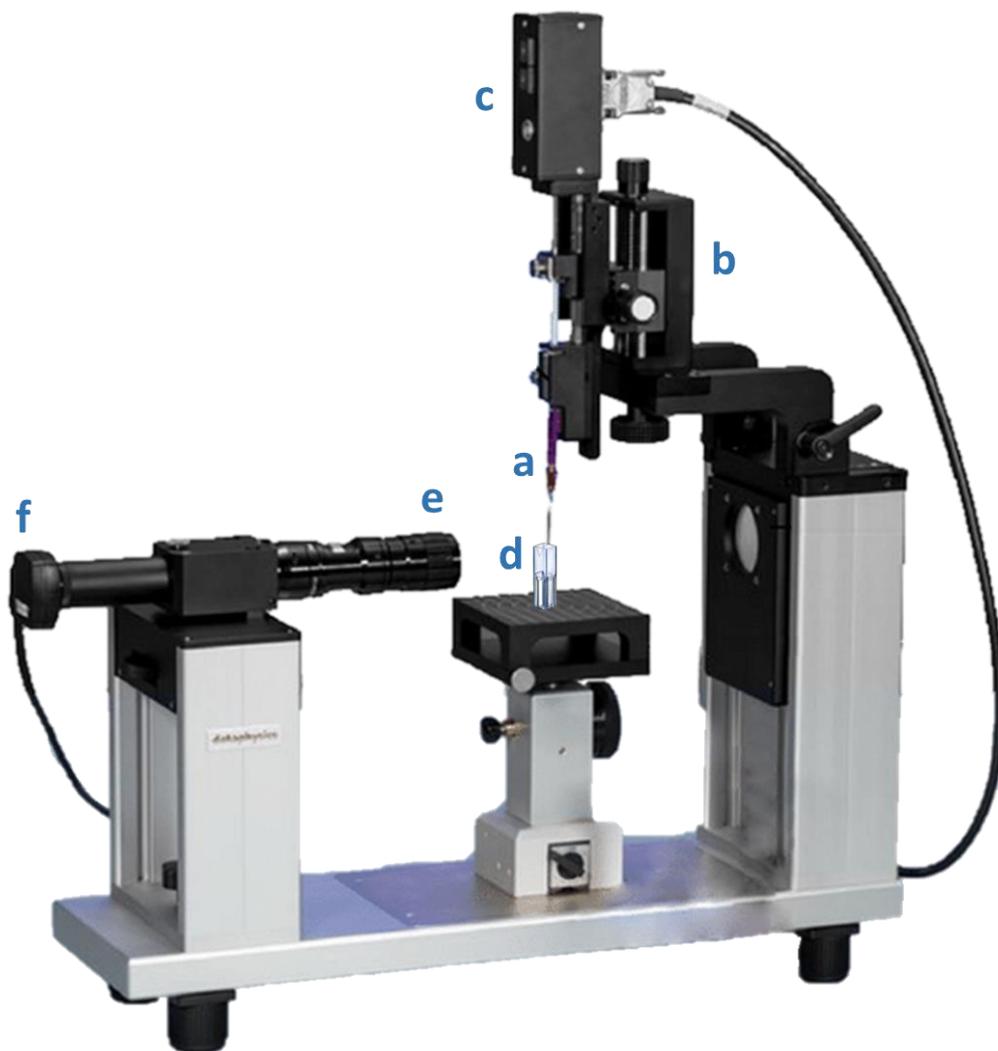


Figure 50 : Appareil de mesure OCA-20 pour la méthode de la goutte pendante.

## 3.7. Impression 3D

Deux imprimantes 3D sont disponibles au CINaM et ont été utilisées dans le cadre de cette thèse.

La première (Raise3D N2, Raise3D) est une imprimante de type *Fused Deposition Modelling* (FDM – dépôt de fil fondu) qui consiste à déposer couche par couche un filament d'acide polylactique (PLA) fondu par une buse. Ce matériau, peu coûteux, a été utilisé ici pour faire uniquement du prototypage rapide sur les pièces imprimées, ou pour fabriquer des pièces pour la structure globale de la plateforme. En effet, un des inconvénients de ce procédé d'impression est l'épaisseur de couche (environ 0,05 à 0,3 mm), qui dépend de l'épaisseur du filament et de la largeur de la buse d'impression. Ainsi, la précision des pièces est limitée (0,5 mm). De plus, le matériau PLA utilisé ne résiste pas en température.

Pour des pièces contenant des détails, j'ai préféré utiliser un autre procédé d'impression avec l'imprimante Form3+ (Formlabs) qui utilise la stéréolithographie (SLA) pour la photopolymérisation couche par couche d'une résine. L'épaisseur de couche est directement liée à l'épaisseur du faisceau (environ 0,02 mm) et donc permet de réaliser des pièces d'une grande résolution (0,1 mm). Dans le cadre de cette thèse, trois résines différentes ont été utilisées selon les applications souhaitées :

- Une résine transparente résistante en température, jusqu'à 238 °C (*High Temp Resin*) pour les pièces soumises à des changements de température importants
- Une résine grise opaque (*Grey Resin*) pour les pièces UV et Raman
- Une résine transparente classique (*Clear Resin*) pour les pièces structurelles.

Les prototypes sont dessinés par Mehdi Lagaize, responsable de la plateforme d'impression 3D, sur le logiciel Inventor (Autodesk).

## 4. Méthodes

### 4.1. Mesure d'énergie interfaciale

Les énergies interfaciales sont déterminées par la méthode de la goutte pendante initialement décrite par Tate [79]. Une goutte pendante du fluide le plus dense est générée avec un faible débit dans une cuve transparente contenant le fluide le moins dense. Ainsi, pour les mesures dans l'air, une goutte d'huile ou de solvant est directement générée dans une cuve vide. Pour les mesures entre l'huile GPL107 et un solvant (parmi ceux utilisés ici, Tableau 2), l'huile GPL107 est le fluide le plus dense et est donc utilisée pour générer les gouttes pendantes.

A l'extrémité de l'aiguille de la seringue, la goutte pendante est soumise à l'énergie interfaciale entre les deux fluides (qui retient la goutte sur l'extrémité de l'aiguille et lui donne sa forme) et aux forces gravitationnelles (qui ont tendance à faire tomber la goutte). Lors de la génération de la goutte, j'enregistre des photos à intervalles réguliers de quelques millisecondes jusqu'au détachement de la goutte. La dernière photo avant le détachement correspond ainsi à l'équilibre entre l'énergie interfaciale et l'effet gravitationnel. Cette photo est analysée par le logiciel (SCA20) afin de déterminer le contour de la goutte et différents rayons de courbure (Figure 51), qui sont liés par l'équation de Laplace-Young (9) à l'énergie interfaciale entre les deux fluides [80]. Cette équation définit la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur d'une goutte par :

$$\Delta P = (P_{int} - P_{ext}) = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (39)$$

Où :

$\gamma$  : énergie interfaciale

$R_1$  et  $R_2$  : principaux rayons de courbure de la goutte

La loi fondamentale de l'hydrostatique (équation (2)) définit la différence de pression liée à la gravité par :

$$\Delta P(z) = \Delta P_0 - \Delta \rho g z \quad (40)$$

Où :

$\Delta \rho$  : différence de densité entre les deux fluides

$\Delta P_0$  : pression au point  $z=0$

Au vertex (point le plus bas de la goutte), on a  $R_1 = R_2 = R$  (rayon de courbure au vertex). On peut donc définir un repère de référence OXZ en ce point (Figure 51).

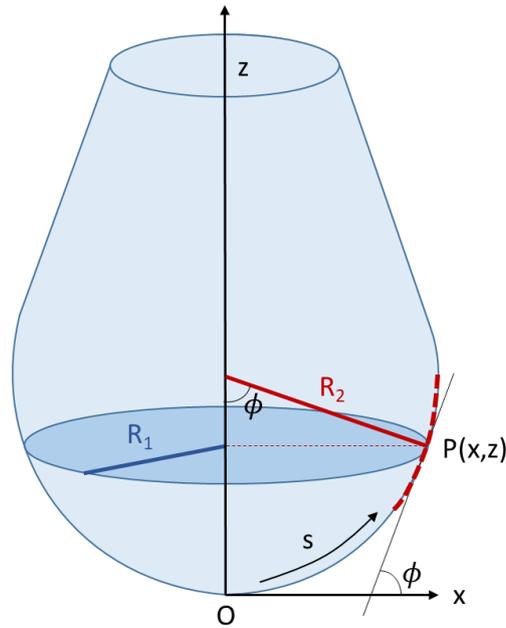


Figure 51 : Définition des paramètres géométriques pour la méthode de la goutte pendante.

Ainsi, la différence de pression en O est donnée par :

$$\Delta P(O) = \Delta P_0 = \frac{2\gamma}{R} \quad (41)$$

Ailleurs, d'après les équations (39) et (40) on a :

$$\Delta P = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \frac{2\gamma}{R} - \Delta \rho g z \quad (42)$$

Or pour tout point P(x,z), on a :

$$\sin(\Phi) = \frac{x}{R_2} \Leftrightarrow \frac{1}{R_2} = \frac{\sin(\Phi)}{x} \quad (43)$$

L'équation (42) donne ainsi :

$$\frac{1}{R_1} + \frac{\sin(\Phi)}{x} = \frac{2}{R} - \frac{\Delta \rho g z}{\gamma} \quad (44)$$

En définissant la longueur d'arc s entre le vertex et le point P considéré, et en paramétrant le système selon un repère cylindrique (z,Φ) on peut ainsi obtenir le système suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{ds}{d\Phi} = R_1 \quad (45) \\ \frac{dx}{dS} = \cos(\Phi) \quad (46) \\ \frac{dz}{dS} = \sin(\Phi) \quad (47) \\ \text{En } O : x(s=0) = z(s=0) = \Phi(s=0) = 0 \quad (48) \end{array} \right.$$

L'équation (48) correspond aux conditions limites au vertex. Dans ce nouveau repère, l'équation (44) donne :

$$\frac{d\Phi}{ds} = \frac{2}{R} - b \frac{z}{R^2} - \frac{\sin(\Phi)}{x} \text{ avec } b = \frac{\Delta\rho g R^2}{\gamma} \quad (49)$$

Le facteur de forme  $b$  correspond au nombre de Bond, et permet de relier l'énergie interfaciale  $\gamma$  et le rayon de courbure principal de la goutte au vertex  $R$ .

On cherche donc, par la méthode de la goutte pendante, à déterminer  $R$  et  $b$ , qui permettront ensuite de calculer la valeur de  $\gamma$ . Ici, le logiciel SCA20 permet de déterminer ces deux valeurs en comparant le profil réel détecté de la goutte et un profil calculé.

## 4.2. Mesures de solubilité

### 4.2.1. En microfluidique

Sur la plateforme microfluidique, les solubilités ont été mesurées par dissolution d'une poudre de la phase à analyser contenue dans une colonne, méthode développée par Peybernès et al. [6].

Tout d'abord, une solution étalon de concentration connue est préparée, puis injectée dans le circuit microfluidique pour mesurer l'intensité UV transmise à travers la solution ( $I_{\text{étalon}}$ ) à longueur d'onde donnée ou sur une gamme de longueur d'ondes (cf. Partie C – 2.2.1).

Puis pour la mesure de solubilité, un lit de poudre (50 à 100 mg), est introduit dans une colonne et bloqué par un filtre, puis placé à l'intérieur d'une boîte thermostatée. Ce lit est alors traversé par un débit  $Q_D$  de solvant à température donnée. En sortie du filtre, la solution saturée ainsi produite est diluée par un flux de solvant de débit  $Q_S$  (Figure 52).

L'intensité UV transmise  $I_{\text{mes}}$  à travers la solution diluée est enregistrée au cours du temps et comparée à l'intensité de l'étalon. L'UV étant sensible à la température, la mesure se fait à température ambiante. Une longueur suffisante de capillaire doit donc être laissée entre la sortie de la boîte thermostatée et la cellule UV pour permettre la mise à l'équilibre thermique. La dilution de la solution saturée permet de réduire le risque de nucléation du produit en sortie de la boîte.

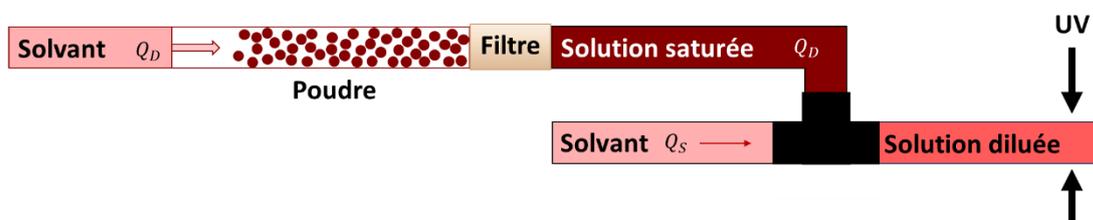


Figure 52 : Génération d'une solution saturée suivie de la dilution pour les mesures de solubilité en microfluidique.  $Q_D$  et  $Q_S$  sont respectivement les débits de la solution saturée et du solvant de dilution.

Après stabilisation du signal UV, les débits  $Q_D$  et  $Q_S$  sont ajustés, par palier, pour atteindre  $I_{mes} \approx I_{étalon}$  (Figure 53). Dans ce cas, on a donc  $C_{mes} \approx C_{étalon}$ , où  $C_{mes}$  est la concentration de la solution diluée. Or, celle-ci est liée à la concentration de la solution saturée, c'est-à-dire à la solubilité  $C_S$  par :

$$C_{mes} = C_S \times \frac{Q_D}{Q_D + Q_S} \quad (50)$$

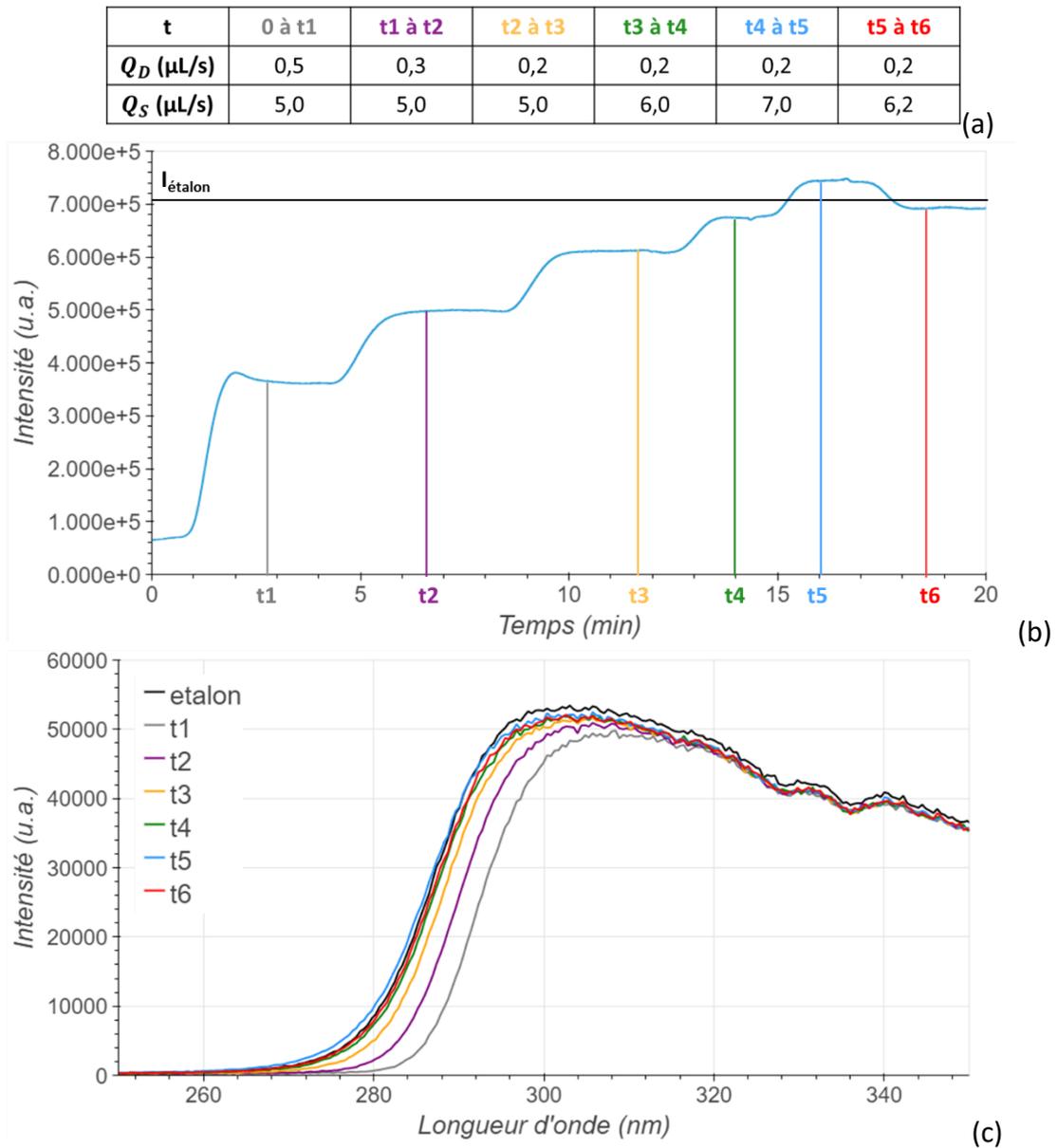


Figure 53 : Suivi d'intensité UV lors d'une mesure de solubilité du Rimonabant forme I dans l'acétonitrile à 20 °C. (a) Débits de solution saturée ( $Q_D$ ) et de solvant de dilution ( $Q_S$ ) appliqués lors de la mesure. Les temps  $t_1$  à  $t_6$  correspondent aux temps où les débits ont été changés. (b) Suivi de l'intégrale de l'intensité entre 250 et 300 nm au cours du temps. Les lignes verticales indiquent les changements de débits ( $t_1$  à  $t_6$ ). La ligne horizontale indique la valeur de l'intégrale de l'intensité pour la solution étalon de concentration 0,67 mg/mL. (c) Spectres UV en transmission de l'étalon et des solutions diluées selon différents ratios de débits. Les captures ont été prises juste avant les changements de débits aux temps  $t_1$  à  $t_6$ .

En considérant  $C_{mes}=C_{étalon}$ , on a ainsi la solubilité :

$$C_S = \frac{C_{étalon}}{\frac{Q_D}{Q_D + Q_S}} \quad (51)$$

Cette méthode est utilisée pour mesurer des solubilités de formes stables et métastables. Cependant, une attention particulière doit être portée à la mesure pour détecter une éventuelle transition de phase en partant de la forme métastable. Lorsque la poudre dans la colonne n'a pas été totalement consommée lors de la mesure, elle est analysée par DRX pour vérifier s'il y a eu une transition de phase.

Lorsque plusieurs températures sont utilisées avec la même colonne de poudre, il faut procéder à température croissante (dans le cas de solubilité directe), afin d'éviter la recristallisation du produit.

## 4.2.2. En Monopuits

Pour les mesures de solubilité en vials avec le Monopuits, une masse connue de poudre est d'abord introduite dans un vial de 1 mL. Un volume connu de solvant est ensuite ajouté de manière à ce que la poudre ne soit pas totalement dissoute. La suspension ainsi produite est ensuite progressivement chauffée par pas de 0,1 à 1 °C toutes les quelques heures. La suspension est observée au microscope optique au cours du chauffage. La température à laquelle a lieu la dissolution totale des cristaux correspond à la température d'équilibre à la concentration de départ.

## 4.3. Génération des gouttes

### 4.3.1. Description de la méthode

De la même manière que pour la mesure de solubilité, une solution saturée est générée à température donnée en faisant traverser un flux de solvant (débit  $Q_D$ ) à travers un lit de poudre (50 à 100 mg) à l'intérieur d'une boîte thermostatée. En revanche, pour la génération des gouttes, le flux de solution saturée est directement croisé avec un flux d'huile (débit  $Q_C$ ) dans une jonction T (Figure 54). Dans le cadre de cette thèse, des gouttes de solvant seul ont également été générées afin d'estimer les débits appropriés pour générer des gouttes avec la bonne fréquence (assez espacées) et quasi sphériques du diamètre du capillaire.

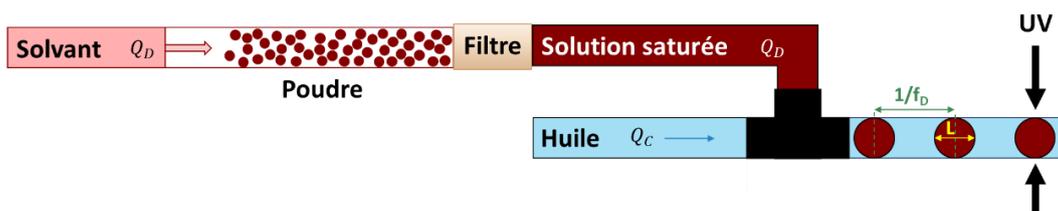


Figure 54 : Génération de gouttes saturées en microfluidique.  $Q_D$  et  $Q_C$  sont respectivement les débits du fluide dispersé (solution saturée) et du fluide continu (huile).

La taille ( $L$ ) et la fréquence ( $f_D$ ) des gouttes sont caractérisées en sortie de la boîte thermostatée par spectroscopie UV. Cependant, les gouttes étant saturées, le risque que le produit cristallise en sortie de la boîte est élevé. Comme seule la variation de l'intensité est importante pour la caractérisation des gouttes, et non sa valeur, il n'est pas nécessaire de refroidir les gouttes. Dans ce cas, la distance entre la sortie de la boîte et la mesure UV est donc réduite au maximum, et une lampe infrarouge est positionnée au-dessus du capillaire pour maintenir la température suffisamment haute pour limiter le risque de nucléation.

Comme vu précédemment (Partie A – 2.2.2.3), la taille et la fréquence des gouttes sont reliées aux débits par le nombre capillaire  $Ca$ . Pour produire des gouttes quasi-sphériques régulières en taille et en fréquence, de diamètre proche de celui du capillaire (ici 1 mm, soit environ 500 nL) afin d'éviter leur coalescence, il faut se placer dans le régime *squeezing*, défini pour  $Ca < 0,01$  (Partie A – 2.2.2.2). Dans le cadre de cette thèse, les débits qui correspondent à ce régime pour la génération de gouttes sont compris entre  $0,2\mu\text{L/s}$  et  $1,5\mu\text{L/s}$ .

### **4.3.2. Analyse de la taille et la fréquence des gouttes**

Lors du passage des gouttes, le signal UV ainsi que les débits sont enregistrés. L'absorbance UV de l'interface goutte-huile, ainsi que celle des solutions saturées, est supérieure à celle de l'huile, ce qui donne des pics d'absorbance, signatures du passage des gouttes. J'ai développé des programmes Python afin de traiter les signaux obtenus, afin de déterminer les tailles et les fréquences des gouttes. Les gouttes étant analysées en mouvement, elles sont légèrement déformées et les tailles déterminées sont donc légèrement surestimées. Cependant cette analyse permet de distinguer des gouttes quasi-sphériques de plugs. Le principe du traitement est présenté dans cette partie.

#### **4.3.2.1. Lecture des données**

Pour chaque expérience de génération des gouttes, deux fichiers sont nécessaires :

- Un fichier OceanView (.txt) contenant la date en Epoch time, l'heure en Standard Time et la valeur d'intensité UV.
- Un fichier Nemesys (.nlg) contenant le temps depuis le début de l'enregistrement (celui-ci est indiqué dans l'en-tête du fichier), et les débits de chaque seringue

Les fichiers ont été traités pour pouvoir revenir à une échelle temporelle commune (date + heure exactes de l'expérience), et le débit total a également été calculé (somme des débits).

#### **4.3.2.2. Choix de la zone à analyser**

Lors de la génération des gouttes, les premières gouttes sont la plupart du temps irrégulières en taille et en fréquence le temps que le régime d'écoulement se stabilise suite à la variation des débits. Ainsi, elles ne doivent pas être prise en compte dans l'analyse des tailles et fréquences. De plus, si plusieurs conditions sont étudiées, le programme développé ici ne permet que de les analyser une par une. La zone à analyser doit donc être définie.

La Figure 55 présente un signal UV enregistré lors de la génération de gouttes (Figure 55a) avec différents ratios de débits (Figure 55b).

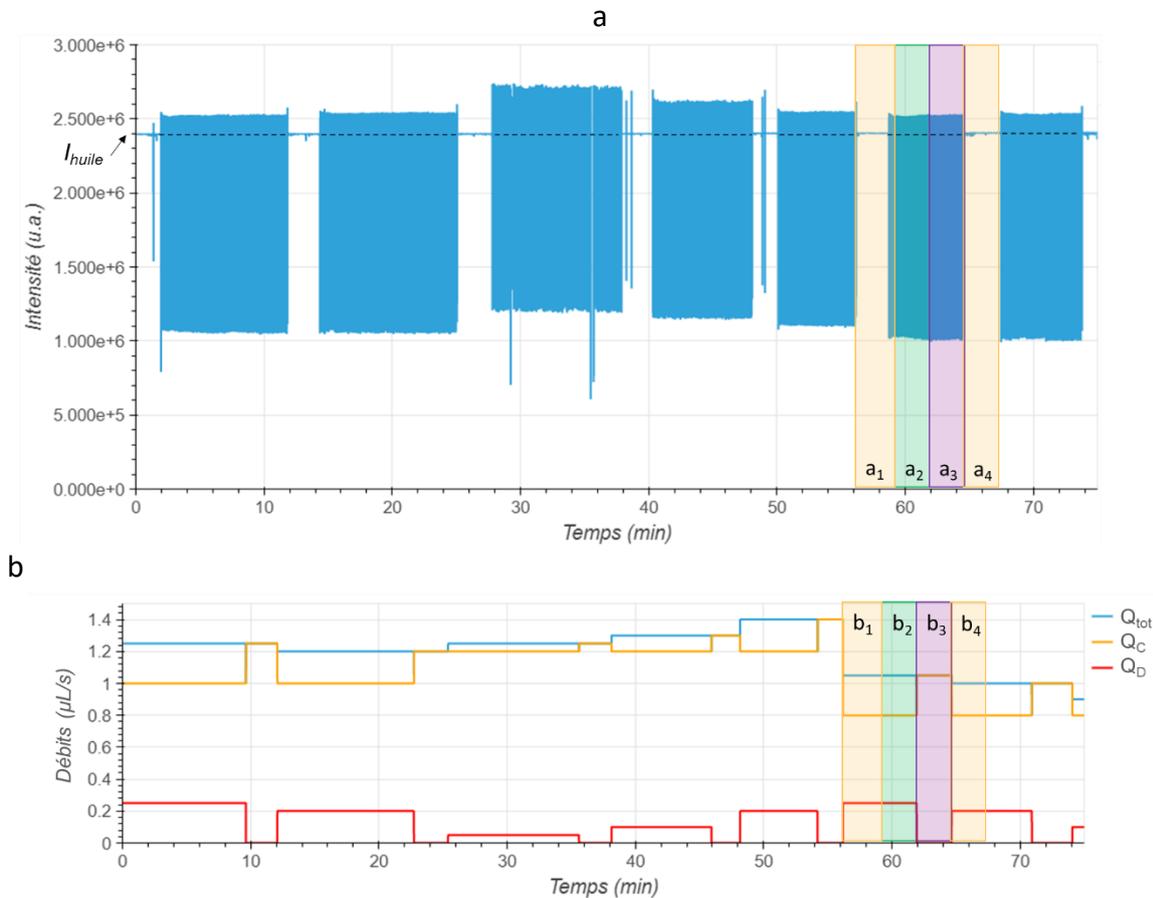


Figure 55 : (a) Suivi de l'intensité UV au cours du temps lors du passage de gouttes générées à différents débits. (b) Suivi des débits lors de la génération des gouttes. Les zones encadrées sont utilisées pour l'analyse du train de gouttes. Les zones  $a_1$  (débits  $b_1$ ) et  $a_4$  (débits  $b_4$ ) correspondent à la séparation des trains de gouttes par de l'huile.

Sur cette figure, la génération d'un train de goutte est encadrée, et séparée en quatre zones. La zone  $a_1$  en UV (débits  $b_1$ ) correspond au début de la génération du train de gouttes. On observe dans un premier temps le signal de l'huile seule, puis celui correspondant au passage des premières gouttes. Le décalage temporel entre le moment où les débits sont définis et l'observation des premières gouttes en UV correspond au temps nécessaire aux gouttes pour parcourir la distance entre la jonction T de génération et le détecteur UV. Ensuite, la zone  $a_2$  (débits  $b_2$ ) correspond au passage des gouttes en gardant les débits de la génération. A la fin de la génération des gouttes, un débit d'huile égal au débit total ( $Q_C + Q_D$ ) utilisé pour générer les gouttes est appliqué afin de séparer le train de goutte du suivant (Figure 55 $b_3$ ). Cela permet également de ne pas modifier la vitesse de passage des dernières gouttes, et ainsi d'obtenir un signal similaire à celui de la zone  $a_2$ . Ainsi, l'ensemble des gouttes des zones  $a_2$  et  $a_3$  est analysé. Dans le cas où le ratio des débits avait été changé directement, les dernières gouttes n'auraient pas pu être prises en compte dans l'analyse. Comme pour la

zone  $a_1$ , le signal UV correspondant au débit d'huile seule  $b_3$  est détecté en UV avec un décalage temporel (zone  $a_4$ ).

#### 4.3.2.3. Détection des pics

Deux types de signaux UV peuvent être observés. Le premier consiste en un pic simple, et est notamment observé dans le cas des gouttes de solutions saturées, ainsi que dans certains cas pour des gouttes de solvants seuls (Figure 56), dont l'absorbance est toujours supérieure à celle de l'huile. Le second consiste en un double pic (Figure 57), chacun correspondant à une extrémité de la goutte (interface goutte-huile). L'absorbance aux interfaces de la goutte est supérieure à celle de l'huile tandis qu'à l'intérieur de la goutte, celle du solvant seul est inférieure à celle de l'huile.

##### (a) Cas d'un pic simple

Dans le cas d'un signal avec des pics simples, chaque pic correspond à une goutte (Figure 56). La fonction *findpeaks* sur Python permet directement de déterminer la position des pics, en donnant l'information sur le sommet du pic ainsi que les positions du début et de la fin du pic, correspondant ici au début et à la fin de la goutte.

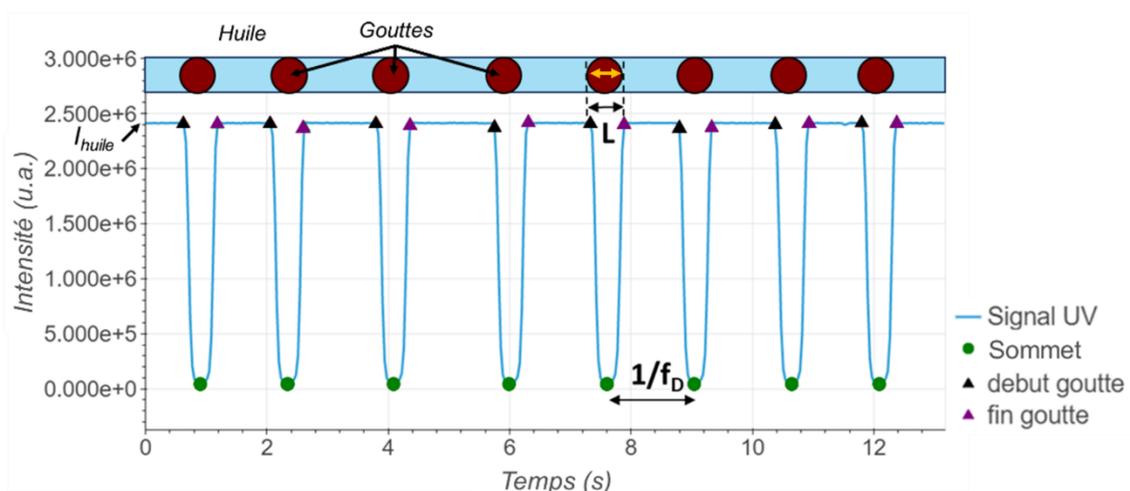


Figure 56 : Suivi de l'intensité UV transmise lors du passage de gouttes dans un cas de pics simples.  $L$  et  $f_D$  sont respectivement la longueur et la fréquence des gouttes.

##### (b) Cas d'un double pic

Dans ce cas-là, chaque goutte correspond à un signal de deux pics d'absorbance, entre lesquels on trouve un pic plus ou moins intense correspondant à un maximum local d'intensité (Figure 57).

Contrairement au cas précédent, ici, trois types de pics vont donc être détectés avec la fonction *findpeaks*, dont les paramètres doivent être adaptés manuellement au signal analysé. Ainsi, les pics de type 1 sont les pics de maximum d'intensité, représentés en vert sur la Figure 57. Les pics de type 2 (en rouge sur la Figure 57) sont les pics correspondant aux débuts des gouttes, et les pics 3 (en jaune sur la Figure 57) à la fin des gouttes.

Le début de la goutte sera donc détecté au début d'un pic de type 2 tandis que la fin de la goutte correspondra à la fin d'un pic de type 3.

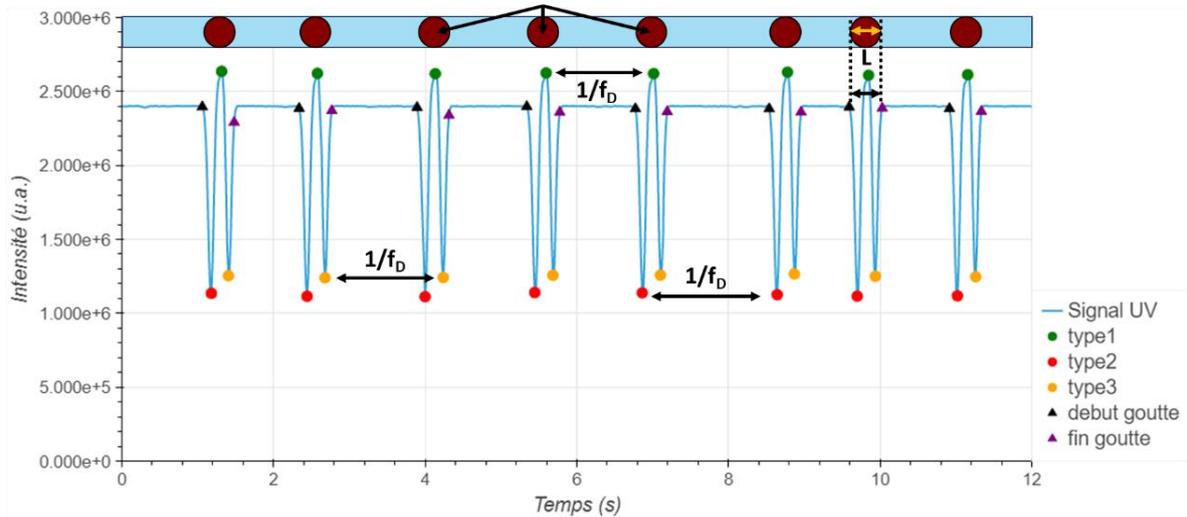


Figure 57 : Suivi de l'intensité UV transmise lors du passage de gouttes dans un cas de doubles pics.  $L$  et  $f_D$  sont respectivement la longueur et la fréquence des gouttes.

#### 4.3.2.4. Calcul de la taille et de la fréquence des gouttes

Dans les deux cas décrits précédemment, la largeur du pic  $\Delta t$  est directement reliée à la longueur  $L$  de la goutte par (cf. Partie A – 3.1) :

$$L = \frac{Q_{tot} \times \Delta t}{\pi \times \left(\frac{W}{2}\right)^2} \quad (52)$$

Où  $Q_{tot}$  est le débit total ( $Q_{tot} = Q_D + Q_D$ ),  $\Delta t$  est le temps entre la fin d'une goutte et le début de cette même goutte et  $W$  est le diamètre interne du capillaire.

La distance entre deux gouttes successives peut être calculée de la même manière en considérant le temps entre la fin d'une goutte et le début de la goutte suivante.

La fréquence entre les gouttes est donnée par :

$$f_D = \frac{1}{\Delta t_D} \quad (53)$$

Où  $\Delta t_D$  est le temps entre deux pics successifs dans le cas de pics simples ou deux pics successifs de même type dans le cas de doubles pics.

### 4.3.2.5. Traitement des données erronées

Le traitement de signal décrit précédemment est facilement utilisable dans le cas de gouttes régulières et bien séparées.

Cependant, lorsque des gouttes sont très proches mais n'ont pas coalescé, le pic de sortie de la première goutte (type 3) est confondu avec le pic d'entrée de la seconde (type 2). Une méthode d'identification de ce type d'erreur a été développée, en définissant un pic de type 4 (en violet sur la Figure 58).

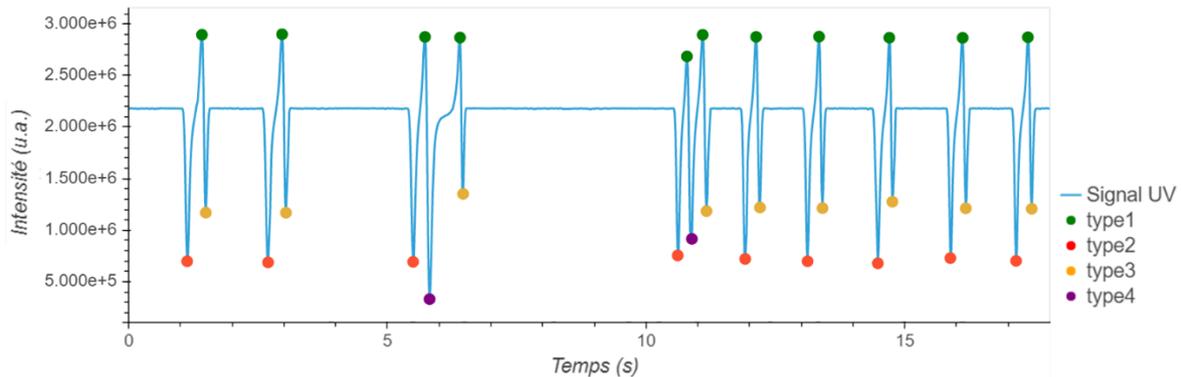


Figure 58 : Suivi de l'intensité UV transmise lors du passage de gouttes dans un cas de doubles pics avec présence de gouttes rapprochées.

Par ailleurs, il arrive que des petites gouttes se forment ( $\ll$  diamètre capillaire), notamment au début ou à la fin d'une expérience, ou lors d'un changement de débit. Bien que visibles, elles sont difficiles à détecter à l'œil nu, mais cela se traduit en UV par des pics plus ou moins intenses vers le bas (Figure 59). Cela peut également être le cas lors de la présence de microbulles. Cela empêche la bonne détection des pics et donc l'analyse des tailles et fréquences des gouttes. Cependant, dans ces cas, les gouttes ne sont pas régulières. Il a donc été choisi dans le cadre de cette thèse de ne pas approfondir le traitement de signal pour corriger ces erreurs, car elles indiquent que les conditions opératoires ne sont pas adaptées et/ou le montage nécessite une amélioration.

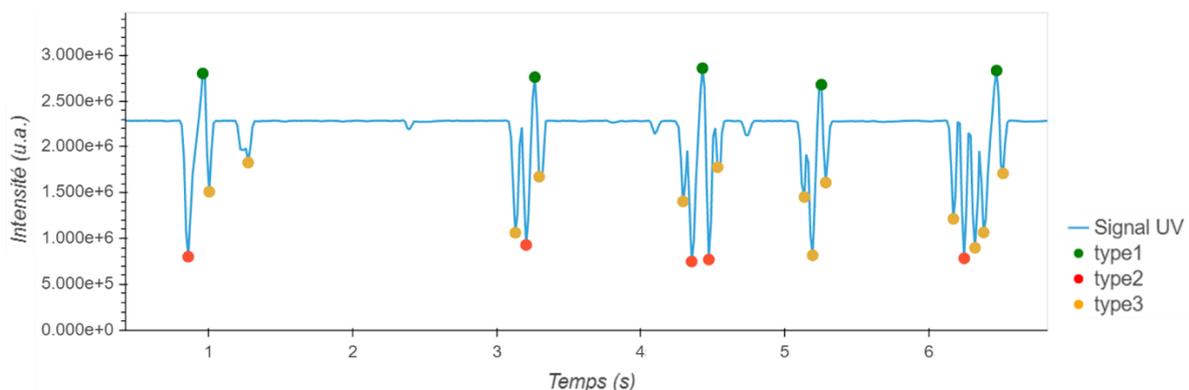


Figure 59 : Suivi de l'intensité UV transmise lors du passage de gouttes dans un cas de doubles pics avec présence de gouttes rapprochées.

## 4.4. Criblages

### 4.4.1. En vials

J'ai réalisé des criblages préliminaires en vials pour identifier des solvants de cristallisation intéressants, et identifier les polymorphes pouvant cristalliser facilement pour les différentes molécules, afin d'orienter les essais en microfluidique.

#### 4.4.1.1. En EasyMax

Les réacteurs EasyMax ont été utilisés afin de cristalliser par refroidissement du Rimonabant dans différents solvants dans le but de générer des solvates.

Une masse donnée de Rimonabant (forme I) est introduite dans un volume connu de solvant. La quantité de produit est choisie pour que la concentration totale soit inférieure à la solubilité du Rimonabant à 60 °C. Le réacteur est chauffé jusqu'à 60 °C, et maintenu au moins 1 h à cette température après dissolution totale des cristaux. Le milieu est ensuite refroidi avec une rampe de -5 °C/min jusqu'à une température entre 0 °C et -10 °C selon le solvant. Les conditions expérimentales testées (solvant et concentration) sont présentées en Annexe 2.

Les échantillons cristallisés sont ensuite filtrés sous vide léger sur filtres Millipore 0,45 µm. La phase solide est conditionnée dans des vials fermés à température ambiante. Il est important de noter que les échantillons isolés n'ont pas été séchés après filtration afin de diminuer le risque d'une transition de phase de la phase solide obtenue.

Ils ont ensuite été analysés par différentes méthodes : DRX, TGA et DSC, directement après filtration, puis après 3 semaines en vials fermés à température ambiante.

#### 4.4.1.2. Maturations

Comme précédemment, j'ai utilisé la méthode de maturation dans le cadre de l'étude des solvates du Rimonabant. Le principe de cette méthode repose sur l'évolution d'une forme cristalline en suspension dans un solvant.

Des suspensions agitables de Rimonabant (Forme I) ont été préparées par ajouts successifs de solvant, de volume total connu, sur une masse de poudre connue dans un vial de 8 mL.

Les échantillons ont ensuite été maintenus sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 jours, puis filtrés sous vide léger sur filtres Millipore 0,45 µm. La phase solide ainsi obtenue est conditionnée dans des vials fermés à température ambiante puis analysée comme précédemment (4.4.1.1) par DRX, TGA et DSC.

#### 4.4.1.1. En Monopuits

Les vials préparés pour les mesures de solubilité de l'Aripiprazole en Monopuits ont été utilisés pour faire des cristallisations par refroidissement, avec ou sans ensemencement (ajout d'un cristal ou quelques cristaux) à une température inférieure à la température de dissolution

mesurée. Les refroidissements ont été variés selon les vials et ont duré entre quelques heures et quelques mois.

#### 4.4.2. En microfluidique

Ce paragraphe présente la méthode générale de criblage en microfluidique. Certaines étapes, directement liées au développement de la plateforme, seront décrites en partie C.

Pour le criblage de polymorphes en microfluidique, des gouttes saturées en principe actif sont générées comme décrit précédemment (Partie B – 4.3.1) à haute température  $T_{\text{génération}}$ . La taille et la fréquence des gouttes ne sont pas systématiquement mesurées, mais le signal UV est toujours enregistré pour s'assurer de l'homogénéité des gouttes et détecter des éventuelles anomalies (par exemple présence de bulles).

En sortie d'UV, les gouttes sont stockées dans une cuve thermostatée (Partie C – 3.1) dont la température est réglée au-dessus de la température de génération afin de dissoudre les éventuels cristaux ayant nucléé lors du transfert entre la boîte thermostatée et la cuve. A la fin de la génération des gouttes, le capillaire est coupé et scellé en entrée et en sortie de la cuve.

Les gouttes sont ensuite refroidies, soit par une rampe de température de vitesse variable, soit par une trempe, c'est-à-dire un refroidissement brusque (<5 min), soit par des profils plus complexes tels des paliers. Pendant le refroidissement, les gouttes sont observées régulièrement afin de détecter les événements de nucléation au cours du temps (toutes les 30 min à 2 h) et en fonction de la température. Cela permet de faire des premières statistiques sur la nucléation globale (toutes phases confondues) dans les gouttes. A l'issue du refroidissement, un temps de maintien à basse température de quelques heures à plusieurs jours peut être appliqué.

Enfin, le capillaire contenant les gouttes est retiré de la cuve thermostatée et chaque goutte est analysée manuellement *in situ*, directement sur la plateforme, par spectroscopie Raman (cf. Partie C - 5) et certaines sont choisies pour être caractérisées ex-situ par DRX (Partie B – 3.5).

## Conclusion

Dans cette partie, j'ai présenté les différents produits utilisés lors de cette thèse. Le Rimonabant, l'Irbesartan, l'Aripiprazole et le Sulfathiazole sont quatre molécules pharmaceutiques modèles qui présentent du polymorphisme (desmotropie dans le cas de l'Irbesartan). Leur cristallisation dans des solvants variés a été étudiée lors de cette thèse (cf. Partie C), à la fois en microfluidique (500 nL) et dans des volumes de l'ordre du mL.

Les principaux composants microfluidiques ont été décrits, ainsi que les différents équipements et méthodes utilisés pour la mesure des énergies interfaciales, la mesure de solubilité, la cristallisation et l'analyse des poudres et des cristaux obtenus aux différentes échelles de volumes.

---

## *Partie C : Développement de la plateforme*

---

*Cette partie présente les différents modules de la plateforme microfluidique, avec les améliorations apportées pendant cette thèse, en commençant par le module de génération des solutions saturées et des gouttes, puis la caractérisation UV et le stockage et refroidissement des gouttes selon différents profils de température. Un chapitre est ensuite consacré à la caractérisation optique des gouttes afin de pouvoir suivre la nucléation des cristaux au cours du temps en fonction de la température, et ainsi faire une première étude statistique sur la nucléation globale dans les gouttes. Enfin, le choix d'un système de spectroscopie Raman à fibres optiques est décrit, ainsi que son implémentation sur la plateforme afin de pouvoir caractériser les différentes phases obtenues directement dans le capillaire (in situ).*

*Un dernier chapitre présente la fabrication d'une plateforme complète adaptable, composée des différents modules.*

# 1. Génération de solutions et de gouttes

Un des objectifs de la plateforme microfluidique est de consommer le moins de produit possible pour réaliser les expériences. Originellement, des solutions saturées étaient préparées et stockées directement dans les seringues. Cependant, la manipulation de ces solutions était compliquée et induisait un risque de nucléation dans les seringues. De ce fait, Peybernès [7], [56] a développé une méthode de génération des solutions saturées directement dans le circuit, à partir d'un lit de poudre, bloqué par un filtre, et traversé par un flux de solvant à une température ( $T^{\circ}\text{C}$ ) donnée. La régulation en température se fait au moyen d'une boîte thermostatée par circulation d'eau. La solution saturée ainsi générée peut ensuite être diluée, pour la mesure de solubilité (Partie B – 4.2) ou croisée avec un flux d'huile pour former des gouttes saturées en principe actif à la température de génération (Partie B – 4.3). Dans cette partie, je décrirai la boîte thermostatée dans laquelle ont lieu les générations des solutions saturées et des gouttes saturées, ainsi que le circuit microfluidique utilisé. Je présenterai les améliorations apportées lors de ce travail de thèse par rapport à la méthode développée par Peybernès.

## 1.1. Boîte thermostatée

Initialement, une boîte thermostatée à circulation d'eau était utilisée pour maintenir la température du lit de poudre et du solvant le traversant pour la génération de la solution saturée. Cette boîte (Figure 60) était composée d'une structure en acier (Figure 60a) et de vitres en plastique (dans le fond de la boîte ainsi que dans le couvercle) (Figure 60b). Elle était fermée par 8 vis à têtes moletées (Figure 60c) et connectée (Figure 60d) à un thermostat à circulation d'eau (Compatible control CC3, Huber). Enfin, 20 entrées et sorties microfluidiques étaient réparties sur le tour de la boîte (Figure 60e). Cependant, cette boîte présentait de nombreux inconvénients :

- L'acier est un bon conducteur thermique ce qui rendait la manipulation de la boîte difficile lors de la circulation d'eau à haute température.
- Bien qu'étant de petites dimensions (17x17x4,5 cm à l'extérieur et 12,5x12,5x2,5 à l'intérieur), la boîte était relativement lourde à manipuler à cause de sa structure en acier (1,9 kg à vide).
- La fermeture par 8 vis rendait également les manipulations compliquées et longues.
- De plus, comme les vis étaient en contact direct avec de l'eau, elles avaient tendance à s'oxyder.
- Enfin, l'accumulation des contraintes mécaniques et thermiques sur les vitres en plastique avait tendance à les déformer. Par conséquent, leur transparence et leur étanchéité en ont fortement été affectées.

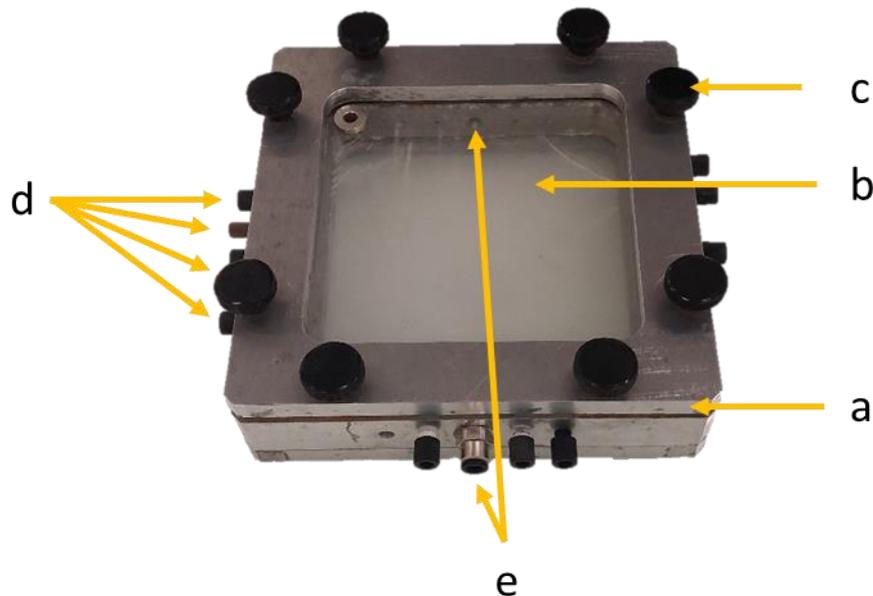


Figure 60 : Photo de l'ancienne boîte de génération, composée (a) d'une structure en acier, (b) deux vitres en plastique, (c) 8 vis de fermeture, (d) 20 entrées-sorties de microfluidique et (e) une entrée et une sortie d'eau reliées à un thermostat à circulation d'eau.

Pour pallier cela, nous avons conçu une nouvelle boîte, dessinée sur Inventor et imprimée en 3D en résine thermorésistante (Partie B – 3.7) (Figure 61). Cette boîte présente de nombreux avantages :

- La résine est isolante thermiquement et plus légère que l'acier (masse totale de la boîte de 1,2 kg à vide).
- Au niveau du couvercle, une vitre en verre est utilisée pour l'observation des gouttes (Figure 61c). Celle-ci présente l'avantage, en comparaison du plastique, de ne pas se déformer.
- Les 8 vis de fermeture ont été remplacées par 4 grenouillères (Figure 61e) plus faciles d'utilisation et rapides à manipuler. De plus, elles ne nécessitent pas de serrage excessif pour permettre la bonne étanchéité de la boîte. Cependant, un renforcement du couvercle par ajout de résine s'est avéré nécessaire afin d'éviter que celui-ci ne se casse lors de la fermeture. Enfin, n'étant pas en contact direct avec l'eau, les grenouillères sont peu soumises à l'oxydation.
- Un inconvénient de ce nouveau modèle de boîte concerne le fond en résine qui n'est pas parfaitement transparent, rendant difficile l'observation des gouttes à l'intérieur. Pour pallier cela, des miroirs sont incrustés dans le fond de la boîte (Figure 61f) au niveau des entrées et sorties des capillaires microfluidiques (Figure 61g).

Nous avons de plus rajouté des trous filetés dans le fond de la boîte afin de pouvoir fixer les composants microfluidiques si nécessaire (Figure 61h). Des supports ont également été ajoutés sur le haut de la boîte afin de pouvoir stocker une spirale contenant des gouttes (Partie C -3.1.1). Par ailleurs, la hauteur à l'intérieur de la boîte a été augmentée (3,5 cm)

afin de permettre l'utilisation de composants plus volumineux tels que les jonctions multiports (cf. Annexe 1). (ref. P-150, P-154 et P-191, Idex Health & Science)

Enfin, cette boîte, étant imprimée directement au laboratoire, elle est modulable et ouvre des possibilités d'améliorations ultérieures selon les besoins des utilisateurs.

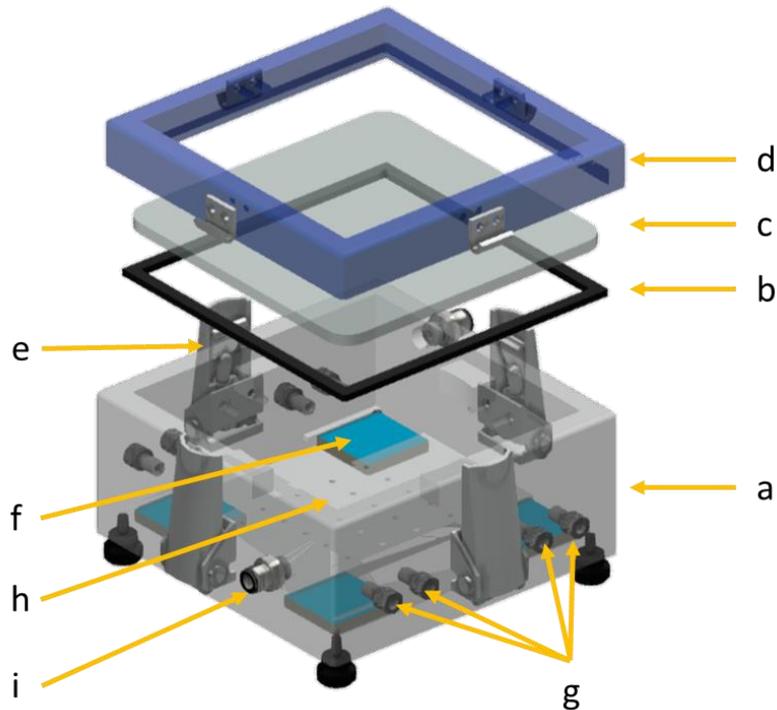


Figure 61 : Dessin 3D de la nouvelle boîte de génération composée de : (a) un fond imprimé en résine, (b) un joint plat, (c) une vitre en verre, (d) un couvercle renforcé imprimé en résine, (e) 4 grenouillères, (f) 4 miroirs incrustés dans le fond de la boîte, (g) 8 entrées-sorties des capillaires microfluidiques, (h) trous filetés dans le fond de la boîte et (i) d'entrées et sorties d'eau connectées à un thermostat à circulation d'eau.

## 1.2. Circuit microfluidique

### 1.2.1. Lit de poudre

Initialement, la poudre était introduite directement dans un capillaire en PFA de 1 mm de diamètre interne (ref. 1507L, Idex Health & Science) (Figure 62a) et de quelques cm de long, dans lequel on faisait circuler le solvant pour générer la solution saturée. Pour introduire la poudre, on s'aidait d'un capillaire en verre (capillaire utilisé en DRX de type Mark-tubes (Hilgenberg)) que l'on utilisait comme entonnoir. Cependant, pour les poudres électrostatiques, le remplissage était laborieux car la poudre avait tendance à se coller sur les parois du capillaire. Le remplissage de quelques cm de lit de poudre pouvait alors prendre plusieurs dizaines de minutes. Une alternative était de pousser la poudre mécaniquement à l'intérieur du capillaire. Cependant, cela pouvait entraîner le bouchage de celui-ci. Enfin, le capillaire était connecté à un filtre de 0,5  $\mu\text{m}$  (ref. A-356, Idex Health & Science) afin de retenir le lit de poudre.

Durant ce travail de thèse, j'ai remplacé le capillaire en PFA par une colonne UHPLC en acier inox de 2,1 mm de diamètre interne, de 7,5 cm de long et terminée par des filtres de 0,5  $\mu\text{m}$  (ref. 5030IP-04021-0075-05, Idex Health & Science) (Figure 62b). Celle-ci est facilement remplie grâce à un adaptateur (« packing adapter ») utilisé en HPLC pour le package des colonnes (ref. 3160-04-21, Idex Health & Science) (Figure 62c).



Figure 62 : (a) Photo du remplissage d'un capillaire en PFA ( $a_1$ ) par de la poudre à l'aide d'un capillaire de type Mark-tube ( $a_2$ ). (b) Colonne HPLC. (c) Adaptateur « Packing adapter ».

### 1.2.2. Régulation de la pression

Comme observé par Peybernès [56], l'augmentation de température entre le solvant contenu dans la seringue ( $T_{\text{ambiante}}$ ) et la température à l'intérieur de la boîte, ainsi que l'ajout d'un débit, peut conduire à la formation de bulles dans le circuit microfluidique (Figure 63). Cela peut s'expliquer par un changement d'état du solvant lié à une dépression locale. Ce phénomène est appelé cavitation et il doit être évité :

- Lors de la mesure de solubilité, car les bulles peuvent empêcher la bonne homogénéisation des solutions et créer des irrégularités dans le signal UV mesuré.
- Lors de la génération des gouttes, car la présence de bulles empêche la formation de gouttes régulières et le contrôle de leur taille par le débit.

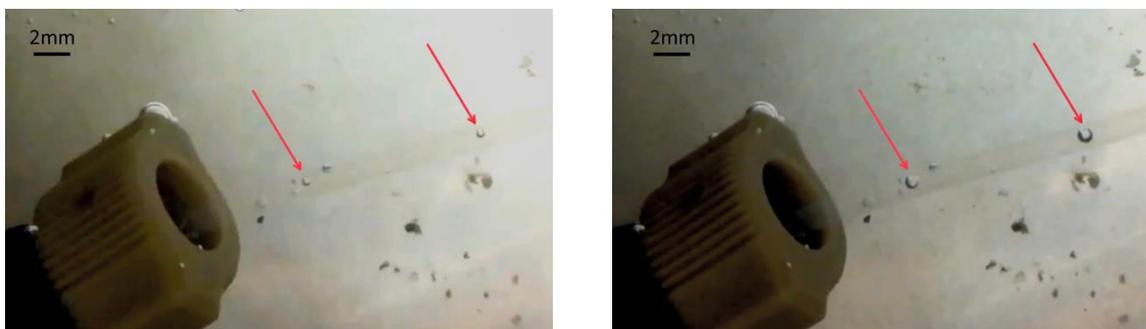


Figure 63 : Photos de bulles de cavitation (indiquées par les flèches) grossissant au cours du temps dans le circuit microfluidique. Les deux photos ont été prises à environ 1 min 30 d'écart.

Afin d'éviter la nucléation des bulles, il est possible d'augmenter la pression dans le circuit. Pour cela, la réponse proposée par Peyber্নès [56] consiste à ajouter une perte de charge en rajoutant une longueur de capillaire en fin de circuit. La valeur de la perte de charge ainsi créée va dépendre de la longueur du capillaire ajoutée, ainsi que de son diamètre. Cependant, dans certains cas, nous avons remarqué que les pertes de charge ajoutées de cette manière ne suffisent pas à éviter la cavitation.

J'ai donc proposé ici l'utilisation d'un régulateur de contre-pression (*Back Pressure Regulators* ou BPR) en fin de circuit (Figure 64). Cet élément est utilisé en HPLC pour éviter la formation de bulles dans les conduites. Son fonctionnement repose sur la compression mécanique d'un ressort par le flux entrant pour une pression supérieure à un seuil prédéfini. Ainsi, la pression en amont du BPR est au moins égale à ce seuil (5psi ou 20psi ici).

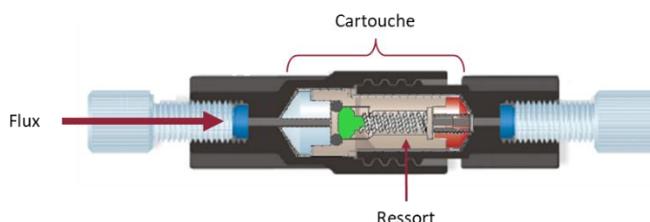


Figure 64 : Schéma d'un régulateur de contre-pression.

La Figure 65 présente un signal UV transmis entre 250 et 300 nm pour un flux d'éthanol à 60 °C. Au début de l'expérience, sans BPR, on observe le phénomène de cavitation, indiqué par les baisses d'intensité dans le signal, correspondant au passage des bulles. Après environ 15 minutes, un BPR (5psi) est ajouté en fin de circuit. On observe alors que le signal est stable, il n'y a plus de bulles de cavitation. Cette figure illustre ainsi l'efficacité de l'ajout d'un BPR sur la cavitation.

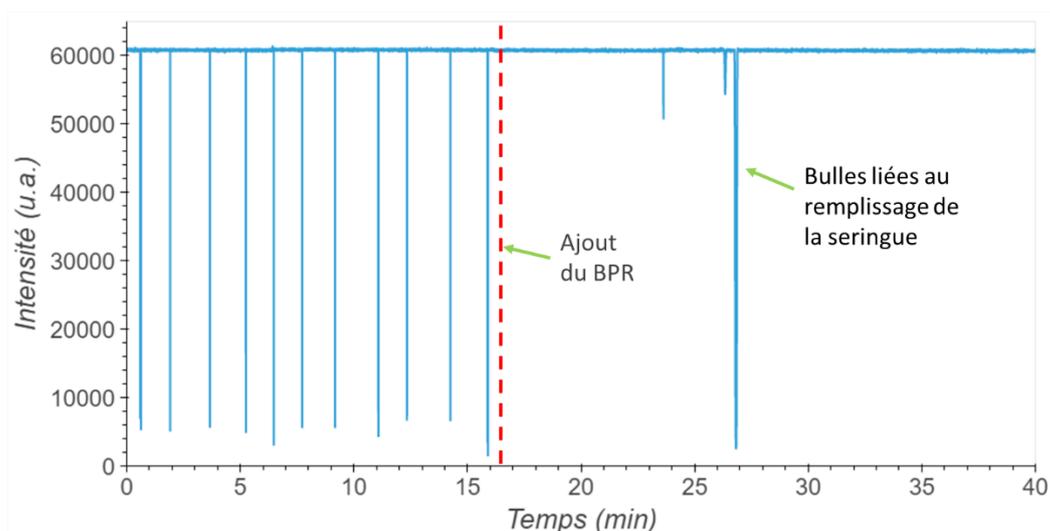


Figure 65 : Signal UV au cours du temps, avant et après ajout du BPR en fin de circuit.

## 2. Caractérisation UV des solutions et des gouttes

### 2.1. Description du module

La spectroscopie UV est utilisée ici pour mesurer des solubilités (Partie B – 4.2.1) et pour caractériser les tailles et fréquences des gouttes générées (Partie B – 4.3.2).

La solution en flux ou en gouttes est illuminée directement dans le capillaire (Figure 66a) par une source UV-Vis au deutérium (Figure 66b) (DT-mini-2-GS, OceanInsight) par l'intermédiaire d'une fibre optique solarisée pour l'UV (Figure 66c). Celle-ci est maintenue perpendiculaire au capillaire de solution grâce à un support imprimé en 3D au laboratoire (Figure 66d). Le signal traversant la solution est récupéré par une fibre optique similaire alignée avec la première fibre. Il est ensuite analysé par un spectromètre USB (Figure 66e) (USB2000+, OceanInsight), piloté par le logiciel OceanView (OceanInsight) sur lequel sont définis les paramètres d'acquisition (temps d'intégration, longueur d'onde d'intérêt pour le suivi d'un signal au cours du temps, paramètres d'enregistrement du signal, etc.)

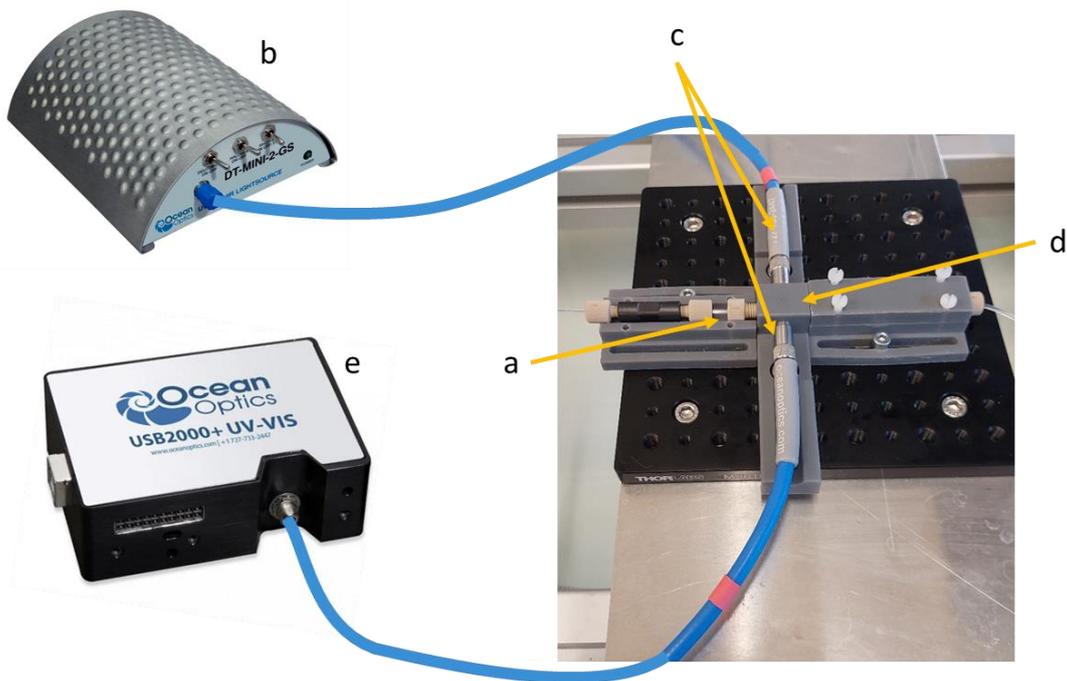


Figure 66 : Schéma du module de caractérisation UV : (a) capillaire contenant la solution ou les gouttes, (b) lampe UV-Vis au deutérium, (c) fibres optiques solarisées, (d) support 3D imprimé au CINaM, (e) spectromètre UV.

## 2.2. Optimisation du signal

Pour la caractérisation des gouttes en taille et en fréquence, la valeur absolue de l'intensité transmise n'a que peu d'importance, car l'essentiel de l'information se trouve dans la variation d'intensité. En revanche, pour la mesure de solubilité, la valeur absolue de l'intensité a une grande importance, car elle permet de distinguer deux concentrations différentes. Dans ce cas, si les conditions opératoires ne sont pas bien choisies, la mesure ne peut pas être faite avec précision, générant une erreur de mesure. Dans cette partie, nous décrivons les principaux paramètres pris en compte pour l'optimisation du signal.

### 2.2.1. Choix de la gamme spectrale

La plupart des petites molécules pharmaceutiques, dont celles utilisées dans cette thèse, absorbent les longueurs d'onde entre 200 et 300 nm.

Classiquement, pour des mesures UV, il est d'usage d'effectuer les mesures à la longueur d'onde d'absorption maximale. Cependant, celle-ci n'est pas toujours bien définie (bosse d'absorbance), ou elle peut être inférieure à la longueur d'onde minimale détectée par le spectromètre. Cet inconvénient est d'autant plus marqué dans notre cas, car l'absorbance du produit s'ajoute à celle du solvant ainsi qu'à celle du capillaire.

Sur la Figure 67 sont représentés les signaux des intensités transmises de solutions de Rimonabant dans l'éthanol à différentes concentrations, de 0,06 mg/mL à 1,13 mg/mL, ainsi que le signal transmis à travers de l'éthanol pur. Aux longueurs d'onde inférieures à 250 nm, il est difficile, voire impossible de distinguer les solutions les plus concentrées, de 0,51 mg/mL à 1,13 mg/mL. Cela est toujours le cas jusqu'à 270 nm pour les solutions de 0,70 mg/mL à 1,13 mg/mL. De même, aux longueurs d'ondes supérieures à 290 nm, les intensités transmises par les solutions les moins concentrées sont quasiment identiques et proches de celles de l'éthanol. Il pourrait alors être envisageable de choisir une longueur d'onde entre 270 et 290 nm. Cependant, afin de maximiser les variations du signal enregistré, nous préférons intégrer le signal entre deux longueurs d'onde, 250 nm et 300 nm dans le cas du Rimonabant.

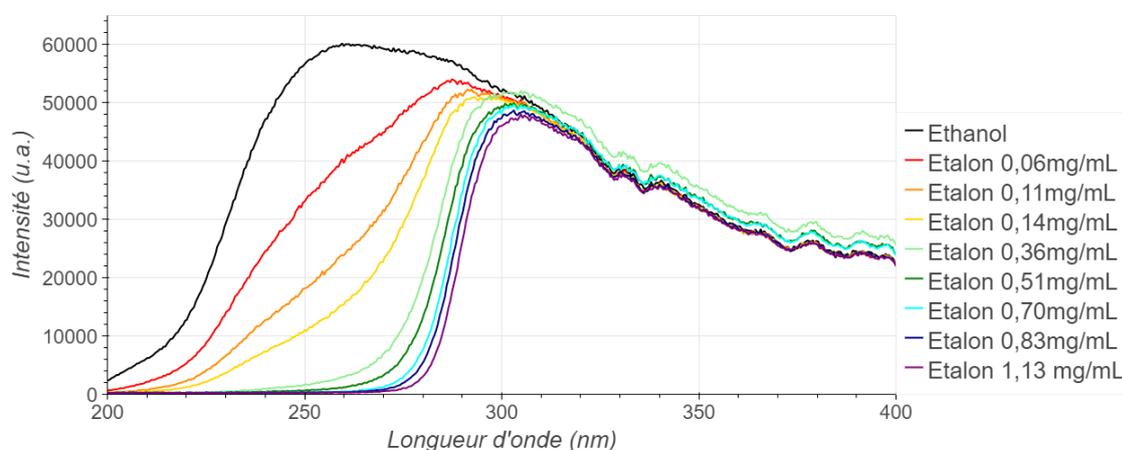


Figure 67 : Spectre UV en intensité transmise pour l'éthanol seul et pour des solutions de Rimonabant dans l'éthanol à différentes concentrations, entre 200 et 400 nm.

## 2.2.2. Choix de la concentration

Pour la méthode de mesure de solubilité en microfluidique décrite précédemment (Partie B – 4.2.1) la solution saturée générée est diluée progressivement jusqu'à ce que le signal transmis corresponde à celui d'un étalon de concentration connue. De ce fait, la concentration de l'étalon doit être bien choisie afin que les variations du signal autour de cette concentration soient les plus grands possibles. C'est le cas des solutions les plus diluées, comme on peut le voir sur la Figure 67 (concentrations jusqu'à 0,14 mg/mL). Pour les concentrations plus élevées, les variations de signal sont moins importantes et conduiraient à une mesure moins précise. De plus, l'avantage de préparer un étalon peu concentré est que l'on peut utiliser moins de produit lors de sa préparation. Cependant, si la solution étalon est trop peu concentrée, les volumes de dilution de la solution saturée nécessaires pour la mesure seraient trop importants et nécessiteraient des remplissages fréquents de la seringue de solvant. De plus, l'intensité transmise est sensible au débit, donc l'utilisation de débits trop élevés entraîne une erreur de mesure. Dans le cas du Rimobant, un bon compromis pour la solution étalon correspond à une concentration entre 0,1 et 0,15 mg/mL.

## 2.2.3. Choix du capillaire

Les mesures d'intensité transmise en UV dépendent de la concentration, mais également du matériau utilisé pour le capillaire contenant la solution à analyser.

Comme illustré sur la Figure 68, le PFA (diamètre interne 1 mm et diamètre externe 1,6 mm) absorbe fortement les longueurs d'onde entre 200 et 400 nm. Pour une mesure de solubilité, on préférera alors choisir un matériau moins absorbant pour obtenir plus de précision sur la mesure de l'intensité transmise. De ce fait, plusieurs types de verre ont été comparés, avec des capillaires de dimensions équivalentes (diamètre interne 1,0 mm et diamètre externe 1,2 mm pour le borosilicate et 1,5 mm pour les autres). Les signaux correspondants sont également représentés sur la Figure 68. Le verre « classique » absorbe entre 200 et 300 nm. Néanmoins, cette absorbance est moindre en comparaison au PFA, ce qui rend ce type de verre tout à fait compatible pour une mesure. Le verre borosilicate et surtout le quartz sont encore moins absorbants, notamment dans les plus faibles longueurs d'onde. Nous avons alors choisi le quartz dans le cadre de cette thèse, pour les mesures de solubilité.

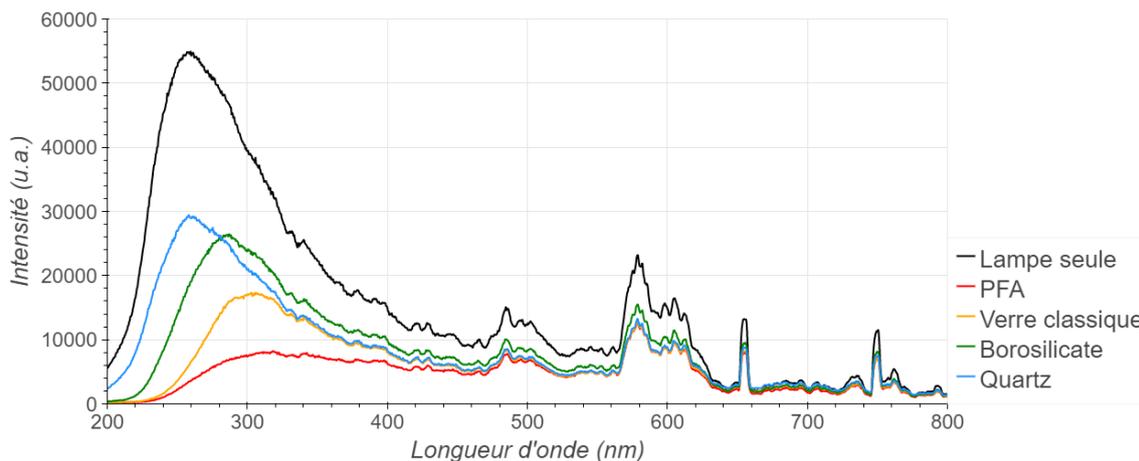


Figure 68 : Intensité transmise de la lampe UV seule et à travers différents capillaires vides.

Pour les mesures de tailles et fréquences des gouttes, seule la variation d'intensité liée au passage des gouttes est nécessaire. Les mesures dans le capillaire en PFA sont donc suffisantes. De plus, la mesure est plus directe et permet de réduire le nombre de jonctions traversées par les gouttes, et donc le risque de coalescence et/ou de nucléation.

## 2.2.4. Comparaison des spectromètres

Un dernier moyen d'améliorer la mesure est de choisir un spectromètre plus sensible. J'ai comparé le spectromètre USB2000+ (dont nous disposons) avec un spectromètre HDX (OceanInsight), plus sensible aux faibles longueurs d'ondes. On note cette sensibilité sur la Figure 69 qui compare les spectres en intensité transmise (Figure 69a) et en absorbance (Figure 69b) d'une solution concentrée d'Irbesartan dans l'éthanol (1 mg/mL) à travers un capillaire en quartz. Les temps d'intégration ont été choisis pour que le signal en intensité (Figure 69a) à 750 nm (en dehors de la zone d'absorption) soit le même pour les deux spectromètres. On constate que le spectromètre HDX nécessite un temps d'intégration plus faible, ce qui illustre sa meilleure sensibilité. On observe cependant qu'entre 450 et 650 nm, le spectromètre HDX semble moins sensible que le spectromètre USB2000+.

Sur la Figure 69b, les absorbances correspondantes (rapport du signal transmis par la solution sur signal de la lampe seule) sont représentées. Cette figure illustre bien le fait que le bruit est largement supérieur avec le spectromètre USB2000+ qu'avec le spectromètre HDX. Ce dernier permet de mesurer plus précisément des concentrations plus élevées, en utilisant un temps d'intégration inférieur.

Cependant, dans le cadre de cette thèse, ce niveau de précision pour les plus faibles longueurs d'onde n'est pas indispensable, et le temps d'intégration n'est pas un facteur limitant pour les mesures effectuées. Ainsi, nous continuerons donc de travailler avec le spectromètre USB2000+.

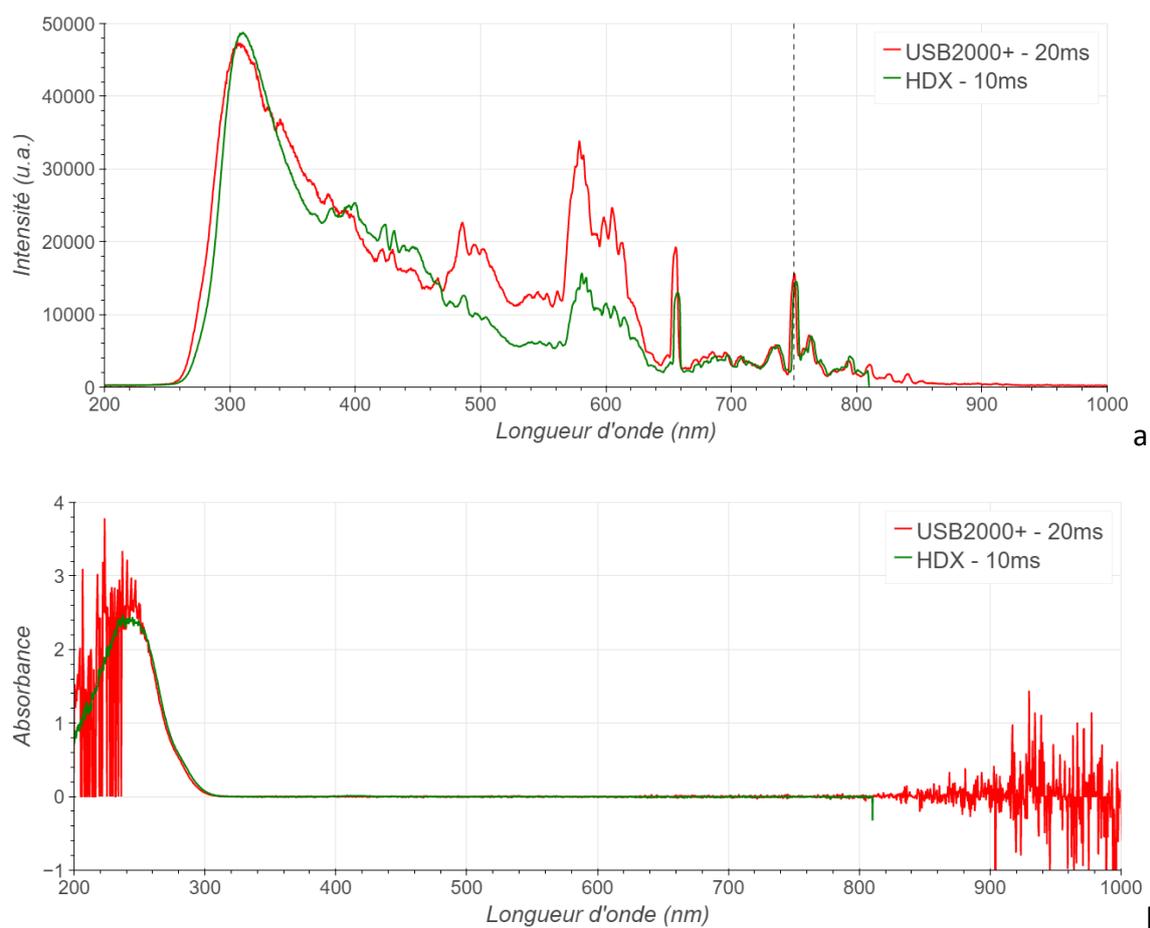


Figure 69 : Intensité transmise (a) et absorbance (b) d'une solution d'Irbesartan dans l'éthanol (1 mg/mL), mesurées avec les spectromètres USB2000+ et HDX à travers un capillaire en quartz, avec un temps d'intégration de 20 ms pour l'USB2000+ et 10 ms pour l'HDX.

## 2.3. Amélioration du support

Au début de la thèse, une pièce imprimée en 3D au laboratoire (Figure 70a) est utilisée pour maintenir les fibres optiques alignées entre elles, de part et d'autre du capillaire contenant les solutions ou les gouttes. Initialement imprimée en filament de PLA, cette pièce était composée d'un cube central traversé par le capillaire (Figure 70a<sub>1</sub>), lui-même fixé par une jonction de type XP-235 (IDEX Health & Science). Deux bras perpendiculaires au capillaire servaient de support pour les fibres (Figure 70a<sub>2</sub>). Celles-ci étaient fixées au bloc central par des jonctions SMA (ref. HASMA, Thorlabs).

Au cours de cette thèse, la pièce existante n'a pas été modifiée, mais deux bras amovibles (Figure 70b) munis de couvercles (Figure 70c) ont été ajoutés autour du capillaire en quartz afin de le protéger d'éventuels mouvements et ainsi d'éviter qu'il ne se casse. La nouvelle pièce ainsi formée est imprimée en résine grise, plus précise et plus résistante que le PLA. Pour la génération des gouttes, le capillaire utilisé étant en PFA, les bras amovibles (Figure 70b-c) ne sont pas utiles.

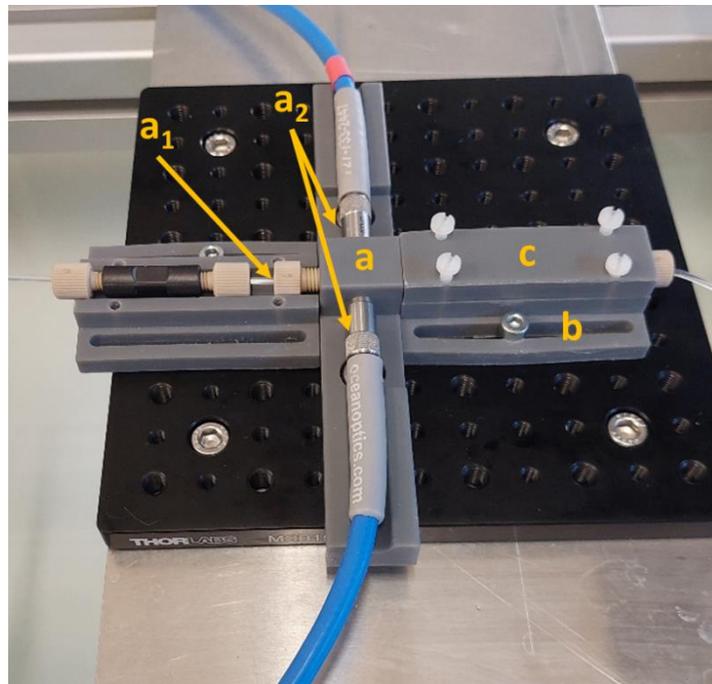
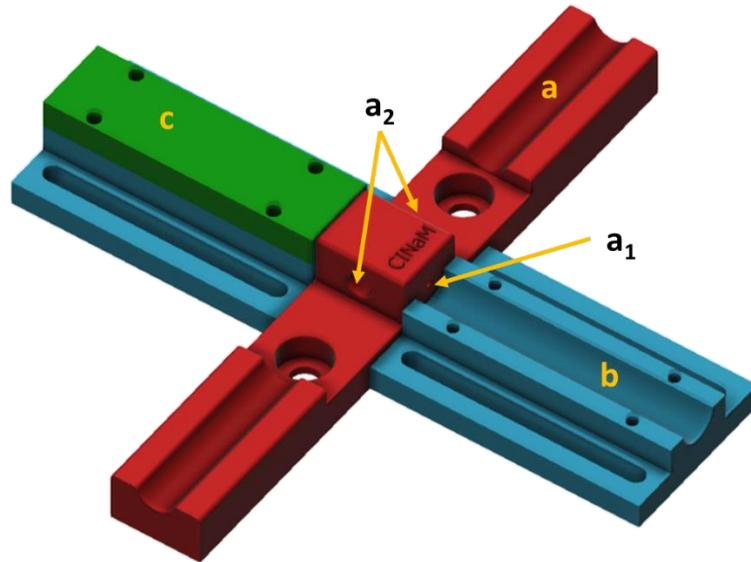


Figure 70 : Support UV imprimé au CINAM. (a) Pièce centrale permettant de fixer le capillaire ( $a_1$ ) et les fibres optiques ( $a_2$ ). (b) Bras amovibles permettant de maintenir le capillaire en quartz en place. (c) Couvercle des bras amovibles.

## 3. Stockage et refroidissement des gouttes

Une fois générées et analysées en UV, les gouttes saturées en principe actif sont transférées dans une cuve thermostatée où se produira la nucléation des cristaux. Dans le cadre de cette thèse, la sursaturation est générée par refroidissement des gouttes en faisant varier la température dans la cuve. Le module de stockage et de refroidissement des gouttes a donc été conçu avec l'objectif d'appliquer différents profils de température, plus ou moins rapides, à l'intérieur de la cuve.

### 3.1. Description du module

#### 3.1.1. Spirale de stockage

Afin de réduire la zone d'observation tout en augmentant le nombre de gouttes observées, celles-ci sont stockées dans un capillaire enroulé en spirale. Pour cela, j'ai conçu un support imprimé en résine thermorésistante (Figure 71).

Celui-ci est composé de trois pièces :

- La pièce supérieure (Figure 71a) possède 4 bras avec des encoches (Figure 71a<sub>1</sub>), permettant de maintenir le capillaire. Un compromis doit être fait sur l'épaisseur de ces bras afin d'augmenter leur transparence, en réduisant l'épaisseur, tout en assurant la solidité de la pièce. Les bras sont reliés entre eux par un anneau central (Figure 71a<sub>2</sub>) et un anneau extérieur (Figure 71a<sub>3</sub>). Sur chacun d'eux, des cales (Figure 71a<sub>4</sub>), possédant des petites extrusions bombées, ont été ajoutées pour maintenir les deux autres pièces décrites ci-après.
- La pièce du milieu est un plateau de disque dur (Figure 71b), agissant comme miroir, afin de faciliter l'observation par réflexion des gouttes lors du stockage et/ou de l'expérience. Initialement, un CD était utilisé, mais sa surface était moins réfléchissante et moins résistante à l'eau, notamment à haute température.
- La pièce inférieure est un disque imprimé en 3D en résine (Figure 71c), permettant de maintenir le plateau bien à plat contre la pièce supérieure. En effet, cela permet d'améliorer la réflexion de la lumière et donc la qualité des photos. Ce disque possède des encoches permettant de le positionner puis de le bloquer par une rotation de quelques degrés par rapport aux cales de la pièce supérieure. Deux trous ont été faits pour faciliter sa manipulation.

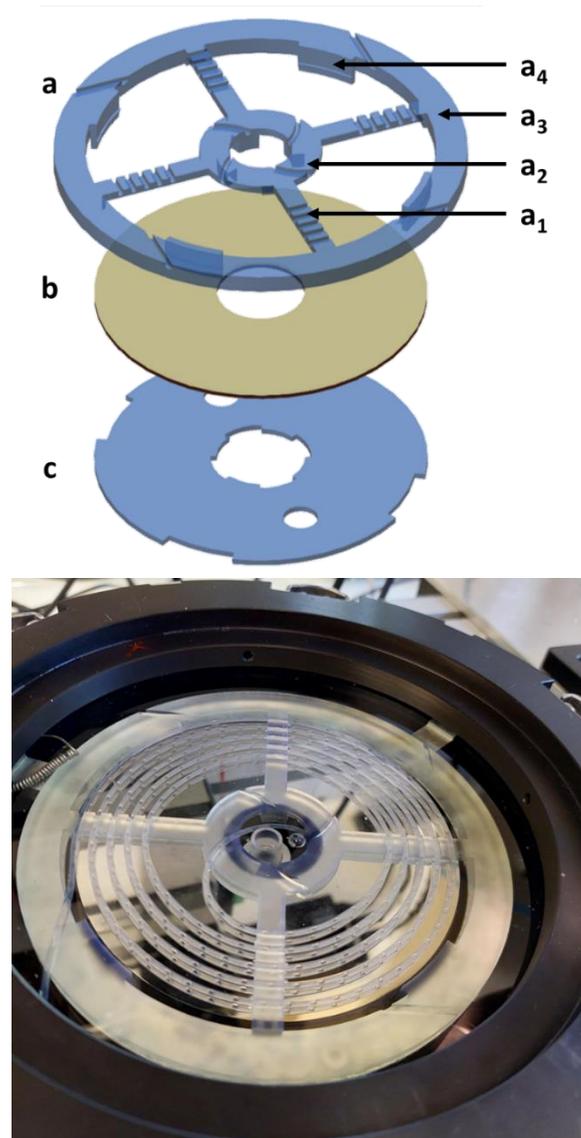


Figure 71 : Haut : Support de spirale fabriqué au CINaM par impression 3D en résine thermorésistante (a) Pièce supérieure composée de 4 bras avec encoches pour maintenir le capillaire ( $a_1$ ), reliés entre eux par des anneaux intérieur ( $a_2$ ) et extérieur ( $a_3$ ) et maintenant les pièces inférieures à l'aide de cales ( $a_4$ ). (b) Plateau de disque dur. (c) Disque imprimé en 3D pour maintenir (b). Bas : Photo d'une spirale contenant des gouttes dans la cuve thermostatée.

### 3.1.2. Régulation de température

Le support de spirale décrit précédemment, supportant le capillaire contenant les gouttes, est maintenu dans une cuve thermostatée (R1D2, Figure 72a<sub>1</sub>) fabriquée sur mesure en polyoxyméthylène (POM) et en acier inoxydable par la société ANACRISMAT. La cuve est composée de deux circuits d'eau indépendants :

- Le premier circuit passe à l'intérieur d'un échangeur thermique, et permet la régulation de la température de la cuve grâce à un bain thermostaté commercial (Dyneo DD 600F, Julabo, Figure 72a<sub>2</sub>).

- Le second circuit, visible, circule directement dans la cuve grâce à une pompe, qui permet d'homogénéiser la température dans tout le volume d'eau.

## Partie C : Développement de la plateforme

Ainsi la spirale, sur laquelle est fixé le capillaire contenant les gouttes, baigne directement dans cette eau, ce qui permet d'assurer une bonne régulation de la température à l'intérieur du capillaire. Un autre intérêt de maintenir la spirale dans de l'eau est que l'indice optique du PFA (1,35) est proche de celui de l'eau (1,33). De ce fait, le capillaire est presque entièrement transparent dans l'eau, ce qui facilite l'observation des gouttes. Ce circuit d'eau est relié à un bain thermostaté par effet Peltier (PIONEER Figure 72a<sub>3</sub>) fabriqué sur mesure par la société ANACRISMAT, qui permet de remplacer rapidement (<1 min) l'eau de ce second circuit. Cette fonction est uniquement utilisée pour les trempes (Partie C – 3.2.3), car dans le cas de rampes de températures, le circuit reste fermé (Partie C – 3.2.2).

Une interface développée au CINaM sur LabVIEW permet de suivre la température de la cuve (Figure 72b<sub>1</sub>), contrôler la température des bains Julabo et PIONEER (Figure 72b<sub>2</sub> et b<sub>3</sub>), d'enregistrer ces températures, et de programmer des profils de température (Figure 72b<sub>4</sub>).

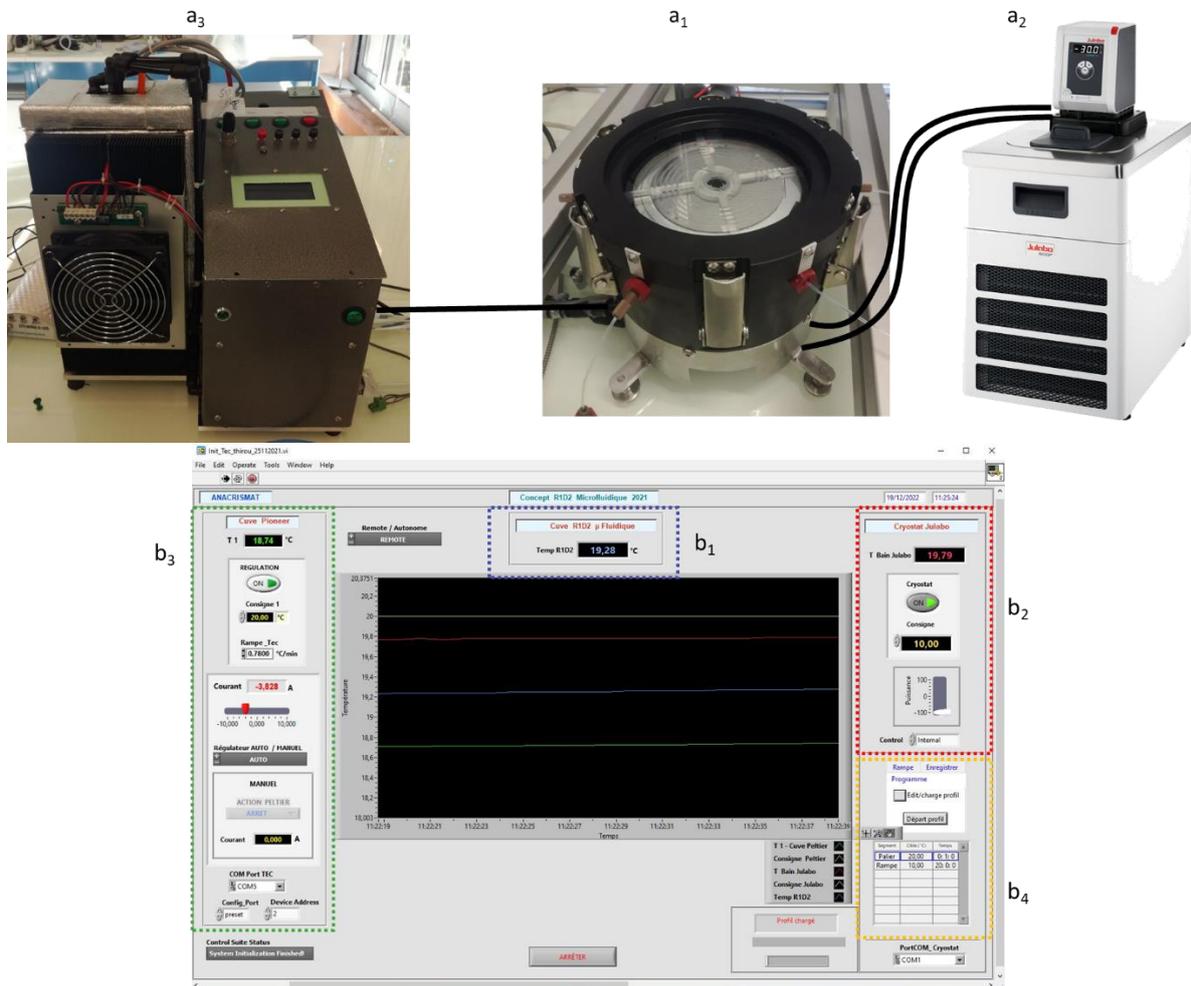


Figure 72 : Module de stockage et refroidissement : (a<sub>1</sub>) Cuve thermostatée contenant les capillaires de gouttes en spirale sur le support imprimé, régulée en température par le bain thermostaté Julabo (Dyneo-DD 600F) (a<sub>2</sub>) et reliée au bain thermostaté PIONEER (a<sub>3</sub>) pour les changements rapides de température. (b) Logiciel de contrôle du module : (b<sub>1</sub>) affichage de la température de la cuve ; (b<sub>2</sub> et b<sub>3</sub>) affichage et contrôle des températures des bains thermostatés Julabo et Pioneer respectivement ; (b<sub>4</sub>) programmation de profils de température.

## 3.2. Considérations thermiques

La principale contrainte pour la cristallisation est de ne pas dépasser la température de consigne choisie à partir d'un diagramme de solubilité. En effet, si les gouttes sont refroidies au-dessous de la température de consigne, la sursaturation créée est supérieure à celle souhaitée ce qui fausse le résultat de cristallisation. A l'inverse, si la température des gouttes remonte au-dessus de la température de consigne après la cristallisation, il y a un risque de dissolution des cristaux formés. On comprend donc que la température de la cuve doit être parfaitement contrôlée lors des étapes de refroidissements, qu'ils soient lents ou rapides, afin de ne pas fausser les interprétations.

### 3.2.1. Calibration de la température dans la cuve

Un écart entre la température du Julabo (et donc la température de consigne), et la température de la cuve a été observé. Cela s'explique par la faible isolation thermique des tuyaux entre les deux composants, induisant un échange avec l'extérieur. De ce fait, une calibration a été effectuée afin de relier la température du Julabo à la température réelle de la cuve. La droite correspondante est tracée en Figure 73. Pour les températures les plus basses, la température de la cuve est supérieure à la température de consigne du Julabo. En revanche, pour les températures les plus élevées, la cuve présente une température plus faible que celle du Julabo. La température de croisement, pour laquelle la température de la cuve correspond bien à la température de consigne est d'environ 43 °C pour ce système. Une telle calibration devra être faite lors de l'utilisation en routine de ce module, afin d'adapter les températures de consignes aux besoins réels. En effet, la variation dépend de l'environnement. Si la température de la pièce est stable (pièce climatisée par exemple), la calibration devra uniquement se faire lors de l'installation du module, ou en cas de modification majeure (changement des tuyaux par exemple).

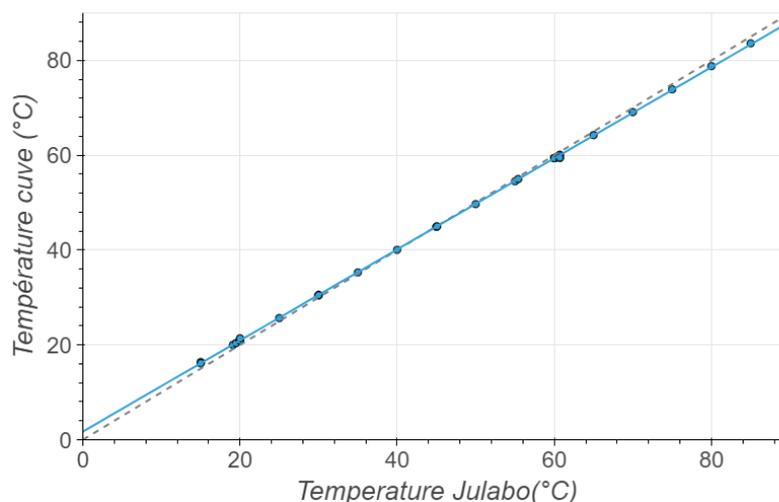


Figure 73 : Droite de calibration (en bleu) de l'écart de température entre la cuve et le Julabo, d'équation  $T_{cuve} = 0,96 \times T_{julabo} + 1,7$ , comparée à la droite théorique  $T_{cuve} = T_{julabo}$  (en pointillés gris).

Dans cette thèse, les écarts entre la consigne et la température de la cuve n'étant pas très élevés, cet écart sera négligé et les températures seront directement définies par la consigne du Julabo.

### 3.2.2. Refroidissements lents

Le type de refroidissement le plus facile à mettre en place consiste en une rampe de température de pente constante. Des refroidissements lents à profil contrôlé (par exemple des paliers de températures) peuvent également être utilisés. Pour ces deux types de refroidissement, un profil de température est programmé directement sur le logiciel de contrôle du module, comme illustré pour un refroidissement par paliers sur la Figure 74, afin de définir la température de consigne suivie par le Julabo. Dans ce cas, il a été remarqué que la température de la cuve ne dépasse pas la température de consigne.

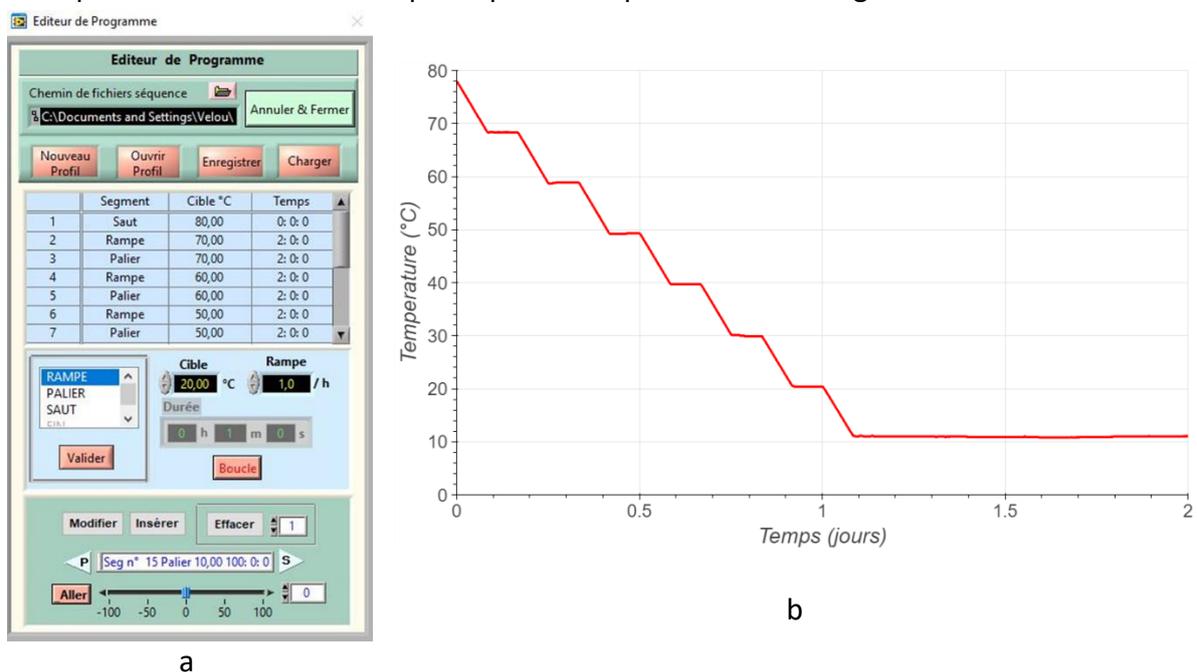


Figure 74 : (a) Programmation d'un profil de température par paliers de 2 h tous les 10 °C, séparées par des rampes de -5 °C/h, de 80 à 10 °C. (b) Profil de température dans la cuve correspondant au programme (a).

La vitesse maximale de refroidissement atteignable avec ce système est actuellement d'environ 1 °C/min, soit 60 °C/h. Pour des vitesses de refroidissement aussi rapides cependant, un décalage temporel de quelques minutes entre la température de consigne et la température réelle de la cuve est observé. Cela est lié au temps nécessaire au refroidissement et à l'homogénéisation de l'eau de la cuve. La Figure 75 illustre un tel refroidissement. Dans ce cas, la température de consigne est passée directement de 60 °C à 30 °C. Ainsi, le Julabo refroidit aussi vite qu'il le peut, soit en 30 minutes environ. Il faut noter que même dans ce cas extrême, la température de la cuve ne dépasse pas la température de consigne lors du refroidissement.

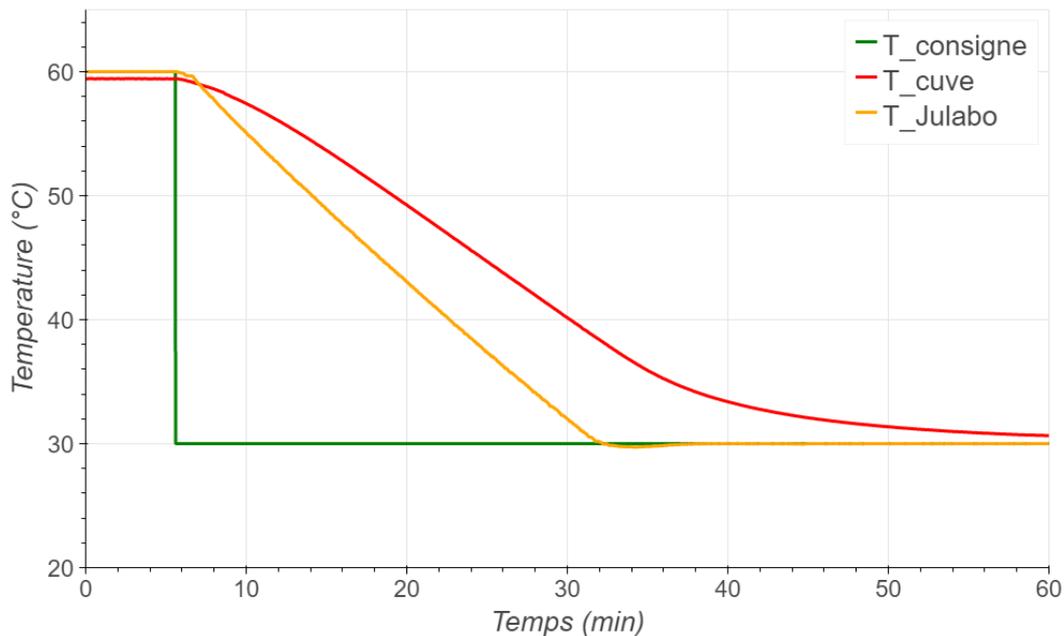


Figure 75 : Profil de température lors d'un refroidissement à la vitesse maximale de refroidissement du bain Julabo : la température de consigne pour le Julabo  $T_{consigne}$  (vert) est réglée de 60 à 30 °C.  $T_{cuve}$  (rouge) et  $T_{Julabo}$  (jaune) sont les températures respectives de la cuve contenant la spirale de gouttes et le bain Julabo.

Dans cette thèse, les rampes appliquées sont nettement plus lentes que la limite mentionnée ci-dessus (de 0,5 °C/h à 5 °C/h). Pour les refroidissements plus rapides, des trempes ont été effectuées en utilisant le module PIONEER (Figure 72a<sub>3</sub>)

### 3.2.3. Trempes

Le principe de la trempe est de refroidir la cuve le plus rapidement possible, en quelques minutes seulement. Pour cela, toute l'eau de la cuve est remplacée par de l'eau préalablement refroidie dans le bain PIONEER.

Le premier problème soulevé par ce refroidissement est que bien que l'eau de la cuve ait été refroidie rapidement, ce n'est pas le cas de l'eau de régulation du bain Julabo passant dans l'échangeur thermique. En effet, son refroidissement est limité par la vitesse maximale de refroidissement du bain Julabo, de -1 °C/min. De ce fait, une fois l'eau de la cuve refroidie par le transfert d'eau avec le bain PIONEER, sa température augmente de nouveau à cause de la régulation par le Julabo (Figure 76).

## Partie C : Développement de la plateforme

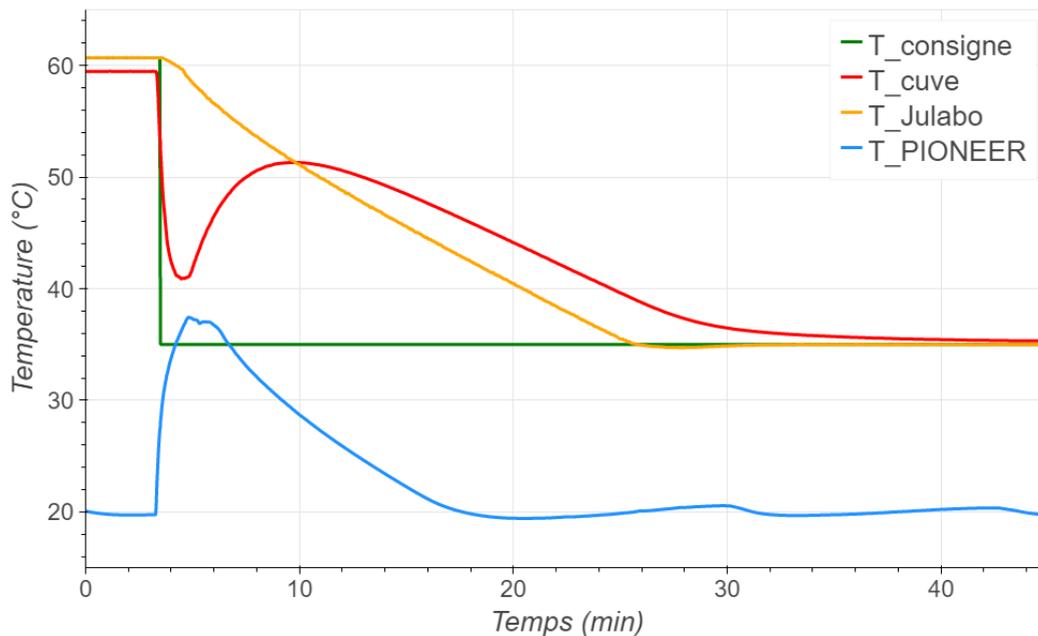


Figure 76 : Profil de température lors d'une trempe (sans bypass) : la température de consigne pour le bain Julabo  $T_{consigne}$  (vert) est réglée de 60 à 35 °C. La température du bain PIONEER (bleu) est réglée à 20 °C par effet Peltier.  $T_{cuve}$  (rouge) et  $T_{Julabo}$  (jaune) sont les températures respectives de la cuve contenant la spirale de gouttes et le bain Julabo.

De ce fait, un bypass a été ajouté en sortie du bain Julabo (Figure 77) afin de l'isoler et de permettre son pré-refroidissement sans affecter la température de la cuve.

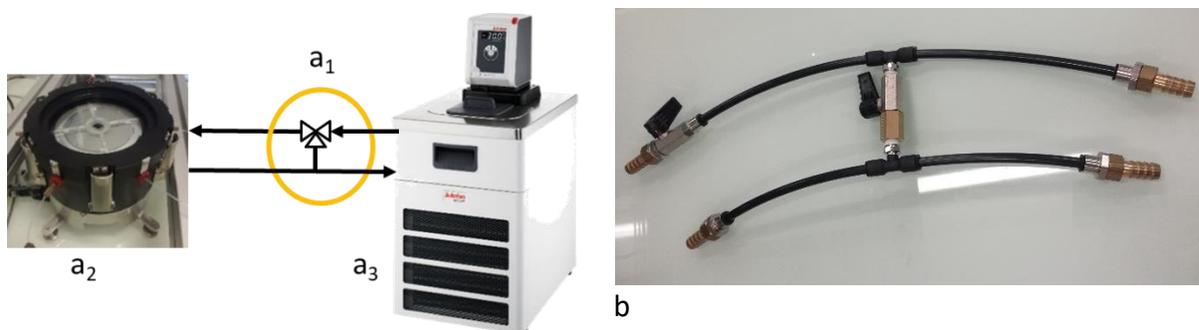


Figure 77 : (a) Schéma du circuit avec bypass ( $a_1$ ) entre la cuve ( $a_2$ ) et le bain Julabo ( $a_3$ ). (b) Photo du bypass rajouté sur le circuit.

La Figure 78, représente le profil de température dans la cuve (en rouge) obtenu lors d'une trempe avec l'utilisation d'un bypass. La température initiale du Julabo est fixée à 40 °C, et le bain PIONEER est pré-refroidi à 20 °C. A  $t_1$ , le bypass est ouvert afin que l'eau du Julabo reste en boucle fermée dans ce bain et ne circule plus dans la cuve. La température de consigne du Julabo est alors fixée à la température finale souhaitée, ici 25 °C. A  $t_2$ , le Julabo a atteint la température de consigne. La température de la cuve est quant à elle descendue à 38 °C. Le bypass est alors fermé, de sorte que l'eau du Julabo retourne dans la cuve pour sa régulation. En parallèle, l'échange entre la cuve et le bain PIONEER est mis en marche, jusqu'à  $t_3$ . Une fois la température souhaitée atteinte (à  $t_3$ ), le transfert d'eau entre PIONEER et la cuve est arrêté,

et seule la régulation par le Julabo permet de maintenir la température de la cuve à la température souhaitée.

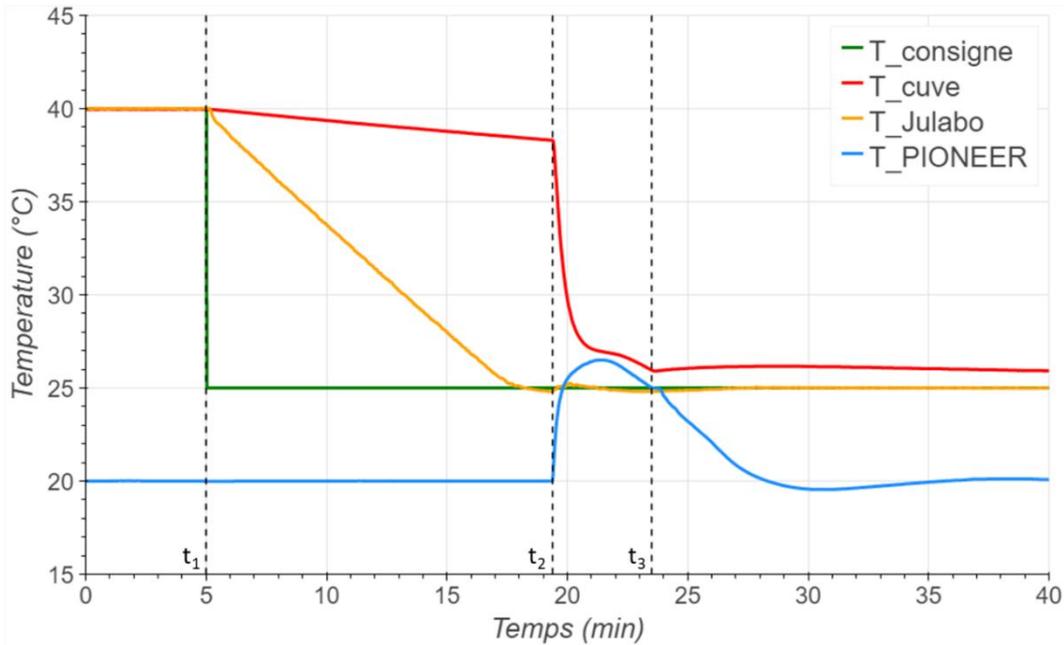


Figure 78 : Profil de température lors d'une trempe avec bypass : la température de consigne pour le Julabo  $T_{consigne}$  (vert) est réglée de 40 à 25 °C. La température du bain PIONEER (bleu) est réglée à 20 °C par effet Peltier.  $T_{cuve}$  (rouge) et  $T_{Julabo}$  (jaune) sont les températures respectives de la cuve contenant la spirale de gouttes et le bain Julabo. A  $t_1$ , le bypass est ouvert pour le pré-refroidissement du Julabo. A  $t_2$  le bypass est ouvert et le transfert d'eau entre PIONEER et la cuve est mis en marche. A  $t_3$ , le transfert est arrêté et la régulation se fait uniquement par le bain Julabo.

Sur la Figure 78, on observe également que lors du transfert d'eau entre la cuve et le bain PIONEER, une température intermédiaire est atteinte (environ 26,5 °C ici). La température de la cuve ne peut pas atteindre la température du bain PIONEER. Cela est dû au fait que l'eau chaude de la cuve se mélange avec l'eau froide du bain PIONEER, pour atteindre une température d'équilibre  $T_{eq}$ , donnée par :

$$T_{eq} = \frac{m_{cuve} \times T_{cuve} + m_{PIONEER} \times T_{PIONEER}}{m_{cuve} + m_{PIONEER}} \quad (54)$$

Où  $m_{cuve}$  et  $m_{PIONEER}$  sont les masses d'eau de la cuve (eau chaude) et d'eau de PIONEER (eau froide), et  $T_{cuve}$  et  $T_{PIONEER}$  les températures de la cuve et du bain PIONEER.

Ce mélange limite les refroidissements. Par exemple, si la cuve (environ 1L) est à 38 °C et que l'eau du bain PIONEER (environ 1,5L) est préparée à 20 °C, comme sur la Figure 78, la température d'équilibre sera d'environ 27 °C.

Afin d'effectuer des refroidissements à plus basse température, il est donc proposé de pré-refroidir un volume d'eau complémentaire (environ 2L). Lors de la trempe, l'eau chaude contenue dans la cuve est récupérée dans un flacon de vidange séparé, afin d'éviter son mélange avec l'eau froide. L'eau froide complémentaire est ajoutée progressivement dans le

bain PIONEER afin d'éviter qu'il ne se vide trop et donc qu'il soit endommagé. Une fois la température finale de la cuve atteinte, le transfert d'eau est arrêté.

Enfin, on observe que lors du pré-refroidissement, la température de la cuve diminue de quelques degrés. Cela peut être compensé par l'augmentation de la température de départ. Ainsi, comme dans le cas de la Figure 79, pour des gouttes générées à 60 °C, la cuve sera d'abord maintenue à au moins 65 °C (ici température de consigne du Julabo de 67 °C). Cela permet aussi de s'assurer que les cristaux ayant accidentellement nucléé lors de la génération des gouttes saturées se dissolvent, et qu'au début de l'expérience, toutes les gouttes soient dépourvues de cristaux.

Ainsi, la Figure 79 présente une trempe de température en utilisant à la fois le bypass, un flacon de vidange et un volume d'eau froide complémentaire.

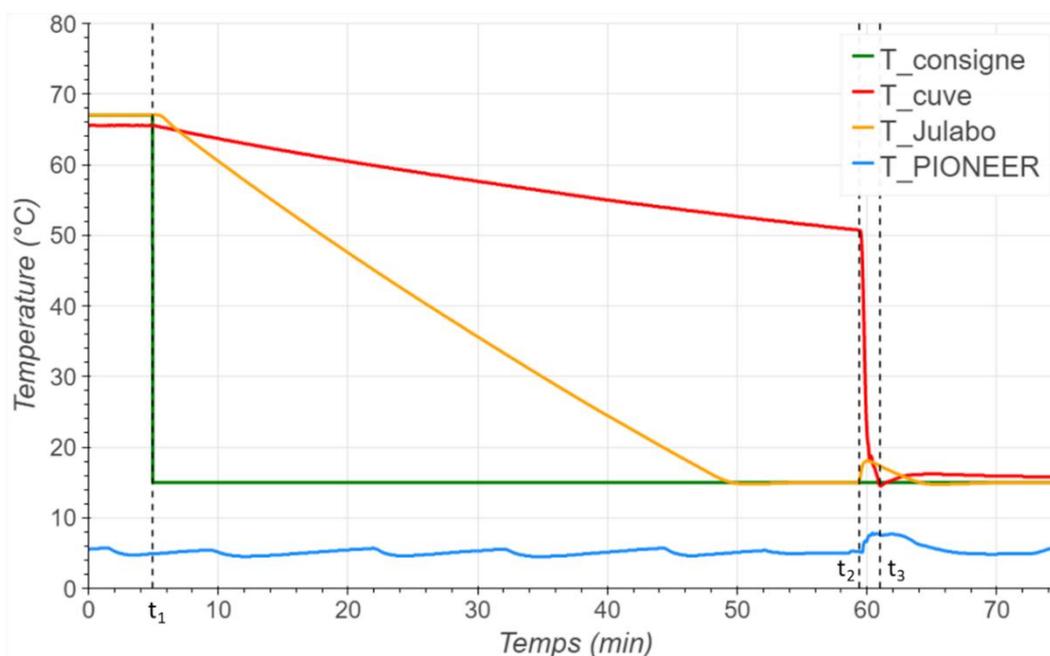


Figure 79 : Profil de température lors d'une trempe avec bypass, flacon de vidange et ajout d'eau froide complémentaire : la température de consigne pour le Julabo  $T_{consigne}$  (vert) est réglée de 67 à 15 °C. La température du bain PIONEER (bleu) est réglée à 5 °C par effet Peltier.  $T_{cuve}$  (rouge) et  $T_{Julabo}$  (jaune) sont les températures respectives de la cuve contenant la spirale de gouttes et le bain Julabo. A  $t_1$ , le bypass est ouvert pour le pré-refroidissement du Julabo. A  $t_2$  le bypass est ouvert et le transfert d'eau entre le bain PIONEER et la cuve est mis en marche. A  $t_3$ , le transfert est arrêté et la régulation se fait uniquement par le Julabo.

La température initiale du Julabo est fixée à 67 °C, et le bain PIONEER est pré-refroidi à 5 °C. Comme dans l'exemple précédent, à  $t_1$ , le bypass est ouvert afin que l'eau du Julabo reste en boucle fermée. La température de consigne du Julabo est alors fixée à 15 °C. A  $t_2$ , le Julabo a atteint la température de consigne. La température de la cuve est quant à elle descendue à 51 °C. Le bypass est alors fermé pour la régulation de la cuve, en parallèle du transfert d'eau entre la cuve R1D2 et le bain PIONEER. Lors de ce transfert, l'eau chaude est récupérée dans le flacon de vidange, et le niveau d'eau du bain PIONEER est ajusté en continu avec l'eau froide additionnelle. Enfin, lorsque la température souhaitée est atteinte ( $t_3$ ), le transfert est arrêté

et la régulation en température se fait uniquement grâce au Julabo. La température finale de la cuve (15,5 °C) peut ainsi être directement atteinte avec cette méthode, alors qu'elle aurait été limitée à une température entre 25 et 30 °C avec le mélange des eaux chaude et froide.

Cet exemple illustre également qu'il est possible d'effectuer une trempe sans dépassement de la température de consigne. Seul un petit écart de température est observé à la fin de la trempe (environ 1 °C), causé par le réchauffement de l'eau du Julabo lors de l'ouverture du bypass, par l'eau présente dans la cuve. Cependant, cet écart est tolérable dans notre étude.

### **3.3. Simplification du module**

Pour une utilisation en routine en laboratoire industriel, il a été décidé de simplifier l'utilisation du module. Ainsi, une nouvelle cuve a été développée avec un unique circuit d'eau modulable, dont différentes parties peuvent être rendues indépendantes grâce à un système de vannes. La cuve, précédemment en boucle fermée avec le bain PIONEER, est désormais reliée directement avec le bain thermostaté Julabo. Une fois la cuve remplie, des vannes permettent d'isoler cette eau par rapport au circuit de régulation afin d'éviter la circulation potentielle de bulles en provenance du thermostat, pouvant gêner l'observation. Le bain Julabo peut également être isolé, de manière à pré-refroidir indépendamment son eau, comme dans la configuration avec le bypass, décrite précédemment, afin d'effectuer des trempes de température. Cependant, le montage ne permet pas, en l'état, d'éviter le mélange des eaux chaude et froide. Dans un premier temps il sera donc uniquement utilisé pour effectuer des rampes de température. Des améliorations similaires à celles décrites précédemment (cuve de récupération de l'eau chaude par exemple) pourront facilement être apportées selon les besoins.

Ce module sera testé ultérieurement afin d'être installé sur la plateforme que j'ai dupliquée à Sanofi à Vitry-sur-Seine.

## 4. Observation des gouttes

Lors du refroidissement, les gouttes sont observées afin de détecter les événements de nucléation au cours du temps et en fonction de la température appliquée. L'observation permet également de caractériser directement les cristaux dans les gouttes, via leur faciès. Cependant, pour un suivi correct de l'ensemble de l'expérience, un grand nombre de photos est nécessaire (5 000 à 20 000 en général). De ce fait, la prise des photos et leur analyse représentent un travail conséquent, qui se doit d'être optimisé pour réduire autant que possible les interventions de l'utilisateur. Cette partie présente donc le système optique utilisé, le logiciel de pilotage développé durant cette thèse afin de faciliter l'acquisition des images ainsi que différents outils développés sur Python pour le traitement des photos.

### 4.1. Système optique

Les gouttes sont observées directement dans le capillaire qui est fixé dans la cuve, sur le support de spirale décrit précédemment (Partie B – 3.1.1). En utilisant un système optique différent de celui utilisé ici, il serait possible d'observer l'ensemble de la spirale en une seule photo. Cependant, cette photo ne permettrait pas d'avoir une bonne résolution des cristaux présents dans les gouttes. De ce fait, j'ai décidé de n'observer que quelques gouttes par photo avec une bonne résolution, au niveau de la goutte, en balayant une zone d'intérêt.

Pour cela, une caméra (Exo267MU3, SVS-Vistek) de 8,8MP de résolution (4096x2160px) est montée sur un système optique à zoom ajustable (Zoom 70 avec moteur pas à pas, TV-Objectif x3,1, WD=77 mm, L=10 mm, TV-Tube 1,0xD=35 mm L=146,5 mm, OPTO). Cette configuration permet d'observer une zone de 2,03x1,53 mm à 14,2x10,68 mm (Figure 80).

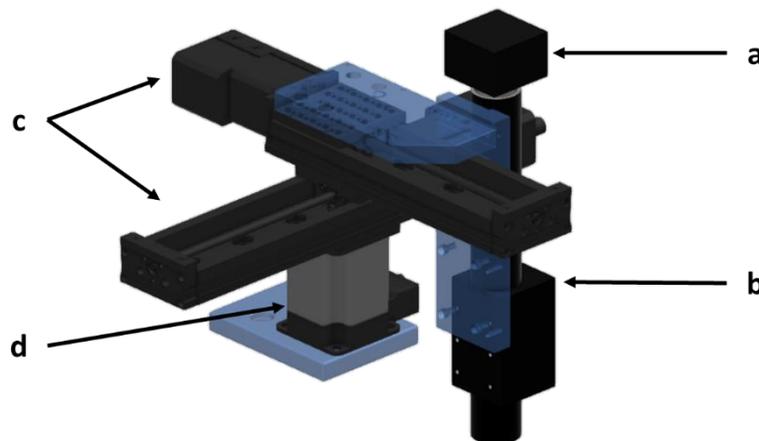


Figure 80 : Ensemble composé d'une caméra (a) et d'un système optique à zoom ajustable (b), fixé sur des platines motorisées en X et Y (c), et une platine motorisée en Z (d) pour le réglage du focus. Les pièces représentées en bleu sont des adaptateurs imprimés en résine au CINaM pour la fixation de l'ensemble.

Cet ensemble optique est fixé sur une platine motorisée en XYZ (X-VSR40A-PTB2 and XY-LSQ150A, Zaber) (Figure 80c et d) et une interface développée au CINaM sur LabVIEW permet

de le déplacer (Axes X et Y, Figure 81a), de modifier le focus (Axe Z, Figure 81b) et le zoom (Figure 81c), et d'enregistrer des photos (Figure 81d). Ainsi toute la zone contenant la spirale peut être observée avec le choix du niveau de détail et donc du nombre de gouttes dans le champ.

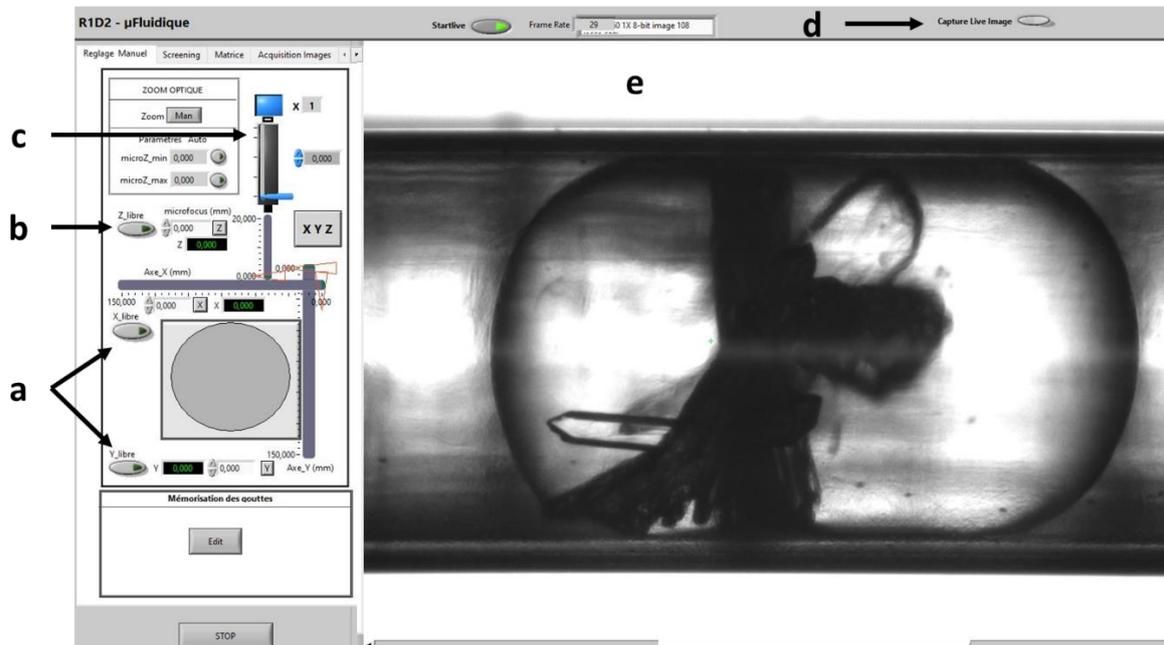


Figure 81 : Capture d'écran de l'interface LabVIEW de contrôle de l'ensemble optique, permettant de régler les positions en X et Y (a), le focus (b), le zoom (c) et d'acquérir manuellement des photos (d) de la zone observée (e).

## 4.2. Prise de photos

Le système décrit précédemment permet de déplacer la caméra et de prendre des photos manuellement. Cependant, lors d'un criblage, il est nécessaire d'automatiser la prise de photos afin d'observer l'ensemble des gouttes régulièrement au cours du refroidissement.

### 4.2.1. Définition d'une matrice

Au début du projet, la position des gouttes dans la spirale contenant le capillaire était mémorisée manuellement, goutte par goutte. Cependant, à raison d'environ 1 min par goutte, soit 5 h pour 300 positions, cette méthode n'était pas envisageable en routine. De plus, du fait d'un léger déplacement des gouttes dans le capillaire lors du refroidissement et au cours du temps (Figure 82), l'enregistrement des positions devait être corrigé plusieurs fois durant le refroidissement.

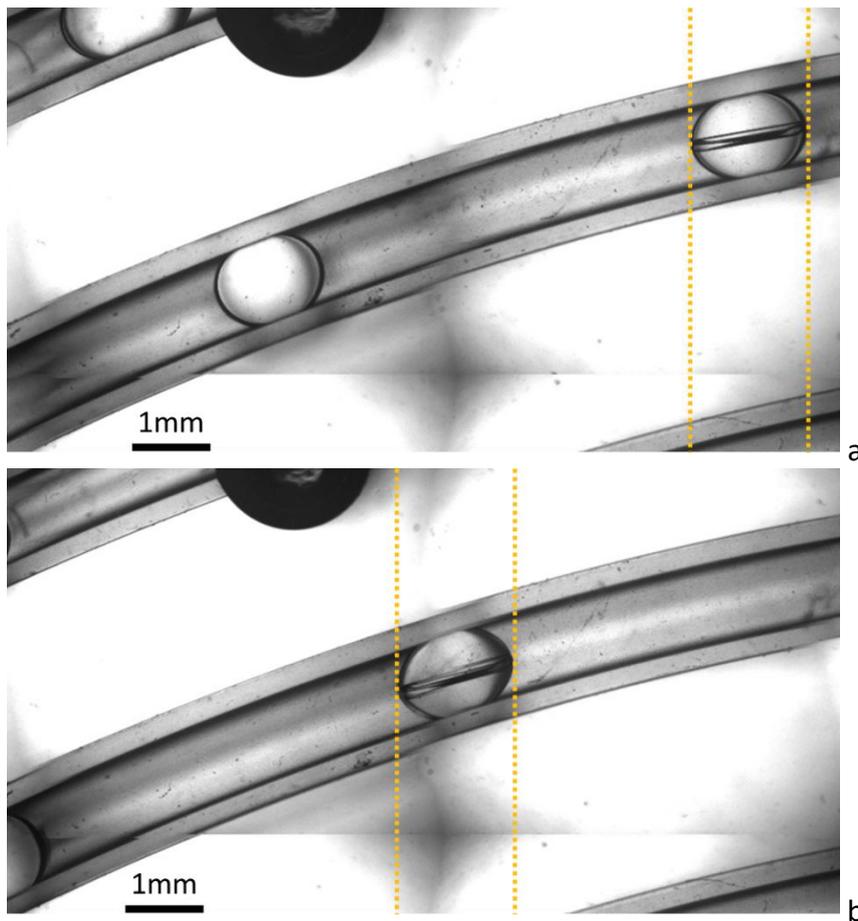
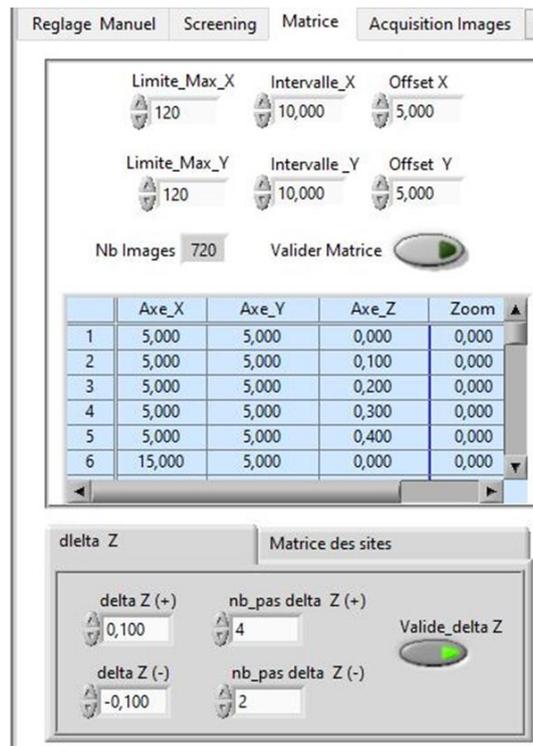


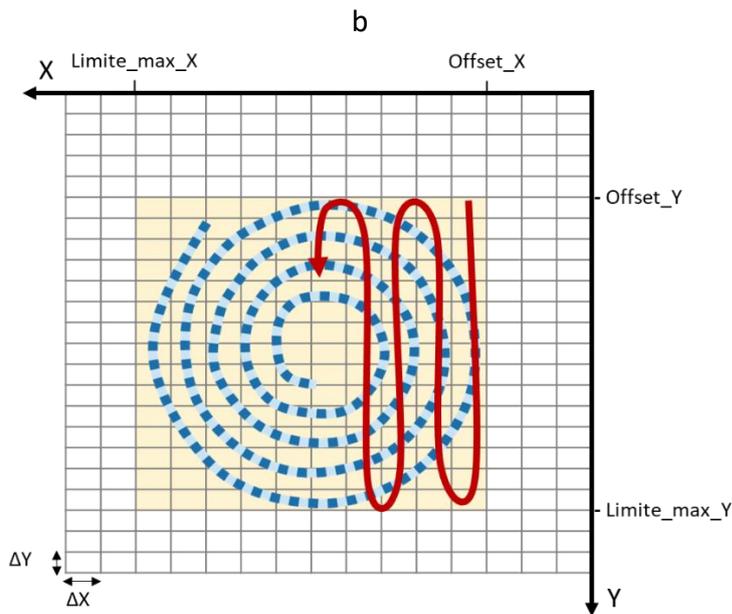
Figure 82 : Photos de gouttes d'acétonitrile saturées en Rimonabant à 60 °C et refroidies à 50 °C. La photo (a) a été prise environ 6 h avant la photo (b).

Le logiciel a donc été modifié pour générer automatiquement une matrice de positions correspondant aux centres des photos comprises dans la zone à observer (Figure 83a), ici l'ensemble de la spirale. Cette matrice est définie par un pas en X (Intervalle\_X (Figure 83a), ou  $\Delta X$  sur la Figure 83b) et en Y (Intervalle\_Y (Figure 83a), ou  $\Delta Y$  sur la Figure 83b), dépendant du zoom appliqué et de la caméra (taille de photo). Des limites minimum et maximum en X et Y de la zone à observer sont également définies (Offset\_X, Offset\_Y, Limite\_max\_X et Limite\_max\_Y sur la Figure 83a et b). De plus, il est également possible d'ajouter une variation en Z (focus) avec un pas et un nombre de pas choisi de part et d'autre d'une valeur moyenne  $Z_{moy}$  (Figure 83c). Cette variation en Z est utile lorsque le plan de la spirale n'est pas parfaitement parallèle avec le plan XY de la platine motorisée, et que le focus doit être ajusté selon la position XY de la caméra. Elle peut également être utile selon la position du cristal dans la goutte. En effet, lors de la génération de la matrice, Z est choisi pour que les gouttes soient nettes, ce qui correspond au centre de celles-ci. Cependant, les cristaux peuvent apparaître n'importe où dans la goutte, et le focus ne sera donc pas nécessairement adapté.

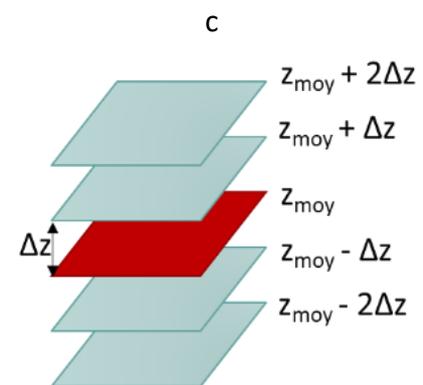
La définition d'une telle matrice permet de réduire le temps d'intervention de l'utilisateur à moins de 5 min, quel que soit le nombre de positions définies, et permet d'observer l'ensemble des gouttes lors du refroidissement, indépendamment de leur position exacte.



a



b



c

Figure 83 : Définition d'une matrice pour le balayage XYZ de la zone contenant la spirale. (a) Interface du programme LabVIEW. (b) Schéma explicatif : en jaune, la zone d'intérêt contenant la spirale, définie par les limites  $Offset_X$ ,  $Offset_Y$ ,  $Limite\_max\_X$  et  $Limite\_max\_Y$ . Les pas  $\Delta X$  et  $\Delta Y$  correspondent respectivement à la largeur et la hauteur des photos. La flèche rouge indique le chemin parcouru par la caméra lors du balayage. (c) Définition du pas  $\Delta z$  autour de la valeur  $z_{moy}$ .

## 4.2.2. Réduction du temps d'acquisition

Le nombre de photos nécessaires pour observer l'ensemble de la spirale augmente avec le zoom. En conséquence, le temps d'acquisition est également augmenté. Cela peut s'avérer problématique si l'on souhaite faire des acquisitions rapprochées dans le temps.

Une solution est d'accélérer le déplacement de la caméra. Cependant, il est indispensable de trouver un bon compromis entre vitesse et stabilité. En effet, si la vitesse de déplacement choisie est trop élevée, la caméra n'a pas le temps de se stabiliser mécaniquement, ce qui conduit à des photos floues.

Si le temps d'acquisition reste trop élevé, une autre alternative est de réduire le nombre d'images. Pour cela, une solution est décrite en Partie C – 4.3.2.

## 4.2.3. Choix des paramètres d'acquisition

L'observation des gouttes se fait durant tout le processus de refroidissement, afin de détecter l'apparition des cristaux dans les gouttes. De ce fait, une acquisition séquentielle doit être paramétrée. Le logiciel développé permet de définir le nombre de cycles à effectuer, chaque cycle correspondant à une matrice de photos, c'est-à-dire une spirale entière à un temps (modulo le temps d'acquisition) et une température donnés. Une durée entre chaque cycle est également définie. Cette durée doit être supérieure au temps d'acquisition d'un cycle.

Le titre des photos enregistrées (Figure 84) comprend l'heure exacte de prise de photo, les informations de position (X, Y, Z et zoom), le numéro du cycle et le numéro de la photo dans le cycle. Pour cette thèse, l'information de température n'est pas comprise dans le titre des photos, puisque le logiciel de contrôle des bains et celui de contrôle du système optique sont indépendants. Cependant, la température de la cuve est facilement retrouvée grâce à la date exacte de prise de photos.

20221025\_15h46min18sec\_CYC001\_\_X\_32v000\_Y\_13v000\_Z\_11v750\_Zm\_1v500\_Screening\_goutte001.jpg

Date	Heure	N° cycle	Positions X, Y et Z (focus)	Zoom	Titre éditable	N° photo
------	-------	----------	-----------------------------	------	----------------	----------

Figure 84 : Exemple de titre d'une photo.

Une nouvelle version comprenant les deux interfaces (d'acquisition des photos et de température) en une unique est en cours de développement, et permettra d'accéder directement à la température dans le titre de la photo.

## 4.3. Traitement

### 4.3.1. Reconstruction de l'image globale

Dans cette partie, je présente la méthode de reconstruction de l'image globale de la zone observée, définie au paragraphe précédent, à partir de toutes les photos prises lors du balayage d'une matrice. On parlera d'image pour la reconstruction, et de photo pour désigner les photos individuelles.

#### 4.3.1.1. Méthode de reconstruction

En informatique, une photo est une matrice, ici de dimension  $4096 \times 2160$  ( $largeur\_photo \times hauteur\_photo$  en pixels), dont les valeurs correspondent aux couleurs de chaque pixel. Par exemple, pour une photo binaire, ces valeurs sont soit 0 (noir), soit 1 (blanc). Dans notre cas, il s'agit de photos codées en niveaux de gris. Ainsi, les valeurs sont comprises entre 0 (noir) et 255 (blanc) et correspondent à différentes teintes de gris.

Pendant la thèse, j'ai développé un code Python pour reconstituer une image complète de la zone observée, contenant la spirale, à partir des différentes photos du balayage d'une matrice. La Figure 85 résume les différentes étapes de la reconstruction.

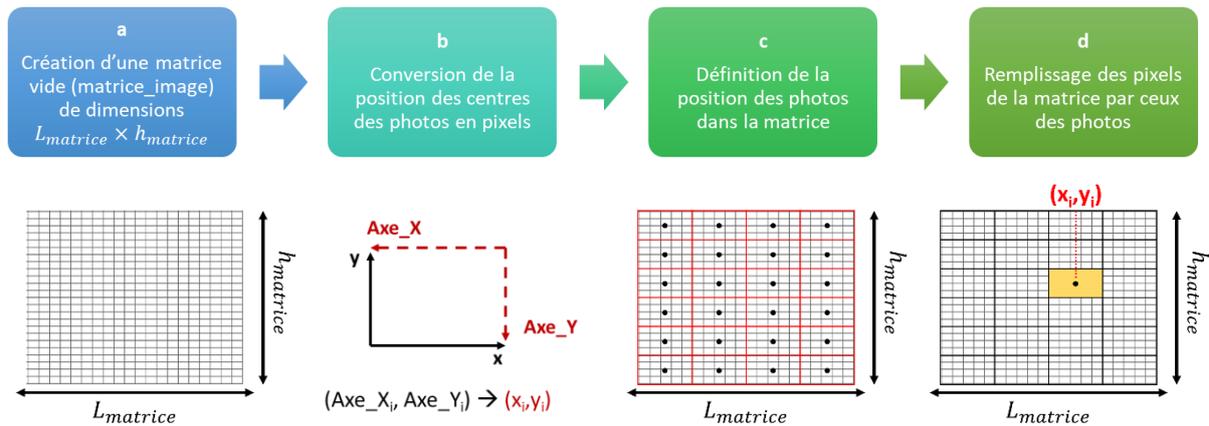


Figure 85 : Processus de reconstruction de l'image globale de la zone observée à partir des photos prises lors du balayage d'une matrice.

Pour la première étape de reconstruction de l'image globale (Figure 85a), une matrice vide (*matrice\_image*) va être créée, de dimensions  $L_{matrice} \times h_{matrice}$ , avec :

$$L_{matrice} = largeur\_photo(pixels) \times nombre\ de\ photos\ par\ lignes \quad (55)$$

$$h_{matrice} = hauteur\_photo(pixels) \times nombre\ de\ photos\ par\ colonnes \quad (56)$$

Cette matrice est ensuite remplie par les valeurs des pixels de chaque photo. Pour cela, les positions des centres des photos, de coordonnées  $(Axe\_X_i, Axe\_Y_i)$  sont d'abord converties en pixels lors de la seconde étape, dans un nouveau repère  $(x', y')$  défini (Figure 85b) par :

$$x'_i = f_{zoom} \times (150 - Axe\_X_i) \quad (57)$$

$$y'_i = f_{zoom} \times Axe\_Y_i \quad (58)$$

Où  $f$  est un facteur dépendant du zoom, qui relie le nombre de pixels aux coordonnées de la caméra :

$$f_{zoom} = \frac{Axe\_X_{gauche} - Axe\_X_{droite}}{largeur\_image \text{ (pixels)}} = \frac{Axe\_Y_{bas} - Axe\_Y_{haut}}{hauteur\_image \text{ (pixels)}} \quad (59)$$

$f_{zoom}$  est mesuré une fois pour chaque zoom, lors de la calibration de la caméra (cf Annexe 3), sa valeur restant fixe pour un système donné.

Ensuite, une troisième étape a pour but de définir la position de chaque photo dans la *matrice\_image* (Figure 85c), c'est-à-dire les indices des pixels remplis par la photo d'indice  $i$ , centrée en  $(x'_i, y'_i)$ . La position est définie par ses limites haute, basse, droite et gauche, qui sont calculées à partir du centre de la photo  $i$ , défini pour le balayage, ainsi que de la largeur et de la hauteur des photos, par :

$$gauche(i) = x'_i - min(x') \quad (60)$$

$$droite(i) = gauche(i) + largeur\_image \quad (61)$$

$$haut(i) = y'_i - min(y') \quad (62)$$

$$bas(i) = haut(i) + hauteur\_image \quad (63)$$

Enfin, les pixels de la *matrice\_image* compris dans ces coordonnées sont remplis avec les pixels de la photo (Figure 85d), en comparant les valeurs des pixels de la matrice (*a priori* 0), à celles des pixels de l'image. Ainsi, s'il y a chevauchement des photos, par exemple si le pas en  $Axe\_X$ , ou en  $Axe\_Y$  défini pour l'acquisition est inférieur respectivement à la largeur, et à la hauteur d'une photo, seule la valeur la plus élevée (image plus lumineuse) sera gardée.

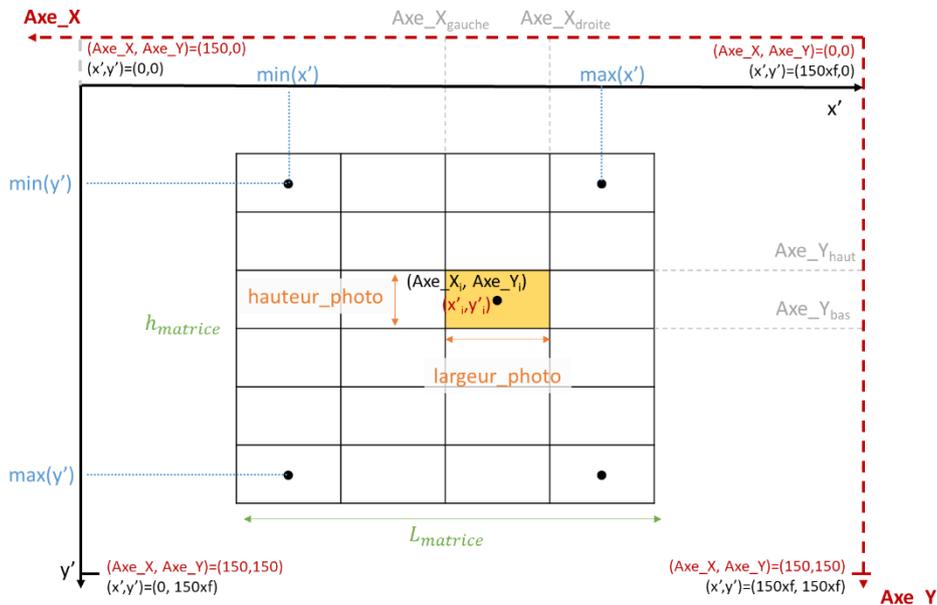


Figure 86 : Schéma permettant de définir les repères ( $Axe\_X$ ,  $Axe\_Y$ ) des coordonnées de la caméra,  $(x', y')$  des coordonnées en pixels, les coordonnées des photos de centres  $(x'_i, y'_i)$  ainsi que la hauteur et la largeur d'une photo et celles de la *matrice\_image*. Les positions limites de la caméra sont données par  $(min(x'), min(y'), max(x'), max(y'))$ .

La matrice ainsi construite est enregistrée comme image (Figure 87). Pour des questions de taille de stockage, et de temps d'enregistrement, il peut être intéressant de réduire la taille de l'image globale. Dans cette thèse, la taille des images a été réduite d'un facteur 5. Cela permet de conserver une résolution largement suffisante pour la détection visuelle de cristaux dans les gouttes.

Le processus décrit ci-dessus est appliqué pour chaque cycle de photos.

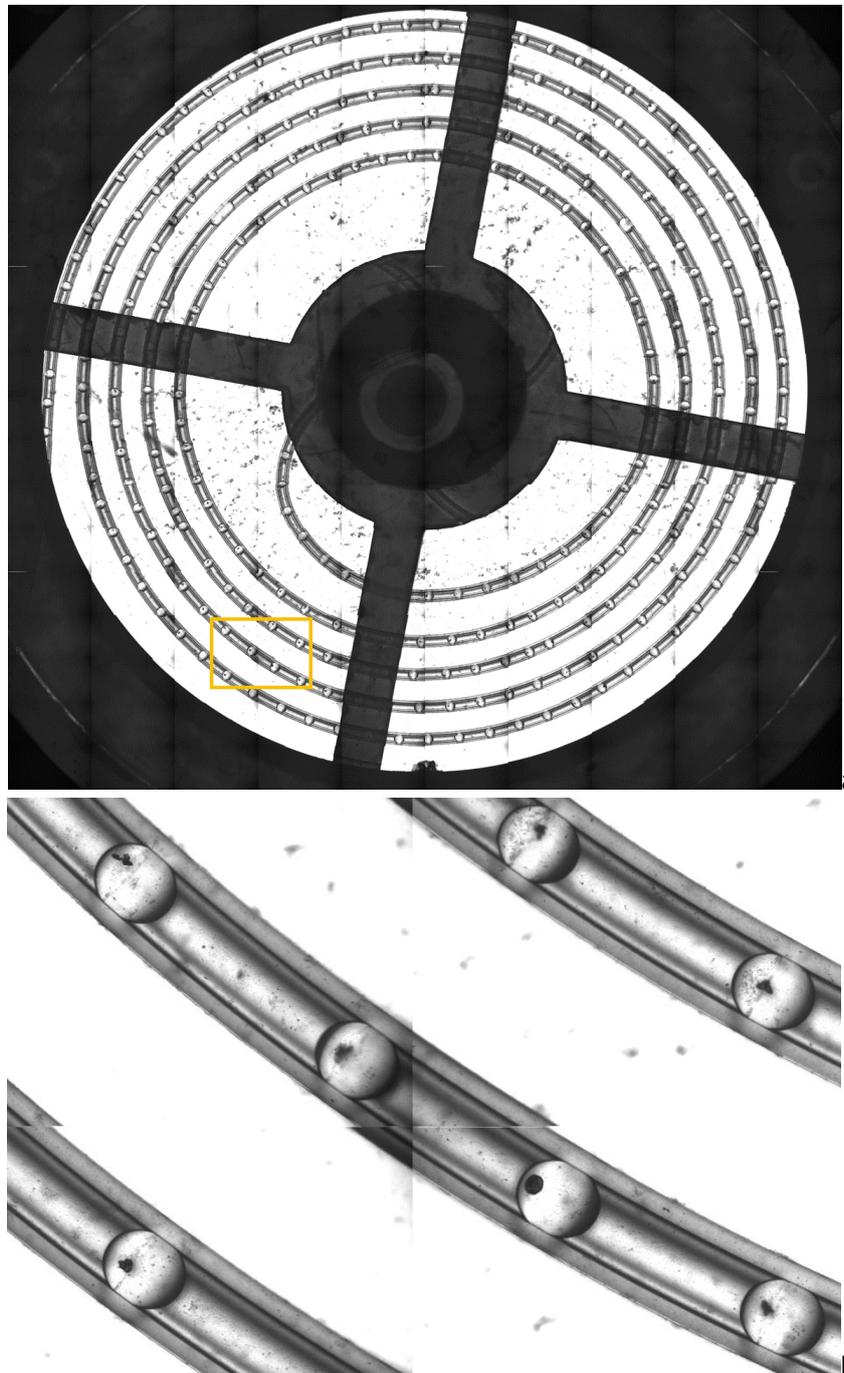


Figure 87 : Gouttes de Sulfathiazole dans l'eau, générées à 70 °C dans l'huile GPL107 et refroidies à 10 °C (rampe de -5 °C/h), dans un capillaire de 1 mm de diamètre interne. (a) Reconstruction de l'image complète de la spirale à partir de 180 photos. (b) Zoom sur l'image (a) à la jonction de quatre photos, indiqué par un rectangle en (a).

### 4.3.1.1. Correction des erreurs

Deux erreurs principales ont été observées durant cette thèse lors de la prise de photos.

Premièrement, pour certains cycles, de façon aléatoire, il arrive qu'une photo ne soit pas enregistrée. Lors de la reconstruction, cela se traduit par un décalage des photos (Figure 88a). Le plus souvent, cette erreur affecte la première photo du cycle, comme c'est le cas sur la Figure 88a. Pour y remédier, une photo noire est ajoutée manuellement dans la liste des photos et renommée en fonction de la photo manquante.

La seconde erreur, plus courante, affecte une partie ou la totalité des photos d'un cycle. En effet, pour ces photos erronées, une bande de pixels devant correspondre aux pixels de gauche de la photo, est positionnée à droite de la photo (Figure 88b). La largeur de bande est constante, ce qui rend la correction facile. Lors de la reconstruction de l'image complète, une boucle est ajoutée au code décrit précédemment afin de corriger les photos concernées en coupant la bande fausse de droite et en l'insérant à gauche de la photo.

Dans certains cas, les deux types d'erreurs sont présentes.

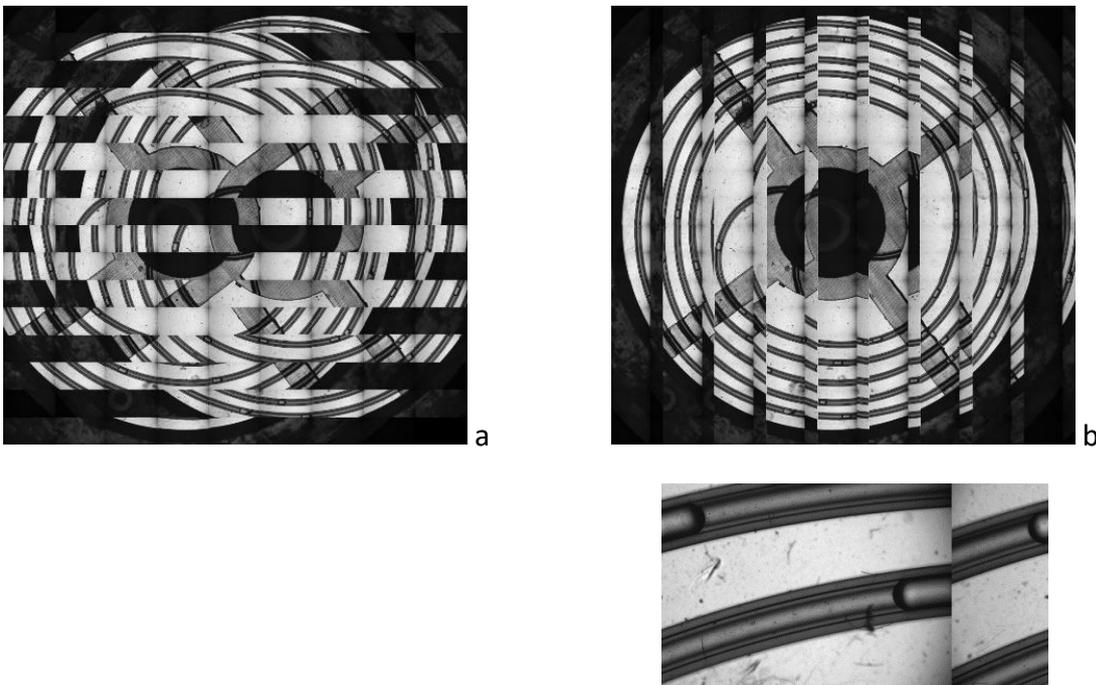


Figure 88 : Reconstructions d'images avec des erreurs dans la prise de photos. (a) Cas où la première image est manquante. (b) haut : Cas où les images sont toutes erronées ; bas : photo erronée.

### 4.3.2. Réduction du nombre d'images

Pour réduire le temps d'acquisition ainsi que l'espace de stockage utilisé, on peut réduire le nombre de photos. En effet, certaines photos, hors de la spirale, ne contiennent pas d'information utile. J'ai donc développé un code Python afin de sélectionner les positions des photos utiles à partir d'une matrice. La Figure 89a présente une reconstruction de la zone observée par une matrice complète selon la méthode décrite précédemment (Partie C –

4.3.1.1). L'image est positionnée dans le repère  $(x,y)$ , qui servira à remonter aux positions  $Axe\_X$  et  $Axe\_Y$  des images dans le repère du système optique (Figure 89a). Le centre de chaque photo est indiqué par un point rouge si la photo est dans la zone utile et un point jaune si la photo est en dehors. Cette zone utile est définie à l'aide de deux ellipses de dimensions ajustables ( $rv$  et  $rh$ , respectivement les rayons verticaux et horizontaux) (Figure 89b). Les positions des photos comprises dans la zone utile sont converties selon  $Axe\_X$  et  $Axe\_Y$ , et enregistrées dans un fichier lisible par l'interface de contrôle. L'image globale de la zone est ensuite reconstruite comme décrit précédemment (Partie C – 4.3.1.) (Figure 89c).

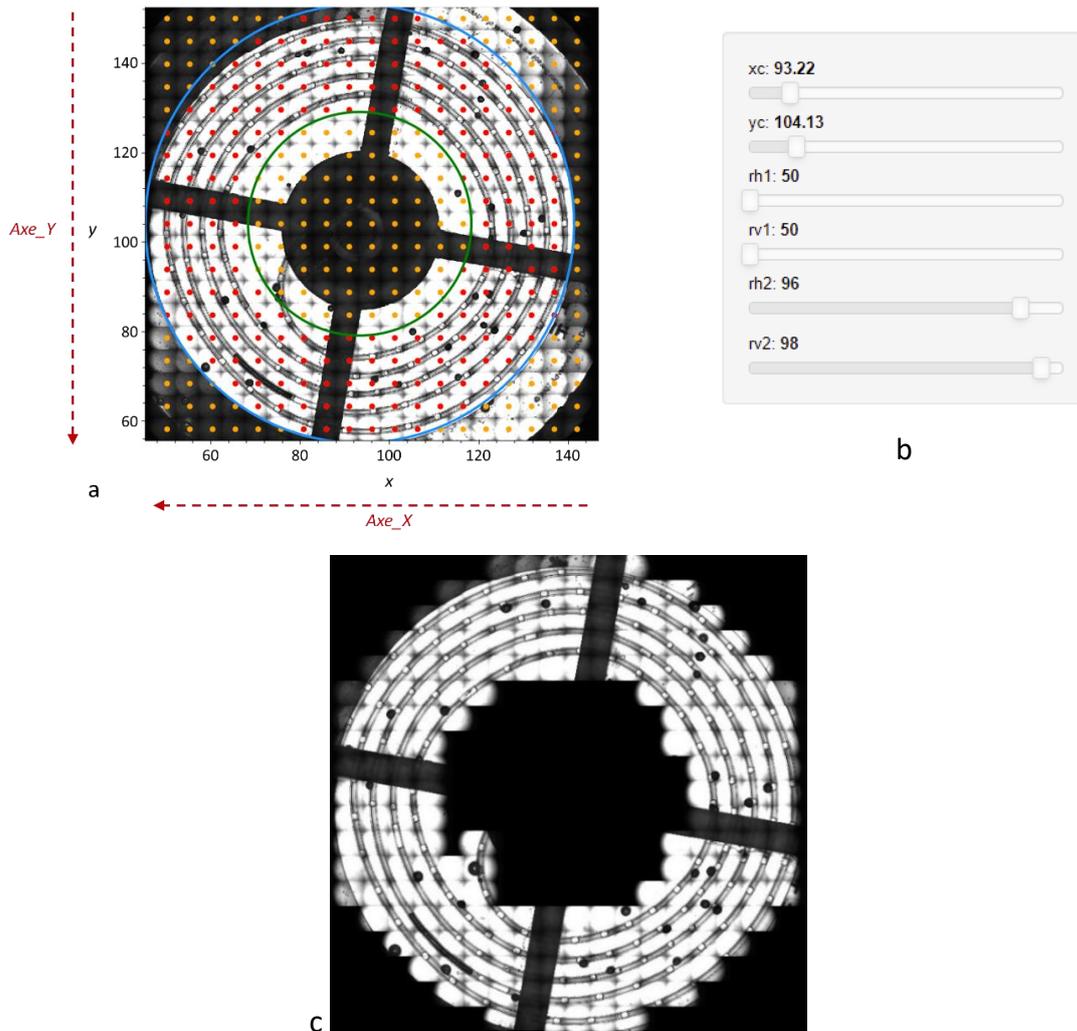


Figure 89 : (a) Sélection d'une zone utile à l'aide de deux ellipses (bleue et verte) sur une image reconstituée à partir de 361 photos. Le centre des photos est indiqué d'un point rouge pour les photos incluses dans la zone utile, ou jaune pour les photos hors de la zone utile. (b) Sélection des paramètres des ellipses :  $xc$  et  $yc$  sont les coordonnées  $x$  et  $y$  du centre des ellipses,  $rh1$  et  $rh2$  les rayons horizontaux des ellipses et  $rv1$  et  $rv2$  les rayons verticaux. (c) Image reconstituée à partir des 204 photos prises uniquement dans la zone utile.

### 4.3.3. Positions réelles des gouttes

Un des inconvénients de la prise de photos matricielle est que les gouttes peuvent se retrouver à cheval entre deux photos. Pour une meilleure visualisation des gouttes et/ou des cristaux, il peut être utile de prendre des photos individuellement sur chaque goutte. J'ai donc développé un programme Python pour accéder aux positions des gouttes.

Comme précédemment, une matrice de photos contenant la spirale est placée dans un repère xy. Le code permet, en cliquant sur les gouttes, d'obtenir les coordonnées x et y correspondantes, et ainsi de revenir aux positions Axe\_X et Axe\_Y. Un nouveau fichier contenant ces positions, ainsi qu'une ou plusieurs valeurs d'Axe\_Z et de Zoom peut ainsi être enregistré, et utilisé pour une acquisition des images des gouttes. Ce fichier est également éditable sur l'interface de contrôle, si les positions doivent être ajustées (Figure 90).

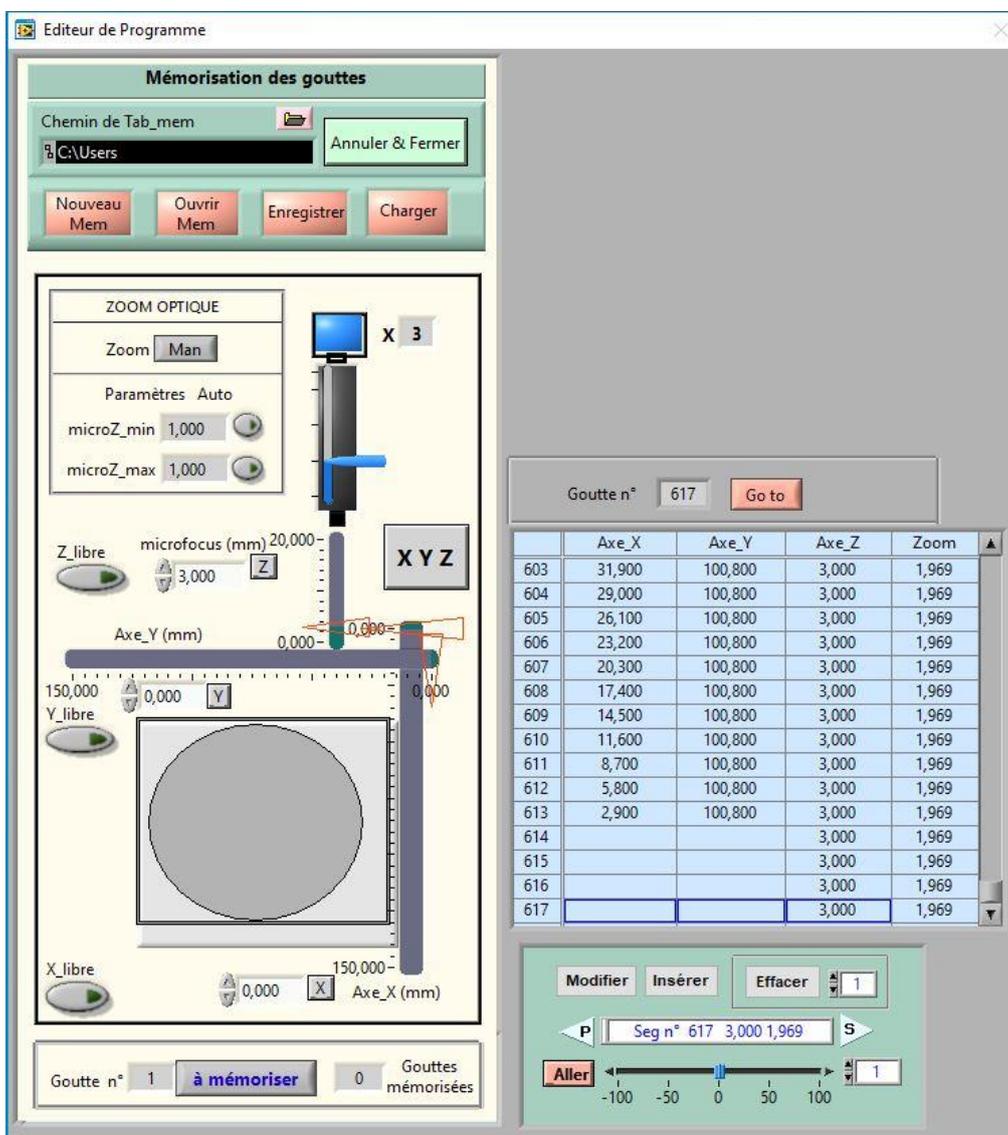


Figure 90 : Onglet d'édition de la matrice de positions de l'interface de contrôle de la caméra. La partie de gauche permet de positionner la caméra et de mémoriser sa position dans la matrice affichée dans la partie de droite. La partie de droite permet de modifier cette matrice de positions

*en ajoutant, modifiant ou supprimant des lignes, et de déplacer la caméra vers une position choisie de la matrice.*

De la même manière que pour une matrice globale, une photo contenant l'ensemble des gouttes peut être reconstituée (Figure 91).

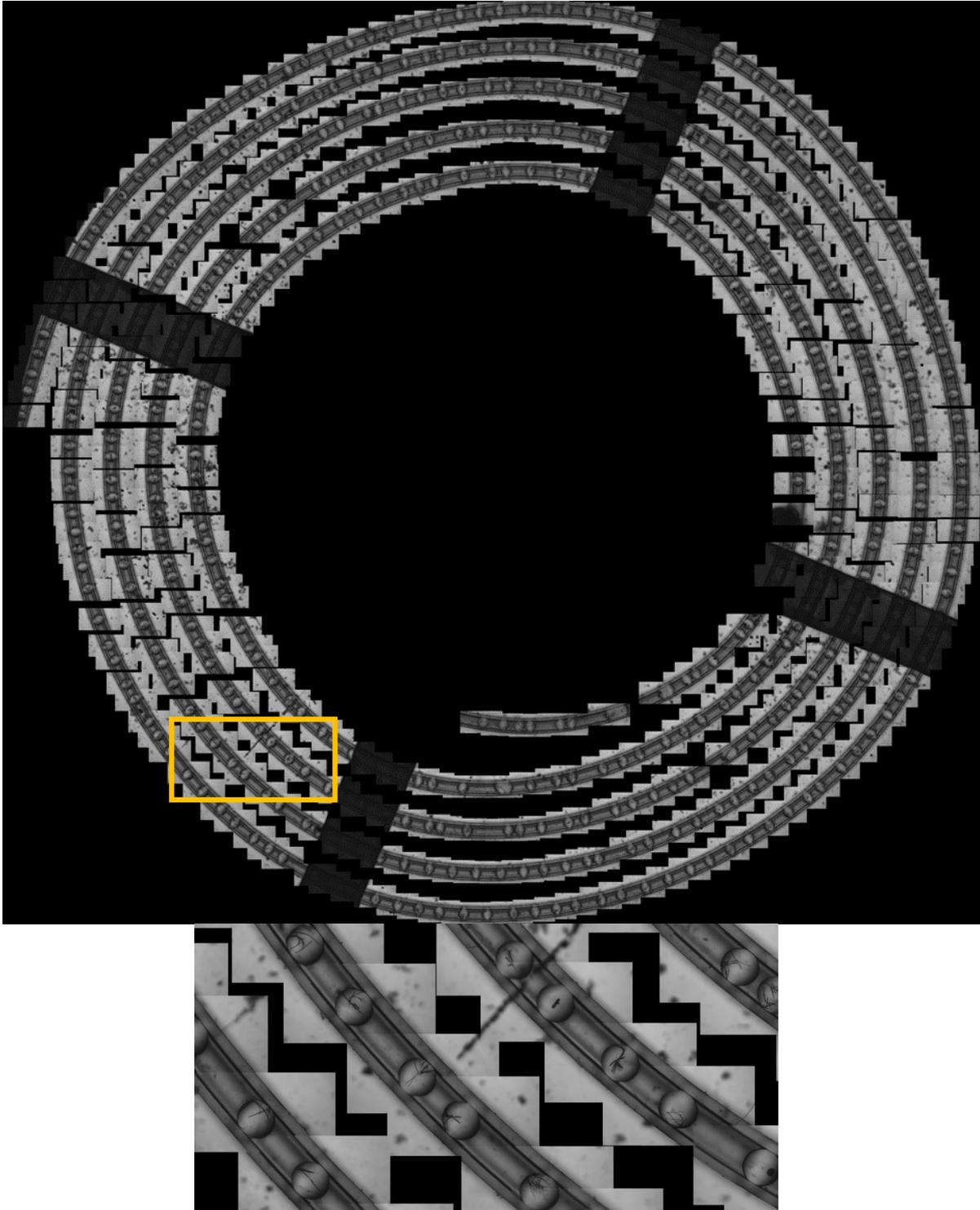
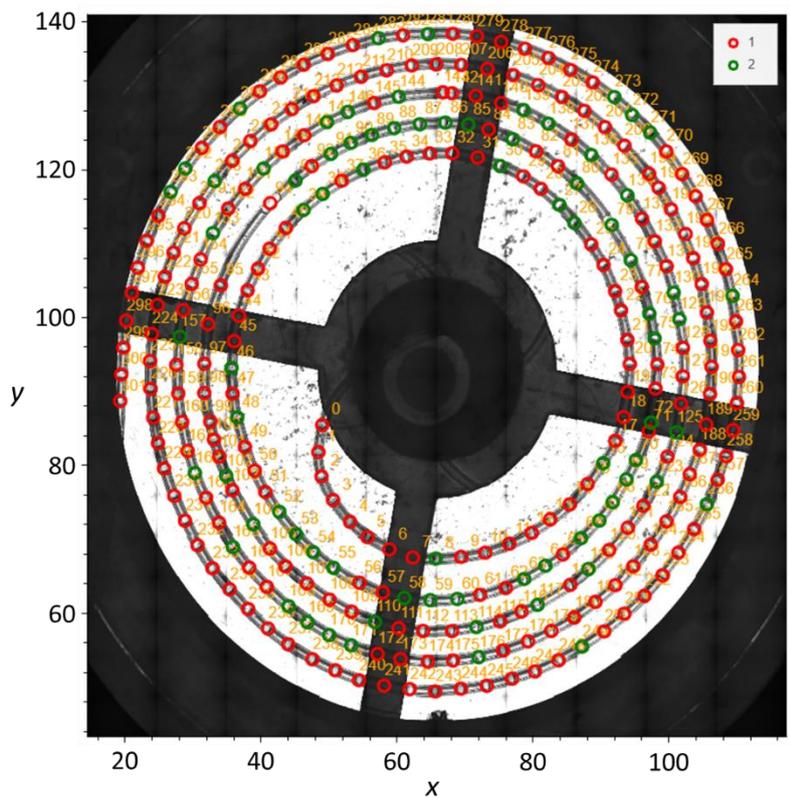


Figure 91 : (a) Image reconstituée à partir de 492 photos, d'un capillaire de 1 mm de diamètre contenant des gouttes de Sulfathiazole dans l'eau, générées à 70 °C et refroidies à 10 °C par une rampe (-0,5 °C/h). (b) Zoom sur l'image (a) dans la zone représentée par un rectangle.

### 4.3.4. Comptage des cristaux

J'ai développé sur Python un programme similaire à celui décrit précédemment afin de compter les gouttes vides et les gouttes contenant un ou plusieurs cristaux (Figure 92). Ainsi, un simple clic sur une goutte indique qu'elle est vide. Celle-ci est indiquée par un cercle rouge. En revanche, un double clic indique que la goutte contient au moins un cristal, et la marque avec un cercle vert. Comme précédemment, le numéro de la goutte est indiqué en orange (Figure 92a).

L'ensemble des informations est enregistré dans un tableau (Figure 92b). Cela permet à la fois d'effectuer des statistiques, et de comparer l'évolution de l'état d'une goutte au cours du temps, en comparant les tableaux des différents cycles, sous réserve que les gouttes soient numérotées de la même manière (même goutte de départ, pas de coalescence...).



a

#	x	y	Taps
0	76.032494	92.572414	2.0
1	75.772274	87.635844	1.0
2	77.376968	83.159463	2.0
3	79.952069	78.995878	2.0
4	84.489357	76.071894	2.0
5	94.518892	74.053877	2.0

b

Figure 92 : (a) Sélection des positions des gouttes vides (rouge, Taps = 1) et contenant un cristal (vert, Taps = 2) à partir de l'image reconstruite de la spirale. (b) Les positions x et y, ainsi que le nombre de clics (Taps) sont enregistrées dans un tableau.

## 5. Caractérisation Raman

Bien que la caractérisation optique permette d'avoir une première idée du polymorphisme grâce au faciès des cristaux, une analyse complémentaire est nécessaire afin d'identifier clairement les phases cristallines présentes. En effet, différentes phases peuvent présenter des faciès similaires. De même, deux cristaux de même phase peuvent avoir des faciès différents. Au début de la thèse, deux techniques sont utilisées pour distinguer les phases cristallines : la diffractions des rayons X et la spectroscopie Raman. Dans les deux cas, les gouttes sont analysées en dehors de la plateforme (Partie B – 3.3 et 3.5), ce qui implique des manipulations supplémentaires des capillaires et des gouttes.

Un des objectifs principaux de cette thèse a donc été d'ajouter une technique de caractérisation des cristaux (*in situ*), directement sur la plateforme, dans les capillaires. Il a été choisi de se tourner vers un système de caractérisation Raman à fibres optiques, composé d'un laser, d'une sonde, comportant les fibres optiques, et d'un spectromètre. Après une étude bibliographique approfondie et la comparaison théorique des différentes solutions commerciales proposées, j'ai testé différents systèmes pendant plusieurs mois en les adaptant à la plateforme microfluidique afin de déterminer la meilleure combinaison technologique pour une caractérisation dans les gouttes. Cette partie présente les principales caractéristiques étudiées pour le choix de chaque élément.

### 5.1. Choix du laser

Comme décrit en Partie A – 3.5.2.1 (équation (37)), l'intensité du signal Raman dépend fortement de la longueur d'onde utilisée pour l'excitation. Plus la longueur d'onde sera faible, plus le signal sera intense. Cependant, le risque de fluorescence des produits et des matériaux augmente lorsque l'on diminue la longueur d'onde. Ainsi, il a été choisi de travailler à une longueur d'onde de 785 nm afin de limiter le risque de fluorescence tout en gardant une intensité du signal convenable. Pour la même raison, cette longueur d'onde est couramment utilisée pour l'analyse de molécules pharmaceutiques.

Il a également été choisi de travailler avec un laser à puissance de sortie ajustable jusqu'à 350 mW (ref. I0785MM0350MF, Innovative Photonic Solutions), afin de pouvoir éviter la dégradation des produits très sensibles.

### 5.2. Choix du spectromètre

#### 5.2.1. Spectromètres testés

Dans le cadre de cette thèse, de nombreux spectromètres ont été étudiés. Quatre d'entre eux, prêts par des fournisseurs, ont été testés en pratique :

- HR-TEC-785 (StellarNet)
- AvaRaman Bundle-D (Avantes)

- QE Pro (OceanInsight)
- QEPro+ (OceanInsight)

Leurs caractéristiques sont présentées en annexe.

Les quatre spectromètres testés permettent des analyses sur les mêmes gammes spectrales. Hormis pour le spectromètre HR-TEC, le type de réseau de diffraction peut être choisi lors de l'achat du spectromètre, afin de gagner en résolution spectrale, au détriment de la largeur spectrale accessible, comme décrit précédemment (Partie A – 3.5.2.3).

La principale différence entre ces spectromètres réside donc dans le type de détecteur, qui est plus ou moins sensible au signal reçu

## 5.2.2. Comparaison des spectromètres

La Figure 93 présente les spectres Raman d'un échantillon de poudre de Rimonabant (forme II) enregistrés sur les spectromètres AvaRaman, QEPro et QEPro+. Les spectres ont été mesurés à partir du même échantillon de poudre, avec la même sonde (Sonde Raman IPS). Le spectromètre HR-TEC n'a pas pu être testé avec cette sonde, et n'est donc pas représenté sur la Figure 93. Toutefois, en utilisant les autres sondes, le signal enregistré avec le spectromètre HR-TEC était moins intense que celui du spectromètre AvaRaman. Enfin, d'après la Figure 93, il est clair que le spectromètre QEPro+ présente une sensibilité largement supérieure aux autres spectromètres étudiés. Il a de ce fait été choisi comme solution et installé sur la plateforme microfluidique.

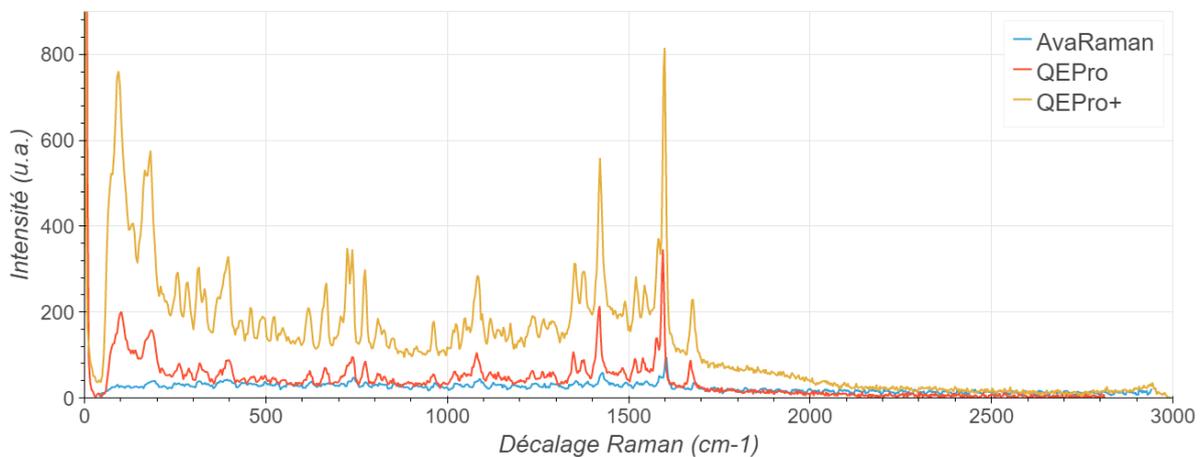


Figure 93 : Comparaison des spectromètres AvaRaman, QEPro et QEPro+ munis d'une sonde IPS sur un échantillon de poudre de Rimonabant Forme II, avec un temps d'intégration de 100 ms.

## 5.2.3. Choix de la fente d'entrée

Comme décrit en Partie A – 3.5, le signal, récupéré par la sonde et envoyé à travers la fibre optique de collection, entre dans le spectromètre par une fente, qui, suivie du réseau de diffraction, participe à la séparation des longueurs d'ondes et donc influence directement la résolution du spectre Raman obtenu.

Ainsi, plus la fente d'entrée du spectromètre est fine, plus le signal sera résolu. En revanche, en réduisant la fente d'entrée, l'intensité reçue par le spectromètre est naturellement réduite, et un temps d'intégration plus long sera nécessaire. Sur le spectromètre QEPro+ choisi, il est possible de changer la fente d'entrée du spectromètre afin d'améliorer la résolution spectrale. La Figure 94 présente les spectres Raman d'un échantillon de poudre de Rimonabant (forme II) en utilisant différentes fentes sur le spectromètre QEPro+. Comme attendu, plus la fente est fine, plus les pics sont résolus mais plus le signal est faible. Il a été choisi de garder la fente d'entrée par défaut, de 50  $\mu\text{m}$ , qui est un bon compromis entre résolution et intensité. On note sur la Figure 94 que l'intensité du signal avec la fente de 25  $\mu\text{m}$  est inférieure à celle avec la fente de 10  $\mu\text{m}$ . Cela pourrait s'expliquer par exemple par un mauvais alignement de la fibre sur la fente d'entrée du spectromètre et donc une perte de signal.

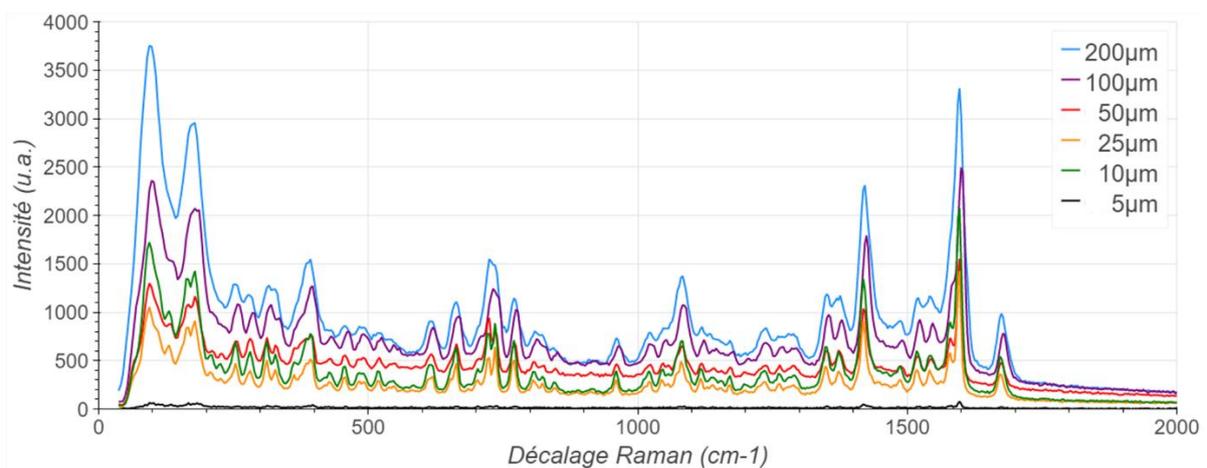


Figure 94 : Spectres Raman d'un échantillon de poudre de Rimonabant (forme II) mesurés avec le spectromètre QEPro+ muni de fentes d'entrées de différentes largeurs (200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$ ) avec un temps d'intégration de 100 ms.

### 5.3. Choix de la sonde

Comme décrit dans la Partie A – 3.5.2.2., la sonde Raman est composée d'une tête de sonde contenant de nombreux éléments optiques, adaptés à la longueur d'onde choisie (ici 785 nm) et de deux fibres optiques.

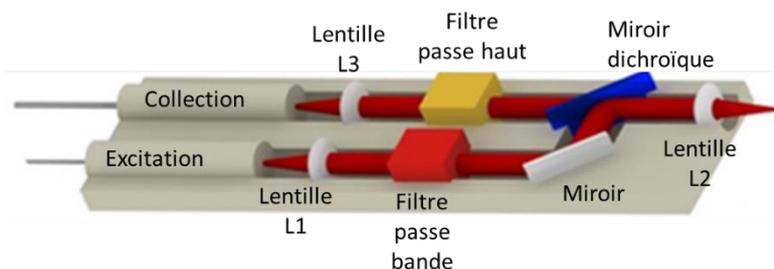


Figure 95 : Schéma de la sonde RPB (InPhotonics-OceanInsight).

La qualité et la géométrie des fibres optiques ont une influence sur le signal Raman collecté. J'ai testé deux géométries pour la fibre de collection (Figure 96). Une géométrie « classique » (Figure 96a), qui aligne une unique fibre optique de 200  $\mu\text{m}$  de diamètre sur la fente d'entrée du spectromètre, et une géométrie « circle-to-line » (Figure 96b), composée de 6 fibres optiques de 200  $\mu\text{m}$  qui sont alignées avec la fente en entrée du spectromètre, afin de minimiser les pertes de signal en entrée du spectromètre.

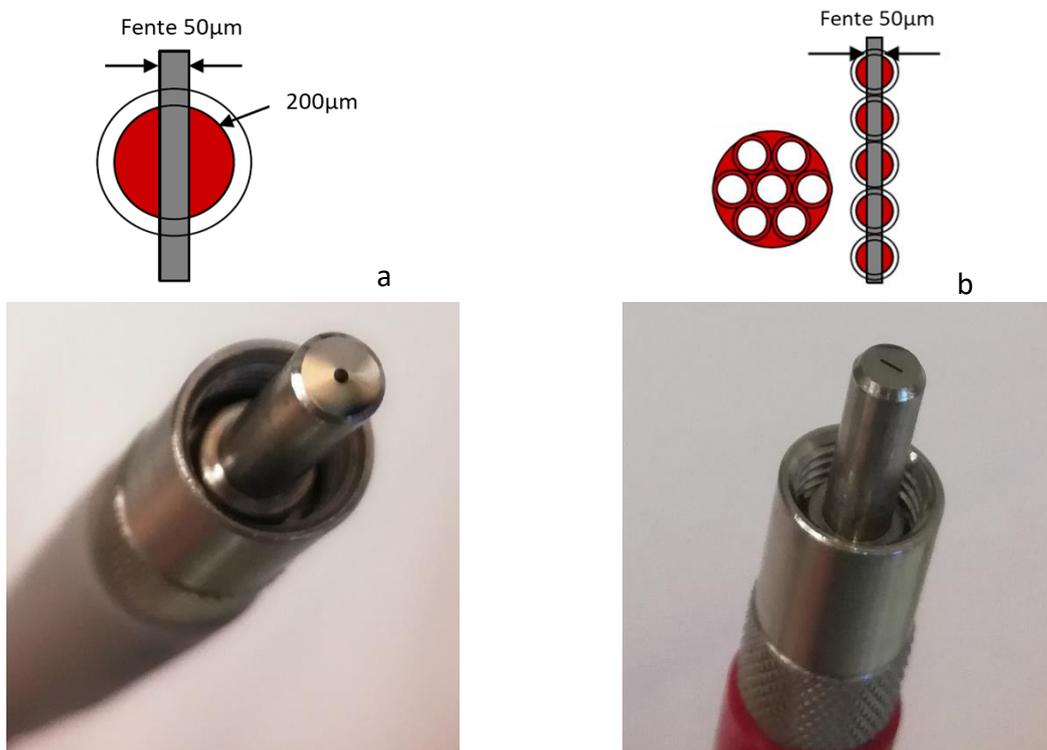


Figure 96 : Différentes géométries de fibres de collection : (a) géométrie « classique », (b) géométrie « circle-to-line ».

Dans le cadre de cette thèse, trois sondes Raman à 785 nm ont été testées :

- Sonde InPhotonics standard - géométrie classique pour la fibre de collection
- Sonde InPhotonics enhanced - géométrie circle-to-line pour la fibre de collection
- Sonde Innovative Photonic Solutions (IPS) - géométrie circle-to-line pour la fibre de collection

La Figure 97 présente les spectres Raman d'un échantillon de poudre de Rimonabant (forme II) en utilisant les trois sondes sur le spectromètre QEPro+ et en appliquant le même temps d'intégration (100 ms). Les deux sondes InPhotonics présentent un signal plus intense que celui de la sonde IPS, la sonde InPhotonics enhanced présentant le signal le plus intense.

Sur cette figure, il est également notable que la fréquence de coupure des filtres diffère selon les sondes. Ainsi, pour la sonde IPS, la fréquence de coupure est de 50  $\text{cm}^{-1}$ . La fréquence de coupure de la sonde InPhotonics standard est de 150  $\text{cm}^{-1}$  et celle de la sonde InPhotonics enhanced de 200  $\text{cm}^{-1}$ .

Pour l'implémentation sur la plateforme, j'ai donc choisi une sonde InPhotonics enhanced, dont la fréquence de coupure a été décalée à  $100\text{ cm}^{-1}$ , et une distance focale de 7,5 mm.

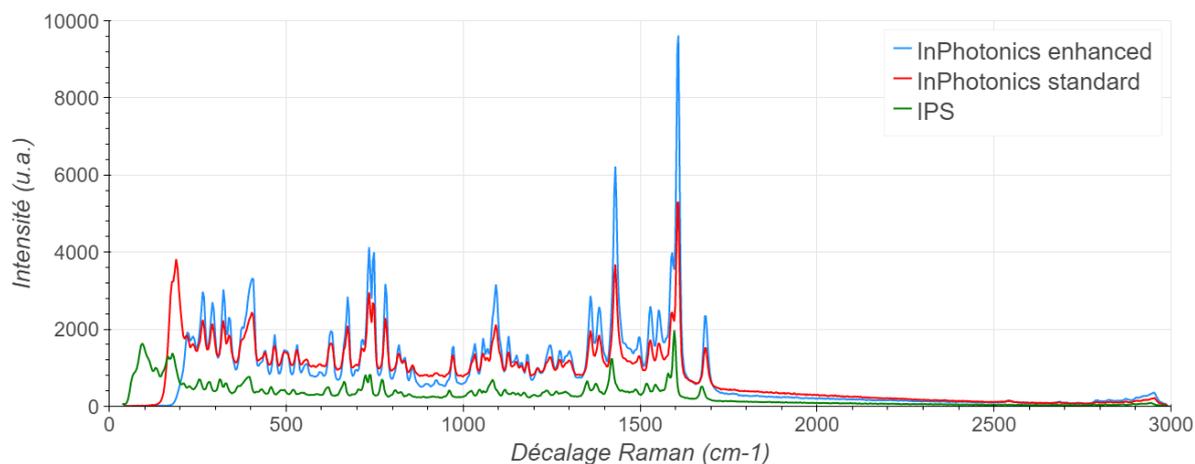


Figure 97 : Spectres Raman d'un échantillon de poudre de Rimonabant (forme II) mesurés avec le spectromètre QEPro+, avec les trois sondes testées (InPhotonics enhanced, InPhotonics standard et IPS) avec un temps d'intégration de 100 ms.

## 5.4. Adaptation à la microfluidique

### 5.4.1. Support de sonde

Afin de pouvoir analyser les cristaux directement dans les gouttes (*in situ*), un support de sonde a été développé et imprimé en 3D en résine grise au CINA M.

Celui-ci, présenté en Figure 98, est composé de deux pièces :

- Une première pièce permet de maintenir la sonde à une position fixe. Cette position peut être ajustée selon  $y$  (Figure 98 haut) afin que la goutte à analyser se trouve à la distance focale de la sonde (ici 7,5 mm), et que l'intensité du signal soit maximisée (cf. Annexe 5).
- La seconde pièce permet de maintenir le capillaire en face du faisceau. Sa position peut être ajustable selon  $z$  (Figure 98 haut). Cela peut être nécessaire selon la position du cristal dans la goutte.

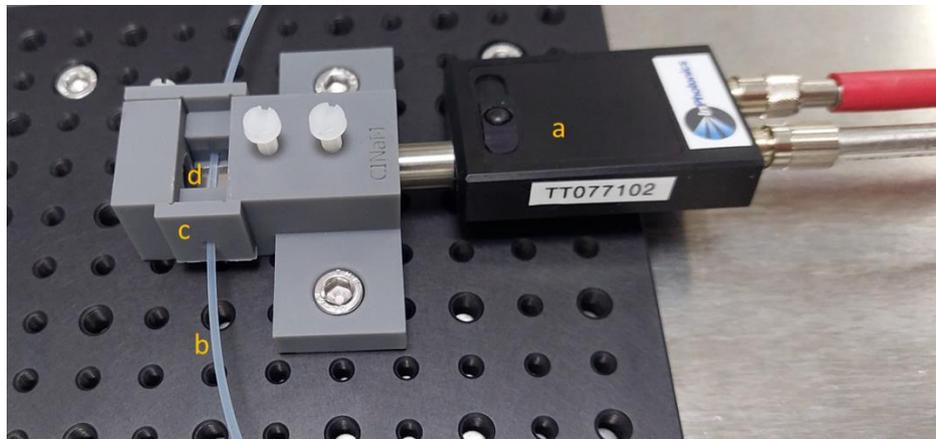
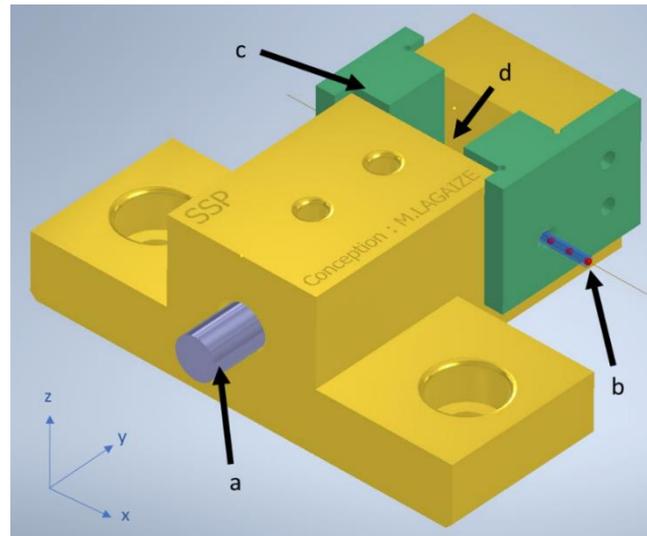


Figure 98 : Support de sonde Raman. La position de la sonde Raman (a) peut être ajustée en Y afin de focaliser le faisceau laser à l'intérieur de la goutte, dans le capillaire (b). Celui-ci est maintenu par une pièce mobile (c) qui permet d'ajuster sa position en Z. Le capillaire est bougé manuellement afin d'ajuster la position en X. Un miroir est fixé au fond de la zone d'observation (d).

La position du capillaire selon x (Figure 98 haut) est ajustée manuellement afin de positionner les gouttes en face du faisceau (Figure 99). Pour cela, le module d'observation décrit précédemment (Partie C - 4) est positionné au-dessus du capillaire. Une surface réfléchissante a été collée au fond de la seconde pièce du support de sonde, afin de faciliter l'observation des gouttes. Pour le positionnement, afin de ne pas saturer le détecteur de la caméra, la sonde est partiellement fermée par un clapet coulissant intégré.

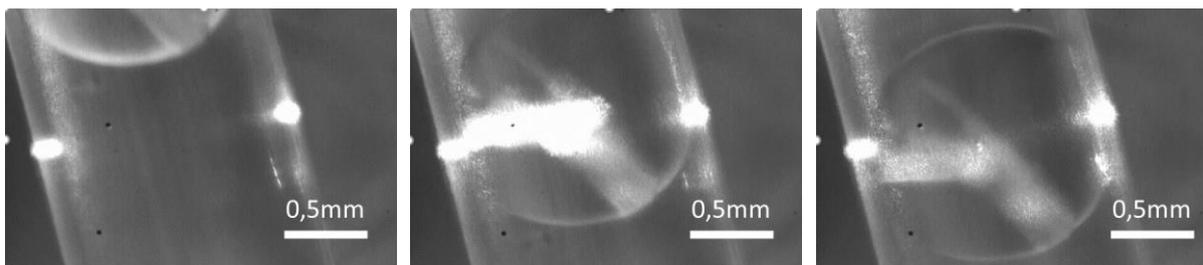


Figure 99 : Positionnement d'un cristal en face du faisceau laser.

## 5.4.2. Choix du capillaire

Comme pour la spectroscopie UV (Partie C – 2.2.3), le choix du matériau utilisé pour le capillaire impacte l'analyse Raman. J'ai acquis les spectres Raman de capillaires en différents types de verre (classique, verre de borosilicate et verre de quartz) et en PFA (0,5 ou 1 mm de diamètres internes et 1,6 mm de diamètre externe) (Figure 100).

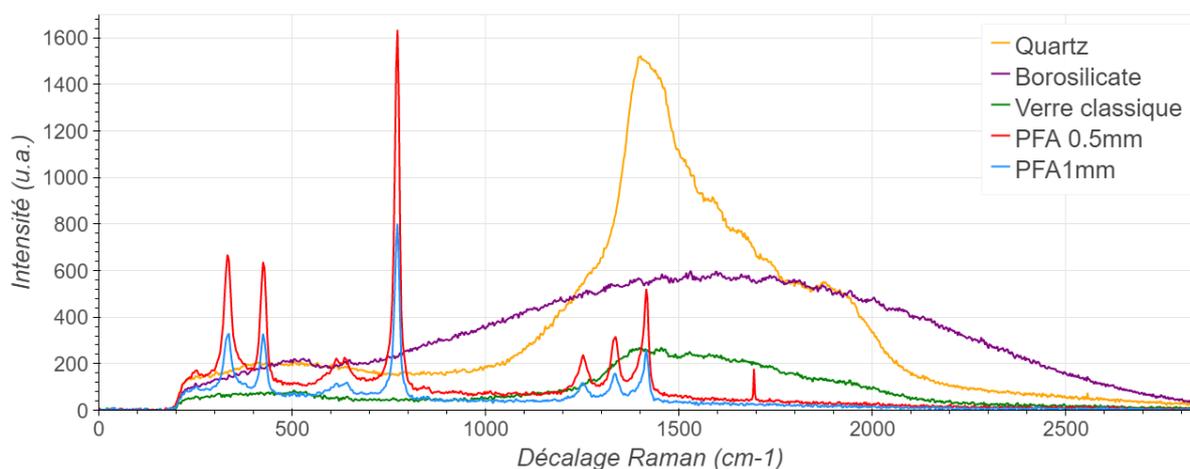


Figure 100 : Spectres Raman de capillaires en verre de quartz, en verre de borosilicate, en verre classique et en PFA de 0,5 mm et 1 mm de diamètres internes mesurés à 785 nm avec le spectromètre QEPro.

Les spectres Raman des différents types de verre (classique, verre de borosilicate et verre de quartz) ne présentent pas de pics définis, mais des halos, ce qui indique que ces matériaux fluorescent sous l'excitation par le laser à 785 nm. Cela rend ces matériaux inappropriés pour l'analyse des gouttes. Au contraire, le PFA présente des pics bien définis, plus intenses dans le cas du capillaire de diamètre interne 0,5 mm dont les parois sont plus épaisses. De ce fait, les capillaires en PFA peuvent être utilisés pour l'analyse des gouttes en spectroscopie Raman, sous réserve que les molécules analysées présentent des pics à d'autres valeurs de décalage Raman que ceux du PFA. Pour cette thèse, j'ai donc utilisé des capillaires en PFA de 1 mm de diamètre interne.

En pratique, pour les molécules étudiées dans cette thèse, les signaux Raman des cristaux analysés présentent des pics qui se distinguent de ceux du PFA. De plus, dans la majorité des cas, le signal Raman du cristal est nettement plus intense que celui du capillaire, celui-ci n'est ainsi pas ou peu visible dans les spectres mesurés.

## 5.5. Preuve de concept de l'analyse Raman

### 5.5.1. Analyse *in situ*

L'objectif de l'implémentation d'un système Raman sur la plateforme microfluidique est de pouvoir analyser les cristaux obtenus lors d'un criblage directement dans les gouttes, à l'intérieur du capillaire (*in situ*).

La Figure 101 présente les spectres Raman d'un capillaire en PFA de 1 mm de diamètre interne, et dans ce capillaire : de l'huile GPL107, d'une goutte d'acétonitrile saturée en Rimonabant et d'une goutte d'acétonitrile contenant un cristal de Rimonabant (forme II). Je les compare également aux références des poudres de Rimonabant (formes I et II).

Sur les spectres de l'huile ainsi que des gouttes d'acétonitrile et d'acétonitrile saturée au Rimonabant, la signature Raman du PFA (vers 300 à 500  $\text{cm}^{-1}$ , 700  $\text{cm}^{-1}$  et 1200 à 1400  $\text{cm}^{-1}$ ) n'est pas visible. Pour la goutte saturée non cristallisée, le signal de l'acétonitrile est intense (notamment vers 900 et 2250  $\text{cm}^{-1}$ ) mais celui du Rimonabant est absent (vers 1100 et 1600  $\text{cm}^{-1}$ ). En revanche, sur le spectre de la goutte contenant un cristal, le signal de l'acétonitrile est faible en intensité (bien qu'il soit toujours présent) en comparaison du signal du cristal de Rimonabant sur l'ensemble du spectre.

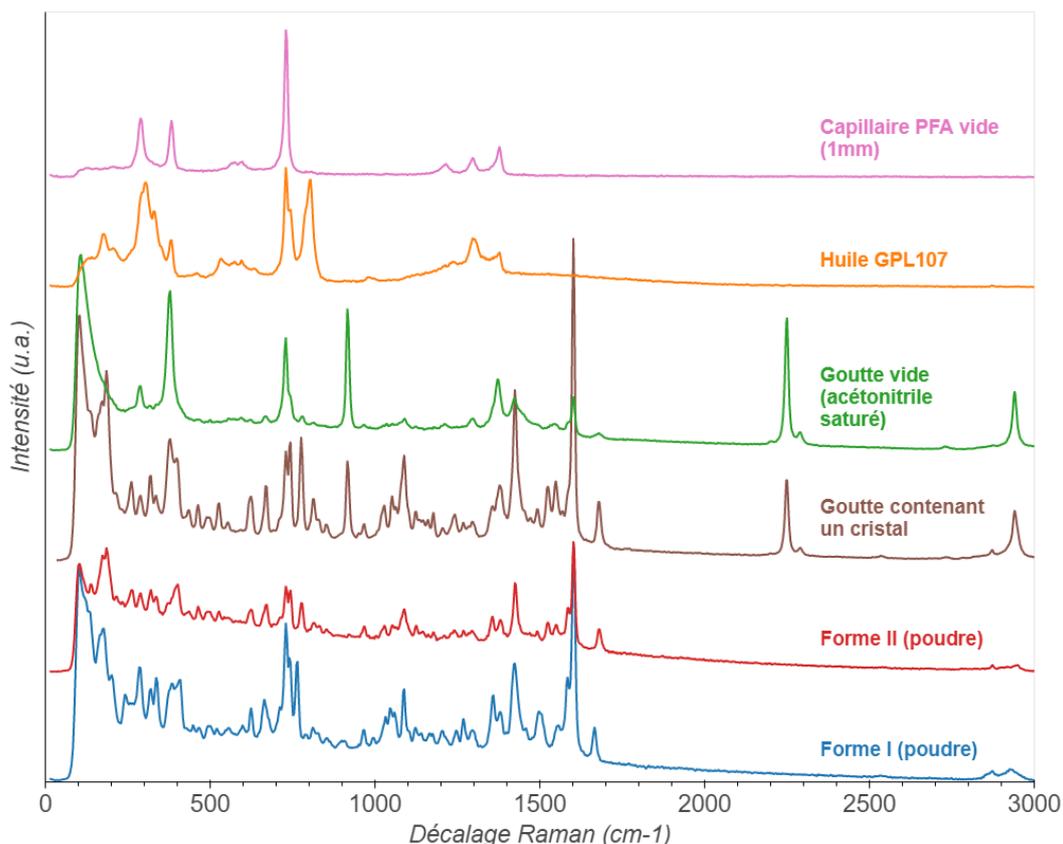


Figure 101 : Spectres Raman d'un capillaire en PFA vide (1 mm ID), de ce capillaire contenant l'huile GPL107, une goutte d'acétonitrile saturée en Rimonabant, une goutte d'acétonitrile contenant un cristal de Rimonabant (forme II) et de références des poudres de Rimonabant (formes I et II).

De plus, les temps d'intégration utilisés pour obtenir ces spectres sont de l'ordre de la centaine de millisecondes. Ainsi, ces mesures permettent de montrer qu'il est possible, avec un faible temps d'intégration, d'analyser directement une phase cristalline dans une goutte entourée d'huile GPL107 et à l'intérieur d'un capillaire en PFA.

### 5.5.2. Distinction de polymorphes *in situ*

Dans le paragraphe précédent, j'ai montré qu'il était possible de caractériser les cristaux *in situ*, c'est à dire directement dans les gouttes à l'intérieur des capillaires. L'objet de ce paragraphe est de montrer que le système de spectroscopie Raman choisi permet bien de distinguer deux phases cristallines entre elles.

La Figure 101 présente les spectres Raman mesurés sur des poudres de formes I et II du Rimonabant. Ces spectres présentent des différences notables, par exemple un décalage du pic à environ  $1660\text{ cm}^{-1}$  pour la forme I et  $1680\text{ cm}^{-1}$  pour la forme II, de même que la présence d'un double pic entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  et  $1520\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre de la forme II. Le système de spectroscopie Raman choisi permet donc bien de distinguer des phases cristallines entre elles sur des analyses de poudre.

Sur cette même figure, j'ai également reporté le spectre du cristal de Rimonabant analysé dans une goutte d'acétonitrile. Nous notons qu'il est facilement comparable aux références mesurées sur les poudres. En effet, la présence du pic à  $1680\text{ cm}^{-1}$ , ainsi que du double pic entre  $1500\text{ cm}^{-1}$  et  $1520\text{ cm}^{-1}$  permet de l'identifier comme étant un cristal de forme II.

En complément, j'ai analysé un plug d'acétonitrile contenant deux cristaux de faciès différents (Figure 102a). Les cristaux ont été obtenus lors du refroidissement à  $30\text{ °C}$  de deux gouttes distinctes d'acétonitrile saturées en Rimonabant à  $60\text{ °C}$ . Les gouttes ont ensuite coalescé lors de la manipulation du capillaire. Pour l'analyse, le laser a été focalisé d'une part seulement sur le cristal de gauche (Figure 102b), d'autre part seulement sur le cristal de droite (Figure 102c). Les spectres correspondants sont représentés en Figure 102d. Le spectre du cristal de gauche correspond au spectre Raman de la forme II du Rimonabant, tandis que le spectre du cristal de droite correspond à la forme I du Rimonabant. Ainsi, en plus de pouvoir mesurer les spectres des cristaux dans des gouttes et de distinguer plusieurs phases cristallines entre elles, je montre également qu'il est possible d'analyser sélectivement différents cristaux dans une même goutte. Dans l'exemple présenté, les cristaux sont relativement gros en taille ( $0,5$  à  $2\text{ mm}$ ), cependant ce constat a également été fait sur des cristaux plus petits (jusqu'à  $0,05\text{ mm}$ ) issus d'une unique goutte.

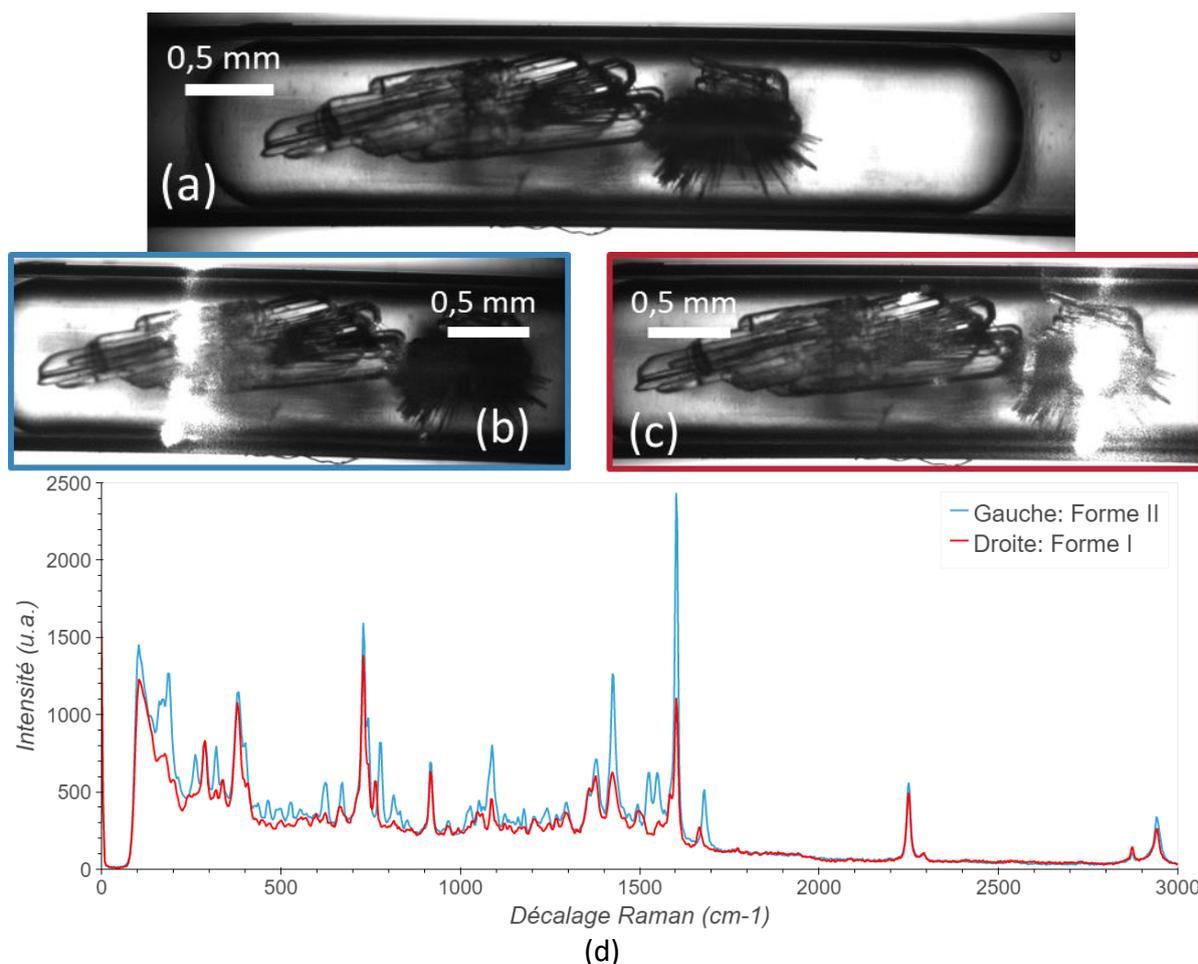


Figure 102 : (a) Plug d'acétonitrile contenant des cristaux de Rimonabant ; (b) Laser focalisé sur le cristal de gauche ; (c) Laser focalisé sur le cristal de droite; (d) Spectres Raman correspondant au cristal de gauche (Forme II) et au cristal de droite (Forme I).

### 5.5.3. Analyse statique d'une série de gouttes (offline)

Lors d'un criblage, des centaines de gouttes sont générées. Chaque goutte est analysée individuellement directement dans le capillaire (*in situ*). Pour cela, je positionne manuellement la goutte, dans le capillaire, devant le faisceau laser. Les gouttes sont statiques dans le capillaire, et le capillaire est fixe lors de l'analyse (analyse *offline*). Un temps d'intégration est défini entre 100 et 500 ms. J'enregistre manuellement les spectres, un par un.

Les spectres Raman de l'ensemble des gouttes sont représentés sur une image (*colormap*) comme celle présentée en Figure 103a pour le Rimonabant dans l'acétonitrile.

## Partie C : Développement de la plateforme

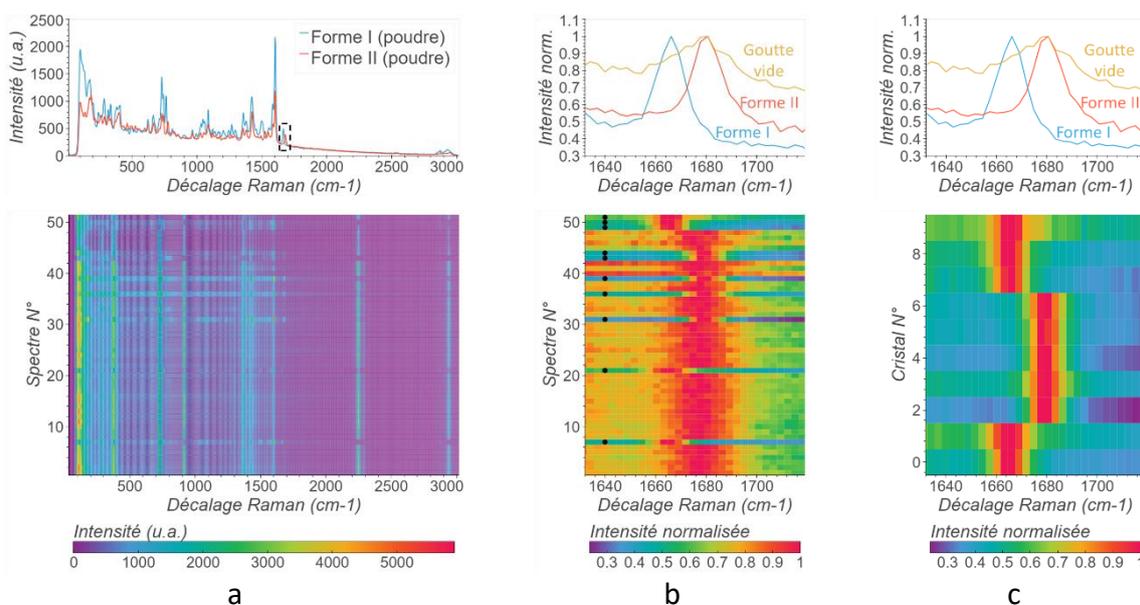


Figure 103 : Spectres Raman des gouttes d'acétonitrile saturées en Rimonabant à 60 °C, et refroidies à 10 °C : (a) haut : Spectres de référence des formes I et II du Rimonabant (à partir des poudres de départ) ; bas : Représentation des spectres de 51 gouttes. (b) and (c) haut : Spectres normalisés entre 1630 et 1730  $\text{cm}^{-1}$  des références des formes I et II du Rimonabant et d'une goutte saturée ne contenant pas de cristaux. (b) bas : Représentation des spectres normalisés de 51 gouttes entre 1630 et 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Les points noirs indiquent les gouttes contenant un cristal. (c) bas : Représentations des spectres normalisés entre 1630 et 1730  $\text{cm}^{-1}$  des 10 gouttes contenant un cristal.

J'ai mis en place un procédé de traitement des spectres en plusieurs étapes :

- J'identifie d'abord les gouttes contenant un cristal et les gouttes vides. Pour cela, je choisis une zone de décalages Raman. Cette zone doit inclure au moins un pic, de préférence unique, correspondant à un cristal, et éviter les signaux du capillaire, de l'huile et du solvant. Sur la Figure 103a (et Figure 102d), pour le Rimonabant, le pic à 1650-1680  $\text{cm}^{-1}$  répond à ces critères. J'ai donc choisi une zone comprise entre 1630 et 1730  $\text{cm}^{-1}$ .
- Je normalise l'intensité du signal Raman par le maximum d'intensité sur cette zone (Figure 103b). Ainsi, si la goutte contient un cristal, le signal contient un pic, et la valeur du signal normalisé vaut 1 au sommet du pic et tend vers 0 en s'en éloignant. Au contraire, si le signal normalisé est proche de 1 sur toute la zone, cela signifie que la goutte est vide.
- Je choisis un décalage Raman en dehors du pic, par exemple 1640  $\text{cm}^{-1}$  sur la Figure 103b. A ce décalage, le signal normalisé sera proche de 0 si la goutte contient un cristal ou il sera proche de 1 si la goutte n'en contient pas. Je fixe alors une valeur seuil d'intensité normalisée (ici 0,7), afin de définir si la goutte contient un cristal. Sur la Figure 103b, les gouttes contenant un cristal sont indiquées par un point noir à 1640  $\text{cm}^{-1}$ .
- Enfin, j'identifie les différentes phases cristallines dans les gouttes contenant des cristaux, en comparant les pics sur une ou plusieurs zones (définies comme ci-dessus). Sur la Figure 103c, les formes I et II du Rimonabant peuvent facilement être identifiées

sur la zone entre 1630 et 1730  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres possédant un pic à 1660  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la forme I tandis que les spectres avec un pic à 1680  $\text{cm}^{-1}$  correspondent à la forme II.

Pour les molécules avec plus de deux phases, comme le Sulfathiazole, la comparaison des pics nécessite plusieurs zones.

De plus, les zones d'analyses sont définies pour chaque solvant, et peuvent ainsi changer pour un même produit.

Une attention spéciale doit être portée pour la sélection des zones lorsque les cristaux sont de petite taille ou localisés à l'interface goutte/huile. En effet, dans ce cas, le signal Raman du cristal peut être faible en comparaison du signal du solvant et/ou de l'huile, ce qui peut rendre son interprétation difficile.

Pour l'identification des formes, les spectres peuvent être comparés aux spectres de références connues. L'analyse Raman peut également être complétée par une analyse DRX après extraction des cristaux des gouttes (Partie B – 3.5).

Dans cette thèse, les spectres Raman de référence pour le Rimonabant ont été mesurés à partir des poudres de formes I et II. Pour le Sulfathiazole, les spectres Raman obtenus ont été comparés à la littérature [7], [56], [72].

#### **5.5.4. Analyse dynamique d'une série de gouttes (*online*)**

Des mesures complémentaires ont également été faites sur un capillaire de Rimonabant dans l'acétonitrile afin d'étudier la possibilité de réaliser des mesures Raman dynamiques, c'est-à-dire sur des gouttes en mouvement (*online*). Pour cela, je tire le capillaire lentement et manuellement devant le laser. Une fréquence d'acquisition est définie, ainsi qu'un nombre de spectres maximum ou une durée d'acquisition maximum afin de limiter le nombre de spectres enregistrés.

Cependant, cette méthode présente plusieurs inconvénients :

- La vitesse de tirage du capillaire n'est pas régulière car manuelle. Un système adapté doit être développé pour tirer le capillaire de façon constante et continue. Cependant, cela n'a pas été exploré pendant cette thèse.
- Au vu du nombre de spectres enregistrés, il est difficile de réaliser le procédé de traitement comme décrit précédemment. Cependant, une partie de ces spectres concerne les volumes d'huile entre les gouttes et sont donc inutiles à traiter. Afin de sélectionner les spectres qui concernent uniquement les gouttes, j'ai alors envisagé un couplage avec la spectroscopie UV afin de détecter les gouttes. Pour cela, j'ai conçu un support (Figure 104) permettant de maintenir à la fois les fibres optiques, pour l'UV (Figure 104a) autour du capillaire (Figure 104b), et la sonde Raman (Figure 104c et d). Je l'ai imprimée en 3D en résine grise. Cependant, l'instabilité du tirage du capillaire a rendu le signal UV inexploitable pour poursuivre l'étude ici. Une fois le tirage corrigé, il pourrait également être judicieux d'utiliser un déclencheur d'acquisition, qui

permettrait de n'enregistrer que les spectres des gouttes détectées en UV, et ainsi réduire la quantité de données générées.

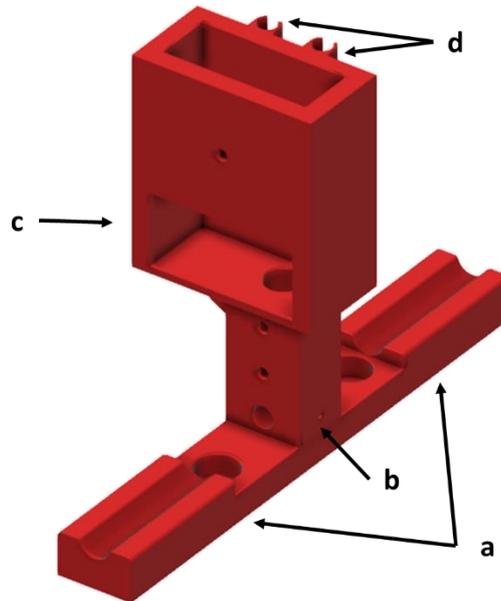


Figure 104 : Support UV-Raman imprimé au CINA M. (a) Supports de fibres optiques pour l'UV. (b) Capillaire. (c) Support de sonde Raman. (d) Attaches pour les fibres optiques de la sonde Raman.

- Cette technique d'analyse dynamique ne permet pas de positionner chaque cristal devant le laser individuellement. Ainsi, pour des petits cristaux notamment, le risque est que seul le solvant soit analysé, et non le cristal, ce qui engendrerait une perte d'information non acceptable.

Une optimisation globale du système doit donc être mise en place afin de faciliter l'analyse des gouttes en dynamique (*online*). Cela sort du cadre de cette thèse et ne sera donc pas approfondi ici. Ainsi, seule l'analyse statique (*offline*) a été utilisée pour cette thèse.

## 6. Une plateforme modulaire

Je présente ici l'aboutissement de cette partie C, c'est-à-dire la construction de la plateforme microfluidique complète modulaire pour étudier la cristallisation (Figure 105). Un des objectifs de la thèse étant de développer une plateforme transposable et facilement utilisable pour le criblage de polymorphe, l'ensemble des composants décrits précédemment a été regroupé sous forme de modules interchangeables. Ceux-ci sont posés sur des plaques d'aluminium et inclus sur une structure en profilés d'aluminium (Minitec) modulable selon les besoins de l'utilisateur. Les pièces UV et Raman sont fixées sur les plaques en aluminium par l'intermédiaire de plaques optiques (Thorlabs). L'ensemble optique (objectif et caméra) monté sur les platines motorisées est fixé sur un chariot mobile afin de pouvoir observer différents endroits de la plateforme.

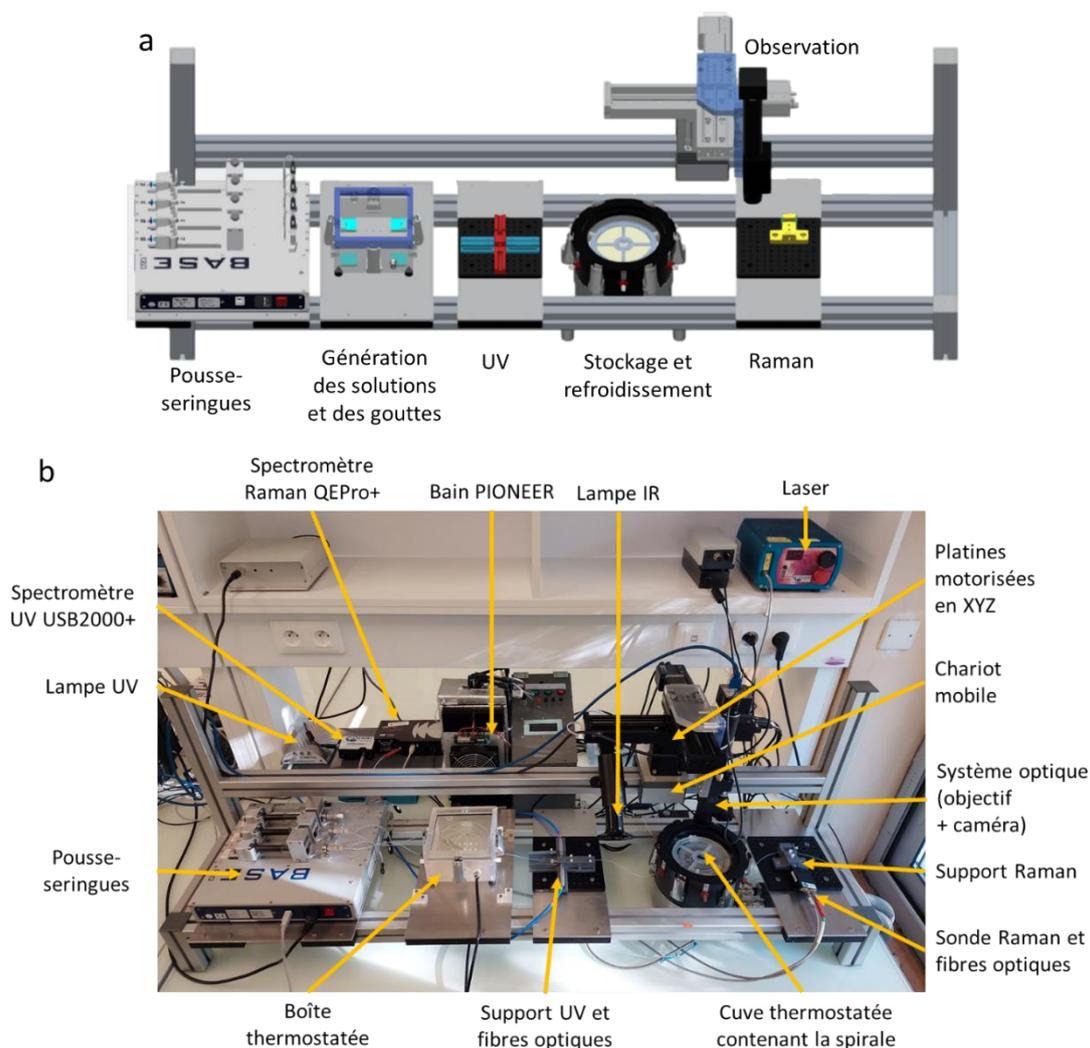


Figure 105 : (a) Schéma de la plateforme microfluidique avec les différents modules : pousse seringues, génération des solutions et des gouttes, caractérisation UV, stockage et refroidissement des gouttes, module d'observation et caractérisation Raman. (b) Photo de la plateforme présentant les différents éléments.

## Conclusion

Dans cette partie, j'ai présenté le travail de développement et de mise au point de la plateforme microfluidique. Celle-ci est composée de différents modules interchangeables.

Tout d'abord, des améliorations ont été apportées au module déjà existant de génération des solutions et des gouttes. Une nouvelle boîte thermostatée imprimée en 3D a été conçue afin de faciliter les manipulations. J'ai également proposé l'utilisation d'une colonne HPLC pour contenir le lit de poudre afin de faciliter le remplissage et éviter le bouchage du circuit. Enfin, j'ai montré que l'ajout d'un régulateur de contre-pression (BPR) permettait de supprimer les phénomènes de cavitation liés à la variation de pression dans les capillaires, qui perturbaient les flux de solutions et de gouttes.

Dans un deuxième temps, j'ai travaillé sur le module de caractérisation UV, déjà existant également, afin d'optimiser le signal mesuré. J'ai également complété le support de fibres optiques afin de protéger les capillaires en quartz préconisés pour les mesures de solubilité.

Ensuite, j'ai mis en place un nouveau système de stockage et refroidissement des gouttes. Celles-ci sont stockées dans un capillaire enroulé en spirale, et maintenu sur un support imprimé en 3D et optimisé pour l'observation des gouttes. Un travail important a été fait sur la régulation en température à l'intérieur de la cuve de stockage. Il est ainsi possible d'effectuer tous les types de profils de température, à la fois lents (rampes) et rapides (trempes, < 5 min). Le module développé au CINaM a été simplifié pour son implémentation sur la plateforme de Sanofi, pour qu'il puisse être utilisé en routine.

En parallèle, le système d'observation des gouttes a été développé afin d'automatiser la prise de photos, en réduisant le temps de manipulation de plusieurs heures à quelques minutes. Le système permet ainsi d'observer une zone entière contenant l'ensemble des gouttes au cours du temps lors d'un refroidissement. Une image globale est reconstruite sur Python pour chaque cycle de photos, pris à différents instants lors du procédé de cristallisation, ce qui permet de suivre le phénomène de nucléation dans les gouttes au cours du temps et en fonction de la température, et d'effectuer des statistiques globales (toutes phases confondues) sur l'apparition des cristaux.

Enfin, le dernier module ajouté lors de cette thèse est le module de caractérisation Raman des solides obtenus. J'ai choisi un système Raman à fibres optiques parmi différentes solutions commerciales, dont 4 que j'ai testées. J'ai ainsi choisi la combinaison laser-sonde-spectromètre permettant d'obtenir le meilleur signal lors de l'analyse de cristaux dans des gouttes, à l'intérieur d'un capillaire. Je l'ai ensuite adapté à la plateforme microfluidique avec notamment la fabrication d'un support de sonde permettant d'aligner les cristaux au faisceau laser. Ce nouveau module permet ainsi de caractériser directement les cristaux dans les gouttes (*in situ*) et de distinguer deux polymorphes l'un de l'autre. L'analyse statique (*offline*) de séries de gouttes permet ainsi de compléter les statistiques globales de nucléation par des statistiques d'apparition phase par phase des cristaux.

## Partie C : Développement de la plateforme

La plateforme modulable ainsi construite a été implémentée en industrie sur le site Sanofi R&D de Vitry-sur-Seine afin d'être utilisée en routine pour les mesures de solubilité et le criblage de l'état solide des nouvelles molécules en développement.

---

## Partie D : Résultats – Discussion

---

*Cette partie présente différents résultats obtenus dans le cadre de la thèse :*

*- Le premier chapitre est consacré à la génération des gouttes et à la comparaison de nos systèmes avec le modèle proposé par Zhang [35] utilisant le nombre capillaire. Pour cela, j'ai mesuré les énergies interfaciales dans différents milieux, ainsi que les tailles et fréquences des gouttes générées. Enfin, l'étude originale de l'ajout d'un non-solvant est présentée dans différentes géométries de génération des gouttes.*

*- Dans le deuxième chapitre, l'objectif est de montrer que la méthode de mesure de la solubilité développée au laboratoire [7] est applicable dans des cas faisant intervenir différentes phases cristallines. Pour cela, j'ai mesuré la solubilité de différentes formes, stables et métastables, de molécules pharmaceutiques (Irbesartan, Rimonabant et Aripiprazole) dans des solvants organiques et aqueux.*

*- Enfin, les troisième et quatrième chapitres décrivent des criblages de phases (polymorphes) en microfluidique, avec à la fois des statistiques globales de nucléation (toutes phases confondues) et des statistiques sur chacune des phases cristallines obtenues, en comparant notamment l'influence du profil de refroidissement utilisé.*

# 1. Génération des gouttes

## 1.1. Mesure des énergies interfaciales

Pour la génération des gouttes, il a été montré que l'énergie interfaciale  $\gamma_{CD}$  entre le fluide dispersé (D) et le fluide continu (C) est un paramètre important, intervenant dans le nombre capillaire Ca (Partie 1 – 2.2.1, équation (24)).

Les mesures de  $\gamma_{CD}$  pour différents couples de fluides ont été réalisées à 20 °C par la méthode de la goutte pendante décrite précédemment (Partie B – 4.1).

Les valeurs mesurées sont représentées sur la Figure 106.

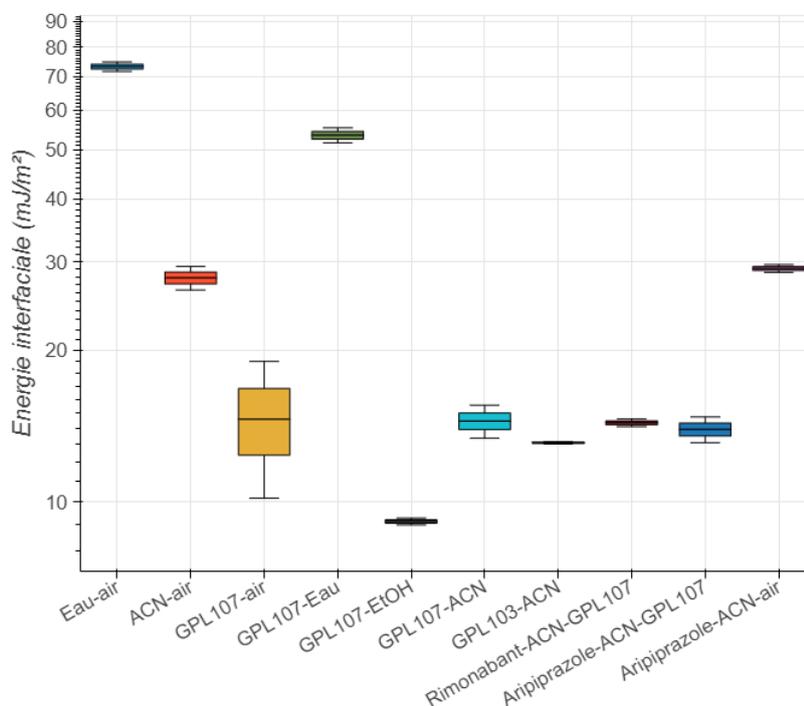


Figure 106 : Energies interfaciales mesurées pour l'eau, l'acétonitrile (ACN) et l'huile GPL107 avec l'air, pour l'huile GPL avec l'eau, l'éthanol (EtOH), l'acétonitrile (ACN), une solution d'acétonitrile saturée en Rimonabant et une solution d'acétonitrile saturée en Aripiprazole. Energie interfaciale mesurée pour l'huile GPL103 dans l'acétonitrile, et pour une solution d'acétonitrile saturée en Aripiprazole avec l'air. Les boîtes représentent l'ensemble des données mesurées pour chaque couple. La barre centrale correspond à la valeur médiane, le haut et le bas de la boîte aux 25<sup>ème</sup> et 75<sup>ème</sup> quantiles et les lignes extérieures s'étendent entre la valeur minimale et la valeur maximale mesurées.

Nous remarquons que les valeurs de  $\gamma_{CD}$  entre l'huile GPL107 et différents solvants se classent par ordre décroissant avec l'eau, l'air, l'acétonitrile et l'éthanol (Figure 106). On note que la mesure de l'énergie interfaciale entre l'huile GPL107 et l'air est très approximative. Cela est dû à la viscosité élevée de l'huile qui empêche la formation contrôlée d'une goutte pendante dans l'air et complique donc la mesure. Avec l'acétonitrile, les huiles GPL107 et

GPL103 ont des  $\gamma_{CD}$  proches. Cette mesure permet de mettre en évidence que bien que ces huiles aient des viscosités très différentes (82 cSt pour la GPL103 contre 1535 cSt pour la GPL107 à 20°C), cela n'affecte pas l'énergie interfaciale, ce qui permet d'étudier l'effet de la viscosité sur la génération des gouttes, en utilisant les différentes huiles de cette gamme (GPL100 à GPL107, Krytox).

Afin de vérifier l'effet de l'ajout d'un produit dans un solvant sur le  $\gamma_{CD}$  avec l'huile, une solution d'acétonitrile saturée en Rimonabant a été préparée par prélèvement du surnageant d'une suspension de Rimonabant à 20 °C, soit à une concentration d'environ 20 mg/mL. Sur la Figure 106, on constate que l'ajout du Rimonabant dans l'acétonitrile n'a pas d'effet à 20 °C sur  $\gamma_{CD}$  avec l'huile GPL107. Le Rimonabant n'a donc pas d'effet tensioactif dans ces conditions.

J'ai également fait la mesure pour une solution saturée à 20 °C d'Aripiprazole dans l'acétonitrile. Sur la Figure 106 on observe qu'il n'y a pas de différence significative pour les mesures d'énergies interfaciales avec l'huile GPL107 et avec l'air. Cependant, après la génération des gouttes saturées à haute température, et leur refroidissement, celles-ci se rapprochent jusqu'à se coller (Figure 107a), mais ne coalescent pas, puis s'allongent (Figure 107b). Ce phénomène a été observé dans tous les solvants testés avec l'Aripiprazole (acétonitrile, eau, 1-butanol, 2-propanol et DMSO). On suppose donc que l'Aripiprazole est à l'origine d'un « effet tensioactif » lorsqu'il est suffisamment concentré. Afin de mettre en évidence cet effet, il faudrait effectuer une mesure d'énergie interfaciale à haute température entre une solution concentrée (saturée à haute température) et l'huile GPL107. Cependant, une telle mesure à haute température est délicate et n'est pas possible avec le dispositif disponible au laboratoire.

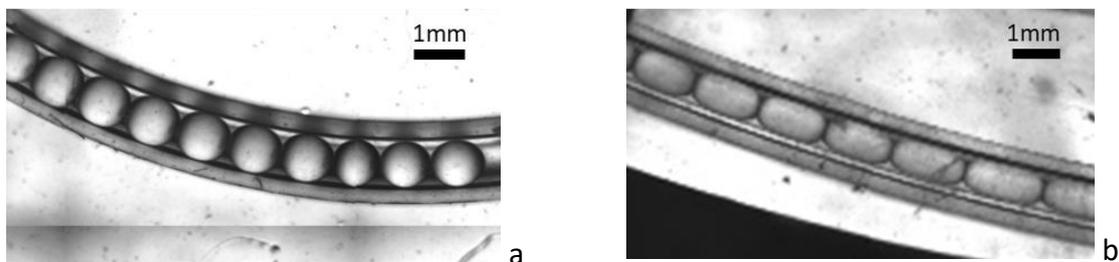


Figure 107 : Gouttes d'acétonitrile saturées en Aripiprazole à 60 °C et refroidies à 10 °C.

## 1.2. Génération des gouttes

Chaque goutte représentant un nanocristalloir indépendant, il est nécessaire de générer des gouttes régulières en taille afin de pouvoir comparer les résultats obtenus dans chacune d'elles et ainsi faire des statistiques sur la nucléation. Zhang [35] a proposé un modèle permettant de relier la taille et la fréquence des gouttes au nombre capillaire  $Ca$ , défini par les propriétés des fluides (Partie 1 – 2.2.1, équation (24)). Ce modèle a été proposé pour des gouttes d'éthanol dans une huile FC-70 à température ambiante dans une géométrie en T, à partir d'images prises lors de la génération des gouttes.

Dans cette partie, nous décrivons les tailles et fréquences mesurées à partir du signal UV afin de vérifier le modèle proposé par Zhang à différentes températures (20, 40, 50 et 60 °C) et en utilisant différentes géométries, sur un système Acétonitrile – huile GPL107. Dans un deuxième temps, nous présenterons des mesures de taille et fréquence de gouttes lors de l’ajout d’eau dans le système acétonitrile-huile GPL107, en utilisant différentes géométries.

### 1.2.1. Analyse des tailles et des fréquences

Afin de vérifier le modèle proposé par Zhang [35] (Partie A – 2.2.2.3) pour relier la taille et la fréquence des gouttes à Ca dans le cas de l’acétonitrile et de l’huile GPL107, des gouttes d’acétonitrile seul ou d’acétonitrile saturées en Rimonabant ont été générées avec différents débits à 20 °C. Les tailles et les fréquences ont été déterminées à partir du signal UV enregistré au cours du temps lors du passage des gouttes, comme décrit précédemment (Partie B – 4.3.2). Des gouttes ont été générées à 20 °C, soit dans une géométrie simple avec une unique jonction T (Figure 108a), soit dans une géométrie « en Y » (Figure 108b), avec deux flux de solvant arrivant avec des angles à 60° de part et d’autre du flux d’huile, dans une jonction multiports.

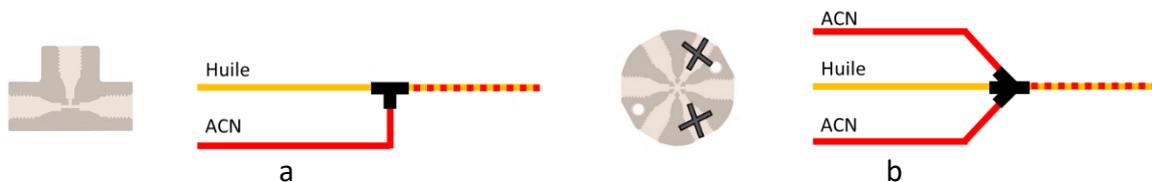


Figure 108 : Schéma du montage pour la génération des gouttes (a) dans une jonction T et (b) dans une jonction multiport avec une géométrie « en Y ». Le port vertical de la jonction multiport n’est pas représenté mais il est bouché, de même que les ports marqués d’une croix.

Les capillaires utilisés pour ces mesures ont un diamètre interne  $W$  de 1 mm. Les vitesses totales  $v_{tot}$  sont calculées à partir des débits par l’équation (20) (Partie A – 2.2.).

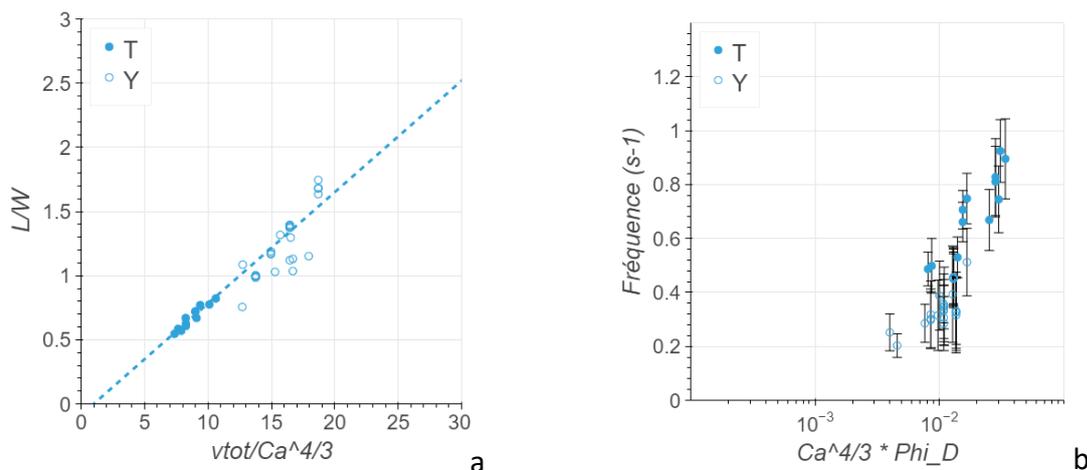


Figure 109 : (a) Tailles ( $L/W$ , avec  $W=1$  mm) et (b) fréquences des gouttes mesurées sur des gouttes d’acétonitrile (seul ou saturé en Rimonabant) mesurées à différentes températures. Les points pleins correspondent à une géométrie classique en T simple, les points vides correspondent à une géométrie en Y avec deux flux d’acétonitrile. Les barres d’erreur horizontales et verticales sur

(a), et horizontales sur (b) sont inférieures ou égales à la taille des points. L'erreur verticale sur (b) a été calculée à partir des déviations standard sur les fréquences des gouttes pour chaque série de mesure (représentée par un unique point).

Pour les deux géométries, les longueurs obtenues à 20 °C semblent bien suivre le modèle proposé (Figure 109a), avec le rapport  $L/W$  proportionnel au rapport  $\frac{V_{tot}}{Ca^{4/3}}$ , avec un coefficient propre au couple huile GPL107-acétonitrile. Les valeurs des fréquences obtenues à 20 °C sont assez regroupées mais il n'est pas possible de conclure avec certitude sur le fait qu'elles suivent ou non l'allure exponentielle proposée par le modèle (Figure 109b) pour les conditions testées.

Comme lors d'un criblage, les gouttes sont d'abord générées à haute température pour créer la sursaturation par refroidissement, les gouttes ont également été observées à plus hautes températures (40 °C, 50 °C et 60 °C). Les conditions de débits sont adaptées selon le solvant et la température. Cependant, les  $\gamma_{CD}$  n'étant pas connues à ces températures, les valeurs de  $Ca$  ne peuvent pas être calculées et les mesures de tailles et de fréquences ne peuvent pas être comparées au modèle. J'ai cependant constaté qu'à haute température, il fallait généralement utiliser un ratio  $Q_D/Q_C$  plus faible, et un débit total plus élevé qu'à 20 °C.

## 1.2.2. Ajout d'un non-solvant dans les gouttes

Un autre moyen pour sursaturer les gouttes consiste en l'ajout d'un non-solvant. En effet, cela diminue la solubilité du soluté dans le solvant, ce qui peut provoquer la nucléation des cristaux dans les gouttes. Afin d'étudier l'ajout d'un non-solvant dans des gouttes, différentes géométries ont été étudiées pour ajouter dans les gouttes d'acétonitrile, soit de l'eau pure, soit un mélange 50/50 d'eau/acétonitrile.

### 1.2.2.1. Géométrie en T

La première configuration testée utilise deux jonctions en T. Les gouttes d'acétonitrile sont générées dans une première jonction T1, puis l'eau ou un mélange eau/acétonitrile sont injectés dans les gouttes avec une seconde jonction T2 (Figure 110).

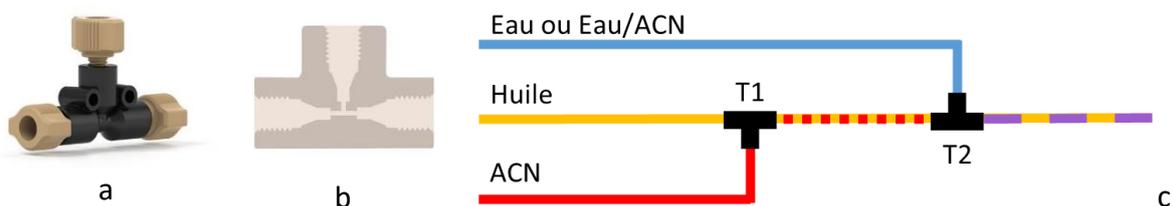


Figure 110 : (a) Photo d'une jonction T. (b) Schéma de l'intérieur d'une jonction T. (c) Schéma du montage pour l'ajout d'un non-solvant avec géométrie en double T (T1 et T2).

Cependant, les débits ainsi que les propriétés hydrodynamiques des fluides doivent être bien adaptés afin que l'anti-solvant remplisse bien les gouttes en T2. Dans le cas de l'ajout de l'eau ou du mélange eau/acétonitrile dans les gouttes d'acétonitrile, de nombreux débits ont été testés, mais les gouttes générées restent irrégulières. En effet, il semble que des gouttes d'anti-solvant se forment entre les gouttes d'acétonitrile, et coalescent ensuite avec elles

(Figure 111). Ce type de géométrie est donc inadapté, et nous choisissons l'alternative d'ajouter de l'eau directement lors de la génération des gouttes grâce à une jonction en croix.

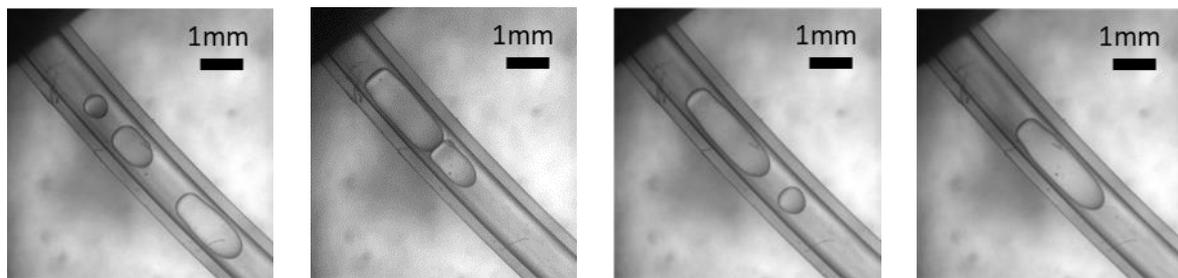


Figure 111 : Gouttes obtenues en sortie de la seconde jonction T pour différents débits.

### 1.2.2.2. Géométrie en croix

J'ai utilisé une jonction en croix afin de générer des gouttes en ajoutant directement le non-solvant lors de la génération des gouttes (Figure 112).

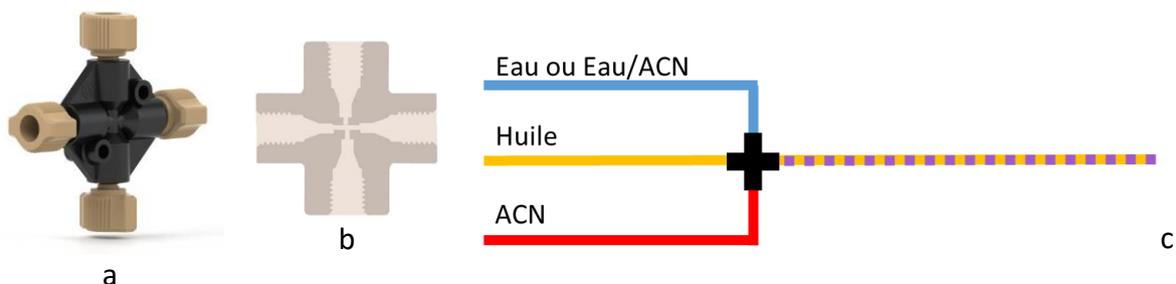


Figure 112 : (a) Photo d'une jonction en croix. (b) Schéma de l'intérieur d'une jonction en croix. (c) Schéma du montage pour l'ajout d'un non-solvant avec géométrie en croix.

Avec cette géométrie, des gouttes plus régulières ont pu être formées. Cependant, comme le montre l'intensité transmise en UV à travers les gouttes au cours du temps (Figure 113a), des trains de gouttes régulières sont séparés par des plugs (signal de décrochage). Ces plugs sont observés régulièrement dans le capillaire (Figure 113b). Cela indique que toutes les gouttes formées n'ont pas la même  $\gamma_{CD}$  et donc pas la même composition. On peut supposer que des gouttes d'anti-solvant se forment entre les gouttes d'acétonitrile et coalescent, ou forment directement des plugs.

J'ai mis ce phénomène en évidence par ajout d'un colorant dans l'eau. Sur la Figure 113c, on observe clairement que certaines gouttes sont colorées (gouttes d'eau seule), et d'autres incolores (gouttes d'acétonitrile seul). Ainsi, le mélange d'eau et d'acétonitrile ne se fait pas toujours dans la jonction en croix. De ce fait, cette géométrie en croix ne sera pas non plus utilisée. Une alternative est l'utilisation d'une géométrie en Y, permettant d'injecter l'acétonitrile et l'eau avec un angle donné, différent de 90 °C, de part et d'autre du flux d'huile afin que leurs flux ne soient pas en face l'un de l'autre.

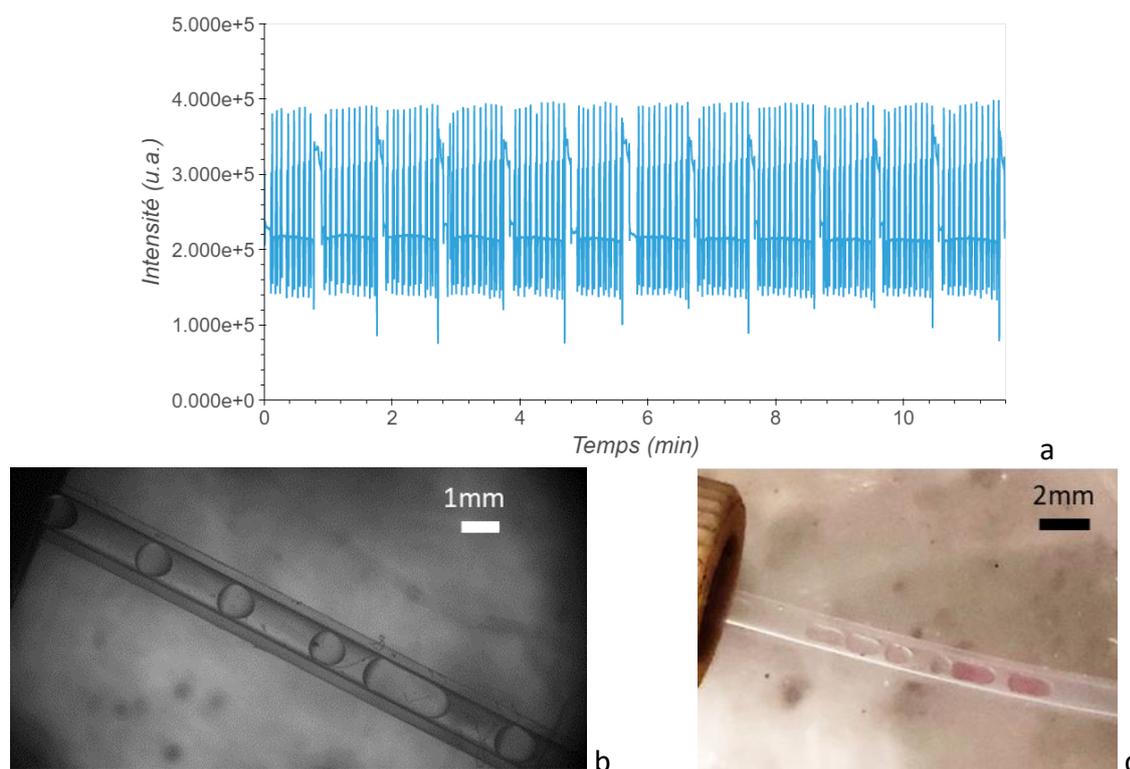


Figure 113 : (a) Signal UV au cours du temps lors du passage des gouttes générées avec une géométrie en croix. (b) et (c) Gouttes observées en sortie de la jonction en croix. Sur (c), les gouttes rouges sont des gouttes d'eau et les gouttes incolores sont des gouttes d'acétonitrile.

### 1.2.2.3. Géométrie en Y (jonction multiports)

Afin de favoriser la formation de gouttes contenant le mélange de l'acétonitrile et de l'eau, j'ai utilisé une jonction multiports pour injecter les deux fluides avec des angle de 60° autour de l'huile (Figure 114a). Ici, il s'agit d'une jonction à sept ports (six horizontaux et un vertical), dont trois ports ont été bouchés car non utilisés (2 horizontaux et le vertical), de sorte que le port de sortie soit dans le prolongement du flux d'huile (Figure 114b).

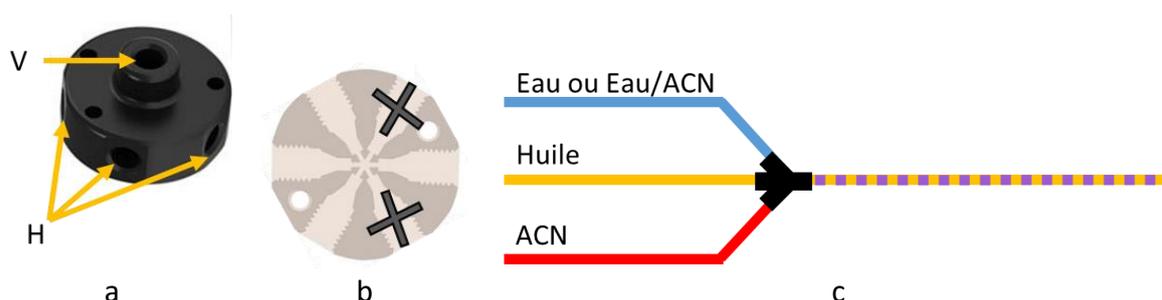


Figure 114 : (a) Photo d'une jonction 7 ports (1 vertical V et 6 horizontaux H). (b) Schéma des 6 ports horizontaux de la jonction 7 ports. Le port vertical n'est pas représenté mais il est bouché, de même que les ports marqués d'une croix. (c) Schéma du montage pour l'ajout d'un non-solvant avec géométrie en Y.

Dans ce cas-là, la formation de gouttes régulières a été possible, et ce pour différents débits. J'ai également contrôlé visuellement la composition des gouttes par l'ajout d'un

colorant rouge dans l'eau. Sur la Figure 115b et c, des gouttes ont été générées avec respectivement 50% d'eau et 75% d'eau. On voit une nette différence de coloration entre ces deux types de gouttes. De plus, la coloration semble homogène à l'intérieur des gouttes, ce qui indique que le mélange entre l'eau et l'acétonitrile se fait rapidement. Cette géométrie paraît ainsi la plus adaptée pour ajouter un anti-solvant dans les gouttes.

J'ai également observé qu'il était en général plus facile de générer des gouttes en utilisant un mélange eau/acétonitrile que de l'eau seule, pour laquelle certains débits ne permettent pas d'obtenir des gouttes régulières. Cela pourrait s'expliquer par la différence de  $\gamma_{CD}$  entre l'eau et l'acétonitrile avec l'huile GPL107. Gerard et al. [27] ont également observé cela pour l'huile FC-70 avec différents solvants, en concluant que l'énergie interfaciale du mélange solvant-eau devait être supérieure à 15-20 mJ/m<sup>2</sup> afin d'éviter la coalescence et ainsi permettre la génération de gouttes régulières et stables, sans l'utilisation de tensioactifs.

Dans cette partie sur l'ajout d'un non-solvant, nous avons donc trouvé une géométrie pour obtenir des gouttes régulières et homogènes en composition en remplaçant l'eau pure comme non solvant par un mélange eau/acétonitrile. Cela permet également d'ajouter de faibles proportions d'eau sans utiliser un débit de non-solvant trop faible par rapport à celui de la solution saturée, ce qui pourrait gêner la génération. De plus, on évite ainsi d'atteindre la limite basse des pousse-seringues (0,1 $\mu$ L/s pour des seringues de 10 mL sur le pousse seringue Nemesys utilisé). Cependant, l'utilisation d'un mélange eau/acétonitrile implique une dilution supplémentaire des gouttes (due à la présence d'acétonitrile), ce qui n'est pas toujours souhaité car cela réduit la sursaturation. Enfin, la méthode de cristallisation par ajout d'un non-solvant peut également être couplée à une variation de température permettant d'augmenter la sursaturation.

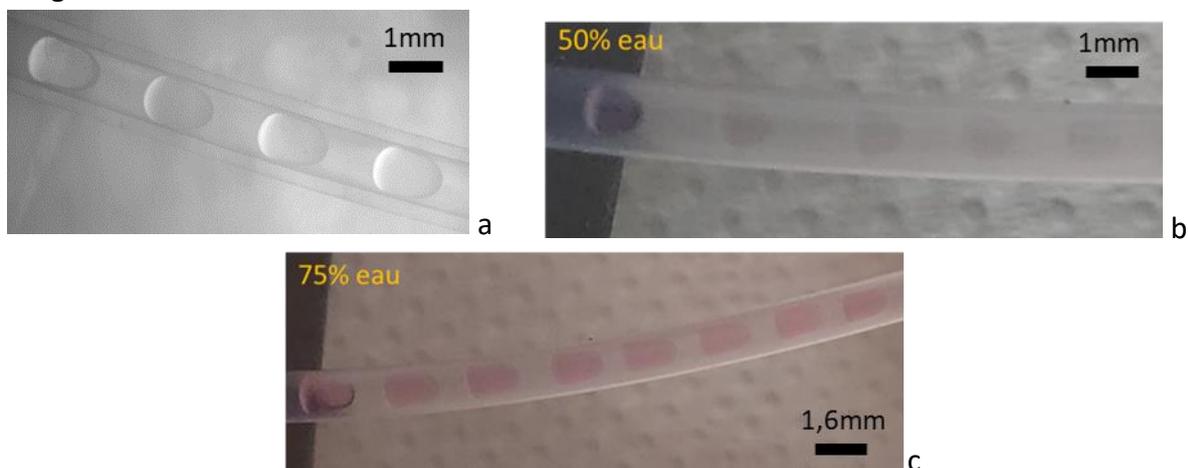


Figure 115 : Gouttes d'eau/acétonitrile obtenues en sortie d'une jonction multiport. (b) Gouttes contenant 50% d'eau colorée en rouge. (c) Gouttes contenant 75% d'eau colorée en rouge.

## 2. Mesures de solubilité

La solubilité d'une poudre de principe actif dépend du solvant utilisé pour la dissoudre, de la température mais également de la phase cristalline de la poudre. En effet, deux polymorphes d'un même principe actif ont des solubilités différentes. A pression constante, entre deux polymorphes, le plus stable est celui dont la solubilité est la plus basse, sur toute la gamme de température (système monotrope) ou sur une gamme de températures (système énantiotrope). La mesure de solubilité est donc couramment utilisée pour étudier les stabilités relatives des différentes phases d'un système. Au cours du développement du procédé de cristallisation, la connaissance du diagramme de phase est également nécessaire afin de déterminer les conditions opératoires. Dans notre cas, la mesure de solubilité permet également d'avoir une idée de la concentration des gouttes lorsqu'elles sont générées à haute température (bien que cette information ne soit pas indispensable pour le criblage de polymorphes).

Les courbes de solubilité de l'Irbesartan, du Rimonabant et de l'Aripiprazole ont été mesurées en microfluidique avec la méthode décrite en Partie B – 4.2.1. La mesure a nécessité environ 1 h par point de solubilité par température donnée en comptant le changement de température et l'erreur est seulement de 5%. Pour les solubilités les plus basses, comme pour l'Aripiprazole, nous avons pu tracer toute la courbe de solubilité avec une seule colonne de poudre (60 à 100 mg). Pour l'Irbesartan et le Rimonabant, une colonne a permis de déterminer plusieurs points de solubilité. Toutefois pour le Rimonabant à des températures supérieures à 40 °C, qui présente la solubilité la plus élevée, chaque point de solubilité a nécessité une colonne entière de poudre.

Les mesures microfluidiques ont été complétées par des mesures en Monopuits (méthode décrite en Partie B – 4.2.2) afin de vérifier la cohérence du résultat dans le cas de l'Aripiprazole et du Rimonabant, et avec la littérature dans le cas de l'Irbesartan.

La solubilité du Sulfathiazole n'a pas été mesurée dans le cadre de cette thèse mais les mesures de Peybernès dans l'eau et l'acétonitrile [56] en microfluidique à partir du même lot de poudre que celui utilisé ici sont présentées à titre indicatif pour le criblage des polymorphes.

Dans la suite, nous décrivons les résultats de solubilité obtenus pour chaque principe actif avec la méthode microfluidique, et les comparons avec des mesures en Monopuits et/ou avec la littérature.

## 2.1. Irbesartan

Les solubilités de la forme A et de la forme B de l'Irbesartan mesurées dans l'éthanol sont présentées sur la Figure 116. Les courbes sont tracées d'après un ajustement par la loi de van't Hoff à partir des points mesurés.

La solubilité de la forme A est en accord avec celle mesurée par Wang et al. [81], en tenant compte des barres d'erreurs. La forme B est connue pour être le desmrotrope (cf. Partie B – 1.1.2) de l'Irbesartan le plus soluble dans l'éthanol [63], ce qui est confirmé par nos mesures microfluidiques. Ce résultat illustre que cette méthode permet de mesurer les solubilités des formes les plus solubles, c'est-à-dire des formes métastables dans le cas de polymorphes, sous réserve qu'aucune transition de phase n'ait lieu au cours de la mesure.

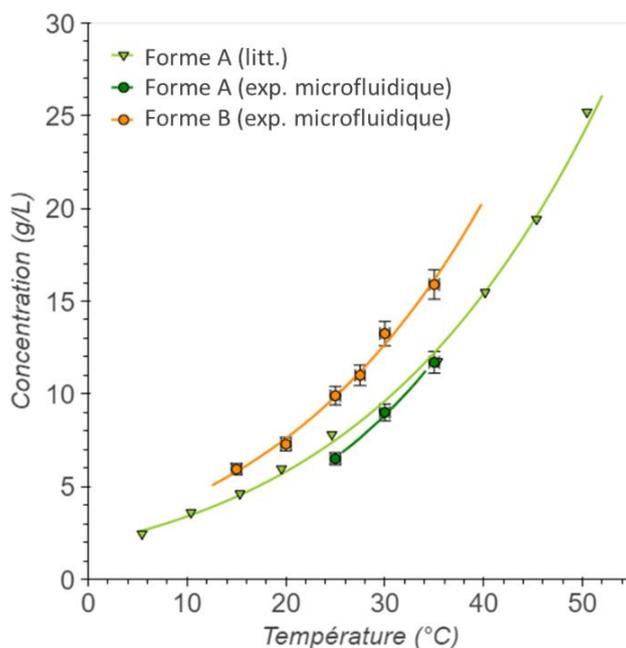


Figure 116: Courbes de solubilité de l'Irbesartan A et B dans l'éthanol mesurées en microfluidique dans cette thèse. La solubilité de la forme A est comparée à la littérature [81].

## 2.2. Rimonabant

Les points de solubilité des formes I et II du Rimonabant mesurés en microfluidique et en Monopuits sont présentés sur la Figure 117a. Les deux polymorphes présentent des solubilités similaires aux erreurs expérimentales près, comme cela a été observé dans la littérature dans d'autres solvants [61], [82], (Figure 117b). Il est donc impossible de déterminer les stabilités relatives entre les deux formes en utilisant les mesures de solubilités.

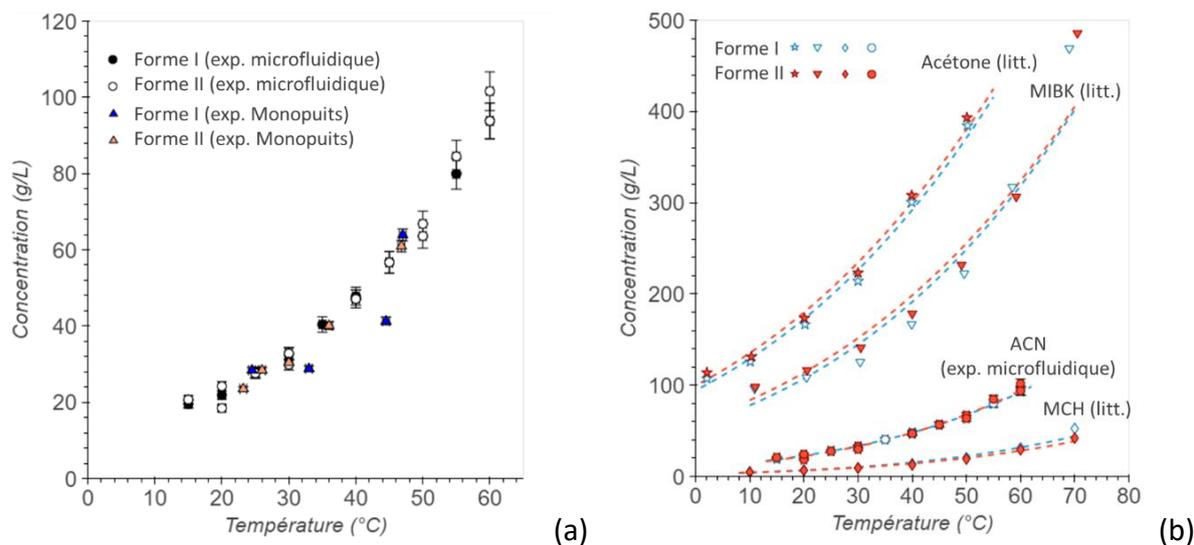


Figure 117 : (a) Solubilités des formes I et II du Rimonabant mesurées en microfluidique et en Monopuits dans l'acétonitrile. (b) Solubilités des formes I et II du Rimonabant mesurées dans l'acétonitrile en microfluidique et comparées aux solubilités de la littérature dans l'acétone, la méthylisobutylcétone (MIBK) et le méthylcyclohexane (MCH). [61], [82]

## 2.3. Aripiprazole

La poudre de départ d'Aripiprazole est un mélange des formes II et III (cf. DRX Figure 40). La forme II est *a priori* plus stable que la forme III, mais n'est pas la forme la plus stable de l'Aripiprazole à température ambiante [67], [70]. Afin de mettre en évidence une éventuelle transition de phase lors de la solubilisation de la poudre contenant les deux polymorphes, un débit constant (0,30 $\mu$ L/s) d'acétonitrile a été injecté à travers un lit de poudre dans une colonne à 20 °C. La solution saturée ainsi obtenue en sortie de colonne a ensuite été diluée avec un débit constant d'acétonitrile (0,34 $\mu$ L/s).

L'intensité transmise en UV de la solution diluée au cours du temps est représentée sur la Figure 118 :

- Avant 1h, les premiers maxima d'intensité correspondent au passage de bulles d'air dues au mouillage de la poudre par le solvant. Puis jusqu'à 1h, le signal est instable et de faible intensité, c'est à dire de forte concentration. Cela peut être interprété par la dissolution de la forme métastable (forme III), suivi de la nucléation-croissance de la forme II.

- Après 1h, le signal atteint un plateau, ce qui indique qu'il n'y a *a priori* plus de transformation jusqu'à la fin de l'expérience. De plus, le diffractogramme RX mesuré sur la poudre résiduelle dans la colonne à la fin de l'expérience correspond à la forme II seule. On peut donc conclure que la forme III s'est transformée en forme II. Cela illustre que le montage microfluidique peut être utilisé pour purifier un mélange de plusieurs polymorphes, par dissolution de la phase la moins stable, pour obtenir la phase la plus stable du mélange initial de poudre. Le plateau observé sur la Figure 118 correspond à la solubilité de la forme la plus stable, la forme II.

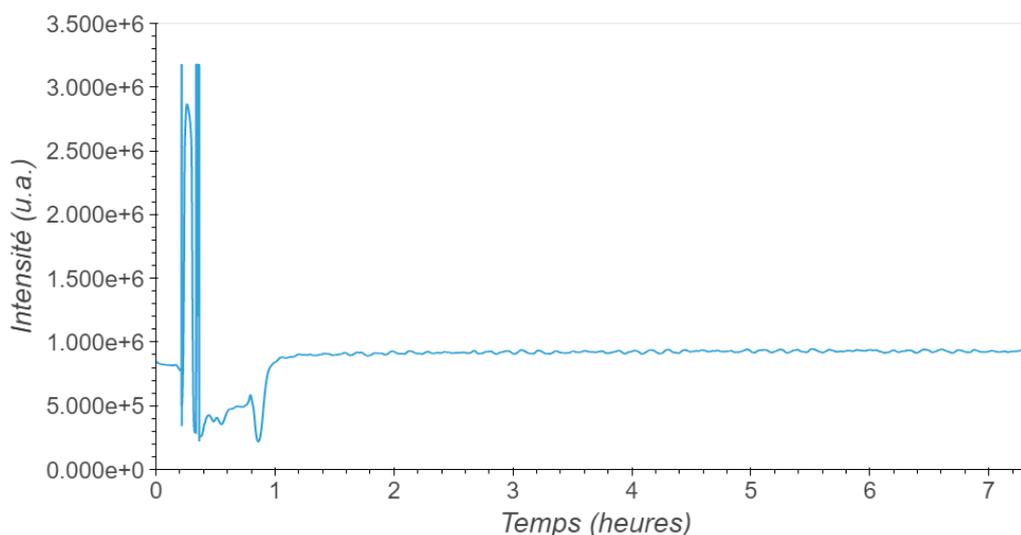


Figure 118 : Signal UV en fonction du temps d'une solution diluée d'Aripiprazole dans l'acétonitrile.

Suite à ces résultats, la solubilité de la phase la plus stable, la forme II de l'Aripiprazole, a été mesurée dans l'acétonitrile à partir d'un mélange de formes II et III à différentes températures. La Figure 119 présente cette courbe de solubilité et elle montre que les points mesurés en Monopuits sont cohérents avec ceux mesurés en microfluidique.

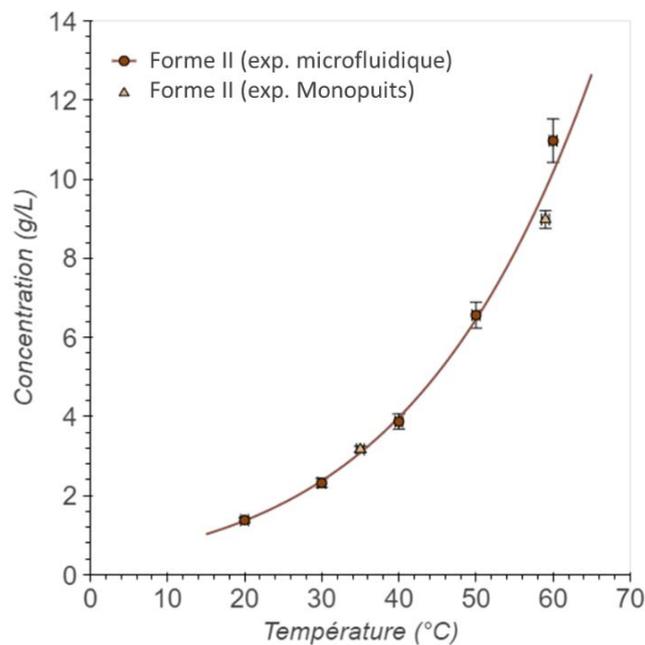


Figure 119 : Solubilité de la forme II de l'Aripiprazole mesurée dans l'acétonitrile en microfluidique et en Monopuits.

## 2.4. Sulfathiazole

La poudre de départ du Sulfathiazole est un mélange des formes II et IV. La Figure 120 présente les courbes de solubilité de cette poudre mesurées par Peybernès [56] dans l'acétonitrile et l'eau à partir de la même poudre de départ.

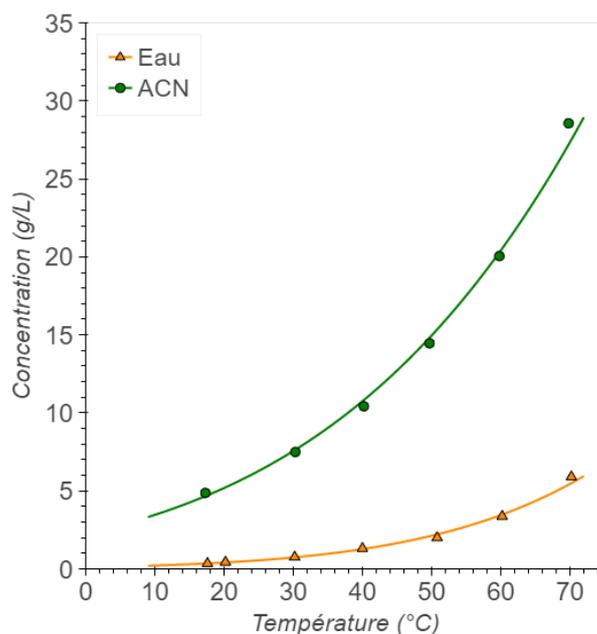


Figure 120 : Solubilité de la poudre de départ de Sulfathiazole (lot MKBQ0002V, Fluka Analytical) mesurée en microfluidique par Peybernès dans l'acétonitrile et l'eau. [56]

La transition de phase n'a pas été vérifiée lors de la mesure. Cependant, les formes II et IV présentes dans la poudre de départ ont des solubilités très proches, également similaires à celle de la forme III [72]. Dans cette thèse on a ainsi considéré que les courbes mesurées peuvent correspondre aux solubilités de ces trois formes sans distinction. En effet ici la solubilité nous sert à estimer la concentration dans les gouttes, et donc la quantité de poudre ayant été dissoute dans les gouttes, sans distinction de la phase exacte de départ. Une mesure plus approfondie doit être réalisée si on veut utiliser la solubilité pour comparer les stabilités relatives de ces trois formes.

## 3. Statistiques de nucléation

Dans cette partie on s'intéresse au suivi des événements de nucléation pour le Sulfathiazole, le Rimonabant et l'Aripiprazole dans différents solvants. Des gouttes saturées en principe actif ont été générées à haute température puis refroidies en utilisant différents profils de température afin de générer de la sursaturation. A l'issue du refroidissement, les gouttes sont maintenues à basse température pendant quelques heures à quelques jours pour continuer la nucléation des principes actifs et augmenter le pourcentage total de gouttes ayant nucléé à la fin de l'expérience. Des photos ont été prises régulièrement, toutes les 30 min à 2 h comme décrit en Partie C - 4.2. afin de suivre le pourcentage de gouttes ayant nucléé au cours du temps. Les gouttes contenant des cristaux et les gouttes vides ont été comptées afin de suivre l'évolution du nombre d'événements de nucléation (toutes phases confondues) dans les gouttes au cours du temps et en fonction de la température.

Dans la suite, je présente les résultats obtenus pour chaque soluté sous forme de statistique globale sans distinction de la phase qui a nucléé, et je termine par une conclusion partielle sur la nucléation dans les gouttes.

### 3.1. Sulfathiazole

#### 3.1.1. Dans l'eau

Pour le Sulfathiazole, deux expériences ont été menées dans l'eau. Dans les deux cas, les gouttes sont générées à 70 °C et refroidies à 10 °C par une rampe à -5 °C/h et -0,5 °C/h respectivement.

##### 3.1.1.1. Rampe rapide (-5 °C/h)

Pour la première expérience de cristallisation du Sulfathiazole dans l'eau, les gouttes ont été refroidies de 70 °C à 10 °C avec une rampe de -5 °C/h puis maintenues à 10 °C pendant 3 jours. Le pourcentage de gouttes contenant des cristaux au cours du temps est représenté en Figure 121, en parallèle du profil de température. Le premier cristal est apparu pendant le refroidissement, à 29 °C. Quelques autres cristaux (environ 5%) sont apparus avant la fin de la rampe. Le nombre de cristaux n'a ensuite pas évolué pendant quelques heures, avant d'augmenter de nouveau, jusqu'à atteindre 51% : 162 gouttes contenant un cristal sur 319 gouttes au total, après 2,5 jours à 10 °C.

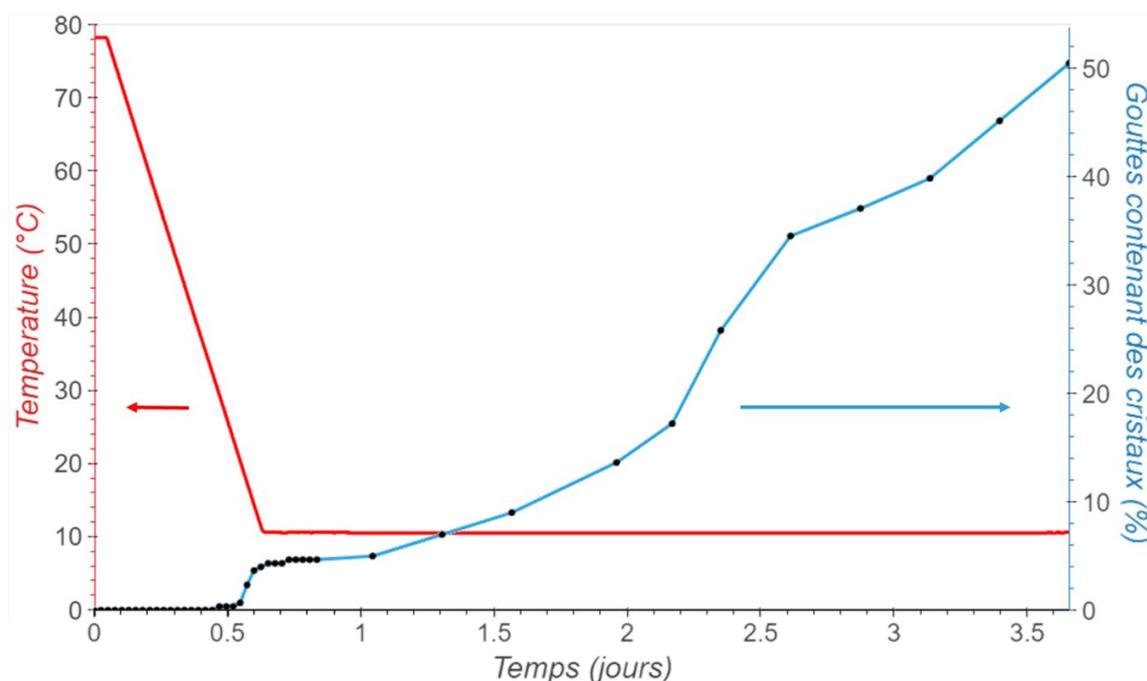


Figure 121: Pourcentage de gouttes d'eau saturées en Sulfathiazole contenant des cristaux de Sulfathiazole en fonction du temps (bleu) et profil de température en fonction du temps (rouge) pour une rampe rapide (-5 °C/h).

### 3.1.1.2. Rampe lente (-0,5 °C/h)

La seconde rampe appliquée sur des gouttes d'eau saturée en Sulfathiazole est une rampe plus lente, de vitesse -0,5 °C/h. Les gouttes ont ensuite été maintenues à 10 °C pendant environ une journée.

De même que lors de l'expérience précédente, le premier cristal est apparu à environ 30 °C, et le pourcentage de cristaux a atteint un plateau à 5% (Figure 122). Cependant, contrairement à l'expérience précédente, la première saturation en nucléation débute avant la fin de la rampe, entre 25 °C et 19 °C.

Puis une seconde vague de nucléation a un lieu entre 19 °C et 17 °C, augmentant le pourcentage de gouttes contenant des cristaux de 5% à plus de 90% en quelques heures. Le nombre de cristaux a ensuite continué d'augmenter plus lentement pour atteindre 95% de gouttes contenant un cristal à la fin de la rampe, puis 100% des 453 gouttes après un jour à 10 °C.

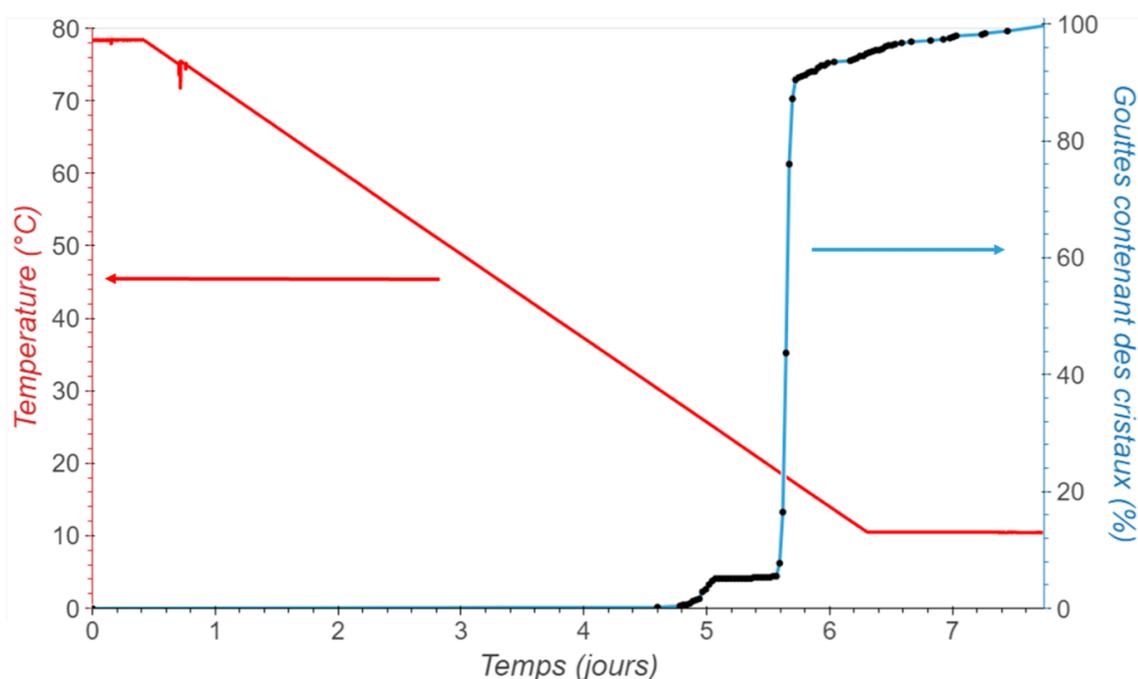


Figure 122: Pourcentage de gouttes d'eau saturées en Sulfathiazole contenant des cristaux de Sulfathiazole en fonction du temps (bleu) et profil de température en fonction du temps (rouge) pour une rampe lente (-0,5 °C/h).

### 3.1.1.3. Discussion

Lors du refroidissement rapide dans l'eau, l'expérience totale a duré 3,5 jours, dont 3 à 10 °C, à l'issue desquels seuls 51% des gouttes ont nucléé. Dans le cas du refroidissement lent, au bout de cette même durée, la température se situe encore autour de 40 °C et aucune goutte n'a nucléé. Cependant, à la fin de cette seconde expérience, 100% des gouttes ont nucléé, dont 5% lors du maintien 24 h à 10 °C, les autres 95% ayant nucléé lors du refroidissement, entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour de l'expérience. On peut ainsi observer qu'à la fois la température, la vitesse de refroidissement et le temps exercent une influence sur le taux de nucléation. Pour le paramètre « temps », la Figure 121 montre qu'à la fin de l'expérience de refroidissement rapide, le nombre de cristaux semble être toujours en train d'augmenter. On peut ainsi supposer que le nombre total de gouttes contenant des cristaux aurait pu atteindre 100% en attendant quelques jours supplémentaires à 10 °C.

### 3.1.2. Dans l'acétonitrile

Afin d'étudier l'influence du solvant sur le taux de nucléation, j'ai mené des expériences de refroidissement dans l'acétonitrile. La solubilité du Sulfathiazole y est plus élevée (d'environ un ordre de grandeur, Figure 120) [7], ce qui permet d'obtenir des gouttes plus concentrées. Ainsi, on pourrait s'attendre à obtenir des cinétiques et pourcentages de nucléation plus élevés pour des niveaux de sursaturation équivalents [83], les gouttes contenant plus de molécules et donc ayant plus de chances de former des germes de taille critique. Comme pour les expériences dans l'eau, deux profils de température ont été appliqués sur des gouttes de Sulfathiazole dans l'acétonitrile générées à 70 °C pour les refroidir à 10 °C.

### 3.1.2.1. Rampe rapide (-5 °C/h)

Pour la première expérience, les gouttes ont été refroidies par une rampe de vitesse -5 °C/h puis maintenues 11 jours à 10 °C. A la fin de l'expérience, seules 19% des gouttes (89 gouttes sur 465 au total) contenaient un cristal (Figure 123). La plupart des cristaux sont apparus pendant la rampe, les premiers étant apparus à 47 °C.

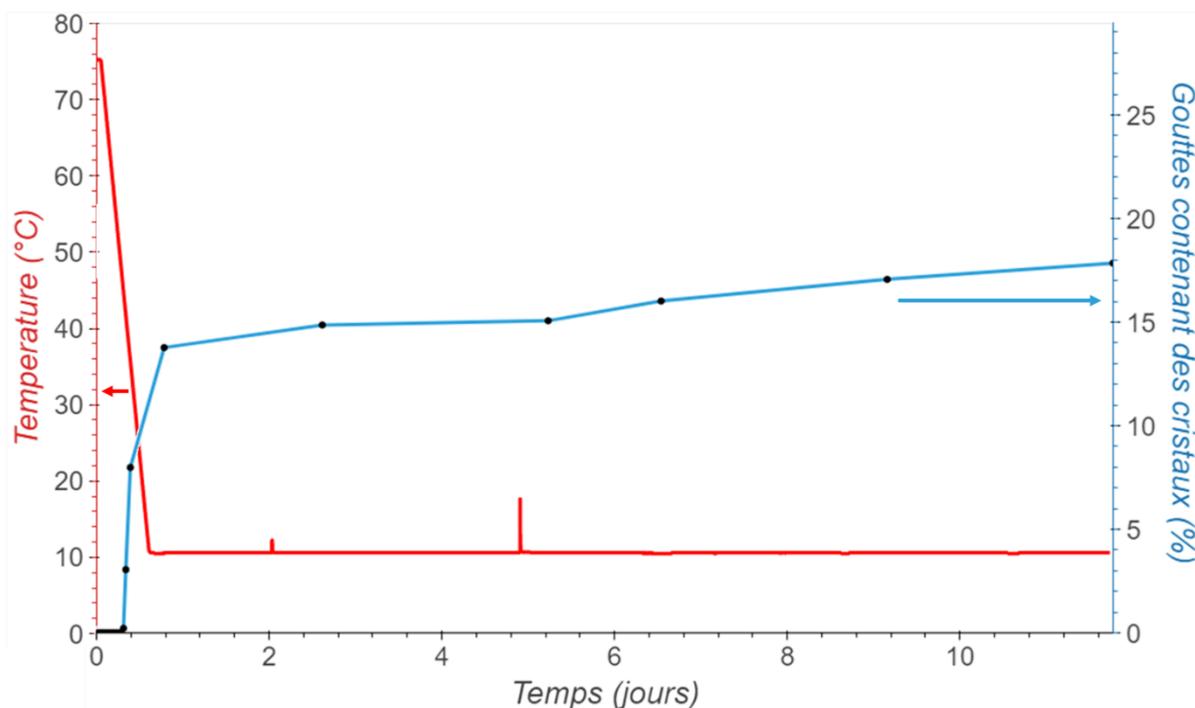


Figure 123 : Pourcentage de gouttes d'acétonitrile saturées en Sulfathiazole contenant des cristaux de Sulfathiazole en fonction du temps (bleu) et profil de température en fonction du temps (rouge) pour une rampe rapide (-5 °C/h).

En comparant cette expérience avec le même refroidissement dans l'eau, on aurait pu s'attendre à un taux de nucléation plus important, car le Sulfathiazole possède une solubilité beaucoup plus élevée dans l'acétonitrile que dans l'eau [7]. Or dans l'eau, le taux de nucléation atteint au bout de 3,5 jours d'expérience était de 51% tandis qu'il n'est que de 19% ici. Cela peut s'expliquer par l'augmentation de la sursaturation lors du refroidissement de 70 °C à 10 °C, qui est beaucoup plus importante pour un refroidissement dans l'eau ( $\beta \approx 27$ ) que dans l'acétonitrile ( $\beta \approx 8$ ) (calculées à partir des données de la Figure 120). Ainsi, le faible taux de nucléation observé ici illustre bien l'influence de la sursaturation sur la nucléation, comme cela a été observé par Peybernès et al. [7].

Par ailleurs, comme dans l'eau, on peut supposer qu'en prolongeant l'expérience de plusieurs jours voire semaines, l'ensemble des gouttes auraient fini par nucléer. Cependant ce temps semble également plus important dans le cas de l'acétonitrile que dans l'eau, comme l'indique la plus faible pente de la courbe représentant l'apparition des cristaux au cours du temps dans l'ACN par rapport à l'eau (en bleu sur les Figure 122 et Figure 123).

### 3.1.2.2. Trempe

Afin de générer une sursaturation plus importante plus brusquement dans l'acétonitrile que celle obtenue avec une rampe, une trempe de température (70 °C à 10 °C en moins de 5 min) a été appliquée sur des gouttes qui ont ensuite été maintenues à 10 °C pendant 6 jours. Cependant, à la fin de l'expérience, aucun cristal n'a été observé.

### 3.1.2.3. Discussion

Comme dans l'eau, on observe dans l'acétonitrile que, le taux de nucléation diminue lorsque l'on augmente la vitesse de refroidissement. C'est contraire à ce que l'on peut imaginer. J'ai donc formulé plusieurs hypothèses pour expliquer ce comportement :

- D'un point de vue thermodynamique, on peut expliquer la nucléation massive pendant le refroidissement en considérant la valeur de la force motrice de la nucléation  $\Delta\mu$ , donnée par  $\Delta\mu = kT \ln(\beta)$ . Ainsi, lorsque la température diminue, la sursaturation  $\beta$  augmente. La courbe  $\Delta\mu$  en fonction de la température est une courbe en cloche présentant un maximum à une température donnée qui varie selon le système solvant-soluté et selon la concentration de départ. De telles courbes sont tracées pour le Sulfathiazole dans l'eau et dans l'acétonitrile, avec des températures de génération de 70° à partir des mesures de solubilité de Peyber্নès [56].

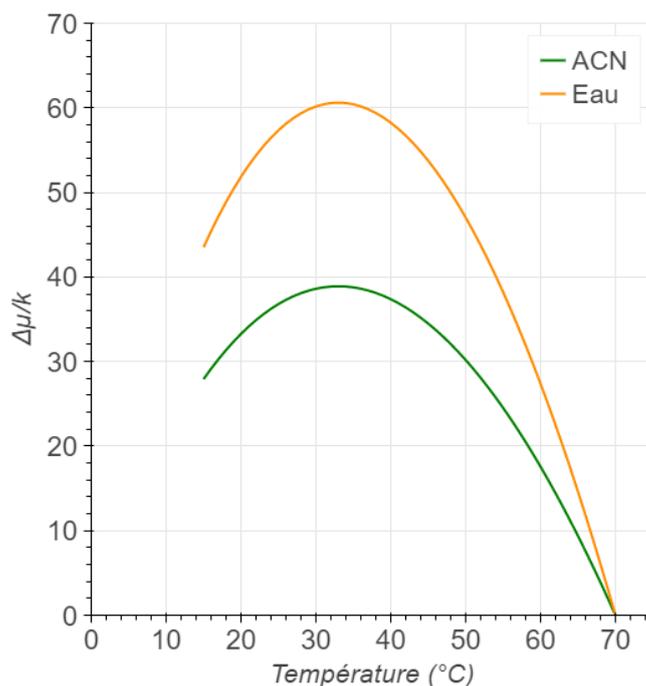


Figure 124 : Courbes  $\Delta\mu/k$  en fonction de la température pour le Sulfathiazole dans l'acétonitrile et dans l'eau pour des solutions générées à 70 °C. Pour cette température,  $\Delta\mu = 0$ . Les courbes ont été tracées à partir des données de solubilité de Peyber্নès [56] en calculant  $\frac{\Delta\mu}{k} = T \times \ln\left(\frac{C_S(70^\circ\text{C})}{C_S(T)}\right)$  où  $T$  est la température en °C et  $C_S(T)$  la solubilité à la température  $T$ .

On observe que dans l'eau et l'acétonitrile, la valeur de  $\Delta\mu$  est maximale entre 30 et 40 °C. Cela indique que la nucléation est favorisée autour de ces températures par rapport aux

températures les plus froides pour lesquelles la valeur de  $\Delta\mu$  diminue. Ces valeurs de température coïncident avec les températures auxquelles on a pu observer les premiers événements de nucléation dans les deux solvants lors des rampes de température (29-30 °C dans l'eau et 47 °C dans l'acétonitrile). On note également que la valeur de  $\Delta\mu$  est supérieure dans l'eau que dans l'acétonitrile, ce qui explique le taux de nucléation plus faible dans l'acétonitrile que dans l'eau, que nous avons observé.

- D'un point de vue cinétique, une autre explication possible à la baisse du taux de nucléation pour les températures les plus faibles repose dans le calcul de la fréquence de nucléation  $J$  selon la théorie classique de la nucléation (TCN), selon laquelle on a :

$$J(\beta) = A \exp\left(-\frac{B}{\ln^2\beta}\right) \quad (64)$$

En pratique, les facteurs  $A$  et  $B$  sont souvent considérés comme constants. Cependant, il s'agit de variables qui dépendent notamment de la température [11]. Dans cette thèse, les fréquences de nucléation n'étant pas mesurées, les valeurs exactes de  $A$  et  $B$  ne sont pas déterminées. Cependant, nous observons bien l'effet de la température.

- Dans tous les cas, un effet de confinement (cf. Partie A – 2.3.) s'ajoute à l'effet de la température, ce qui entraîne une réduction du taux de nucléation par rapport à un volume « infini » comme dans un réacteur [42].

## 3.2. Rimonabant

Pour le Rimonabant, des expériences de criblage ont été menées dans l'acétonitrile, dans un mélange acétonitrile-eau et dans l'éthanol. Dans l'acétonitrile, différents profils de température ont été testés, en partant de poudres de formes I ou II qui ont des solubilités similaires (Figure 117).

### 3.2.1. Dans l'acétonitrile

Deux poudres de Rimonabant ont été utilisées, l'une de forme I pure, l'autre de forme II pure. Dans ce paragraphe, je décris les expériences de refroidissement menées sur des gouttes générées à partir de chacune de ces formes.

#### 3.2.1.1. Refroidissements en partant de la forme I du Rimonabant

En partant de gouttes d'acétonitrile saturées à partir de la forme I du Rimonabant et générées à 60 °C, j'ai appliqué deux profils de refroidissement :

- Le premier profil comprend une rampe de 65 °C à 10 °C avec une vitesse de -0,6 °C/h, suivie d'un palier d'un jour à 10 °C puis d'un palier d'un jour à 6 °C. A l'issue de l'expérience, seules 6 gouttes sur 47 contiennent des cristaux, soit 13%.

- Le second profil comprend une trempe de 60 °C à 15 °C (<1 min), suivie d'un palier de 5 jours à 15 °C. A l'issue de cette expérience, seulement 4 gouttes sur 99 ont cristallisé (4%).

Comme pour le Sulfathiazole, il semble que le refroidissement le plus lent (rampe) favorise la nucléation. Cependant, dans les deux cas, les nombre d'événements de nucléation obtenus sont très faibles (4 et 6 gouttes seulement), ce qui ne nous permet pas de confirmer avec certitude cette influence de la vitesse de refroidissement sur la nucléation.

En revanche, pour les deux profils de température, le faible taux de nucléation obtenu souligne la limite de la microfluidique pour la cristallisation dans le cas du Rimonabant. On peut l'expliquer du fait du confinement cinétique car les temps d'induction de la nucléation sont fortement augmentés dans les gouttes de volume nanométrique en microfluidique si on les compare à des volumes de l'ordre du mL au L (Partie 1 – 2.3.). Ainsi, il peut être difficile d'obtenir 100% de gouttes nucléées dans un temps raisonnable (quelques heures à quelques jours).

### **3.2.1.2. Refroidissements en partant de la forme II du Rimonabant**

#### **(a) Rampe et trempe**

Comme les solubilités des formes I et II du Rimonabant sont similaires dans l'acétonitrile (Figure 117), il est alors attendu que la phase de départ n'influence pas la nucléation, ni la phase des cristaux obtenus dans les gouttes si on étudie le criblage des phases. Puisque les solutions de départ sont préparées par dissolution jusqu'à l'équilibre à 60 °C des produits de départ, la forme de départ fixe la concentration atteignable. Pour vérifier cela, les mêmes criblages (rampe et trempe) qu'avec la forme I ont été réalisés en partant de la forme II :

- Pour la rampe lente (-0,6 °C/h), suivie de 4 jours de maintien à 10 °C, seule une goutte a nucléé (à 38,9 °C) à la fin de l'expérience. Le capillaire a été stocké en chambre froide à (5-6 °C) pendant dix jours supplémentaires mais aucun nouveau cristal n'est apparu. Cela pourrait s'expliquer par une diminution de la valeur de  $\Delta\mu$  à basse température (cf. Partie D – 3.1.2.3.).

- Pour la trempe de 60 à 15 °C, suivie d'un maintien 4 jours à 15 degrés, aucun cristal n'a été observé dans les 324 gouttes générées.

Comme précédemment, le faible taux de nucléation pour ces expériences ne permet pas de conclure sur l'influence de la forme de départ.

#### **(b) Paliers de température**

En plus des deux profils décrits au paragraphe précédent, j'ai également appliqué deux profils de refroidissement par paliers, avec des paliers de température de durées variables, changés manuellement, sur des gouttes d'acétonitrile saturées à partir de la forme II du Rimonabant à 60 °C :

- Le premier refroidissement, de 60 °C à 20 °C, a été établi par paliers tous les 10 °C, séparés par des rampes de 10 min à 1 °C/min. La durée de chaque palier était de : 20 h pour 50 °C, 23 h pour 40 °C, 95 h pour 30 °C et 28 h pour 20 °C, ce qui correspondait à une durée totale de refroidissement d'environ 7 jours. Les cristaux ont été comptés à la fin de chaque palier. La

Figure 125 représente les paliers de température (en rouge) et le pourcentage de gouttes contenant des cristaux à la fin de chaque palier de température (en bleu).

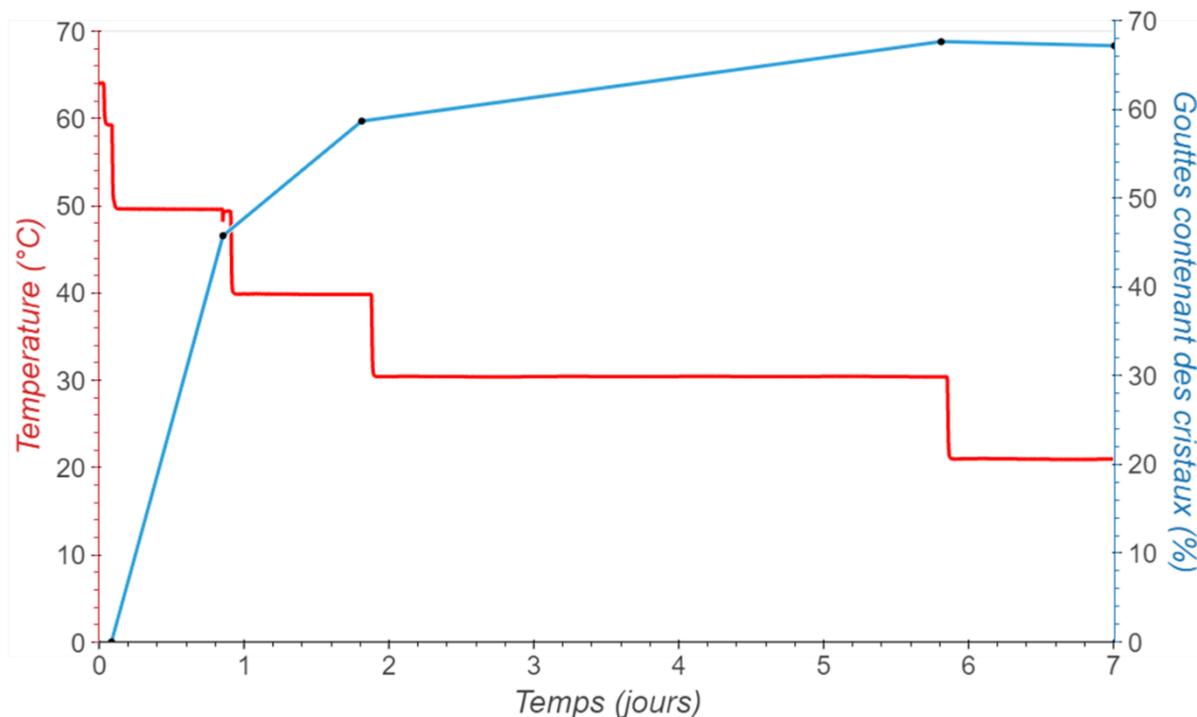


Figure 125 : Pourcentage de gouttes d'acétonitrile saturées en Rimonabant contenant des cristaux en fonction du temps (bleu) et profil de température en fonction du temps (rouge) pour un refroidissement par paliers. Le nombre de cristaux a été compté à la fin de chaque palier de température (50 °C, 40 °C, 30 °C et 20 °C).

La majorité des cristaux (70, soit 46% des gouttes) a nucléé lors du palier à 50 °C. Le nombre de cristaux a ensuite continué d'augmenter légèrement jusqu'à la fin du palier à 30 °C puis il s'est stabilisé lors du palier à 20 °C. Sur la Figure 125, on observe une légère diminution du pourcentage de gouttes ayant cristallisé. Il faut noter que cette diminution n'est pas due à une dissolution des cristaux dans les gouttes. Elle peut avoir trois origines, expérimentales, d'après les observations faites sur la spirale car les gouttes se déplacent lors du refroidissement (cf. Partie C – 4.2) :

- Certaines gouttes contenant des cristaux sortent du champ d'observation
- D'autres coalescent lors de leur déplacement, réduisant ainsi le nombre de gouttes contenant des cristaux
- Certains cristaux volumineux peuvent rester bloqués dans le capillaire, alors que la goutte vide continue de se déplacer. Si le cristal est attrapé par une goutte contenant déjà un cristal, le nombre de gouttes contenant des cristaux diminue.

Toutefois, on note que la différence en pourcentage n'est pas significative (ici 67,6% à 30 °C et 67,1% à 20 °C sur environ 140 gouttes) et n'empêche pas de visualiser la tendance de la nucléation. Un comptage plus précis prenant en compte ces 3 événements pourrait être fait à partir des photos pour une étude plus poussée sur la nucléation.

- Le second refroidissement par palier consiste en trempes successives (<2 min), de 60 °C à 30 °C, puis de 30 °C à 20 °C et enfin de 20 °C à 16 °C. Les paliers entre les trempes sont respectivement de 91 h, 147 h et 20 h (Figure 126). De même que pour l'expérience précédente, la majorité des cristaux est apparu lors du premier palier, à 30 °C dans cette expérience. Le pourcentage de cristaux a ensuite continué d'augmenter lentement durant le reste de l'expérience, pour atteindre seulement 23% de nucléation à la fin de l'expérience (43 gouttes cristallisées sur 184 gouttes au total). Sur la Figure 126, on observe également quelques diminutions apparentes du pourcentage de gouttes contenant des cristaux. Cette diminution n'est pas due à une dissolution des cristaux mais aux 3 phénomènes (sortie du champs d'observation, blocage d'un cristal et coalescence) décrits précédemment. Cependant, ces artefacts ne masquent pas la tendance globale de nucléation.

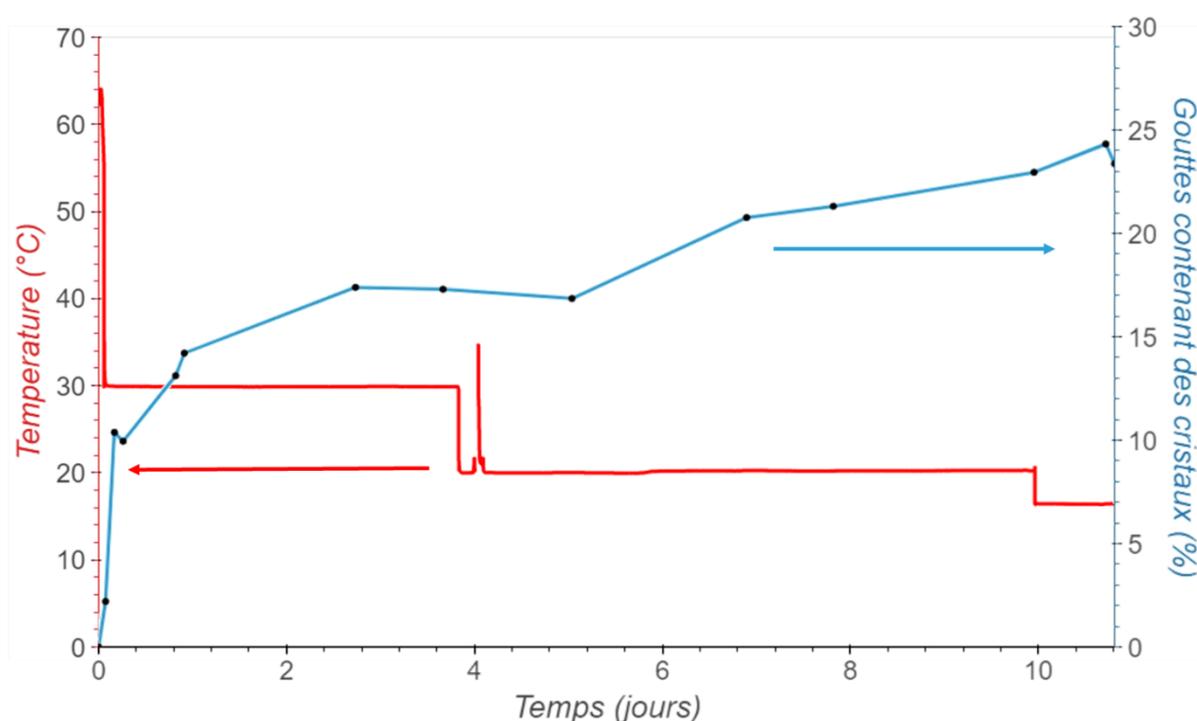


Figure 126 : Pourcentage de gouttes d'acétonitrile contenant des cristaux de Rimonabant en fonction du temps (bleu) et profil de température en fonction du temps (rouge) pour un refroidissement par paliers de trempes successives.

En comparant les deux expériences, nous notons que plus le refroidissement est lent, plus la nucléation est favorisée, et ce à température plus élevées (la majorité des cristaux a nucléé à 50 °C lors du refroidissement par paliers). Ce comportement ressemble à ce que nous avons observé avec le Sulfathiazole.

Par ailleurs, les deux expériences montrent que le Rimonabant présente des difficultés à nucléer dans les gouttes d'acétonitrile, et que le temps nécessaire pour que les cristaux apparaissent est relativement long (plusieurs jours).

### 3.2.1.3. Ajout d'un non-solvant : mélange Acétonitrile-eau

Afin de déclencher la nucléation, j'ai opté pour un procédé avec ajout de non-solvant pour diminuer la solubilité du Rimonabant, couplé avec une diminution de la température. J'ai introduit de l'eau dans les gouttes d'acétonitrile saturées en Rimonabant, ce dernier étant très peu soluble dans l'eau (<0,1 mg/mL).

Comme vu précédemment, il n'est pas possible d'ajouter de l'eau dans les gouttes déjà formées (Partie D – 1.2.2.1.). Le choix a donc été fait de former les gouttes en injectant l'eau et l'acétonitrile saturée dans l'huile afin de former des gouttes contenant directement de l'eau :

- Une première configuration consiste à générer des gouttes dans une jonction en croix (Figure 127). Cependant, cette géométrie n'a pas permis de générer des gouttes régulières, et ce, malgré la variété de débits utilisés, permettant d'avoir 9 à 16% d'eau dans les gouttes. De plus, le Rimonabant a nucléé à différents endroits du circuit, indiqués par des étoiles sur la Figure 127 : notamment entre les bains malgré l'utilisation d'une lampe UV, à l'intérieur de la jonction et à la sortie de celle-ci, mais également dans le flux d'arrivée d'eau, ce qui indique qu'une partie de la solution d'acétonitrile saturée en Rimonabant remonte dans ce circuit.

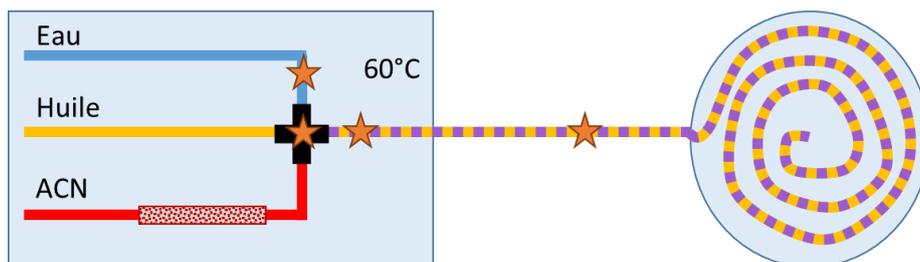


Figure 127 : Schéma du montage pour l'ajout d'eau lors de la génération des gouttes saturées d'acétonitrile dans une jonction en croix.

- Dans la Partie D – 1.2.2., nous avons montré qu'il était préférable d'utiliser un mélange eau-acétonitrile plutôt que de l'eau seule, ainsi qu'une jonction en Y de type multiport avec des arrivées à 60° autour du flux d'huile plutôt qu'une jonction en croix (Figure 128). Cette configuration a donc été testée, en utilisant un mélange eau/acétonitrile 50/50 en volume. Le débit de la solution saturée est fixé à 0,15  $\mu\text{L/s}$  tandis que le débit du mélange eau-acétonitrile est de 0,04  $\mu\text{L/s}$ , ce qui correspond à 10,5% d'eau dans le volume total des gouttes. En revanche, le fait d'utiliser un mélange eau-acétonitrile plutôt que de l'eau seule entraîne une dilution (de facteur x1,1) de la solution saturée par l'acétonitrile, en plus d'une dilution identique par l'eau.

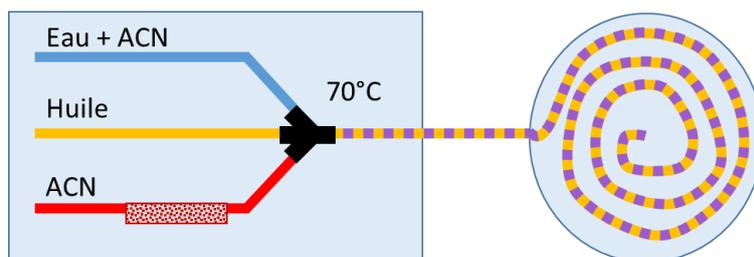


Figure 128 : Schéma du montage pour l'ajout d'eau lors de la génération des gouttes saturées d'acétonitrile dans une jonction multiports.

Sur les gouttes ainsi générées, une rampe de 65 °C à 10 °C à une vitesse de -0,6 °C/h a été appliquée. Celles-ci ont ensuite été maintenues à 10 °C pendant 7 jours. Cependant, aucun cristal n'a nucléé à la fin de l'expérience. Une première hypothèse s'appuie sur la dilution de la solution saturée par l'acétonitrile, qui réduit la sursaturation et empêche la nucléation.

Une seconde hypothèse considère que la quantité d'eau est trop faible pour baisser significativement la solubilité. En effet, on ne connaît pas l'influence du mélange eau/acétonitrile sur la solubilité. Dans le cas de l'Irbesartan dans un mélange eau/2-propanol, Taulelle [84] a montré que la solubilité augmentait d'abord lors de l'ajout d'une faible fraction d'eau, mais diminuait lors de l'ajout d'une quantité d'eau plus importante, en semblant suivre la même tendance que l'enthalpie de mélange des solvants (Figure 129).

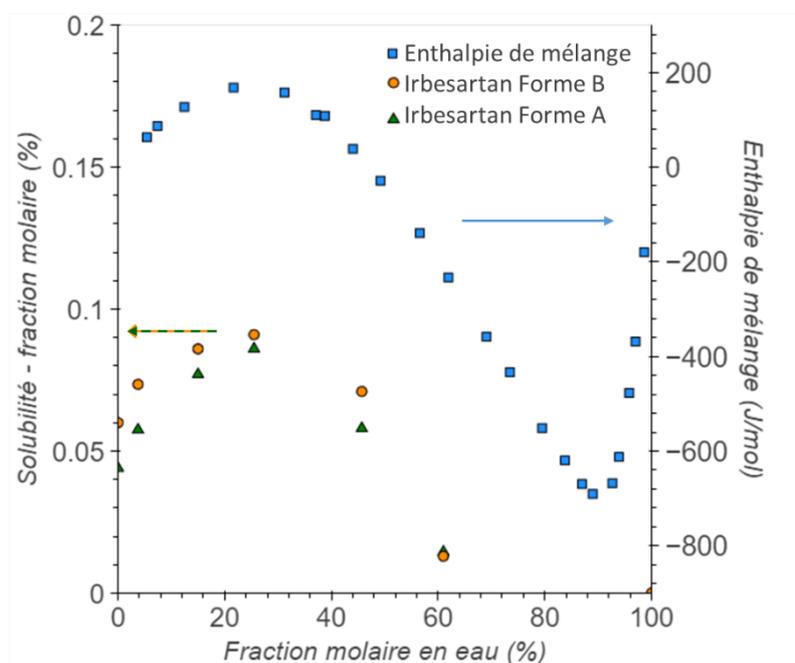


Figure 129 : Comparaison de la variation de la solubilité à 20 °C des formes A et B de l'Irbesartan avec celle de l'enthalpie de mélange d'un mélange eau/2-propanol, en fonction de la fraction molaire en eau dans un mélange eau/2-propanol (d'après Taulelle [84]).

Il se trouve que le mélange binaire eau/acétonitrile est un azéotrope positif (Figure 130) dont l'excès d'enthalpie de mélange augmente pour des faibles quantités d'eau (fraction molaire <0,4) puis diminue pour des quantités d'eau plus importantes [85]. Il serait ainsi

possible que la solubilité du Rimonabant dans le mélange eau/acétonitrile se comporte comme celle de l'Irbesartan dans le mélange eau/2-propanol et que l'ajout de l'eau en tant que non-solvant provoque l'effet inverse, c'est-à-dire augmenter la solubilité.

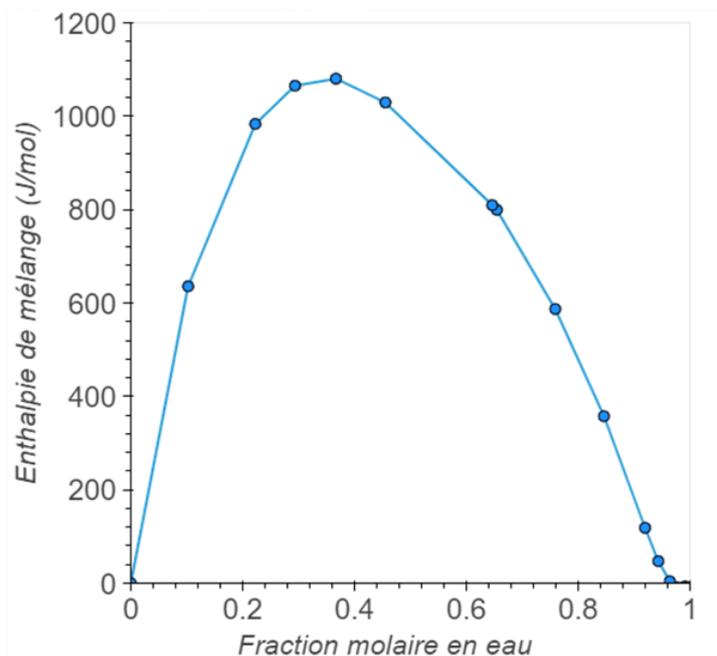


Figure 130 : Courbe azéotrope (enthalpie de mélange) du mélange binaire eau-acétonitrile en fonction de la fraction molaire en eau à 25 °C d'après [85].

Le sujet n'a pas été approfondi dans le cadre de cette thèse, mais il pourrait être intéressant d'étudier l'influence du mélange eau/acétonitrile sur la solubilité du Rimonabant, ainsi que de générer des gouttes avec une proportion d'eau plus importante que celle testée ici dans le but de voir si la nucléation est favorisée ou inhibée. Cette étude a tout de même montré la faisabilité de l'approche par ajout d'un anti-solvant et confirme l'importance de la connaissance du diagramme de phase pour étudier la cristallisation et développer un procédé de cristallisation.

### 3.2.2. Dans l'éthanol

Lors du criblage des polymorphes, plusieurs solvants sont généralement étudiés afin d'identifier les phases pures ou solvates pouvant exister pour la molécule d'intérêt. Le Rimonabant présente un solvate connu dans l'éthanol (éthanolate).

Des gouttes d'éthanol saturées en Rimonabant à 65 °C ont été générées puis refroidies à 20 °C par une rampe lente (-0,4 °C/h). A la fin de la rampe (au bout de 6 jours), les gouttes ont été refroidies rapidement à 10 °C (en moins d'1 h), et maintenues à cette température pendant 20 h. A la fin de l'expérience, aucune des 239 gouttes ne contenait de cristal. Trois hypothèses ont été envisagées et étudiées :

1) Une nucléation non désirée a été observée en amont de la spirale. Cela a pu diminuer la concentration en Rimonabant dans les gouttes et donc sa sursaturation. J'ai donc reproduit l'expérience avec une lampe infrarouge en amont de la spirale pour éviter la

nucléation entre la sortie de la colonne et la spirale de stockage, lors de la génération des gouttes. Comme précédemment, après 8 jours, dont 2 à 10 °C, aucun cristal n'est apparu.

2) Le Rimonabant ne cristallise pas dans l'éthanol. Les deux spirales (sans et avec lampe IR) ont été mises au congélateur respectivement 14 et 5 jours. Dans les deux cas, la majorité des gouttes a cristallisé et les cristaux ne semblent pas se dissoudre à température ambiante. Le soluté est donc capable de cristalliser dans l'éthanol. Cependant, les cristaux ont cristallisé brusquement dans les deux spirales, et les gouttes ont coalescé, notamment à cause de la manipulation des capillaires et des changements brusques de température. Il est donc impossible de savoir précisément le nombre de cristaux et de gouttes. De plus, certains sont complètement sortis des gouttes. L'analyse Raman de ces cristaux correspond au solvate éthanol (éthanolate).

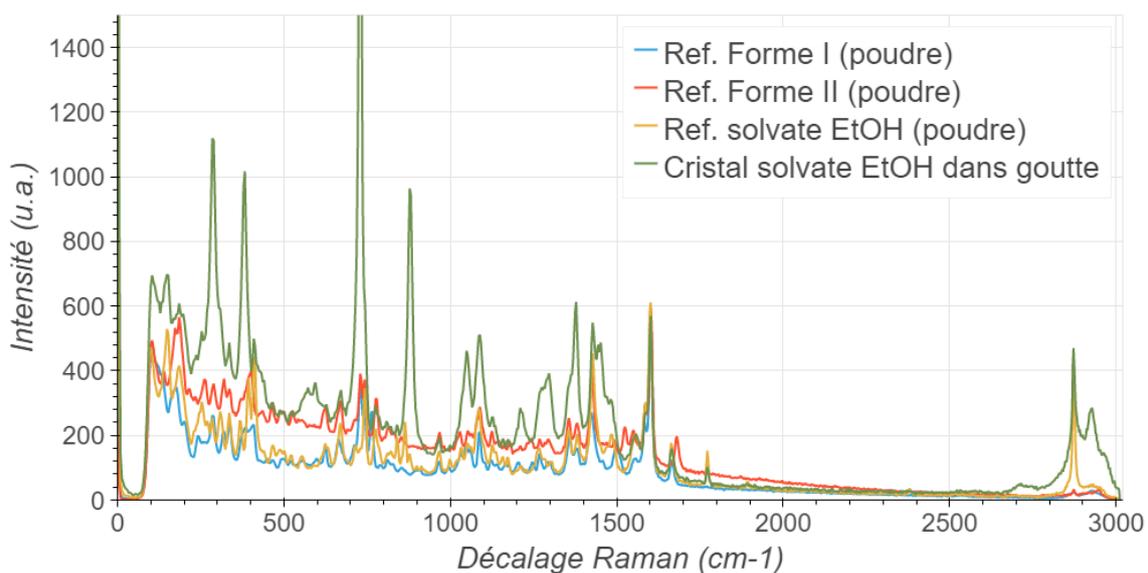


Figure 131 : Spectres Raman d'un cristal de solvate de Rimonabant dans une goutte d'éthanol (vert) et des références des formes I (bleu), II (rouge) et de l'éthanolate du Rimonabant (jaune) mesurés sur des poudres.

3) Une transition de phase a lieu au cours de la dissolution dans la colonne, modifiant la solubilité de la poudre. En effet, la solution saturée est préparée par dissolution d'une phase solide contenue dans une colonne. S'il existe une phase plus stable, et donc moins soluble, celle-ci est susceptible de nucléer. Il est donc possible d'observer une "purification" vers la phase la moins soluble comme décrit en Partie D – 2.3. sur la mesure de solubilité à partir d'un mélange de phases. La concentration de la solution serait ainsi inférieure à la solubilité de la phase de départ. Pour répondre à cette hypothèse, la poudre résiduelle de la colonne, ainsi que les cristaux apparus dans le circuit après la fin de la génération des gouttes (entre la sortie de colonne et la jonction en T dans laquelle les gouttes sont générées, puis en fin de circuit) ont été analysées en DRX (Figure 132). Dans tous les cas il s'agissait du solvate éthanol. Cela indique qu'il y a eu une transition de phase dans la colonne, par dissolution de la phase de départ et recristallisation en solvate, qui semble alors être la phase stable dans l'éthanol à cette température. Cela indique qu'il n'est pas envisageable, dans le cas de la formation d'un

solvate plus stable que la forme de départ, de changer de solvant en cours d'expérience, comme imaginé en début de thèse. En effet, l'idée était alors de générer des gouttes dans plusieurs solvants à partir d'une même colonne de poudre. Cet exemple illustre la nécessité de bien choisir le ou les solvants utilisés, et de contrôler les phases par DRX ou Raman à l'intérieur de la colonne pour des expériences de cristallisation.

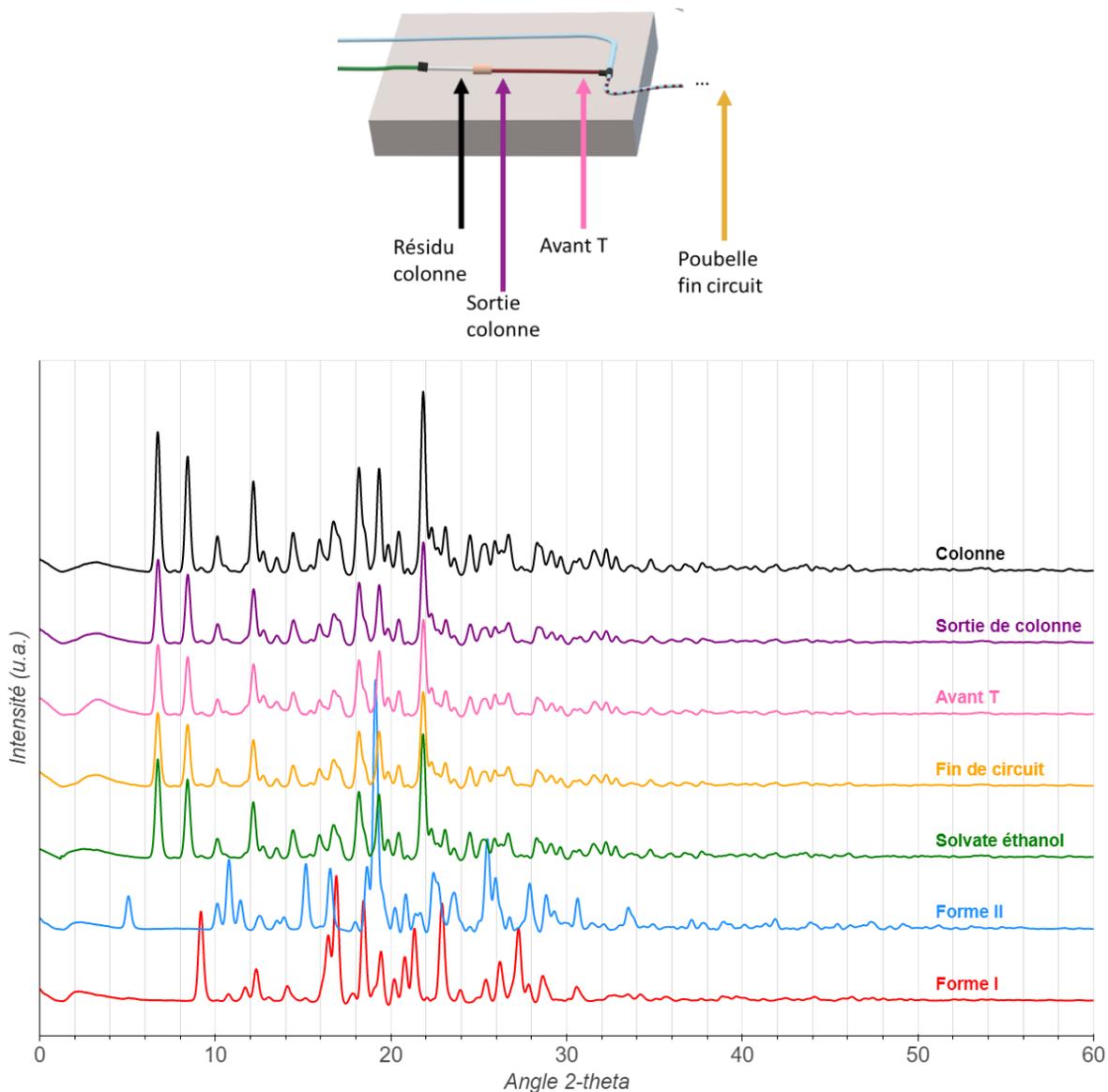


Figure 132 : (a) Schéma de la génération des gouttes indiquant les différents points où de la poudre a été récupérée en fin d'expérience. (b) Diffractogrammes RX des échantillons de poudre récupérés dans la colonne, en sortie de colonne, juste avant la jonction T et en fin de circuit, et comparés aux formes I et II et à une référence du solvate éthanol.

## 3.3. Aripiprazole

### 3.3.1. Dans l'acétonitrile

Deux rampes identiques, de 65° à 10 °C à -0,6 °C/h, ainsi qu'une trempe de 65 °C à 10 °C ont été appliquées sur des gouttes d'acétonitrile saturées en Aripiprazole générées à 60 °C. Dans ces trois cas, aucun cristal n'a nucléé. J'ai alors réalisé un criblage de solvants afin de trouver un solvant dans lequel le taux de nucléation global est suffisamment élevé.

### 3.3.2. Criblage des solvants

Des gouttes saturées à 80 °C dans l'eau, le 1-butanol et le DMSO et à 70 °C dans le 2-propanol ont été générées, puis refroidies par des rampes rapides (-5 °C/h) jusqu'à 10 °C, puis maintenues quelques heures à 10 °C. Dans le cas du DMSO, des paliers de température de 2 h ont été appliqués tous les 10 °C lors du refroidissement.

Dans l'eau et le DMSO, aucun cristal n'est apparu. Dans le butanol, 7 événements de nucléation ont été observés sur 381 gouttes, chacun ayant lieu à l'interface entre deux gouttes (Figure 133). Comme dit précédemment (Partie D – 1.1), les gouttes d'Aripiprazole se rapprochent sans coalescer car elles semblent être soumises à un effet tensioactif. Sur la Figure 133, on observe également que les gouttes ayant nucléé ont retrouvé une forme sphérique tandis que les gouttes sans cristaux sont toujours allongées. Cela appuie l'hypothèse selon laquelle l'Aripiprazole a un effet tensioactif dans la solution saturée.

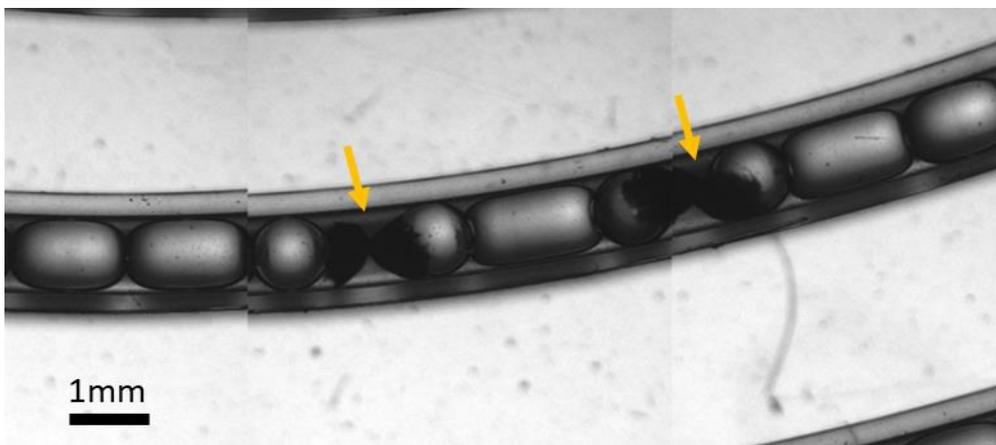


Figure 133 : Exemple d'événement de nucléation de l'Aripiprazole dans le butanol, à l'interface entre deux gouttes

De même, dans le propanol, seulement 15 événements de nucléation ont été observés à l'interface entre deux gouttes sur 403 gouttes (soit environ 4%).

Comme il a été observé que la vitesse de refroidissement a une influence sur le taux de nucléation, une rampe plus lente (-0,5 °C/h) a été effectuée sur des gouttes d'Aripiprazole dans le butanol. Cependant, dans ce cas-là, aucun cristal n'a été observé.

### 3.4. Bilan sur les statistiques globales de nucléation

Le Tableau 4 regroupe l'ensemble des résultats de nucléation présentés précédemment. La première observation est l'effet du volume sur le taux de nucléation pour la majorité des expériences, pour lesquelles peu ou pas de gouttes ont nucléé à la fin du refroidissement et après maintien quelques jours ou quelques heures à basse température. D'après l'effet de confinement cinétique [42] décrit précédemment, le temps d'induction de la nucléation est fortement augmenté (inversement proportionnel au volume) et la probabilité de former un germe de taille critique, donnant lieu à la nucléation, est réduite.

Deuxièmement, le solvant a également une forte influence sur le taux de nucléation. Dans le cas de l'Aripiprazole, seuls deux solvants sur les cinq testés ont conduit à la formation de cristaux, et ce, en très faible nombre. De même pour le Rimonabant, des cristaux ont été obtenus par refroidissement dans l'acétonitrile, mais aucun n'a été obtenu dans l'éthanol lors du refroidissement. Dans ce solvant, on a mis en évidence une transition de phase rapide dans la colonne, ce qui souligne la nécessité de contrôler la phase présente et de choisir un solvant adapté. J'ai également montré que l'ajout d'un non-solvant dans les gouttes (ici de l'eau dans les gouttes d'acétonitrile contenant du Rimonabant) ne permettait pas nécessairement d'induire la nucléation. En effet, la composition du mélange de solvants semble avoir une influence et des études plus approfondies doivent être menées afin de mesurer la solubilité du produit dans le mélange, car celui-ci peut, dans certaines proportions, augmenter la solubilité du soluté. Cette méthode doit être approfondie afin d'optimiser le choix du non-solvant et de sa quantité. Enfin, dans le cas du Sulfathiazole, on observe une nette différence de taux de nucléation entre les expériences dans l'eau et dans l'acétonitrile. Cela illustre que le solvant et donc la concentration initiale dans les gouttes ont une influence. On pourrait s'attendre à ce que plus la goutte est concentrée, plus le taux de nucléation est important. Or cela ne semble pas être le cas car la sursaturation doit être prise en considération plutôt que la concentration en elle-même.

D'autre part, l'influence du profil de température sur le taux de nucléation a également été mis en évidence. Ainsi, les refroidissements lents semblent favoriser la nucléation. Cela est contre intuitif, car lors d'un refroidissement rapide, comme une trempe, la sursaturation atteint plus vite des valeurs élevées. Cela peut s'expliquer en considérant la valeur de  $\Delta\mu$ , qui n'est pas monotone sur tout le domaine de température. Ainsi, sa valeur peut être maximale pour des températures intermédiaires, ce qui indique que la nucléation est favorisée à ces températures intermédiaires plutôt qu'à des températures plus faibles. Une autre explication possible se base sur la cinétique de nucléation, car la fréquence de nucléation  $J$  varie également en fonction de la température. Un approfondissement doit être fait afin d'étudier plus en détail l'influence de la vitesse de refroidissement sur le taux de nucléation, pour relier par exemple la valeur de  $\Delta\mu$  au taux de nucléation.

Produit	Solvant	Profil de refroidissement	% de nucléation à la fin de l'expérience	Commentaires
<b>Sulfathiazole</b>	Eau	Rampe rapide (-5 °C/h)	51	/
<b>Sulfathiazole</b>	Eau	Rampe lente (-0,5 °C/h)	100	/
<b>Sulfathiazole</b>	Acétonitrile	Rampe rapide (-5 °C/h)	19	/
<b>Sulfathiazole</b>	Acétonitrile	Trempe	0	/
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Paliers	67	46% ont nucléé dès 50 °C
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Trempe (60-30 °C) puis trempes à 20 et 16 °C	23	/
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Rampe lente (-0,6 °C/h)	13	Forme départ= I
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Trempe	4	Forme départ= I
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Rampe lente (-0,6 °C/h)	1 goutte	Forme départ= II
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile	Trempe	0	Forme départ= II
<b>Rimonabant</b>	Acétonitrile-eau	Rampe lente (-0,6 °C/h)	0	/
<b>Rimonabant</b>	Ethanol	Rampe lente (-0,4 °C/h)	0	Cristallisation au congélateur
<b>Rimonabant</b>	Ethanol	Rampe lente (-0,4 °C/h)	0	Cristallisation au congélateur
<b>Aripiprazole</b>	Acétonitrile	Rampe lente (-0,6 °C/h)	0	/
<b>Aripiprazole</b>	Acétonitrile	Rampe lente (-0,6 °C/h)	0	/
<b>Aripiprazole</b>	Acétonitrile	Trempe	0	/
<b>Aripiprazole</b>	Eau	Rampe rapide (-5 °C/h)	0	/
<b>Aripiprazole</b>	DMSO	Paliers	0	/
<b>Aripiprazole</b>	Propanol	Rampe rapide (-5 °C/h)	4	A l'interface entre 2 gouttes
<b>Aripiprazole</b>	1-butanol	Rampe rapide (-5 °C/h)	2-3	A l'interface entre 2 gouttes
<b>Aripiprazole</b>	1-butanol	Rampe lente (-0,5 °C/h)	0	/

Tableau 4 : Récapitulatif des expériences de nucléation.

Dans ce chapitre, j'ai étudié des statistiques globales de nucléation en m'intéressant aux gouttes qui avaient nucléé, mais sans distinction de phases. Cette étude est cruciale pour mettre au point le procédé microfluidique et la méthode de nucléation pour chaque soluté. J'ai ensuite affiné cette étude de nucléation globale en distinguant chaque phase, grâce à une analyse Raman *in situ* afin d'établir des statistiques de nucléation phase par phase.

## 4. Criblages des phases

Un des objectifs de cette thèse est d'étudier le polymorphisme de principes actifs pharmaceutiques modèles (Aripiprazole, Rimonabant et Sulfathiazole), en faisant des statistiques plus centrées sur les phases obtenues dans les gouttes. Dans un premier temps, je présente des criblages en grand volume (mL dans des vials) par rapport aux nanovolumes en microfluidique (environ 500 nL) pour l'Aripiprazole et le Rimonabant. Pour l'Aripiprazole, l'objectif était de mettre en évidence la possibilité de nucléation des différents polymorphes dans l'acétonitrile. Pour le Rimonabant, le but était d'obtenir les différents solvates obtenus par Fours dans différents solvants [61], et trouver un solvant ne donnant pas de solvate. Dans un deuxième temps, j'analyse les résultats des expériences décrites dans la partie précédente, en considérant les phases obtenues. Pour cette partie, j'ai choisi de ne présenter que le Rimonabant dans l'acétonitrile et dans l'éthanol, et le Sulfathiazole dans l'acétonitrile et dans l'eau car ils ont produit assez de cristaux pour une étude statistique de la nucléation des différents polymorphes.

### 4.1. En vials (volume du mL)

Dans l'industrie pharmaceutique, les criblages de polymorphes se font classiquement en vials de quelques mL. Dans chaque vial, une condition de solvant-concentration est testée, selon une méthode définie (refroidissement, évaporation, maturation...). Pour un criblage classique, de nombreux solvants sont testés afin de déterminer un « bon » solvant de cristallisation, dans lequel la forme désirée nucléée spontanément, et dans lequel on n'observe pas de transition de phase.

#### 4.1.1. Aripiprazole

Pour l'Aripiprazole (dont la poudre de départ est un mélange des formes II et III), j'ai choisi d'utiliser l'Acétonitrile comme solvant de cristallisation, car il s'agit d'un des solvants cités dans la littérature dans lequel il est possible de cristalliser différents polymorphes [67].

Les solutions préparées en vials de 1,5 mL proviennent des mesures de solubilité en Monopuits de l'Aripiprazole dans l'acétonitrile. Elles ont été refroidies afin d'étudier la cristallisation du produit et l'apparition des différents polymorphes. Trois vials ont été préparés, pour différentes concentrations de produit et différents profils de température ont été appliqués :

- Le vial 1 a été préparé par ajout de 1,5 mL d'acétonitrile à 13,5 mg d'Aripiprazole. Il a ensuite été chauffé par paliers successifs de 30 min tous les 5 °C, de 35 °C à 60 °C, séparés par des rampes de 0,1 °C/min. La dissolution a été observée à environ 59 °C. Le vial a ensuite été refroidi rapidement à 20 °C. Des cristaux tabulaires (Figure 134) ont nucléé rapidement. Ils ont été récupérés pour analyse DRX, et correspondent à de la forme IV (cf. DRX en Annexe 6).

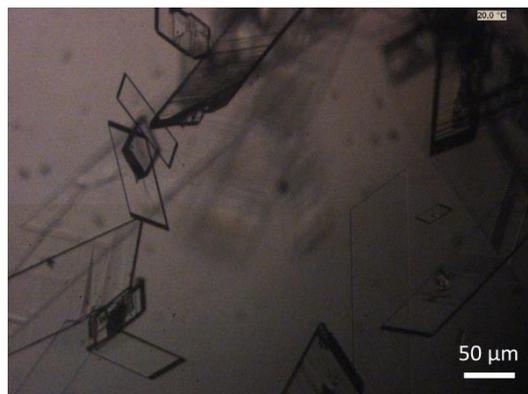


Figure 134 : Cristaux tabulaires d'Aripiprazole obtenus dans le vial 1 à 20 °C dans l'acétonitrile.

- Le vial 2 a été préparé par ajout de 1,5 mL d'acétonitrile à 4,8 mg d'Aripiprazole. Il a ensuite été chauffé selon le même profil que le vial 1, mais de 20 à 60 °C. La température de dissolution de la poudre est d'environ 35 °C. Le vial a également été refroidi rapidement à 20 °C. Des cristaux aciculaires ont d'abord nucléé (Figure 135a), puis des petits cristaux tabulaires (Figure 135b) sont apparus. Cependant, tous ces cristaux, de petite taille, n'ont pas pu être collectés pour analyse DRX. Deux autres types de cristaux, plus volumineux ont ensuite nucléé dans le vial, des cristaux prismatiques et des cristaux de faciès indéterminé (Figure 135c). Plusieurs de ces derniers ont été récupérés pour analyse RX, montrant qu'il s'agissait de la forme V (cf. DRX en Annexe 6).

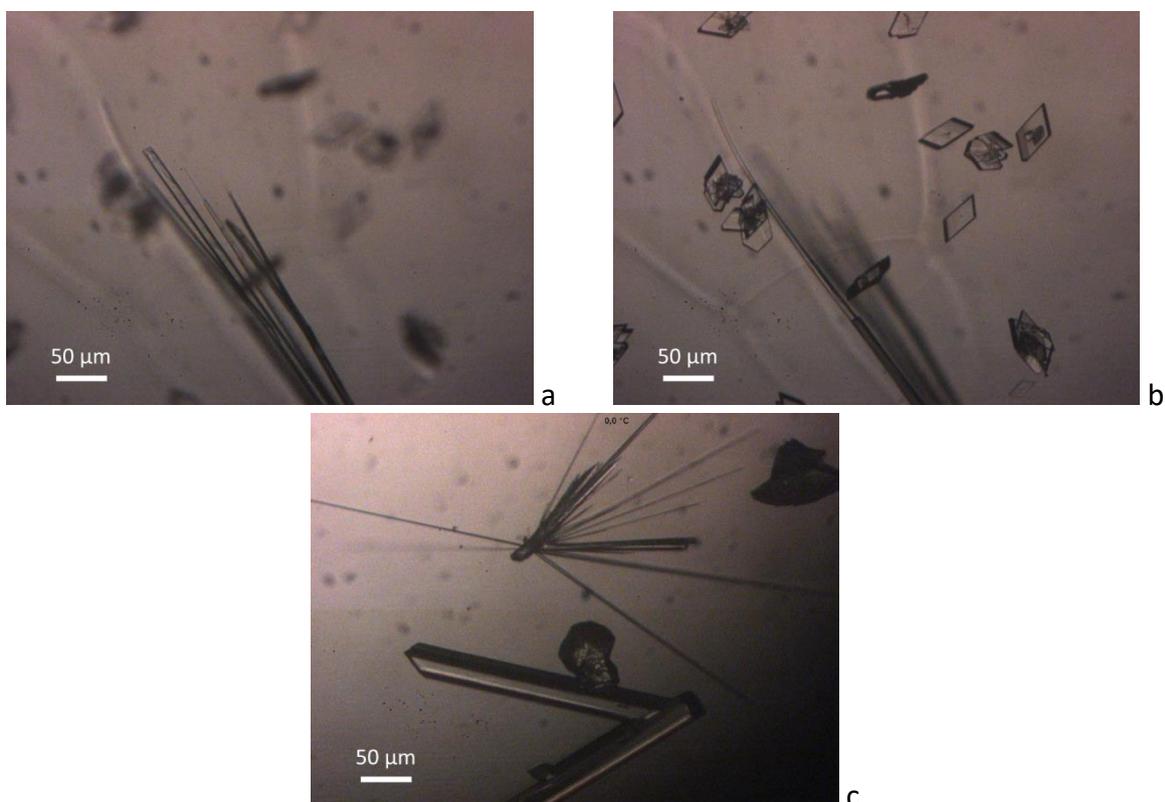
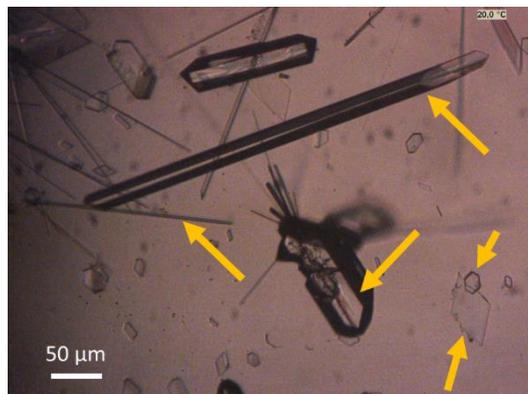


Figure 135 : Cristaux aciculaires (a), tabulaires (b) et prismatiques (c) d'Aripiprazole obtenus dans le vial 2 dans l'acétonitrile.

- Enfin, le vial 3 a été préparé en récupérant le surnageant du vial 1 après refroidissement à 20 °C. Il a été maintenu à 20 °C quelques heures. Dans ce vial, différents types de cristaux ont été observés, avec des faciès variés (Figure 136). Un cristal de type prismatique a été récupéré et analysé par DRX, il correspond à la forme V (cf. DRX en Annexe 6). Même si, je n'ai pas pu caractériser tous les cristaux de différents faciès, on peut supposer qu'ils correspondent à des formes cristallines différentes.



*Figure 136 : Cristaux d'Aripiprazole de faciès variés (exemples indiqués par des flèches) obtenus dans le vial 3 dans l'acétonitrile.*

Ces trois expériences mettent en valeur la facilité de l'Aripiprazole à cristalliser dans l'Acétonitrile en grand volume (de l'ordre du mL dans les vials), ainsi que la possibilité de nucléer plusieurs formes cristallines. Il faut noter les nombreux événements de nucléation dans chaque expérience (correspondant à une condition donnée), qui de surcroît apparaissent très rapidement, alors qu'en microfluidique, l'Aripiprazole n'avait donné que très peu de cristaux. Cela illustre donc encore une fois l'effet du confinement cinétique sur le taux de nucléation.

#### **4.1.2. Rimonabant**

Au début de la thèse, j'ai effectué un criblage classique de phase du Rimonabant sur le site de Sanofi (Vitry-sur Seine), dans le but de retrouver et d'isoler les différents solvates obtenus par Fours [61], d'en identifier d'éventuels nouveaux et de déterminer un ou plusieurs solvants de cristallisation ne conduisant pas à la formation de solvates. Pour ce criblage, deux méthodes ont été utilisées : la maturation (ou mûrissement) de suspensions, et le refroidissement de solutions.

La méthode de la maturation (ou mûrissement) consiste à préparer une suspension de poudre dans un solvant donné, et de la laisser sous agitation à une température donnée pendant un temps donné (ici température ambiante pendant 12 jours) afin d'observer une éventuelle transition de phase. Dans la méthode de refroidissement d'une solution, une solution est préparée par dissolution complète de la poudre à 60 °C, puis refroidie avec une rampe de -5 °C/min jusqu'à une température comprise entre 0 et 10 °C.

Dans les deux cas, les suspensions obtenues sont ensuite filtrées et les poudres sont analysées par DRX afin de comparer les diffractogrammes à celui de la forme de départ (ici

forme I). Une analyse DSC est également effectuée sur la poudre obtenue, afin de détecter d'éventuels phénomènes thermiques (fusion, désolvatation, recristallisation). Cette analyse est complétée par une analyse TGA afin de quantifier le départ de solvant, et éventuellement la stœchiométrie du solvate, lors des phénomènes détectés en DSC (Partie A – 3.3 et Partie B – 3.4.). Après maintien plusieurs jours à température ambiante dans des vials fermés non étanches, les échantillons ont été réanalysés de la même manière afin d'étudier leur évolution dans l'air.

Au total 13 solvants ont été testés par l'une ou les deux méthodes et les expériences ont même parfois été répétées. Tous les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 5.

Solvant	Méthode	Phase obtenue
Eau	Maturation	Forme inconnue isomorphe du solvate éthanol évoluant en monohydrate (GUBLAS dans la CSD).
2-pentanol	Maturation	Forme inconnue isomorphe du solvate éthanol évoluant en un autre solvate non identifié.
Butan-1-ol	Maturation	Solvate non identifié
3-méthyl-1-butanol	Maturation	Solvate 3-méthyl-1-butanol référencé
Éthanol	Maturation	Solvate éthanol référencé
	Refroidissement	
	Refroidissement	
	Refroidissement	
Méthanol	Maturation	Forme inconnue isomorphe du solvate éthanol évoluant en une forme isomorphe au monohydrate.
	Refroidissement	Forme isomorphe au monohydrate
Propan-2-ol	Maturation	Forme inconnue isomorphe du solvate éthanol évoluant en Forme I
	Refroidissement	Solvate non identifié
	Refroidissement	
DMF	Maturation	Mélange du solvate DMF référencé et d'une forme inconnue isomorphe du solvate éthanol évoluant en solvate DMF référencé pur.
	Refroidissement	Forme inconnue évoluant en Forme I
	Refroidissement	Solvate DMF référencé
	Refroidissement	
2-méthoxyéthanol	Maturation	Solvate 2-méthoxyéthanol référencé
	Refroidissement	
1-méthyl-2-pyrrolidone	Maturation	Solvate 1-méthyl-2-pyrrolidone référencé
Méthylcyclohexane	Refroidissement	Forme I
Toluène	Refroidissement	Forme I
Acétonitrile	Refroidissement	Forme I

Tableau 5: Résultats du criblage « classique » en vials du Rimonabant dans différents solvants obtenus par maturation ou refroidissement. Les solvates référencés sont ceux identifiés par Fours [61].

Voici des précisions sur les phases obtenues :

- Dans le 3-méthylbutanol, l'éthanol, le 2-méthoxyéthanol et le 1-méthyl-2-pyrrolidone, les solvates obtenus par maturation correspondent à ceux décrits par Fours [61]. Il en va de même pour les solvates obtenus par refroidissement dans le DMF, l'éthanol et le 2-méthoxyéthanol.

- Dans l'eau, le méthanol, le 2-pentanol, le 2-propanol et le DMF, les formes obtenues par maturation sont des formes inconnues, dont les diffractogrammes RX sont très proches de celui de l'éthanolate. On parle dans ce cas d'isomorphisme. Cela peut s'expliquer par exemple par la formation de liaisons H entre le Rimonabant et le solvant, induisant un positionnement identique des molécules de Rimonabant dans la maille cristalline. Dans tous les cas, ces formes semblent instables et évoluent dans l'air en solvates, ou en forme I dans le cas du 2-propanol.

- Dans le butanol (par maturation), le méthanol le propan-2-ol et le DMF (par refroidissement), des formes inconnues ont été isolées.

- Enfin, pour les refroidissements dans le méthylcyclohexane, le toluène et l'acétonitrile, la forme I, identique à la forme de départ, a été obtenue.

Ces résultats illustrent donc bien la facilité qu'a le Rimonabant à former des solvates, notamment dans les alcools. Par conséquent, en microfluidique, une attention particulière devra être apportée aux transitions de phase dans la poudre traversée par le solvant, comme vu plus haut avec l'éthanol. L'acétonitrile est choisi comme solvant de cristallisation, car il s'agit d'un solvant non dangereux couramment utilisé dans l'industrie.

## 4.2. En microfluidique (volume du nL)

Un des objectifs de la thèse est d'établir des statistiques de nucléation phase par phase afin d'étudier l'influence des différents paramètres (solvant, vitesse de refroidissement...) sur le polymorphisme grâce à la plateforme microfluidique. Une première idée du polymorphisme peut être obtenue par l'observation du faciès des cristaux. Cependant, cette approche n'est pas suffisante. Ainsi, les cristaux de Rimonabant et de Sulfathiazole obtenus précédemment dans les expériences décrites pour l'étude des statistiques de nucléation (Partie D – 3.) ont également été analysés dans le capillaire (*in situ*) à la fin de l'expérience (*offline*) par spectroscopie Raman selon la méthode développée durant cette thèse (Partie C – 5.5.). Le but est de déterminer plus précisément les phases cristallines ayant nucléé.

## 4.2.1. Rimonabant

### 4.2.1.1. Dans l'acétonitrile

#### (a) Refroidissements en partant de la forme I

##### Refroidissement lent (rampe) à partir de la forme I

Parmi les gouttes générées dans la spirale à 60 °C dans l'acétonitrile à partir de forme I de Rimonabant et refroidies à 10 °C par une rampe de -0,6 °C/min, 51 ont été analysées en Raman, dont 10 contenant des cristaux : 6 avaient été observés lors du refroidissement, 3 étaient présents hors du champs d'observation de la caméra et un dernier est apparu avant l'analyse Raman. Cette analyse permet d'identifier 5 cristaux de forme I et 5 de forme II, soit 50% de chaque forme. Sur les 6 cristaux dont la nucléation a été observée dans la spirale, 5 s'avèrent être de forme II. Le cristal apparu entre la fin de l'expérience et l'analyse est de forme I, de même que les 3 cristaux hors du champs d'observation de la caméra. Il semble ainsi que la forme II cristallise plus facilement lors du refroidissement, la forme I étant apparue plus tardivement. Cependant, le faible nombre de cristaux considérés ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

Il a de plus été observé que les cristaux de forme I présentent plutôt un faciès en aiguilles tandis que les cristaux de forme II sont plus volumineux, avec un faciès en plaquettes, bien que ce critère ne soit pas toujours discriminant (Figure 137).

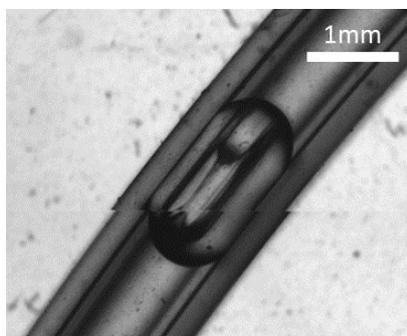


Figure 137 : Cristal de forme II obtenu dans une goutte d'Acétonitrile saturé à 60 °C et refroidie par refroidissement lent à 10 °C.

##### Refroidissement rapide (trempe) à partir de la forme I

Parmi les gouttes de Rimonabant générées dans la spirale à 60 °C dans l'acétonitrile à partir de forme I et refroidies par une trempe de 60 °C à 15 °C (<1 min), seules les 4 cristaux observés ont été analysés. Ces cristaux présentent des faciès en aiguilles (Figure 138) et sont analysés en Raman comme étant de forme I.

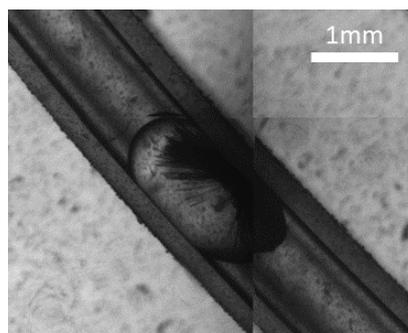


Figure 138 : Cristal de forme I obtenu dans une goutte d'Acétonitrile saturée à 60 °C et refroidie par refroidissement rapide à 15 °C.

## (b) Refroidissements en partant de la forme II

### Refroidissement lent (rampe) à partir de la forme II

Un unique cristal a nucléé lors du refroidissement par une rampe lente (-0,6 °C/h) de la spirale générée à partir de forme II de Rimonabant à 60 °C. Il s'agit d'après l'analyse en spectroscopie Raman d'un cristal de forme II.

### Refroidissements par paliers à partir de la forme II

Deux expériences de refroidissement par paliers ont été menées (décrites en Partie D – 3.2.1.2.(b)) : l'une avec des paliers tous les 10 °C sur 140 gouttes, dont 94 ont donné des cristaux (soit 67%) et l'autre avec des trempes successives à 30, 20 et 16 °C sur 184 gouttes, dont 43 ont donné des cristaux (soit 23%). Dans les deux cas, l'analyse Raman des cristaux montre que seule la forme II a été obtenue.

Pour ces deux expériences, les cristaux ont un faciès en plaquettes plus ou moins larges (Figure 139).

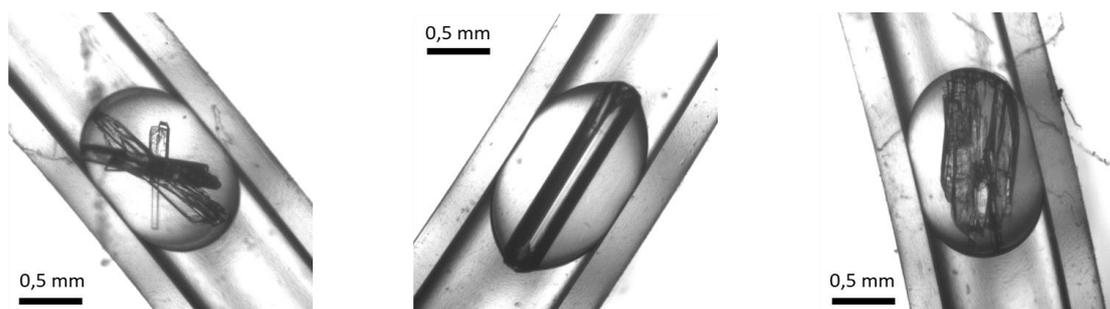


Figure 139 : Cristaux de forme II de Rimonabant obtenus dans l'acétonitrile par refroidissement par paliers de 60 à 20 °C tous les 10 °C.

## 4.2.1.2. Dans l'éthanol

Le Rimonabant a cristallisé dans l'éthanol après mise des deux spirales de gouttes au congélateur pendant 14 et 5 jours respectivement. Seule la deuxième spirale a été analysée. 117 cristaux ont été analysés sur 150 gouttes au total. Cependant, certains cristaux analysés étaient sortis des gouttes et étaient directement dans l'huile. L'ensemble des cristaux s'est

avéré être du solvate éthanol sur cette expérience. Cela est cohérent avec l'observation précédente, indiquant que le solvate semble être fortement favorisé dans l'éthanol par rapport aux formes non solvatées.

Ces expériences sur le Rimonabant ont permis de montrer que les deux formes (I et II) pouvaient cristalliser dans l'acétonitrile pour une même condition, et que seul le solvate cristallisait dans l'éthanol. Cependant, le faible taux de nucléation ne permet pas d'établir des statistiques exploitables, contrairement au Sulfathiazole dont le taux de nucléation est plus élevé (cf. Partie D – 3.1.).

## 4.2.2. Sulfathiazole

### 4.2.2.1. Dans l'eau

#### (a) Rampe rapide (-5 °C/h)

Pour le Sulfathiazole dans l'eau, après une rampe de 70 °C à 10 °C de -5 °C/h, et trois jours de maintien à 10 °C, 50% des gouttes ont nucléé. 319 gouttes ont été analysées par spectroscopie Raman, dont 162 contenant des cristaux. Ici, nous nous intéressons au pourcentage de chacune des phases ayant nucléé parmi ces 162 gouttes.

Les pourcentages des formes obtenues sont représentés sur la Figure 140 :

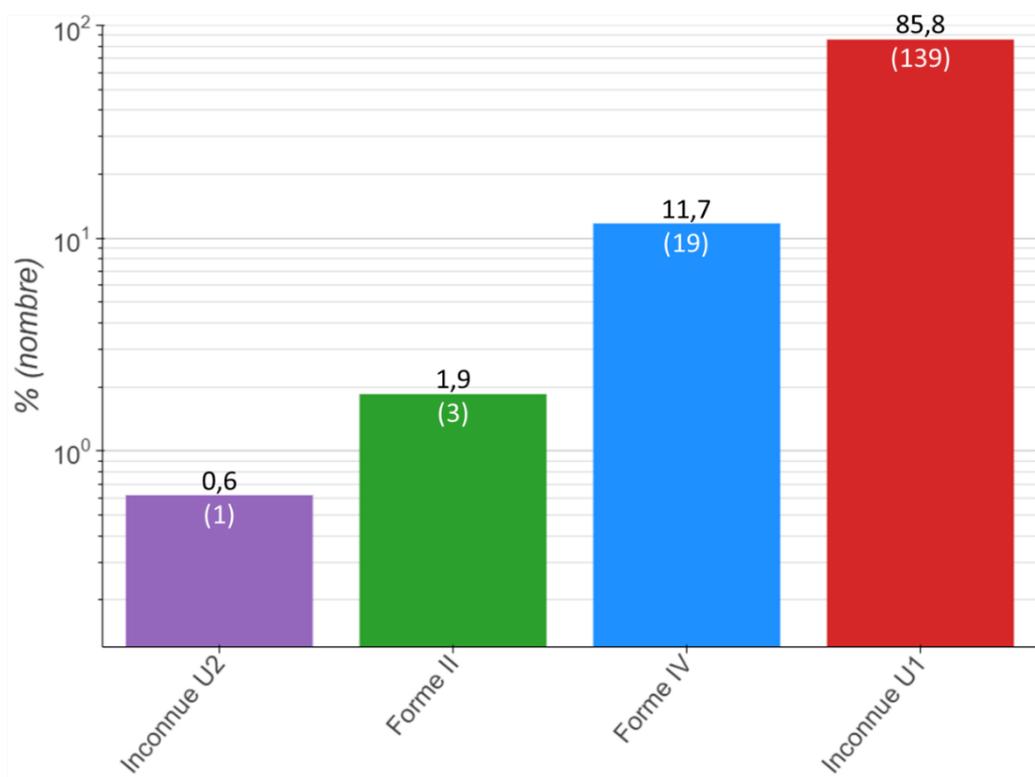
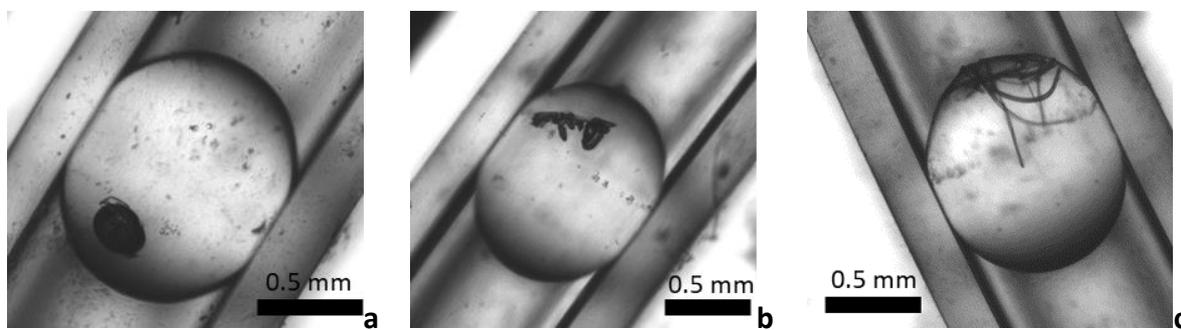


Figure 140 : Pourcentage (et nombre) de cristaux de Sulfathiazole : formes II, IV et formes inconnues U1 et U2 parmi les gouttes cristallisées dans l'eau avec une rampe de -5 °C/h de 70 à 10 °C, 51 % de gouttes ayant nucléé.

- Les formes II et IV représentent respectivement 1,9% et 11,7% des cristaux. Ces deux formes ne présentent pas de faciès bien défini et ne peuvent donc pas être distinguées optiquement (Figure 141a).

- Une forme inconnue appelée U1 ici, correspond à la majorité des cristaux (85,8%), qui présentent un faciès cristallin reconnaissable (Figure 141b), déjà observé par Peybernès [56] dans quelques gouttes d'expériences préliminaires. Cependant, aucune analyse DRX n'avait été faite, et la forme avait été identifiée comme proche de la forme I par son spectre Raman (Figure 142). Certains cristaux ont été isolés pour une mesure DRX (Figure 143). Le diffractogramme obtenu ne correspond à aucune forme reportée dans la Cambridge Structural Database pour le Sulfathiazole (Figure 143).

- Un dernier cristal, appelé U2 ici, a également présenté un signal Raman légèrement différent des autres. Cependant, à cause de la petite taille et du faciès en aiguilles du cristal (Figure 141c), il n'a pas pu être collecté pour une analyse DRX dans cette expérience.



*Figure 141 : Faciès cristallins des cristaux de Sulfathiazole dans l'eau obtenus principalement pour les cristaux de formes (a) II et IV ; (b) inconnue U1 ; (c) inconnue U2.*

Les spectres Raman des différentes formes du Sulfathiazole rencontrées lors de cette thèse sont représentés sur la Figure 142.



Figure 142: Spectres Raman des différentes formes cristallines du Sulfathiazole mesurées sur des cristaux obtenus dans des gouttes d'eau avec le spectromètre QPro (785 nm).

Les diffractogrammes RX des différentes formes du Sulfathiazole rencontrées lors de cette thèse sont représentés sur la Figure 143 et comparés aux diffractogrammes de poudre calculés pour les formes de référence de la Cambridge Structural Database.



Figure 143 : Diffractogrammes RX des différentes formes cristallines du Sulfathiazole. SUTHAZ, SUTHAZ01, SUTHAZ02, SUTHAZ04 et SUTHAZ05 sont les références issues de la Cambridge Structural Database. U1, U2 et U3 ont été mesurés sur les formes inconnues des cristaux obtenus dans des gouttes d'eau.

Afin d'étudier la stabilité relative de la forme U1 par rapport aux formes connues, une expérience de dissolution complémentaire a été menée. Un morceau de la spirale contenant les gouttes avec des cristaux de forme U1 a été isolé et scellé à ses deux extrémités. Deux cristaux d'intérêt, contenus dans des gouttes voisines, ont été sélectionnés après analyse Raman, l'un de forme U1, l'autre de forme IV. Les deux gouttes ayant été générées dans les mêmes conditions, les concentrations en Sulfathiazole à l'intérieur de celles-ci sont considérées comme identiques (modulo la consommation de matière par le cristal). L'objectif de cette expérience est d'étudier la température de dissolution de chacun de ces cristaux, afin de déterminer lequel a la plus faible, et est donc le moins stable.

Le morceau de capillaire a été placé dans la cuve thermostatée à 25 °C et progressivement chauffé jusqu'à 72 °C (Figure 144a). Les deux gouttes sélectionnées, contenant les cristaux, ont été observées durant tout le chauffage et des photos ont été prises toutes les 2 à 4 minutes afin de suivre la dissolution des cristaux (Figure 144b-c). Le cristal de forme U1 a été complètement dissout autour de 65 °C tandis que le cristal de forme IV s'est dissout autour de 70°. Cela montre que la forme U1 a une solubilité plus élevée que la forme IV à haute température, et donc que la forme II, dont la solubilité est proche de celle de la forme IV [72].

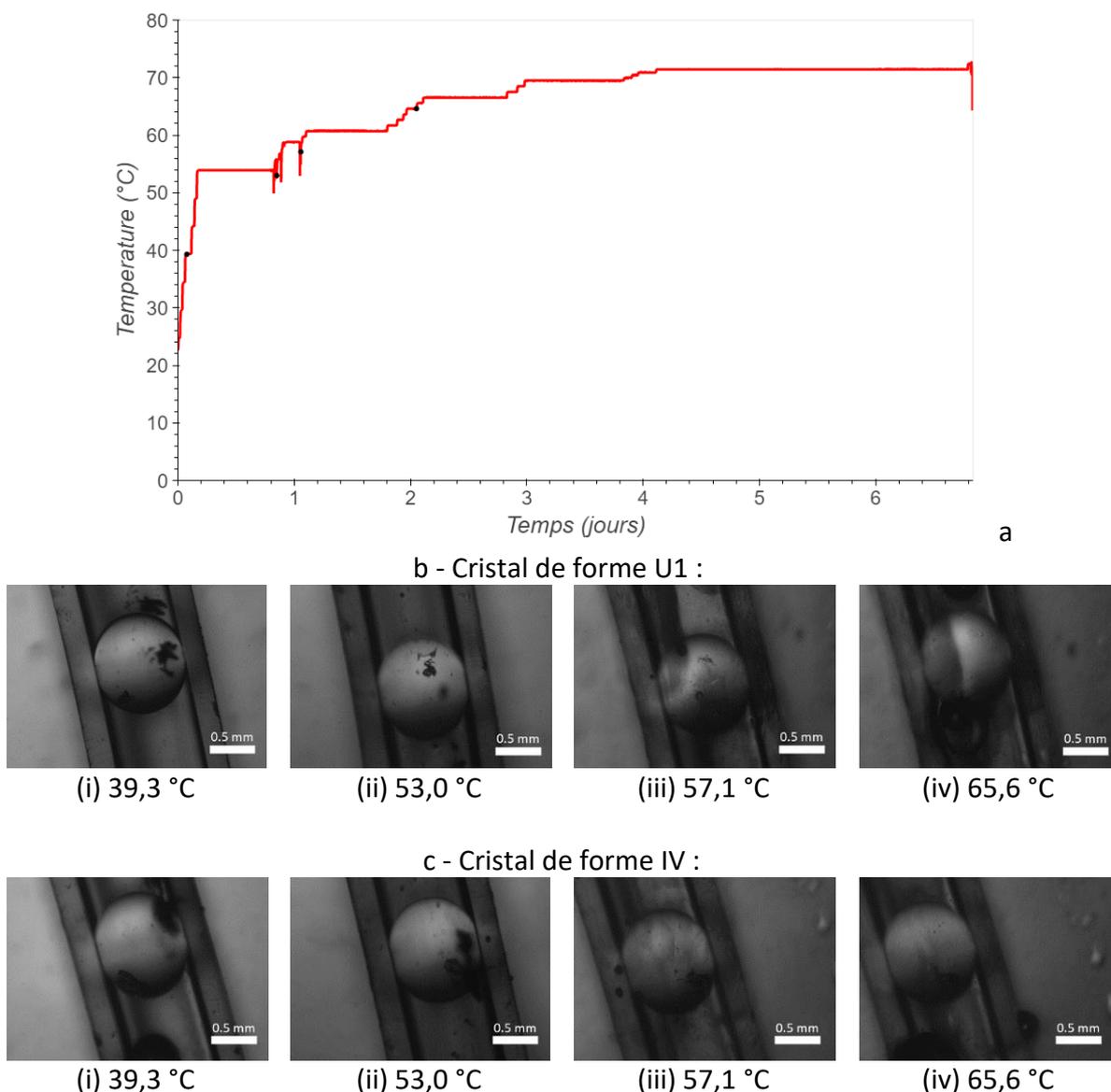


Figure 144 : (a) Profil de température pour la dissolution des cristaux de formes U1 et IV du Sulfathiazole dans l'eau. Les points noirs indiquent les températures correspondant aux photos représentées en (b) et (c) pour les deux cristaux. (b) et (c) Photos des cristaux de Sulfathiazole, forme U1 (b) et forme IV (c) observés lors de leur dissolution à différentes températures : (i) 39,3 °C, (ii) 53,0 °C, (iii) 57,1 °C, (iv) 65,6 °C. La barre d'échelle correspond à 0,5 mm.

Les statistiques obtenues ici (Figure 140) sont en accord avec l'ordre de stabilités établi par Munroe et al. [72], avec la forme II plus stable que la forme IV, et la nouvelle forme U1 métastable par rapport aux formes II et IV. En effet, ce criblage met en évidence une

compétition entre l'effet cinétique et l'effet thermodynamique. Les premiers cristaux ayant nucléé sont de formes II et IV, qui sont thermodynamiquement plus stable. Au contraire, la forme U1 apparaît après plusieurs heures voire plusieurs jours, lors du maintien des gouttes à 10 °C. Lors du refroidissement, la sursaturation augmente ce qui déplace les conditions expérimentales sur le diagramme de phase d'un état sous-saturé ou à saturation, vers un état sursaturé, en traversant d'abord les courbes de solubilité des formes II et IV respectivement, puis celle de la forme U1. Il en va de même pour les limites de zones métastables pour les trois formes (dont on n'a pas connaissance a priori). Cela peut expliquer pourquoi, au début de la nucléation, les formes les plus stables (II et IV) nucléent : la sursaturation par rapport à ces formes est plus élevée que par rapport à celle des formes plus métastables. Cependant, après un temps de latence, l'effet cinétique prend le dessus sur la thermodynamique, ce qui conduit à la nucléation de la forme métastable U1, en accord avec la règle d'Ostwald, dont l'équilibre est plus proche de l'état sursaturé de la goutte.

La forme U2 ayant cristallisé dans une unique goutte, elle n'est pas considérée dans cette discussion.

### (b) Rampe lente (-0,5 °C/h)

Pour la seconde expérience de criblage sur le Sulfathiazole dans l'eau, après une rampe de 70 °C à 10 °C de -0,5 °C/h, et un jour de maintien à 10 °C, 100% des gouttes ont nucléé. Ainsi, 453 gouttes contenant des cristaux ont été analysées.

Les pourcentages des formes obtenues sont représentés sur la Figure 145 :

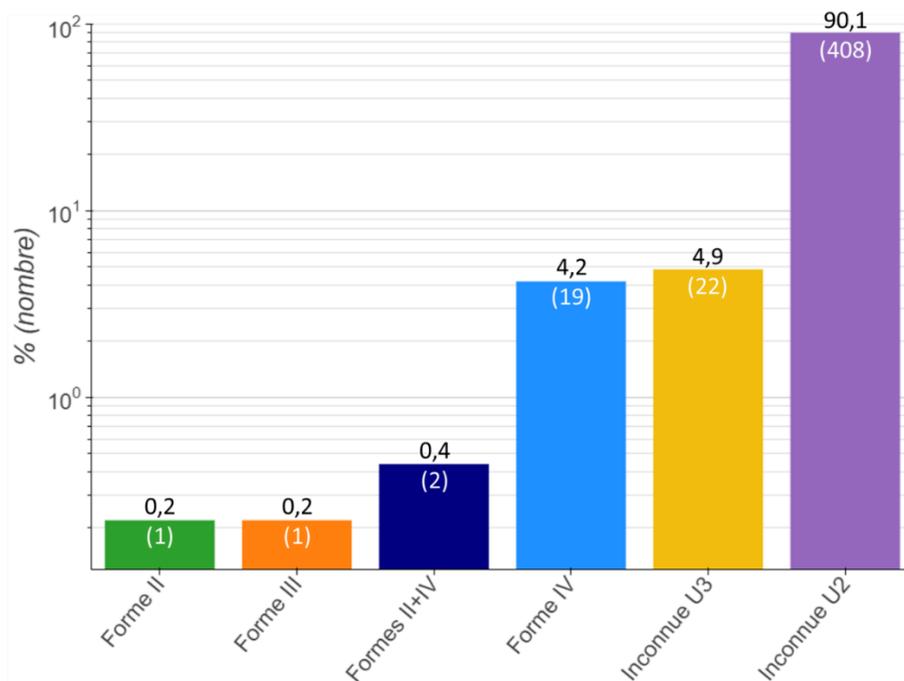
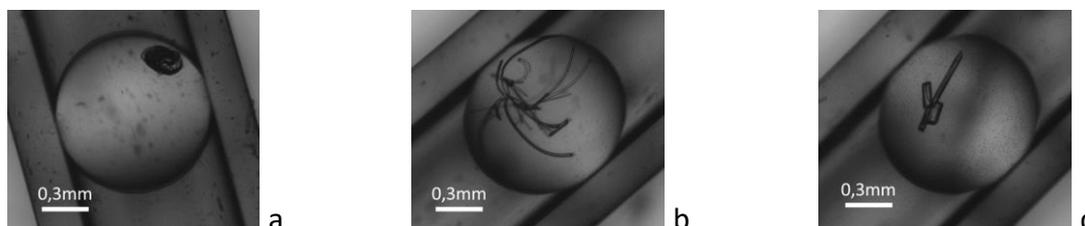


Figure 145 : Pourcentage (et nombre) de cristaux de Sulfathiazole : formes II, III, IV, mélange II+IV et formes inconnues U1, U2 et U3 parmi les gouttes cristallisées dans l'eau avec une rampe de -0,5 °C/h de 70 à 10 °C, 100 % des gouttes ayant nucléé.

- Les formes II et III ont chacune nucléé une seule fois dans des gouttes séparées (0,2 %) tandis que la forme IV représente 4,2% des cristaux. Deux cristaux ont également été analysés comme des polycristaux composés de mélanges de formes II et IV. Cependant, aucune de ces formes ne présente de faciès caractéristique, ce qui empêche de les distinguer optiquement (Figure 146a).

- La majorité des cristaux (90,1%) est de la forme inconnue U2, décrite précédemment. Les cristaux de cette forme présentent le faciès caractéristique déjà obtenu, représenté en Figure 146b. Pour cette expérience, des cristaux ont pu être récupérés et analysés par DRX. Le diffractogramme obtenu est tracé sur la Figure 143.

- Enfin, 4,9% des cristaux se sont avérés être d'une nouvelle forme cristalline, appelée U3 ici, dont ni le spectre Raman (Figure 142), ni le diffractogramme RX (Figure 143) ne correspondent à des formes répertoriées. Les cristaux de cette nouvelle forme présentent un faciès bien facetté, tels que celui représenté sur la Figure 146c.



*Figure 146 : Faciès cristallins majoritairement obtenus pour les cristaux de (a) formes II, III et IV, (b) forme inconnue U2 et (c) forme inconnue U3 du Sulfathiazole dans l'eau.*

De même que lors du criblage précédent, les formes connues II, III et IV ont nucléé avant les formes inconnues les plus représentées, U2 et U3, qui ne sont apparues que lors de la seconde vague de nucléation (Partie D – 3.1.1.2.). Cela pourrait également s'expliquer par une compétition entre la thermodynamique et la cinétique comme expliqué dans le paragraphe Partie D – 4.2.2.1.(a). La forme U1 n'a quant à elle pas nucléé lors de cette expérience.

Bien que le Sulfathiazole soit connu pour former de nombreux solvates, aucun hydrate n'est répertorié dans la CSD. Une hypothèse pourrait être que les formes U1, U2 et U3, qui n'ont été observées que dans l'eau, soient des hydrates. Cela n'a pas été vérifié ici, des études complémentaires, qui nécessitent de plus grandes quantités de matière, doivent être menées afin de caractériser plus précisément ces nouvelles formes (analyses thermiques (DSC, TGA), diffraction RX sur monocristal...).

#### **4.2.2.2. Dans l'acétonitrile**

Pour le Sulfathiazole dans l'acétonitrile, le refroidissement par une trempe n'ayant pas donné de cristaux, seul le refroidissement par la rampe sera présenté ici. Après un refroidissement par une rampe de -5 °C/h et un maintien des gouttes à 10 °C pendant 11 jours, 345 gouttes sur les 465 produites ont été analysées, dont les 89 contenant des cristaux (19%). Il faut noter que les gouttes non analysées sont des gouttes sans cristaux.

Les cristaux obtenus dans l'acétonitrile présentent des faciès variés (Figure 147), et la taille des cristaux est plus importante que celle des cristaux obtenus dans l'eau. Cela était attendu,

car la solubilité du Sulfathiazole est beaucoup plus importante dans l'acétonitrile à 70 °C que dans l'eau, et donc il en va de même pour la concentration dans les gouttes. Ainsi, même si les sursaturations atteintes sont plus élevées dans l'eau, les quantités de matière disponibles pour la croissance des cristaux sont plus importantes dans l'acétonitrile (cf. Partie A – 1.1.1.2., Figure 2).

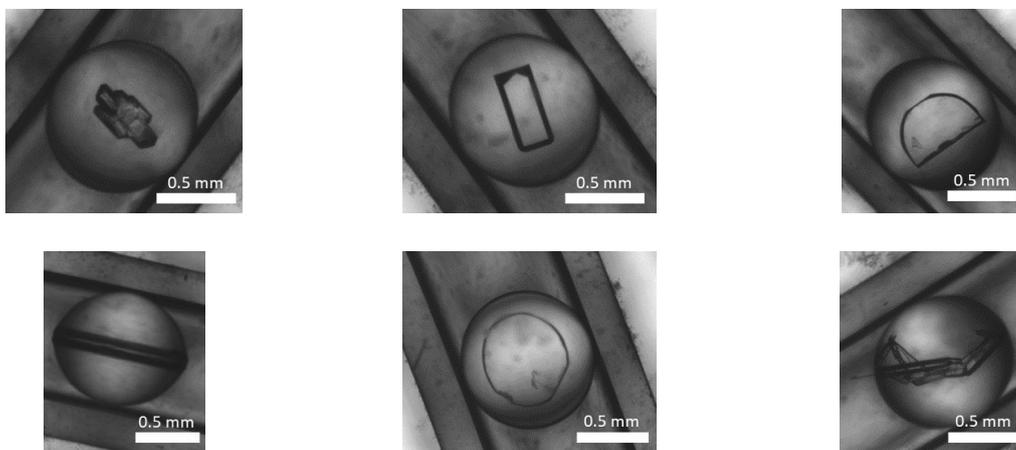


Figure 147 : Exemples de faciès cristallins de cristaux de Sulfathiazole cristallisés dans l'acétonitrile avec une rampe de 70 °C à 10 °C de vitesse -5 °C/h.

L'analyse Raman des cristaux obtenus a permis d'identifier deux cristaux de forme IV (soit 2%) et un cristal présentant les pics des formes II et IV, le reste des cristaux analysés étant de forme II (86/89 cristaux, soit 97% des cristaux).

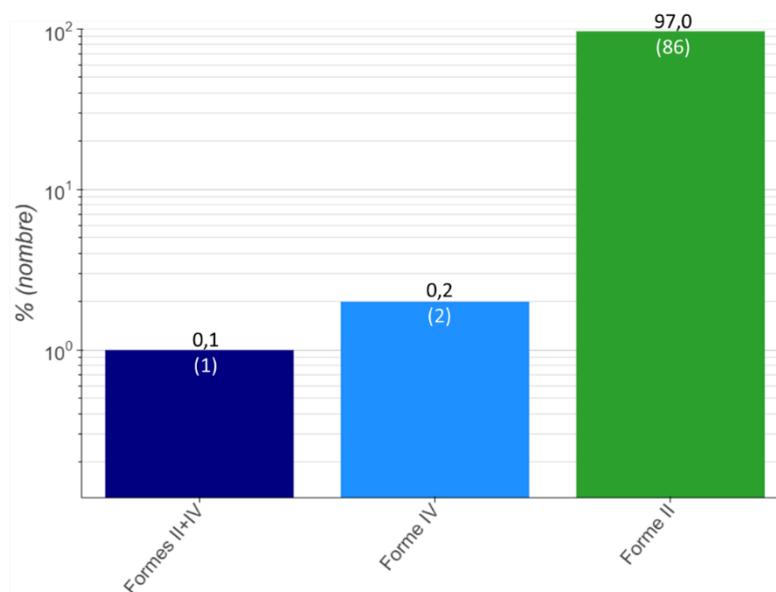


Figure 148 : Pourcentage (et nombre) de cristaux de Sulfathiazole formes II+IV, IV et II parmi les gouttes cristallisés dans l'acétonitrile avec une rampe de -5 °C/h de 70 à 10 °C, 19 % des gouttes ayant nucléé.

Ce résultat est cohérent avec les résultats de Peybernès [56] qui n'avait obtenu que des cristaux de forme II dans l'acétonitrile, avec un refroidissement plus lent. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un refroidissement lent favorise généralement la nucléation de la forme stable.

## Conclusion

Dans cette partie, j'ai abordé des questions hydrodynamiques (formation de gouttes), thermodynamiques (courbes de solubilité) et cinétiques (de nucléation et sur le polymorphisme). J'ai d'abord montré l'importance de l'hydrodynamique sur la formation des gouttes (sans tensioactif). Ainsi, la génération des gouttes va principalement dépendre du solvant choisi, de son énergie interfaciale  $\gamma_{CD}$  avec l'huile, de la viscosité de l'huile qui permet de s'affranchir des tensioactifs, des valeurs de débits appliquées et de la température. Dans certains cas, la nature du soluté et sa concentration dans le solvant vont également fortement influencer la génération et la manipulation des gouttes, comme c'est le cas pour l'Aripiprazole qui semble avoir un fort effet tensioactif. Les mesures à température ambiante présentées dans cette thèse suivent le modèle empirique proposé par Zhang [35], qui permet de relier les tailles et fréquences des gouttes générées au nombre capillaire, et donc aux débits appliqués lors de la génération pour un solvant et une huile donnés.

De plus, pour l'ajout d'un non-solvant, ou l'utilisation d'un deuxième flux pour la génération des gouttes, nous avons montré que la géométrie en Y était plus appropriée, et permettait d'avoir un meilleur contrôle sur la formation de gouttes régulières et homogènes et ceci sans utiliser de tensioactif. Dans cette thèse, l'approche pour le choix de la géométrie a été purement qualitative. La compréhension de l'hydrodynamique à l'intérieur des jonctions en croix et de la jonction multiport pour la géométrie en Y permettraient d'avoir un meilleur contrôle sur la génération des gouttes, de même que la composition d'un éventuel mélange de solvants et leurs énergies interfaciales respectifs [86].

Après cette partie de mise au point de la méthode de génération des gouttes, j'ai réalisé des mesures de solubilité à partir d'une poudre dans un montage microfluidique. Ces mesures ont été réalisées sur différentes formes de principes actifs pharmaceutiques dans des solvants organiques. Nous avons montré que la méthode permettait de mesurer les solubilités de formes stables et métastables dans différentes gammes de concentration et de température. Dans le cas de l'Irbesartan notamment, les courbes de solubilités des deux desmotropes sont bien distinctes. Avec l'exemple de l'Aripiprazole, nous avons également montré que la méthode peut être utilisée sur un mélange de polymorphes, en obtenant une forme pure par transition de phase dont on peut ensuite mesurer la solubilité. Cependant, lors d'une transition de phase rapide, comme la solvatation du Rimonabant pour former l'éthanoate, il peut être compliqué de mesurer les solubilités des autres formes existantes, à cause de la rapidité de leur transformation. Pour la suite, la mesure de solubilité sur d'autres types de phases cristallines, comme des sels ou des cocristaux, peut être intéressante. On peut également envisager des mesures de solubilité pour des mélanges de solvant avec des gradients de composition par exemple pour comprendre l'influence du mélange eau-acétonitrile sur la solubilité du Rimonabant. De façon générale, ces gradients de composition pourraient aller jusqu'à un changement total de solvant, lorsqu'il n'y a pas de transition de phase rapide.

Enfin, j'ai étudié des cinétiques et statistiques globales de nucléation en microfluidique, de différents principes actifs modèles : Rimonabant, Aripiprazole et Sulfathiazole, dans plusieurs solvants (Acétonitrile, eau, mélange eau-acétonitrile, éthanol, 1-butanol et DMSO et 2-propanol). Pour le Sulfathiazole dans l'eau et l'acétonitrile, j'ai montré que la vitesse de refroidissement avait une influence sur le taux de nucléation. Ainsi, les refroidissements plus lents semblent favoriser la nucléation tandis que les refroidissements rapides semblent réduire le nombre de cristaux obtenus. Cela peut s'expliquer en considérant la force motrice de la cristallisation  $\Delta\mu$  qui possède une valeur maximale pour des températures intermédiaires, ce qui indique que la nucléation est favorisée à ces températures, c'est-à-dire au cours d'un refroidissement lent, plutôt qu'à des températures plus faibles. Une autre explication possible se base sur la cinétique de nucléation, car la fréquence de nucléation  $J$  diminue avec la température, à sursaturation constante.

De plus, dans la plupart des cas, notamment pour le Rimonabant et l'Aripiprazole, très peu d'évènements de nucléation sont observés, quels que soient le solvant ou le profil de température utilisés. Cela illustre une limite de la microfluidique pour la cristallisation par refroidissement : plus le volume  $V$  du cristalliseur est petit, plus le temps d'induction de la nucléation ( $t_N$ ) augmente, c'est ce que l'on appelle le confinement cinétique ( $t_N=1/JV$ ). Des sursaturations suffisamment élevées doivent donc être atteintes pour obtenir la nucléation de cristaux dans un temps raisonnable. Différentes techniques de cristallisation ont déjà été étudiées pour atteindre des sursaturations plus élevées. Dans le cas de cette thèse, nous avons étudié l'ajout d'un non-solvant dans les gouttes. Cependant, des mesures de solubilité complémentaire sont nécessaires afin d'étudier l'influence du mélange de solvants sur la solubilité du produit. D'autres méthodes comme l'évaporation de gouttes [32], [87] ou l'utilisation d'un champ externe afin d'induire la nucléation [44], [45], [48], [49] ont déjà été explorées au laboratoire ou dans la littérature, et des améliorations futures sont envisagées pour l'implémentation de ces techniques sur la plateforme microfluidique.

En plus des statistiques globales de nucléation, j'ai aussi étudié les statistiques de nucléation des phases et/ou des polymorphes, dans le but de comprendre les mécanismes qui régissent la nucléation d'une phase stable ou métastable au-delà de la règle des phases d'Ostwald. Dans le cas du Rimonabant, les deux polymorphes connus ont été obtenus dans l'acétonitrile. De plus, dans l'éthanol, le solvate semble être fortement favorisé, comme cela a déjà été mis en évidence par l'observation d'une transition de phase dans le lit de poudre et l'obtention de cristaux de solvate dans l'éthanol. Cependant, le faible taux de nucléation n'a pas permis de conclure quant à l'influence des différents paramètres sur le polymorphisme.

En revanche dans le cas du Sulfathiazole, le criblage des polymorphes dans l'eau a permis de montrer que la vitesse de refroidissement avait une influence sur les formes obtenues. Trois nouvelles formes cristallines ont été identifiées, présentant des diffractogrammes RX et des spectres Raman ne correspondant à aucune forme répertoriée dans la CSD. Un approfondissement est nécessaire afin d'identifier ces formes, qui pourraient être des hydrates, car elles n'ont été observées que dans l'eau. Une compétition entre la thermodynamique et la cinétique de cristallisation a été mise en évidence par l'apparition des

formes stables connues dans un premier temps, puis l'apparition plus tardive mais majoritaire des formes métastables et/ou inconnues dans un second temps. Dans l'acétonitrile, seules des formes connues ont été obtenues, la forme II étant majoritaire, comme l'avait déjà observé Peybernès [56].

Tous ces résultats montrent que la plateforme microfluidique développée au cours de ma thèse est un outil puissant pour le criblage de polymorphes et le contrôle des phases par une meilleure compréhension de l'influence des paramètres expérimentaux sur leur nucléation. Cette plateforme peut être utilisée dans les laboratoires de recherche de l'industrie pharmaceutique pour découvrir de nouvelles formes cristallines de principes actifs pharmaceutiques. C'est dans cet objectif que j'ai dupliqué la plateforme sur le site de Sanofi à Vitry-sur-Seine afin d'être utilisée en routine pour l'étude de l'état solide des nouvelles molécules en développement.

---

*Conclusion générale et  
perspectives*

---

## Conclusion générale de la thèse

Dans la partie bibliographique, j'ai mis en évidence l'intérêt pour l'industrie pharmaceutique d'étudier le polymorphisme des nouvelles molécules dès le début du développement d'un médicament, de manière la plus exhaustive possible. Les criblages classiques utilisent des quantités importantes de matière première, limitant ainsi le nombre de conditions testées. L'aspect stochastique de la nucléation n'est pas non plus pris en compte. Afin de réduire la quantité de produit utilisée pour le criblage, la microfluidique à base de gouttes s'avère être une solution particulièrement intéressante. En effet, elle permet d'utiliser plusieurs centaines de gouttes, isolées les unes des autres par un volume d'huile, considérés comme des cristallisoirs indépendants de volume nanométrique (500 nL ici). Cela permet à la fois d'augmenter le nombre de conditions testées, et le nombre de répétitions d'expériences pour une même condition, apportant une approche statistique sur la nucléation. Des systèmes « *Plug and Play* » à base de capillaires et jonctions en Téflon ont été proposés pour diverses applications, grâce à leur grande résistance chimique, leur facilité d'utilisation et leur modularité.

Le premier objectif de la thèse est donc de développer une plateforme microfluidique complète en utilisant ces composants, facile d'utilisation et d'installation en laboratoire industriel pour le criblage de l'état solide de molécules d'intérêt pharmaceutique. En particulier, la caractérisation en ligne des gouttes et des cristaux est un aspect majeur étudié lors de cette thèse. Le second objectif est d'étudier et comprendre la nucléation des différentes phases cristallines de principes actifs à partir de données expérimentales obtenues sur la plateforme. Cela passe par l'établissement des diagrammes de phase et des statistiques de nucléation globales (toutes phases confondues) et phase par phase.

J'ai ainsi développé une plateforme composée de différents modules :

- Un module de génération des solutions et des gouttes, permettant de générer des solutions saturées directement à partir d'un lit de poudre, à différentes températures, et de les diluer, de générer des gouttes saturées et d'ajouter un non-solvant.
- Un module de caractérisation UV utilisé pour la mesure de solubilités ou pour la caractérisation des gouttes générées (taille et fréquence).
- Un module de stockage et refroidissement des gouttes, dans lequel les gouttes saturées sont soumise à différents profils de température permettant de générer de la sursaturation et ainsi d'induire la nucléation des principes actifs.
- Un module d'observation automatisé, permettant d'observer l'ensemble des gouttes au cours de leur refroidissement. Cela permet de suivre les phénomènes de nucléation au cours du temps et en fonction de la température, et ainsi établir des statistiques sur la nucléation globale dans les gouttes (toutes phases confondues).
- Un module de caractérisation Raman, utilisant un système à fibres optiques, pour la caractérisation des cristaux dans les gouttes (*in situ*), afin de distinguer les différentes

phases cristallines. L'analyse statique (*offline*) de séries de gouttes permet ainsi de compléter les statistiques globales de nucléation par des statistiques d'apparition phase par phase des cristaux.

Cette plateforme m'a permis de mesurer les solubilités de 3 principes actifs pharmaceutiques modèles impliquant du polymorphisme : l'Irbesartan, l'Aripiprazole et le Rimonabant. J'ai montré que la méthode permettait de mesurer les solubilités de formes stables et métastables dans différentes gammes de concentration et de température. Dans le cas de l'Irbesartan notamment, les courbes de solubilités des deux desmotropes sont bien distinctes. Avec l'exemple de l'Aripiprazole, j'ai également montré que la méthode peut être utilisée sur un mélange de polymorphes, en obtenant une forme pure par transition de phase dont on peut ensuite mesurer la solubilité. Cependant, lors d'une transition de phase rapide, comme la solvatation du Rimonabant pour former l'éthanoate, il peut être compliqué de mesurer les solubilités des autres formes existantes, à cause de la rapidité de leur transformation.

J'ai également utilisé la plateforme pour faire des criblages sur l'Aripiprazole, le Rimonabant et le Sulfathiazole dans plusieurs solvants organiques (Acétonitrile, eau, mélange eau-acétonitrile, éthanol, 1-butanol et DMSO et 2-propanol). L'étude des statistiques globales de nucléation m'a permis de montrer, avec le cas du Sulfathiazole, que la vitesse de refroidissement avait une influence sur le taux de nucléation. Ainsi, les refroidissements plus lents semblent favoriser la nucléation tandis que les refroidissements rapides semblent réduire le nombre de cristaux obtenus. Cela peut s'expliquer en considérant la force motrice de la cristallisation  $\Delta\mu$  qui possède une valeur maximale pour des températures intermédiaires, ce qui indique que la nucléation est favorisée à ces températures, c'est-à-dire au cours d'un refroidissement lent, plutôt qu'à des températures plus faibles. Une autre explication possible se base sur la cinétique de nucléation, car la fréquence de nucléation  $J$  varie également en fonction de la température. En revanche, avec le Rimonabant et l'Aripiprazole, j'ai pu mettre en évidence l'influence du confinement (réduction du volume) sur la nucléation : très peu d'évènements de nucléation sont observés, quels que soient le solvant ou le profil de température utilisés. J'ai étudié l'ajout d'un non-solvant (eau) dans les gouttes d'acétonitrile saturé en Rimonabant, cependant, des mesures de solubilité complémentaire sont nécessaires afin d'étudier l'influence du mélange de solvants sur la solubilité du produit.

En plus des statistiques globales de nucléation, j'ai aussi étudié les statistiques de nucléation des phases et/ou des polymorphes. Dans le cas du Rimonabant, les deux polymorphes connus ont été observés dans l'acétonitrile. De plus, dans l'éthanol, le solvate semble être fortement favorisé, comme cela a déjà été mis en évidence par l'observation d'une transition de phase dans le lit de poudre et l'obtention de cristaux de solvate dans l'éthanol. Cependant, le faible taux de nucléation n'a pas permis de conclure quant à l'influence des différents paramètres sur le polymorphisme.

En revanche dans le cas du Sulfathiazole, les criblages des polymorphes dans l'eau et l'acétonitrile ont permis de montrer que la vitesse de refroidissement avait une influence sur

les formes obtenues. Trois nouvelles formes cristallines ont ainsi été identifiées dans l'eau. Une compétition entre la thermodynamique et la cinétique de cristallisation a été mise en évidence par l'apparition des formes stables connues dans un premier temps, puis l'apparition plus tardive mais majoritaire des formes métastables et/ou inconnues dans un second temps.

Ces résultats montrent que la plateforme microfluidique développée au cours de ma thèse est un outil puissant pour le criblage de polymorphes, pouvant être utilisée dans les laboratoires de recherche de l'industrie pharmaceutique pour identifier de nouvelles formes cristallines de molécules en développement. Dans cet objectif, j'ai dupliqué la plateforme modulable dans un laboratoire de Sanofi R&D (Vitry-sur-Seine) afin qu'elle puisse être utilisée en routine pour les mesures de solubilité et le criblage de l'état solide des nouvelles molécules.

## Perspectives

A l'issue de cette thèse, différentes perspectives peuvent être envisagées :

- Tout d'abord, j'ai montré que j'avais développé un outil puissant pour étudier la cristallisation de molécules organiques, qui peut également s'utiliser sur tous types de molécules. Cet outil devrait permettre dans le futur de produire des données robustes et reproductibles sur les cinétiques de nucléation des différentes phases afin de comprendre les règles et mécanismes gérant leur nucléation concurrente ou concomitante.
- J'ai également montré que l'effet de confinement causé par la réduction du volume pouvait fortement ralentir la nucléation. En plus de l'ajout d'un non-solvant, il existe différentes méthodes permettant d'augmenter la sursaturation ou d'induire la nucléation. L'évaporation de gouttes [32], [87] ou l'utilisation d'un champ externe [44], [45], [48], [49] sont actuellement étudiées au laboratoire. Des améliorations futures sont envisagées pour l'implémentation de ces techniques sur la plateforme microfluidique.
- En plus de cela, il serait intéressant de mesurer les énergies interfaciales entre les huiles et les solvants à haute température. Cela permettrait d'une part de compléter le modèle proposé par Zhang et al. [35] pour prédire les tailles et les fréquences des gouttes en fonction des débits utilisés et en fonction de la température, et d'autre part, cela permettrait de pouvoir mesurer des énergies interfaciales avec des solutions concentrées en principes actifs à haute température, et mettre en évidence une éventuelle modification de l'énergie interfaciale dans certains cas (effet tensioactif).
- Enfin, l'automatisation de l'analyse Raman pour une analyse dynamique (online) serait une amélioration majeure pour l'utilisation en routine. Cependant, comme je l'ai souligné, plusieurs difficultés sont à prendre en compte, comme la vitesse de déplacement des gouttes et le positionnement des cristaux devant le laser. Un travail approfondi sur ce sujet pourrait permettre à terme de proposer une solution adaptée pour cette analyse dynamique.
- D'autre part, en ce qui concerne les mesures de solubilité, il pourrait être envisagé de mesurer les solubilités d'autres types de phases cristallines, comme des sels ou des cocristaux. On peut également penser à mesurer des solubilités dans des mélanges de solvant avec des gradients de composition, pouvant aller jusqu'à un changement total de solvant lorsqu'il n'y a pas de transition de phase rapide. Cela permettrait de mettre en évidence une influence de la composition du mélange de solvants sur la solubilité du produit, et ainsi permettre de choisir des conditions optimales pour l'ajout d'un non-solvant.

# Références

- [1] M. Bauer, "Cristallisation et polymorphisme Description du phénomène," *Techniques de l'ingénieur États de la matière*, vol. base documentaire : TIB109DUO., no. ref. article : af3640. Editions T.I., 2004. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/etats-de-la-matiere-42109210/cristallisation-et-polymorphisme-af3640/>
- [2] N. Broll, "Caractérisation de solides cristallisés par diffraction X," *Techniques de l'ingénieur Études de structure et caractérisation*, vol. base documentaire : TIB386DUO., no. ref. article : p1080. Editions T.I., 1996. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/etudes-de-structure-et-caracterisation-42386210/caracterisation-de-solides-cristallises-par-diffraction-x-p1080/>
- [3] J. Halebian and W. McCrone, "Pharmaceutical applications of polymorphism," *J. Pharm. Sci.*, vol. 58, no. 8, pp. 911–929, 1969, doi: 10.1002/jps.2600580802.
- [4] S. R. Chemburkar *et al.*, "Dealing with the Impact of Ritonavir Polymorphs on the Late Stages of Bulk Drug Process Development," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 4, no. 5, pp. 413–417, Sep. 2000, doi: 10.1021/op000023y.
- [5] J. Bauer *et al.*, "Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism," *Pharm. Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 859–866, 2001.
- [6] G. Peybernès *et al.*, "Microfluidics set-up rapidly measures solubility directly from powder," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 22, pp. 1856–1860, Nov. 2018, doi: 10.1021/acs.oprd.8b00300.
- [7] G. Peybernès, R. Grossier, F. Villard, P. Letellier, N. Candoni, and S. Veessler, "Microfluidics Platform for Polymorph Screening Directly from Powder," *Cryst. Growth Des.*, vol. 20, no. 6, pp. 3882–3887, Jun. 2020, doi: 10.1021/acs.cgd.0c00181.
- [8] D. J. W. Grant, M. Mehdizadeh, A. H.-L. Chow, and J. E. Fairbrother, "Non-linear van't Hoff solubility-temperature plots and their pharmaceutical interpretation," *Int. J. Pharm.*, vol. 18, no. 1, pp. 25–38, Jan. 1984, doi: 10.1016/0378-5173(84)90104-2.
- [9] R. Boistelle, "Concepts de la cristallisation en solution," in *Actualités Néphrologiques*, Flammarion Médecine Sciences., Crosnier J. *et al.*, Ed. 1985, pp. 159–202.
- [10] S. Karthika, T. K. Radhakrishnan, and P. Kalaichelvi, "A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories," *Cryst. Growth Des.*, vol. 16, no. 11, pp. 6663–6681, Nov. 2016, doi: 10.1021/acs.cgd.6b00794.
- [11] D. Kashchiev and G. M. van Rosmalen, "Review: Nucleation in solutions revisited," *Cryst. Res. Technol.*, vol. 38, no. 7–8, pp. 555–574, Jul. 2003, doi: 10.1002/crat.200310070.
- [12] D. Mangin, F. Puel, and S. Veessler, "Polymorphism in Processes of Crystallization in Solution: A Practical Review," *Org. Process Res. Dev.*, vol. 13, no. 6, pp. 1241–1253, Nov. 2009, doi: 10.1021/op900168f.
- [13] A. M. Araya-Sibaja *et al.*, "Irbesartan desmotropes: Solid-state characterization, thermodynamic study and dissolution properties," *J. Pharm. Anal.*, vol. 9, no. 5, pp. 339–346, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.jpha.2019.07.001.
- [14] N. Schultheiss and A. Newman, "Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties," *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, no. 6, pp. 2950–2967, Jun. 2009, doi: 10.1021/cg900129f.

- [15] A. M. Reilly *et al.*, “Report on the sixth blind test of organic crystal structure prediction methods,” *Acta Crystallogr. Sect. B*, vol. 72, no. 4, pp. 439–459, Aug. 2016, doi: 10.1107/S2052520616007447.
- [16] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev Mod Phys*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, Oct. 2005, doi: 10.1103/RevModPhys.77.977.
- [17] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, juillet 2006, doi: 10.1038/nature05058.
- [18] H. Shi, Y. Xiao, S. Ferguson, X. Huang, N. Wang, and H. Hao, “Progress of crystallization in microfluidic devices,” *Lab. Chip*, vol. 17, no. 13, pp. 2167–2185, 2017, doi: 10.1039/C6LC01225F.
- [19] J. Puigmartí-Luis, “Microfluidic platforms: a mainstream technology for the preparation of crystals,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 7, pp. 2253–2271, 2014, doi: 10.1039/C3CS60372E.
- [20] L. Li and R. F. Ismagilov, “Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves, Droplets, and SlipChip,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 39, no. 1, pp. 139–158, avril 2010, doi: 10.1146/annurev.biophys.050708.133630.
- [21] W. Du, L. Li, K. P. Nichols, and R. F. Ismagilov, “SlipChip,” *Lab. Chip*, vol. 9, no. 16, pp. 2286–2292, 2009, doi: 10.1039/B908978K.
- [22] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, “Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, Jul. 2002, doi: 10.1021/ar010110q.
- [23] A. R. Abate, D. Lee, T. Do, C. Holtze, and D. A. Weitz, “Glass coating for PDMS microfluidic channels by sol–gel methods,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 4, pp. 516–518, 2008, doi: 10.1039/B800001H.
- [24] N. Candoni, R. Grossier, M. Lagaize, and S. Veessler, “Advances in the Use of Microfluidics to Study Crystallization Fundamentals,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 10, no. 1, pp. 59–83, juin 2019, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-060718-030312.
- [25] M. Ildefonso, E. Revalor, P. Punniyam, J. B. Salmon, N. Candoni, and S. Veessler, “Nucleation and polymorphism explored via an easy-to-use microfluidic tool,” *J. Cryst. Growth*, vol. 342, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.jcrysgro.2010.11.098.
- [26] C. Zhang, R. A. Grossier, L. Lacia, F. Rico, N. A. Candoni, and S. A. Veessler, “A microfluidic method generating monodispersed microparticles with controllable sizes and mechanical properties,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 211, p. 115322, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ces.2019.115322.
- [27] C. J. J. Gerard *et al.*, “A Chemical Library to Screen Protein and Protein–Ligand Crystallization Using a Versatile Microfluidic Platform,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 18, no. 9, pp. 5130–5137, Sep. 2018, doi: 10.1021/acs.cgd.8b00572.
- [28] D. Witters *et al.*, “Digital Microfluidic High-Throughput Printing of Single Metal–Organic Framework Crystals,” *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 10, pp. 1316–1320, Mar. 2012, doi: 10.1002/adma.201104922.
- [29] K. Choi, A. H. C. Ng, R. Fobel, and A. R. Wheeler, “Digital Microfluidics,” *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 413–440, juin 2012, doi: 10.1146/annurev-anchem-062011-143028.
- [30] R. Grossier, Z. Hammadi, R. Morin, A. Magnaldo, and S. Veessler, “Generating nanoliter to femtoliter microdroplets with ease,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 98, no. 9, pp. 091916–3, 2011.
- [31] R. Cedeno, “Development and analysis of methods for quantifying nucleation kinetics in agitated crystallizers and microfluidic systems,” 2021.

- [32] R. Cedeno *et al.*, “Nucleation in sessile saline microdroplets: induction time measurement via deliquescence–recrystallization cycling,” *Faraday Discuss*, vol. 235, no. 0, pp. 183–197, 2022, doi: 10.1039/D1FD00090J.
- [33] D. Knezic, J. Zaccaro, and A. S. Myerson, “Nucleation Induction Time in Levitated Droplets,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 30, pp. 10672–10677, Jul. 2004, doi: 10.1021/jp049586s.
- [34] M. T. Heilmann *et al.*, “Real-Time In situ XRD Study of Simvastatin Crystallization in Levitated Droplets,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 21, no. 8, pp. 4665–4673, Aug. 2021, doi: 10.1021/acs.cgd.1c00509.
- [35] S. Zhang, C. Guivier-Curien, S. Veessler, and N. Candoni, “Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics,” *Chem. Eng. Sci.*, vol. 138, pp. 128–139, décembre 2015, doi: 10.1016/j.ces.2015.07.046.
- [36] A. Dewandre, J. Rivero-Rodriguez, Y. Vitry, B. Sobac, and B. Scheid, “Microfluidic droplet generation based on non-embedded co-flow-focusing using 3D printed nozzle,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, p. 21616, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-77836-y.
- [37] P. Zhu and L. Wang, “Passive and active droplet generation with microfluidics: a review,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 1, pp. 34–75, 2017, doi: 10.1039/C6LC01018K.
- [38] M. Zagnoni, J. Anderson, and J. M. Cooper, “Hysteresis in Multiphase Microfluidics at a T-Junction,” *Langmuir*, vol. 26, no. 12, pp. 9416–9422, Jun. 2010, doi: 10.1021/la1004243.
- [39] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Danga, “Dynamics of microfluidic droplets,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2032–2045, 2010, doi: 10.1039/C001191F.
- [40] J. D. Tice, H. Song, A. D. Lyon, and R. F. Ismagilov, “Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of the Reynolds and the Capillary Numbers,” *Langmuir*, vol. 19, no. 22, pp. 9127–9133, Oct. 2003, doi: 10.1021/la030090w.
- [41] J. Wang, J. Wang, L. Feng, and T. Lin, “Fluid mixing in droplet-based microfluidics with a serpentine microchannel,” *RSC Adv*, vol. 5, no. 126, pp. 104138–104144, 2015, doi: 10.1039/C5RA21181F.
- [42] R. Grossier and S. Veessler, “Reaching One Single and Stable Critical Cluster through Finite-Sized Systems,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 9, no. 4, pp. 1917–1922, avril 2009, doi: 10.1021/cg801165b.
- [43] Z. Hammadi, N. Candoni, R. Grossier, M. Ildefonso, R. Morin, and S. Veessler, “Small-volumes nucleation,” *Comptes Rendus Phys.*, vol. 14, pp. 192–198, 2013.
- [44] E. Revalor *et al.*, “Usual and Unusual Crystallization from Solution,” *J. Cryst. Growth*, vol. 312, pp. 939–946, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.jcrysgr.2010.01.006.
- [45] Z. Hammadi *et al.*, “Localizing and inducing primary nucleation,” *Faraday Discuss.*, vol. 179, no. 0, pp. 489–501, 2015, doi: 10.1039/C4FD00274A.
- [46] D. Kashchiv, “Nucleation in external electric field,” *Third Int. Conf. Cryst. Growth*, vol. 13–14, pp. 128–130, May 1972, doi: 10.1016/0022-0248(72)90074-7.
- [47] A. Katsuki, R. Tokunaga, S. Watanabe, and Y. Tanimoto, “The Effect of High Magnetic Field on the Crystal Growth of Benzophenone,” *Chem. Lett.*, vol. 25, no. 8, pp. 607–608, Aug. 1996, doi: 10.1246/cl.1996.607.
- [48] A. J. Alexander and P. J. Camp, “Non-photochemical laser-induced nucleation,” *J. Chem. Phys.*, vol. 150, no. 4, p. 040901, Jan. 2019, doi: 10.1063/1.5079328.
- [49] T. Sugiyama and S.-F. Wang, “Manipulation of nucleation and polymorphism by laser irradiation,” *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, vol. 52, p. 100530, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2022.100530.

- [50] S. Zhang *et al.*, “Microfluidic platform for optimization of crystallization conditions,” *Ind. Cryst. Precip. Fr. CRISTAL-8 May 2016 Rouen Fr.*, vol. 472, pp. 18–28, août 2017, doi: 10.1016/j.jcryspro.2017.01.026.
- [51] J. Grenet and B. Legendre, “Analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC),” *Techniques de l'ingénieur Techniques d'analyse*, vol. base documentaire : TIP630WEB., no. ref. article : p1205. Editions T.I., 2010. doi: 10.51257/a-v1-p1205.
- [52] E. Wirth, F. Guitteny, and C. Mathonat, “Thermogravimétrie,” *Techniques de l'ingénieur Techniques d'analyse*, vol. base documentaire : TIP630WEB., no. ref. article : p1260. Editions T.I., 2014. doi: 10.51257/a-v3-p1260.
- [53] C. Aronica and E. Jeanneau, “Diffraction des rayons X - Techniques et études des structures cristallines,” in *CultureSciences Physique - ISSN 2554-876X*, 2009. [Online]. Available: <https://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/Diffraction-rayons-X-techniques-determination-structure.xml>
- [54] J. W. Visser, “A fully automatic program for finding the unit cell from powder data,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 2, no. 3, pp. 89–95, Aug. 1969, doi: 10.1107/S0021889869006649.
- [55] C. J. J. Gerard *et al.*, “Crystallization via tubing microfluidics permits both in situ and ex situ X-ray diffraction,” *Acta Crystallogr. Sect. F*, vol. 73, no. 10, pp. 574–578, Oct. 2017, doi: 10.1107/S2053230X17013826.
- [56] G. Peybernès, “Development of a versatile microfluidic platform for the study of the solid state of active pharmaceutical ingredients,” Theses, Université d'Aix-Marseille, 2019. [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02349617>
- [57] A. F. Chrimes, K. Khoshmanesh, P. R. Stoddart, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, “Microfluidics and Raman microscopy: current applications and future challenges,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 13, pp. 5880–5906, 2013, doi: 10.1039/C3CS35515B.
- [58] Barbillat Jacques, Bougeard Daniel, Buntinx Guy, Delhaye Michel, Dhamelincourt Paul, and Fillaux François, “Spectrométrie Raman,” *Tech. Ing. CND Méthodes Surfaiques*, vol. base documentaire : TIB586DUO, no. ref. article : p2865, Sep. 1999, [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/cnd-methodes-surfaiques-42586210/spectrometrie-raman-p2865/>
- [59] J. Sanudo, “Quelle longueur d'onde pour votre spectromètre Raman?” Opton Laser International. [Online]. Available: <https://www.optonlaser.com/article/quelle-longueur-d-onde-pour-votre-spectrometre-raman>
- [60] T. Schmid and P. Dariz, “Raman Microspectroscopic Imaging of Binder Remnants in Historical Mortars Reveals Processing Conditions,” *Heritage*, vol. 2, no. 2, pp. 1662–1683, 2019, doi: 10.3390/heritage2020102.
- [61] B. Fours, “Contribution à l'étude des phases solides du Rimonabant (SR141716),” Unpublished PhD thesis, Université de Rouen, 2009.
- [62] M.-A. Perrin, M. Bauer, M. Barrio, J.-L. Tamarit, R. Céolin, and I. B. Rietveld, “Rimonabant Dimorphism and Its Pressure–Temperature Phase Diagram: A Delicate Case of Overall Monotropic Behavior,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 7, pp. 2311–2321, Jul. 2013, doi: 10.1002/jps.23612.
- [63] M. Bauer, R. K. Harris, R. C. Rao, D. C. Apperley, and C. A. Rodger, “NMR study of desmotropy in Irbesartan, a tetrazole-containing pharmaceutical compound,” *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, no. 3, pp. 475–482, 1998, doi: 10.1039/A708038G.
- [64] A. M. Araya-Sibaja *et al.*, “The effect of solution environment and the electrostatic factor on the crystallisation of desmotropes of irbesartan,” *RSC Adv.*, vol. 9, no. 9, pp. 5244–5250, 2019, doi: 10.1039/C8RA10146A.

- [65] T. A. Zeidan *et al.*, "An unprecedented case of dodecamorphism: the twelfth polymorph of aripiprazole formed by seeding with its active metabolite," *CrystEngComm*, vol. 18, no. 9, pp. 1486–1488, 2016, doi: 10.1039/C5CE02467F.
- [66] N. Osiecka-Drewniak, A. Deptuch, E. Juszyńska-Gałązka, M. Jasiurkowska-Delaporte, and S. Baran, "Insight into Polymorphism of the Aripiprazole," *SSRN*, 2022, [Online]. Available: <https://ssrn.com/abstract=4285519>
- [67] D. E. Braun, T. Gelbrich, V. Kahlenberg, R. Tessadri, J. Wieser, and U. J. Griesser, "Conformational polymorphism in aripiprazole: Preparation, stability and structure of five modifications," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 6, pp. 2010–2026, Jun. 2009, doi: 10.1002/jps.21574.
- [68] A. Burger and R. Ramberger, "On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I," *Microchim. Acta*, vol. 72, no. 3, pp. 259–271, May 1979, doi: 10.1007/BF01197379.
- [69] A. Burger and R. Ramberger, "On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. II," *Microchim. Acta*, vol. 72, no. 3, pp. 273–316, May 1979, doi: 10.1007/BF01197380.
- [70] S. P. Delaney, D. Pan, S. X. Yin, T. M. Smith, and T. M. Korter, "Evaluating the Roles of Conformational Strain and Cohesive Binding in Crystalline Polymorphs of Aripiprazole," *Cryst. Growth Des.*, vol. 13, no. 7, pp. 2943–2952, Jul. 2013, doi: 10.1021/cg400358e.
- [71] S. P. Delaney, T. M. Smith, D. Pan, S. X. Yin, and T. M. Korter, "Low-Temperature Phase Transition in Crystalline Aripiprazole Leads to an Eighth Polymorph," *Cryst. Growth Des.*, vol. 14, no. 10, pp. 5004–5010, Oct. 2014, doi: 10.1021/cg500569x.
- [72] Á. Munroe, Å. C. Rasmuson, B. K. Hodnett, and D. M. Croker, "Relative Stabilities of the Five Polymorphs of Sulfathiazole," *Cryst. Growth Des.*, vol. 12, no. 6, pp. 2825–2835, Jun. 2012, doi: 10.1021/cg201641g.
- [73] Y. Hu, A. Erxleben, A. G. Ryder, and P. McArdle, "Quantitative analysis of sulfathiazole polymorphs in ternary mixtures by attenuated total reflectance infrared, near-infrared and Raman spectroscopy," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 3, pp. 412–420, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2010.05.002.
- [74] D. S. Hughes, M. B. Hursthouse, T. Threlfall, and S. Tavener, "A new polymorph of sulfathiazole," *Acta Crystallogr. Sect. C*, vol. 55, no. 11, pp. 1831–1833, Nov. 1999, doi: 10.1107/S0108270199010112.
- [75] A. L. Bingham, D. S. Hughes, M. B. Hursthouse, R. W. Lancaster, S. Tavener, and T. L. Threlfall, "Over one hundred solvates of sulfathiazole," *Chem Commun*, no. 7, pp. 603–604, 2001, doi: 10.1039/B009540K.
- [76] N. Blagden *et al.*, "Crystal chemistry and solvent effects in polymorphic systems : Sulfathiazole," *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 94, no. 8, pp. 1035–1044, 1998.
- [77] I. Braschi, G. Paul, G. Gatti, M. Cossi, and L. Marchese, "Embedding monomers and dimers of sulfonamide antibiotics into high silica zeolite Y: an experimental and computational study of the tautomeric forms involved," *RSC Adv*, vol. 3, no. 20, pp. 7427–7437, 2013, doi: 10.1039/C3RA22290J.
- [78] S. Khoshkhoo and J. Anwar, "Crystallization of polymorphs: the effect of solvent," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 26, no. 8B, p. B90, Aug. 1993, doi: 10.1088/0022-3727/26/8B/013.
- [79] T. Tate, "XXX. On the magnitude of a drop of liquid formed under different circumstances," *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 27, no. 181, pp. 176–180, Mar. 1864, doi: 10.1080/14786446408643645.

- [80] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. C. Chan, and R. F. Tabor, "Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 454, pp. 226–237, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.012.
- [81] L. Wang, J. Wang, Y. Bao, and T. Li, "Solubility of Irbesartan (Form A) in Different Solvents between 278 K and 323 K," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 52, no. 5, pp. 2016–2017, Sep. 2007, doi: 10.1021/je700296x.
- [82] Alcade Alain, Anne-Archarde Gilles, Gavory Corinne, and Monnier Olivier, "Polymorphous Form of Rimonabant, Preparation Method and Pharmaceutical Compositions Containing Same," WO 2003/040105 A1, May 15, 2003 [Online]. Available: <https://lens.org/193-967-197-394-41X>
- [83] N. Candoni, R. Grossier, Z. Hammadi, R. Morin, and S. Veessler, "Practical physics behind growing crystals of biological macromolecules.," *Protein Pept. Lett.*, vol. 19, no. 7, pp. 714–724, Jul. 2012, doi: 10.2174/092986612800793136.
- [84] P. Taulelle, "Etude de l'influence d'ajout d'additifs lors de la cristallisation de molécules pharmaceutiques," 2007. [Online]. Available: <http://www.theses.fr/2007AIX30069/document>
- [85] K. W. Morcom and R. W. Smith, "Enthalpies of mixing of water+methyl cyanide," *J. Chem. Thermodyn.*, vol. 1, no. 5, pp. 503–505, Sep. 1969, doi: 10.1016/0021-9614(69)90009-3.
- [86] C. J. J. Gerard, "Microfluidic platform for optimization of protein crystallization conditions," Theses, Université d'Aix-Marseille, 2017. [Online]. Available: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01588298>
- [87] R. Cedeno, R. Grossier, V. Tishkova, N. Candoni, A. E. Flood, and S. Veessler, "Evaporation Dynamics of Sessile Saline Microdroplets in Oil," *Langmuir*, vol. 38, no. 31, pp. 9686–9696, Aug. 2022, doi: 10.1021/acs.langmuir.2c01269.

# Annexes

<b>ANNEXE 1 : COMPOSANTS MICROFLUIDIQUES</b>	<b>196</b>
<b>ANNEXE 2 : CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR LE CIBLAGE EN VIALS DU RIMONABANT</b>	<b>197</b>
<b>ANNEXE 3 : METHODE DE CALIBRATION DE LA CAMERA</b>	<b>198</b>
<b>ANNEXE 4 : CARACTERISTIQUES DES SYSTEMES RAMAN TESTES</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE 5 : POSITIONNEMENT DE LA SONDE RAMAN</b>	<b>200</b>
<b>ANNEXE 6 : DIFFRACTOGRAMME RX DES CRISTAUX D'ARIPRAZOLE</b>	<b>201</b>

# Annexe 1 : Composants microfluidiques

Reference	Designation	
1507L	PFA Tubing Natural 1/16" OD x .040" ID x 50ft	
3160--04-21	Packing Adapter, IsoBar 2,1 mm ID	
5030IP-04021-0075-05	IsoBar Systems 2.1 mm ID, Parker Port 7,5 cm	
F-120X	One-Piece Fingertight 10-32 Coned, for 1/16" OD Natural - 10 Pack	
P-200X	Flangeless Ferrule Tefzel™ (ETFE), 1/4-28 Flat-Bottom, for 1/16" OD Blue-10 Pack	
P-287X	Super Flangeless Nut for 1/16" or 1/32" OD Tubing - 10Pack	
P-316	Plug for 1/4-28 Flat-Bottom Ports	
P-703	Union Assembly PEEK .050 thru hole, for 1/8" OD	
P-728	PEEK Tee .050 thru hole Hi Pressure, F-300	
P-733	PEEK Shut-Off Valve	
P-760	PEEK Union for 1/16" OD Tubing	
P-790	Back Pressure Regulator Assembly (5psi)	
U-467R	Plug for 10-32 Coned Ports	
XP-235X	Flangeless Fitting Short, PEEK, 1/4-28 Flat-Bottom for 1/16" OD Natural - 10 Pack	
P-150	Manifold Standard Assembly 7 Port, for 1/16" OD	

## Annexe 2 : Conditions expérimentales pour le criblage en vials du Rimonabant

<i>Méthode</i>	<i>Solvant</i>	<i>m<sub>produit</sub></i> <i>(mg)</i>	<i>V<sub>solvant</sub></i> <i>(μL)</i>	<i>C</i> <i>(mg/mL)</i>
<i>Maturations</i> <i>(12 jours)</i>	Eau MilliQ	108,7	375	289,9
	2-pentanol	102,5	250	410,0
	Butan-1-ol	110,1	250	440,4
	3-méthyl-1-butanol	103,7	250	414,8
	Éthanol	116,0	375	309,3
	Méthanol	110,1	375	293,6
	Propan-2-ol	105,4	375	281,1
	Diméthylformamide (DMF)	100,6	250	402,4
	2-méthoxyéthanol	109,4	375	291,7
	1-méthyl-2-pyrrolidone (NMP)	102,8	250	411,2
<i>Refroidissement</i>	Éthanol	106,1	2375	44,7
	N-DMF	110,0	250	440,0
	2-méthoxyéthanol	118,0	750	157,3
	1,4-dioxane	105,1	250	420,4
	DMSO	116,2	625	185,9
	Éthanol	101,8	1750	58,2
	1-méthyl-2-pyrrolidone	115,5	375	308,0
	Méthylcyclohexane	95,2	5125	18,6
	Toluène	102,1	250	408,4
	Acétonitrile	109,3	2375	46,0
	Eau MilliQ	100,2	6250	16,0
	Ethanol	118,9	1500	79,3
	Méthanol	131,8	1625	81,1
	Propan-2-ol	100,0	375	266,7
	DMF	141,4	500	282,8
	Eau MilliQ	119,1	4000	29,8
	Ethanol	122,8	1500	81,9
	Méthanol	099,7	1625	61,4
	Propan-2-ol	133,5	375	356,0
	DMF	108,7	1000	108,7

## Annexe 3 : Méthode de calibration de la caméra

La méthode décrite ici permet de déterminer le facteur  $f_{\text{zoom}}$  nécessaire à la reconstruction de l'image globale de la zone balayée. Ce facteur permet ainsi de relier le déplacement de la caméra au nombre de pixels. Il doit être mesuré pour chaque valeur de zoom.

Choisir un point de repère, par exemple une tâche ou une paroi de capillaire, et le positionner en bordure (par exemple à gauche) de l'image et noter la position correspondante (par exemple ici en  $\text{Axe}_X$ ). Déplacer ensuite la caméra jusqu'à ce que le point de repère se retrouve sur la bordure opposée de l'image (par exemple à droite) et noter la nouvelle position.

Le facteur de zoom est ainsi calculé pour un déplacement horizontal (respectivement un déplacement vertical) par :

$$f_{\text{zoom}} = \frac{\text{Axe}_X_{\text{gauche}} - \text{Axe}_X_{\text{droite}}}{\text{largeur\_image (pixels)}} = \frac{\text{Axe}_Y_{\text{bas}} - \text{Axe}_Y_{\text{haut}}}{\text{hauteur\_image (pixels)}}$$

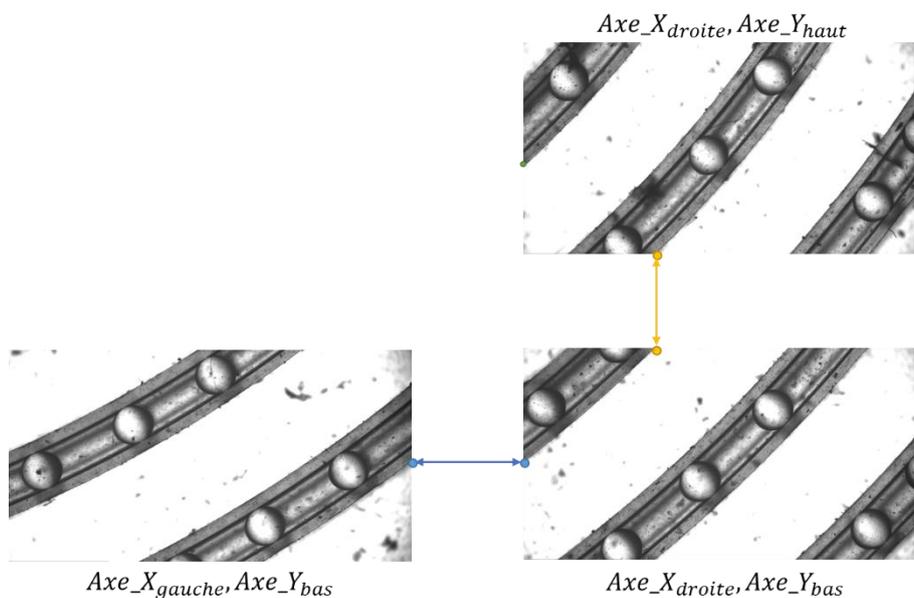


Figure 149 : Schéma de la calibration pour un déplacement vertical (jaune) et horizontal (bleu), avec les points repères correspondant.

# Annexe 4 : Caractéristiques des systèmes Raman testés

Les caractéristiques des quatre spectromètres Raman testés, des lasers et des sondes sont données dans le tableau ci-dessous. Les sondes et les lasers ont été testés sur les différents spectromètres. La sonde IDIL a été testée sous 2 versions, de géométries des fibres optiques line-to-line et circle-to-line (cf. Partie C – 5.3.).

Composant	Paramètre	PhotInnov (StellarNet) HR-TEC-785	IDIL (OceanInsight) QE Pro et QE Pro+		Optoprim (Avantes) Raman Bundle-D
Laser	<i>Longueur d'onde</i>	785	785		785
	<i>Puissance</i>	> 500 mW ajustable	< 350 mW ajustable		500 mW ajustable
Sonde	<i>Distances focales</i>	4,5 mm	7,5 mm		9 mm
	<i>Diamètre sonde</i>	12,5 mm	12,5 mm		7,94 mm
Spectromètre	<i>Type</i>	HR-TEC-785	QE Pro	QE Pro+	AvaSpec HERO AvaSpec- HS1024x58TEC- EVO
	<i>Détecteur</i>	CCD 2048 pixels (refroidi)	CCD 1044*64 (refroidi)	back-thinned FFT-CCD (dimensions non communiquées)	CCD 1024
	<i>Résolution</i>	4 cm <sup>-1</sup>	9 cm <sup>-1</sup>	10 cm <sup>-1</sup>	10 cm <sup>-1</sup>
	<i>Plage de mesure (valeurs approchées)</i>	792-1011 nm 200-2750 cm <sup>-1</sup>	780-1010 nm (ajustable) 0-2870 cm <sup>-1</sup>	780-1020 nm (ajustable) 0-3000 cm <sup>-1</sup>	788-1020 nm (ajustable) 100-3000 cm <sup>-1</sup>
	<i>Fente entrée</i>	25 µm	50 µm (ajustable)	50 µm (ajustable)	25 µm (ajustable)
	<i>Signal:bruit</i>	>1000:1	1000:1	1000:1	1200:1
	<i>Dimensions</i>	60 x 170 x 155 mm 1,5 kg	182 mm x 110 mm x 47 mm 1,15 kg	182 mm x 110 mm x 47 mm 1,15 kg	240 mm x 140 mm x 250 mm

Tableau 6 : Caractéristiques des systèmes Raman testés.

# Annexe 5 : Positionnement de la sonde Raman

La distance entre la sonde Raman et le capillaire contenant l'échantillon doit être ajustée en fonction de la distance focale de la lentille en bout de sonde (ici 7,5mm). Afin de choisir la position optimale, la sonde a été positionnée à différentes distances du capillaire. Sur la Figure 150a, les traits indiquent la position de la fin du support Raman pour les différentes positions. Sur la Figure 150b, on observe que le signal est plus intense pour la distance 0 (bleu). C'est donc cette position qui est choisie pour les mesures.

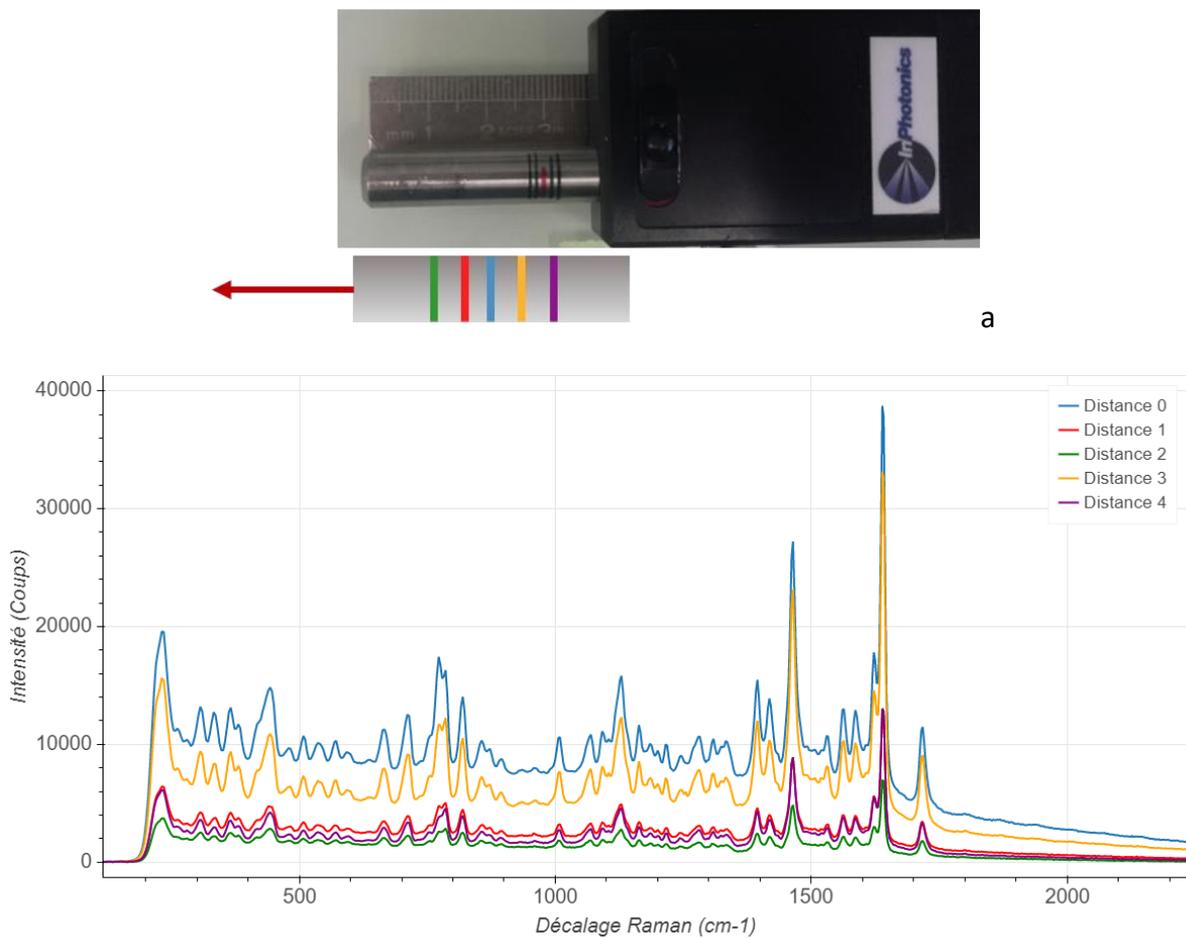


Figure 150 : (a) Photo de la sonde Raman RPB (In Photonics) marquée pour différentes positions. (b) Spectres Raman d'une poudre de Rimonabant (forme II) dans un capillaire en PFA (1mm ID) enregistrés pour les différentes positions de la sonde Raman par rapport au capillaire, avec un spectromètre QEPro (temps d'intégration = 20s).

# Annexe 6 : Diffractogramme RX des cristaux d'Aripiprazole

Les diffractogrammes RX des cristaux d'Aripiprazole obtenus en vials dans l'acétonitrile sont comparés à la poudre de départ et aux formes répertoriées dans la CSD sur la Figure 151.

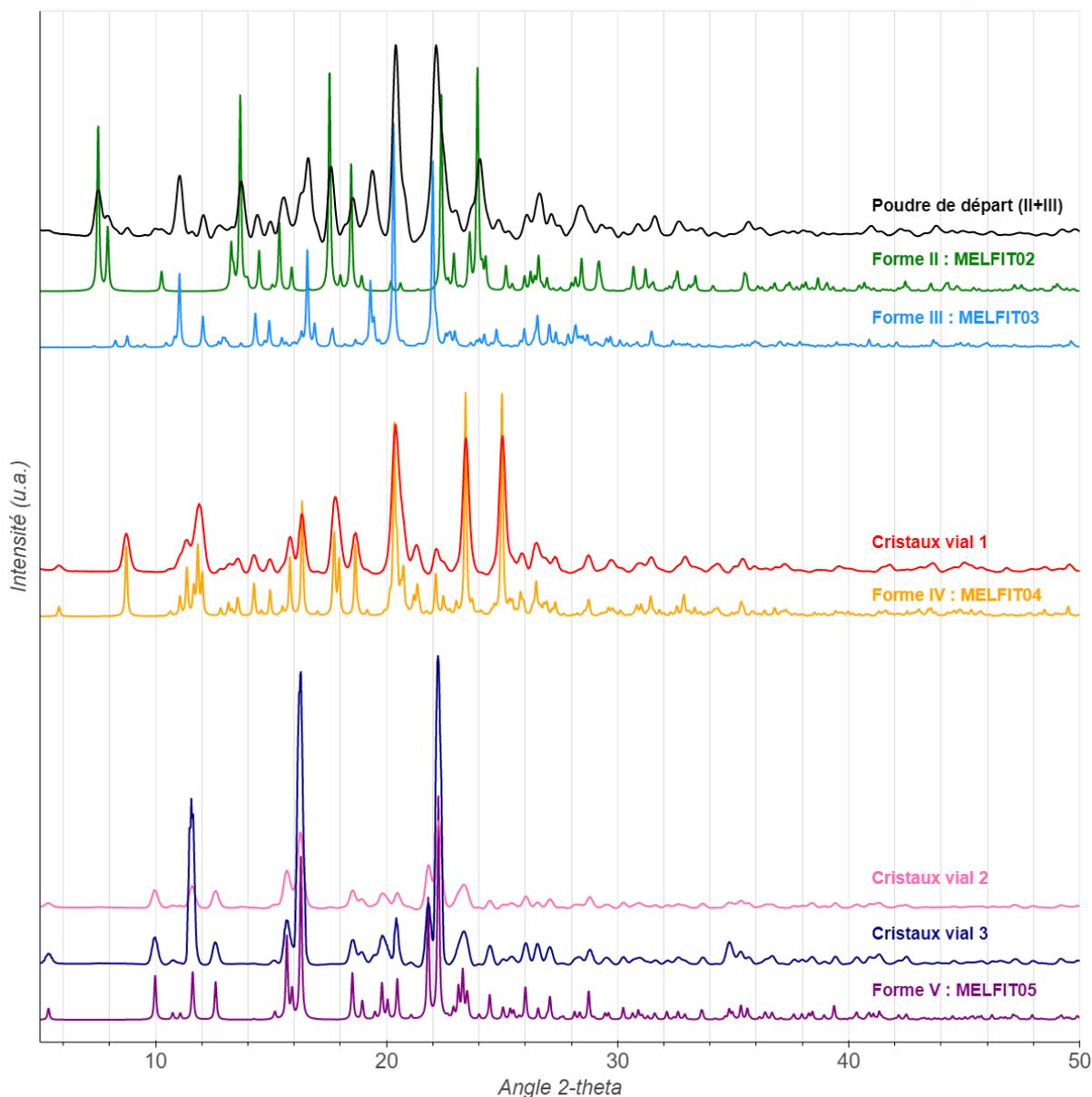


Figure 151 : Diffractogrammes RX de l'Aripiprazole : la poudre de départ est comparée aux formes II (MELFIT02) et III (MELFIT03) répertoriées dans la CSD, les cristaux obtenus dans le Vial 1 dans l'acétonitrile à la forme IV (MELFIT04) et les cristaux des vials 2 et 3 à la forme V (MELFIT05).