

# THESE

présentée devant

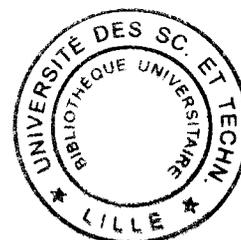
l'Université des Sciences et Technologies de Lille

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université en Sciences des Matériaux

par

Armelle DE GUSSEME



## **TRANSFORMATIONS DE PHASES A L'ETAT SOLIDE DE MATERIAUX PHARMACEUTIQUES : LA FANANSERINE ET LE TREHALOSE**

Soutenue le 8 octobre 2003 devant la commission d'examen :

M. Jean DOUCET	Université Paris XI, Orsay	Rapporteur
M. Michel OLLIVON	Université Paris XI, Châtenay-Malabry	Rapporteur
Mme Carole NEVES	Aventis Pharma, Vitry-sur-Seine	Examinatrice
M. Gérard COQUEREL	Université de Rouen	Examineur
M. J-F WILLART	Université Lille 1	Directeur de thèse
M. Marc DESCAMPS	Université Lille 1	Directeur de thèse

*Vous savez ce que c'est que la recherche : on part  
sur une question et on trouve en cours de route  
des faits qui vous en posent une autre.*

Philippe Meyer

*La science est un jeu dont la règle du jeu  
consiste à trouver quelle est la règle du jeu.*

François Cavanna

## REMERCIEMENTS

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Dynamique et Structure des Matériaux Moléculaires (LDSMM) de l'Université de Lille 1 et l'équipe « Applied Physics » du groupe « Material Design and Drug Delivery Systems » d'AVENTIS Pharma à Vitry-sur-Seine. Le projet a été initié par Messieurs Marc DESCAMPS (LDSMM) et Franck LEVEILLER (Aventis) ; je leur suis très reconnaissante de m'avoir permis d'y prendre part.

Ce travail a été supervisé par Messieurs Marc DESCAMPS et Jean-François WILLART. Je tiens à les remercier de m'avoir accordé leur confiance, et de m'avoir fait bénéficier de leurs compétences scientifiques. Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Madame Carole NEVES, responsable de l'équipe « Applied Physics » d'Aventis, qui a accordé un grand intérêt à ce travail et en a suivi toutes les évolutions. Ses conseils et ses encouragements m'ont été d'une aide précieuse pour mener à bien ce projet.

Je remercie également les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail : Messieurs Jean DOUCET et Michel OLLIVON, rapporteurs, et Monsieur Gérard COQUEREL, examinateur.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance à tous les membres du LDSMM et de l'équipe « Applied Physics » d'Aventis avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de ces trois années, et en particulier :

Monsieur Laurent CARPENTIER (LDSMM), dont l'enthousiasme et les grandes qualités de pédagogue m'ont permis de réaliser les mesures diélectriques dans les meilleures conditions. Je le remercie également pour sa relecture attentive du manuscrit et ses commentaires toujours constructifs,

Madame Agnès RAMEAU (Aventis), qui s'est impliquée dans le projet avec un dynamisme communicatif. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir formée à l'Analyse ThermoGravimétrique, et d'avoir réalisé l'analyse diélectrique des lyophilisats de tréhalose,

Monsieur Ronan LEFORT (LDSMM), qui a réalisé la plupart des mesures de Résonance Magnétique Nucléaire, et m'a fait découvrir cette technique avec beaucoup de talent et de patience,

Madame Stéphanie HEMON (LDSMM), qui m'a fait bénéficier avec gentillesse de son expérience en Diffraction des Rayons X,

Monsieur Julien GIOVANNINI (Aventis), à l'origine de discussions instructives et enthousiastes sur la fanansérine en particulier.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui, de manière plus ponctuelle, ont accepté de consacrer un peu de leur temps et de leurs compétences à ce projet :

Dans l'équipe « Applied Physics » (Aventis) : Mademoiselle Aurélia CHEVALLIER, pour la préparation des lyophilisats de tréhalose, Madame Sophie NOEL, pour les clichés de Microscopie Electronique à Balayage, Madame Magali SAUTEL pour les expériences de DVS, Messieurs Marc-Antoine PERRIN et Jacques BOURGET pour la diffraction des rayons X,

Au LDSMM : Madame Florence DANEDE, Messieurs Frédéric CAPET, Gérard ODOU, Jacques LEFEBVRE pour la diffraction des rayons X, et Monsieur Dominique PREVOST pour son assistance technique. J'aimerais aussi remercier Madame Yolande ODOU, secrétaire du LDSMM, dont l'efficacité et la gentillesse rendent les démarches administratives beaucoup plus agréables.

Merci également aux professeurs A. CESARO, de l'Université de Trieste, Italie, et K.L. NGAI, du Naval Research Laboratory, Washington DC, Etats-Unis, qui ont montré de l'intérêt pour ces études au cours de discussions intéressantes et constructives.

La thèse est une expérience très enrichissante, mais qui n'est pas constituée que de moments d'euphorie scientifique. Je voudrais donc remercier particulièrement mes parents et mes sœurs, dont le soutien permanent a largement contribué à la réalisation de ce travail. Merci aussi à ma famille et à mes amis : membres honoraires de l'orchestre idéal, thésards compatissants et occasionnellement sportifs, et tous les autres sans qui ces trois années comporteraient beaucoup moins de bons souvenirs !

# TRANSFORMATIONS DE PHASES A L'ETAT SOLIDE DE MATERIAUX PHARMACEUTIQUES : LA FANANSERINE ET LE TREHALOSE

## PREMIERE PARTIE : CONTEXTE DE L'ETUDE RAPPELS THEORIQUES

<u>Chapitre I : Introduction</u> .....	<b>3</b>
A. Contexte général de l'étude .....	5
B. Objectifs .....	7
C. Organisation de la thèse .....	9
<u>Chapitre II : Transformations de phases à l'état solide - Techniques expérimentales et méthodes spectroscopiques utilisées pour la caractérisation des échantillons</u> .....	<b>13</b>
A. Transformations de phases à l'état solide .....	15
A.1. Situation de l'étude dans le contexte pharmaceutique .....	15
A.2. Cas du broyage mécanique .....	17
A.3. Cas de la déshydratation .....	23
B. Techniques de caractérisation et de préparation des échantillons .....	28
B.1. Broyage des échantillons .....	28
B.2. Diffraction des rayons X sur poudre (DX) .....	29
B.3. Analyse Thermique Différentielle (ATD) .....	30
B.4. Analyse ThermoGravimétrique (ATG) .....	31
B.5. Cinétique d'absorption de vapeur (DVS) .....	31
B.6. Microscopie optique .....	32
B.7. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	32
B.8. Analyse diélectrique .....	33
C. Aspects méthodologiques et théoriques : caractérisation de l'état vitreux .....	34
C.1. Définition et caractéristiques de la transition vitreuse .....	34
C.2. Mobilité moléculaire dans les domaines métastable et vitreux .....	36
C.3. Méthodes de caractérisation de la mobilité moléculaire : Spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique .....	42

<b>DEUXIEME PARTIE : LA FANANSERINE</b>
---

<u>Chapitre III : La fanansérine - un exemple d'investigation de la mobilité moléculaire dans un composé pharmaceutique</u> .....	<b>55</b>
A. Historique du développement de la fanansérine .....	57
B. Propriétés structurales et calorimétriques des différentes phases de la fanansérine ....	58
B.1. Caractérisation structurale .....	58
B.2. Comportement au chauffage des quatre polymorphes .....	59
C. Caractérisation des lots de phases III et IV utilisés pour les études de broyage .....	61
D. Etude de la mobilité moléculaire de la fanansérine trempée .....	63
D.1. Spectroscopie diélectrique .....	63
D.2. Spectroscopie de chaleur spécifique .....	67
D.3. Synthèse des résultats spectroscopiques : analyse et discussion .....	69
E. Prédiction de la stabilité des amorphes .....	71
 <u>Chapitre IV : Transformations de phases de la fanansérine induites par broyage mécanique</u> .....	 <b>77</b>
A. Effets d'un broyage mécanique au dessus de $T_g$ .....	79
A.1. Broyage de la forme III .....	79
A.2. Broyage de la forme IV .....	85
A.3. Synthèse des transformations induites par broyage à 25°C .....	91
B. Effets d'un broyage mécanique en dessous de $T_g$ .....	92
B.1. Broyage de la forme III .....	92
B.2. Broyage de la forme IV .....	94
B.3. Analyse des résultats .....	97
B.4. Synthèse des transformations induites par broyage à 0°C .....	99
C. Stabilité des états atteints par broyage .....	100
C.1. Stabilité de la phase I issue du broyage à 25°C .....	100
C.2. Stabilité de l'amorphe issu du broyage à 0°C .....	101
D. Discussion .....	104
D.1. Influence du paramètre « température » sur les transformations induites par broyage .....	104
D.2. Possibilité d'application des modèles de broyage existants au cas de la fanansérine .....	105

<b>TROISIEME PARTIE : LE TREHALOSE</b>
--

<b><u>Chapitre V : Le tréhalose, présentation et propriétés</u></b> .....	<b>113</b>
A. Caractéristiques chimiques .....	115
B. Phases cristallines identifiées – Comportement au chauffage .....	115
B.1. Polymorphisme du tréhalose .....	115
B.2. Analyse calorimétrique du comportement de $T_{\beta}$ au chauffage .....	119
C. Intérêt du tréhalose pour la bioprotection – Applications potentielles .....	121
<b><u>Chapitre VI : Transformation de phase du tréhalose anhydre <math>T_{\beta}</math> induite par broyage mécanique</u></b> .....	<b>125</b>
A. Mise en évidence de la vitrification de $T_{\beta}$ induite par broyage mécanique .....	127
B. Evaluation de la fraction de $T_{\beta}$ amorphisée par broyage .....	133
B.1. A partir des résultats d'ATD .....	133
B.2. A partir du saut de $C_p$ .....	133
B.3. A partir des spectres de RMN $^{13}C$ .....	134
C. Analyse et discussion .....	139
C.1. Confrontation des résultats d'ATD et de RMN pour la quantification du taux d'amorphe .....	139
C.2. Mécanisme d'amorphisation par broyage du tréhalose .....	141
<b><u>Chapitre VII : Transformations de phases du tréhalose associées à ses différents modes de déshydratation</u></b> .....	<b>145</b>
A. Etude de la déshydratation du tréhalose dihydrate .....	147
A.1. Influence du protocole de déshydratation sur la nature de l'anhydre formé .....	148
A.2. Identification structurale des états stationnaires atteints par déshydratation .....	152
A.3. Recherche des paramètres de contrôle du processus de déshydratation .....	156
A.4. Propriétés spécifiques de la phase anhydre $T_{\alpha}$ .....	173
B. Etude d'un lyophilisat de tréhalose .....	183
B.1. Cycle de lyophilisation .....	183
B.2. Caractérisation visuelle des lyophilisats de tréhalose .....	184
B.3. Caractéristiques structurales et thermodynamiques des lyophilisats .....	185

<b>Chapitre VIII : Etude comparée des propriétés structurales et dynamiques du tréhalose amorphisé par quatre voies indépendantes .....</b>	<b>191</b>
A. Caractéristiques structurales du tréhalose amorphisé par différentes voies .....	193
B. Mobilité moléculaire du tréhalose dans le domaine métastable .....	196
B.1. Spectroscopie diélectrique .....	197
B.2. Spectroscopie de chaleur spécifique .....	198
B.3. Analyse des résultats .....	201
C. Mobilité moléculaire du tréhalose dans le domaine vitreux .....	204
C.1. Cas du liquide sous refroidi .....	204
C.2. Cas des amorphes obtenus par lyophilisation, broyage de $T_{\beta}$ et déshydratation de $T_{2H_2O}$ .....	209
C.3. Analyse des résultats .....	213
D. Analyse et discussion .....	215
D.1. Relation entre fragilité et non exponentialité .....	215
D.2. Origine des différents processus de relaxations secondaires .....	216
D.3. Le tréhalose présente-t-il un polyamorphisme ? .....	218

## QUATRIEME PARTIE : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A. Rappel des principaux objectifs .....	226
B. Conclusions .....	227
C. Perspectives .....	230

## ANNEXES

1. Méthode de calcul de la fraction amorphisée par ATD conventionnelle .....	237
2. Pourquoi le tréhalose est-il aussi efficace pour la biopréservation ? Quelques tentatives d'explication.....	239

**TRANSFORMATIONS DE PHASES A  
L'ETAT SOLIDE DE MATERIAUX  
PHARMACEUTIQUES :  
LA FANANSERINE ET LE TREHALOSE**

# PREMIERE PARTIE

Contexte de l'étude

Rappels théoriques

# **CHAPITRE I**

## **Introduction**

## **A. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE**

Les matériaux pharmaceutiques présentent, à l'état condensé, un polymorphisme souvent très riche et une aptitude marquée à se maintenir dans des états métastables ou amorphes plus ou moins transitoires. L'existence de ces différentes formes polymorphiques peut avoir une influence considérable sur les propriétés thérapeutiques des médicaments, dans la mesure où elles conditionnent leur stabilité dans le temps, leur solubilité, et donc leur biodisponibilité [1]. Les transitions entre les différents polymorphes d'un même composé interviennent couramment lors de traitements thermiques, mais peuvent aussi être générées par l'application de sollicitations extérieures sans modification de la température [2]. Au cours des procédés de formulation, les solides pharmaceutiques sont soumis à de nombreux traitements physiques ou chimiques. Ce sont par exemple, les opérations de broyage, de micronisation, de mise en solution ou de désolvation. Ces étapes offrent de riches possibilités de transformations : les matériaux moléculaires présentent en effet un potentiel considérable de génération de nouveaux états, du fait du contraste existant entre les forces de liaisons intra et intermoléculaires.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux effets du broyage mécanique et de la déshydratation.

### ▪ **Effets du broyage mécanique :**

L'industrie pharmaceutique a recours à la réduction de taille des particules dans de nombreuses étapes de formulation. La réduction de granulométrie est en général effectuée par broyage mécanique ou par micronisation. Elle permet d'augmenter la surface spécifique des grains, et de modifier les propriétés pharmacocinétiques des médicaments [2]. Les opérations de broyage peuvent aussi induire des transformations impromptues, soit vers une phase cristalline polymorphe de la phase initiale (c'est le cas par exemple de l'indométhacine [3]), soit vers l'état amorphe (comme pour le poly(éthylène téréphtalate [4]).

Les effets du broyage sont actuellement très étudiés en métallurgie [5,6]. Cette technique permet par exemple de réaliser des alliages métalliques amorphes que l'on ne peut obtenir en quantité importante par les traitements thermiques habituels, en raison des grandes vitesses de trempes requises. De nombreux modèles visant à rationaliser les effets du broyage ont été proposés. Il s'appuient par exemple sur la généralisation du critère de Lindemann [7], ou sur la prise en compte de défauts de natures diverses [8]. Un mécanisme très simple de fusion locale suivie d'une trempe thermique a aussi été proposé [2]. Récemment, Martin et al. ont élaboré une approche fondée sur le concept de transformation dynamique hors équilibre, permettant de rendre compte de la mise en désordre des alliages binaires métalliques sous broyage [9] : après un certain temps de

traitement, le matériau semble atteindre un état stationnaire décrit par un paramètre d'ordre spécifique, qui dépend uniquement de la température et de l'intensité de broyage. Toutefois, aucun de ces modèles n'est à ce jour capable de décrire l'ensemble des transformations susceptibles de se produire sous contrainte mécanique.

Dans le domaine des matériaux moléculaires organiques, les effets du broyage ont été constatés sur divers composés pharmaceutiques [2-4]. Néanmoins, en dépit de la grande réactivité au broyage de ces matériaux et de la diversité des transformations susceptibles de se produire, aucune tentative de rationalisation des transformations induites n'a été entreprise. L'application aux matériaux moléculaires organiques des modèles proposés pour les transformations sous broyage des métaux n'a pas encore été tentée.

#### ▪ **Effets de la déshydratation**

Les problèmes de désolvatation interviennent couramment en pharmacie, dans la mesure où nombre de principes actifs sont synthétisés à partir de solvants de cristallisation. L'eau est très souvent impliquée dans les procédés de fabrication, directement ou par l'intermédiaire des excipients. Elle influe de manière conséquente sur des propriétés physiques telles la solubilité, la stabilité thermique et la mobilité moléculaire [10].

Les opérations de déshydratation sont fréquentes en pharmacie. Par exemple, elles font partie intégrante des procédés de lyophilisation, couramment utilisés pour produire des formes sèches plus stables que les formes en solution. Or, la déshydratation est susceptible d'entraîner des modifications structurales profondes. Le retrait des molécules d'eau incluses dans l'édifice cristallin peut provoquer des réarrangements structuraux d'une phase cristalline hydratée vers une phase cristalline anhydre [11]. Plusieurs exemples d'amorphisation induite par déshydratation ont également été reportés [12,13]. L'eau peut aussi intervenir lors du stockage des médicaments, certains composés hygroscopiques formant spontanément des hydrates stœchiométriques au contact de l'humidité ambiante [10].

Les observations expérimentales de déshydratation de composés pharmaceutiques sont nombreuses. Elles ont révélé que les mécanismes microscopiques qui gouvernent la déshydratation sont souvent complexes, et diffèrent fortement d'un composé à l'autre. Des critères permettant de classer les différents processus de déshydratation ont été définis [14]. Ils concernent principalement les mécanismes microscopiques de départ d'eau, et la relation structurale entre l'hydrate de départ et l'anhydre finalement obtenu [15]. Toutefois, il n'y a pas de consensus sur les mécanismes de déshydratation, et aucune approche générale faisant intervenir des paramètres physiques n'a jusqu'ici été mise en œuvre.

## **B. OBJECTIFS**

Les procédés de broyage et de déshydratation induisent, comme nous serons amenés à le démontrer par la suite, des transformations de phases qui dépendent des conditions d'application des sollicitations (intensité de broyage, vitesse de déshydratation, température, etc.). Deux points principaux ressortent de ces observations :

- il apparaît important de maîtriser, et idéalement de prévoir les différentes transformations de phases induites par sollicitations extérieures (broyage ou déshydratation), dans l'optique de l'amélioration des procédés de formulation
- l'étude de la stabilité des produits transformés est nécessaire pour définir les conditions de conservation des médicaments les mieux adaptées

Dans le cadre d'une collaboration entre le LDSMM et le laboratoire d'Analyses Physiques d'Aventis Pharma, nous avons entrepris l'étude des **transformations de phases à l'état solide** de deux composés pharmaceutiques : la fanansérine et le tréhalose. Cette terminologie désigne les transformations induites par des perturbations extérieures comme le broyage mécanique et la déshydratation, se produisant à des températures très inférieures à la température de fusion du composé. L'un des points importants de cette étude sera de tester si les transformations générées par ces sollicitations particulières ne pourraient pas relever des nouvelles approches avancées en métallurgie, qui tendent à prouver que l'on ne serait pas en présence de transformations de phases « ordinaires », mais plutôt de transitions hors équilibre. Cet aspect n'a jamais été abordé dans le domaine des matériaux moléculaires.

**La fanansérine** est un principe actif synthétisé par Aventis Pharma. Il présente quatre phases cristallines polymorphes, dont les structures cristallographiques, le comportement calorimétrique et les domaines de stabilité ont été déterminés lors d'une précédente thèse [16]. Ce système étant très sensible aux perturbations d'origine thermique, il a semblé adapté à l'investigation des transformations potentielles induites par les perturbations mécaniques spécifiques au broyage. Par ailleurs, la température de transition vitreuse  $T_g$  de la fanansérine vitrifiée par sous refroidissement de la phase liquide est très proche de la température ambiante, et donc facilement accessible expérimentalement. Dans l'hypothèse où les sollicitations mécaniques entraîneraient des transformations de phases, cette particularité offre la possibilité de tester l'influence de la température de broyage de part et d'autre de  $T_g$ .

**Le tréhalose** est un disaccharide très répandu à l'état naturel. Il est activement étudié pour ses facultés de bioprotection qui semblent supérieures à celles de ses isomères [17,18], ce qui lui

confère des applications potentielles en tant qu'excipient. Le tréhalose présente deux formes anhydres ( $T_\alpha$  [19] et  $T_\beta$  [20]) et une forme dihydrate ( $T_{2H_2O}$  [21,22]). L'amorphisation par broyage du sucrose, un autre disaccharide, a déjà été signalée [23], ce qui nous incite à tester le comportement du tréhalose sous broyage. Les effets de la déshydratation du tréhalose dihydrate ont été précédemment étudiés, mais les conclusions publiées sont très diverses et contradictoires. Les principales interrogations concernent la nature structurale de l'anhydre obtenu (amorphe ou phase cristalline), et les caractéristiques intrinsèques de ce dernier. La situation est donc favorable à une étude rationnelle et méthodique des transformations de phases du tréhalose par déshydratation. Ces investigations sont potentiellement liées à l'action bioprotectrice du tréhalose, puisqu'il a été proposé que l'existence d'une forme dihydrate et la création d'une situation transitoire originale propre à la déshydratation puissent jouer un rôle essentiel dans le scénario de la bioprotection [18].

Les **objectifs principaux** de ce travail sont donc les suivants :

- Etudier l'influence des perturbations mécaniques sur la fanansérine, pour laquelle Aventis Pharma dispose de quelques échantillons dans des variétés polymorphiques différentes. Cela nous a offre l'opportunité rare (cela n'a semble-t-il jamais pu être réalisé de manière aussi directe en métallurgie) d'étudier les effets du broyage sur différents états de départ. C'est un point important pour tester par exemple la validité de l'hypothèse de transformations vers des états stationnaires, pour évaluer la dépendance de ces états finals par rapport aux états initiaux, et éventuellement pour mettre en évidence des différences dans les chemins cinétiques empruntés pour les atteindre.

Nous avons par ailleurs évalué le rôle de la température, en effectuant des broyages de part et d'autre de la température de transition vitreuse  $T_g$ .

En liaison directe avec les problématiques de la pharmacie, la stabilité des phases générées par broyage a également été étudiée. Ces investigations ont permis de tester la nature (stationnaire ou d'équilibre) des états stabilisés sous broyage.

- Etudier les effets de la déshydratation sur le tréhalose. Il s'agit d'abord de clarifier une situation confuse quant aux produits issus de la déshydratation. Nous avons pour cela mis au point un protocole expérimental rigoureusement contrôlé, de manière à optimiser les conditions de déshydratation.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à savoir si les états atteints par déshydratation sont des états d'équilibre thermodynamique du système, ou des états stationnaires, afin d'évaluer si les transformations induites par déshydratation peuvent être décrites en terme de transitions dynamiques.

- Etudier la possibilité, pour un même composé, d'atteindre l'état amorphe par différentes voies. Dans le cas du tréhalose, nous montrerons qu'il existe au moins quatre méthodes d'amorphisation indépendantes les unes des autres. Il se pose alors la question de savoir si les amorphes ainsi générés possèdent les mêmes propriétés (notamment au niveau de leur structure locale et de leur stabilité), ou si au contraire, ils engendrent une situation de polyamorphisme semblable à celle détectée dans le triphénylphosphite [24,25] ou la glace [26]. Nous avons pour cela étudié les propriétés dynamiques de ces échantillons, en utilisant les méthodes de spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique.

## C. ORGANISATION DE LA THESE

Ce mémoire est articulé en quatre parties : une introduction, deux parties consacrées aux résultats obtenus respectivement sur la fanansérine et le tréhalose, et une conclusion. Elles s'organisent de la manière suivante :

- Le **chapitre II** permet de situer plus précisément notre étude dans ses contextes physique et pharmaceutique : il propose un rappel bibliographique concernant les transformations induites par broyage et par déshydratation, et les différents modèles mis au point pour les rationaliser. Les travaux présentés ici ont nécessité l'utilisation de techniques expérimentales nombreuses et variées, que nous décrirons brièvement. Enfin, les méthodes spectroscopiques qui nous ont permis d'étudier la mobilité moléculaire des échantillons sont évoquées plus en détail en fin de chapitre.
- La deuxième partie de ce mémoire rassemble les résultats expérimentaux obtenus sur la fanansérine. Elle est constituée des chapitres III et IV.

Le **chapitre III** propose une brève présentation de la molécule, ainsi qu'un rappel des caractéristiques structurales et du comportement calorimétrique des deux polymorphes étudiés. Nous présentons ensuite une investigation de la mobilité moléculaire de la fanansérine sous refroidie, réalisée par spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique.

Le **chapitre IV** met en évidence les transformations de phases de la fanansérine induites par broyage mécanique, en fonction de la phase de départ et de la température. La stabilité au stockage des états ainsi obtenus a également été étudiée.

- La troisième partie de ce mémoire regroupe les résultats obtenus sur le tréhalose. Elle se compose de quatre chapitres.

Le **chapitre V** présente le composé et rassemble les informations cristallographiques connues pour les différentes phases. Il donne un aperçu des applications potentielles du tréhalose dans les domaines de la pharmacie et de l'agroalimentaire notamment.

Le **chapitre VI** montre les effets d'un broyage mécanique sur la forme anhydre  $T_\beta$ . La possibilité d'amorphiser le tréhalose à l'état solide est mise en évidence pour la première fois [27]. Nous discutons à cette occasion des possibilités de quantification de la fraction amorphisée offertes par l'Analyse Thermique Différentielle et la Résonance Magnétique Nucléaire.

Le **chapitre VII** présente les transformations de phases du tréhalose dihydrate associées à ses différents modes de déshydratation. Deux cas sont abordés ici : la déshydratation du composé cristallin  $T_{2H_2O}$ , et la lyophilisation d'une solution aqueuse de tréhalose. Nous montrerons que les conditions de déshydratation utilisées influencent directement la nature de la phase anhydre obtenue, en produisant soit une phase cristalline métastable  $T_\alpha$ , soit un amorphe [28]. L'utilisation de protocoles de déshydratation optimisés permet de lever les ambiguïtés précédemment signalées quant aux propriétés de l'état anhydre obtenu. Nous avons cherché à mettre en évidence les paramètres physiques susceptibles de contrôler le processus de déshydratation et de conditionner la nature structurale de l'anhydre obtenu. Nos résultats nous ont incités à évaluer les rôles joués par la température d'une part, et le débit des molécules d'eau s'évacuant de l'échantillon d'autre part. Nous présentons également dans ce chapitre les investigations relatives aux propriétés intrinsèques et à la stabilité de  $T_\alpha$ , dont la structure demeure non résolue à ce jour. Enfin, nous évoquons le procédé de lyophilisation comme une voie possible d'amorphisation du tréhalose.

Le **chapitre VIII** propose une comparaison de la mobilité moléculaire des échantillons de tréhalose amorphisés par différentes voies. Cette étude a nécessité l'utilisation conjointe des techniques d'analyse diélectrique et de spectroscopie de chaleur spécifique. Les investigations concernent les domaines métastable et vitreux, et fournissent une évaluation globale de la mobilité des amorphes. Les principaux points discutés sont les caractères non arrhenien et non exponentiel des relaxations, ainsi que la question de l'origine des relaxations secondaires.

- Le **chapitre IX** regroupe les conclusions de l'ensemble des résultats obtenus sur la fanansérine et le tréhalose, et propose de possibles prolongements à ce travail.

## REFERENCES

1. L. Yu, *Adv. Drug. Del. Rev.*, **48** (2001), 27
2. T.P. Shakhshneider, V.V. Boldyrev, dans «Reactivity of Molecular Solids», édité par E. Boldyreva et V. Boldyrev, 1999
3. M. Otsuka, K. Otsuka, N. Kanewima, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20** (1994), 1649
4. J. Font, J. Muntasell, E. Cesari, *Mat. Res. Bull.*, **32**, 12 (1997), 1691
5. H. Bakker, G.F. Zhou, H. Yang, *Prog. Mat. Sci.*, **39** (1995), 159
6. P. Pochet, L. Chaffron, P. Bellon, G. Martin, *Ann. Chim. Sci. Mat.*, **22** (1997), 363
7. N.Q. Lam, P.R. Okamoto, *MRS Bulletin*, **XIX**, 7 (1994), 41
8. H.J. Fecht, W.L. Johnson, *Nature*, **334** (1988), 50
9. G. Martin, P. Bellon, *Solid State Phys.*, **50** (1997), 189
10. R.K. Khankari, D.J.W. Grant, *Thermochimica Acta*, **248** (1995), 61
11. S.R. Byrn, « Solid state chemistry of Drugs », Academic Press, New York, 1982
12. N. Onodera, H. Suga, S. Seki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41** (1968), 2222
13. A. Saleki-Gerhardt, J.G. Stowell, S.R. Byrn, G. Zografi, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 3 (1995), 318
14. A.K. Galwey, *Thermochimica Acta*, **355** (2000), 181
15. S. Petit, G. Coquerel, *Chem. Mater.*, **8** (1996), 2247
16. J. Giovannini, Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1, numéro d'ordre 2648 (2001)
17. J.H. Crowe, L.M. Crowe, A.E. Oliver et al., *Cryobiology*, **43** (2001), 89
18. F. Sussich, C. Skopec, J. Brady, A. Cesaro, *Carbohydr. Res.* (2001), **334**, 165
19. G.A. Jeffrey, R. Nanni, *Carb. Res.*, **137** (1985), 21
20. H.J. Reisener, H.R. Goldschmidt, G.A. Ledingham, A.S. Perlin, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **2** (1962), 403
21. G.M. Brown, D.C. Rohrer, D. Berking et al., *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3145
22. T. Taga, M. Senma, K. Osaki, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3258
23. I. Tsukushi, O. Yamamuro, T. Matsuo, *Solid State Comm.* (1995), **94**, 12, 1691
24. A. Ha, I. Cohen, M. Iee, D. Kievelson, *J. Phys. Chem. Solids*, **100** (1996), 1
25. A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *Phys. Rev. B*, **58** (1998), 1
26. O. Mishima, *Nature*, **384** (1996), 546
27. J.F. Willart, A. De Gusseme, S. Hemon, G. Odou, F. Danede, M. Descamps, *Solid State Comm.* (2001), **119**, 501
28. J.F. Willart, A. De Gusseme, S. Hemon, M. Descamps, F. Leveiller, A. Rameau, *J. Phys. Chem. B* (2002), **106**, 3365



## **CHAPITRE II**

**Transformations de phases à l'état solide**

**Techniques expérimentales et méthodes**

**spectroscopiques utilisées pour la caractérisation des**

**échantillons**



Ce chapitre introductif a pour objectif de préciser les éléments théoriques et méthodologiques utilisés par la suite. Il est divisé en trois sections : la première est consacrée à un rappel bibliographique sur les transitions de phases à l'état solide de matériaux pharmaceutiques. La section B présente les différentes techniques expérimentales utilisées pour la préparation et la caractérisation (structurale, thermique et dynamique) des échantillons. En section C, nous rappelons brièvement les principales caractéristiques de l'état vitreux, et décrivons les méthodes de spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique qui ont permis d'étudier les propriétés dynamiques des composés.

## **A. TRANSFORMATIONS DE PHASES A L'ETAT SOLIDE**

Les matériaux thérapeutiques présentent, à l'état condensé, un polymorphisme souvent très riche et une aptitude à se maintenir dans des états métastables ou amorphes plus ou moins transitoires. Ces différentes formes polymorphiques possèdent généralement des propriétés physiques différentes et n'ont donc pas la même efficacité thérapeutique.

Les procédés industriels d'élaboration des médicaments font couramment intervenir des sollicitations extérieures dites « non thermiques », dans la mesure où elles ne requièrent pas le chauffage du composé. Ce sont, par exemple, le broyage mécanique ou la micronisation destinés à réduire la granulométrie des poudres, ou les opérations de désolvation. Ces perturbations sont susceptibles de modifier profondément les propriétés des matériaux. Par conséquent, leur utilisation doit être parfaitement contrôlée.

Nous allons aborder ici deux aspects importants des procédés de formulation des composés pharmaceutiques, pouvant induire des transformations de phases particulières. Il s'agit du broyage mécanique, peu documenté dans le domaine des matériaux moléculaires, et de la déshydratation de composés hydratés. Nous verrons au paragraphe A.1 comment ces sollicitations interviennent dans la mise en forme des médicaments. Nous présenterons ensuite (§ A.2 et A.3) les différentes propositions de rationalisation des effets du broyage et de la déshydratation.

### **A.1. Situation de l'étude dans le contexte pharmaceutique**

#### **➤ Réduction de la taille des grains – Opérations de broyage**

De manière générale, l'ingénierie des poudres, c'est-à-dire le contrôle de la morphologie et de la taille des particules est une étape essentielle de la galénique. La réduction de la taille des particules est une méthode fréquemment mise en œuvre pour modifier les caractéristiques des

matériaux thérapeutiques. Les techniques les plus couramment utilisées dans ce but sont la micronisation et le broyage mécanique, auquel sera consacrée une grande partie de cette étude. La réduction de la taille de grains implique notamment :

- l'augmentation de la solubilité, qui améliore la biodisponibilité des médicaments [1]
- la possibilité d'administrer des quantités de produit plus faibles, ce qui autorise un meilleur contrôle du dosage et une réduction des effets secondaires [2]
- la possibilité d'accéder à d'autres modes d'administration des médicaments. On peut citer en exemple les inhalateurs, dont l'efficacité pour soigner certaines pathologies pulmonaires est reconnue et qui nécessitent l'élaboration de poudres à très faible granulométrie ( $< 1 \mu\text{m}$ ) [3]
- la modification des propriétés mécaniques de la poudre, qui favorise la réalisation de comprimés (la réduction de taille provoque l'augmentation de la surface spécifique des grains, et du nombre de points de contacts entre les particules. De ce fait, elle augmente le nombre de liaisons interparticulaires pouvant se former pendant la compression, et améliore ainsi la tenue mécanique du comprimé)

Mais les procédés de réduction de la taille des particules peuvent aussi modifier plus profondément les propriétés physiques des substances pharmaceutiques, en provoquant des transitions polymorphiques à l'état solide. Ces transformations inopinées peuvent générer des phases métastables plus solubles, donc plus efficaces que la phase stable initiale. Par exemple, le broyage mécanique de la forme stable de l'indométhacine, notée  $\gamma$ , provoque une transition vers le polymorphe métastable  $\alpha$  [4], qui possède une solubilité plus grande que la forme  $\gamma$  de départ. Les transformations induites par perturbation mécanique peuvent aussi s'avérer néfastes pour la biodisponibilité. On peut citer en exemple les formes B et C du chloramphénicol palmitate, qui se transforment sous traitement mécanique vers la forme A, moins soluble et moins efficace [5]. D'autre part, il a été montré que le broyage de composés moléculaires comme le poly(éthylène téréphthalate) [6] ou le sucrose [7] entraînait l'amorphisation de ces matériaux.

Ces quelques exemples montrent que les problèmes de transformations de phases induites par broyage interviennent couramment dans les matériaux pharmaceutiques, et peuvent avoir des implications considérables dans la formulation des médicaments. Bien que les effets du broyage soient largement reportés dans la littérature pharmaceutique, il n'y a pas eu jusqu'à présent de tentative d'approche physique des diverses modifications entraînées par le broyage dans les matériaux moléculaires organiques. Nous verrons par la suite que ces questions ont été principalement abordées en métallurgie.

### ➤ **Désolvatation – Interactions avec l'eau**

L'utilisation de solvants est extrêmement courante dans l'industrie pharmaceutique. Par exemple, la recherche des polymorphes d'un composé passe généralement par des tentatives de cristallisation par évaporation dans différents solvants.

Nous nous sommes intéressés au cas particulier de l'eau, qui constitue l'un des solvants les plus largement utilisés. Les interactions des composés pharmaceutiques avec l'eau au cours des procédés de formulation doivent être parfaitement contrôlées. En effet, de nombreux matériaux naturellement hygroscopiques forment spontanément, dans les conditions ambiantes, des hydrates stœchiométriques plus stables que les phases anhydres correspondantes. C'est un paramètre à prendre en compte pour la stabilité et la conservation du médicament. A l'inverse, la maîtrise des conditions de déshydratation des systèmes hydratés est également nécessaire au bon déroulement des procédés de formulation : le séchage de systèmes aqueux est une étape fondamentale du procédé de lyophilisation que nous présenterons au chapitre VII.

La déshydratation peut entraîner des modifications structurales profondes. Le retrait des molécules d'eau incluses dans l'édifice cristallin peut provoquer des réarrangements structuraux d'une phase cristalline hydratée vers une phase cristalline anhydre [8]. Quelques exemples d'amorphisations induites par déshydratation ont également été reportés [9-10]. Par ailleurs, la présence de molécules d'eau dans l'édifice cristallin influe de manière conséquente sur des propriétés physiques telles la solubilité, la stabilité thermique et la mobilité moléculaire.

En résumé, les phénomènes d'hydratation ou de déshydratation modifient directement les caractéristiques physiques et chimiques des composés. Tout comme les sollicitations mécaniques, ils vont engendrer des transformations de phases qu'il est nécessaire de contrôler, et idéalement prévoir.

Diverses hypothèses ont été émises pour rendre compte des modifications physiques engendrées par le broyage mécanique ou la déshydratation. Les deux paragraphes suivants présentent une étude bibliographique rassemblant quelques unes de ces propositions. Notre objectif n'est pas de dresser une liste exhaustive des différents modèles précédemment mis au point, mais de fournir quelques éléments de réflexion utiles à l'interprétation des résultats expérimentaux présentés dans les chapitres à venir.

### **A.2. Cas du broyage mécanique**

Les effets du broyage mécanique ont été étudiés de manière extensive dans le domaine de la métallurgie, depuis 1970. Cette technique s'est notamment révélée performante pour la

mécanosynthèse d'alliages métalliques [11]. Diverses études de transitions ordre → désordre induites par broyage ont aussi été reportées, par exemple pour l'alliage FeAl [12]. En outre, le broyage mécanique offre la possibilité d'amorphiser à l'état solide des substances métalliques pures, comme le sélénium [13], ou des composés mixtes, comme les alliages binaires NiZr [14].

Les observations expérimentales des effets du broyage mécanique ont naturellement soulevé la question de leur rationalisation dans une théorie universelle. Plusieurs modèles ont été proposés, mais aucun à ce jour ne rend compte de manière satisfaisante de toutes les transformations de phases induites par le broyage mécanique. Nous avons répertorié ici quelques uns de ces modèles. Les trois premiers (modèles de Gibbs-Thomson, Lindemann et Fecht) sont fondés sur la thermodynamique d'équilibre. Nous présentons également une approche « hors équilibre » récemment mise au point, qui repose sur le concept de transition dynamique.

➤ **Effet Gibbs Thomson - Réduction de la taille des cristallites**

L'effet Gibbs-Thomson est dû la réduction de la taille des cristallites provoquée par les opérations de broyage [15]. L'agrégat cristallin nanoscopique de rayon  $r$  est soumis, du fait de la courbure de l'interface, à une surpression  $\Delta P$  dont l'expression est donnée par :

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{II.1})$$

où  $\gamma$  est la tension interfaciale. L'énergie de Gibbs de cet agrégat est alors augmentée, et la température de fusion réduite en proportion [16] comme l'illustre la **figure II.1** :

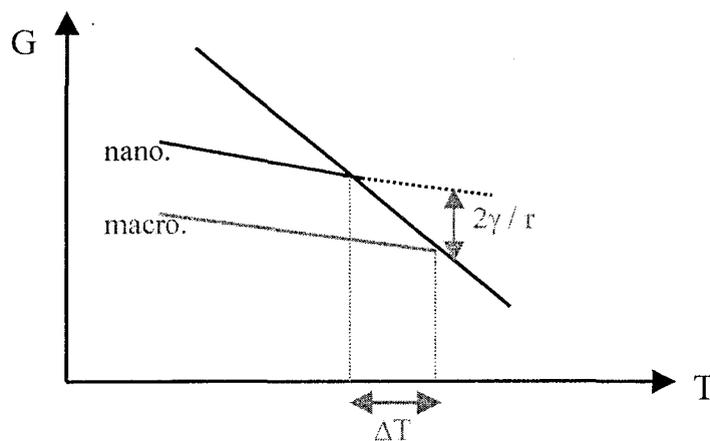


Figure II.1 :

Diagramme de Gibbs donnant  $G(T)$  pour un cristal non broyé macroscopique et un agrégat microscopique. Dans ce deuxième cas, l'interface plus importante perturbe l'énergie de Gibbs et décale la fusion vers les basses températures.

Le modèle de Gibbs – Thomson permet donc de rendre compte d'éventuelles dépressions des températures de fusion des échantillons broyés. Toutefois, ces effets ne sont significatifs qu'à l'échelle nanoscopique.

➤ **Critère de Lindemann généralisé**

Le critère de Lindemann généralisé rationalise la transition cristal → amorphe en tenant compte des défauts introduits par le broyage dans le cristal [17]. Le critère initialement proposé par Lindemann explique le phénomène de fusion de la manière suivante : l'amplitude des vibrations des atomes  $\mu_{\text{vib}}$  autour de leur position d'équilibre augmente avec la température. Quand les mouvements vibrationnels deviennent supérieurs à la moitié de la distance interatomique, le cristal fond. Cette théorie, qui s'appuie sur la seule instabilité thermique, a par la suite été généralisée pour prendre en compte le désordre « statique » lié aux défauts introduits dans le cristal du fait du broyage [17]. Dans ce contexte, la fusion intervient lorsque le déplacement atomique moyen total atteint une valeur critique, ce qui s'écrit :

$$\langle \mu_{\text{vib}}^2 \rangle + \langle \mu_{\text{sta}}^2 \rangle = \langle \mu_{\text{cri}}^2 \rangle \quad (\text{II.2})$$

où  $\mu_{\text{sta}}$  est le déplacement atomique dû au désordre statique, et  $\mu_{\text{cri}}$  le déplacement atomique critique au delà duquel le réseau cristallin ne peut subsister.

L'expression (II.2) implique qu'un cristal présentant suffisamment de défauts puisse subir une fusion induite par le seul désordre statique, à toute température  $T_f^d$  inférieure à la température de fusion « théorique »  $T_f^o$  du cristal non défectif. Cette approche est compatible avec les modèles microscopiques visant à expliquer le mécanisme de formation des défauts dans les cristaux. Par exemple, le principe énoncé par Nabarro stipule que l'énergie de formation d'un défaut dans un cristal soit une fonction décroissante de la concentration de ce défaut [18]. En d'autres termes, plus le nombre de défauts est important, plus il est facile d'en générer d'autres, ce qui conduit finalement à la désorganisation totale du cristal.

➤ **Approche de la thermodynamique d'équilibre - Théorie de Fecht**

Le modèle proposé par Fecht est une généralisation des modèles de fusion de Frenkel et de Mott [19]. Il s'inscrit dans le cadre de la thermodynamique d'équilibre et permet de tenir compte du rôle des défauts dans le phénomène de fusion. Pour Fecht, les défauts ponctuels introduits par sollicitation extérieure (broyage mécanique, irradiation...), font partie intégrante de la structure cristalline. L'évolution relative de l'enthalpie libre du cristal défectif par rapport au liquide, en fonction de la concentration de défauts  $c$ , est représentée sur la **figure II.2**.

Dans un cristal défectif, l'équilibre thermodynamique entre le cristal et le liquide n'est plus défini par

$$\Delta G = G_{liq} - G_{cri} = 0 \quad (II.3)$$

où  $G_{liq}$  et  $G_{cri}$  désignent respectivement les énergies libres du liquide et du cristal, mais par

$$\Delta G^* = \Delta G - \Delta G_d = 0 \quad (II.4)$$

Dans l'expression (II.4), le terme  $\Delta G_d$  désigne la variation d'énergie libre associée aux défauts ponctuels. Pour une concentration  $C$  de défauts, cette variation s'écrit :

$$\Delta G_d = C(\Delta H_d - T\Delta S_d) + kT[C \ln C + (1-C) \ln (1-C)] \quad (II.5)$$

où  $\Delta H_d$  et  $\Delta S_d$  sont les variations d'enthalpie et d'entropie associées aux défauts.

La figure II.2 montre que plus la concentration de défauts est élevée, plus la transition cristal  $\rightarrow$  liquide est décalée vers les basses températures et plus elle se rapproche d'une transition du second ordre. Il existe une concentration limite de défauts ( $C_2$  sur la figure II.2) pour laquelle l'enthalpie de Gibbs du cristal défectif devient tangente à celle du liquide. Comme le souligne Okamoto [20], le cristal fortement défectif se trouve alors dans une situation thermodynamique qui le pousse à basculer vers la phase liquide. Toutefois, à la température à laquelle se produit cette transformation, la mobilité moléculaire n'est pas celle d'un liquide. On assiste donc à une transition cristal  $\rightarrow$  amorphe.

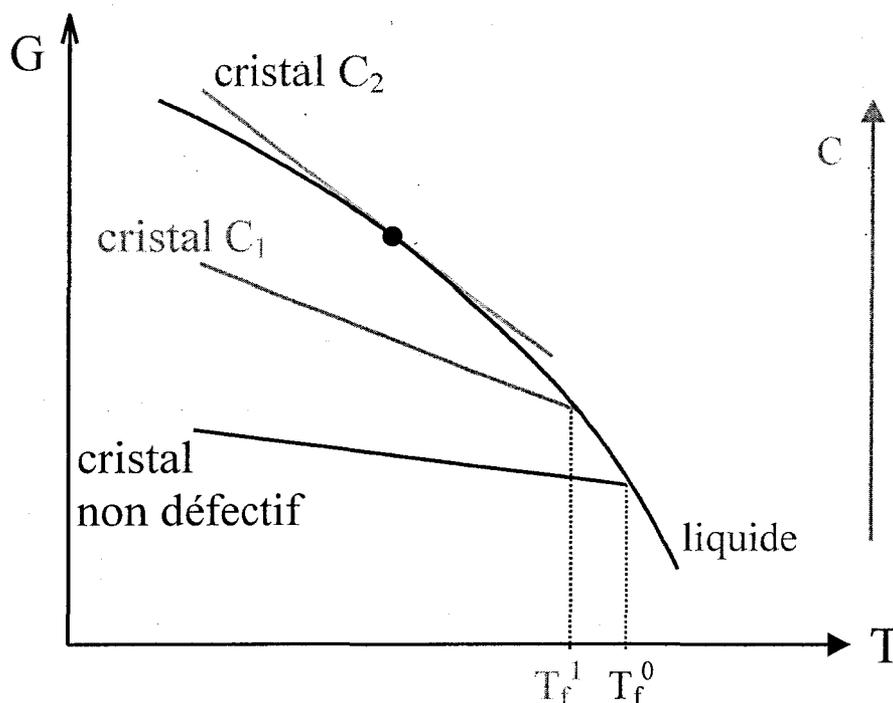


Figure II.2 :

Représentation schématique du diagramme de Gibbs pour un cristal non défectif ( $C = 0$ ) et deux cristaux défectifs pour lesquels les concentrations des défauts  $C_1$  et  $C_2$  sont telles que  $C_1 < C_2$ , selon l'approche de Fecht.

Les trois modèles présentés ci-dessus permettent de rendre compte d'une partie des effets du broyage constatés expérimentalement. Toutefois, aucun n'est en mesure de décrire toutes les transformations physiques possibles. Le modèle de Gibbs-Thomson permet de rendre compte des éventuelles dépressions de la température de fusion des composés broyés. En revanche, il ne propose aucune explication relative aux transitions de phases survenant au cours du broyage. Les modèles de Lindemann et de Fecht fournissent tous deux une explication aux phénomènes d'amorphisation par broyage, mais aucun n'est capable de rationaliser les transitions polymorphiques observées dans de nombreux cas.

A ces approches fondées sur la thermodynamique d'équilibre, on peut opposer l'hypothèse de transitions dynamiques récemment formulée par G. Martin et P. Bellon.

➤ **Approche hors équilibre – Notion de transition dynamique**

Le formalisme proposé par Martin et al. pour rationaliser les effets du broyage mécanique [21] s'appuie sur l'étude expérimentale de l'amorphisation de NiZr [14] d'une part, et de la mise en désordre d'alliages binaires FeAl [12] d'autre part. Ces auteurs ont montré qu'il était pertinent de définir une intensité de broyage comme étant la quantité de mouvement cédée à la poudre par unité de masse et de temps. Dans le cas simple d'un broyeur vertical à une bille, I s'écrit :

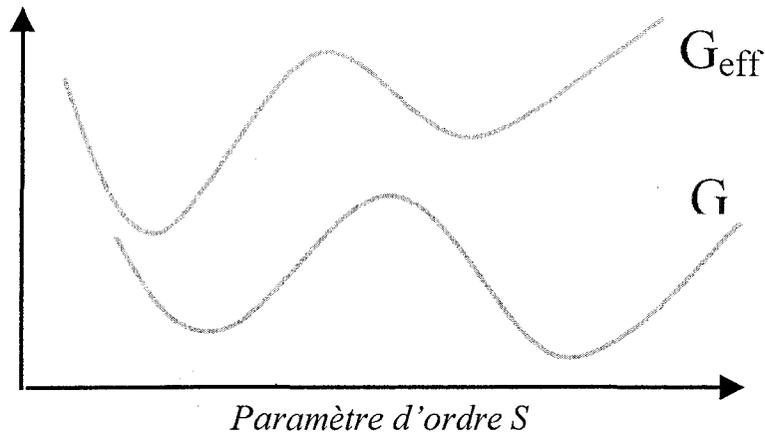
$$I = \frac{M_b V_b f}{M_p} \quad (II.6)$$

où  $M_p$  et  $M_b$  sont les masses respectives de la poudre et de la bille de broyage,  $V_b$  la vitesse de la bille et  $f$  la fréquence des chocs. La fréquence des impacts de la bille sur la poudre intervient donc de manière directe dans la quantification de l'efficacité du broyage.

Ce type d'approche balistique est une généralisation du traitement des problèmes de transformations de phases induites par irradiation. Elle a été formalisée dans le cas de la mise en désordre d'alliages FeAl, et permet de rationaliser les effets du broyage en s'appuyant sur le concept de transition dynamique, hors équilibre [21]. D'après la théorie de Martin - Bellon, les effets du broyage peuvent être décrits en fonction du jeu de paramètres  $\{I, T\}$ ,  $T$  étant la température de broyage. L'état du système physique est quant à lui décrit par un paramètre d'ordre  $S$ , qui dans le cas de FeAl est le degré d'ordre dans l'alliage. Pendant le broyage, deux dynamiques agiraient en parallèle : l'une liée aux propriétés thermodynamiques intrinsèques du composé, et l'autre en relation directe avec la fréquence et l'intensité des chocs balistiques des billes de broyage sur le matériau. Cette dernière contribution ajoute un terme dit « de forçage » à l'énergie libre de Gibbs. Les états accessibles au systèmes sont alors définis par l'équation :

$$\frac{dS}{dt} = -\Gamma_{th} \frac{\partial G}{\partial S} - \Gamma_{bal} = -\frac{\partial G_{eff}}{\partial S} \quad (II.7)$$

où  $S$  est le paramètre d'ordre caractérisant la transition, et  $\Gamma_{\text{bal}}$  et  $\Gamma_{\text{th}}$  sont respectivement la fréquences des sauts balistiques, indépendante de la température, et celles des sauts thermiquement activés. Les solutions de cette équation correspondent aux minima de « l'énergie libre effective », notée  $G_{\text{eff}}$ . Ils définissent des états stationnaires accessibles sous broyage, qui ne sont pas des états d'équilibre du système, comme l'illustre la **figure II.3** :



*Figure II.3 :*

*Illustration du concept « d'énergie libre effective ». Les minima de  $G_{\text{eff}}$  définissent les états stationnaires accessibles au système sous broyage. Ils ne correspondent pas aux minima thermodynamiques définis par l'énergie libre  $G$ , et qui définissent les états d'équilibre du système.*

Les paramètres extérieurs  $I$  et  $T$  influant directement sur l'état final atteint après le broyage, on peut envisager l'établissement de diagrammes de phases dynamiques, dont l'objectif ultime est de permettre la prédiction de l'état final atteint par le composé en fonction des paramètres de forçage.

Le modèle de Martin – Bellon [21] ne fait aucune hypothèse sur la nature de la transition induite par le broyage. Dans une approche hors équilibre, il permet donc de rendre compte aussi bien des transitions polymorphiques que des amorphisations à l'état solide. Toutefois, l'application stricte de ce modèle est aussi soumise à certaines restrictions :

- l'intensité de broyage  $I$  doit être définie pour un type de broyeur donné, la notion de fréquence de chocs étant indispensable. Dans le cas où le mouvement des billes de broyage est complexe (par exemple, pour un broyeur planétaire) la détermination des paramètres de forçage pose problème
- dans le cas de transformations polymorphiques ou d'amorphisations induites par broyage, le choix du paramètre d'ordre pertinent demeure un problème non résolu (la validation du modèle

n'ayant été effectuée que pour des alliages métalliques binaires subissant une transition ordre → désordre)

### **A.3. Cas de la déshydratation**

Les interactions des matériaux moléculaires pharmaceutiques avec l'eau constituent un problème majeur de leur formulation et de leur vieillissement. L'eau peut intervenir de diverses manières, en fonction de la nature du diagramme binaire du composé moléculaire envisagé et de l'eau.

Un grand nombre de composés moléculaires forment des hydrates stœchiométriques [22]. On parle alors de « pseudopolymorphisme ». Ces phases sont susceptibles de se former de manière inopinée pendant le procédé de fabrication ou le stockage du médicament. Des réactions de déshydratation peuvent se produire au chauffage ou par modification de l'atmosphère environnante (vide partiel, balayage de gaz sec...). Ces réactions sont influencées par un grand nombre de facteurs, liés aux perturbations extérieures appliquées, ainsi qu'à la nature moléculaire du composé (notamment le nombre de liaisons hydrogène que comporte la maille). Les effets des déshydratations signalés dans la littérature peuvent être classés en trois catégories principales.

- Le plus souvent, on assiste à la formation de nouvelles phases cristallines anhydres, ou de degré de stœchiométrie différent. On peut observer un changement de structure cristalline, vers une forme anhydre pouvant par ailleurs être obtenue par cristallisation dans un autre solvant. Il existe généralement une parenté entre la structure de l'anhydre obtenu et celle de l'hydrate de départ. Cela est dû au fait que la structure de l'hydrate de départ favorise l'évacuation des molécules d'eau suivant des directions cristallographiques précises. C'est le cas par exemple du lactose [23] et de la caféine [24], tous deux monohydrates, pour lesquels les molécules d'eau quittent la structure cristalline par des canaux parallèles.
- Dans les autres cas, il n'y a pas de relation entre la structure anhydre résultante et la structure de l'hydrate de départ, et la variété anhydre issue de la déshydratation peut différer de celle obtenue par cristallisation dans un autre solvant.
- La déshydratation peut conduire à un état anhydre amorphe. Cette transformation est couramment observée lors de la lyophilisation. Elle peut aussi survenir lors de la déshydratation d'un hydrate stœchiométrique, et entraîner alors une transformation directe cristal → verre à l'état solide. C'est ce qui se produit par exemple lors de la déshydratation de l'acétate de magnésium tétrahydrate [9].

Les investigations consacrées à la déshydratation des hydrates moléculaires ont révélé que les mécanismes microscopiques qui gouvernent la déshydratation sont souvent complexes, et diffèrent fortement d'un composé à l'autre. Elles ont abouti à la définition de critères permettant de classer les différents processus de déshydratation [25]. Ces critères concernent principalement les mécanismes microscopiques de départ d'eau, et la relation structurale entre l'hydrate de départ et l'anhydre issu de la déshydratation [26]. Toutefois, il n'y a pas de consensus sur les mécanismes de déshydratation, et diverses possibilités de scénarii ont été proposées [25]. On peut les classer en deux catégories principales [26]:

- **Mécanismes « continu »**: ces modèles postulent que les réactions de déshydratation interviennent de manière continue, par réorientation progressive des molécules du cristal. Dans ce cas, les réactions interviennent par le biais de mouvements de faible amplitude, ce qui ne modifie pratiquement pas les caractéristiques du réseau cristallin. La phase issue de la déshydratation présente alors des caractéristiques structurales comparables à celles de l'hydrate d'origine. Néanmoins, de très nombreuses réactions de déshydratation produisent des phases dont la structure est clairement différente de celle de l'hydrate initial.
- **Mécanismes de nucléation – croissance** : ces modèles postulent que les transitions induites par déshydratation ont pour point de départ des sites précis, par exemple les défauts dans une structure cristalline ou la surface des particules. La transformation se propage à l'ensemble du matériau par déplacement progressif d'une interface. Dans ce cas, l'information structurale contenue dans la phase hydratée de départ n'est pas conservée, et on n'observe pas de réminiscence de cet ordre dans la structure de la phase obtenue après déshydratation.

Ce type d'interprétation est né d'analyses cinétiques conduisant à une forme sigmoïdale de type Avrami des courbes de déshydratation en fonction du temps. Le passage d'une phase hydratée à un pseudopolymorphe de stœchiométrie différente a donc été interprété en terme de nucléation - croissance. C'est cette hypothèse qu'il faudrait alors élargir au processus d'amorphisation par déshydratation, dans une approche inverse de celle habituellement associée à la loi d'Avrami (qui décrit la cristallisation par un mécanisme de nucléation - croissance).

Dans certains cas, très rares, il a été signalé que selon les conditions de déshydratation, on pouvait générer une phase anhydre soit cristalline, soit amorphe. C'est le cas de l'érythromycine dihydrate [27] et de l'ampicilline trihydrate, pour laquelle la déshydratation à pression atmosphérique produit un anhydre cristallin, tandis que la déshydratation sous pression (21 bars) produit un anhydre amorphe [28]. C'est aussi le cas de la déshydratation du tréhalose dihydrate

[29,30], à laquelle sera consacrée une partie de cette étude (chapitre VII). En effet, la possibilité d'obtenir, pour un même composé, différents produits de la déshydratation, offre en principe une opportunité supplémentaire d'identifier les paramètres physiques pertinents susceptibles de gouverner les différents modes de transformations.

La littérature pharmaceutique fait état de recherches de paramètres extérieurs conditionnant le produit de la déshydratation. Parmi eux, on peut citer :

- **la température** : Ono et al. [31] ont montré que pour la carbamazépine dihydrate, des températures de déshydratations différentes généraient la formation de phases anhydres différentes.
- **la pression** : Han et al. ont étudié l'influence de la pression sur la déshydratation de la carbamazépine dihydrate [32] et de l'ampicilline trihydrate [28]. Pour la carbamazépine, la déshydratation à pression atmosphérique conduit à la formation du polymorphe anhydre  $\gamma$ , tandis qu'à haute pression c'est le polymorphe anhydre  $\beta$  qui est formé. Dans le cas de l'ampicilline trihydrate, la déshydratation à pression atmosphérique conduit à l'amorphisation du composé, tandis que la déshydratation à haute pression permet la formation d'ampicilline anhydre cristalline.
- **la taille des grains** : cet aspect sera abordé au chapitre VII, en relation avec nos résultats expérimentaux sur la déshydratation du tréhalose.

D'autres paramètres ont également été testés, mais ne seront pas abordés ici. Malgré les nombreuses études expérimentales (portant notamment sur les composés pharmaceutiques), aucune théorie unificatrice capable de décrire tous les effets de la déshydratation n'a encore émergé.

Un autre aspect des effets d'interaction des composés pharmaceutiques avec l'eau implique l'ensemble du diagramme binaire du mélange, et ses aspects hors équilibre. On rencontre très fréquemment, dans la littérature pharmaceutique ou agrochimique, la notion de diagramme « d'état », plutôt que « de phase », car les aspects de non équilibre sont impliqués. Cela se produit lors de cheminements complexes dans ce diagramme, comme ceux empruntés au cours du processus de lyophilisation [33] et illustrés sur la **figure II.4**.

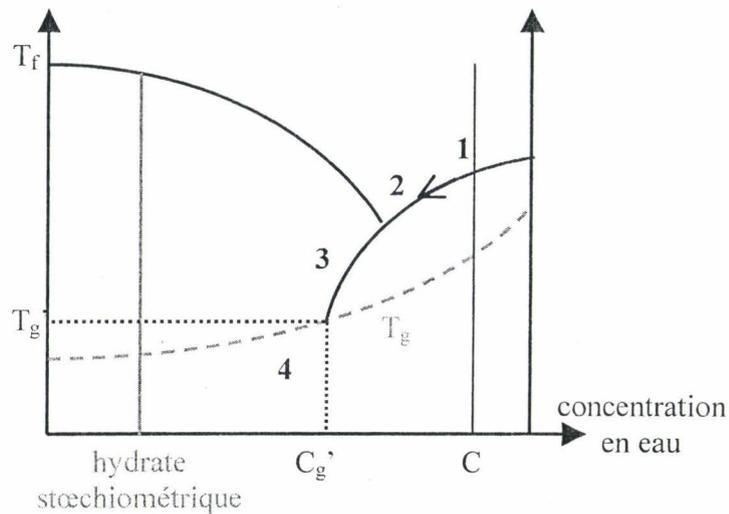


Figure II.4

Diagramme d'état d'un mélange {réactant / eau} ne présentant pas d'eutectique. Les points 1 à 4 décrivent l'étape initiale de congélation du processus de lyophilisation.

Dans le cas d'un mélange sans eutectique, l'étape initiale du processus de lyophilisation peut être décrite de la manière suivante :

- (1) la congélation d'une solution riche en eau provoque la cristallisation de la glace.
- (2) la concentration en réactant augmente, et le mélange suit la courbe d'équilibre solide – liquide
- (3) l'abaissement de la température conduit le système à suivre le prolongement métastable du liquidus. La solution non encore congelée est de plus en plus concentrée, et sa viscosité augmente fortement
- (4) en poursuivant le refroidissement, le système atteint la température T<sub>g'</sub> à laquelle la mobilité moléculaire ne permet plus les réarrangements structuraux, sur l'échelle de temps de l'expérience. On aboutit alors à un état « figé », hors équilibre, pour une concentration C<sub>g'</sub> fixée. La connaissance des paramètres C<sub>g'</sub> et T<sub>g'</sub>, définis par l'intersection d'une courbe d'équilibre métastable, et d'une courbe hors équilibre, est essentielle au bon déroulement du processus de lyophilisation, puisque l'étape de congélation doit impérativement s'effectuer à une température inférieure à T<sub>g'</sub> [34]. Il faut donc amener le système dans un état de non équilibre.

Un cycle de lyophilisation classique comprend, en plus de l'étape de congélation, deux étapes de séchage successives effectuées à plus haute température et sous pression réduite, afin de sublimer la glace présente dans le mélange. Nous aurons l'occasion de revenir sur les différentes étapes du cycle au chapitre VII. La lyophilisation, très couramment employée en industrie

pharmaceutique, explore donc le diagramme d'état d'un mélange binaire {réactant / eau} dans les domaines d'équilibre et de non équilibre.

En conclusion, les sollicitations telles que le broyage mécanique ou la déshydratation d'hydrates cristallins, sont susceptibles de modifier profondément l'état physique des composés, en générant des réarrangements structuraux importants. Les répercussions de ces transformations sur les propriétés thérapeutiques sont considérables, dans la mesure où l'état structural du médicament influence non seulement ses propriétés physico-chimiques et mécaniques, mais aussi sa biodisponibilité et son efficacité. En conséquence, l'optimisation des conditions d'emploi et de formulation des médicaments nécessite de maîtriser, et à terme prédire les transformations de phases induites par le broyage et la déshydratation.

## B. TECHNIQUES de PREPARATION et de CARACTERISATION DES ECHANTILLONS

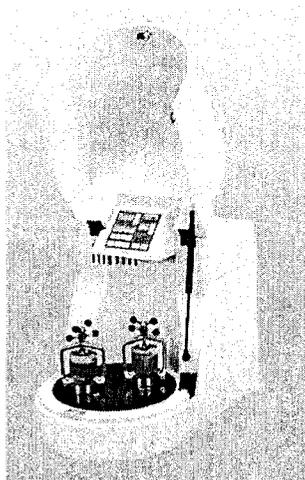
### B.1. Broyage des échantillons

Les études présentées dans ce rapport ont nécessité la réalisation de nombreuses opérations de broyage. L'appareil utilisé est un **microbroyeur planétaire** « **Pulvérisette 7** » commercialisé par Fritsch (**photo II.1**). Il est constitué d'un plateau sur lequel sont fixées deux jarres de broyage de 45 ml chacune. Chaque jarre peut contenir jusqu'à 7 billes de broyage de 15 mm de diamètre. Les jarres et les billes de broyage sont en oxyde de zirconium (de pureté 95 %  $ZrO_2$ , et de densité  $5.7 \text{ g.cm}^{-3}$ ). Ce matériau présente une très grande résistance aux chocs et à l'usure et autorise des broyages prolongés.

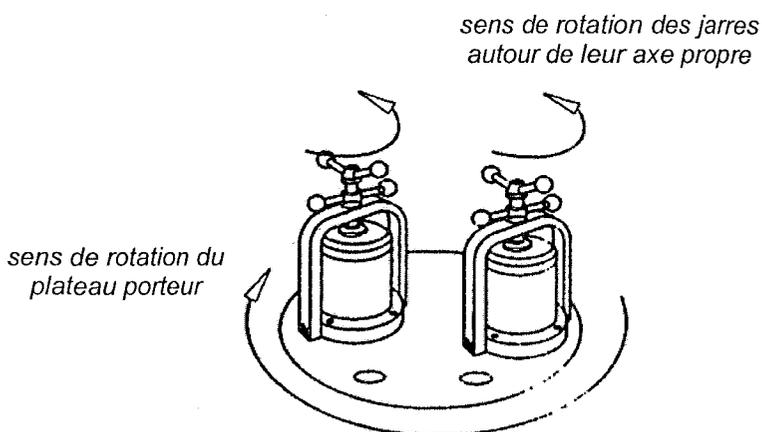
Les sens de rotation des jarres autour de leur axe propre et du plateau porteur sont opposés, ce qui génère des forces centrifuges concurrentes et antagonistes. La vitesse de rotation des jarres est la même que celle du plateau. Elle est choisie par l'utilisateur et peut varier entre 100 trs/min et 800 trs/min, par pas de 10 trs/min.

- Le broyage dans la Pulvérisette 7 résulte donc de deux phénomènes simultanés :
  - un effet de friction induit par le roulement des billes de broyage sur les parois de la jarre
  - un effet de choc provenant de l'impact des billes sur ces parois.

La **figure II.5** schématise le fonctionnement du microbroyeur planétaire « Pulvérisette 7 » :



*Photo II.1 :*  
Microbroyeur planétaire  
« Pulvérisette 7 »



*Figure II.5 :*  
Principe de fonctionnement de la Pulvérisette 7

Afin d'assurer aux expériences de broyage la meilleure reproductibilité possible, nous avons utilisé pour chaque expérience de broyage les mêmes **paramètres expérimentaux**. Toutes les opérations de broyage ont ainsi été réalisées avec 7 billes de broyage et 2 grammes de poudre par jarre. La vitesse de rotation des jarres et du plateau porteur a été fixée à 400 tours/minute.

Les chocs provoqués par les billes de broyage induisant une élévation de température à l'intérieur des jarres pendant les opérations de broyage, nous avons limité cet effet importun en alternant des périodes de broyage effectif et des périodes de pause de 5 minutes chacune.

## **B.2. Diffraction des rayons X sur poudre (DX)**

La Diffraction des Rayons X sur poudre (DX) a été utilisée au cours de cette étude, pour identifier les états cristallographiques des échantillons, ou suivre en temps réel des transformations structurales survenant au cours de traitements thermiques. Les résultats reportés dans les chapitres suivants proviennent de trois diffractomètres différents :

- ◆ un **diffractomètre Inel** muni d'un détecteur courbe sensible en position CPS 120. Sa courbure est telle que les rayons X diffractés arrivent perpendiculairement à l'anode du détecteur, ce qui permet de s'affranchir des erreurs de parallaxe habituellement rencontrées aux limites des détecteurs courbes. Le détecteur CPS 120 autorise des acquisitions très rapides, sur un domaine angulaire de 120 degrés. Le rayonnement utilisé provient d'une anticathode en cuivre ; sa longueur d'onde est  $\lambda(\text{Cu}_{K\alpha 1}) = 1.541 \text{ \AA}$ .

Ce montage a été principalement utilisé pour la caractérisation structurale des poudres à température ambiante. Les échantillons ont été analysés sur capillaires tournants de diamètre 0.7 mm.

- ◆ un **diffractomètre Panalytical Xpert Pro**, muni d'un détecteur Xcelerator. Il est équipé d'une chambre Anton Paar TTK 450, qui permet de réaliser le vide à  $10^{-2}$  mbar, et de faire varier la température de  $-193^\circ\text{C}$  à  $+450^\circ\text{C}$ . Cet appareil a été utilisé en particulier pour des expériences de diffraction des rayons X en réflexion, nécessitant l'utilisation de porte-échantillons cuivre/chrome, de dimension  $15 \times 10 \times 0.8 \text{ mm}^3$ . Le rayonnement provient d'une anticathode de cuivre ( $\lambda(\text{Cu}_{K\alpha 1}) = 1.541 \text{ \AA}$ ).

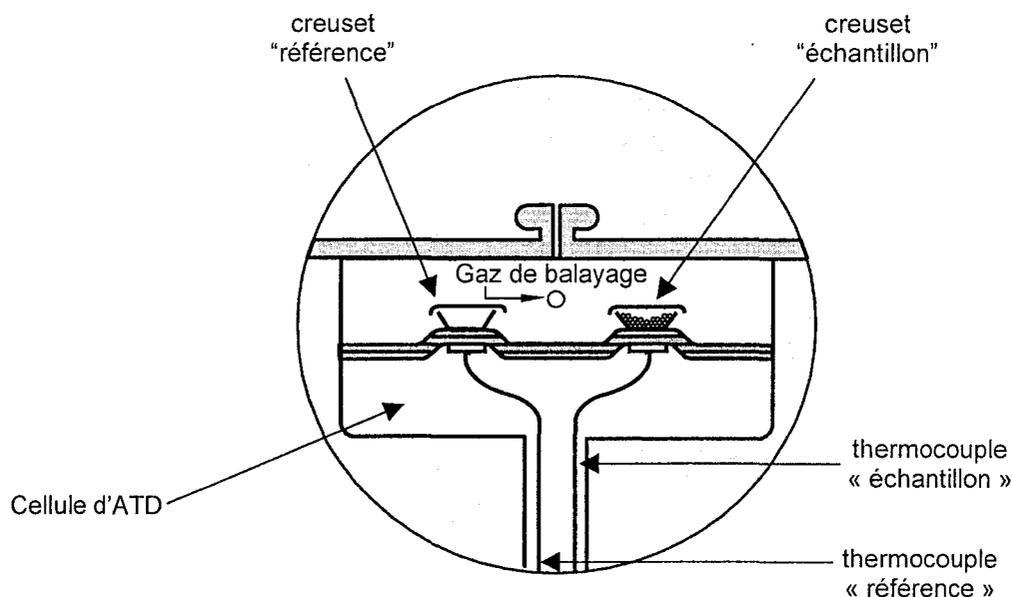
Ce montage permet d'effectuer des expériences de diffraction X résolues en temps, et de suivre les évolutions structurales d'échantillons soumis à des traitements thermiques.

- ◆ un diffractomètre Siemens - Bruker D5000, équipé d'une chambre en température Anton Paar TTK 450. Les porte échantillons sont en aluminium. Un tube à anticathode de cobalt fournit un rayonnement incident filtré par le fer. Deux radiations sont émises :  $\text{Co K}\alpha_1$  ( $\lambda = 1.7890 \text{ \AA}$ ) et  $\text{Co K}\alpha_2$  ( $\lambda = 1.7929 \text{ \AA}$ ). On utilise un détecteur linéaire multicanal Braun 50M, qui possède une fenêtre de détection de largeur  $10^\circ$  en  $2\theta$ .

Ce montage a été plus spécifiquement employé au suivi des modifications structurales en temps réel des échantillons.

### B.3. Analyse Thermique Différentielle (ATD)

L'Analyse Thermique Différentielle (ATD) permet de suivre en temps réel l'évolution thermodynamique d'un échantillon, pendant un traitement thermique ou une isotherme. L'appareil que nous avons utilisé est la **DSC 2920 de TA Instruments**. Il est équipé d'un compresseur réfrigérant qui permet d'étendre la gamme des températures accessibles de  $-60^\circ\text{C}$  à  $400^\circ\text{C}$ . Les échantillons sont placés dans des creusets en aluminium sans couvercle (pour favoriser d'éventuelles déshydratations lors du chauffage) ; un creuset vide, de même masse que le creuset « échantillon », tient lieu de référence. La masse de produit est choisie suffisamment faible (3 - 10 mg) pour que la totalité de l'échantillon suive les variations thermiques imposées. L'enceinte de la DSC 2920 est schématisée sur la **figure II.6**.



*Figure II.6 :*

*schéma de principe du four de la DSC 2920 de TA Instruments*

Avant chaque série de mesures, la *ligne de base* est calibrée à four vide, avec une vitesse de chauffage identique à celle de l'expérience. La *température* et l'*enthalpie* sont corrigées à l'aide d'un échantillon d'Indium servant d'étalon. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Universal Analysis 2000 version 3.7 de TA Instruments.

L'utilisation spécifique de l'ATD en mode modulé requiert une étape de calibrage supplémentaire permettant de corriger la valeur de la chaleur spécifique  $C_p$ . Cette étape s'effectue en mesurant la valeur du  $C_p$  du saphir sur la gamme de température de l'expérience. La description détaillée de la technique d'ATD à modulation de température, qui permet de réaliser une spectroscopie de chaleur spécifique, est proposée au paragraphe C.3 de ce chapitre.

#### **B.4. Analyse ThermoGravimétrique (ATG)**

L'Analyse ThermoGravimétrique (ATG) mesure l'évolution de la masse d'un échantillon, en fonction du temps ou de la température, et permet notamment de détecter et de suivre les déshydratations. L'appareil utilisé est la **TGA Q500 de TA Instruments**. Les échantillons, de masse comprise entre 5 et 10 mg, sont placés dans une nacelle balayée par un flux d'azote sec. Les évolutions de masse sont mesurées par une microbalance de précision 0.1  $\mu\text{g}$ .

Le calibrage de l'appareil s'effectue en deux temps :

- la balance micrométrique est calibrée grâce à des références de masses étalon de 100 mg et 1 g fournies par le constructeur
- la température est calibrée avec les points de Curie de l'alumel et du nickel

Les résultats d'ATG ont été analysés avec le logiciel Universal Analysis 2000, version 3.7 de TA Instruments.

#### **B.5. Cinétique d'absorption de vapeur (ou « Dynamic Vapor Sorption » : DVS)**

La technique de DVS permet de mesurer les variations de masse d'un échantillon, en faisant varier le degré d'humidité relative dans l'enceinte de l'appareil. Les variations de masse sont mesurées par une microbalance, et le taux d'humidité est atteint par un mélange de vapeur d'eau et d'azote sec. L'appareil utilisé est le **DVS 1000 de Surface Measurements Systems**.

La microbalance est calibrée grâce à une masse étalon de 100 mg  $\pm$  50  $\mu\text{g}$ . La calibration en humidité relative (HR) est effectuée avec cinq solutions saturées de sels dont le point de déliquescence correspond à une HR précise à 25°C:

LiCl : 11.3 % HR

MgCl<sub>2</sub> : 32.8 % HR

Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> : 52.8 %

NaCl : 75.3 % HR

KNO<sub>3</sub> : 93.7 % HR

## **B.6. Microscopie Optique**

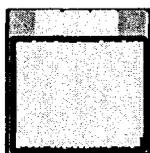
Nous avons utilisé le **microscope optique Olympus BX51**. Les échantillons sont placés dans une platine Linkam THMS 600 permettant d'effectuer des traitements thermiques au chauffage et au refroidissement, et de contrôler l'atmosphère. Ils sont éclairés en transmission par une lumière halogène de 100 W. Un régulateur Linkam TMS 94, associé à un système de refroidissement à l'azote liquide, donne accès à une gamme de températures allant de - 190°C à 600°C. Les vitesses de chauffe accessibles (0.01°C/min – 100°C/min ) autorisent l'application de traitements thermiques analogues à ceux utilisés en ATD et en ATG. Les analyses des photos et la détermination des tailles moyennes des particules ont été réalisées avec le logiciel AnalySys version 3.2, de Soft Imaging System GmbH.

## **B.7. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

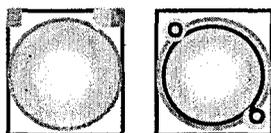
La RMN du solide a été utilisée pour étudier les propriétés structurales intramoléculaires des différents échantillons. Les spectres CPMAS du carbone (<sup>13</sup>C) ont été enregistrés à 25.14 MHz, à température ambiante, sur un spectromètre Bruker ASX 100 équipé d'une sonde MAS adaptée à des rotors de 7 mm. La fréquence de rotation des rotors est de 5 kHz, ce qui est suffisant pour s'affranchir des bandes de rotation, et permet de s'assurer du caractère isotrope du déplacement chimique. La largeur des pics est dans ce cas minimisée à la résolution instrumentale. Le temps de relaxation spin - réseau T<sub>1</sub>(<sup>1</sup>H) est mesuré séparément sur une sonde proton statique. Chaque séquence est séparée par un délai de répétition égal à cinq fois T<sub>1</sub>(<sup>1</sup>H), de manière à permettre la relaxation complète des spectres CPMAS <sup>13</sup>C. 2048 points séparés de 160 μs ont été enregistrés pour chaque signal d'induction libre. Une convolution lorentzienne de 3 Hz a été appliquée à l'ensemble des spectres.

## B.8. Analyse Diélectrique

Les mesures diélectriques ont été réalisées avec l'analyseur **DEA 2970 de TA Instruments**, qui couvre un domaine fréquentiel de 7 décades (de  $3 \cdot 10^{-3}$  à  $10^5$  Hz). La gamme de température accessible s'étend de  $-190$  à  $400^\circ\text{C}$  grâce à l'utilisation d'un système de refroidissement à l'azote liquide (Liquid Nitrogen Cooling Accessory). Pendant chaque expérience, l'échantillon est maintenu sous un flux d'azote sec, afin de prévenir toute absorption d'humidité. Deux types de cellules ont été utilisés, suivant la nature physique de l'échantillon :



- les **cellules « interdigitées »**, qui sont spécialement adaptées à l'étude des propriétés diélectriques des liquides. Elles se composent d'un quadrillage d'électrodes sur lequel le composé est directement fondu, ce qui garantit un remplissage optimal de la cellule



- les **cellules de type « condensateur plan »**, qui permettent l'investigation des propriétés diélectriques d'échantillons poudreux (issus du broyage notamment). La poudre est dans ce cas préalablement compactée sous 8 tonnes à la presse hydraulique, de manière à former une pastille homogène, d'épaisseur inférieure à 1 mm.

La caractérisation des propriétés diélectriques des échantillons a été effectuée en deux étapes. Nous avons réalisé des expériences préliminaires isochrones, qui consistent à tester plusieurs fréquences au cours d'un balayage en température. Elles fournissent une évaluation globale du comportement de l'échantillon, et permettent de cibler les domaines de température et de fréquence nécessitant des investigations plus poussées. L'étude approfondie des processus de relaxations diélectriques a été effectuée au cours d'expériences isothermes, en utilisant le plus grand nombre de fréquences possibles (28 au maximum). La durée de chaque isotherme est calculée de sorte que la table de fréquences puisse être parcourue plusieurs fois, ce qui permet de s'assurer de la stabilité du composé pendant l'isotherme.

Les résultats des mesures diélectriques ont été affinés avec le logiciel WinFit version 1.2 de Novocontrol GmbH.

La réalisation de mesures spectroscopiques avec l'analyseur diélectrique est décrite en détails au paragraphe C.3 de ce chapitre.

## **C. ASPECTS METHODOLOGIQUES ET THEORIQUES :** **CARACTERISATION DE L'ETAT VITREUX**

Une partie de ce mémoire (chapitre VIII) est consacrée à l'étude de la mobilité moléculaire de matériaux amorphisés par différentes méthodes, et à son évolution à l'approche de la transition vitreuse. Une telle étude nécessite certaines connaissances préalables concernant la transition vitreuse et ses propriétés. Elle nécessite aussi la maîtrise de techniques spectroscopiques adaptées à ce type d'investigations, telles l'ATD à modulation de température ou l'analyse diélectrique. D'autre part, la température de transition vitreuse  $T_g$  est une référence de l'état amorphe, par rapport à laquelle il est nécessaire de situer l'ensemble des perturbations appliquées.

Nous rappellerons au paragraphe C.1, la définition et les caractéristiques de la transition vitreuse. Le paragraphe C.2 sera consacré à la description de la mobilité moléculaire de part et d'autre de  $T_g$ . Nous détaillerons ensuite, au paragraphe C.3 deux méthodes de caractérisation des relaxations qui nous ont permis de caractériser la mobilité moléculaire des différents échantillons : la spectroscopie diélectrique et la spectroscopie de chaleur spécifique, utilisée pour étudier les relaxations enthalpiques des matériaux amorphes.

### **C.1. Définition et caractéristiques de la transition vitreuse**

Les composés solides peuvent exister sous forme cristalline ou sous forme amorphe. L'état cristallin se caractérise par la périodicité de son réseau. L'état amorphe, au contraire, ne possède pas d'ordre à longue portée. Le liquide en constitue l'exemple le plus courant [35].

La **figure II.7** représente l'évolution de l'entropie configurationnelle  $S$  et de la chaleur spécifique  $C_p$  d'un liquide sous refroidi en fonction de la température  $T$ . Le refroidissement de la phase liquide peut, dans certains cas, être suffisamment rapide pour éviter la cristallisation. L'entropie suit alors la ligne d'équilibre du liquide en deçà de la température  $T_f$  ; le composé se trouve alors dans l'état de « liquide sous refroidi », métastable. Le refroidissement d'un tel système provoque une augmentation de sa viscosité, qui reflète un ralentissement des mouvements de relaxation structurale.

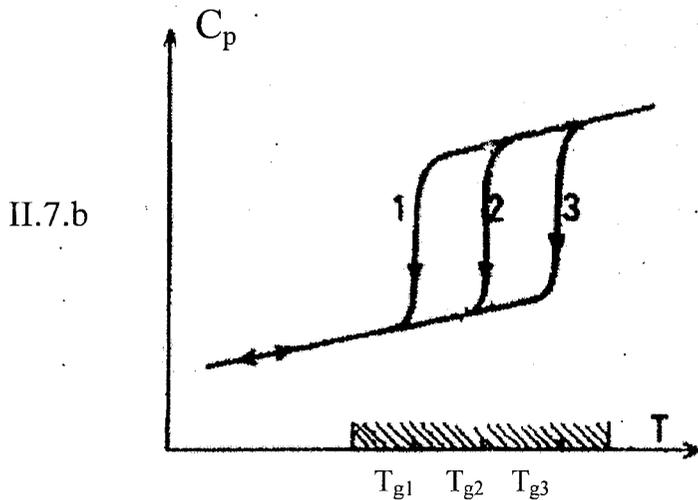
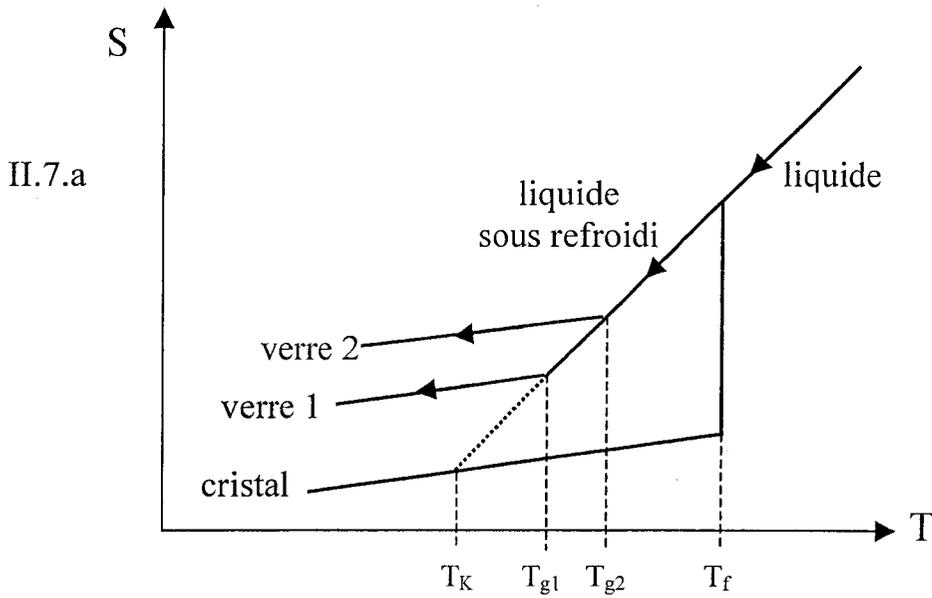


Figure II.7 :

- a. Représentation schématique de l'évolution de l'enthalpie  $H$ , en fonction de la température  $T$ . La température de transition vitreuse  $T_g$  dépend de la vitesse de refroidissement  $v$ . Sur la figure II.7,  $v_1 < v_2$
- b. Sauts de chaleur spécifique associés aux différentes vitesses de refroidissement  $v_1 < v_2 < v_3$

La **température de transition vitreuse  $T_g$**  est la température à laquelle ces mouvements deviennent tellement lents qu'ils semblent gelés, sur l'échelle de temps de l'expérience [36]. On observe à  $T_g$  un changement de pente de l'entropie à l'origine d'un saut de la chaleur spécifique  $C_p$  du composé ( $C_p/T = \partial S/\partial T$ ), comme le montre le thermogramme de la figure II.7.b. En dessous de  $T_g$ , le système se trouve dans un état **vitreux, hors équilibre**, dont l'entropie est supérieure à celle du prolongement du liquide métastable. La transition vitreuse résultant de la compétition de deux échelles de temps (celle des réarrangements moléculaires, et celle de l'expérience),  $T_g$  dépend

fortement de la vitesse de refroidissement du liquide métastable. La figure II.7.a montre en particulier qu'un refroidissement à la vitesse  $v_1 < v_2$ , permet de suivre le prolongement métastable du liquide plus longtemps, ce qui se traduit pour les températures de transition vitreuse par  $T_{g1} < T_{g2}$ .

Cette figure met aussi en évidence l'existence d'une singularité thermodynamique à la température de Kauzmann,  $T_K$  [36]. L'extrapolation de la courbe d'entropie du liquide métastable en dessous de  $T_g$  définit la température  $T_K$  à laquelle l'entropie du liquide deviendrait égale à celle du cristal. En dessous de  $T_K$ , le cristal aurait alors la plus grande entropie. Cette situation est évitée grâce au changement de pente de  $S(T)$  qui intervient à la transition vitreuse.  $T_K$  représente donc la limite inférieure de la température de transition vitreuse.

La transition vitreuse n'est donc pas une transition de phase au sens de la thermodynamique ; c'est un **phénomène cinétique** qui marque le passage d'un état d'équilibre métastable (le liquide sous refroidi) à un état hors équilibre (le verre). Ces notions, présentées ici pour le verre obtenu par trempe thermique du liquide, peuvent être généralisées aux matériaux amorphisés par d'autres voies.

## C.2. Mobilité moléculaire dans les domaines métastable et vitreux

### ➤ Au-dessus de $T_g$ : Relaxations « principales »

Les relaxations structurales, dont les temps caractéristiques augmentent de manière critique lors du sous-refroidissement et gèlent à  $T_g$ , sont appelées « **relaxations principales** » ou « **relaxations  $\alpha$**  » [35,36]. La dépendance en température des temps caractéristiques des relaxations principales est généralement non arrhenienne. Elle peut être décrite par la loi de Vogel-Fülcher-Tamman (VFT) :

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{A}{T - T_0}\right) \quad (\text{II.8})$$

Dans cette expression,  $A$  et  $\tau_0$  sont des constantes ( $\tau_0$  correspond au temps caractéristique des modes de vibration), et  $T_0$  est la température virtuelle à laquelle les temps de relaxation extrapolés divergeraient. Cette température est souvent assimilée à la température de Kauzmann  $T_K$ . Pour  $T_0 = 0$ , on retrouve la loi d'Arrhenius décrivant un processus thermiquement activé.

La dépendance en température du temps de relaxation est souvent représentée dans un **diagramme d'Arrhenius** de la forme :  $\log[\tau(T)] = f(1000/T)$ , qui donne accès aux paramètres de la

loi VFT (II.8). Un tel diagramme donne par ailleurs la valeur de  $T_g$ , conventionnellement définie comme la température à laquelle le temps de relaxation  $\tau(T)$  vaut 100 s.

▪ Evolution non arrhenienne des relaxations - Notion de fragilité

Pour classer et comparer les systèmes formateurs de verre, il est utile d'introduire la notion d'**indice de fragilité m** [37]. Ce paramètre est défini par la relation :

$$m = \left. \frac{d(\log \tau)}{d(T_g/T)} \right|_{T=T_g} \quad (\text{II.9})$$

L'indice de fragilité  $m$  est donc la pente à  $T_g$  de la courbe d'évolution des temps de relaxations  $\tau(T)$ , dans un diagramme d'Arrhenius normalisé à  $T_g$ . Il permet d'estimer, pour un changement de température  $\Delta T$  donné, la modification de la mobilité moléculaire. On peut classer les systèmes formateurs de verre en deux catégories :

- **les systèmes vitrifiables dits « forts »**, qui possèdent de faibles indices de fragilité ( $m \approx 16$ ), dont la dynamique est quasiment arrhenienne. Ce sont par exemple les systèmes présentant un réseau de liaisons intermoléculaires fortes, tels les verres d'oxyde comme  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{GeO}_2$
- **les systèmes vitrifiables dits « fragiles »**, qui possèdent des indices de fragilité élevés, et dont la dynamique s'éloigne fortement du comportement arrhenien. La valeur de  $m$  est d'autant plus grande que la déviation par rapport au comportement arrhenien est marquée. Les liquides les plus fragiles sont ceux pour lesquels les évolutions structurales dans le liquide sous-refroidi sont les plus rapides, sur un intervalle de température donné. Les composés moléculaires organiques vitrifiables constituent des systèmes fragiles.

Le diagramme d'Arrhenius de la **figure II.8** présente la dépendance en température des temps caractéristiques de relaxation de divers formateurs de verres. Les verres forts, comme les verres de silice ( $m = 20$  [37]), présentent une dynamique arrhenienne qui se traduit par une droite dans le diagramme d'Arrhenius. Certains verres organiques, comme l'o-terphenyl ( $m = 81$  [37]), présentent au contraire une dynamique fortement non arrhenienne à l'origine de la forte courbure de l'évolution de  $\log(\tau)$ . Entre ces deux extrêmes, on trouve des composés de fragilité intermédiaire, tel le glycérol ( $m = 53$  [37]).

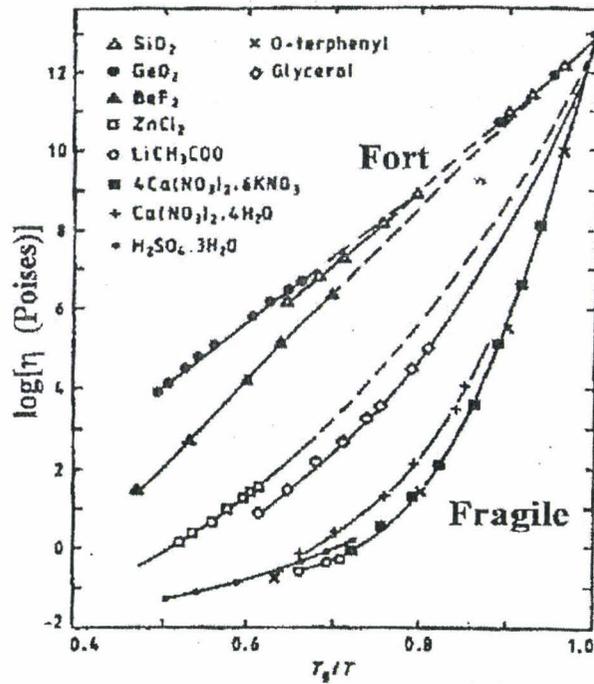


Figure II.8 :

Diagramme d'Arrhenius normalisé à  $T_g$  de divers formateurs de verre, reproduit de [38]. Ceux dont la dépendance en température des temps de relaxation est arrhenienne, comme  $\text{GeO}_2$  ou  $\text{SiO}_2$ , se classent dans la catégorie des verres forts. Les verres « fragiles » présente une dynamique déviant du comportement arrhenien. C'est par exemple le cas de l'orthoterphenyl

▪ Caractère non exponentiel des relaxations

Les relaxations observées expérimentalement présentent le plus souvent un caractère non exponentiel : elles ne peuvent pas être caractérisées par un temps de relaxation unique. La réponse de l'échantillon est alors donnée par l'expression en exponentielle étirée de Kolrausch-Williams-Watts (KWW) :

$$\Phi(t) = \exp \left[ - \left( \frac{t}{\tau} \right)^{\beta_{\text{KWW}}} \right] \quad (\text{II.10})$$

Dans l'équation (II.10),  $\tau$  est le temps caractéristique de la relaxation et  $\beta_{\text{KWW}}$  un exposant tel que  $0 < \beta_{\text{KWW}} \leq 1$ , qui permet d'évaluer la non exponentialité des relaxations. Plus l'exposant  $\beta_{\text{KWW}}$  est faible, plus le caractère non exponentiel est marqué. Le cas particulier où  $\beta_{\text{KWW}} = 1$  correspond à une relaxation monoexponentielle, de type Debye. Nous reviendrons sur ce point dans le cas des relaxations diélectriques (cf. § C.3). Ce comportement en exponentielle étirée est lié aux interactions intermoléculaires, qui provoquent des mouvements corrélés et ralentissent les relaxations principales.

Böhmer et al [37] ont montré qu'il existait une relation entre la fragilité d'un système et la non exponentialité de ses relaxations. D'une manière générale, le caractère non exponentiel des

relaxations est d'autant plus prononcé que la fragilité du système est importante. Cette tendance est illustrée sur la **figure II.9**, reproduite à partir de la référence [37]. La figure II.9 distingue les systèmes complexes, comme les polymères, des systèmes moléculaires plus simples, et montre que la relation empirique entre  $m$  et  $\beta_{KWW}$  est vérifiée pour la grande majorité des composés.

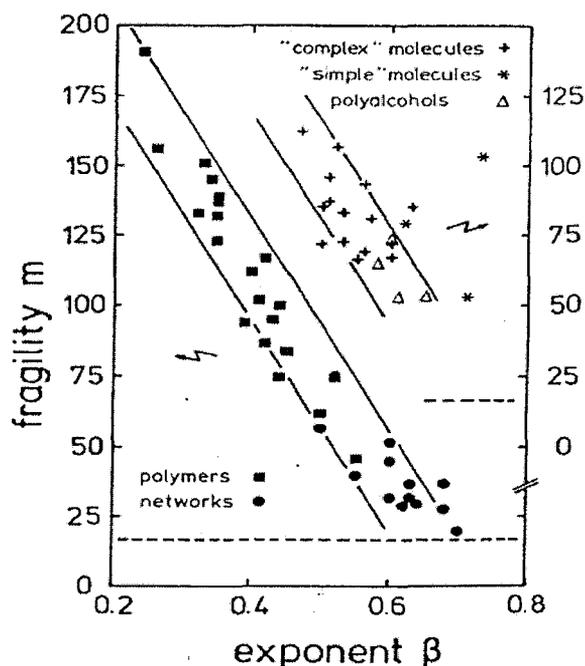


Figure II.9 :

Relation empirique entre l'indice de fragilité  $m$  et le coefficient de non-exponentialité  $\beta_{KWW}$ , [37] : plus la dynamique est non arrhenienne, plus le caractère non exponentiel des relaxations est marqué.

### ➤ En dessous de $T_g$ : Relaxations « secondaires »

En dessous de la température de transition vitreuse  $T_g$ , le système vitrifié ne relaxe plus sur l'échelle de temps de l'expérience. Toutefois, cela ne signifie pas que la mobilité moléculaire est bloquée : il existe, pour de nombreux composés de natures diverses, des observations expérimentales indiquant la présence d'une dynamique relaxationnelle importante dans le domaine vitreux. Ces relaxations sont appelées « **relaxations secondaires** » ou « **relaxations  $\beta$**  » [39]. Elles témoignent d'une mobilité résiduelle qui persiste dans l'échantillon à des températures parfois très inférieures à  $T_g$ .

Il existe plusieurs types de processus secondaires. Certains trouvent leur origine dans les mouvements rapides de groupements atomiques de faible poids moléculaire, comme les groupes OH, CH<sub>3</sub> ou CH<sub>2</sub>OH [40]. Ce type de relaxation est clairement d'origine intramoléculaire, et s'observe par exemple dans les polymères, qui comportent de nombreux groupes mobiles branchés sur les chaînes principales. Cependant, les travaux de Johari et Goldstein [41] ont mis en évidence

des relaxations secondaires dans des molécules rigides. Dans ce cas, il ne peut donc pas s'agir de mouvements intramoléculaire, mais bien d'un processus impliquant l'ensemble de la molécule. Ce type de relaxations secondaires, appelées relaxations de Johari-Goldstein (JG), apparaissent donc comme étant une propriété intrinsèque du verre. A une température donnée, les relaxations secondaires sont moins intenses que les relaxations principales, et leurs temps caractéristiques sont souvent inférieurs à ceux de la relaxation  $\alpha$  par plusieurs ordres de grandeur. Leur dépendance en température est arrhenienne. Elles constituent un vaste domaine d'investigations, puisqu'elles soulèvent de nombreux problèmes. En particulier, les relaxations secondaires influent sur la stabilité du matériau, et sont suspectées être à l'origine de processus de nucléation sous  $T_g$  [42]. D'un point de vue fondamental, leur origine exacte demeure à ce jour controversée. Deux hypothèses principales ont été proposées : celle des îlots de mobilité, et la théorie des effets couplés.

▪ **Îlots de mobilité**

D'après les travaux de Johari et Goldstein [41], la relaxation  $\beta$  s'explique par l'hétérogénéité structurale des verres. Un matériau vitreux ne présente pas de densité uniforme, mais est constitué de différentes régions de densité diverses :

- des zones de faible densité, statistiquement distribuées, et dont le nombre augmente avec la température [43]. Elles constituent des « îlots de mobilité », au sein desquels certains mouvements de diffusion locale sont encore possibles et donnent lieu aux relaxations secondaires
- des zones de haute densité, dans lesquelles les mouvements moléculaires nécessitent une coopérativité importante, et sont donc « bloqués » sous  $T_g$  (le réarrangement coopératif de ces zones est à l'origine de la transition vitreuse)

Dans ce contexte, les relaxations  $\beta$  ne feraient intervenir qu'une partie des molécules du système vitreux.

▪ **Théorie des effets couplés**

Une autre hypothèse [44] suggère au contraire que la relaxation secondaire fasse intervenir l'ensemble des molécules du verre. Elle suppose que toute les molécules d'un matériau vitreux possèdent un environnement équivalent, et soient capables de réarrangements individuels. Les mouvements de faible amplitude, non coopératifs, pourraient avoir lieu à haute fréquence, dans des domaines de températures situés en dessous de la transition vitreuse. Ils seraient à l'origine des relaxations secondaires. Au contraire, les mouvements de plus grande amplitude, coopératifs et de plus basse fréquence, ne pourraient intervenir que dans une gamme de température supérieure à  $T_g$ . Ils généreraient les relaxations principales.

Dans ce cas, toutes les molécules du matériau contribuent à la fois aux relaxations principales et secondaires [45]. Cette approche permet de mettre en évidence une corrélation entre ces deux types de relaxations. La théorie des effets couplés prévoit l'existence d'un temps caractéristique  $t_c$  qui détermine le passage de relaxations indépendantes à des relaxations coopératives.  $t_c$  est indépendant de la température, et n'est déterminé que par les interactions intermoléculaires. Sa valeur varie donc suivant le type de matériau considéré. Pour les composés moléculaires organiques,  $t_c$  est de l'ordre de 2 ps. A  $t < t_c$ , les molécules relaxent indépendamment les unes des autres, et suivent une relaxation exponentielle de temps caractéristique  $\tau_0$ . Au contraire, à  $t \geq t_c$ , les interactions intermoléculaires tendent à ralentir les relaxations principales, et à développer des mouvements coopératifs; les relaxations suivent alors le comportement en exponentielle étirée de l'expression (II.10). En conséquence, la fonction de distribution des relaxations est donnée par:

$$\begin{cases} \Phi(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_0}\right)\right] & \text{pour } t < t_c \\ \Phi(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau_{KWW}}\right)^{\beta_{KWW}}\right] & \text{pour } t \geq t_c \end{cases} \quad (\text{II.11})$$

La continuité de la fonction  $\Phi(t)$  à  $t = t_c$  impose une relation entre le temps caractéristique de la relaxation exponentielle  $\tau_0$ , et celui de l'exponentielle étirée  $\tau_{KWW}$  :

$$\tau_0 = (t_c)^n (\tau_{KWW})^{1-n} \quad (\text{II.12})$$

où  $n = 1 - \beta_{KWW}$ . La relation (II.12) implique que la dépendance en température de  $\tau_0$  soit comparable à celle de  $\tau_{KWW}$ . Au-dessus de  $T_g$ , elle suit la loi VFT (II.8), tandis qu'en dessous de  $T_g$ , domaine dans lequel les réarrangements structuraux sont très ralentis, la dépendance des temps caractéristiques devient arrhénienne. Les travaux de K.L. Ngai [46] ont permis de mettre en évidence, pour diverses classes de matériaux, deux résultats principaux :

- à  $T \leq T_g$ , le temps caractéristique  $\tau_0$  de la théorie des effets couplés est du même ordre de grandeur que le temps caractéristique  $\tau_\beta$  des relaxations secondaires de type Johari-Goldstein. La connaissance des paramètres de l'expression de KWW, qui décrit les relaxations principales, peut donc permettre de situer la position en fréquence des relaxations secondaires JG
- la valeur de  $\log[\tau_\beta(T_g)]$  est fortement liée à la valeur de  $\beta_{KWW}$  : le temps caractéristique des relaxations secondaires à  $T_g$ ,  $\tau_\beta(T_g)$ , est d'autant plus court que l'exposant de non-exponentialité  $\beta_{KWW}$  est petit.

Il découle de cette dernière observation que les formateurs de verre qui possèdent un exposant  $\beta_{\text{KWW}}$  proche de 1 présenteront un temps de relaxation  $\tau_{\beta}(T_g)$  voisin de  $\tau_{\alpha}(T_g)$ . En d'autres termes, il sera difficile dans ce cas de dissocier le processus de relaxation secondaire du processus de relaxation principale.

### C.3. Méthodes de caractérisation de la mobilité moléculaire : Spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique

Ce paragraphe présente les deux techniques qui nous ont permis d'étudier la mobilité moléculaire des composés. En premier lieu, nous rappelons les approches possibles pour l'analyse des courbes  $\varepsilon(\omega)$  issues de la spectroscopie diélectrique. En second lieu, nous décrivons la méthode d'analyse des signaux d'ATD à modulation utilisée pour réaliser une spectroscopie de chaleur spécifique. Ces aspects théoriques sont illustrés par des résultats obtenus sur le maltitol.

#### ➤ Spectroscopie diélectrique

Lors d'une expérience de relaxation diélectrique, on mesure la permittivité diélectrique complexe  $\varepsilon(\omega)$ , qui traduit la réponse de l'échantillon à l'application d'un champ électrique oscillant. Au-dessus de  $T_g$ , les relaxations suivent un comportement en « exponentielle étirée », décrit par la fonction  $\Phi(t)$  de KWW (II.15). De manière plus générale, on peut représenter la fonction réponse  $\Phi(t)$  par une superposition d'exponentielles simples, de sorte que :

$$\Phi(t) = \int_{-\infty}^{\infty} g(\ln \tau) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) d \ln \tau \quad (\text{II.13})$$

où  $g(\ln \tau)$  est une distribution de temps de relaxation.

Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel s'effectue par la transformée de Fourier de la fonction  $\Phi(t)$ . L'expression générale de la permittivité diélectrique complexe  $\varepsilon(\omega)$  est alors donnée par :

$$\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_{\infty}}{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}} = \int_0^{\infty} \exp(i\omega t') \left[ -\frac{d\Phi(t')}{dt'} \right] dt' \quad (\text{II.14})$$

où  $\varepsilon_s$  est la permittivité statique du matériau ( $\omega \rightarrow 0$ ), et  $\varepsilon_{\infty}$  la valeur limite de la permittivité pour une fréquence infinie. Différentes distributions  $g(\ln \tau)$  permettent de décrire les données de manière satisfaisante [47]. Cependant, il convient de noter qu'il n'existe pas de transformée de Fourier analytique de la fonction de KWW, sauf pour les cas particuliers  $\beta_{\text{KWW}} = 0.5$  [48] et  $\beta_{\text{KWW}} = 1$  (pour lequel la distribution  $g(\ln \tau)$  est un pic de Dirac en  $t = \tau$ ). Ce dernier exemple est celui d'une

relaxation monoexponentielle observée dans les liquides de faible viscosité. Elle est décrite par le modèle de Debye.

▪ Relaxation exponentielle – Modèle de Debye

Le modèle de Debye décrit une relaxation exponentielle [49], et correspond au cas particulier de l'équation (II.10) pour lequel  $\beta_{KWW} = 1$ . La permittivité diélectrique complexe  $\epsilon(\omega)$  prend alors la forme suivante :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + i\omega\tau} \quad (II.15)$$

et les parties réelle et imaginaire de la permittivité diélectrique s'expriment respectivement par :

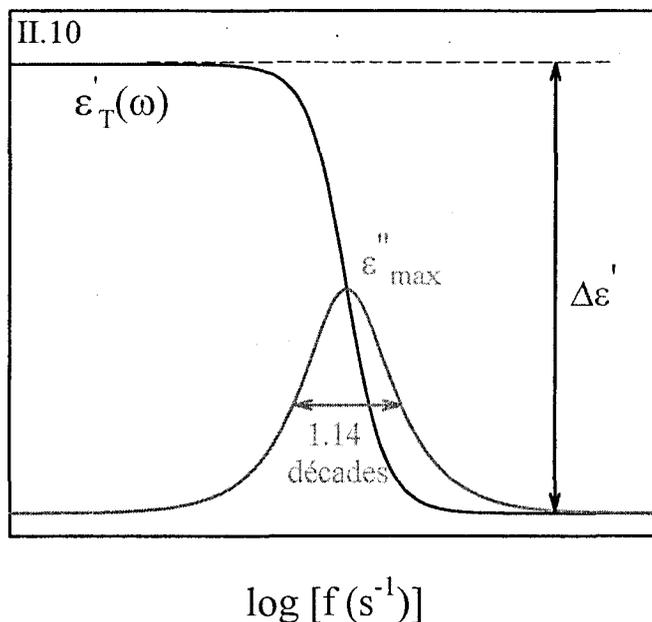
$$\epsilon'(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\Delta\epsilon}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (II.16)$$

et

$$\epsilon''(\omega) = \Delta\epsilon \frac{\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2} \quad (II.17)$$

où  $\Delta\epsilon = \epsilon_s - \epsilon_{\infty}$ .

La relation (II.17) montre que pour une relaxation exponentielle, les courbes  $\epsilon''(\omega)$  sont symétriques, et de largeur à mi-hauteur égale à 1.14 décades lorsqu'elles sont représentées en échelle logarithmique de  $\omega$ . De plus, le rapport d'amplitude entre  $\epsilon''_{\max}(\omega)/\Delta\epsilon'(\omega)$ , où  $\Delta\epsilon'(\omega) = \epsilon_s - \epsilon_{\infty}$ , vaut 0.5. Ce comportement particulier est illustré par la **figure II.10**. Dans le modèle de Debye, le temps caractéristique de la relaxation est lié à la pulsation par la relation simple :  $\tau = 1/\omega$ , ce qui permet d'accéder facilement aux caractéristiques dynamiques du composé.



*Figure II.10 :*

*Evolution en fréquence des courbes  $\epsilon'_T(\omega)$  et  $\epsilon''_T(\omega)$  pour une relaxation exponentielle, de type « Debye »*

▪ Cas général – relaxations non exponentielles

Dans tous les autres cas, c'est-à-dire pour un exposant  $\beta_{\text{KWW}} \neq 1$ , l'absence d'expression analytique de  $\varepsilon(\omega)$  directement dérivée de la fonction KWW rend l'analyse des données expérimentales plus délicate. Deux approches sont possibles :

- soit on introduit une expression empirique de la permittivité diélectrique complexe  $\varepsilon(\omega)$ , en cherchant à en déduire les caractéristiques de la fonction  $\Phi(t)$ . Les possibilités d'expression de  $\varepsilon(\omega)$  sont nombreuses [47], et nous ne présenterons ici que la fonction d'Havriliak et Negami [50].
- soit on effectue la démarche inverse : au lieu d'introduire une expression empirique de  $\varepsilon(\omega)$ , on utilise le comportement en exponentielle étirée de la fonction  $\Phi(t)$  de KWW.

**Méthode empirique – Formule d'Havriliak et Negami**

L'équation d'Havriliak et Negami [50] modifie l'expression II.11 en introduisant deux exposants,  $\alpha_{\text{HN}}$  et  $\beta_{\text{HN}}$ , tels que  $0 < \alpha_{\text{HN}}, \beta_{\text{HN}} \leq 1$  :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon}{[1 + (i\omega\tau)^{\alpha}]^{\beta}} \quad (\text{II.18})$$

Les paramètres  $\alpha_{\text{HN}}$  et  $\beta_{\text{HN}}$  traduisent respectivement l'élargissement et l'asymétrie des courbes  $\varepsilon''(\omega)$ . De par le nombre important de paramètres ajustables ( $\varepsilon_s, \varepsilon_{\infty}, \alpha_{\text{HN}}, \beta_{\text{HN}}, \tau_{\text{HN}}$ ), les affinements réalisés avec cette loi sont en très bonne adéquation avec les résultats expérimentaux. On en déduit également le temps caractéristique des relaxations  $\tau_{\text{max}}$  que l'on reporte dans le diagramme d'Arrhenius, et qui donne directement accès à la mobilité moléculaire. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette analyse est qu'elle ne fournit pas les paramètres physiques caractérisant les relaxations (il n'existe pas de relation générale reliant les paramètres d'étalement ( $\alpha_{\text{HN}}$ ) et d'asymétrie ( $\beta_{\text{HN}}$ ) au coefficient de non exponentialité  $\beta_{\text{KWW}}$ ).

D'autres fonctions similaires sont aussi couramment utilisées. On peut citer en exemple les expressions de Cole et Cole (pour laquelle  $\beta_{\text{HN}} = 1$ ) et de Cole et Davidson (pour laquelle  $\alpha_{\text{HN}} = 1$ ). Enfin, le cas  $\alpha_{\text{HN}} = \beta_{\text{HN}} = 1$  correspond à la relaxation exponentielle de Debye.

**Méthode directe : expression de Kolrausch-Williams-Watts**

Une autre façon d'analyser les relaxations diélectriques consiste à calculer numériquement la transformée de Fourier de l'expression de KWW (II.10), et de déterminer les valeurs de  $\beta_{\text{KWW}}$  qui s'ajustent le mieux avec les résultats expérimentaux [45]. Cette approche est plus difficile à mettre en œuvre que la méthode empirique précédemment décrite ; elle est donc moins employée.

Toutefois, elle présente l'avantage considérable de fournir directement les paramètres  $\beta_{KWW}$  et  $\tau_{KWW}$  qui décrivent les caractéristiques des relaxations principales.

Par ailleurs, ce type d'approche se révèle indispensable si l'on souhaite utiliser la théorie des effets couplés présentée au paragraphe C.2 de cette section, dans la mesure où ce modèle utilise les valeurs de  $\beta_{KWW}$  et  $\tau_{KWW}$  pour évaluer le temps caractéristique des relaxations secondaires de type Johari-Goldstein.

L'exemple des relaxations diélectriques de la fanansérine sous-refroidie, présenté au chapitre III, illustrera les informations fournies par ces deux méthodes d'analyse des relaxations, et permettra d'en comparer la pertinence.

▪ Relaxations secondaires

Contrairement aux relaxations principales, les courbes  $\varepsilon''(\omega)$  des relaxations secondaires ne sont pas asymétriques. Dans ce cas, il existe des formes analytiques des transformées de Fourier des fonctions de distribution qui leur sont associées. Il est donc possible d'analyser les relaxations secondaires au moyen de l'approche empirique décrite plus haut, puisque les paramètres des expressions de  $\varepsilon''(\omega)$  peuvent être reliés aux paramètres de la fonction  $\Phi(t)$ , qui possèdent une réelle signification physique. On peut citer en exemple deux expressions adaptées à la description des processus secondaires :

- la fonction log-normal, dans le domaine temporel, pour laquelle la fonction de distribution  $g(\ln \tau)$  est une gaussienne :

$$\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_\infty - \varepsilon_S} = \int_{-\infty}^{\infty} g(\ln \tau) \frac{d \ln \tau}{1 + i\omega\tau} \quad \text{avec} \quad g(\ln \tau) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left(-\frac{(\ln(\tau / \tau_0))^2}{2\sigma^2}\right) \quad (\text{II.19})$$

- la fonction de Cole et Cole, qui correspond à l'expression de Havriliak et Negami avec  $\beta_{HN} = 1$ , c'est-à-dire :

$$\frac{\varepsilon(\omega) - \varepsilon_\infty}{\varepsilon_S - \varepsilon_\infty} = \frac{1}{1 + (i\omega\tau)^{\alpha_{cc}}} \quad (\text{II.20})$$

➤ Spectroscopie de chaleur spécifique par ATD à modulation

Les principes théoriques de l'ATD à modulation ont fait l'objet de diverses publications [51,52]. Nous résumons ici une exploitation possible des signaux d'ATD à modulation, en terme de spectroscopie de chaleur spécifique. Une description plus complète est proposée par exemple dans les références [53,54].

Perturbation appliquée et réponse de l'échantillon :

Dans une expérience d'ATD à modulation, une oscillation sinusoïdale de température de faible amplitude est ajoutée à la rampe linéaire de l'ATD conventionnelle :

$$T(t) = T_i + qt + A \sin \omega t \quad (\text{II.21})$$

Dans cette expression,  $T_i$  est la température initiale,  $q$  la vitesse de balayage linéaire.  $A$  et  $\omega$  sont respectivement l'amplitude et la pulsation de la modulation. Les pulsations accessibles vont de 0.063 à 0.63 Hz, ce qui correspond à des périodes  $P = 2\pi/\omega$  comprises entre 10 s et 100 s.

La **perturbation appliquée** à l'échantillon est définie comme la dérivée de la température modulée, et s'écrit

$$\dot{T}(t) = q + \dot{T}_0 \cos \omega t ; \dot{T}_0 = A\omega \quad (\text{II.22})$$

La **réponse de l'échantillon** à cette sollicitation est donc le flux de chaleur modulé. Il comporte une partie linéaire, et une partie sinusoïdale déphasée par rapport à la perturbation. Il faut signaler qu'un terme cinétique additionnel (lié par exemple à des effets de cristallisation ou de rattrapage enthalpique se produisant au passage de la transition vitreuse, lors du réchauffage du verre) peut également contribuer au flux de chaleur modulé. Cette contribution ne sera pas discutée ici. La réponse de l'échantillon s'exprime donc dans ce cas :

$$\dot{Q}(t) = qC_p(q, \bar{T}) + (\dot{Q}_{\text{cin}}) + \dot{Q}_{\text{mod}}(t) \quad (\text{II.23})$$

$$\text{avec } \dot{Q}_{\text{mod}}(t) = \dot{Q}_0(\bar{T}, \omega) \cdot \cos(\omega t - \varphi) \quad (\text{II.24})$$

Dans l'équation (II.23)  $C_p(q, \bar{T})$  est la chaleur spécifique. Les deux premiers termes de l'équation sont ceux mesurés au cours d'une expérience d'ATD conventionnelle.

Les informations accessibles par une expérience d'ATD modulée sont présentées sur la **figure II.11**. Le composé utilisé est le maltitol, précédemment étudié au laboratoire [52]. Ce polyol est en effet un bon formateur de verre, facile à amorphiser par trempe thermique. Les courbes de la figure II.11 ont été enregistrées lors du chauffage à 2°C/min du verre formé par refroidissement du maltitol liquide à 20°C/min. La modulation de température ajoutée à la rampe linéaire est de fréquence 1/40 s<sup>-1</sup> et d'amplitude 0.2°C.

La figure II.11.a montre les signaux bruts de l'ATD modulée, définis par les expressions (II.22) et (II.23). La figure II.11.b présente les évolutions de la chaleur spécifique moyenne, de l'amplitude de la chaleur spécifique modulée, et du déphasage  $\varphi$  au passage de la transition vitreuse.

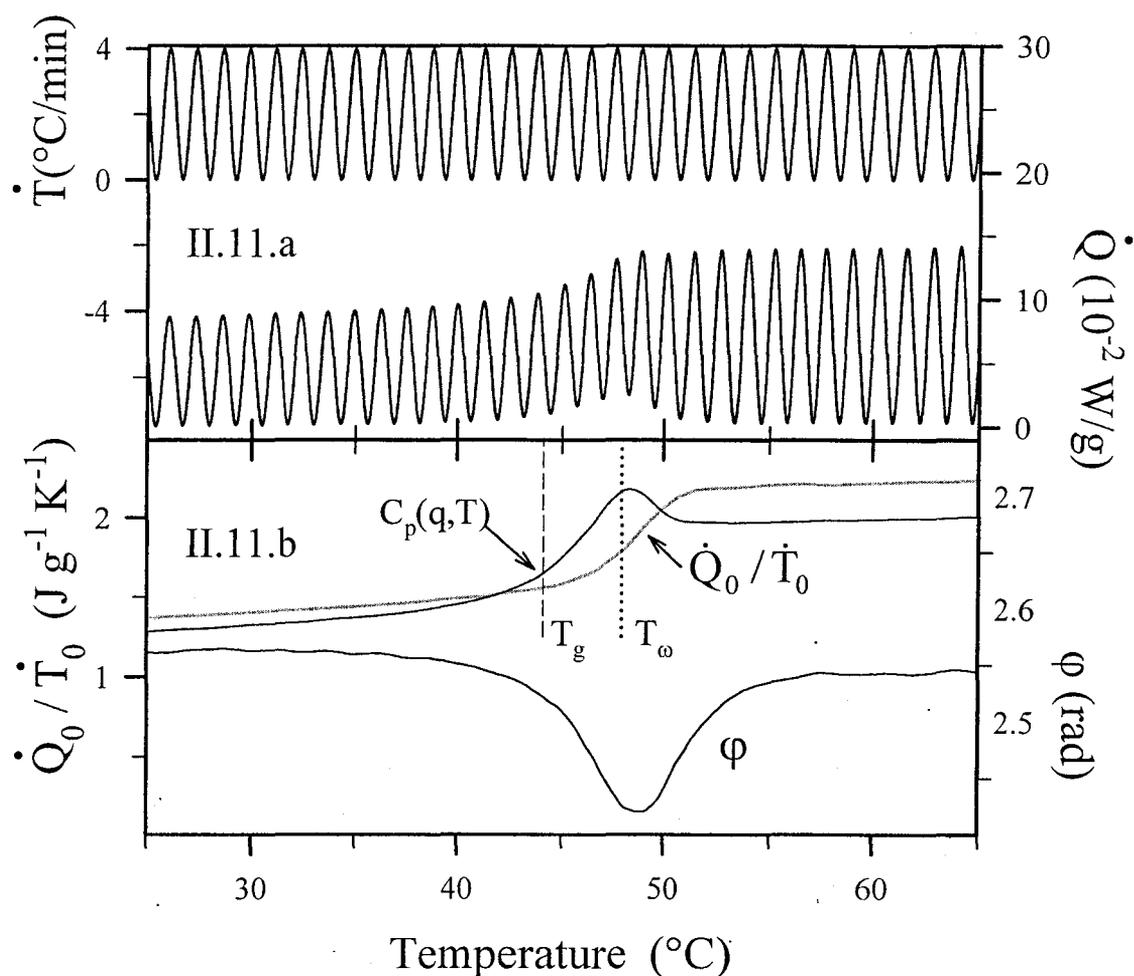


Figure II.11 :

- a. signaux bruts de l'ATD à modulation : dérivée de la température modulée et flux de chaleur modulé  
 b. chaleur spécifique, module de la chaleur spécifique complexe et déphasage

Les caractéristiques de la transition vitreuse apparaissent clairement. On distingue :

- un saut de la chaleur spécifique  $C_p(T)$  à la température  $T_g^{2^\circ\text{C/min}} = 44^\circ\text{C}$
- un saut de l'amplitude de la chaleur spécifique modulée,  $\dot{Q}_0/\dot{T}_0$ , à une température plus élevée  $T_\omega = 48^\circ\text{C}$
- un pic de déphasage à  $T_\omega$

La température de transition vitreuse  $T_g$  observée au réchauffage dépend considérablement de la vitesse à laquelle le liquide a été préalablement trempé. Pour le maltitol liquide refroidi à  $2^\circ\text{C/min}$ , la transition vitreuse mesurée par une expérience d'ATD classique, au chauffage à  $2^\circ\text{C/min}$ , se produit à  $T_g = 44^\circ\text{C}$ . La température  $T_\omega$  est associée aux caractéristiques de la perturbation sinusoïdale.

Correction de phase

Le déphasage  $\varphi$  révélé sur la figure II.11.b est non nul sur tout le domaine de température exploré. Il s'explique par deux contributions distinctes [55,56] :

- l'une d'origine purement relaxationnelle, notée  $\varphi_0$
- l'autre attribuée aux transferts de chaleur, à la fois entre l'échantillon et le calorimètre, mais aussi à l'intérieur de l'échantillon lui-même

Dans une expérience d'ATD à modulation, seule la contribution purement relaxationnelle  $\varphi_0$  doit être prise en compte. Pour isoler cette contribution, il est nécessaire de corriger le déphasage  $\varphi$  mesuré de la partie due aux transferts de chaleur. La correction que nous avons choisi d'appliquer à nos résultats a été proposée par Weyer et al. [56]. Elle consiste à soustraire de  $\varphi(T)$  une courbe proportionnelle à la chaleur spécifique, ajustée de telle façon qu'elle rejoigne les valeurs du déphasage en dehors de la zone de la transition vitreuse.

Chaleur spécifique complexe

En notation complexe, le flux de chaleur modulé est relié à la chaleur spécifique complexe  $C_p^*(\omega)$  par la relation :

$$\dot{Q}_{\sin}(t) = \text{Re}(\dot{Q}_{\sin}^* \cdot e^{-i\omega t}) = \text{Re}(C_p^*(\omega) \cdot \dot{T}_0 \cdot e^{-i\omega t}) \quad (\text{II.25})$$

Les parties réelle et imaginaire de  $C_p^*(\omega)$  sont alors données par :

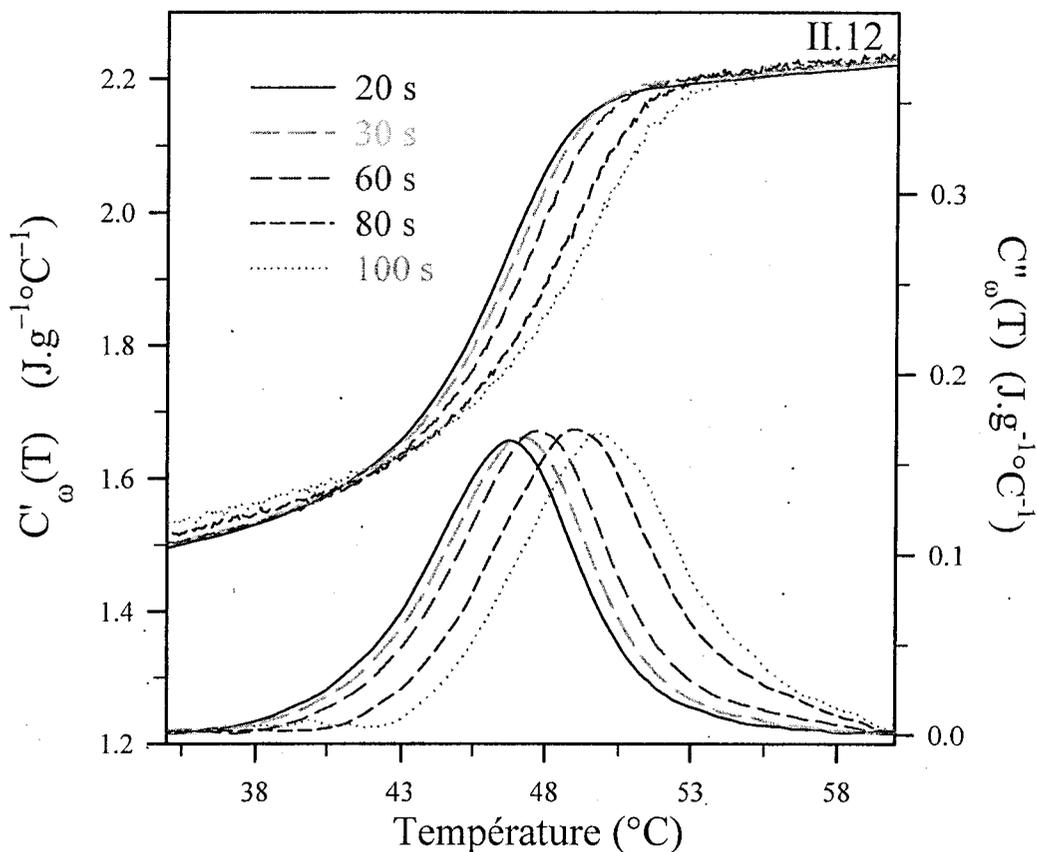
$$C' = \frac{\dot{Q}_0}{\dot{T}_0} \cos \varphi_0 \quad (\text{II.26}) \quad \text{et} \quad C'' = \frac{\dot{Q}_0}{\dot{T}_0} \sin \varphi_0 \quad (\text{II.27})$$

L'ATD à modulation de température permet de déterminer facilement la chaleur spécifique complexe  $C_p^*(\omega)$ . Comme il l'a déjà été discuté précédemment [51], une vitesse de balayage élevée peut entraîner une déformation et un aplatissement des signaux mesurés. Ces effets résultent d'une compétition entre les deux temps caractéristiques de la technique (respectivement liés à la rampe linéaire de température, et à la perturbation sinusoïdale). Cet inconvénient peut être facilement évité en utilisant une faible vitesse de balayage  $q$ .

Les périodes de modulation accessibles s'étendent de 10 s à 100 s. Les temps de relaxation généralement associés à  $T_g$  étant de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  s, l'ATD à modulation de température donne directement accès à des temps caractéristiques des relaxations intervenant juste au-dessus de la température de transition vitreuse. L'ATD à modulation de température offre par conséquent la possibilité de réaliser une spectroscopie de chaleur spécifique, et d'étudier les relaxations enthalpiques au voisinage de la transition vitreuse. Le domaine de fréquence accessible par cette

technique étant relativement restreint (une décade), les mesures s'effectuent au cours de balayages isochrones de part et d'autre de  $T_g$ .

L'évolution thermique de  $C'_{\omega}(T)$  et  $C''_{\omega}(T)$  dans le cas du maltitol sous refroidi est représentée sur la **figure II.12**.



*Figure II.12 :*

*Spectroscopie de chaleur spécifique du maltitol amorphisé par trempe. Les différentes courbes ont été obtenues par des balayages au refroidissement, à  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , avec les périodes de modulation indiquées sur la figure*

Les signaux ont été enregistrés lors de refroidissements successifs du liquide métastable, de  $70^{\circ}\text{C}$  à  $20^{\circ}\text{C}$ . Travailler au refroidissement permet de s'affranchir des effets cinétiques comme le rattrapage enthalpique du verre. En outre, l'utilisation d'une vitesse de balayage extrêmement lente ( $q = 0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) évite les effets de distorsion discutés plus haut. Les différentes courbes ont été obtenues pour cinq périodes de modulation comprises entre 20 et 100 s. La perturbation étant la dérivée de la température modulée (équation (II.22)), sa valeur moyenne vaut  $A\omega$ . Pour réaliser la spectroscopie de chaleur spécifique à perturbation constante, il est nécessaire d'adapter l'amplitude de modulation en fonction de la fréquence scannée. Ainsi, chacune des courbes de la figure II.12 a été obtenue avec une modulation vérifiant :

$$\dot{T}_0 = A\omega = \pi/100 \text{ } ^\circ\text{C/s} \quad (\text{II.28})$$

Les maxima des courbes  $C''_{\omega}(T)$  dépendent de la fréquence, et se situent aux températures  $T_{\omega}$ . Ces maxima correspondent aux points d'inflexion des courbes  $C'_{\omega}(T)$ . Les courbes  $C'_{\omega}(T)$  et  $C''_{\omega}(T)$  présentent donc le comportement caractéristique de la susceptibilité complexe d'un processus de relaxation. La température  $T_{\omega}$ , qui augmente avec  $\omega$ , est la température à laquelle le temps de relaxation caractéristique du matériau,  $\tau(T_{\omega})$ , est le plus probable. L'évolution des courbes  $C''_{\omega}(T)$  indique que le temps caractéristique de relaxation du maltitol amorphe augmente quand la température diminue.

#### Détermination de la non exponentialité des relaxations

Böhmer et al. [57] ont proposé une méthode permettant d'estimer l'exposant de non exponentialité  $\beta_{\text{KWW}}$  de l'expression II.10 à partir des données de spectroscopies isochrones. Leur analyse repose sur le rapport des amplitudes  $\chi''_{\text{max}} / \Delta\chi'$ ,  $\chi'$  et  $\chi''$  étant respectivement les parties réelle et imaginaire de la susceptibilité complexe. Dans le cas d'une relaxation exponentielle, le rapport vaut 0.5, et l'exposant  $\beta_{\text{KWW}}$  vaut 1. Plus la relaxation s'éloigne du comportement exponentiel, plus le rapport diminue. Moynihan et al. ont tabulé cette corrélation [58], en évaluant la transformée de Fourier de la fonction KWW (II.10). Cette méthode générale est applicable aux résultats de spectroscopie de chaleur spécifique. Les courbes  $C''_{\omega}(T)$  de la figure II.12 ne sont pas symétriques, et le rapport des amplitudes  $C''_{\text{max}}(T) / \Delta C'(T)$  est clairement inférieur à la valeur de 0.5 attendue pour une relaxation de type « Debye ». D'après la méthode de Böhmer,  $\beta_{\text{KWW}} = 0.42$  pour le maltitol sous refroidi. Cette valeur est en accord avec celles obtenues par d'autres techniques (par exemple, la spectroscopie diélectrique donne  $\beta_{\text{KWW}} = 0.40$  [59]). La spectroscopie de chaleur spécifique se révèle donc être une méthode fiable d'évaluation de la non exponentialité des relaxations.

En résumé, la spectroscopie de chaleur spécifique est une technique particulièrement adaptée à l'étude des relaxations enthalpiques, dont les temps de relaxation caractéristiques varient entre 10 s et 100 s. Elle est donc extrêmement pertinente pour déterminer les propriétés dynamiques des matériaux près de la transition vitreuse, où les temps de relaxation sont de l'ordre de  $10^2$  s à  $10^3$  s.

## REFERENCES

1. T.P. Shakhshneider, V.V. Boldyrev, dans « Reactivity of Molecular Solids », édité par E. Boldyreva et V. Boldyrev, 1999
2. G.G. Liversidge, K.C. Cundy, *Int. J. Pharm.*, **125** (1995), 91
3. V. Naini, P.R. Byron, E.M. Phillips, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**(10) (1998), 895
4. M. Otsuka, K. Otsuka, N. Kanewima, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **20** (1994), 1649
5. M. Otsuka, N. Kaneniwa, *J. Pharm. Sci.*, **75** (1986), 506
6. J. Font, J. Muntasell, E. Cesari, *Mat. Res. Bull.*, **32**, 12 (1997), 1691
7. I. Tsukushi, O. Yamamuro, T. Matsuo, *Solid State Comm.*, **94** (1995), 1013
8. S.R. Byrn, « Solid state chemistry of Drugs », Academic Press, New York, 1982
9. N. Onodera, H. Suga, S. Seki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41** (1968), 2222
10. A. Saleki-Gerhardt, J.G. Stowell, S.R. Byrn, G. Zograf, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 3 (1995), 318
11. H. Bakker, G.F. Zhou, H. Yang, *Prog. Mater. Sci.*, **39** (1995), 159
12. P. Pochet, E. Tominez, L. Chaffron, G. Martin, *Phys. Rev. B* **52** (1995), 4006
13. K. Lu, F.Q. Guo, Y.H. Zhao, Z.H. Jin, *J. Metastable and Nanocrystalline Mat.*, **2-6** (1999), 43
14. Y. Chen, M. Bibole, R. Le Hazif, G. Martin, *Phys. Rev. B* **48** (1993), 14
15. A. Keller, M. Hikosaka, S. Rastagi, A. Toda, P.J. Bahram, G. Golbeck-Wood, *J. Mater. Sci.* (1994), **29**, 2579
16. J. Strange, J.B.W. Webber, *Meas. Sci. Technol.*, **8** (1997), 555
17. N.Q. Lam, P.R. Okamoto, *MRS Bulletin*, **XIX**, 7 (1994), 41
18. F.R.N. Nabarro, "Theory of crystal dislocations", Oxford, Clarendon P. , 1967
19. H.J. Fecht, W.L. Johnson, *Nature*, **334** (1988), 50
20. P.R. Okamoto, N.Q. Lam, L.E. Rehn, *Solid state Phys.*, **52** (1999), 1
21. G. Martin, P. Bellon, *Solid State Phys.*, **50** (1997), 189
22. R.K. Khankari, D.J.W. Grant, *Thermochimica Acta*, **248** (1995), 61
23. S. Garnier, S. Petit, G. Coquerel, *J. therm. Anal. and Calor.*, **68** (2002), 489
24. M. de Matas, H.G.M. Edwards, E.E. Lawson, L. Shields, P. York, *J. Molec. Struct.*, **440**, 1-3, (1998), 97
25. A.K. Galwey, *Thermochimica Acta*, **355** (2000), 181
26. S. Petit, G. Coquerel, *Chem. Mater.*, **8** (1996), 2247
27. érythromycine
28. J. Han, S. Gupte, R. Suryanarayanan, *Int. J. Pharm.*, **170** (1998), 63

29. H.J. Reisener, H.R. Goldschmid, G.A. Ledingham, A.S. Perlin,  
*Can. J. Biochem. Physiol.* (1962), **2**, 403
30. F. Sussich, R. Urbani, A. Cesaro, F. Princivalle, S. Brückner, *Carbohydr. Letters*, **2** (1997), 403
31. M. Ono, Y. Tozuka, T. Ogushi, S. Yamamura, K. Yamamoto, *Int. J. Pharm.*, **239** (2002), 1
32. J. Han, R. Suryanarayanan, *Int. J. Pharm.*, **157** (1997), 209
33. F. Franks, *Cryo-Letters*, **11** (1990), 93
34. Y.H. Roos, *J. Therm. Anal.*, **48** (1997), 535
35. S.R. Elliot, « Physics of amorphous materials », Longman, London, 1984
36. M.D. Ediger, C.A. Angell, S.R. Nagel, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996), 13200
37. R. Böhmer, K.L. Ngai, C.A. Angell, D.J. Plazek, *J. Chem. Phys.*, **99** (1993), 5, 4201
38. C.A. Angell, *J. Non. Cryst. Solids*, **131-133** (1991), 13
39. C.A. Angell, K.L. Ngai, G.B. McKenna, P.R. McMillan, S.W. Martin,  
*J. of Applied Physics*, **88**, 6 (2000), 3113
40. J. Einfeldt, D. Meißner, A. Kwasniewski, *Prog. Polym. Sci.*, **26** (2001), 1419
41. G.P. Johari, M. Goldstein, *J. Chem. Phys.*, **53** (1970), 2372
42. T. Hikima, M. Hanaya, M. Oguni, *Solid State Comm.* (1995), **93**, 8, 713
43. G.P. Johari, dans « Plastic Deformation of Amorphous and Semi-Crystalline Materials »,  
les Editions de Physique, Les Ullis, France, 1983
44. G. Williams, D.C. Watts, *Trans. Faraday Soc.*, **67** (1971), 1971
45. K.L. Ngai, *J. Chem. Phys.*, **109**, 16 (1998), 6982
46. K.L. Ngai, P. Lukenheimer, C. León, U. Schneider, R. Brand, A. Loidl,  
*J. Chem. Phys.*, **115**, 3 (2001), 1405
47. R. Zorn, *J. Chem. Phys.*, **116**, 8 (2002), 3204
48. F. Alvarez, A. Alegría, J. Colmenero, *Phys. Rev. B*, **44**, 14 (1991), 7306
49. P. Debye, « Polar Molecules », Dover, New York, 1945
50. S. Havriliak, S. Negami, *Polymer*, **8** (1967), 161
51. B. Wunderlich, Y. Jim, A. Boller, *Thermochimica Acta*, **238** (1994), 277
52. O. Bustin, M. Descamps, *J. Chem. Phys.*, **110** (1999), 22, 10982
53. L. Carpentier, O. Bustin, M. Descamps, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **35** (2002), 402
54. L. Carpentier, L. Bourgeois, M. Descamps, *J. Therm. Anal. Cal.*, **68** (2002), 727
55. Z. Jiang, C.T. Imrie, J.M. Hutchinson *Thermochimica Acta*, **315** (1988), 1
56. S. Weyer, A. Hensel, C. Schick, *Thermochimica Acta*, **304-305** (1997), 267
57. R Böhmer, E. Sanchez, C.A. Angell, *J. Phys. Chem. B*, **96** (1992), 23, 9089
58. C.T. Moynihan, L.P. Boesch, N.L. Laberge, *Phys. And Chem. of Glasses*, **14** (1973), 6, 122
59. A. Faivre, Thèse de Doctorat (1997), INSA, Lyon

# DEUXIEME PARTIE

## LA FANANSERINE



## **CHAPITRE III**

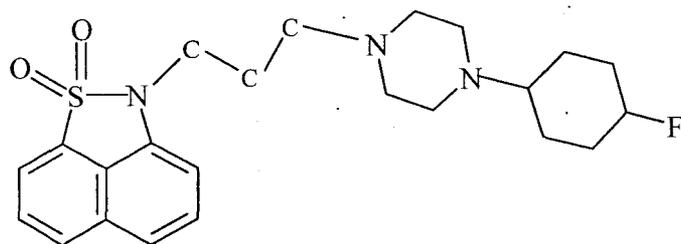
### **La fanansérine : un exemple d'investigation de la** **mobilité moléculaire dans un composé** **pharmaceutique**



Ce troisième chapitre est consacré à la présentation de la fanansérine, ainsi qu'à l'investigation de sa mobilité moléculaire. La section A rappelle brièvement l'historique du développement de la molécule. Les caractéristiques structurales et thermodynamiques des différents polymorphes sont présentées en section B. Les informations rassemblées dans ces deux premières sections proviennent essentiellement de la thèse de J. Giovannini [1]. La section C est consacrée à l'étude spécifique des propriétés des lots utilisés pour les études de broyage que nous présenterons au chapitre IV. La section D présente l'étude de la mobilité moléculaire de la fanansérine amorphe, réalisée au laboratoire par analyse diélectrique et ATD à modulation de température.

## A. HISTORIQUE DU DEVELOPPEMENT DE LA FANANSERINE

La fanansérine est un principe actif de formule  $C_{23}H_{24}FN_3O_2S$  et de masse molaire  $425.53 \text{ g.mol}^{-1}$ . La molécule, qui compte 54 atomes, est schématisée sur la **figure III.1** :



*Figure III.1 :*  
Représentation à 2D de la molécule de fanansérine  $C_{23}H_{24}FN_3O_2S$

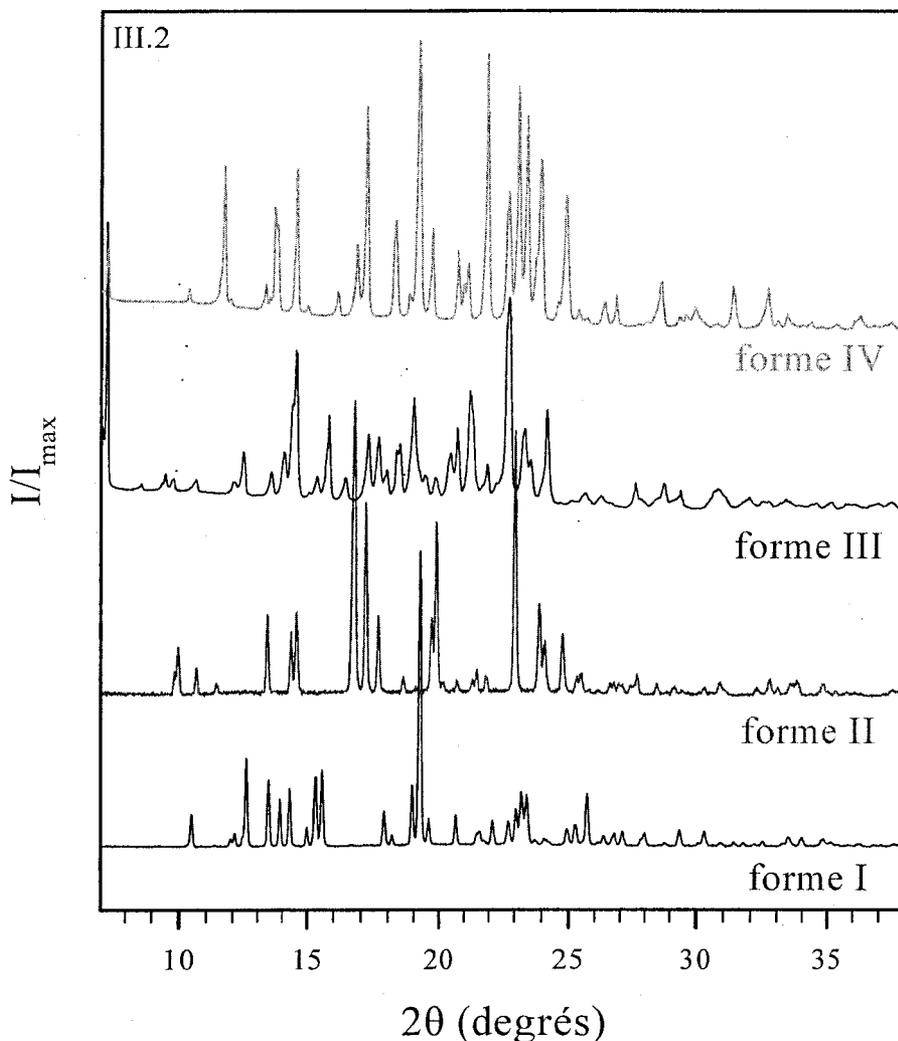
C'est un anxiolytique agissant sur le système nerveux, dont le développement a été initié par Aventis en 1990. Les indications thérapeutiques de la molécule privilégiant une administration par voie orale, le développement s'est orienté vers une formulation sous forme solide.

La fanansérine est soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, le diméthylsulfoxyde et le tétrahydrofurane. Elle a donc pu être cristallisée par évaporation de solutions saturées dans ces solvants. Les premiers essais de cristallisation, qui datent de 1990, firent apparaître une phase notée I. Cette forme n'est plus jamais réapparue au cours des synthèses ultérieures. Un autre polymorphe, noté II, et supposé plus stable que la forme I, cristallisa lors des nouvelles synthèses. En 1995, d'autres essais aboutirent à la formation d'une nouvelle phase de la fanansérine, la forme III. L'apparition successive de ces polymorphes motiva alors une étude expérimentale du polymorphisme de la fanansérine, au cours de laquelle une quatrième phase (appelée phase IV) fut produite. La fanansérine constitue donc un système tétramorphe. Les propriétés structurales et thermodynamiques de ces quatre formes ont été intensivement étudiées dans les laboratoires d'Aventis. Les résultats sont présentés dans la section B.

## B. PROPRIETES STRUCTURALES ET CALORIMETRIQUES DES DIFFERENTES PHASES DE LA FANANSERINE

### B.1. Caractérisation structurale

La **figure III.2** rassemble les diagrammes de Diffraction des Rayons X des quatre polymorphes, qui serviront de référence pour les études ultérieures.



*Figure III.2 :*

*Diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés sur poudre à  $T_{amb}$ , des quatre formes cristallines de la fananserine, d'après les travaux de thèse de J. Giovannini [1]*

Les structures cristallines de ces polymorphes ont été résolues [2], amenant les données cristallographiques résumées dans le **tableau III.1** :

Forme	I	II	III	IV
Système	Triclinique	Monoclinique	Monoclinique	Monoclinique
a (Å)	8.359	17.887	14.625	8.633
b (Å)	17.228	6.597	14.370	9.714
c (Å)	8.089	9.076	20.356	12.270
$\alpha$ (°)	101.32	90	90	90
$\beta$ (°)	110.85	94.73	92.84	96.70
$\gamma$ (°)	86.85	90	90	90
Groupe d'espace	P-1	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> /n	P2 <sub>1</sub>
Z	2	2	8	2

Tableau III.1 :

Données cristallographiques des quatre polymorphes de la fanansérine [1,2]

## B.2. Comportement au chauffage des quatre polymorphes

Les phases cristallines de la fanansérine ne subissant pas d'interconversion polymorphique au chauffage, avant leur fusion, il est possible de déterminer les températures et enthalpies de fusion des différents polymorphes. Ces données thermodynamiques, obtenues au chauffage à 5°C/min, sont reportées dans le **tableau III.2** :

	$T_f^{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)
Forme I	93.2	60.2
Forme II	102.0	65.3
Forme III	101.6	69.0
Forme IV	99.6	82.1

Tableau III.2 :

Températures onset et enthalpies de fusion des quatre phases cristallines de la fanansérine (d'après [1])

L'exploitation des données thermodynamiques du tableau III.1 a conduit à l'établissement du diagramme d'équilibre (p,T) de la fanansérine, et à la détermination des domaines de stabilité des différents polymorphes. Le diagramme (p, T) obtenu est reproduit de [2] sur la **figure III.3.a**. Ces données nous ont permis de réaliser le diagramme de Gibbs de la fanansérine, schématisé sur la **figure III.3.b**.

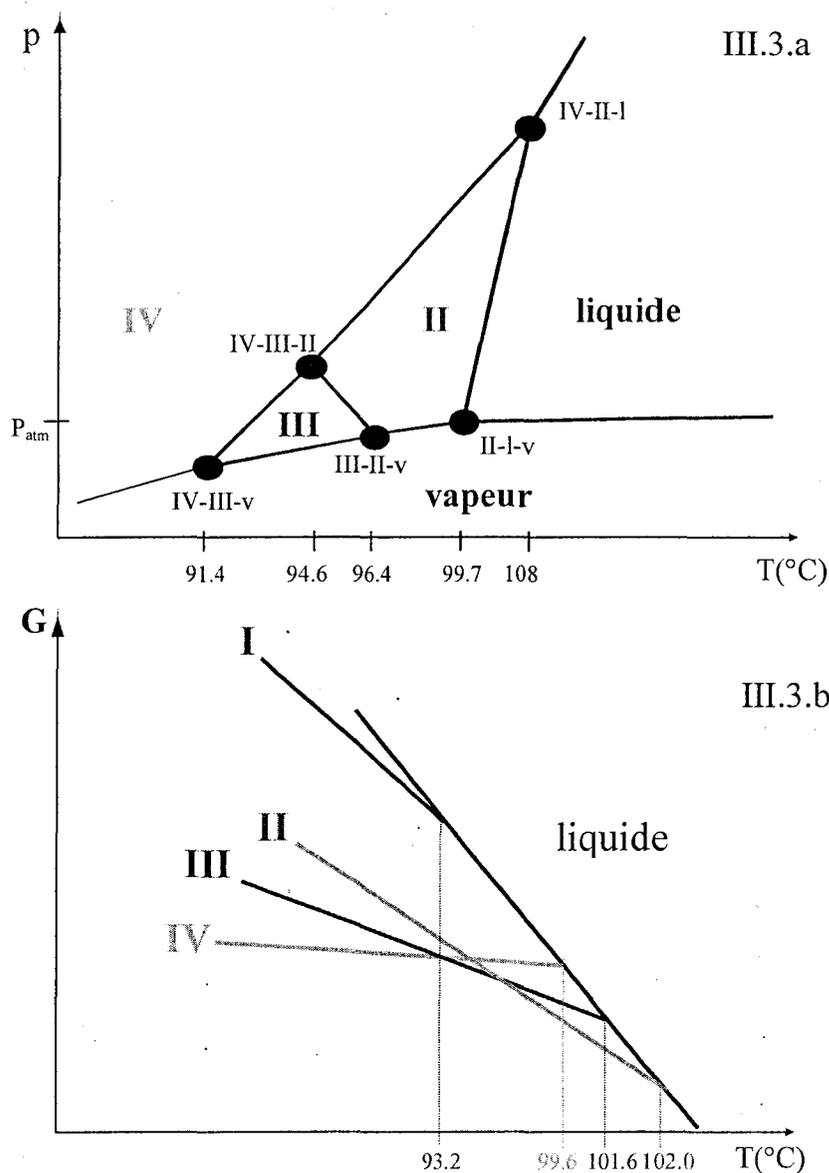


Figure III.3 :

- a. Diagramme ( $p$ ,  $T$ ) de la fanansérine, reproduit de la référence [2] avec la permission de l'auteur
- b. Représentation schématique du diagramme de Gibbs  $G(T)$  établi d'après le diagramme ( $p$ ,  $T$ )

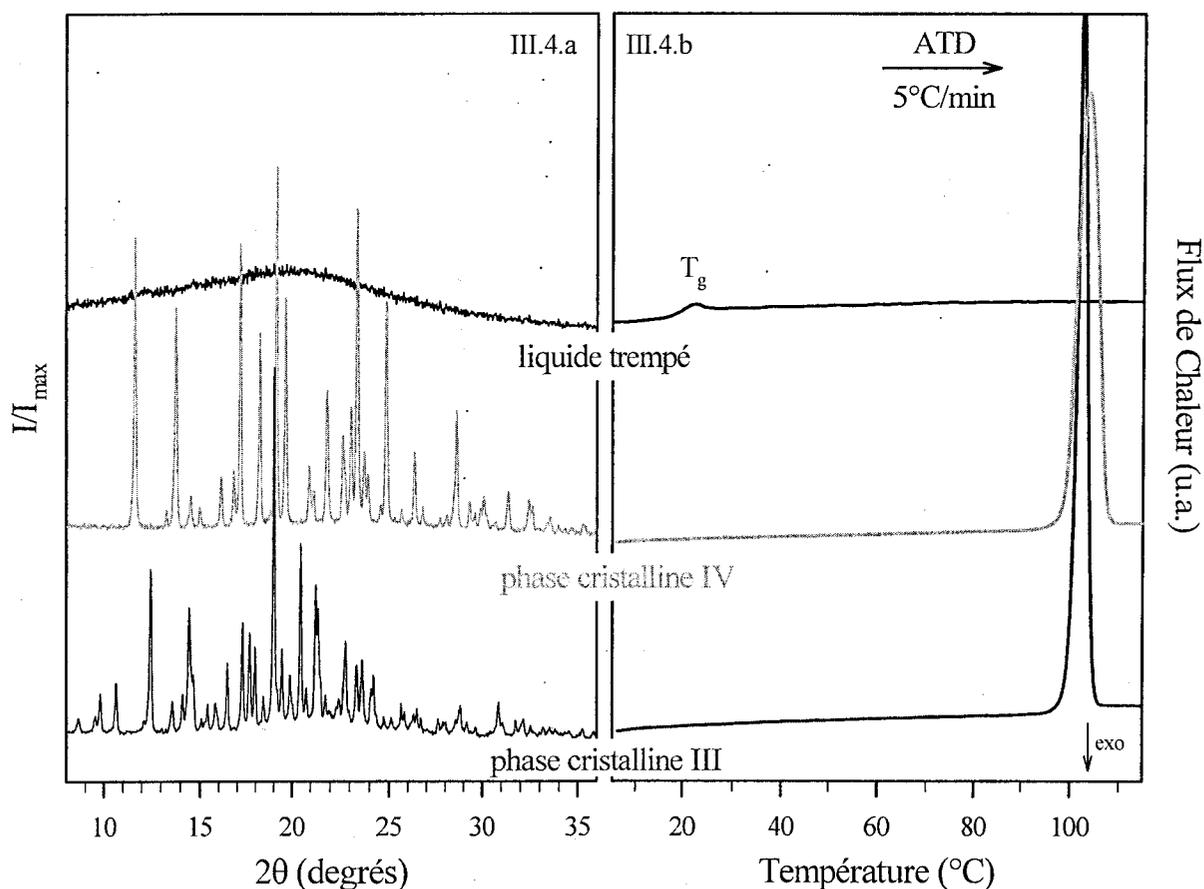
Il ressort de ces travaux qu'à température ambiante et à pression atmosphérique, la forme IV est la phase la plus stable. Le domaine de stabilité des phases II et III sont limités en pression par celui de la phase IV. La phase I, quant à elle, est intrinsèquement métastable.

La figure III.3 met aussi en évidence la grande complexité de la situation près de la fusion des phases II, III et IV, dont les températures de fusion sont extrêmement proches.

### C. CARACTERISATION DES LOTS DE PHASES III ET IV UTILISES POUR LES ETUDES DE BROYAGE

Nous disposons pour notre étude des phases III (lot P95074) et IV (lot P96003). Nous avons caractérisé expérimentalement, par DX et ATD, les caractéristiques de ces deux lots, pour optimiser les protocoles d'investigation et faciliter l'analyse des données collectées lors des expériences de broyage qui feront l'objet du chapitre suivant.

La **figure III.4.a** présente les diagrammes de DX, enregistrés sur capillaire tournant à température ambiante, des phases III et IV de la fanansérine ainsi que du liquide sous-refroidi par une rampe de température à 10°C/min. La **figure III.4.b** rend compte du comportement de ces phases lors d'un chauffage à 5°C/min.



*Figure III.4 :*

- diagrammes de DX, enregistrés sur capillaires tournants de diamètre 0.7 mm, des formes cristallines III et IV de la fanansérine, ainsi que du liquide sous refroidi à 10°C/min
- thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min, des formes III, IV et vitreuse de la fanansérine

Les diagrammes de diffraction des rayons X des phases III et IV (figure III.4) sont tout à fait semblables à ceux enregistrés par J. Giovannini [1], et présentés sur la figure III.2. Les thermogrammes correspondants ne montrent aucun accident enthalpique sur le domaine de température allant de l'ambiante à 100°C environ, ce qui confirme l'absence d'interconversion polymorphique de ces phases au chauffage. Au-delà de 100°C, la fusion se manifeste par un pic endothermique intense. On peut en déterminer la température onset et l'enthalpie :

- pour la forme III :  $T_f^{III} = 101.1^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H_f^{III} = 65.7 \text{ J/g}$
- pour la forme IV :  $T_f^{IV} = 99.0^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H_f^{IV} = 85.9 \text{ J/g}$

Ces valeurs sont en accord avec celles précédemment publiées [1] (voir section B.2.).

La fanansérine liquide peut être aisément sous refroidie. Le diagramme de DX du liquide sous refroidi à 10°C/min, présenté sur la figure III.4.a, ne montre aucune raie de Bragg ; il est caractéristique d'un amorphe. Le thermogramme correspondant, enregistré à 5°C/min présente au réchauffage un saut de chaleur spécifique associé à la transition vitreuse à la température  $T_g^{5K/min} = 19^\circ\text{C}$ . Le verre de liquide présente un comportement au chauffage identique, qu'il soit issu de la fusion de la forme III ou de celle de la forme IV.

## D. MOBILITE MOLECULAIRE DE LA FANANSERINE SOUS-REFROIDIE

Cette section présente une étude de la mobilité moléculaire de la fanansérine amorphisée par sous-refroidissement de sa phase liquide, réalisée par spectroscopie diélectrique et spectroscopie de chaleur spécifique, au voisinage de  $T_g = 19^\circ\text{C}$ . Les appareils utilisés sont l'analyseur diélectrique DEA 2970 et la DSC 2920 décrits au chapitre II, section B. Les aspects théoriques des méthodes spectroscopiques mises en œuvre font l'objet du paragraphe C.3 de ce même chapitre.

### D.1. Spectroscopie diélectrique

#### ➤ Description des résultats

La figure III.5 présente les évolutions des parties réelle et imaginaire de la permittivité diélectrique complexe, respectivement notées  $\varepsilon_T'(\omega)$  et  $\varepsilon_T''(\omega)$ , en fonction du logarithme de la fréquence. Les spectres ont été enregistrés au cours d'isothermes entre  $23^\circ\text{C}$  et  $65^\circ\text{C}$ , par palier de  $6^\circ\text{C}$ .

Le maximum des courbes  $\varepsilon_T''(\omega)$  correspond au point d'inflexion des courbes  $\varepsilon_T'(\omega)$ , et se décale vers les hautes fréquences quand la température augmente. Il faut signaler qu'une contribution due à la conductivité apparaît sur l'aile basse fréquence des pics, mais n'est pas représentée sur la figure pour en simplifier la lecture. Les pics  $\varepsilon_T''(\omega)$  ne sont pas symétriques, et leur largeur à mi-hauteur est supérieure aux 1.14 décades du modèle de Debye présenté au chapitre II (elle atteint 1.5 décades à  $65^\circ\text{C}$ , et 1.9 décades à  $23^\circ\text{C}$ ). Ces deux éléments indiquent que la relaxation n'est pas monoexponentielle [3], mais qu'elle peut être décrite soit par une distribution de temps de relaxation, soit par l'exponentielle étirée de Kolrausch-Williams-Watts :

$$\Phi(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{\tau}\right)^{\beta_{KWW}}\right] \quad (\text{III.1})$$

Des mesures isothermes ont également été réalisées à des températures inférieures à  $T_g$ , afin de déceler la présence éventuelle de processus de relaxations secondaires. Dans les gammes de températures et de fréquences accessibles, aucune trace de relaxation  $\beta$  de type JG n'a pu être détectée.

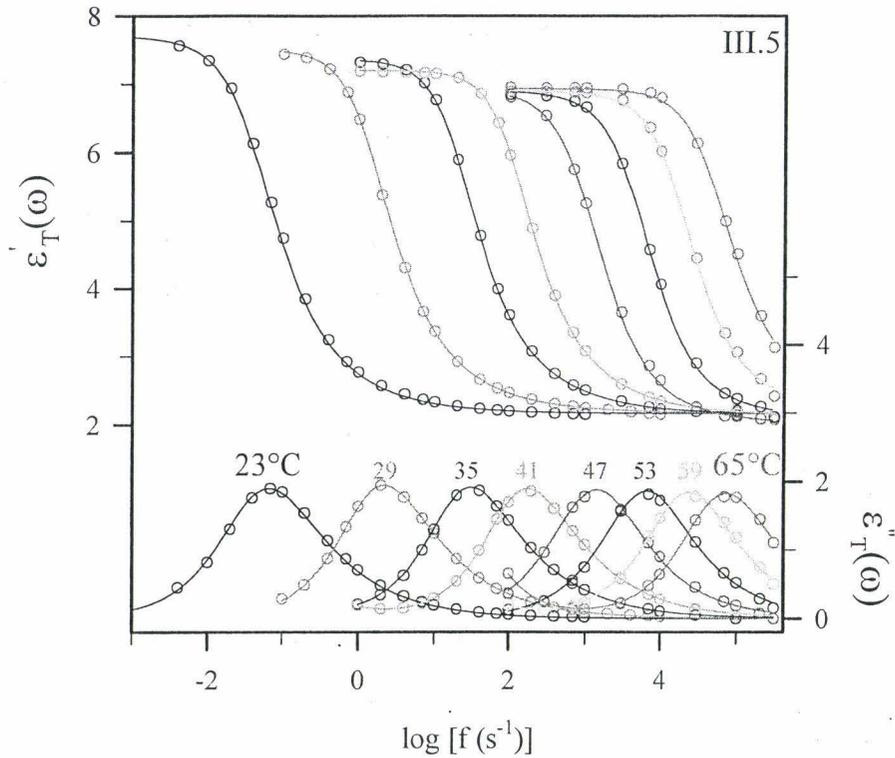


Figure III.5 :

Parties réelle et imaginaire de la permittivité diélectrique de la fanansérine amorphisée par trempe thermique. Les points expérimentaux ont été enregistrés au cours d'isothermes entre 23°C et 65°C, par paliers de 6°C, comme indiqué sur la figure. Les affinements des spectres ont été réalisés sur une loi d'Havriliak et Negami

### ➤ Affinement des courbes et analyse des résultats

Comme nous l'avons discuté au chapitre II (section C.2), deux approches sont possibles pour analyser les relaxations diélectriques et affiner les courbes expérimentales :

- l'utilisation d'une formule empirique de  $\varepsilon_T''(\omega)$ , comme celle d'Havriliak et Negami présentée au chapitre II, équation (II.18). De tels affinements permettent de localiser le temps caractéristique des relaxations  $\tau_{\max}$ . La fonction d'Havriliak et Negami correspondant à une fonction de distribution différente de celle de la loi de KWW, il n'est pas possible d'obtenir d'informations directes sur les caractéristiques physiques des relaxations.
- l'utilisation directe de la formule de KWW, qui décrit la forme physique réelle de la fonction réponse de l'échantillon. Cette méthode donne directement accès au temps caractéristique  $\tau_{\text{KWW}}$  et au coefficient  $\beta_{\text{KWW}}$  de l'exponentielle étirée. Par ailleurs, la théorie des effets couplés permettant de localiser dans le diagramme d'Arrhenius les processus de relaxation secondaire de type JG nécessite la connaissance des paramètres  $\tau_{\text{KWW}}$  et  $\beta_{\text{KWW}}$  (voir chapitre II, section C.2).

▪ Méthode empirique – Affinements d’Havriliak et Negami

Les affinements des résultats expérimentaux sur une loi d’Havriliak et Negami sont reportés en traits pleins sur la figure III.5. Du fait du grand nombre de paramètres variables, les affinements sont en parfaite adéquation avec les points expérimentaux. Le **tableau III.3** donne pour trois températures les valeurs des paramètres  $\alpha_{HN}$ ,  $\beta_{HN}$  et  $\tau_{max}$ .  $\tau_{max}$  est le temps caractéristique de la relaxation ; sa dépendance en température sera discutée lors de la présentation du diagramme d’Arrhenius de la figure III.7.

Température (°C)	$\tau_{max}$ (s)	$\alpha_{HN}$	$\beta_{HN}$
23	2.378	0.87	0.68
47	$1.12 \cdot 10^{-4}$	0.90	0.77
65	$2.15 \cdot 10^{-6}$	0.92	0.82

Tableau III.3 :

*Paramètres d’affinement des courbes de relaxation diélectrique de la fanansérine sur une loi d’HN.  $\tau$  est le temps caractéristique de la relaxation,  $\alpha$  le paramètre qui reflète l’élargissement des courbes  $\epsilon_T''(\omega)$  et  $\beta$  celui qui traduit leur dissymétrie. Pour un processus exponentiel de type Debye,  $\alpha = \beta = 1$ .*

Les paramètres  $\alpha_{HN}$  et  $\beta_{HN}$  de la loi d’Havriliak et Negami reflètent respectivement l’élargissement et la dissymétrie des courbes  $\epsilon_T''(\omega)$ , par rapport à une relaxation exponentielle de type Debye. Leurs valeurs sont inférieures à l’unité à toutes températures, ce qui traduit la non exponentialité des relaxations diélectriques. L’augmentation de la température provoque l’augmentation des valeurs de  $\alpha_{HN}$  et  $\beta_{HN}$  : les courbes  $\epsilon_T''(\omega)$  deviennent plus étroites et plus symétriques, et leurs caractéristiques se rapprochent de celles d’une relaxation exponentielle. Ce comportement est généralement observé pour les liquides métastables : à haute température, les mouvements de relaxation sont peu coopératifs, et la distribution des temps de relaxation dans l’amorphe est relativement uniforme. L’abaissement de la température provoque une augmentation de la viscosité et un accroissement de la coopérativité. La distribution des temps caractéristiques de relaxation s’élargit, ce qui modifie l’allure des courbes  $\epsilon_T''(\omega)$  se traduisant par une diminution des valeurs de  $\alpha_{HN}$  et  $\beta_{HN}$ .

L’évolution en température des paramètres  $\alpha_{HN}$  et  $\beta_{HN}$  donne donc une information globale sur l’allure des relaxations principales, mais ne permet pas de caractériser de manière précise la non exponentialité des relaxations. En revanche, les affinements d’Havriliak et Negami permettent de repérer le temps caractéristique le plus probable de la relaxation,  $\tau_{max}$ , dont la dépendance en

température est particulièrement visible dans un diagramme d'Arrhenius. Nous reviendrons sur ce point en section D.3

▪ Méthode directe - Expression de Kolrausch-Williams-Watts

Une autre méthode d'analyse des données diélectriques consiste à utiliser directement la forme de la fonction réponse de l'échantillon, donnée par l'expression (III.1). De ce fait, le nombre de paramètres variables est plus restreint que dans la méthode empirique. Cette approche présente l'avantage de donner directement le temps caractéristique  $\tau_{\text{KWW}}$  et le coefficient  $n = 1 - \beta_{\text{KWW}}$  qui reflète les caractéristiques physiques des relaxations.

Nous nous intéressons principalement à la valeur de  $n$  au voisinage de la transition vitreuse ( $T_g = 19^\circ\text{C}$ ), puisque c'est cette donnée qui pourra éventuellement nous permettre de localiser les relaxations secondaires [4]. La **figure III.6** montre deux affinements réalisés pour 23 et 29°C, deux températures proches de  $T_g$ . Ils fournissent les paramètres suivants :

- à 23°C :  $\tau_{\text{KWW}} = 2$  s et  $n = 0.32$
- à 29°C :  $\tau_{\text{KWW}} = 0.14$  s et  $n = 0.30$

D'après la théorie formulée par K. Ngai [4], et présentée au chapitre II, une telle analyse des données diélectriques permet de localiser la position en fréquence des relaxations secondaire de type Johari - Goldstein. Les affinements de la figure III.6 donnent accès aux paramètres de la loi de KWW, que l'on peut lier aux paramètres  $\tau_0$  et  $t_c$  de la théorie des effets couplés par l'expression (III.2) :

$$\tau_0 = (t_c)^n (\tau_{\text{KWW}})^{1-n} \quad (\text{III.2})$$

où  $t_c = 2$  ps est le temps de « crossover » qui sépare le domaine des relaxations indépendantes du domaine des relaxations coopératives, et  $\tau_0$  le temps caractéristique des relaxations indépendantes. Les observations expérimentales ont mis en évidence que pour la plupart des formateurs de verres,  $\tau_0$  s'identifie au temps caractéristique  $\tau_\beta$  des relaxations secondaires. La relation (III.2) fournit donc une estimation de la position en fréquence du processus secondaire de Johari-Goldstein. Pour la fanasérine, on obtient à 23°C :

$$\tau_0(T_g) \approx \tau_\beta(T_g) = 2.89 \cdot 10^{-4} \text{ s.}$$

La position de  $\tau_0$  est signalée par une flèche sur la figure III.6.

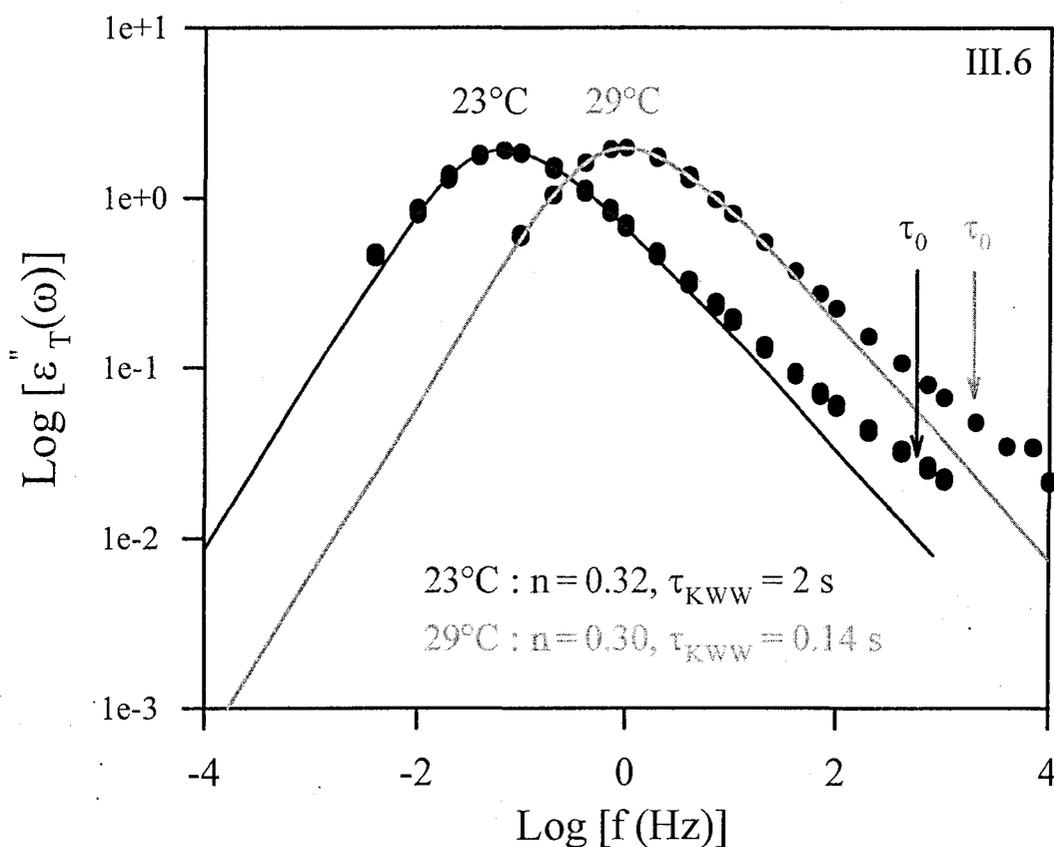


Figure III.6 :

*Affinements des relaxations à 23 et 29°C, sur la fonction de relaxation  $\Phi(t)$*

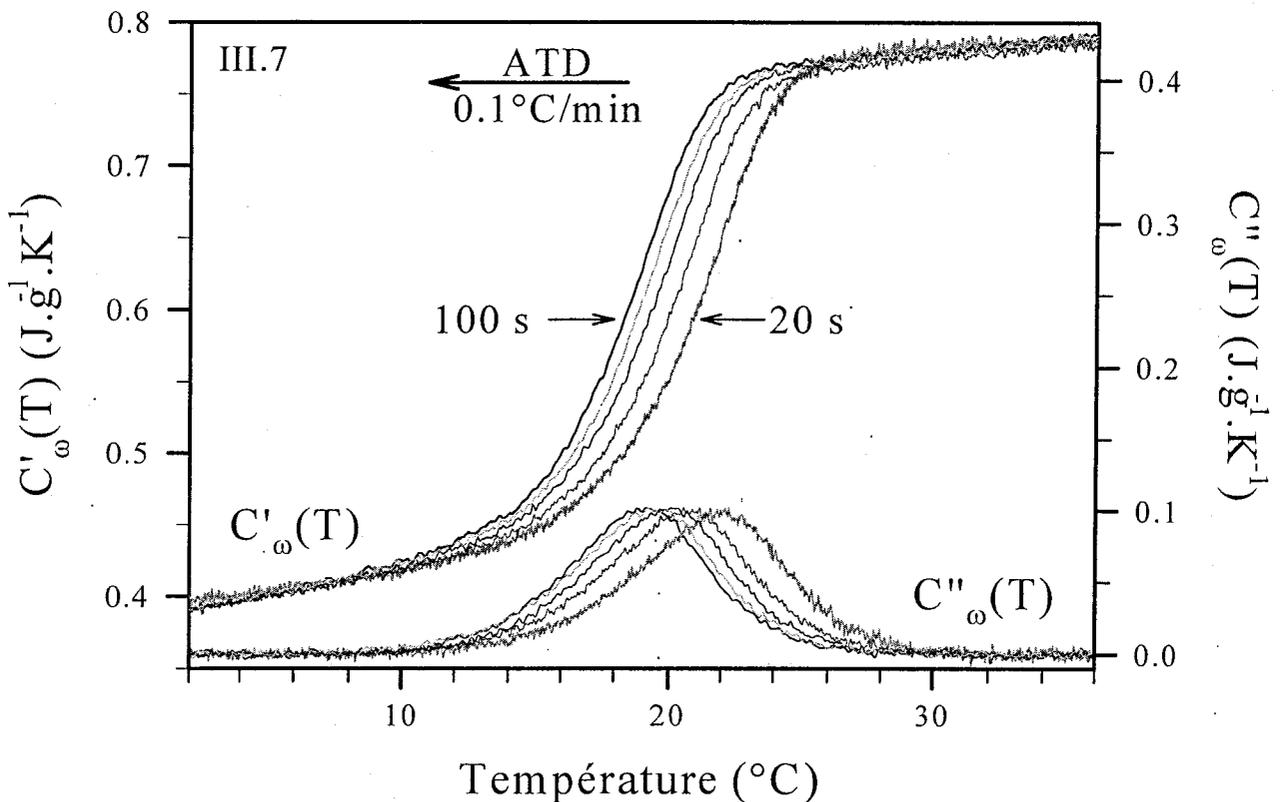
D'après l'approche de Ngai, les temps caractéristiques des processus secondaires de la fanansérine sont, dans ce domaine de température, très proches des temps caractéristiques de la relaxation principale. Les relaxations JG ne sont donc pas clairement visibles, mais se manifestent par un épaulement sur l'aile haute fréquence du pic de relaxation principale. Ce comportement est généralement observée pour les formateurs de verres présentant un coefficient de non exponentialité important, comme c'est le cas ici avec  $\beta_{KWW} = 0.68$ .

## D.2. Spectroscopie de chaleur spécifique

La fanansérine liquide se sous refroidit aisément, et peut être maintenue pendant plusieurs heures 40°C au-dessus de  $T_g$  sans recristalliser. Cette résistance à la recristallisation est particulièrement avantageuse pour la réalisation d'une spectroscopie de chaleur spécifique [5,6]. Les aspects théoriques de cette technique ont été évoqués au chapitre II.

➤ **Description des résultats**

Les courbes expérimentales de la **figure III.7** présentent les parties réelle et imaginaire de la chaleur spécifique complexe de la fanansérine sous refroidie. Elles ont été enregistrés lors de refroidissements successifs du liquide métastable, de 40°C à 0°C. La vitesse de balayage utilisée est extrêmement lente ( $q = 0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ ), afin d'éviter les effets de distorsion du signal discutés au chapitre II [5,6]. Chaque jeu de courbes correspond à une période de modulation  $2\pi/\omega$  différente. Elles varient de 20 à 100 s, par palier de 20 s, dans l'ordre des températures décroissantes.



*Figure III.7 :*

*Parties réelle et imaginaire de la chaleur spécifique complexe de la fanansérine trempée. Les courbes correspondent à des balayages successifs à  $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Les périodes de modulation utilisées vont de 20 à 100 s, par pas de 20 s*

Les profils des courbes  $C'_\omega(T)$  et  $C''_\omega(T)$  de la figure III.7 sont caractéristiques d'un processus de relaxation. Comme les spectres diélectriques de la figure III.5, la partie imaginaire de la chaleur spécifique  $C''_\omega(T)$  présente des pics dont les maxima correspondent aux points d'inflexion des courbes  $C'_\omega(T)$ .

➤ **Analyse des résultats**

Les résultats de la figure III.7 donnent accès à la dépendance en température des temps caractéristiques des relaxations enthalpiques. Cette évolution sera discutée ultérieurement, en

parallèle avec les résultats de spectroscopie diélectrique. La spectroscopie de chaleur spécifique permet aussi d'obtenir des informations additionnelles sur la nature des relaxations, et en particulier sur leur caractère non arrhénien et non exponentiel. L'évaluation du caractère non arrhénien des relaxations, c'est-à-dire de la fragilité du liquide (cf. chapitre II, équation (II.9)) fera l'objet de la section D.3

Les courbes expérimentales de la figure III.6 permettent aussi de déterminer la non exponentialité des relaxations, en utilisant la méthode proposée par Böhmer et al. détaillée au chapitre II, section C.3. Nous avons appliqué cette analyse aux courbes correspondant à une période de modulation de 100 s. Dans ce cas, le maximum de  $C_{\omega}''(T)$  se situe à 19°C. On obtient alors un exposant de non exponentialité  $\beta_{KWW}^{fanan.} = 0.66$ . Cette valeur est en parfaite adéquation avec celle de  $\beta_{KWW}$  déterminée d'après les courbes de spectroscopie diélectrique ( $\beta_{KWW} = 0.68$  à 23°C). La spectroscopie de chaleur spécifique complexe s'avère donc être un moyen efficace de juger de la non exponentialité des relaxations au voisinage de la transition vitreuse.

### D.3. Synthèse des résultats spectroscopiques : analyse et discussion

Les temps caractéristiques des relaxations, déterminés par spectroscopie de chaleur spécifique et par spectroscopie diélectrique, ont été reportés sur le diagramme d'Arrhenius en échelle  $T_g/T$  de la figure III.8.

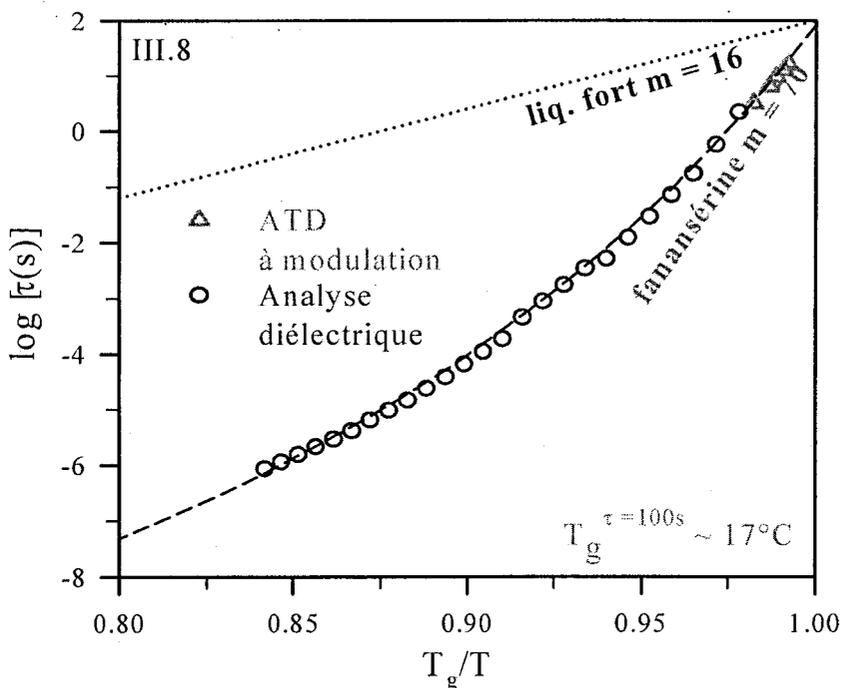


Figure III.8 :

Diagramme d'Arrhenius pour la fanansérine liquide métastable. La courbe en tirets représente l'affinement des résultats expérimentaux sur une loi VFT. La courbe en pointillés est la limite des verres forts

➤ **Complémentarité des deux techniques**

La figure III.8 montre clairement que les résultats d'ATD à modulation prolongent ceux de la spectroscopie diélectrique. Ceci révèle une bonne cohérence des temps de relaxation mesurés par les deux techniques, et démontre que les modes impliqués dans la relaxation diélectrique contribuent de manière significative à la relaxation enthalpique.

➤ **Indice de fragilité**

Comme nous l'avons signalé au chapitre II, les formateurs de verre sont usuellement classés et comparés d'après leur indice de fragilité  $m$  (chapitre II, équation (II.9)) [7]. Nous avons déterminé la fragilité de la fanansérine sous refroidie par deux méthodes différentes.

**Application de la loi VFT**

La courbure de  $\log(\tau)$  dans le diagramme III.8 indique que les relaxations primaires de la fanansérine suivent une dynamique non arrhenienne. La spectroscopie diélectrique donne accès à une plage de températures et de fréquences suffisamment étendue pour ajuster les résultats sur la loi VFT présentée au chapitre II:

$$\tau(T) = \tau_0 \exp\left(\frac{DT_0}{T-T_0}\right) \quad (\text{III.3})$$

On obtient  $D = 9.58$  et  $T_0 = -41^\circ\text{C}$ . Le paramètre  $D$  étant lié à l'indice de fragilité  $m$  par la relation [8]:

$$m = 16 + \frac{590}{D} \quad (\text{III.4}),$$

on en déduit pour la fanansérine  $m = 77$ . La limite des verres forts étant  $m = 16$ , la fanansérine se classe parmi les liquides fragiles.

**Détermination de la fragilité à partir des seuls résultats d'ATD à modulation**

L'indice de fragilité  $m$  est par définition la pente à  $T_g$  de la courbe  $\log(\tau) = f(T_g/T)$ . L'ATD à modulation permettant d'étudier les relaxations enthalpiques à proximité de la transition vitreuse, les informations dynamiques qu'elle fournit se situent dans une gamme de températures et de fréquences particulièrement adaptée à l'évaluation de la fragilité. Comme le domaine de fréquences accessible par cette technique est restreint (une décade), l'évolution des temps caractéristiques mesurés par ATD apparaît arrhenienne. L'affinement conduit à un indice de fragilité  $m = 70$ , ce qui est tout à fait cohérent avec la valeur de  $m$  issue de la loi VFT.

La spectroscopie de chaleur spécifique se révèle donc être une technique fiable d'évaluation de la fragilité des formateurs de verre.

## **E. PREDICTION DE LA STABILITE DES AMORPHES**

L'état amorphe améliore dans certains cas la biodisponibilité et donc l'efficacité thérapeutique des médicaments. Cependant, un matériau amorphe est potentiellement sujet à des phénomènes de recristallisation, qui peuvent intervenir pendant la période de stockage et sont susceptibles de modifier les propriétés thérapeutiques de manière inopinée. En conséquence, les formulations cristallines stables sont en général privilégiées. Toutefois, si le médicament doit contenir une fraction d'amorphe, il est extrêmement important de pouvoir évaluer sa stabilité dans le temps, afin de s'assurer qu'aucune modification structurale n'intervienne pendant la « durée de vie » programmée du médicament. Cette étape passe par l'étude de la mobilité moléculaire, à l'origine des réarrangements structuraux pouvant entraîner des transformations de phases. Nous résumons ici quelques approches, qualitatives et quantitatives, proposant une réponse au problème de la stabilité des formes amorphes.

### **Approches qualitatives**

La température de transition vitreuse  $T_g$  joue un rôle important pour la stabilité d'un composé. En effet, au-dessus de  $T_g$ , les temps caractéristiques de relaxation sont plus courts que l'échelle de temps de l'expérience, ce qui favorise les réarrangements structuraux. Un amorphe doit donc être conservé à une température inférieure à  $T_g$ . Toutefois, cette condition ne suffit pas à en assurer la stabilité : il a par exemple été reporté que l'indométhacine conservée  $12^\circ\text{C}$  en dessous de  $T_g$  recristallisait complètement en quelques semaines. Pour un stockage à  $(T_g - 38^\circ\text{C})$ , ce délai est porté à plus de six mois [9]. Par ailleurs, Hancock et al. ont montré que des composés largement utilisés comme le sucrose ou le polyvinylpyrrolidone (PVP) présentaient une mobilité moléculaire conséquente plusieurs dizaines de degrés en dessous de  $T_g$  [10]. On considère généralement que pour assurer une bonne stabilité, le verre doit être conservé en dessous de la température de Kauzmann  $T_K$  [11] (à laquelle l'entropie du liquide métastable extrapolé égalerait celle du cristal, voir chapitre II, § C.1).  $T_K$  peut être évaluée à partir des mesures de chaleur spécifique du cristal et du liquide. Le stockage d'un médicament amorphe à  $T < T_K$  lui assure en principe une stabilité de plusieurs mois, voire plusieurs années [12]. Pour la fanansérine, on obtient  $T_K = -36^\circ\text{C}$ .

### **Approches quantitatives**

D'autres méthodes ont été mises au point pour estimer plus quantitativement la mobilité moléculaire dans le domaine vitreux.

Relaxations enthalpiques

La première consiste à mesurer les relaxations enthalpiques [13] : on effectue des vieillissement isothermes de durées variables sous  $T_g$ , puis on réchauffe le matériau avec une vitesse fixée. Au passage de la transition vitreuse, l'amplitude du recouvrement enthalpique observé au réchauffage dépend de la durée du vieillissement. En conséquence, la réalisation d'isothermes de durées différentes à une température donnée permet de calculer la fraction de recouvrement enthalpique en fonction du temps de vieillissement. Cette évolution suit généralement la loi en exponentielle étirée de KWW (équation III.1), et permet donc de déterminer le temps caractéristique moyen des relaxations  $\tau$  à chaque température. Si  $\tau$  est très grand par rapport à la durée de stockage prévue pour le médicament, on peut alors présumer que ce dernier ne subira pas de modification structurale majeure pendant sa conservation. En répétant ce protocole à plusieurs températures, on peut établir la courbe  $\tau(T)$ , et prévoir par exemple les conséquences d'une augmentation accidentelle de la température de stockage sur la mobilité moléculaire, donc le risque de transformation de phase. Cette procédure présente deux inconvénients majeurs : elle est longue à mettre en œuvre, puisqu'en dessous de  $T_g$ , il faut en général plusieurs heures pour atteindre la valeur d'équilibre de l'enthalpie. En outre, la proximité du saut de  $C_p$  associé à la transition vitreuse et du pic de recouvrement enthalpique gêne la détermination précise de leurs amplitudes respectives. Il a été montré que l'ATD à modulation de température permettait de s'affranchir de cette difficulté [5].

Extension de la théorie d'Adam et Gibbs au domaine vitreux

Une autre approche permet d'évaluer la mobilité moléculaire dans le domaine vitreux à partir des informations dynamiques recueillies au-dessus de  $T_g$ . Le modèle d'Adam et Gibbs [14], initialement proposé pour décrire la dynamique d'un système à l'équilibre, permet de relier le temps caractéristique des relaxations  $\tau$  à l'entropie configurationnelle  $S_c$  :

$$\tau(T) = A \exp \frac{C}{T S_c} \quad (\text{III.5})$$

où  $A$  et  $C$  sont des constantes. Les verres étant des systèmes hors équilibre, l'application de l'expression (III.5) n'est pas immédiate. L'extension du modèle d'Adam et Gibbs au domaine vitreux passe par l'introduction de la notion de température fictive  $T_f$ , définie comme la température à laquelle le système à l'équilibre aurait les mêmes caractéristiques que le système vitreux réel à la température  $T$ . L'entropie configurationnelle s'exprime donc :

$$S_c^{\text{verre}}(T) = S_c^{\text{eq}}(T_f) = \int_{T_0}^{T_f} \frac{C_p^{\text{conf}}(T)}{T} dT \quad (\text{III.6})$$

où  $S_c^v(T)$  est l'entropie du système vitreux à la température  $T$  et  $S_c^e(T_f)$  l'entropie du système à l'équilibre à  $T_f$ . La dépendance en température de  $C_p^{conf}(T)$  est généralement bien décrite par une loi de type :

$$C_p^{conf}(T) = K/T \quad (III.7)$$

où  $K$  est une constante dépendant du matériau. En injectant les expressions (III.6) et (III.7) dans l'expression d'Adam et Gibbs (III.5), on obtient l'expression du temps de relaxation :

$$\tau(T, T_f) = \tau_0 \exp \frac{DT_0}{T - (T/T_f)T_0} \quad (III.8)$$

La température fictive  $T_f$  peut être déterminée précisément par des mesures calorimétriques [15]. Elle peut aussi être estimée de manière satisfaisante par l'approximation [16]:

$$\frac{1}{T_f} = \frac{\gamma C_p}{T_g} + \frac{1 - \gamma C_p}{T} \quad (III.9)$$

où

$$\gamma C_p = \frac{C_p^{liq} - C_p^{verre}}{C_p^{liq} - C_p^{cristal}} \quad (III.10)$$

En remplaçant l'expression de  $T_f$  dans l'équation (III.8), on peut estimer le temps caractéristique des relaxations. Le tableau IV.6 résume les valeurs de  $T_f$  et de  $\tau$  déterminées pour quatre températures :

$T_{sto}$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\tau$ (s)
19	19	122
10	18.0	599
0	17.2	3816 = 1.1 h
-30	14.2	$4 \cdot 10^6 = 46$ jours

Tableau IV.6 :

Température de stockage  $T_{sto}$ , température fictive  $T_f$  et temps caractéristique  $\tau$  des mouvements relaxationnels de la fanansérine vitreuse, déterminés respectivement d'après les expressions (III.9) et (III.8).

On obtient pour la fanansérine vitreuse conservée à  $-30^\circ\text{C}$  un temps caractéristique voisin de 46 jours. Cette estimation concorde avec nos observations expérimentales : un échantillon de fanansérine vitrifiée par trempage thermique du liquide est toujours amorphe et ne manifeste aucune recristallisation après 30 jours de stockage à  $-30^\circ\text{C}$  (données non présentées).

### Théorie des effets couplés

Le modèle mis au point par K. Ngai [17] (cf. chapitre II) permet de relier, en dessous de  $T_g$ , le temps caractéristique des processus secondaires de type Johari-Goldstein  $\tau_\beta$  au temps caractéristique des relaxations principales noté  $\tau_\alpha$ . Cette approche permet donc de présumer de la stabilité du matériau.

En l'absence de relaxations secondaires détectables, on peut estimer le temps caractéristique  $\tau_\beta(T_g)$  à partir de  $\tau_\alpha(T_g)$ . Si  $\tau_\beta(T_g)$  est rapide, il faudra alors conserver le matériau à très basse température pour espérer réduire la mobilité moléculaire et les risques de réarrangements structuraux.

Pour les matériaux présentant un processus secondaire détectable, il est possible d'effectuer la démarche inverse : en effectuant une mesure de  $\tau_\beta$ , on en déduit une estimation de  $\tau_\alpha$ , dont la mesure directe à proximité de la transition vitreuse nécessiterait un temps d'expérience considérablement plus long. Cette procédure donne directement accès aux caractéristiques des relaxations principales, qui conditionnent la stabilité du matériau.

L'inconvénient de la théorie des effets couplés est qu'elle ne tient pas compte des mouvements relaxationnels autres que de type JG, qui peuvent posséder des temps caractéristiques beaucoup plus courts et modifier également la stabilité de l'amorphe.

En conclusion, les spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique constituent deux techniques complémentaires pour l'étude de la dynamique moléculaire de composés pharmaceutiques [6]. La détermination des caractéristiques dynamiques de la fanansérine amorphe nous a permis de mettre en évidence le caractère fragile ( $m = 70-77$ ) de ce formateur de verre. La spectroscopie de chaleur spécifique donne également accès à l'exposant de non exponentialité des relaxations: Pour la fanansérine trempée,  $\beta_{KWW} = 0.66$  à  $19^{\circ}\text{C}$ . La complémentarité des deux techniques est un atout précieux pour l'étude de la mobilité moléculaire des composés pharmaceutiques : la spectroscopie de chaleur spécifique s'avère être une méthode particulièrement efficace de caractérisation de la mobilité moléculaire à l'approche de  $T_g$ . Elle permet de déterminer, de manière fiable, à la fois la fragilité et la non exponentialité des relaxations. Elle pourra par conséquent être utilisée avantageusement pour évaluer les propriétés dynamiques de composés pour lesquels l'analyse diélectrique n'est pas réalisable (par exemple, les composés présentant une contribution de conductivité tellement importante qu'elle masque le processus de relaxation). Ce point sera approfondi au chapitre VIII, dans le cas du tréhalose.

**REFERENCES**

1. J. Giovannini, Thèse de Doctorat soutenue à l'Université de Rennes 1, (décembre 2001), numéro d'ordre 2648
2. J. Giovannini, L. Ter Minassian, R. Céolin, S. Toscani, M.A. Perrin, D. Louër, F. Leveiller, *J. Phys. IV*, **11** (2001),10
3. C.A. Angell, *J. Non-Cryst. Solids*, **131-133** (1991), 13
4. K.L. Ngai, *J. Chem. Phys.*, **109**, 16 (1998), 6982
5. O. Bustin, M. Descamps, *J. Chem. Phys.*, **110** (1999), 22, 10982
6. L. Carpentier, L. Bourgeois, M. Descamps, *J. Therm. Anal. Cal.*, **68** (2002), 727
7. R. Böhmer, K.L. Ngai, C.A. Angell, D.J. Plazek, *J. Chem. Phys.*, **99** (1993), 5, 4201
8. R. Böhmer, *J. Non Cryst. Solids*, **172-174** (1994), 628
9. M. Yoshioka, B.C. Hancock, G. Zografi, *J. Pharm. Sci.*, **84** (1995), 983
10. B.C. Hancock, S.L. Shamblin, G. Zografi, *Pharm. Res.*, **12** (1995), 799
11. M.D. Ediger, C.A. Angell, S.R. Nagel, *J. Phys. Chem.*, **100** (1996), 13200
12. S.L. Shamblin, X. Tang, L. Chang, B.C. Hancock, M.J. Pikal, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999), 4113
13. I.M. Hodge, *J. non Cryst. Solids*, **169** (1994), 211
14. G. Adam, J.H. Gibbs, *J. Chem. Phys.*, **43** (1965), 139
15. C. T. Moynihan *et al.*, Annals of the New York Academy of sciences, 279, (1976), 15
16. B.C. Hancock, S.L. Shamblin, *Thermochimica Acta*, **380** (2001), 95
17. K.L. Ngai, *J. Chem. Phys.*, **109**, 16 (1998), 6982

## **Chapitre IV**

### **Transformations de phases de la fanansérine** **induites par broyage mécanique**



Ce chapitre est consacré à l'étude des effets du broyage mécanique sur la fanansérine. Comme nous l'avons rappelé au chapitre II, le broyage mécanique peut modifier l'état physique du matériau en induisant des transformations de phase à l'état solide. Les implications de telles transformations sont considérables en pharmacie, puisque deux polymorphes d'un même principe actif sont susceptibles de posséder des propriétés thérapeutiques différentes [1].

La fanansérine est un système tétramorphique [2]. On peut donc espérer assister à des transitions polymorphiques générées par le broyage mécanique. En outre, l'étude des effets du broyage se fait dans un contexte favorable, puisque les phases cristallines existantes et leurs stabilités relatives ont déjà été clairement identifiées [3]. La fanansérine n'est pas hygroscopique et ne nécessite pas de précaution particulière relative à l'atmosphère de broyage ou de stockage. Par ailleurs, sa température de transition vitreuse est proche de la température ambiante, ce qui offre la possibilité d'effectuer le broyage de part et d'autre de  $T_g$ , et donc de tester l'influence de la température de broyage.

Nous présentons dans ce chapitre les résultats expérimentaux obtenus sur le broyage au-dessus de  $T_g$ , à 25°C (section A), puis en dessous de  $T_g$ , à 0°C (section B). Pour chaque température, nous avons suivi les transformations sous broyage des phases III et IV, ce qui permet d'étudier l'influence de la forme polymorphique initiale. La question de la stabilité des produits du broyage au cours du temps est abordée en section C. Cela permettra de tester si les transformations induites par broyage correspondent à des états d'équilibre, ou à des états stationnaires comme le suggère la théorie de Martin - Bellon [4]. L'ensemble des résultats expérimentaux est discuté en section D.

## **A. EFFETS D'UN BROYAGE MECANIQUE AU-DESSUS DE $T_g$**

L'appareil utilisé est le microbroyeur planétaire « Pulvérisette 7 » de Fritsch. Pour optimiser la reproductibilité des résultats, nous avons adopté pour toutes les expériences le protocole de broyage standard décrit au chapitre II, section B.1. Les évolutions des polymorphes III et IV ont été analysées immédiatement après le broyage par Diffraction des rayons X et par Analyse Thermique Différentielle.

### **A.1. Broyage de la forme III**

La **figure IV.1** présente l'évolution des caractéristiques structurales et calorimétriques de la forme III au cours d'un broyage à 25°C. Les diagrammes de diffraction des rayons X de la figure

IV.1.a ont été enregistrés à température ambiante, sur capillaire tournant de diamètre 0.7 mm. La figure IV.1.b rassemble les thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min, pour l'échantillon de forme III non broyé et après chaque étape de broyage.

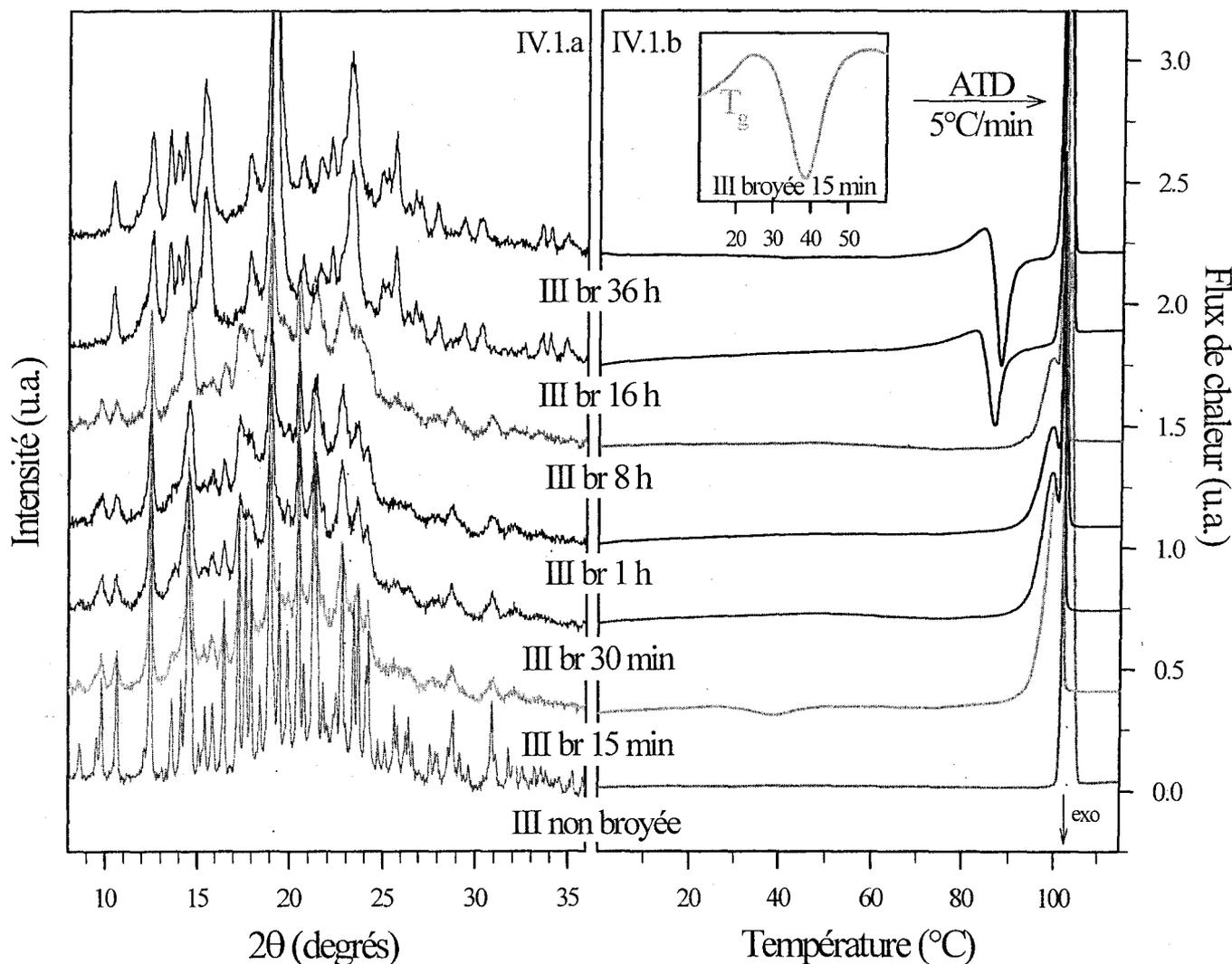


Figure IV.1 :

- évolution du diagramme de DX de la fanansérine III au cours du broyage à 25°C (enregistrements à 25°C sur capillaires tournants, diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K_\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ )
- thermogrammes des échantillons de fanansérine III broyés à 25°C, enregistrés au chauffage à 5°C/min

### ➤ Résultats expérimentaux

Pour un broyage de 15 minutes, le diagramme de DX présente des pics de Bragg plus larges et moins intenses que ceux de l'échantillon cristallin non broyé. On note aussi l'apparition d'un halo de diffusion, qui traduit une **amorphisation** partielle de l'échantillon du point de vue de la DX. Le thermogramme correspondant présente à 19°C un saut de  $C_p$  caractéristique d'une transition vitreuse, qui confirme l'amorphisation de l'échantillon. Le saut de  $C_p$  est immédiatement suivi d'un

exotherme de recristallisation. Ces deux accidents enthalpiques sont de très faible amplitude, mais se distinguent clairement dans l'insert de la figure IV.1.b. Ils prouvent indirectement que la forme III est partiellement amorphisée après 15 min de broyage. On constate aussi que le pic de fusion de la forme III est très élargi par rapport à celui de l'échantillon de départ, et présente un épaulement vers les basses températures à 94°C.

**Pour un broyage de durée comprise entre 30 minutes et 8 heures**, les diagrammes de DX présentent des raies de Bragg de la forme III moins bien résolues, dont l'intensité diminue avec le temps de broyage. Il n'y a pas d'apparition de nouvelles raies correspondant à d'autres polymorphes. Ceci reflète un accroissement du désordre structural dans le composé broyé. En revanche, il est intéressant de noter que les thermogrammes ne présentent plus de trace de transition vitreuse ou de cristallisation. Ils montrent que l'endotherme de fusion des échantillon broyés continue de présenter une structure en double pic, dont l'onset se situe à 92°C. Le processus de fusion des échantillons broyés commence donc près de 10°C en dessous de la température de fusion de l'échantillon non broyé. Cet effet est déjà perceptible après 15 min de broyage et sera discuté par la suite.

**Pour des broyages de 16 et 36 heures**, les diagrammes de DX présentent des pics de Bragg caractéristiques d'une phase cristalline différente de la phase III initiale. Ceci est particulièrement visible en  $2\theta = 13, 22$  et  $30$  degrés. Ces pics sont typiques du polymorphe I (le diagramme de DX de l'échantillon broyé 36 h est tout à fait comparable à celui de la phase cristalline I, présenté au chapitre III, figure III.2). La croissance des pics de la forme I au cours du broyage est concomitante à la disparition des raies de Bragg caractéristiques de la phase III de départ. Un broyage de 36 h provoque donc une **transition polymorphique III → I**.

Les thermogrammes des échantillons broyés 16 et 36 h présentent un accident endothermique à 75°C. Ce pic pourrait être attribué à la fusion, déprimée en température, de la phase I formée par broyage (la fusion de la phase I étant attendue à 93°C). L'endotherme supposé de fusion de I est toujours immédiatement suivi d'un accident exothermique, attribuable à une recristallisation. Le recouvrement des pics de fusion et de recristallisation empêche un calcul précis de l'enthalpie du premier endotherme. On voit cependant que les amplitudes de ces deux pics augmentent entre 16 et 36 h de broyage, ce qui reflète un accroissement de la proportion de forme I dans l'échantillon.

La **figure IV.2** présente les diagrammes de DX permettant d'identifier effectivement la phase vers laquelle a lieu la cristallisation de la fanansérine longuement broyée. Le diagramme (3) est celui de la forme I obtenue par broyage, puis chauffée à 93°C. Il est analogue au diagramme de la forme III de départ (courbe 4). Ces résultats démontrent que l'échantillon, en phase I après le

broyage, recristallise au chauffage vers le polymorphe de départ. Les exothermes observés à 90°C sur la figure IV.1.b sont donc le reflet de la recristallisation I → III. D'autre part, le pic de fusion final retrouve une température onset identique à celle de la fusion de l'échantillon non broyé, ce qui suggère que la reconversion de I vers III au chauffage est totale.

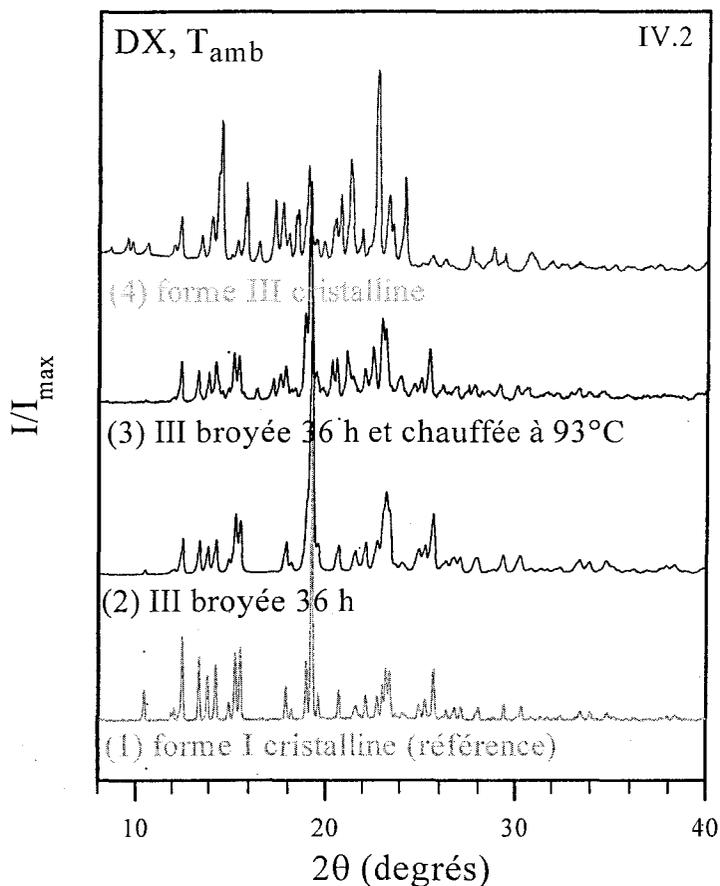


Figure IV.2 :

Diagrammes de diffraction des rayons X, enregistrés sur capillaires tournants à 25°C : (1) de la forme cristalline I, (2) de la forme III broyée 36 h, (3) de la forme III broyée 36 h et chauffée à 93°C, (4) de la forme cristalline III (diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ )

Le broyage prolongé de la fanansérine III a aussi un impact direct sur la granulométrie de l'échantillon. Les observations réalisées au microscope optique ont montré qu'avant le broyage, les grains de forme III ont l'aspect d'aiguilles, de tailles très dispersées. Les plus grandes particules possèdent une longueur supérieure à 300  $\mu\text{m}$ . Après 36 h de broyage, la taille des particules s'est considérablement réduite. La majeure partie des grains n'excède par 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, et tend à s'agglomérer. On distingue aussi quelques particules de taille comprises entre 20 et 30  $\mu\text{m}$ . Les photos IV.1 et IV.2 illustrent l'évolution de la granulométrie entre 0 et 36 h de broyage.

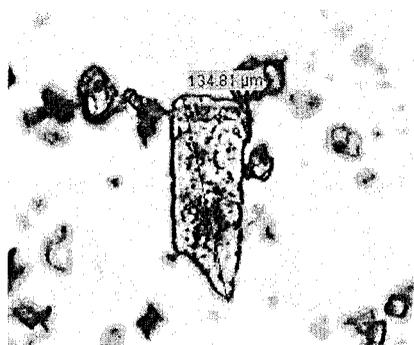


Photo IV.1 :

Observation par microscopie optique de la granulométrie d'un échantillon de forme III non broyé, qui montre une dispersion assez forte de la taille des grains.



Photo IV.2 :

Observation par microscopie optique de la granulométrie d'un échantillon initialement en forme III, après 36 h de broyage. La plupart des particules ont une taille inférieure à 5 µm.

### ➤ Analyse des résultats

Nos résultats montrent que le broyage prolongé à 25°C de la forme III de la fanansérine provoque une **transition polymorphique III → I** à l'état solide. Le saut de  $C_p$ , faible mais net, observé après 15 minutes de broyage suggère que cette transformation n'est pas directe, mais passe par une étape d'amorphisation transitoire.

Dès les premières étapes du broyage on assiste à une modification de l'allure du pic de fusion final de l'échantillon : entre 15 min et 8 h de broyage, le pic est élargi et décalé vers les basses températures. Il présente un épaulement dont l'intensité diminue avec la durée du broyage. Le **tableau IV.1** regroupe les températures et enthalpies totales du pic de fusion final des échantillons :

Durée du broyage	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	Position de l'épaulement (°C)
0	101.2	64.2	-
15 min	101.5	59.7	95
30 min	101.4	53.6	94
1 h	101.9	50.1	94
8 h	101.8	54.4	92
16 h	101.7	63.7	-
36 h	101.3	65.8	-

Tableau IV.1 :

Températures onset du pic principal de fusion, enthalpie totale de fusion, et la position en température de l'épaulement observable pour des durées de broyage comprises entre 15 min et 8 h

La température onset du pic principal de fusion n'est pas modifiée par le broyage : elle est de l'ordre de 101.5°C, ce qui correspond bien à la température de fusion de la forme III. Par contre, entre 15 min et 8 h de broyage, le processus de fusion commence à plus basse température et son enthalpie diminue. Trois effets pourraient expliquer ce comportement :

- la réduction de la taille des particules au cours du broyage. Une fraction de l'échantillon présentant une granulométrie plus faible serait susceptible de fusionner avant le reste de l'échantillon
- la réduction de la taille des cristallites au cours du broyage. Le décalage de la fusion vers les basses températures serait alors une manifestation de l'effet Gibbs Thomson [5]. La taille moyenne des cristallites, estimée à partir des diagrammes de DX, passe de 100 nm pour l'échantillon non broyé, à 25 nm pour un broyage de 36 h. Le décalage en température observé entre le pic de fusion de l'échantillon non broyé et l'épaulement présent pour les courts temps de broyage n'excède pas. L'ordre de grandeur de ce décalage est compatible avec un effet de type Gibbs-Thomson, si l'on considère par exemple que pour le cyclohexane, un confinement dans des pores de 10 nm provoque une dépression de la température de fusion de plus de 19°C [6].
- la création d'un cristal défectueux. D'après la théorie de Fecht, l'augmentation du nombre de défauts dans le cristal accroît l'enthalpie libre de Gibbs du matériau, et fait diminuer la température de fusion [7].

Ces deux conséquences du broyage mécanique agissent certainement de manière simultanée.

L'enthalpie de fusion des échantillons broyés ne retrouve sa valeur attendue qu'au bout de 16 heures de broyage, c'est à dire quand la présence de phase I apparaît clairement sur les diagrammes de DX. Toutefois, les pics de Bragg de cette phase sont larges, ce qui indique certainement que la forme I issue du broyage est aussi affectée par la réduction de taille ou la présence de défauts. Ses températures et enthalpies de fusion sont résumées dans le **tableau IV.2** :

Durée du broyage	$T_f$ (°C) (phase I)	$\Delta H_f$ (J/g) (phase I)
16 h	71.9	7.4
36 h	78.1	11.8

*Tableau IV.2 :*

*Températures et enthalpies de fusion associées à la phase I formée par des broyages de 16 h et 36 h.*

L'augmentation de l'enthalpie de fusion de la forme I avec la durée du broyage montre que la proportion de I dans l'échantillon augmente. Toutefois, les valeurs de  $\Delta H_f$  restent nettement inférieures à celle d'un échantillon de forme I non broyé :  $\Delta H_f^I = 60.2 \text{ J/g}$  [2]. Un examen attentif des résultats d'ATD révèle que l'endotherme de fusion de I s'étend sur un domaine de températures très large, repérable à un changement de ligne de base dès  $60^\circ\text{C}$ . Si l'on admet, comme il l'a déjà été suggéré [2], que la cristallisation de la forme III au réchauffage commence pendant la fusion la phase I, on peut envisager que l'accident enthalpique observé dès  $60^\circ\text{C}$  signale à la fois la fusion de la phase I, et la conversion immédiate du liquide métastable en phase III.

## **A.2. Broyage de la forme IV**

La **figure IV.3** présente l'évolution des caractéristiques structurales et thermodynamiques de la fanansérine IV au cours d'un broyage à  $25^\circ\text{C}$ . Les diagrammes de diffraction des rayons X de la figure IV.3.a ont été enregistrés à température ambiante, sur capillaire tournant de diamètre 0.7 mm. Les thermogrammes de la figure IV.3.b correspondent au réchauffage à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , pour l'échantillon non broyé et après chaque étape de broyage.

**Pour un broyage d'une durée de 36 h**, le diagramme de DX présente des raies de Bragg caractéristiques de la phase cristalline I. Le broyage prolongé de la fanansérine IV induit donc une **transformation polymorphique IV  $\rightarrow$  I à l'état solide**. Le thermogramme correspondant laisse apparaître un endotherme à  $75^\circ\text{C}$ , attribué à la fusion de la phase I formée au cours du broyage. Le pic de fusion de la phase I est immédiatement suivi d'un exotherme associé à une cristallisation. Les diagrammes de DX reportés sur la **figure IV.4** démontrent que l'échantillon broyé 36 h (courbe 2), présente après un chauffage à  $93^\circ\text{C}$  des raies de Bragg caractéristiques du polymorphe III (courbe 3). Au réchauffage, l'échantillon cristallise donc vers la forme III, qui est la plus accessible d'un point de vue cinétique. Les caractéristiques du pic de fusion final (finesse et température) le rendent superposable à celui de l'échantillon de forme III non broyée, présenté sur la figure IV.1. La situation est donc finalement analogue à celle obtenue après un broyage prolongé de la forme III à la même température.

Un autre effet d'un broyage prolongé est la réduction de la taille des particules. Les observations réalisées au microscope optique ont montré que la granulométrie de la forme IV non broyée est hétérogène : les particules, de forme hexagonale [2], possèdent des tailles globalement comprises entre 50 et  $250 \mu\text{m}$ , les plus grandes pouvant dépasser  $500 \mu\text{m}$ . Après un broyage de 36 h, la granulométrie est beaucoup plus réduite : comme dans le cas de la forme III broyée,

l'échantillon est majoritairement composé de grains de taille inférieure à 5  $\mu\text{m}$ , qui tendent à s'agglomérer. On distingue aussi quelques particules de taille plus importante (20 – 30  $\mu\text{m}$ ).

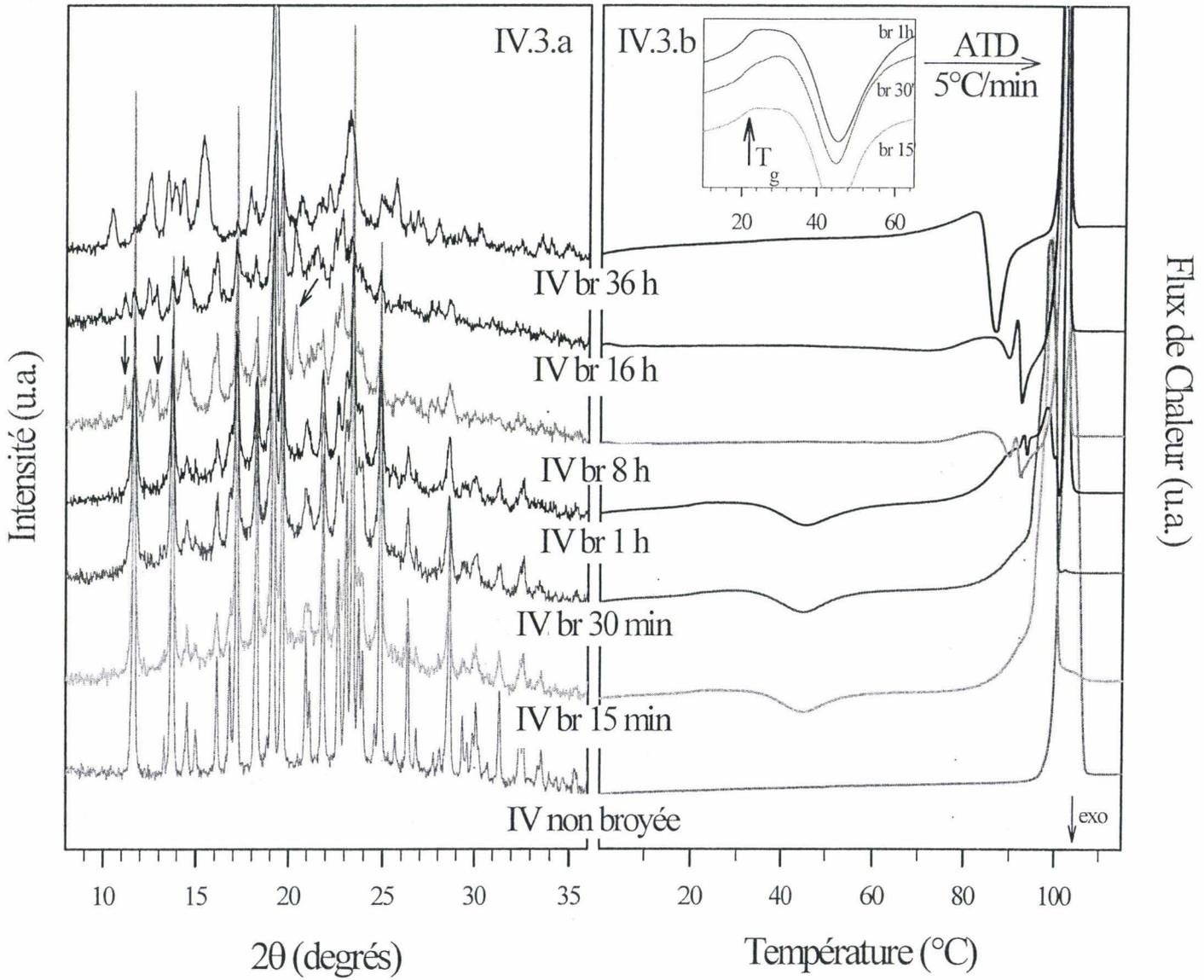


Figure IV.3 :

- a. évolution du diagramme de DX de la fanansérine IV au cours du broyage à 25°C (enregistrements à 25°C sur capillaires tournants, diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ )
- b. thermogrammes des échantillons de fanansérine IV broyés à 25°C, enregistrés au chauffage à 5°C/min

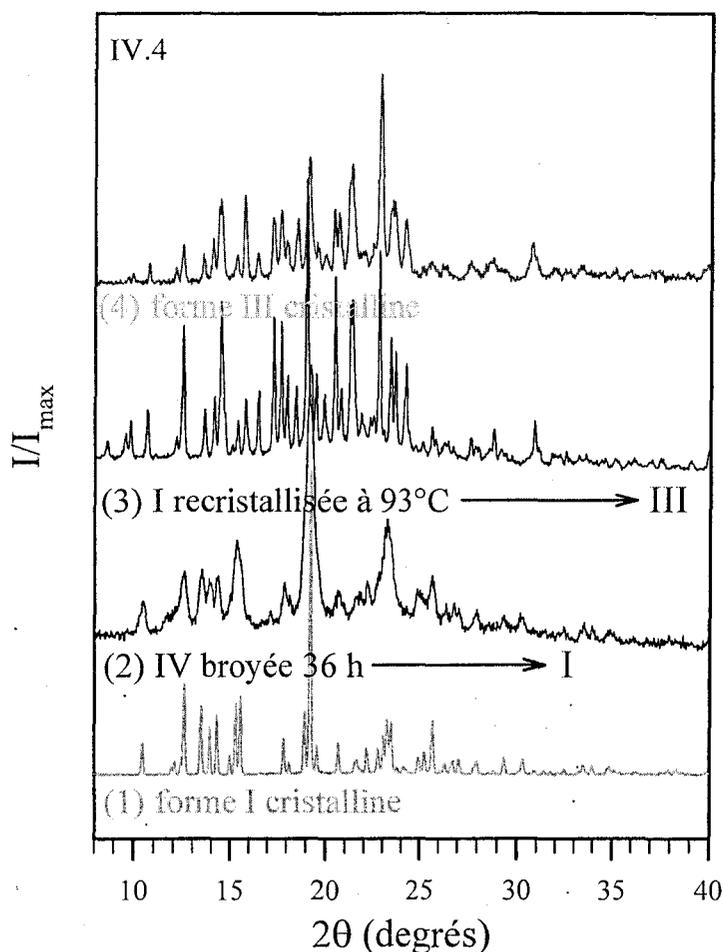


Figure IV.4 :

Diagrammes de diffraction des rayons X, enregistrés sur capillaires tournants : (1) de la forme cristalline I, (2) de la forme IV broyée 36 h à  $T_{amb}$ , (3) de la forme IV broyée 36 h et chauffée à 93°C, (4) de la forme cristalline III (diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ )

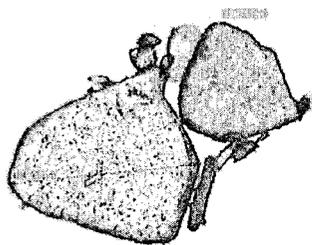


Photo IV.1 :

Observation par microscopie optique de la granulométrie d'un échantillon de forme IV non broyé, qui montre une dispersion assez forte de la taille des grains.



Photo IV.1 :

Observation par microscopie optique de la granulométrie d'un échantillon initialement en forme IV, après 36 h de broyage. La granulométrie moyenne de l'échantillon n'excède pas 5  $\mu\text{m}$ .

Pour des broyages de durée intermédiaire (8 h et 16 h), les diagrammes de DX de la figure IV.3.a révèlent un comportement plus complexe que celui observé lors du broyage de la forme III. En effet, après l'étape d'amorphisation partielle et d'élargissement général des profils de DX de la forme IV de départ, on voit apparaître des raies de Bragg nouvelles, dont les précurseurs sont visibles dès 1 h de broyage (par exemple, au travers du léger épaulement de petit angle sur la première raie de la forme IV située en  $2\theta = 11.5$ ). Ces raies, visibles particulièrement en  $2\theta = 11, 13$  et  $20.5$  degrés, sont fines dans un premier temps, puis s'élargissent et s'affaiblissent pour disparaître après 36 h de broyage. Elles sont caractéristiques de la forme III, qui apparaît être un intermédiaire transitoire de l'évolution de la forme IV sous broyage.

Nous n'avons pas assez d'étapes intermédiaires (en particulier entre 1 h et 8 h, et entre 16 h et 36 h) pour caractériser finement les interconversions qui surviennent pendant le broyage. Il est notamment difficile de déceler l'apparition finale de la forme I, qui se fait aux dépens de la forme III transitoire.

A la suite de ces étapes intermédiaires de broyage, aucun signe de transition vitreuse n'est décelable sur les thermogrammes. Par contre, des perturbations sont visibles dans la zone de température qui précède la fusion. Entre  $80^{\circ}\text{C}$  et  $100^{\circ}\text{C}$ , on assiste à une succession complexe d'accidents endothermiques et exothermiques mêlés, qui se simplifie quand la phase I devient clairement identifiable, au bout de 36 h de broyage. A partir de 1 h de broyage, les thermogrammes ont une apparence globale nettement différente de ceux obtenus aux premiers temps de broyage ; ils sont caractérisés par un endotherme de fusion finale plus fin que celui de la forme IV initiale.

### ➤ Analyse des résultats

Pour la forme IV, les étapes intermédiaires de transformation au cours du broyage sont plus complexes que pour la forme III : en plus de l'amorphisation transitoire détectée aux courts temps de broyage, les diagrammes de DX montrent clairement la présence de forme III intermédiaire. La **figure IV.5** présente un agrandissement de la zone de fusion des échantillons broyés 30 min, 8 h et 36 h. Le pic de fusion de la forme IV non broyée est donné à titre comparatif.

La fusion de la forme IV non broyée se matérialise par un large endotherme qui s'étend sur plus de  $10^{\circ}\text{C}$  ; elle est donc beaucoup plus étalée que la fusion de la forme III, qui ne s'étend que sur  $5^{\circ}\text{C}$ . Le diagramme (p,T) établi par J. Giovannini (chapitre III et [3]) montre qu'aux environs de  $100^{\circ}\text{C}$ , à pression atmosphérique, les domaines de stabilité des phases II, III et IV de la fanansérine sont très proches en température : dans une gamme de température très restreinte ( $3^{\circ}\text{C}$ ), la forme la plus stable est successivement la forme IV, la forme III, puis la forme II dans l'ordre des températures croissantes. En outre, le réchauffage extrêmement lent ( $0.01^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) de la forme IV non broyée met en évidence trois étapes successives [8]:

- la fusion de IV et sa cristallisation vers III
- la fusion de III et sa cristallisation vers II
- la fusion finale de II vers la forme liquide

Ces évènements ne sont pas discernables individuellement avec la vitesse de 5°C/min utilisée pour l'enregistrement des thermogrammes présentés ici. Ils sont inclus dans l'enveloppe du pic de fusion, ce qui explique sa largeur inhabituelle. La fusion de la forme IV de la fanansérine est donc intrinsèquement complexe.

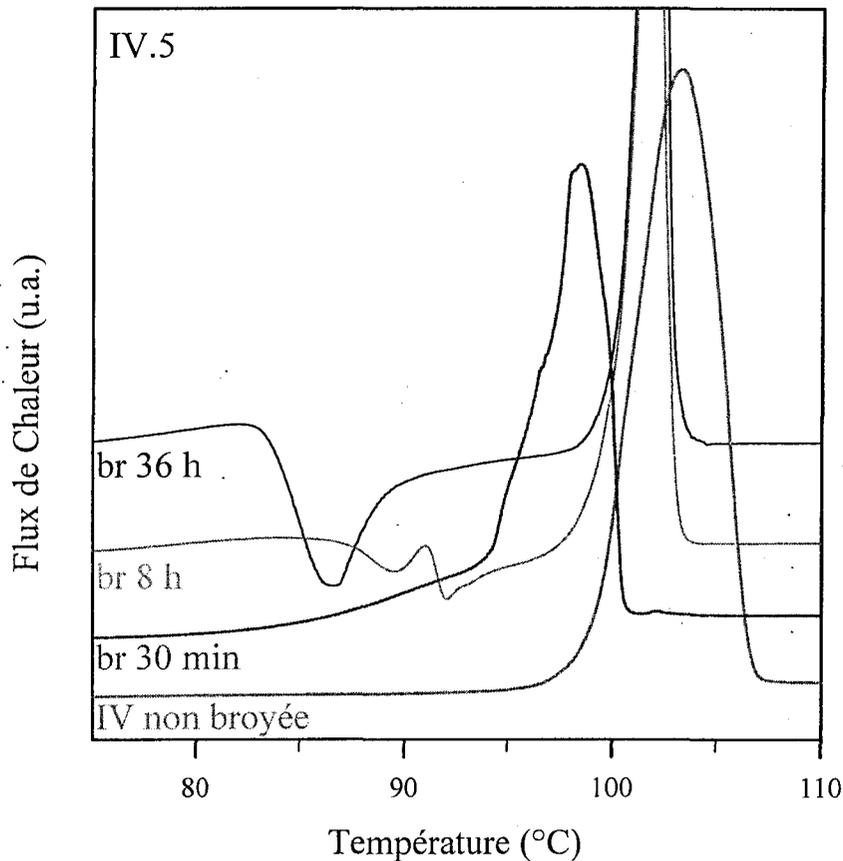


Figure IV.5 :

Zone de fusion d'échantillons de fanansérine IV non broyée, broyée 30 min, broyée 8 h et broyée 36 h, de bas en haut. Cet agrandissement de la figure IV.3 met en évidence la modification de l'allure du pic de fusion pour les broyages courts, et la complexité des évènements calorimétriques qui se succèdent dans l'intervalle 75 – 105°C.

Le broyage mécanique révèle cette complexité sous-jacente. Les enthalpies du pic de fusion final des échantillons de forme IV broyée sont regroupées dans le **tableau IV.3**.

Pour des broyages de durées inférieures à 1 h, les températures onset de fusion suggèrent que le dernier endotherme correspond bien à la fusion de IV. Comme pour la forme III, la diminution de l'enthalpie de fusion  $\Delta H_f^{IV}$  aux premiers temps de broyage peut être interprétée comme une manifestation de l'effet Gibbs-Thomson [5,6], et comme étant associée à la formation

de défauts, qui accroît l'entropie du cristal et entraîne une diminution de son enthalpie de fusion [7].

Durée du broyage	$T_f^{IV}$ (°C)	$\Delta H_f^{IV}$ (J/g)	$T_f^{III}$ (°C)	$\Delta H_f^{III}$ (J/g)
0	99.15	85.9	-	-
15 min	96.56	67.4	-	-
30 min	96.3	54.3	-	-
1 h	-	-	101.5	56.0
8 h	-	-	101.2	60.4
16 h	-	-	100.9	62.8
36 h	-	-	101.2	63.5

*Tableau IV.3.:*

*Enthalpie de fusion de la fanansérine IV en fonction de la durée du broyage à 25°C*

A partir d'une heure de broyage, la situation devient plus complexe. Les diagrammes de DX de la figure IV.3.b montrent que trois phases coexistent dans l'échantillon broyé: la phase IV résiduelle, et les phases I et III formées pendant le broyage. La diversité des phases en présence est certainement un élément permettant d'expliquer les accidents enthalpiques qui se succèdent à partir de 75°C. Toutefois, il apparaît très clairement que le dernier endotherme correspond à la fusion de la forme III: sa température onset est de 101°C, et son enthalpie proche de 60 J/g, ce qui est compatible avec les valeurs de  $T_f^{III} = 101.2^\circ\text{C}$  et  $\Delta H_f^{III} = 64.2$  J/g relevées pour la forme III non broyée.

La transformation  $IV \rightarrow I$  passe donc par des étapes transitoires successives d'amorphisation et de cristallisation de la forme III. Cette complexité apparaît de manière cohérente sur les diagrammes de DX et sur les thermogrammes. Les phases (amorphe et III) qui apparaissent pendant les étapes intermédiaires de broyage possèdent une durée de vie limitée, et la phase finale atteinte semble être la forme I.

### **A.3. Synthèse des transformations induites par broyage à 25°C**

Les broyages réalisés au-dessus de  $T_g$  conduisent aux principaux résultats suivants :

- quelle que soit la phase de départ (III ou IV), on observe après un temps de broyage très long (36 h) une **transformation polymorphique** vers la phase I, qui est la forme la plus métastable de la fanansérine
- quelle que soit la phase de départ, on observe une étape initiale de transformation directe **crystal** → **amorphe**. Cette étape intervient dans les premiers temps du broyage, et dure plus longtemps dans le cas du broyage de la forme la plus stable (IV)
- dans ces premiers temps de broyage, on observe une dépression de la température de fusion de la phase initiale, accompagnée d'un étalement du pic endothermique correspondant
- aux temps intermédiaires du broyage, on observe une différence de comportement entre les phases III et IV : la complexité des transformations est plus grande lors du broyage de la phase la plus stable (IV), puisqu'on observe l'apparition de la phase transitoire métastable III. Cette complexité est également visible lors du réchauffage des échantillons, dans la mesure où de nombreux accidents enthalpiques entremêlés se succèdent juste avant la fusion finale de l'échantillon.

## **B. EFFETS D'UN BROYAGE MECANIQUE EN DESSOUS DE $T_g$**

Nous avons suivi les effets du broyage des formes III et IV de la fanansérine à 0°C, soit 20°C en dessous de  $T_g$ . Les autres paramètres du broyage restent identiques à ceux utilisés pour les broyages à 25°C (cf. section A).

### **B.1. Broyage de la forme III**

#### ➤ **Résultats expérimentaux**

La **figure IV.6.a** montre l'évolution des diagrammes de DX, enregistrés sur plaquette, d'un échantillon de forme III au cours d'un broyage à 0°C. Les thermogrammes correspondants, enregistrés au chauffage à 5°C/min, sont rassemblés sur la figure IV.6.b.

**Des broyages courts (5 min, 15 min, 30 min, 1 h)** modifient nettement les caractéristiques structurales et thermodynamiques des échantillons. Les diagrammes de DX présentent des raies de Bragg qui s'élargissent et diminuent d'intensité au cours du broyage, comparativement à celles de la forme III non broyée. Les thermogrammes enregistrés à l'issue du broyage montrent clairement le développement progressif d'un saut de  $C_p$  à 19°C, suivi à plus haute température [30°C – 40°C] d'un exotherme de recristallisation. Cet exotherme est un signe indirect de l'amorphisation qui s'est opérée au cours du broyage, et le saut de  $C_p$  indique que l'amorphe obtenu possède un caractère vitreux. Ces éléments prouvent que le broyage de la fanansérine sous  $T_g$  induit une **transformation cristal → verre à l'état solide**.

**Pour des broyages très longs (16 et 36 h)**, les diagrammes de DX de la figure IV.6.a présentent toujours des pics de Bragg élargis et un halo de diffusion important comparativement à ceux de la phase cristalline de départ. Cependant, la comparaison des diagrammes de DX des échantillons broyés 1 et 36 h indique que la fraction cristalline dans l'échantillon est plus importante après 36 h de broyage qu'après 1 h de broyage. En outre, la figure IV.6.b montre clairement que l'enthalpie de cristallisation mesurée au chauffage diminue entre 1 et 36 heures de broyage, et que l'amplitude du saut de  $C_p$  à  $T_g$  est moins grande après 36 h qu'après 1 h de broyage.

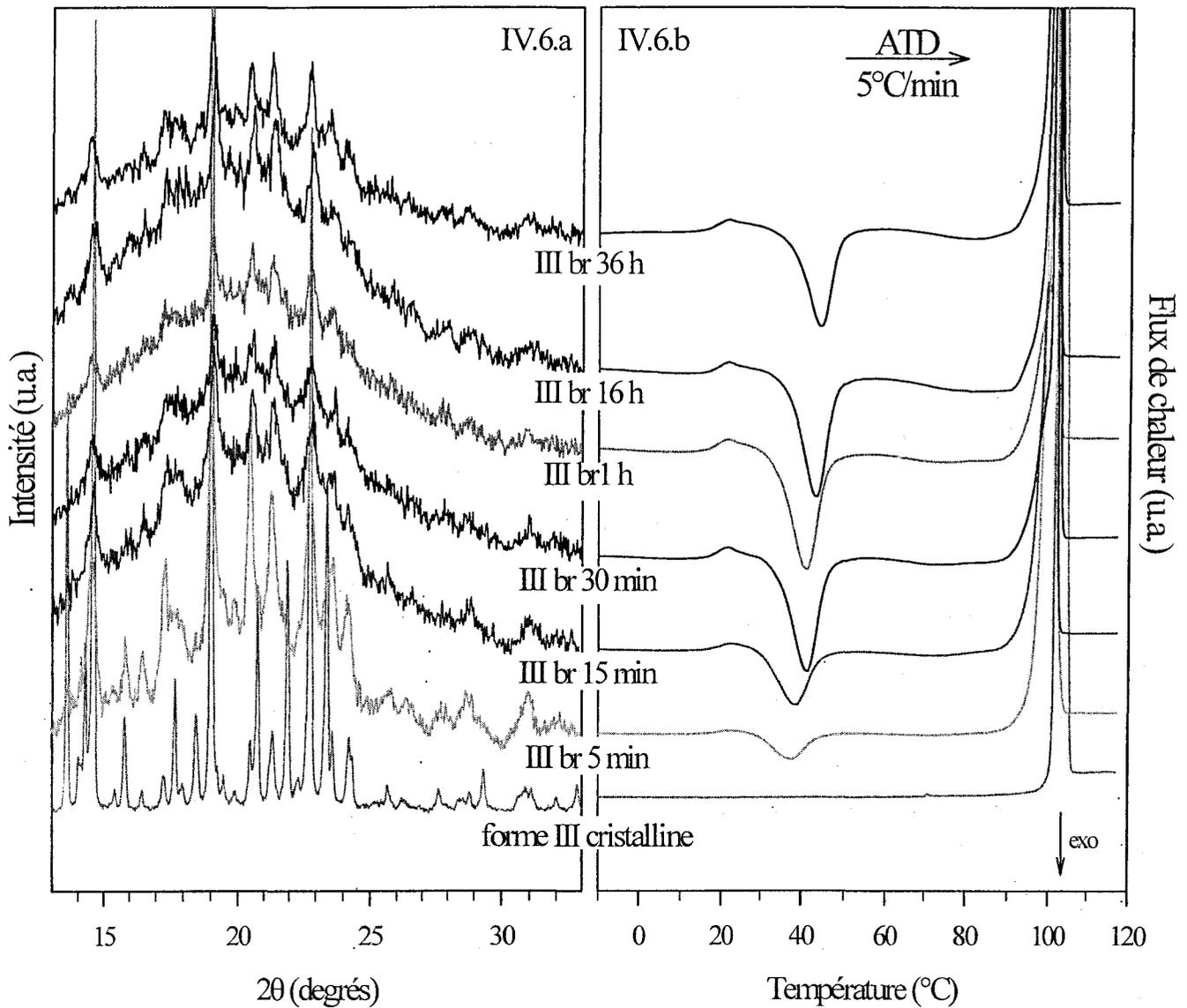


Figure IV.6 :

- évolution du diagramme de DX de la fanansérine III au cours du broyage à 0°C (enregistrements sur plaquette, diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ )
- thermogrammes des échantillons broyés, enregistrés au chauffage à 5°C/min

Au bout de 36 h de broyage, cette transformation n'est que partielle puisqu'on observe des pics de Bragg résiduels. L'enregistrement du diagramme de DX d'un échantillon de forme III broyé 36 h, puis chauffé à 80°C prouve que la recristallisation observée sur la figure IV.6.b s'effectue vers la forme III, c'est-à-dire vers la phase de départ, comme l'indiquent les diagrammes de DX de la **figure IV.7**. Cette transformation est certainement facilitée et orientée par la présence dans l'échantillon de germes de la forme III ayant échappé au broyage.

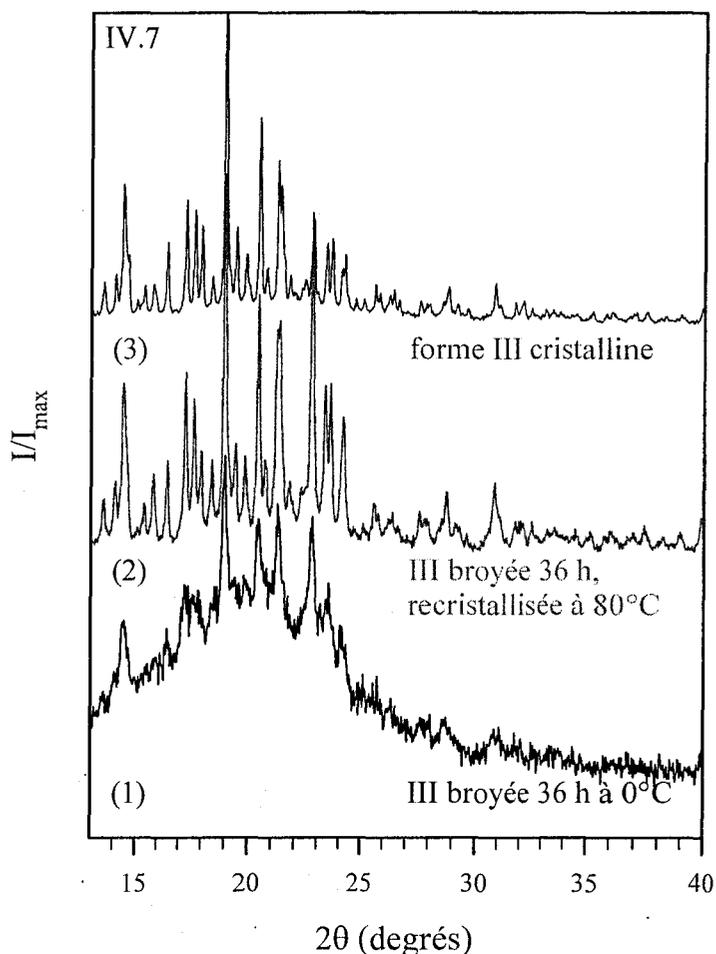


Figure IV.7 :

Diagrammes de diffraction des rayons X enregistrés sur plaquette, à  $T_{amb}$ , sur le diffractomètre Inel : (1) de la forme cristalline III partiellement amorphisée par un broyage de 36 h à 0°C, (2) de la forme III broyée 36 h et chauffée à 80°C, (3) forme cristalline III, enregistrement de référence [2]

Ces résultats seront analysés au paragraphe B.3, en même temps que ceux obtenus pour le broyage de la forme IV.

## B.2. Broyage de la forme IV

### ➤ Résultats expérimentaux

La figure IV.8 présente les diagramme de DX, enregistrés à température ambiante, d'échantillons de forme IV broyés à 0°C (figure IV.8.a), et les thermogrammes correspondants, enregistrés à 5°C/min (figure IV.8.b).

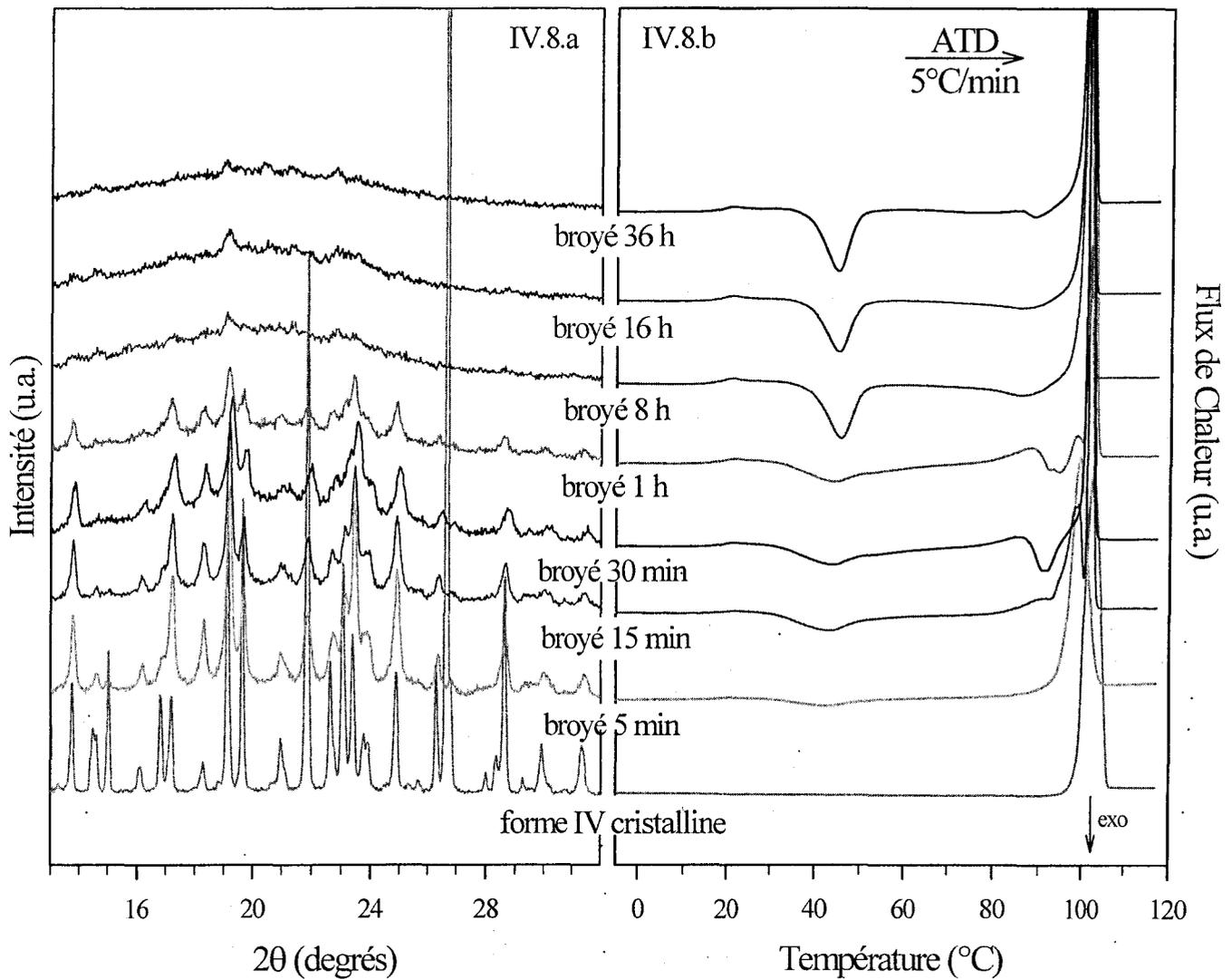


Figure IV.8 :

- a. évolution du diagramme de DX de la fanansérine IV au cours du broyage à 0°C (enregistrements sur plaquette, diffractomètre Inel,  $\lambda(\text{Cu}, K_{\alpha}) = 1.541 \text{ \AA}$ )
- b. thermogrammes des échantillons broyés, enregistrés au chauffage à 5°C/min

**Pour des durées de broyage variant de 5 min à 1 h**, les diagrammes de DX montrent un élargissement des raies de Bragg de la fanansérine IV, accompagné d'une perte d'intensité et du développement progressif d'un halo de diffusion. Les courbes d'ATD correspondantes montrent que les échantillons broyés présentent au réchauffage une transition vitreuse à 19°C, qui témoigne du caractère vitreux de l'amorphe formé par broyage. La forme IV subit donc au cours d'un broyage à 0°C une **transformation partielle cristal → verre à l'état solide**. La transition vitreuse est immédiatement suivie d'un exotherme de recristallisation à 35°C. L'enregistrement du diagramme de DX de la phase recristallisée, présenté sur la **figure IV.9**, permet d'établir que l'amorphe formé par broyage transite au chauffage vers la forme III. Le système ne retourne donc

pas vers la phase IV initiale, la plus stable dans ce domaine de température [2], mais évolue vers la forme III, plus facile à atteindre thermodynamiquement.

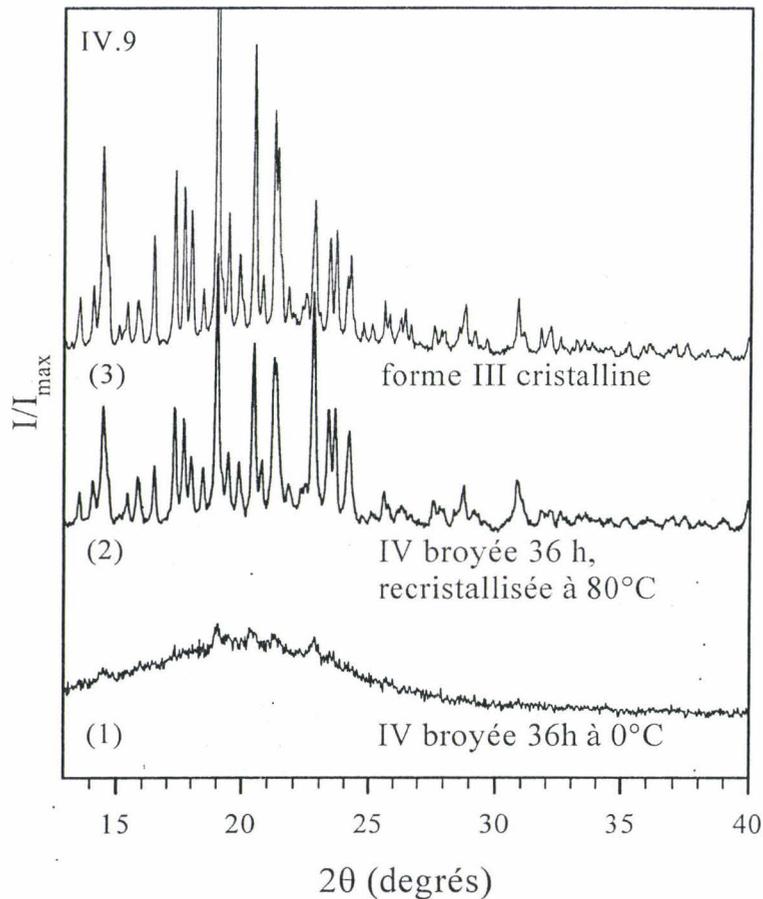


Figure IV.9 :

Diagrammes de diffraction des rayons X, enregistrés sur plaquette à 25°C sur le diffractomètre Inel ( $\lambda(\text{Cu}, K\alpha) = 1.541 \text{ \AA}$ ) : (1) de la forme IV amorphisée par un broyage de 36 h à 0°C, (2) de la forme IV broyée 36 h et chauffée à 80°C, (3) forme cristalline III de référence [2]

Comme à 25°C, le pic de fusion final observé aux premiers temps de broyage est déprimé en température et élargi. Son enthalpie est inférieure à celle du pic de fusion de l'échantillon non broyé. Il faut également signaler la présence, sur les thermogrammes de la figure IV.8.b, d'accidents enthalpiques entremêlés qui interviennent entre 80°C et 100°C. Cela est particulièrement repérable pour les échantillons broyés 30 min et 1 h. Le pic endothermique large, situé vers 80°C, rappelle l'endotherme caractéristique de la fusion de la forme I obtenue par broyage à 25°C. Il est donc possible que les étapes intermédiaires de broyage génèrent l'apparition de phases polymorphiques, qui disparaissent au profit de l'amorphe pour un broyage prolongé.

Pour des durées de broyage variant de 8 à 36 h, les diagrammes DX ne montrent pratiquement plus de raies de Bragg et présentent l'aspect d'un halo de diffusion caractéristique

d'un état amorphe. Par ailleurs, on remarque sur les thermogrammes de la figure IV.8.b que l'enthalpie de recristallisation augmente quand la durée du broyage s'allonge, ce qui suggère que la fraction amorphisée est d'autant plus grande que le broyage est long.

### **B.3. Analyse des résultats**

#### ➤ **Calcul de la fraction amorphisée**

La proportion de l'échantillon amorphisée par le broyage a été évaluée en comparant l'amplitude du saut de chaleur spécifique des échantillons broyés à celle d'un échantillon de fanansérine vitrifiée par sous refroidissement de la phase liquide, et donc totalement amorphe.

#### ▪ **Cas de la forme III**

Les valeurs de la fraction amorphisée lors du broyage de la forme III sont reportées dans le tableau IV.4.

<b>Durée du broyage</b>	<b>Fraction amorphisée (%)</b>
0	0
5 min	23.7
15 min	47.4
30 min	58.1
1 h	69.2
16 h	61.2
36 h	58.5

*Tableau IV.4 :*

*Evolution de la fraction amorphisée lors du broyage à 0°C de la forme III*

Après 5 min de broyage, près du quart de l'échantillon est déjà amorphisé, ce qui indique que le mécanisme d'amorphisation est très efficace. Pour des durées de broyage inférieures à 1 h, la fraction amorphisée augmente avec le temps de broyage ; elle passe par un maximum de 69.2 % après 1 h de broyage. Pour des broyages plus longs, on assiste à une nette diminution de la fraction amorphisée ; elle n'est plus que de 58.5 % après 36 h de broyage. Au vu des données expérimentales dont nous disposons, il ne semble pas possible d'arriver à l'amorphisation totale de la forme III par broyage à 0°C. Ces résultats suggèrent que la création d'amorphe due au broyage soit en compétition avec la recristallisation de l'échantillon vers sa phase initiale.

Cette évolution confirme la tendance donnée par les diagrammes de DX de la figure IV.6.a. La diminution de l'enthalpie de cristallisation qui accompagne la diminution de l'amplitude du saut de  $C_p$  est donc réellement due à une baisse de la fraction amorphisée par broyage, et non à la non recristallisation d'une partie de l'amorphe.

▪ Cas de la forme IV

Les valeurs de la fraction amorphisée lors du broyage de la forme IV sont reportées dans le **tableau IV.5**. La fraction amorphisée ne semble pas passer par un maximum, comme c'était le cas pour le broyage de la forme III. Elle augmente continûment avec la durée de broyage, pour atteindre 70.1 % au bout de 36 h.

Durée du broyage	Fraction amorphisée (%)
0	0
5 min	21.6
15 min	32.1
30 min	54.1
1 h	61.3
16 h	69.0
36 h	70.1

*Tableau IV.5 :*

*Evolution de la fraction amorphisée lors du broyage à 0°C de la forme IV*

Cette évolution est cohérente avec celle des diagrammes de DX de la figure IV.8.a, qui montrent une diminution progressive de l'intensité des pics de Bragg au cours du broyage.

➤ Recristallisation au chauffage des amorphes formés par broyage

Contrairement au liquide trempé, les amorphes obtenus par broyage recristallisent au chauffage après la transition vitreuse. Cette recristallisation se fait toujours vers la forme III (figures IV.7 et IV.9) qui, d'après le diagramme de stabilité de la fanansérine (figure III.3, chapitre III), n'est pas la plus stable à cette température. Néanmoins, la cristallisation au chauffage d'un polymorphe métastable est souvent observée : d'après la « Règle des phases » énoncée par Ostwald en 1897, le premier état rejoint par un composé n'est pas le plus stable, c'est-à-dire le plus favorable d'un point de vue énergétique, mais l'état métastable dont l'énergie est la plus proche de l'état initial.

Dans le cas de l'amorphe issu du broyage de la forme III, la recristallisation au chauffage vers cette même phase est très certainement facilitée par la présence de germes résiduels ayant échappé au broyage. Dans le cas de l'amorphe issu du broyage de IV, on ne peut expliquer la recristallisation par la présence de germes non altérés par le broyage, puisque la recristallisation n'a pas lieu vers la phase IV, mais vers la phase III plus accessible thermodynamiquement. Le verre de liquide chauffé dans les mêmes conditions ne montre aucun signe de recristallisation. On peut alors émettre l'hypothèse d'ordres locaux différents dans les amorphes obtenus par broyage mécanique et par trempe thermique. En effet, il est raisonnable de penser que l'ordre dans l'amorphe obtenu par le broyage d'une phase cristalline ordonnée, soit plus développé que dans l'amorphe issu de la trempe d'une phase liquide, complètement désordonnée. Toutefois, cette hypothèse doit être nuancée dans la mesure où l'amorphisation de la fanansérine par broyage n'est pas totale ; la comparaison avec le verre de liquide (totalement amorphe) n'est donc pas immédiate.

#### **B.4. Synthèse des transformations induites par broyage à 0°C**

Les broyages réalisés en dessous de  $T_g$  conduisent aux principaux résultats suivants :

- Quelle que soit la phase de départ (III ou IV), on observe sous broyage une amorphisation de la fanansérine, sans apparition d'une autre forme cristalline. L'ensemble des opérations de broyage ayant lieu à une température inférieure à 19°C, il s'agit réellement d'une **vitrification à l'état solide**
- Après 36 heures de broyage, cette vitrification est beaucoup plus achevée dans le cas de la phase la plus stable (IV) : la proportion d'amorphe est dans ce cas de 70.1 %, contre 58.5 % après le même broyage de la forme III
- Dans les premiers temps du broyage, on observe (comme lors du broyage à 25°C) une étape de détérioration du cristal, qui se manifeste par une fusion à plus basse température et moins énergétique
- Aux temps intermédiaires de broyage, les thermogrammes de la forme IV montrent ici encore des complexités qui laissent présager des effets de compétition de phases précédemment discutés (cf. § A.3)
- Toutes les phases amorphes obtenues par broyage recristallisent au réchauffage vers la forme III.



## **C. STABILITE DES ETATS ATTEINTS PAR BROYAGE**

En pharmacie, la biodisponibilité d'un principe actif, et de manière générale ses propriétés thérapeutiques, sont liées à son état physique. Dans de nombreux cas, la forme présentant la meilleure disponibilité n'est pas la forme cristalline la plus stable (voir chapitre II). Il peut s'agir d'un polymorphe métastable, ou de l'état amorphe. La stabilité des états générés par perturbation mécanique est donc un élément essentiel à maîtriser, à la fois d'un point de vue pratique et d'un point de vue fondamental :

- d'un point de vue pratique, il est indispensable de connaître les conditions de recristallisation des états métastables atteints par broyage, puisque le retour à un état plus stable peut modifier fondamentalement les propriétés thérapeutiques d'une substance active
- d'un point de vue fondamental, si la théorie de Martin - Bellon [4] s'applique aux effets du broyage des matériaux moléculaires, les états finals atteints devraient être des états *stationnaires*, c'est à dire des états stabilisés pendant l'application de la perturbation dynamique. Quand l'application de cette perturbation cesse, on peut s'attendre à une relaxation vers un état *d'équilibre* différent. Il convient donc de caractériser cet état d'équilibre finalement atteint, ainsi que la durée de vie éventuelle de l'état stationnaire dynamique.

Dans le cas de la fanansérine, nous avons étudié la stabilité de la forme I et de l'amorphe obtenus respectivement par des opérations de broyage réalisées à 25 et 0°C.

### **C.1. Stabilité de la phase I issue du broyage à 25°C**

La **figure IV.10.a** présente les diagrammes de DX d'un échantillon de forme III broyé 40 h, et donc transformé en phase I, immédiatement après le broyage, et après 3 mois de stockage à 25°C. Le diagramme de DX après le vieillissement est toujours caractéristique de la forme I ; les pics de Bragg sont mieux résolus qu'immédiatement après le broyage. La forme I issue du broyage de la forme III est donc stable dans les conditions ambiantes, sur l'échelle de temps du vieillissement.

La **figure IV.10.b** montre le résultat d'un vieillissement de la forme I issue cette fois du broyage de la forme IV. Après 3 mois à 25°C, le diagramme présente toujours certaines raies de Bragg du polymorphe I, mais aussi des pics caractéristiques de la phase IV de départ. L'échantillon broyé a donc recristallisé partiellement vers la phase IV au cours du vieillissement à 25°C. Il retourne donc progressivement vers sa forme initiale, qui est aussi la plus stable à cette température d'après le diagramme (p,T) [2].

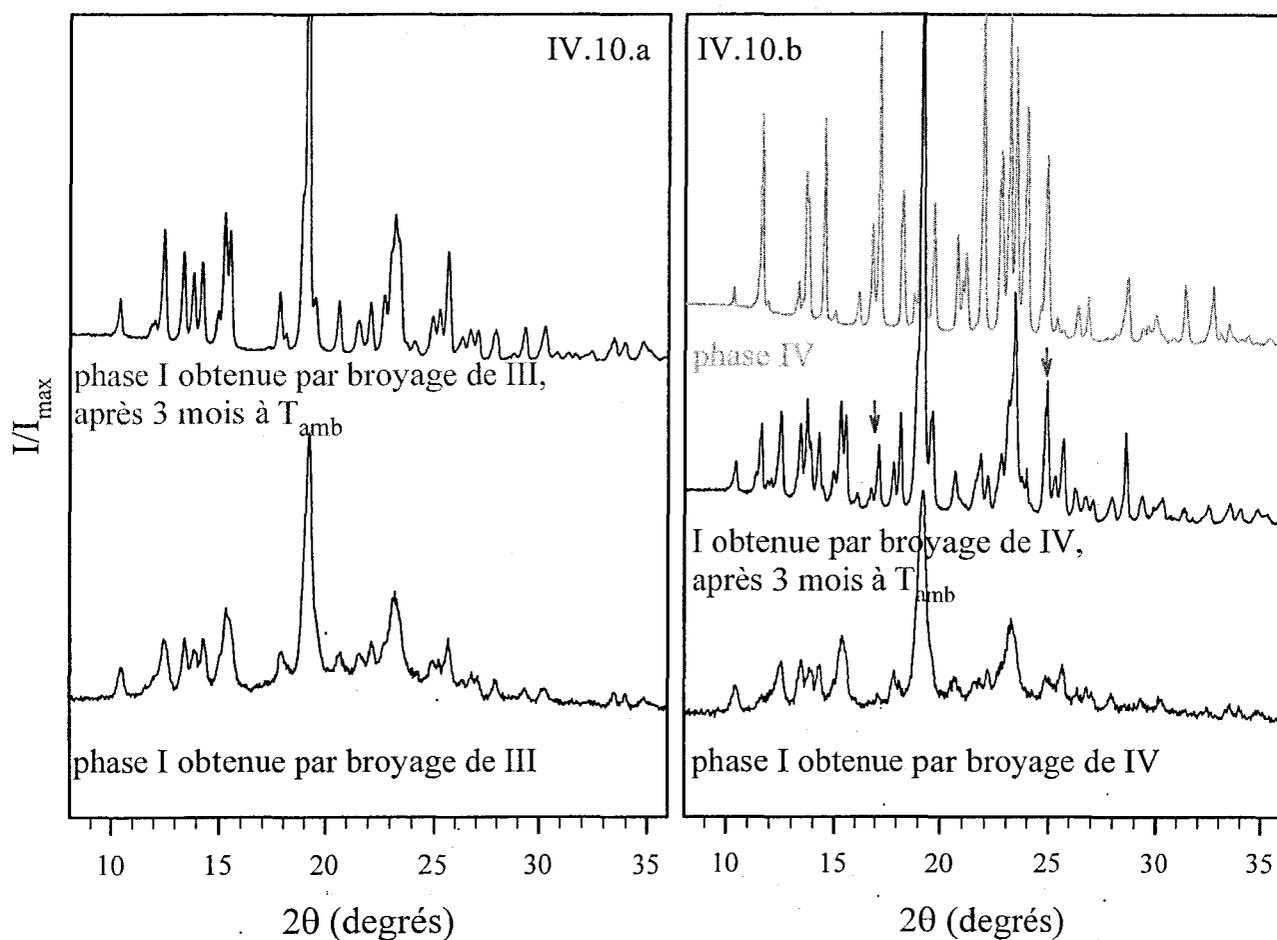


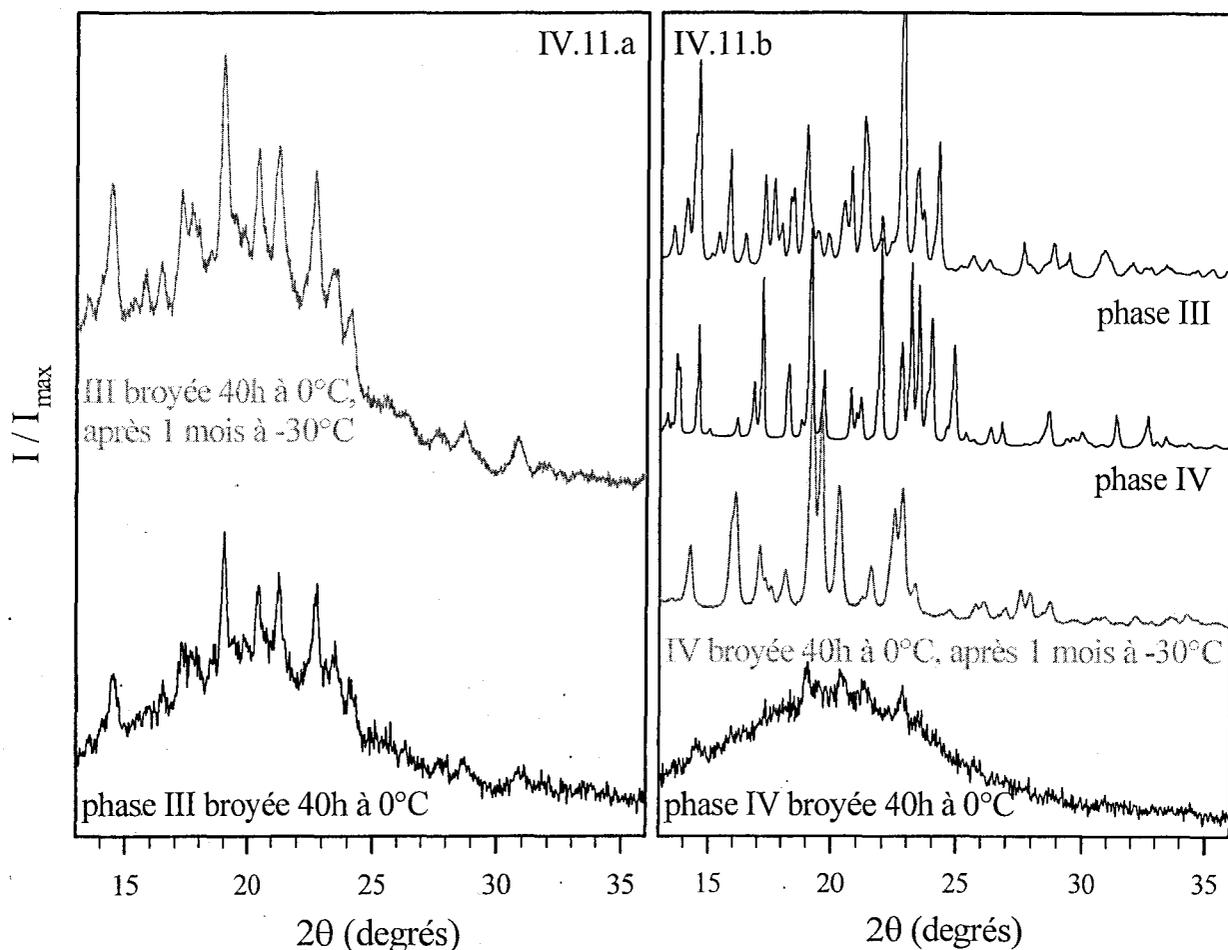
Figure IV.10 :

- a. Evolution structurale de la forme I formée par broyage de III, enregistrée à 25°C sur le diffractomètre Inel. Après 3 mois de vieillissement à  $T_{amb}$ , l'échantillon se trouve toujours en phase I
- b. Evolution structurale de la forme I issue du broyage de IV à 25°C, enregistrée sur le diffractomètre Inel. Après 3 mois de vieillissement à  $T_{amb}$ , le diagramme de DX présente des raies de Bragg caractéristiques de la forme IV

L'analyse des profils de raies des échantillons de forme I issus des phases III et IV montrent que dans les deux cas, la taille des cristallites est de l'ordre de 25 nm. La qualité du broyage est donc comparable. Sur des durées importantes, le polymorphe I généré par le broyage de IV apparaît donc moins stable que celui généré (dans les mêmes conditions) par le broyage de III, puisqu'il recrystallise vers la phase IV de départ. Cette transformation est certainement initiée par la présence dans l'échantillon de germes de la forme IV ayant échappé au broyage.

## C.2. Stabilité de l'amorphe issu du broyage à 0°C

La figure IV.11.a montre les diagrammes de DX d'un échantillon de forme III partiellement amorphisé, immédiatement après le broyage, et après un mois de vieillissement à  $-30^{\circ}\text{C}$ , c'est à dire  $50^{\circ}\text{C}$  en dessous de  $T_g$ .



*Figure IV.11 :*

- Evolution structurale de l'amorphe formé par broyage de III à 0°C. Après 3 mois à -30°C, les pics résiduels caractéristiques de la forme III se sont développés ; ils témoignent d'une cristallisation progressive vers le polymorphe de départ (enregistrement sur plaquette à 25°C, diffractomètre Inel)*
- Evolution structurale de l'amorphe formé par broyage de IV à 0°C. Après 3 mois à -30°C, le diagramme de l'échantillon broyé et vieilli présente des pics de Bragg caractéristiques des formes III et IV.*

Immédiatement après le broyage à 0°C, le diagramme de DX présente clairement un halo diffus attribuable à une phase amorphe, mais aussi des raies de Bragg qui prouvent que l'amorphisation n'est pas totale. Après un mois de vieillissement à -30°C, ces pics se sont développés, au détriment du halo de diffusion caractéristique de l'amorphe. Ceci indique une recristallisation partielle vers la phase III initiale. Néanmoins, la persistance du halo de diffusion signale que la fraction amorphe de l'échantillon demeure importante.

La **figure IV.11.b** permet de confronter les diagrammes de DX d'un échantillon de phase IV amorphisée, immédiatement après le broyage et après un mois de vieillissement à -30°C, et des polymorphes cristallins III et IV. Le diagramme de DX, après un mois de stockage, ne présente plus de halo de diffusion. Il présente au contraire des raies de Bragg de la forme cristalline initiale, la

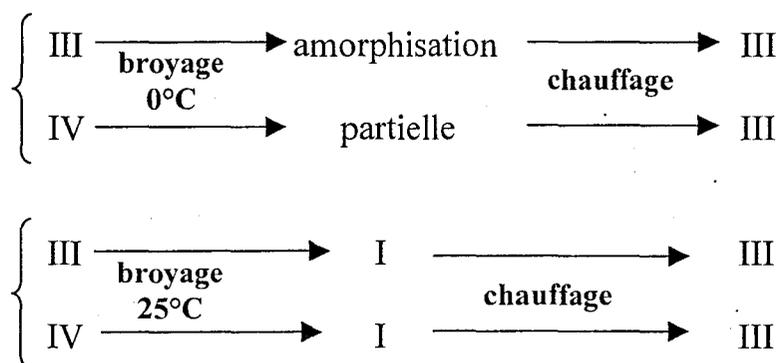
forme IV, mais aussi certains pics de la forme III apparus lors du vieillissement à  $-30^{\circ}\text{C}$ . L'échantillon a donc totalement recristallisé, bien qu'il ait été maintenu  $50^{\circ}\text{C}$  en dessous de  $T_g$ . Cette fois encore, la recristallisation ne se fait pas vers la forme la plus stable (IV), mais vers la forme la plus accessible d'un point de vue cinétique.

De manière générale, on remarque que contrairement au verre de liquide (cf. chapitre III), les amorphes issus du broyage tendent à recristalliser, même lorsqu'ils sont conservés  $50^{\circ}\text{C}$  sous leur température de transition vitreuse. Cette recristallisation est probablement due à la présence, dans les échantillons broyés, de germes cristallins ayant échappé au broyage, ou s'étant formés pendant le broyage. Pourtant, dans ce domaine de température, les temps de relaxation structurale attendus sont considérables, et ne permettent pas d'envisager des phénomènes de croissance cristalline aussi rapides. Le verre de liquide, au contraire, ne montre aucun signe de recristallisation lorsqu'il est soumis au même vieillissement. La recristallisation des amorphes issus du broyage serait donc le signe indirect d'une plus grande mobilité moléculaire que celle du verre de liquide. En conséquence, on peut présumer qu'un stockage de ces amorphes obtenus par broyage à température ambiante faciliterait leur recristallisation vers les polymorphes III et IV.

## D. DISCUSSION

### D.1. Influence du paramètre « température » sur les transformations induites par broyage

Les résultats exposés ci-dessus illustrent la richesse de comportements de la fanansérine lors du broyage mécanique. Nous avons pris soin d'appliquer pour toutes les opérations de broyage le même protocole expérimental, le seul paramètre variable de l'étude étant la température de broyage. On peut résumer les transformations possibles de la façon suivante :



Les deux polymorphes utilisés dans cette étude présentent donc des comportements similaires au broyage. Les broyages réalisés sous  $T_g$  permettent de générer et de stabiliser, sur l'échelle de temps de l'expérience, un amorphe vitreux. Par contre, les broyages réalisés au-dessus de  $T_g$  donnent lieu à des transformations polymorphiques produisant la forme I, intrinsèquement métastable. Par conséquent, le paramètre déterminant pour la nature du produit formé au cours du broyage est la **température** à laquelle celui-ci s'effectue. D'autre part, on constate qu'indépendamment de la phase cristalline initiale et de la température de broyage, la fanansérine broyée recristallise toujours, au réchauffage, vers la forme III (avec les conditions expérimentales que nous utilisons). L'amorphe formé par broyage recristallise à environ  $35^{\circ}\text{C}$ , juste après la transition vitreuse. Le liquide issu de la fusion de I cristallise aussi vers III, mais dans une gamme de températures plus élevée ( $90^{\circ}\text{C}$ ). Dans tous les cas, la phase obtenue à « haute température » est donc la phase III.

## D.2. Possibilité d'application des modèles de broyage existants au cas de la fanansérine

Le chapitre II propose un bref récapitulatif des modèles établis dans le but de rationaliser les effets du broyage mécanique. Nous confrontons ici les résultats expérimentaux obtenus sur la fanansérine, à deux hypothèses distinctes :

- celle du cristal défectif
- celle des transitions de phases dynamiques

### ➤ Hypothèse du cristal défectif

Comme il l'a été rappelé au chapitre II, cette approche postule que le broyage mécanique introduise dans le cristal initial des défauts dont la concentration augmente avec le temps de broyage. Ces défauts modifient l'énergie libre de Gibbs du matériau et finissent par entraîner une transition cristal → liquide à une température inférieure à  $T_f$ , pour laquelle la mobilité moléculaire est très réduite, ce qui explique l'amorphisation.

Or, cette théorie ne permet en aucun cas de rendre compte des transformations complexes subies par la fanansérine au cours du broyage. En particulier, elle ne permet pas de prédire les transitions polymorphiques cristallines. Par contre, l'introduction de défauts dans l'édifice cristallin est certainement à l'origine des perturbations du pic de fusion des échantillons faiblement broyés.

### ➤ Hypothèse de transitions dynamiques

Nous avons présenté en introduction le modèle de rationalisation des transformations induites par broyage proposé par G. Martin et al. [9]. Ce modèle, construit à partir d'expériences de mise en désordre d'alliages métalliques, introduit le concept de **transitions de phases dynamiques**, qui permettent d'atteindre sous broyage des états stationnaires différents des états d'équilibre thermodynamique du matériau. D'après les observations expérimentales sur la mise en désordre de FeAl, les transformations induites par broyage résultent de deux phénomènes simultanés et antagonistes :

- un effet « d'endommagement » induit par les chocs balistiques des billes de broyage sur la poudre
- un effet de « restauration » gouverné par la thermodynamique

La compétition entre ces deux effets dépend de paramètres extérieurs maîtrisables par l'expérimentateur, qui sont la température  $T$  et l'intensité  $I$  du broyage.

Dans le cadre de la théorie des transitions de phases dynamiques, l'énergie apportée par le broyage mécanique modifie la fonction d'énergie libre  $G$  en y ajoutant un terme balistique de fréquence  $\Gamma_{\text{bal}}$ . On peut alors introduire l'**énergie libre effective**  $G_{\text{eff}}$ , telle que :

$$\frac{dS}{dt} = -\Gamma_{\text{th}} \frac{\partial G}{\partial S} - \Gamma_{\text{bal}} = -\frac{\partial G_{\text{eff}}}{\partial S} \quad (\text{IV.1})$$

Dans l'équation IV.1,  $\Gamma_{\text{th}}$  est la fréquence du mécanisme de restauration, et  $S$  le paramètre d'ordre de la transformation, à savoir le degré d'ordre dans l'alliage métallique après le broyage. Les minima de  $G_{\text{eff}}$  fournissent les états stationnaires dynamiques accessibles sous broyage, qui ne correspondent pas aux minima du système non perturbé définis par la thermodynamique.

Le formalisme du modèle développé par Martin et al. n'est pas directement applicable aux transformations de phases de la fanansérine induites par broyage. En effet, nos résultats expérimentaux mettent en évidence une amorphisation à l'état solide, nette lors d'un broyage à 0°C, et sous jacente lors d'un broyage à 25°C. Or, le paramètre d'ordre permettant de « quantifier » l'amorphisation à l'état solide est beaucoup moins immédiat que dans le cas de la mise en désordre d'un alliage, et reste à définir.

La description des effets du broyage en terme d'énergie libre effective  $G_{\text{eff}}$  conduit à la définition d'une **température effective**  $T_{\text{eff}}$ , telle que

$$T_{\text{eff}} = T(1 + \Delta(I, T)) \quad (\text{IV.2})$$

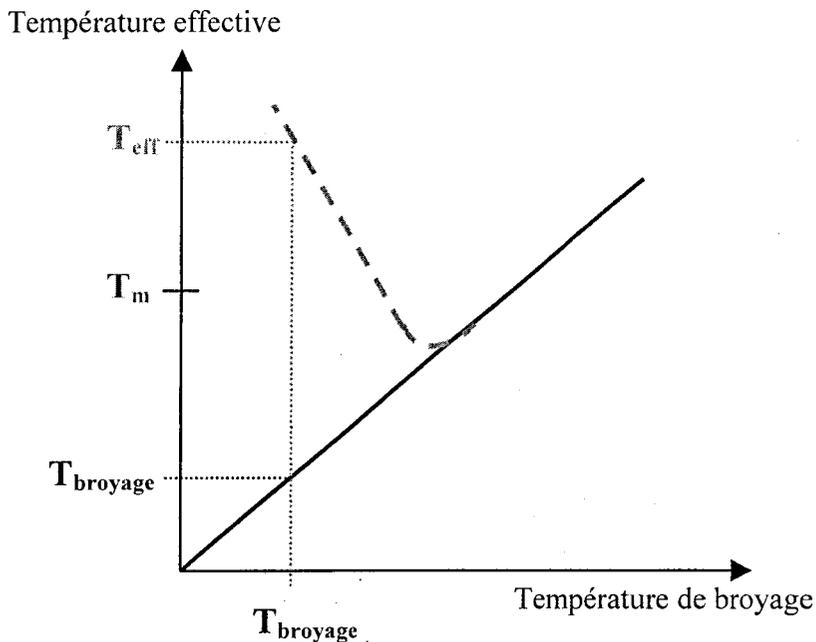
avec

$$\Delta(I, T) = \frac{\Gamma_{\text{bal}}}{\Gamma_{\text{th}}} \cong f(I) \exp\left(\frac{E}{kT}\right) \quad (\text{IV.3})$$

L'expression IV.3 signifie que la configuration du système soumis à un broyage d'intensité  $I$ , à la température  $T$ , serait la même que celle du système se trouvant à la température  $T_{\text{eff}}$  en l'absence de sollicitation mécanique. Le terme  $\Delta(I, T)$  défini par l'équation IV.2 est particulièrement efficace à basse température, comme l'illustre la **figure IV.12**. Par conséquent, un système broyé à basse température se comporte comme s'il se trouvait à une température  $T_{\text{eff}}$  très supérieure à la température de broyage  $T$ , et pouvant excéder la température de fusion  $T_m$  du composé. Une telle situation devrait normalement entraîner la fusion du composé. Néanmoins, les conditions thermodynamiques « réelles » de l'expérience ne permettant pas la transition cristal  $\rightarrow$  liquide, le matériau transite du cristal vers l'état amorphe.

Cette théorie pourrait rendre compte phénoménologiquement des transitions de la fanansérine sous broyage mécanique, puisqu'elle ne fait aucune hypothèse sur la nature cristalline des états stationnaires atteints. Toutefois, l'application quantitative de ce modèle au cas de la fanansérine suppose la définition préalable du paramètre d'ordre  $S$  de l'expression (IV.1). Or, compte tenu de la complexité des transformations rencontrées dans la fanansérine, et dans les

matériaux moléculaires en général, la définition du paramètre d'ordre adéquat est un problème irrésolu.



*Figure VI.12 :*

*Représentation schématique du concept de « température effective » proposant une rationalisation de l'amorphisation induite par broyage mécanique*

Les résultats obtenus sur la fanansérine mettent en évidence l'importance de la situation de la température de broyage par rapport à la **température de transition vitreuse  $T_g$**  du matériau. La théorie des transitions dynamiques telle qu'elle a été formulée ne prend pas en compte ce paramètre. Pourtant, nombre de composés moléculaires possèdent une température de transition vitreuse proche de la température ambiante, et donc susceptible d'influencer le résultat du broyage. Nos résultats expérimentaux permettent de dégager les conclusions suivantes :

- **Dans le cas d'un broyage effectué au-dessus de  $T_g$ ,** la mobilité moléculaire est suffisante pour permettre aux molécules de se réarranger en réseau cristallin.

Le broyage provoque une transition cristal  $\rightarrow$  amorphe, prédite par le concept de température effective. Cette transition est immédiatement suivie d'une cristallisation (de la phase I) induite par les caractéristiques dynamiques du système.

- **Dans le cas d'un broyage effectué en dessous de  $T_g$ ,** la mobilité moléculaire est beaucoup plus réduite. L'amorphe généré par broyage se trouve dans une situation dynamique ne lui permettant pas de recristalliser rapidement, ce qui explique que l'on puisse stabiliser cet amorphe sous broyage uniquement.

En prenant pour base de réflexion le modèle initialement proposé par G. Martin, les résultats expérimentaux obtenus sur la fanansérine apportent une information nouvelle : ils montrent clairement que **la situation de la température de broyage par rapport à  $T_g$  est un paramètre essentiel pour la prédiction des états stabilisés par broyage.**

La fanansérine est un composé adapté à l'étude des transformations de phases induites par broyage mécanique. En effet, son polymorphisme riche permet de suivre le comportement sous broyage de plusieurs variétés cristallines. Par ailleurs, elle offre l'opportunité d'analyser commodément l'influence de la température de broyage, puisque sa température de transition vitreuse se situe très près de la température ambiante.

En étudiant le comportement des phases III et IV, nous avons montré que l'état stationnaire atteint par broyage dépendait uniquement de la température, et non de la forme polymorphique de départ : un broyage au-dessus de  $T_g$  provoque une transformation vers la phase métastable I, tandis qu'un broyage sous  $T_g$  provoque l'amorphisation partielle du composé. Ces transformations ont été systématiquement observées pour des broyages suffisamment longs, et sont reproductibles avec les conditions expérimentales retenues. Elles ne sont pas directes, mais se font par l'intermédiaire de phases transitoires. Au-dessus de  $T_g$ , une étape d'amorphisation a été décelée aux premiers temps du broyage. Elle semble être un préambule indispensable à toute transformation polymorphique. Dans le cas du broyage de la forme IV, une cristallisation intermédiaire de forme III a été mise en évidence. En dessous de  $T_g$ , les transformations de la phase IV sont également complexes. A toute température, le mécanisme de transformation semble d'autant plus complexe que la phase de départ est stable.

L'étude de la stabilité des états générés sous broyage a révélé que les échantillons partiellement amorphisés par broyage à 0°C recristallisaient complètement en l'espace d'un mois, 50°C en dessous de leur température de transition vitreuse. Ce phénomène témoigne d'une mobilité moléculaire résiduelle beaucoup plus importante que dans le verre de liquide à la même température. L'amorphe est donc un état stationnaire atteint par broyage, qui retourne vers un état d'équilibre quand l'application de la perturbation cesse.

Il convient aussi de distinguer clairement les états stationnaires stabilisés par broyage des étapes intermédiaires qui jalonnent le processus de transformation. Cette précaution est nécessaire pour l'application du modèle des transitions de phases dynamiques de Martin-Bellon [4], qui s'avère être une approche prometteuse pour rationaliser les effets du broyage. Toutefois, cette théorie, mise au point pour les composés métalliques, n'est pas directement applicable aux matériaux moléculaires comme la fanansérine.

## REFERENCES

1. T.P. Shakhshneider, V.V. Boldyrev, dans « Reactivity of Molecular Solids », édité par E. Boldyreva et V. Boldyrev, 1999
2. J. Giovannini, thèse de doctorat soutenue à l'Université de Rennes 1 (décembre 2001), numéro d'ordre 2648
3. J. Giovannini, L. Ter Minassian, R. Céolin, R. Toscani, M.A. Perrin, D. Louër, F. Leveiller, *J. Phys. IV*, **11** (2001), 10
4. G. Martin, P. Bellon, *Solid State Phys.*, **50** (1997), 189
5. A. Keller, M. Hikosaka, S. Rastagi, A. Toda, P.J. Bahram, G. Golbeck-Wood, *J. Mater. Sci.* (1994), **29**, 2579
6. J. Strange, J.B.W. Webber, *Meas. Sci. Technol.*, **8** (1997), 555
7. H.J. Fecht, W.L. Johnson, *Nature*, **334** (1988), 50
8. J. Giovannini, *communication*
9. P. Pochet, E. Tominez, L. Chaffron, G. Martin, *Phys. Rev. B* **52** (1995), 4006

# TROISIEME PARTIE

## LE TREHALOSE



## **CHAPITRE V**

### **Le tréhalose :** **présentation et propriétés**

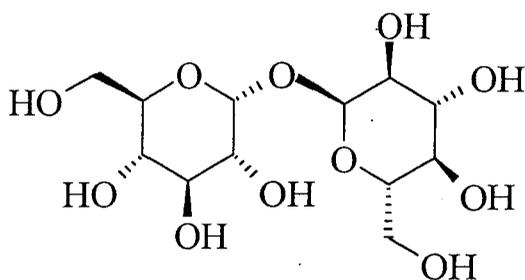


Ce chapitre est consacré à la présentation du deuxième composé utilisé dans cette étude : le tréhalose. Après avoir rappelé quelques unes de ses caractéristiques chimiques (section A), nous détaillerons son polymorphisme en section B. L'intérêt du tréhalose en biologie, et ses applications potentielles dans les industries pharmaceutique et agroalimentaire seront évoqués en section C.

## A. CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

Le  $\alpha,\alpha$ -tréhalose, que nous appellerons simplement « tréhalose » par la suite, a été isolé pour la première fois en 1832. Les travaux de Berthelot, en 1858, ont permis d'en établir la formule chimique :  $C_{12}H_{22}O_{11}$  [1].

Le tréhalose est un disaccharide non réducteur, de masse molaire 342.31 g/mol, constitué de deux cycles de glucose. C'est un isomère, entre autres, du sucrose, du lactose et du maltose. Une représentation schématique de la molécule de tréhalose est proposée sur la **figure V.1** :



*Figure V.1 :*  
Formule développée de la molécule de  
tréhalose  $C_{12}H_{22}O_{11}$

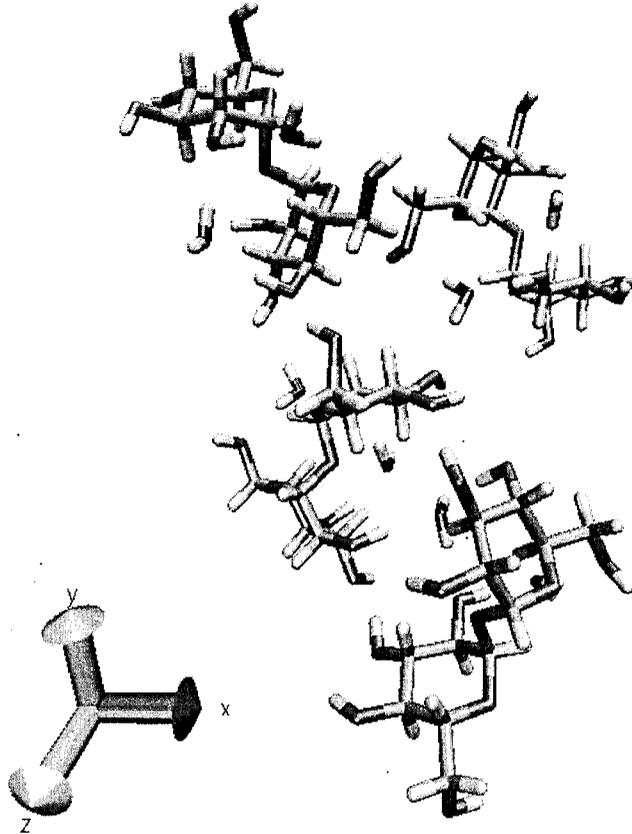
La présence de tréhalose a été détectée dans plus de 80 espèces animales et végétales, parmi lesquelles des plantes, des algues, des champignons, des levures, des bactéries, des insectes et autres invertébrés. Le tréhalose est en outre assimilable par l'organisme humain : on en trouve par exemple dans le miel et les crevettes [1].

## B. PHASES CRISTALLINES IDENTIFIEES – COMPORTEMENT AU RECHAUFFAGE

### B.1. Polymorphisme du tréhalose

On connaît à ce jour trois formes cristallines du tréhalose : une forme dihydrate notée  $T_{2H_2O}$ , et deux formes anhydres, notées  $T_\alpha$  et  $T_\beta$ . Les anhydres  $T_\alpha$  et  $T_\beta$  s'obtiennent par déshydratation contrôlée du tréhalose dihydrate [2].

- La forme dihydrate  $T_{2H_2O}$  peut être cristallisée par évaporation d'une solution d'éthanol aqueux. La structure cristallographique a été résolue sur monocristal en 1972 [3-4]: il a été établi que le tréhalose dihydrate  $T_{2H_2O}$  cristallisait dans le groupe d'espace orthorhombique  $P2_12_12_1$ . Les paramètres de maille sont donnés dans le **tableau V.1**.



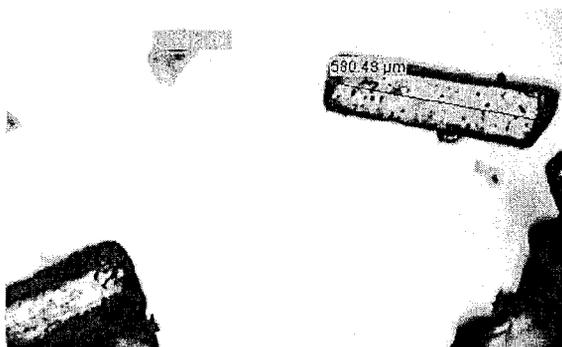
*Figure V.2 :*

*Représentation schématique à 3 dimensions de la maille de  $T_{2H_2O}$ . Pour une meilleure lisibilité les atomes d'oxygène des molécules d'eau sont représentés en bleu. Image réalisée par Patrice Bordat, LDSMM.*

La forme hydratée du tréhalose est la forme la plus stable dans les conditions ambiantes de température et de pression. L'eau est liée aux molécules de tréhalose par un réseau complexe de liaisons hydrogène indépendantes. Les deux molécules d'eau, notées  $W_1$  et  $W_2$ , ne sont pas équivalentes dans la structure cristallographique. La molécule  $W_1$  forme 4 liaisons hydrogène, dans une configuration tétraédrique distordue, tandis que la molécule  $W_2$ , moins fortement liée, ne forme que 3 liaisons hydrogène dans une configuration pyramidale. Contrairement au sucrose, au lactose monohydrate et au maltose monohydrate par exemple, il n'existe pas dans le tréhalose de liaisons hydrogène intramoléculaires directes. Au sein d'une même molécule de tréhalose, la molécule  $W_1$  forme une liaison hydrogène avec les atomes  $O(2)$  et  $O'(4)$ , et la

molécule W2 lie les atomes O(2) et O'(6). Ces liaisons hydrogène assurent la cohésion de la structure de  $T_{2H_2O}$ . Une reproduction de la maille de  $T_{2H_2O}$  est donnée en **figure V.2**.

Le tréhalose dihydrate  $T_{2H_2O}$  provient des laboratoires Fluka Biochemika. Sa pureté est garantie supérieure à 99 % ; il a été utilisé sans purification complémentaire.

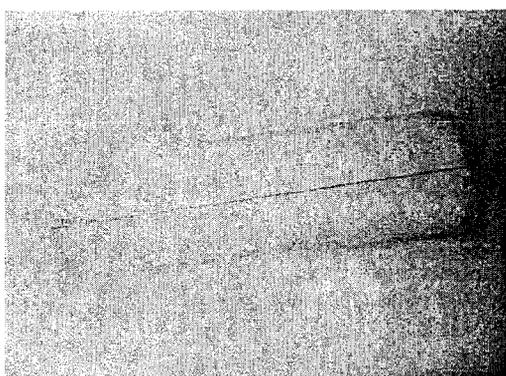


*Photo V.1 :*

*Cliché de microscopie optique d'un échantillon de tréhalose dihydrate. Les grains se présentent sous forme d'aiguilles dont les tailles sont très distribuées. Les plus grandes particules atteignent 1 mm de long.*

- **La forme anhydre  $T_\beta$**  peut être cristallisée dans la pyridine. Elle s'obtient également à partir de  $T_{2H_2O}$  déshydraté par un vieillissement de 4 h, sous vide à 135°C [2]. La structure cristallographique de  $T_\beta$  a été résolue sur monocristal en 1985 [5] : cette forme cristallise dans le groupe d'espace monoclinique  $P2_1$ ; les paramètres de maille sont donnés dans le tableau V.1. La phase  $T_\beta$  est stable en atmosphère ambiante sur une échelle de temps de quelques jours. Néanmoins, le tréhalose étant un composé hygroscopique,  $T_\beta$  nécessite à long terme d'être conservée dans un dessiccateur.

Le tréhalose  $T_\beta$  est synthétisé par Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Il est garanti pur à 99.3 %, et a été utilisé sans aucun traitement additionnel.



*Photo V.2 :*

*Cliché de microscopie optique du tréhalose anhydre  $T_\beta$ . Les grains se présentent sous forme d'aiguille dont la granulométrie est voisine de 1 mm. Le lot examiné possède aussi une fraction minoritaire de particules plus petites (100-300 μm).*

Forme	$T_{2H_2O}$ [5]	$T_\beta$ [4]
Système	Orthorhombique	Monoclinique
a (Å)	17.90	12.971
b (Å)	12.21	8.229
c (Å)	7.586	6.789
$\alpha$ (°)	90	90
$\beta$ (°)	90	98.12
$\gamma$ (°)	90	90
Z	4	2

Tableau V.1 :

Données cristallographiques des phases  $T_{2H_2O}$  et  $T_\beta$  du tréhalose, extraites des références [4] et [5].

La figure V.3 montre les diagrammes de diffraction des rayons X, enregistrés au laboratoire, des deux lots de tréhalose ( $T_{2H_2O}$  et  $T_\beta$ ) utilisés pour les expériences de broyage et de déshydratation que nous présenterons par la suite. Ces deux diagrammes sont conformes aux données cristallographiques précédemment publiées [3-5].

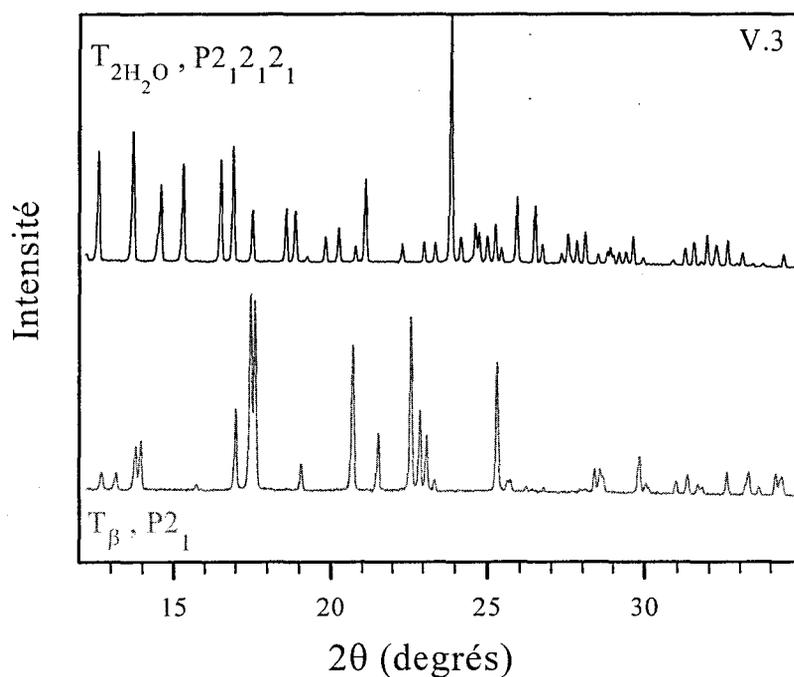


Figure V.3 :

Diagrammes de DX de  $T_{2H_2O}$  et de  $T_\beta$ , enregistrés à  $T_{amb}$  sur capillaires tournants de diamètre 0.5 mm. (Diffractomètre Inel,  $\lambda(Cu, K_\alpha = 1.541 \text{ \AA})$ )

- La forme anhydre  $T_\alpha$  s'obtient par déshydratation à  $85^\circ\text{C}$ , sous vide et pendant 4 h de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ , d'après les informations reportées dans [2]. La structure cristallographique de la phase  $T_\alpha$  n'est pas encore résolue à ce jour. Nous aborderons de manière plus approfondie les propriétés de la phase  $T_\alpha$ , et les difficultés liées à la résolution de sa structure au cours du chapitre VII.

## B.2. Analyse calorimétrique du comportement du tréhalose $T_\beta$ au chauffage

Ce paragraphe vise à préciser les caractéristiques thermodynamiques du tréhalose anhydre  $T_\beta$ , ainsi que du verre obtenu par trempe de la phase liquide. Le comportement au chauffage du tréhalose dihydrate ( $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ ) fera l'objet d'une étude détaillée au chapitre VII.

La figure V.4. présente d'une part les diagrammes de DX (figure V.4.a), et d'autre part les thermogrammes enregistrés au chauffage à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  (figure V.4.b), du tréhalose anhydre  $T_\beta$  et du tréhalose liquide trempé.

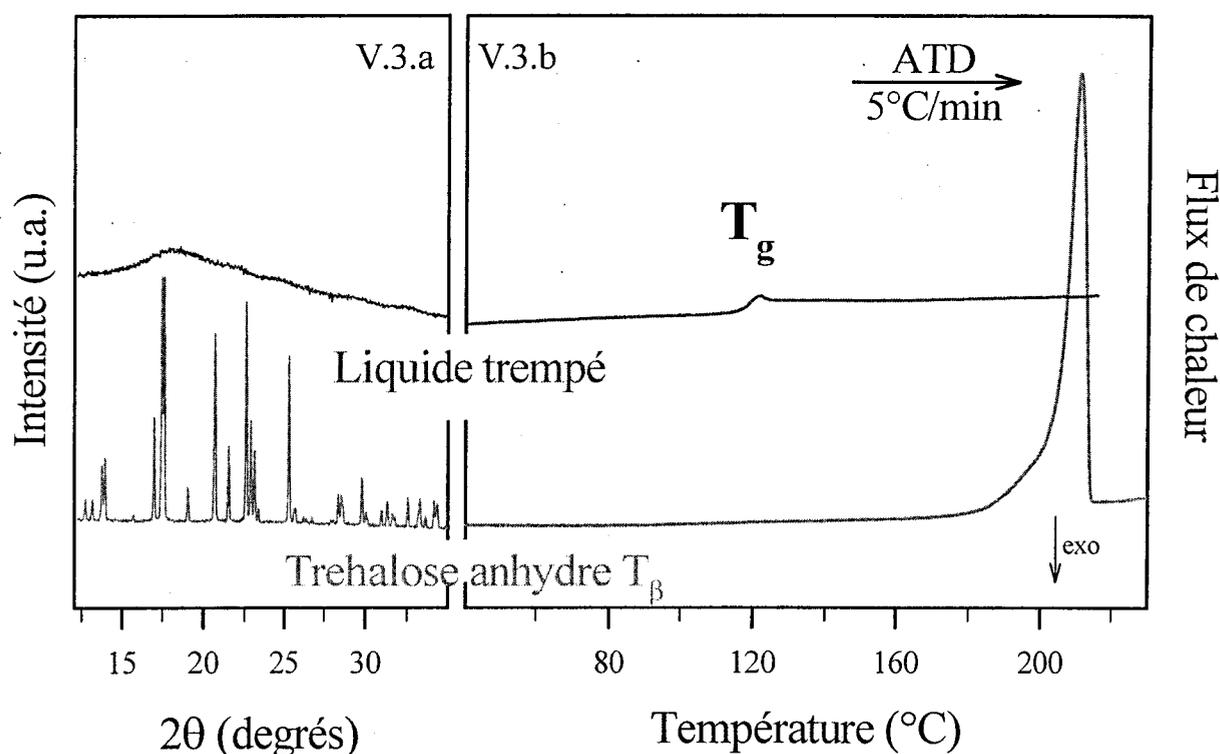


Figure V.4 :

- diagrammes de diffraction des rayons X, enregistrés à  $T_{\text{amb}}$ , du tréhalose  $T_\beta$  cristallin et du verre issu de la trempe du liquide
- thermogrammes enregistrés au réchauffage à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , d'un échantillon de tréhalose  $T_\beta$  et du verre issu de la trempe du liquide

Le thermogramme correspondant au chauffage du tréhalose anhydre  $T_\beta$  (figure V.4.b) ne présente aucun accident enthalpique avant la fusion. Celle-ci commence à  $180^\circ\text{C}$  et se manifeste par un pic endothermique intense. La transition est achevée à  $213^\circ\text{C}$ , et l'enthalpie de fusion mesurée est  $\Delta H_m(T_\beta) = 150 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Il est intéressant de noter que le tréhalose n'est pas sujet à la décomposition thermique avant la fusion. La stabilité thermique du tréhalose permet par conséquent d'atteindre l'état liquide sans altérer les molécules, et offre la possibilité d'amorphiser le tréhalose par trempe thermique. Cette propriété n'est pas commune à tous les disaccharides : le lactose, par exemple, subit une dégradation chimique sévère au chauffage, qui perturbe fortement la fusion et empêche l'amorphisation par trempe thermique.

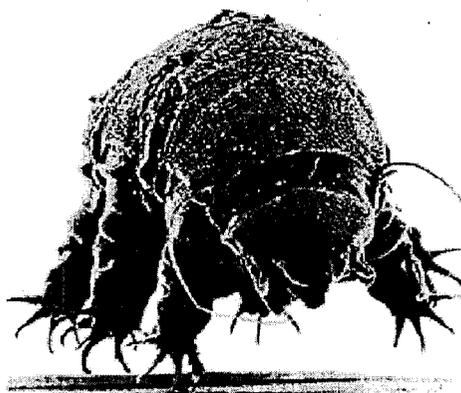
Le verre de liquide a été obtenu par refroidissement à  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  du tréhalose liquide. Son diagramme de DX ne montre aucun pic de Bragg et s'apparente donc à celui d'un amorphe. Au réchauffage, le liquide trempé montre à  $118^\circ\text{C}$  un saut de chaleur spécifique, qui atteste du caractère vitreux de l'amorphe obtenu par trempe thermique de la phase liquide. Comparativement aux autres disaccharides, le tréhalose possède une température de transition vitreuse élevée [6] ( $T_g = 62^\circ\text{C}$  pour le sucrose,  $92^\circ\text{C}$  pour le maltose,  $105^\circ\text{C}$  pour le lactose). Dans les conditions expérimentales utilisées ( $5^\circ\text{C}/\text{min}$  sous balayage d'hélium), le verre de liquide ne recristallise pas au chauffage. Ces deux particularités facilitent la manipulation du verre à température ambiante.

## C. INTERET DU TREHALOSE POUR LA BIOPROTECTION

### APPLICATIONS POTENTIELLES

Les organismes vivant dans des conditions climatiques extrêmes, comme celles des zones désertiques, doivent constamment faire face au manque d'eau liquide. Ces organismes, dits « anhydrobiotiques », possèdent la particularité de pouvoir survivre à des déshydratations prolongées, sans que les fonctions vitales de leurs cellules en soient altérées.

Les nombreuses investigations menées pour comprendre cette particularité ont révélé que la résistance des organismes anhydrobiotiques à la dessiccation passait par la synthèse de molécules bioprotectrices. Ces molécules sont par exemple le glycérol, des sucres comme le tréhalose et le sucrose, ou des oligosaccharides comme le dextran. La synthèse de ces substances bioprotectrices permet le ralentissement extrême du métabolisme des cellules. L'activité métabolique peut ensuite reprendre rapidement et sans dommage dans des conditions d'humidité favorables. De ce point de vue, un exemple fréquemment cité est celui du tardigrade, un arthropode microscopique (photo V.1) capable de synthétiser du tréhalose en quantité considérable (jusqu'à 20% de sa masse sèche) s'il est placé en situation de sécheresse. Ses fonctions vitales entrent alors dans un état de quasi-inactivité. L'animal peut subsister ainsi pendant plusieurs dizaines d'années, avant de retrouver toutes ses capacités métaboliques une fois « réhydraté ».



*Photo V.1 :*

*Le tardigrade est un arthropode microscopique capable de résister à des dessiccations de plusieurs années. Il synthétise pour cela du tréhalose à hauteur de 20% de sa masse sèche*

D'après de nombreuses études biologiques, les propriétés bioprotectrices du tréhalose seraient particulièrement remarquables, ou tout au moins supérieures à celles des autres disaccharides [7]. Les mécanismes à l'origine des facultés bioprotectrices du tréhalose ne sont pas encore clairement compris. Plusieurs hypothèses ont été émises, mais aucune ne semble pleinement

satisfaisante pour justifier la plus grande efficacité du tréhalose en matière de bioprotection. L'Annexe 2 propose un résumé des différentes propositions avancées jusqu'à présent.

Le tréhalose possédant de nombreuses applications potentielles, principalement dans les domaines pharmaceutique, biotechnologique et agroalimentaire, il suscite actuellement un intérêt considérable.

En pharmacie par exemple, l'adjonction de sucres aux formulations pharmacologiques est un moyen couramment utilisé pour protéger les principes actifs lors d'opérations telles que la lyophilisation : les sucres protègent les molécules thérapeutiquement actives, et améliorent la stabilité thermique des formulations. Nous aurons l'occasion d'aborder ce point de manière plus approfondie au chapitre VII.

Dans l'industrie agroalimentaire, les propriétés physico-chimiques du tréhalose en font un additif multifonctionnel. Comparativement au sucrose, le tréhalose possède une moindre cariogénicité, une meilleure stabilité thermique et une température de transition vitreuse plus élevée. Le tréhalose peut donc s'avérer plus performant pour protéger les protéines, ou supporter les arômes. Son utilisation est principalement envisageable dans les boissons énergétiques, les confiseries et les produits surgelés.

Le développement d'applications industrielles du tréhalose est récent, et ce disaccharide demeure à ce jour beaucoup moins utilisé que ses isomères (sucrose, lactose, maltose). En effet, l'absence de procédé de synthèse performant a longtemps entraîné des coûts de production beaucoup plus élevés que ceux des autres disaccharides. La récente mise au point d'une nouvelle méthode de synthèse a ouvert la voie à de nouvelles applications. Utilisé au Japon depuis les années 1990, le tréhalose n'a reçu les autorisations d'utilisation de la Food and Drug Administration et de la Communauté Européenne qu'en octobre 2000 (GRN 000045) et octobre 2001 (décision 2001/721/EC), respectivement.

## REFERENCES

1. A.B. Richards, S. Krakowka, L.B. Dexter, H. Schmid, A.P.M. Woltrbeek, D.H. Waalkens-Berendsen, A. Shigoyuki, M. Kurimoto,  
*Food and Chemical Toxicology*, **40**, 7 (2002), 871
2. H.J. Reisener, H.R. Goldschmidt, G.A. Ledingham, A.S. Perlin,  
*Can. J. Biochem. Physiol.*, **2** (1962), 403
3. G.M. Brown, D.C. Rohrer, D. Berking, C.A. Beevers, R.O. Gould, R. Simpson,  
*Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3145
4. T. Taga, M. Senma, K. Osaki, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3258
5. G.A. Jeffrey, R. Nanni, *Carb. Res.*, **137** (1985), 21
6. Y. Roos, « Phase Transitions in Foods », Academic Press, 1995
7. J.H. Crowe, L.M. Crowe, A.E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers, F. Tablin,  
*Cryobiology*, **43** (2001), 89



## **CHAPITRE VI**

### **Transformation de phase du tréhalose anhydre T<sub>β</sub>** **induite par broyage mécanique**



L'exemple de la fanansérine (chapitre IV) illustre à quel point l'application de contraintes mécaniques est susceptible de provoquer des modifications profondes de la nature physique d'un matériau. Il montre en particulier que le broyage mécanique peut induire des transitions vers une phase cristalline polymorphe, ou provoquer l'amorphisation du composé.

Nous présentons ici les résultats concernant le broyage mécanique du tréhalose. Ce composé, activement étudié pour ses propriétés bioprotectrices (voir Annexe 2), présente une température de transition vitreuse élevée ( $T_g = 118^\circ\text{C}$ ), ce qui permet de réaliser les opérations de broyage en dessous de  $T_g$ . D'autre part, une étude antérieure fait état de la possibilité d'amorphiser par broyage le sucrose, un isomère du tréhalose [1]. Cela laisse penser que le tréhalose soit lui aussi sensible aux effets du broyage mécanique.

Le tréhalose possède deux phases anhydres polymorphes  $T_\alpha$  et  $T_\beta$ , ainsi qu'une phase dihydrate notée  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  [2]. Il est connu que certains composés hydratés (comme le lactose, un isomère du tréhalose) se déshydratent lorsqu'ils sont soumis à un broyage mécanique [3]. Dans ces conditions, il devient difficile de dissocier les transformations dues à la seule perturbation mécanique des effets de la déshydratation. Le choix d'une phase de départ anhydre permet d'étudier uniquement les effets de la sollicitation mécanique sur le composé. Nous avons donc choisi d'étudier les effets du broyage sur la forme anhydre  $T_\beta$  du tréhalose. Cette phase, bien que légèrement hygroscopique, est stable à température et humidité ambiantes sur l'échelle de temps des expériences.

Après avoir rappelé brièvement le protocole expérimental de broyage utilisé, nous présentons en section A les résultats de DX et ATD obtenus au laboratoire sur les échantillons de tréhalose broyés. La section B propose deux méthodes indépendantes de quantification des phases en présence, fondées respectivement sur les résultats d'ATD et de RMN  $^{13}\text{C}$ . Les résultats seront globalement discutés en section C.

Le broyage des échantillons a été effectué avec le microbroyeur planétaire «Pulverisette 7» de Fritsch, dont le principe de fonctionnement est décrit au chapitre II. Toutes les expériences ont été effectuées dans les conditions décrites au chapitre II, paragraphe B.1. Les opérations de broyage s'effectuent à température ambiante, c'est-à-dire environ  $90^\circ\text{C}$  en dessous de la température de transition vitreuse du tréhalose. Les échantillons de tréhalose  $T_\beta$  broyés ont été analysés par Diffraction des rayons X, Analyse Thermique Différentielle et RMN  $^{13}\text{C}$  immédiatement après le broyage.

## A. MISE EN EVIDENCE DE LA VITRIFICATION DE $T_\beta$ INDUITE PAR BROYAGE MECANIQUE

La figure VI.1 présente l'évolution des diagrammes de DX et d'ATD du tréhalose  $T_\beta$  soumis à un broyage mécanique de durée comprise entre 15 min et 20 h.

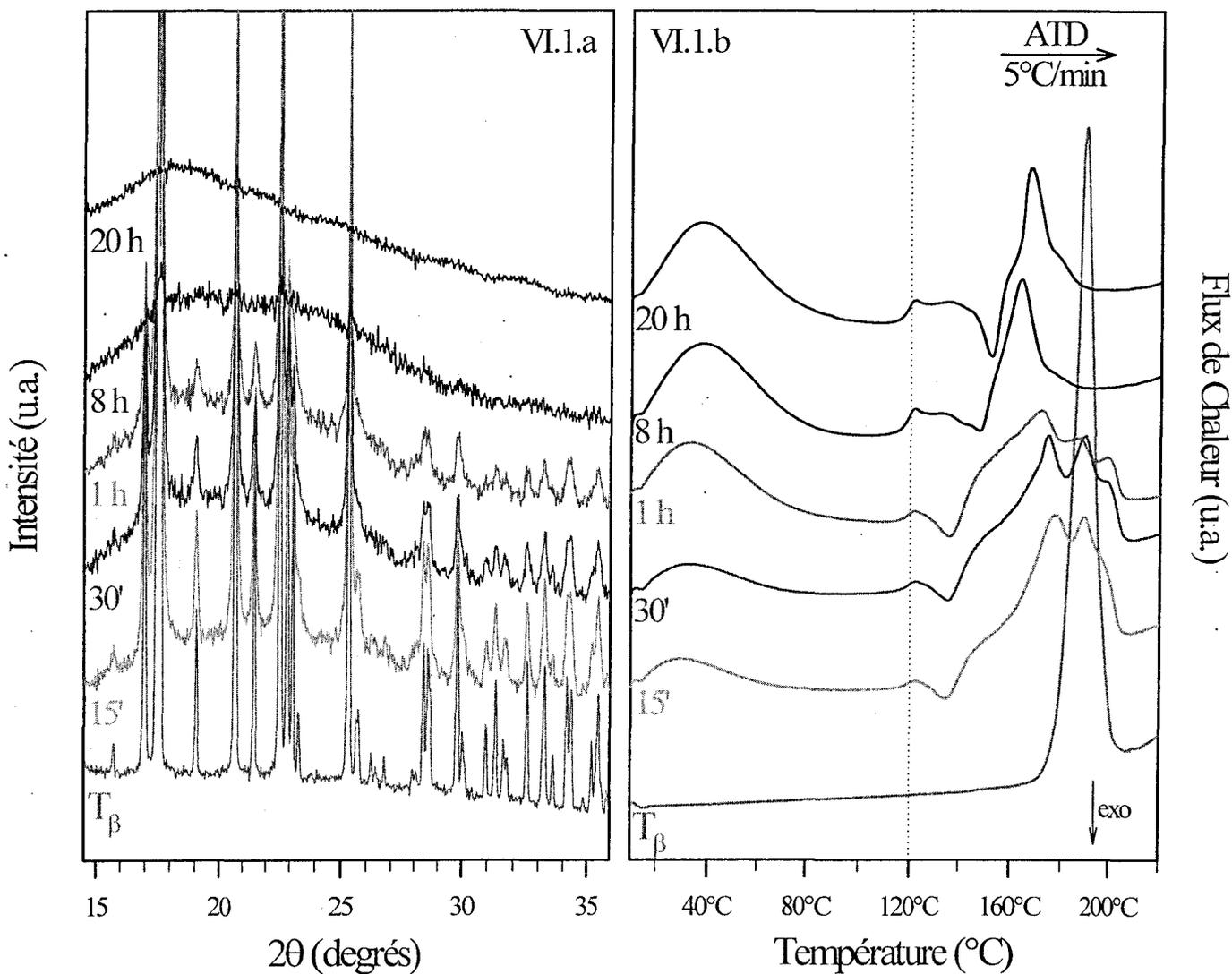


Figure VI.1 :

- diagrammes de DX d'échantillons de tréhalose anhydre non broyé ( $T_\beta$ ) et d'échantillons soumis à des broyages de durées comprises entre 15 min et 20 h, comme indiqué sur la figure. Les enregistrements ont été effectués à  $T_{amb}$  sur plaquette (diffractomètre Inel,  $\lambda$  (Cu  $K_\alpha$ ) = 1.541 Å).
- thermogrammes correspondants, enregistrés au chauffage à 5°C/min immédiatement après le broyage

**Pour un broyage de 20 h**, le diagramme de DX présente l'aspect d'un halo diffus et ne montre aucun pic de Bragg. Le broyage mécanique du tréhalose semble donc provoquer l'amorphisation. Au réchauffage, le thermogramme de l'échantillon broyé 20 h présente quatre accidents enthalpiques distincts :

- une large bosse endothermique, d'enthalpie 82.4 J/g, qui s'étend de  $T_{amb}$  à 100°C. La courbe d'ATG de la **figure VI.2**, enregistrée dans les mêmes conditions, montre sur ce domaine de température une perte de masse de 4.5 %. Cette perte de masse correspond à un départ d'eau, et indique que l'échantillon de tréhalose initialement anhydre s'est humidifié pendant le processus de broyage. En effet, le tréhalose est un composé naturellement hygroscopique. De plus, la réduction de la taille des grains consécutive au broyage mécanique augmente la surface spécifique de la poudre, et favorise ainsi la prise d'eau [4]. Le diagramme de DX de la figure VI.1.a, enregistré immédiatement après le broyage, à température ambiante, ne montre aucun pic de Bragg caractéristique de la phase dihydrate  $T_{2H_2O}$ . On en conclut que la prise d'eau par la poudre au cours du broyage est vraisemblablement attribuable à une « humidification » du tréhalose en surface des grains, plutôt qu'à la formation d'une phase hydratée.
- un léger accident endothermique à 118°C, assimilable à un saut de chaleur spécifique et intervenant à la même température que celui observé lors du réchauffage du verre de liquide. Ce saut de  $C_p$  est caractéristique de la transition vitreuse de l'amorphe formé par broyage. Il atteste du caractère **vitreux** de l'amorphe formé par broyage. L'ensemble du processus ayant eu lieu en dessous de  $T_g$ , on peut réellement parler de **transition directe cristal → verre à l'état solide**. L'absence de pic de Bragg sur le diagramme de DX est donc effectivement due au caractère amorphe de l'échantillon broyé, et ne reflète pas une simple nanostructuration. un exotherme de faible amplitude (13.1 J/g) situé à 145.3°C. Ce pic est attribué à la recristallisation du tréhalose amorphe vers sa forme initiale  $T_p$ .
- un pic endothermique qui se manifeste à 163.0°C, attribué à la fusion de l'échantillon recristallisé. L'enthalpie de fusion du tréhalose broyé 20 h n'est que de 39.0 J/g ; elle est donc très inférieure à celle de l'échantillon non broyé, pour lequel  $\Delta H_f = 150$  J/g. Le suivi en DX du chauffage du tréhalose broyé 20 h, dans les mêmes conditions que celles de l'ATD, a montré que cette vitesse de chauffe ne permettait pas à l'échantillon de recristalliser complètement (données non présentées). Il subsiste donc dans l'échantillon, à une température supérieure à 150°C, une fraction amorphe importante. De cette manière, seule une partie de l'échantillon participe à la fusion.

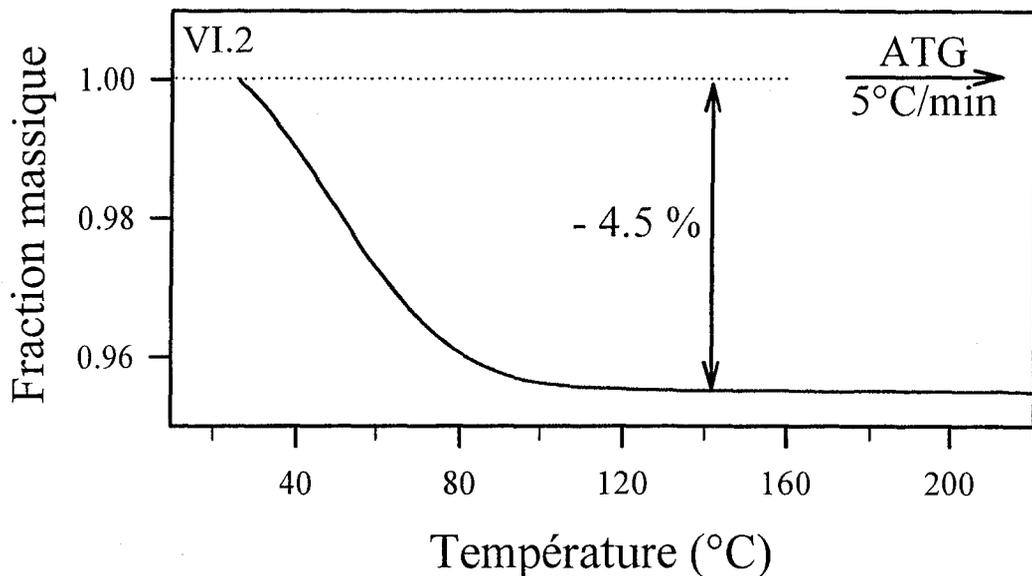


Figure VI.2 :

Courbe d'ATG d'un échantillon de tréhalose  $T_{\beta}$  broyé 20 h, enregistrée au chauffage à 5°C/min. Elle montre une perte de masse de 4.5%, qui intervient principalement entre 25 et 100°C. Cette perte de masse est attribuée à l'évacuation de l'eau adsorbée par la poudre au cours du processus de broyage.

**Pour des broyages de durée comprise entre 15 min et 8 h**, les diagrammes de DX de la figure VI.1.a montrent une diminution progressive de l'intensité des pics de Bragg avec le temps de broyage. Ce phénomène s'accompagne d'un élargissement des raies de Bragg, et de l'apparition d'un halo de diffusion caractéristique de l'état amorphe. Les modifications du diagramme de DX sont perceptibles dès les premières minutes du broyage, ce qui signifie que le mécanisme d'amorphisation du tréhalose est actif dès l'application de la sollicitation. Au bout de 8 h de broyage, le diagramme de DX ne montre presque plus aucun pic de Bragg, ce qui signifie que l'amorphisation du tréhalose est quasi-totale au sens de la diffraction des rayons X.

Les thermogrammes correspondants présentent quatre accidents enthalpiques semblables à ceux détectés pour l'échantillon broyé 20 h, dont les températures onset et les enthalpies sont reportées dans le **tableau VI.1** :

- **un large accident endothermique** entre 30°C et 100°C, associé au départ des molécules d'eau adsorbées par la poudre au cours du broyage. L'enthalpie de cet endotherme augmente avec la durée de broyage : elle est de 20.1 J/g pour un broyage de 15 min, et 78.4 J/g pour un broyage de 8 h. Ce phénomène est imputable à la diminution progressive de la taille des grains de tréhalose au cours du broyage : la largeur des raies de Bragg nous a permis d'estimer que la taille des cristallites passait de 340 nm après 30 min de broyage, à 160 nm après 1 h de broyage. Cette diminution de taille entraîne une augmentation du ratio surface/volume, ce qui favorise la prise d'eau de ce composé naturellement hygroscopique.

Néanmoins, il est important de noter qu'aucun des diagrammes de DX de la figure VI.2.a ne montre de raie de Bragg caractéristiques de la phase  $T_{2H_2O}$ . Ceci prouve clairement que l'eau captée par la poudre au cours du processus de broyage demeure de l'eau de surface, et ne génère à aucun moment la cristallisation de tréhalose dihydrate.

- **un saut de  $C_p$  à 118°C**, visible dès 15 minutes de broyage. Son amplitude augmente avec le temps de broyage, ce qui montre que la fraction vitrifiée par broyage est de plus en plus importante.
- **un pic exothermique**, attribué à la recristallisation de l'amorphe formé par broyage, vers la phase  $T_\beta$  d'origine. Au fur et à mesure du broyage, le pic recristallisation de l'amorphe vers  $T_\beta$  se décale vers les hautes températures, et l'enthalpie de cristallisation augmente : pour un broyage de 15 min, l'exotherme intervient à 127°C, c'est-à-dire juste au-dessus de la transition vitreuse de la fraction amorphisée par broyage, et son enthalpie n'est que de 5.5 J/g. Après 8 h de broyage, l'exotherme de cristallisation se trouve à 137.3°C, pour une enthalpie de 15.5 J/g. La recristallisation au chauffage est certainement favorisée par la présence, au sein de l'échantillon, de germes résiduels de la phase  $T_\beta$  ayant échappé au broyage. Le nombre de germes non altérés est beaucoup plus important dans un échantillon faiblement broyé que dans un échantillon ayant subi un broyage de plusieurs heures. La cristallisation est donc attendue à une température d'autant plus basse que le broyage est de courte durée.
- **un endotherme** correspondant à la fusion finale de l'échantillon, dont les caractéristiques varient considérablement au cours du broyage. Pour des broyages courts (15 min à 1 h), la fusion se manifeste par une large bosse endothermique structurée en trois composantes, dont l'onset se situe à 140°C. Cette structuration du pic de fusion est attribuée à la réduction de taille de grains due au broyage. La granulométrie de l'échantillon devient moins homogène, et les particules les plus petites voient leur fusion décalée vers les basses températures. Pour des broyages plus longs, la fusion est repérable à un pic large, dont l'onset de la fusion se décale vers les hautes températures quand la durée de broyage augmente (153.4°C pour un broyage de 8 h, 163.0°C pour un broyage de 20 h). L'enthalpie de fusion du tréhalose broyé est d'autant plus faible que le broyage est long : elle passe de 150 J/g pour l'échantillon non broyé, à 42.6 J/g pour l'échantillon broyé 8 h. Ce déficit est certainement attribuable à la non recristallisation d'une partie de l'échantillon amorphisé. Cependant, on ne peut pas exclure que le broyage introduise des défauts dans la fraction cristalline restante, et abaisse subséquemment sa température et son enthalpie de fusion.

Durée de broyage	$\Delta H_{\text{déshydratation}}$ (J/g)	$T_{\text{cr}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{cr}}$ (J/g)	$T_{\text{f}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{f}}$ (J/g)
0	-	-	-	181.2	150.0
5 min	7.20	126.5	2.10	170.0	131.7
15 min	20.10	126.5	5.50	158.2	118.1
1 h	42.70	127.6	6.70	145.0	95.0
8 h	78.40	137.3	8.50	153.4	42.6
20 h	83.30	145.3	13.00	163.0	39.0

*Tableau VI.1 :*

*Températures onset et enthalpies de fusion des accidents enthalpiques des thermogrammes de la figure VI.1*

Nous venons de montrer que le broyage mécanique du tréhalose induit une **transformation directe cristal → verre à l'état solide** [5]. Il se pose naturellement la question de l'évolution de la fraction amorphisée au cours des différentes étapes du broyage. La section B présente deux méthodes de quantification de la proportion d'amorphe contenue dans les échantillons broyés.

## **B. EVALUATION DE LA FRACTION DE $T_{\beta}$ AMORPHISÉE PAR BROYAGE**

### **B.1. A partir des enthalpies de cristallisation et de fusion**

Les thermogrammes de la figure VI.1.b apparaissent très complexes, notamment au niveau des étapes de cristallisation et de fusion de l'amorphe formé par broyage. La quantification du taux d'amorphe  $X_{am}(t)$  dans les échantillons de tréhalose est généralement effectuée d'après le rapport des enthalpies de cristallisation et de fusion, suivant la méthode proposée en Annexe 1. Néanmoins, dans le cas du tréhalose broyé, il est nécessaire de réaliser des corrections supplémentaires pour tenir compte de :

- **la prise d'eau pendant le broyage** : les valeurs des enthalpies sont normalisées par la masse des échantillons. La prise d'eau augmentant avec le temps de broyage, elle induit une surestimation de la masse d'autant plus importante que le broyage est long. Cette eau s'évacuant au chauffage en dessous de 100°C, l'échantillon redevient anhydre avant que ne surviennent la transition vitreuse, la cristallisation et la fusion. Il faut donc corriger les enthalpies pour qu'elles rendent compte de la masse du tréhalose anhydre uniquement
- **l'entremêlement des pics associés à la cristallisation et la fusion** : quelle que soit la durée du broyage, il est très difficile de dissocier clairement ces deux événements en ATD, ce qui entraîne une incertitude importante sur la valeur de leurs enthalpies respectives
- **la non recristallisation d'une partie importante de l'échantillon au réchauffage**, qui se manifeste par la diminution de l'enthalpie de fusion quand la durée de broyage augmente
- **l'étalement de l'endotherme de fusion**. Nous avons choisi de décrire nos résultats expérimentaux en prenant les températures onset des transitions. Néanmoins, la fusion des échantillons broyés s'étalant sur plus de 50°C pour les courts temps de broyage, on peut douter de la pertinence de la température onset pour refléter le comportement de l'ensemble de l'échantillon.

Compte tenu de ces particularités des thermogrammes, le calcul de la fraction amorphisée  $X_{am}(t)$  ne peut pas être réalisé dans des conditions satisfaisantes avec la méthode habituellement utilisée et présentée en Annexe 1.

### **B.2. A partir de l'amplitude du saut de $C_p$**

$X_{am}(t)$  peut en revanche être évaluée à partir de l'amplitude du saut de  $C_p$  présent sur les thermogrammes de la figure VI.1.b dès les premières étapes du broyage. En effet, l'amplitude du

saut de  $C_p$  est directement proportionnelle à la proportion d'amorphe contenue dans l'échantillon. En comparant ces amplitudes avec celle du liquide sous refroidi, totalement amorphe, on obtient les valeurs de  $X_{am}(t)$  regroupées dans le **tableau VI.2**. La seule correction préalable requise est celle de la masse de l'échantillon, pour prendre en compte l'humidification de la poudre.

Temps de broyage	$X_{am}(t)$
0	0
15 min	33.10 %
30 min	40.10 %
1 h	61.70 %
8 h	88.20 %
20 h	100 %

*Tableau VI.2 :*

*Fraction de tréhalose amorphisée en fonction du temps de broyage.  $X_{am}(t)$  a été déterminée en comparant l'amplitude du saut de chaleur spécifique à  $T_g$  des différents échantillons broyés à celle du tréhalose vitrifié par trempe thermique, pour lequel  $X_{am}(t) = 100$  %.*

Les résultats du tableau VI.2 indiquent qu'après 20 h de broyage, l'amorphisation du tréhalose est totale. Cela est cohérent avec l'absence de pic de Bragg sur le diagramme de DX correspondant (figure VI.1.a). Ces valeurs de  $X_{am}(t)$  suggèrent que l'effet du broyage est perceptible dès le début du processus, puisqu'après 15 minutes de traitement mécanique, un tiers de l'échantillon est déjà amorphisé.

### **B.3. A partir des spectres de RMN $^{13}C$**

Nous présentons dans ce paragraphe une autre méthode de quantification de la fraction de  $T_\beta$  amorphisée par broyage. La RMN du  $^{13}C$  permet de sonder le déplacement chimique des atomes de carbone de la molécule. Le déplacement chimique est sensible au type et à la conformation des liaisons intramoléculaires. La RMN donne donc une information structurale locale, et offre la possibilité de suivre l'évolution de la structure intramoléculaire du tréhalose  $T_\beta$  au cours du broyage. De plus, le signal RMN étant proportionnel au nombre de noyaux présents dans l'échantillon, la technique possède un caractère quantitatif. Nous allons montrer qu'elle autorise par conséquent la détermination de la fraction de tréhalose  $T_\beta$  amorphisée par broyage.

➤ Evolution des spectres  $^{13}\text{C}$  au cours du broyage

La figure VI.3 présente les spectres RMN CPMAS  $^{13}\text{C}$  d'échantillons de tréhalose broyés entre 5 min et 20 h (spectres 2 à 6). Le spectre de l'anhydre  $T_\beta$  non broyé (spectre 1) est également représenté. Les spectres  $^{13}\text{C}$  ont été acquis dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II (§ B.7).

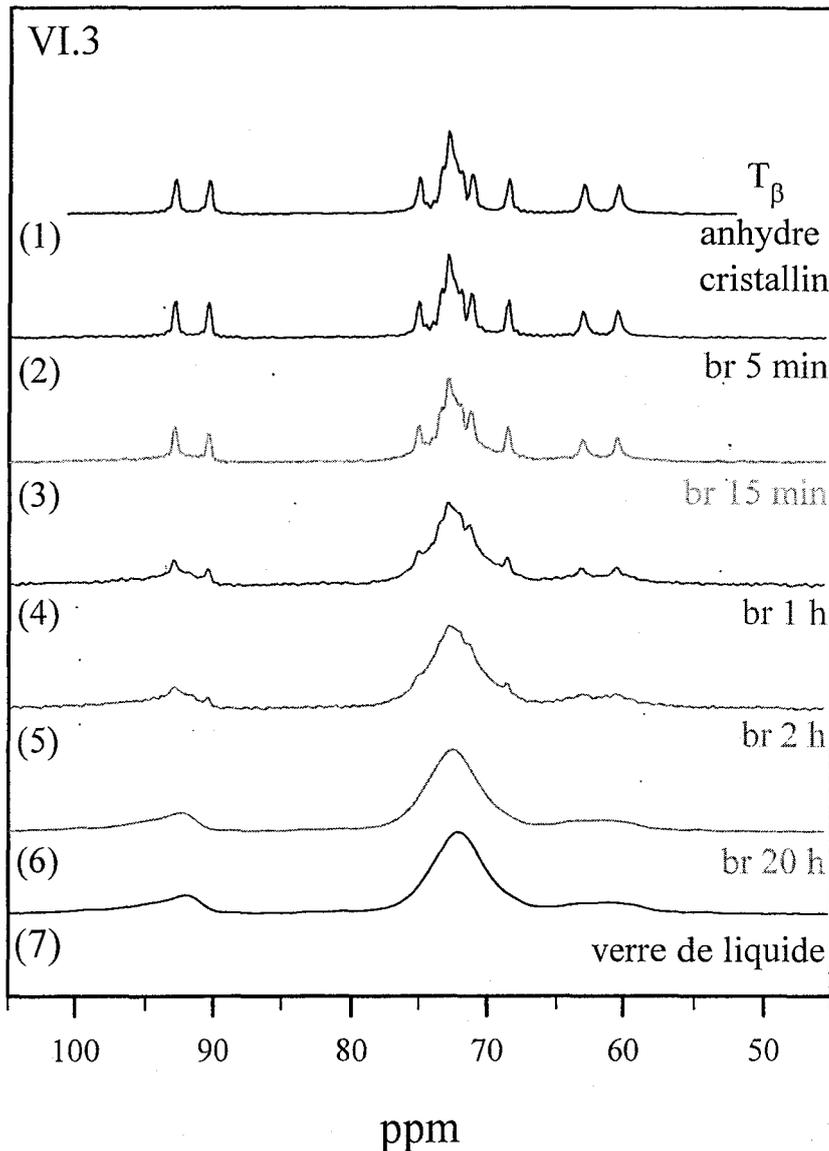


Figure VI.3 :

Spectres RMN CPMAS  $^{13}\text{C}$  du tréhalose broyé de 5 min à 20 h (spectres 2 à 6), du tréhalose  $T_\beta$  cristallin (spectre 1), et du verre de liquide (spectre 7), tous enregistrés à  $T_{amb}$  dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.

Le spectre  $^{13}\text{C}$  du tréhalose anhydre  $T_\beta$  a fait l'objet d'indexations [6,7] permettant d'attribuer les pics visibles sur le spectre 1 de la figure VI.3 aux différents atomes de carbone de la molécule de tréhalose. Les raies situées entre 95 et 90 ppm correspondent aux deux carbones

formant la liaison glycosidique. Le massif entre 76 et 67 ppm est constitué des pics relatifs aux autres atomes de carbone du cycle glucosique. Enfin, les deux raies entre 64 et 60 ppm sont attribués aux atomes de carbone des groupements latéraux CH<sub>2</sub>OH. Compte tenu de la résolution expérimentale accessible, la finesse des pics du spectre 1 est caractéristique de l'état cristallin.

**Le spectre <sup>13</sup>C du tréhalose broyé 20 h** (spectre 6) présente un aspect totalement similaire à celui du verre de liquide (spectre 7). Ceci indique que l'amorphisation après 20 h de broyage est totale, ce qui est cohérent avec les résultats de DX. Au lieu des pics fins observés pour le cristal, il montre des bosses très larges et asymétriques, dont la position en fréquence correspond aux massifs de pics du spectre du tréhalose T<sub>β</sub> cristallin. Ces bosses reflètent un environnement local très différent pour le composé amorphisé par broyage, par rapport au cristal. D'après Zhang et al. [7], la principale origine de l'élargissement des pics dans le tréhalose amorphe est la variation de l'angle de torsion de la liaison glycosidique. Ils ont montré que pour une distribution de Boltzmann des conformations, ces angles présentent dans le tréhalose amorphe une valeur moyenne de 76°, avec une dispersion de 17°. Comparativement, ces mêmes angles dans le tréhalose anhydre cristallin sont de 60° [6], avec une dispersion extrêmement faible.

**Les spectres <sup>13</sup>C d'échantillons broyés de 5 min à 2 h** présentent des pics fins qui correspondent à ceux du cristal non broyé, mais dont l'intensité diminue avec le temps de broyage. Parallèlement, on voit apparaître sur ces spectres la contribution distribuée caractéristique de l'état amorphe. Les résultats RMN de la figure VI.3 montrent que le broyage ne provoque pas un élargissement des pics fins du cristal de départ, mais bien la superposition d'une contribution large à ces pics initiaux. Il est important de souligner que les bosses qui apparaissent sur les spectres des échantillons faiblement broyés, présentent déjà les caractéristiques du spectre (6) de l'échantillon totalement amorphisé. L'intensité des pics étant directement proportionnelle au nombre d'atomes de carbone dans l'échantillon, la disparition progressive des pics fins signifie qu'il subsiste dans l'échantillon de moins en moins de molécules de tréhalose possédant une conformation caractéristique de la forme cristalline T<sub>β</sub>. Ce résultat privilégie donc l'hypothèse de la création erratique de zones amorphes au sein du composé cristallin, plutôt qu'une altération homogène et progressive de la cristallinité de l'ensemble de l'échantillon.

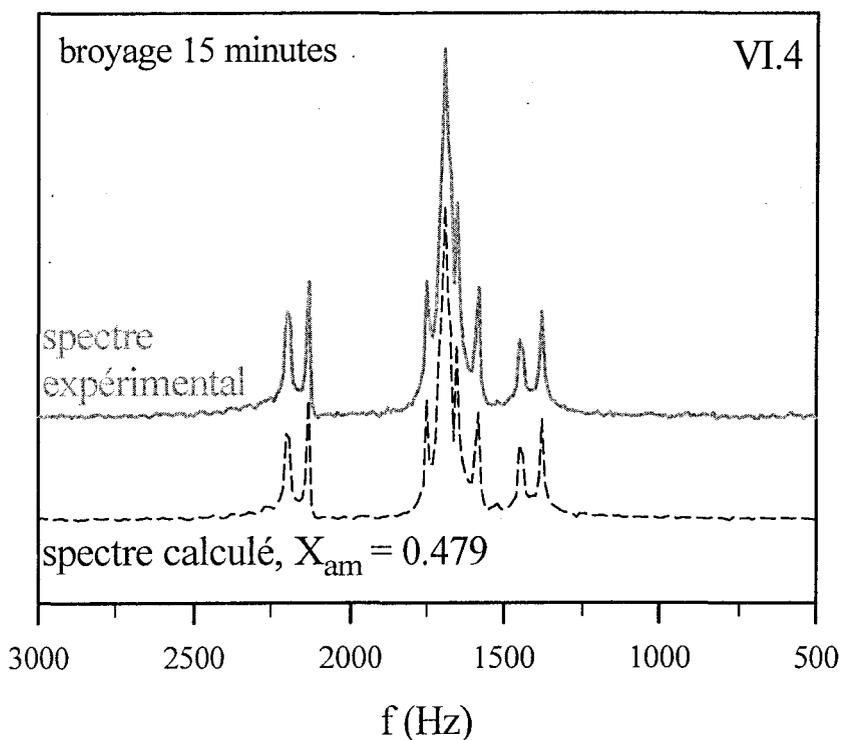
Ces résultats de RMN démontrent que le broyage mécanique influe directement sur la structure intramoléculaire du tréhalose, en autorisant des déplacements chimiques inaccessibles aux atomes de carbone du composé non broyé. La conformation interne des molécules de tréhalose à l'état amorphe est donc profondément perturbée par rapport à l'état cristallin.

➤ Evaluation par RMN du taux d'amorphe dans l'échantillon broyé

La quantification du taux d'amorphe par RMN du carbone, dans les échantillons de tréhalose broyés, repose sur l'hypothèse de la coexistence au sein de l'échantillon, d'une fraction cristalline intacte et d'une fraction complètement amorphe notée  $X_{\text{(amorphe)}}$ . Chaque spectre de tréhalose broyé est nécessairement une combinaison linéaire du spectre du tréhalose  $T_{\beta}$  parfaitement cristallin (figure VI.3, spectre 1), et du spectre du tréhalose broyé 20 h (figure VI.3, spectre 6), totalement amorphe. Les spectres des échantillons broyés  $S_i$  peuvent donc être correctement décrits par la relation :

$$S(t) = X_{\text{am}}(t).S(t = 20 \text{ h}) + (1-X_{\text{am}}(t)).S(t = 0) \quad (\text{VI.1})$$

où  $X_{\text{am}}(t)$  est la fraction de tréhalose amorphisée par broyage,  $S(t = 20 \text{ h})$  le spectre de l'amorphe (spectre 6) et  $S(t = 0)$  le spectre du cristal (spectre 1). La méthode des moindres carrés permet de trouver le meilleur affinement, qui fournit la valeur de la fraction amorphisée pour un temps de broyage donné. La **figure VI.4** présente, pour l'échantillon broyé 15 minutes, le spectre (3) expérimental (courbé en trait plein) et le spectre calculé (courbe pointillée), obtenu par combinaison linéaire des spectres (1) et (6).



*Figure VI.4 :*

*En haut : spectre expérimental (3) du tréhalose broyé 15 minutes*

*En bas : spectre calculé par combinaison linéaire des spectres 1 et 6*

Le spectre calculé par combinaison linéaire est tout à fait comparable au spectre expérimental, et la fraction amorphisée est dans ce cas évaluée à  $X_{\text{am}}(t) = 47.9 \%$ . La cohérence entre le spectre expérimental et le spectre calculé renforce, a posteriori, l'hypothèse de départ de domaines séparés de cristal et d'amorphe.

Nous avons donc appliqué cette méthode pour déterminer la fraction amorphisée à chaque temps de broyage. Les différentes valeurs de  $X_{\text{am}}(t)$  ainsi calculées sont reportées dans le **tableau VI.3**. Ces valeurs de  $X_{\text{am}}(t)$  mettent en évidence une augmentation rapide de la fraction amorphisée au cours des premières étapes du broyage. Au bout de 15 min de broyage, près de la moitié de l'échantillon apparaît déjà complètement amorphisée. Cette proportion d'amorphe est supérieure à celle donnée par l'ATD pour la même durée de broyage. La comparaison des résultats extraits des deux techniques fait l'objet du paragraphe suivant.

Temps de broyage	$X_{\text{am}}(t)$
0	0 %
5 min	19.80 %
15 min	47.90 %
1 h	81.20 %
2 h	90.70 %
20 h	100 %

*Tableau VI.3:*

*Fraction de tréhalose amorphisée par broyage, déterminée par RMN  $^{13}\text{C}$*

## C. ANALYSE ET DISCUSSION

Deux aspects du broyage du tréhalose sont discutés dans cette section. Tout d'abord, nous comparons au paragraphe D.1 les valeurs de la fraction amorphisée fournies par l'ATD et la RMN  $^{13}\text{C}$ . Le paragraphe D.2 est consacré à la question du mécanisme d'amorphisation par broyage.

### C.1. Confrontation des résultats d'ATD et de RMN pour la quantification du taux d'amorphe

La figure VI.5 met en confrontation les fractions amorphisées déterminées d'après les résultats d'ATD d'une part (O), et ceux de RMN  $^{13}\text{C}$  d'autre part ( $\Delta$ ), en fonction de la durée de broyage.

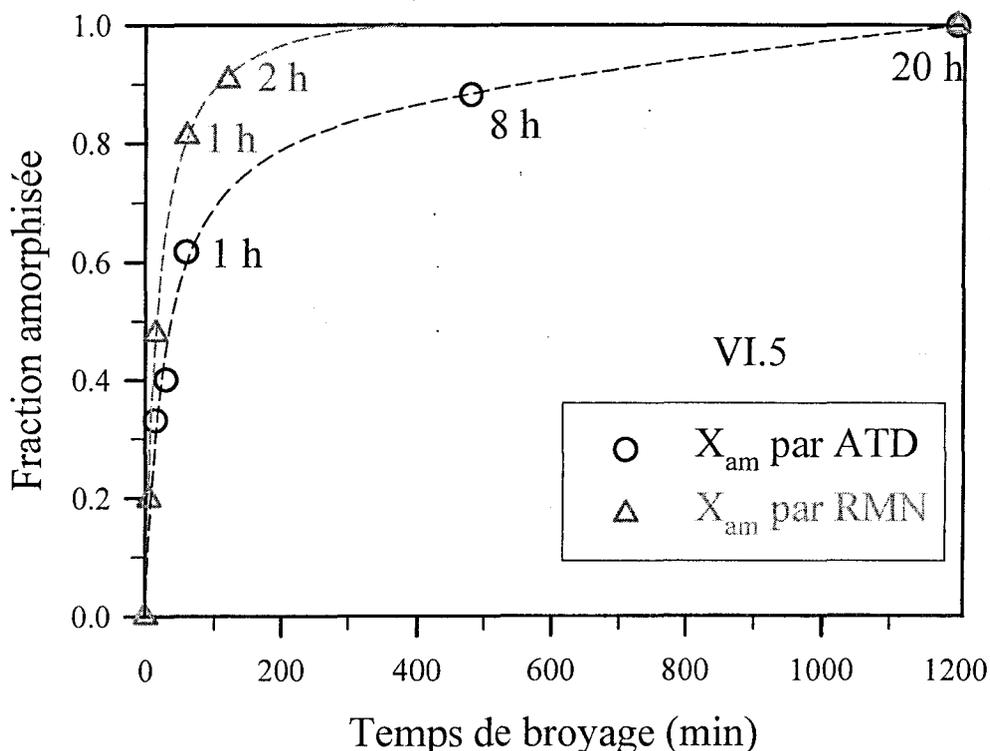


Figure VI.5 :

Fraction de tréhalose amorphisée en fonction de la durée du broyage, déterminée d'après les résultats d'ATD (O) et de RMN ( $\Delta$ ).

Les deux techniques de quantification utilisées amènent une évolution au cours du temps de la fraction amorphisée comparable. On peut toutefois souligner les points suivants :

**Pour 20 h de broyage**, la concordance des résultats d'ATD et de RMN (100 % d'amorphe) est intrinsèque à l'hypothèse de départ pour le traitement des résultats RMN : d'après les résultats de DX, et par comparaison avec le spectre du liquide trempé, nous avons postulé qu'après 20 h de broyage l'amorphisation était totale, et que le spectre  $^{13}\text{C}$  de l'échantillon, identique à celui du liquide trempé, constituait une référence pour le calcul de  $X_{\text{am}}(t)$ .

**Pour les temps de broyage intermédiaires**, la proportion de tréhalose amorphe dans l'échantillon est toujours plus importante du point de vue de la RMN que du point de vue de l'ATD, à durée de broyage égale. Par exemple, après 1 h de broyage, la RMN conduit à  $X_{\text{am}}(t=1 \text{ h}) = 81.2 \%$ , tandis que l'ATD donne  $X_{\text{am}}(t=1 \text{ h}) = 60.3 \%$ . Deux raisons peuvent être invoquées pour expliquer ces différences :

- en ATD, pour les courts temps de broyage, le pic exothermique de cristallisation se mêle à l'endotherme associé au rattrapage enthalpique du verre à  $T_g$ . Par conséquent, l'amplitude du saut de chaleur spécifique que nous mesurons est vraisemblablement sous estimée. La valeur de  $X_{\text{am}}(t)$  aux courts temps de broyage, calculée par ATD, serait alors inférieure à la proportion réelle de tréhalose amorphisé par broyage. Cette explication n'est toutefois plausible que pour les broyages de durée inférieure à 1 h. Pour des broyages de 1 et 8 h, la transition vitreuse et la cristallisation sont mieux séparées sur le thermogramme, ce qui autorise une mesure précise de l'amplitude du saut de  $C_p$ . Pourtant, même pour les broyages longs, la fraction amorphisée mesurée par ATD demeure inférieure à celle mesurée par RMN.
- les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  reflètent les déplacements chimiques des atomes de carbone des molécules de tréhalose. La technique est donc sensible aux distorsions pouvant être dues à l'introduction de désordre structural provoquant l'élargissement des pics RMN, mais n'induisant pas nécessairement d'amorphisation. Au cours du broyage, la création de défauts participant à la modification des spectres RMN ne peut pas être totalement exclue. Toutefois, on ne s'attend pas à ce que le broyage produise des défauts ponctuels, mais plutôt des défauts corrélés comme des dislocations. Ce type de désordre corrélé devrait se traduire sur les spectres par l'apparition de nouveaux pics à des fréquences déterminées. La figure VI.3 ne montre aucune trace de ce comportement, ce qui renforce l'hypothèse d'un système biphasique {cristal / amorphe}.

En ATD, le saut de  $C_p$  est uniquement sensible à la proportion d'amorphe dans l'échantillon. La présence éventuelle de défauts n'influe pas sur le saut de  $C_p$ , en revanche elle est susceptible de modifier l'apparence du pic de fusion. La RMN est vraisemblablement sensible non seulement à

la fraction amorphisée, mais aussi aux défauts introduits par le broyage. Ceci peut expliquer l'apparent désaccord entre les valeurs de  $X_{am}(t)$  évaluées par ces deux méthodes.

Cette étude montre qu'il existe de multiples possibilités de quantification de la fraction amorphisée. La RMN et l'ATD donnent des résultats globalement analogues, dont la pertinence pourrait être évaluée par des expériences complémentaires basées sur des mélanges physiques de tréhalose cristallin et de tréhalose amorphe, qui fourniraient une courbe d'étalonnage pour la fraction amorphisée.

## **C.2 Mécanisme d'amorphisation par broyage du tréhalose $T_\beta$**

Parmi les questions fondamentales qui entourent l'amorphisation à l'état solide, et en particulier l'amorphisation induite par broyage mécanique, celle du mécanisme d'amorphisation demeure irrésolue. Deux hypothèses principales sont habituellement envisagées pour expliquer cette transformation [3].

♦ **L'hypothèse de la fusion locale** : elle suggère que l'amorphisation d'un corps broyé mécaniquement soit due à un échauffement très local de l'échantillon provoqué par l'impact des billes de broyage sur la poudre. Cet échauffement ponctuel serait suffisamment important pour faire fondre le composé, et le brusque retour à la température de la jarre aurait pour effet de tremper le liquide ainsi formé, en produisant finalement un amorphe thermique. L'amorphisation induite par broyage mécanique ne serait pas à proprement parler une transformation à l'état solide, mais une succession de trempes thermiques locales.

Cette explication n'est pas satisfaisante dans le cas du tréhalose  $T_\beta$  broyé avec le protocole expérimental que nous avons choisi. En effet, la température de fusion du tréhalose  $T_\beta$  est très élevée (190°C), et il est improbable que l'échauffement dans la jarre de broyage soit suffisant pour atteindre cette température. D'autre part, des expériences préliminaires de cryobroyage du tréhalose  $T_\beta$ , réalisées au laboratoire, ont montré que l'amorphisation induite par broyage était plus efficace à la température de l'azote liquide qu'à température ambiante [8]. Ce résultat est donc en contradiction directe avec l'hypothèse d'une amorphisation par fusion locale.

♦ **L'hypothèse de l'amorphisation « pas à pas »** : elle postule que les chocs provoqués par les billes de broyage induisent des défauts dans l'édifice cristallin (par exemple des dislocations), par étapes successives et dans des directions cristallographiques précises. Ceci aurait pour effet de

générer des états désordonnés intermédiaires, et d'augmenter l'énergie du cristal. Si le broyage est suffisamment puissant, l'énergie du cristal présentant des défauts peut devenir supérieure à celle de l'amorphe, et entraîner de ce fait une transition directe cristal → amorphe.

Dans le cas du tréhalose  $T_{\beta}$  broyé, les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  montrent qu'il n'y a pas de modification progressive et globale de la structure cristalline. Le broyage semble provoquer directement la création de zones amorphes éparses, au sein des domaines cristallins non encore altérés. Ce résultat ne concorde pas avec le modèle d'amorphisation par étapes successives, puisqu'aucun état intermédiaire partiellement désordonné n'a pu être mis en évidence dans le cas du tréhalose. On peut par conséquent émettre deux hypothèses :

- soit le mécanisme d'amorphisation du tréhalose par broyage mécanique est totalement différent
- soit il est tellement efficace que le moindre impact des billes sur la poudre lors du broyage conduit directement à la transformation cristal → amorphe, sans passer par la création d'un cristal avec défauts.

En conclusion, nous avons montré dans ce chapitre que le broyage mécanique du tréhalose anhydre  $T_\beta$  produisait un amorphe possédant un caractère vitreux [5]. La température de transition élevée (118°C) du tréhalose permet de réaliser l'ensemble du processus de broyage à une température très inférieure à  $T_g$ . Le broyage du tréhalose  $T_\beta$  fournit donc un exemple original de transformation directe cristal  $\rightarrow$  verre à l'état solide.

Les thermogrammes des échantillons broyés présentent une allure complexe. En particulier, les pics de cristallisation et de fusion sont fortement perturbés. De ce fait, la quantification de la fraction amorphisée par la méthode classique de comparaison des enthalpies de cristallisation et de fusion s'avère délicate à mettre en œuvre dans le cas du tréhalose. L'estimation de  $X_{am}(t)$  par l'amplitude du saut de  $C_p$  est quant à elle gênée aux courts temps de broyage par la proximité de la transition vitreuse et de la cristallisation. La RMN  $^{13}C$  se révélerait dans ce cas plus pertinente pour quantifier le taux d'amorphe produit par le broyage. L'ATD et la RMN donnent une évolution globale cohérente de la fraction amorphisée au cours du temps de broyage, mais ne fournissent pas exactement les mêmes valeurs de  $X_{am}(t)$  pour une durée de broyage donnée. Ces différences proviennent vraisemblablement de la définition de « l'état amorphe » du point de vue de chacune des deux techniques.

Nos résultats montrent que le mécanisme d'amorphisation du tréhalose par broyage est incompatible avec l'hypothèse de fusions et trempes thermiques locales [2]. Avec le protocole de broyage que nous avons utilisé, la transformation cristal  $\rightarrow$  verre ne semble pas passer par une désorganisation intermédiaire du réseau cristallin, ce qui invaliderait a priori l'hypothèse d'une amorphisation par étapes successives. Ce dernier point nécessite toutefois d'être approfondi en effectuant par exemple des broyages moins énergétiques.

## REFERENCES

1. I. Tsukushi, O. Yamamuro, T. Matsuo, *Solid State Comm.* (1995), **94**, 12, 1691
2. F. Sussich, R. Urbani, F. Princivalle, A. Cesaro, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998), 7893
3. T.P. Shakhshneider, V.V. Boldyrev, dans « Reactivity of Molecular Solids », édité par E. Boldyreva et V. Boldyrev, 1999
4. Y. Roos, « Phase Transitions in Foods », Academic Press, New York, 1995
5. J.F Willart, A. De Gusseme, S. Hémon, G. Odou, F. Danède, M. Descamps, *Solid State Comm.* (2001), **119**, 501
6. G.A. Jeffrey, R. Nanni, *Carb. Res.*, **137** (1985), 21
7. P. Zhang, A.N. Klymachyov, S. Brown, J.G. Ellington, P.J. Grandinetti, *Solid State NMR*, **12** (1998), 221
8. V. Caron, communication

## **CHAPITRE VII**

**Etude des transformations de phases du tréhalose  
associées à ses différentes modes de déshydratation**



De manière générale, les interactions des matériaux avec l'eau constituent une préoccupation majeure des industries pharmaceutique et agroalimentaire. En effet, l'eau influe directement sur la stabilité des composés, et peut donc entraîner des modifications physiques importantes lors de la formulation ou du stockage des produits [1]. Dans le cas du tréhalose, les interactions du tréhalose avec l'eau sont supposées être en lien direct avec les propriétés bioprotectrices « exceptionnelles » de ce disaccharide [2-4]. La déshydratation des systèmes {tréhalose / eau} constitue de ce fait un domaine d'investigations de première importance.

Nous avons réalisé, dans le cadre de cette thèse, une étude des transformations du tréhalose induites par déshydratation. Deux cas ont été plus particulièrement étudiés :

- la déshydratation du tréhalose dihydrate cristallin
- la lyophilisation d'une solution {tréhalose / eau}

## **A. ETUDE DE LA DESHYDRATATION DU TREHALOSE DIHYDRATE**

Les hydrates stœchiométriques sont courants parmi les matériaux moléculaires [1] (cf. chapitre II, section A). L'évacuation des molécules d'eau faisant partie intégrante de la structure cristalline entraîne souvent des transformations de phases. Ce sont, par exemple, la formation de phases anhydres cristallines [5], ou plus rarement, l'amorphisation du composé [6-7]. Nous abordons dans cette section le problème de la déshydratation du tréhalose dihydrate  $T_{2H_2O}$ . Le système considéré contient deux molécules d'eau par molécule de sucre, c'est-à-dire une concentration massique d'eau de 9.5%.

La possibilité d'amorphiser et de vitrifier le tréhalose par déshydratation de  $T_{2H_2O}$  a été mise en évidence en 1996 [8], et a fait depuis l'objet de multiples études [9-12]. Cependant, la nature et les propriétés de cet état vitreux demeurent incertaines. On peut en particulier souligner les points suivants :

- le caractère vitreux lui-même de l'amorphe formé par déshydratation reste sujet à controverse. Sussich et al. [11] ont affirmé que la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  produisait bien une phase amorphe, mais non vitreuse (la phase vitreuse ne pouvant provenir, d'après [11], que de la trempe thermique du liquide en dessous de  $T_g$ ).
- la température de transition vitreuse du tréhalose varie considérablement suivant les sources bibliographiques :  $79^\circ\text{C}$  [13]  $< T_g < 115^\circ\text{C}$  [8,14].
- de multiples interprétations ont été proposées pour expliquer l'enthalpie anormalement faible du verre issu de la déshydratation [8]

- il y a une grande confusion quant au polymorphisme sous-jacent à la déshydratation [9,11]. En plus des deux phases cristallines bien connues du tréhalose, que sont la phase anhydre  $T_\beta$  [15] et la phase dihydrate  $T_{2H_2O}$  [16,17], une autre phase anhydre, notée  $T_\alpha$ , se développe dans des conditions de déshydratations particulières ( $T_{2H_2O}$  se déshydrate en  $T_\alpha$  après 4 h d'isotherme sous vide à 85°C [11,18]). La phase  $T_\alpha$  a été signalée pour la première fois en 1962, mais ses conditions d'apparition demeurent floues. Un autre polymorphe,  $T_\gamma$ , issu de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  par chauffage à 5-20°C/min a été annoncé par Sussich et al. [11]. Toutefois, ces auteurs ont récemment identifié la phase  $T_\gamma$  comme étant en fait un mélange de  $T_{2H_2O}$  et  $T_\beta$  [10].

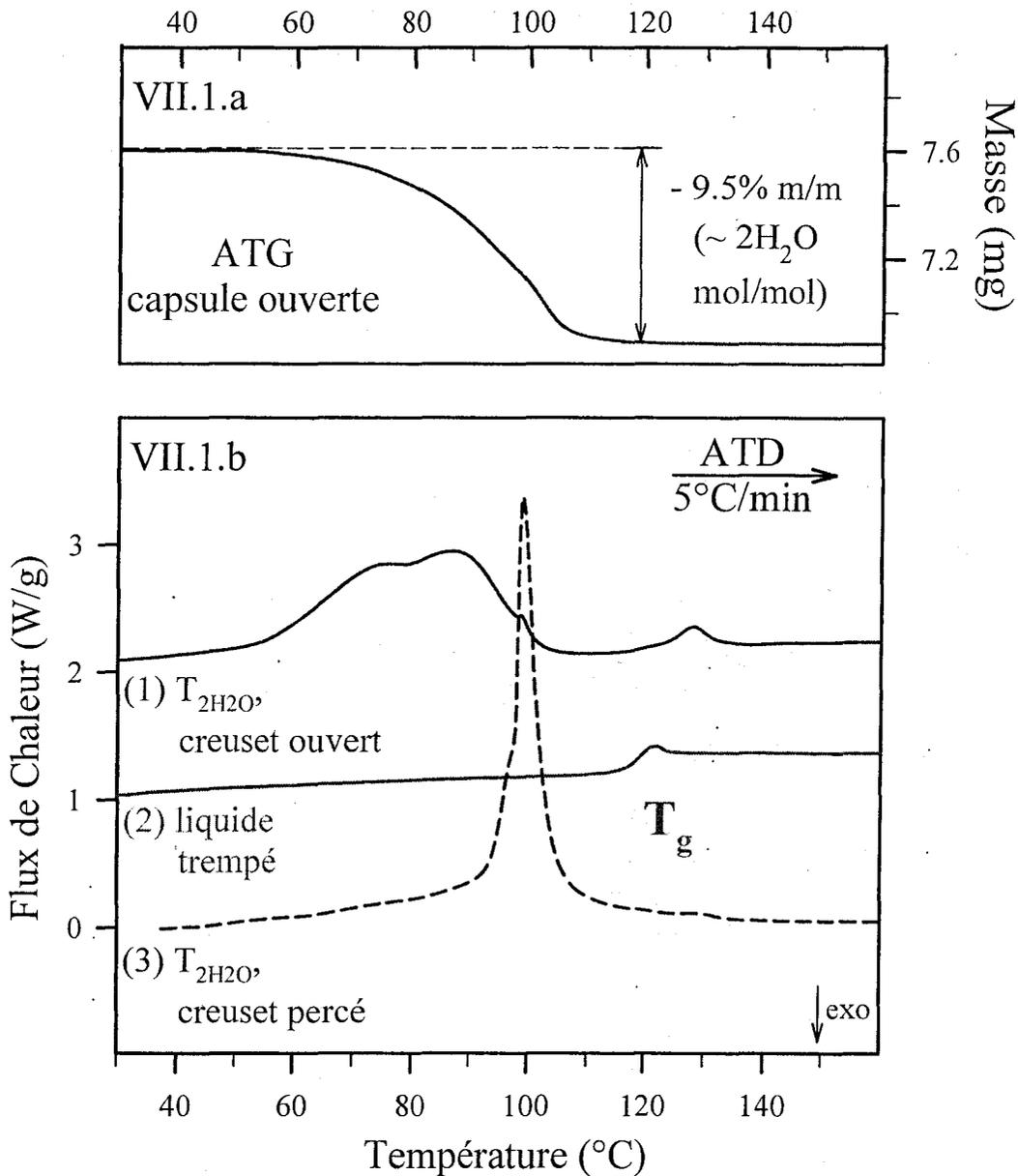
Ces données illustrent bien la difficulté d'identifier les phases polymorphes du tréhalose obtenues par déshydratation, et de maîtriser les conditions de déshydratation qui les génèrent. Notre objectif est d'éclaircir ces problèmes par une étude thermodynamique et structurale de la déshydratation du tréhalose dihydrate. Ce travail s'appuie sur l'utilisation de protocoles de déshydratation adaptés et parfaitement contrôlés. Les principales techniques utilisées sont l'ATD, l'ATG et la DX sur poudre résolue en temps.

## **A.1. Influence du protocole de déshydratation sur la nature de l'anhydre formé**

### **1. Optimisation des conditions expérimentales**

La **figure VII.1** présente les profils ATD d'échantillons de tréhalose dihydrate déshydratés par chauffage à 5°C/min, dans différents types de creusets. La courbe 1 de la figure VII.1.b a été enregistrée avec un creuset ouvert. Ce thermogramme présente deux accidents enthalpiques distincts :

- un large endotherme qui s'étend de 30 à 100°C. La figure VII.1.a, qui montre la courbe d'ATG enregistrée dans les mêmes conditions, révèle que sur ce même domaine de température l'échantillon subit une perte de masse de 9.5%, ce qui correspond très exactement à la perte de deux molécules d'eau par molécule de tréhalose. Ce résultat indique que le large endotherme de la figure VII.1.b correspond à la déshydratation au chauffage de  $T_{2H_2O}$ . La déshydratation totale de  $T_{2H_2O}$  est achevée à 100°C, et ne masque donc pas la zone de transition vitreuse ( $\approx 118^\circ\text{C}$ )
- un petit accident enthalpique situé entre 115°C et 130°C, c'est-à-dire dans la zone de la transition vitreuse du liquide trempé (fig. VII.1.b, courbe 2). Sa nature et son origine feront l'objet du paragraphe suivant.



*Figure VII.1 :*

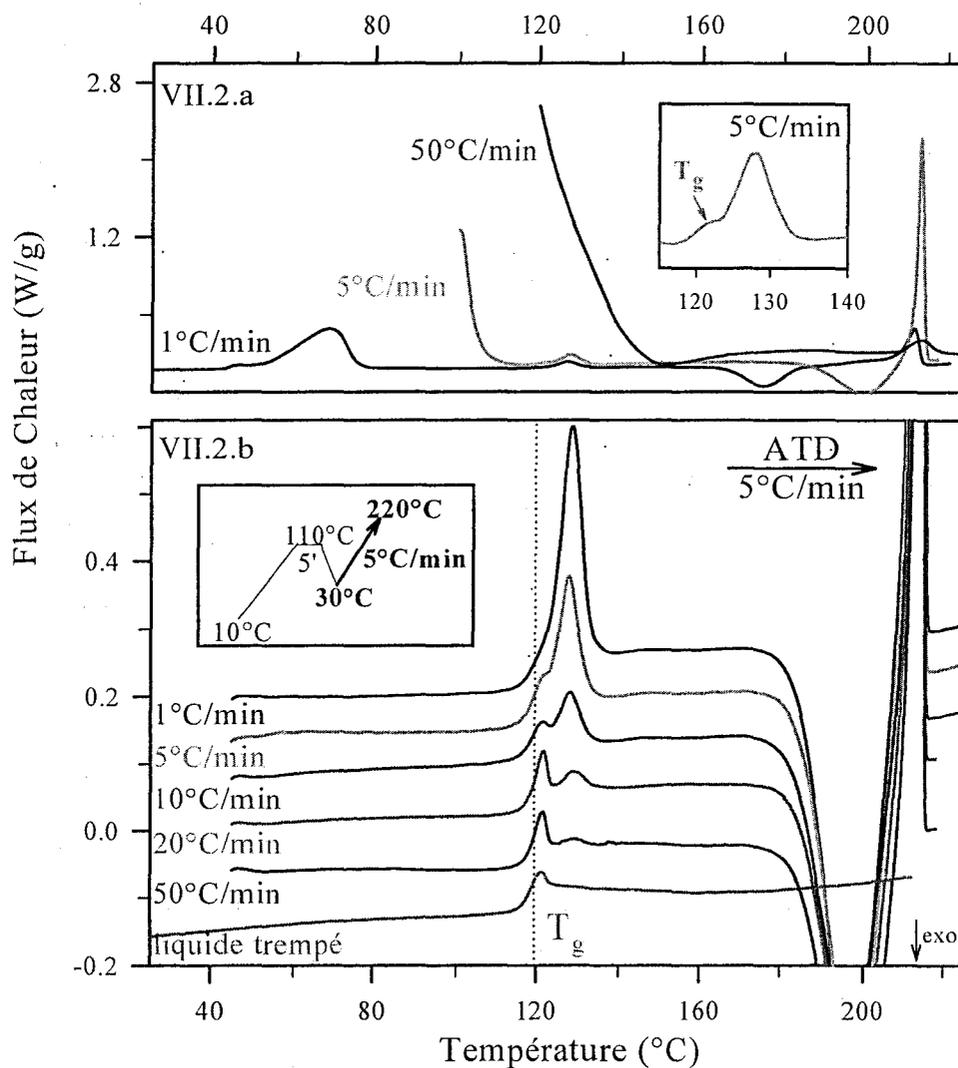
- a. ATG au chauffage à 5°C/min d'un échantillon de tréhalose dihydrate. La perte de masse de 9.5 % correspond exactement aux deux molécules d'eau qui s'évacuent du composé
- b. Thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min : (1) d'un échantillon de T<sub>2H<sub>2</sub>O</sub> placé dans un creuset ouvert, (2) du verre formé par trempage thermique, (3) d'un échantillon de T<sub>2H<sub>2</sub>O</sub> placé dans un creuset fermé

La courbe 3 montre le thermogramme obtenu au réchauffage de T<sub>2H<sub>2</sub>O</sub> avec un protocole expérimental identique, mais dans un creuset fermé d'un couvercle percé. Le résultat diffère sensiblement de celui obtenu en creuset ouvert : le processus de déshydratation au chauffage est contrarié, ce qui a pour effet de repousser l'endotherme de déshydratation vers les hautes températures. La déshydratation se prolonge au-delà de 130°C, empêchant ainsi l'observation de la zone de transition vitreuse. Nous avons donc choisi de réaliser toutes les expériences d'ATD

concernant le tréhalose dihydrate en creuset ouvert, d'une part pour améliorer la reproductibilité des expériences, d'autre part pour se rapprocher au mieux des conditions expérimentales de l'ATG et de la DX en température, qui s'effectuent en milieu ouvert.

**2. Influence de la vitesse de chauffage sur la déshydratation sur le comportement au chauffage de l'échantillon déshydraté**

La figure VII.2.a rassemble les courbes d'ATD de différents échantillons de  $T_{2H_2O}$ , enregistrées au chauffage, pour des vitesses de 1, 5 et 50°C/min.



*Figure VII.2 :*

- a. thermogrammes de trois échantillons de  $T_{2H_2O}$ , enregistrés au chauffage, respectivement à 1, 5 et 50°C/min
- b. thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min, d'échantillons de  $T_{2H_2O}$  préalablement déshydratés suivant le protocole donné en insert. Les vitesses indiquées sur les courbes correspondent aux vitesses de chauffe utilisées pendant l'étape de déshydratation, pour atteindre 110°C.

Les accidents enthalpiques observés sur chaque thermogramme sont ceux décrits au paragraphe précédent. L'étude attentive du thermogramme enregistré à 5°C/min (insert de la figure VII.2.a) révèle que l'endotherme intervenant vers 125°C est plus complexe qu'une simple transition vitreuse, et se décompose en deux accidents enthalpiques distincts :

- un saut de  $C_p$  caractéristique d'une transition vitreuse
- un endotherme de faible amplitude que l'on pourrait associer à la fusion d'une phase cristalline.

Pour un chauffage plus lent (1°C/min) cette complexité n'est pas perceptible ; pour une vitesse de chauffe supérieure (50°C/min), elle est occultée par le déplacement de l'endotherme de déshydratation vers les hautes températures. Pour nous affranchir de cet effet et étudier en détails le domaine de la transition vitreuse, nous avons adopté un protocole de déshydratation plus adéquat, schématisé dans l'insert de la figure VII.2.b.

Dans les expériences de la **figure VII.2.b**, les échantillons de  $T_{2H_2O}$  ont d'abord été déshydratés suivant le protocole reproduit en insert : ils ont été chauffés à 110°C, avec des vitesses de chauffe allant de 1 à 50°C/min, maintenus à cette température pendant 5 minutes, puis ramenés à température ambiante. Le tréhalose ainsi déshydraté a alors été réchauffé à la vitesse de 5°C/min jusqu'à la fusion ; les thermogrammes de la figure VII.2.b correspondent à cette étape finale de chauffage de l'anhydre. Le traitement thermique détaillé ci-dessus permet d'observer distinctement la zone de transition vitreuse des échantillons déshydratés.

Dans ces conditions, le comportement suspecté sur la figure VII.2.a apparaît clairement pour toutes les vitesses de chauffe. L'endotherme situé entre 120 et 130°C se divise en deux accidents successifs rapprochés :

- un saut de  $C_p$  à 118°C qui coïncide exactement avec celui du liquide trempé, quelle que soit la vitesse de déshydratation préalable
- un endotherme, qui s'apparente à une fusion, et dont l'enthalpie varie avec la vitesse de déshydratation. Ce pic est pratiquement inexistant lorsque l'échantillon est déshydraté rapidement (50°C/min) ; en revanche, pour une déshydratation lente (1°C/min), il est tellement développé qu'il masque la transition vitreuse, repérable uniquement à un léger épaulement situé sur le flanc gauche de l'endotherme

Les thermogrammes présentent tous à haute température deux accidents enthalpiques successifs. Le premier, exothermique, marque la cristallisation de l'amorphe vers la phase  $T_\beta$ . Le second, endothermique, correspond à la fusion finale du tréhalose. Sur la figure VII.2.b, la recristallisation vers  $T_\beta$  intervient toujours dans le même domaine de température, et avec la même enthalpie, quelle que soit la vitesse de déshydratation. Au contraire, la figure VII.2.a montre des pics de recristallisation et de fusion dont l'enthalpie diminue quand la vitesse de chauffe augmente. Ce comportement s'explique simplement par la réduction du temps passé dans la zone de

recristallisation de la phase  $T_\beta$  lorsque la vitesse de chauffage augmente. Pour des vitesses élevée (50°C/min), la cristallisation du tréhalose  $T_\beta$  n'est pas complète. Seule une fraction de l'échantillon est donc susceptible de fusionner, ce qui explique le faible enthalpie de l'endotherme de fusion.

Ces résultats d'ATD montrent que la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  entraîne des transformations complexes :

- un **chauffage « rapide »** (50°C/min) provoque majoritairement l'**amorphisation** du tréhalose
- un **chauffage « lent »** (1°C/min) conduit essentiellement à la **formation d'une phase anhydre**, dont la température de fusion se situe juste au-dessus de  $T_g$ . De par sa température de fusion (130°C), cette phase anhydre s'apparente à la phase  $T_\alpha$ , d'après les travaux de Reisener et al. [18]. Les caractéristiques structurales de cette phase, étudiées par Diffraction des rayons X, font l'objet du paragraphe A.2.
- des **vitesses de chauffe intermédiaires** conduisent à un état anhydre constitué d'amorphe et de phase  $T_\alpha$ , dont les proportions varient en fonction du protocole de déshydratation adopté.

Les résultats de la figure VII.2.b montrent que les températures de transition vitreuse (118°C) et de fusion de la phase  $T_\alpha$  (130°C) sont très proches. D'autre part, les endothermes correspondant respectivement à la ré-équilibration enthalpique du verre à  $T_g$  et à la fusion de la phase  $T_\alpha$ , ont des amplitudes relatives fortement dépendantes de la vitesse de chauffage utilisée. Dans ces conditions, il est très difficile de dissocier la transition vitreuse de la fusion de  $T_\alpha$ , ce qui peut expliquer les divergences d'interprétation relevées dans les publications antérieures.

## A.2. Identification structurale des états stationnaires atteints par déshydratation

Pour déterminer précisément la nature structurale de la phase formée par déshydratation, nous avons analysé par Diffraction des rayons X les échantillons préalablement déshydratés avec deux des traitements thermiques de la figure VII.2.b. La **figure VII.3.a** présente les diagrammes de DX, enregistrés à température ambiante, d'échantillons de  $T_{2H_2O}$  déshydratés par chauffage à 110°C, à la vitesse de 1°C/min (courbe 2) et 50°C/min (courbe 3). A titre comparatif, les diagrammes de DX des phases cristallines  $T_{2H_2O}$  et  $T_\beta$ , ainsi que celui du verre de liquide, sont représentés sur les courbes 1, 5 et 4 respectivement.

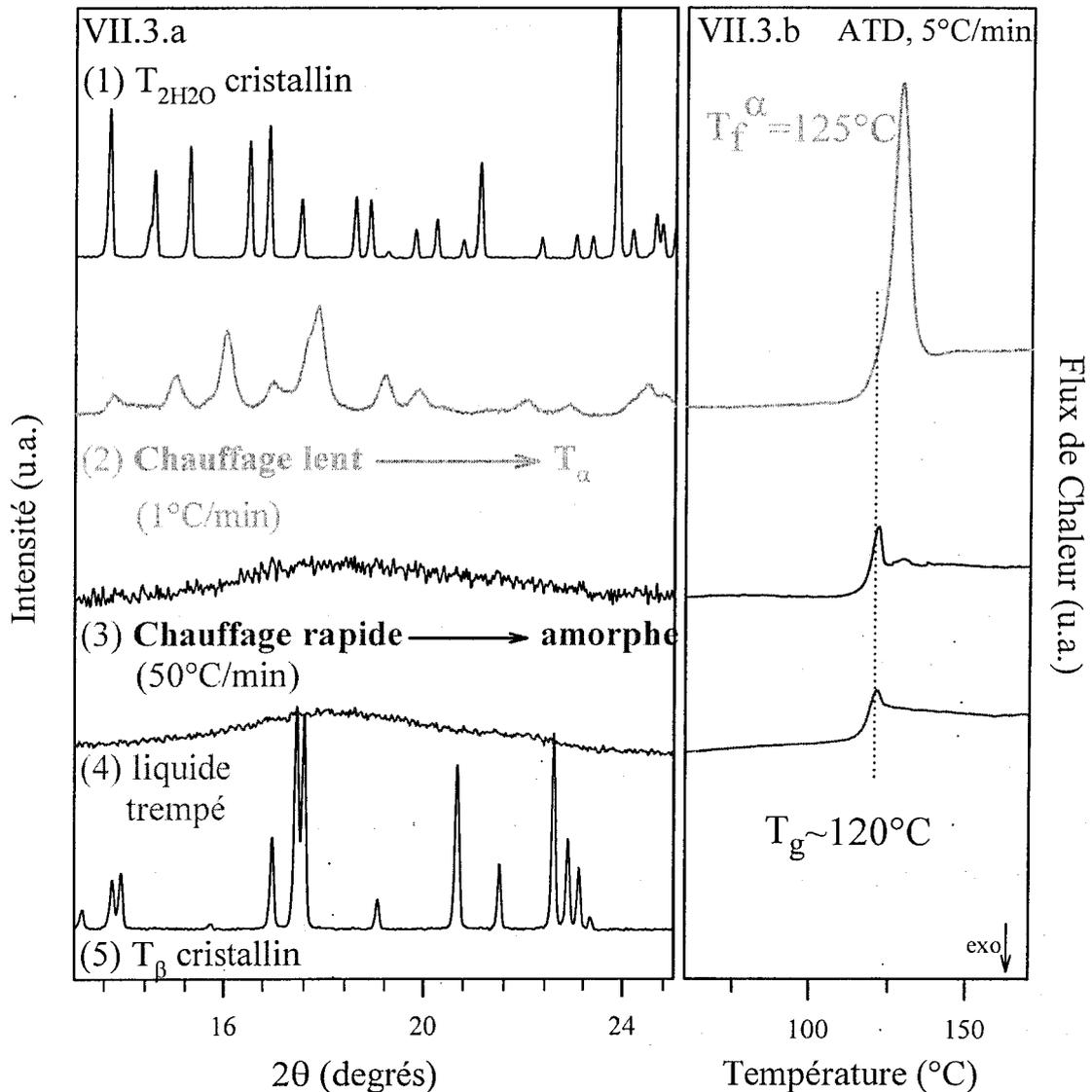


Figure VII.3 :

- a. diagrammes de DX, enregistrés à température ambiante, (1) du tréhalose dihydrate  $T_{2H_2O}$  (2) du tréhalose déshydraté par chauffage lent à 110°C, (3) du tréhalose déshydraté par chauffage rapide à 110°C, (4) du verre de liquide, (5) du tréhalose anhydre  $T_\beta$
- b. thermogrammes correspondants, enregistrés au chauffage à 5°C/min

La figure VII.3.a montre que le résultat de la déshydratation dépend considérablement de la vitesse de chauffage :

- pour l'échantillon de  $T_{2H_2O}$  **chauffé rapidement (50°C/min)**, le diagramme de DX est un halo diffus similaire à celui du liquide trempé. Le thermogramme de la figure VII.3.b rappelle que cet anhydre présente au chauffage un saut de  $C_p$  à 118°C, associé à une transition vitreuse. Ce saut de  $C_p$  montre que l'amorphe obtenu présente un caractère vitreux. Le chauffage rapide de  $T_{2H_2O}$  induit donc une **vitrification à l'état solide**. La vitrification directe induite par

déshydratation d'hydrates stœchiométriques cristallins est une transformation relativement rare. A notre connaissance, elle n'a été signalée que dans le cas du raffinose pentahydrate [6], de l'acétate de magnésium tétrahydrate [7], et de quelques principes actifs comme l'ampicilline trihydrate [19].

- pour l'échantillon de  $T_{2H_2O}$  chauffé lentement ( $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ), le diagramme de DX présente des pics de Bragg qui ne correspondent ni à ceux de la phase dihydrate de départ, ni à ceux de la phase anhydre stable  $T_\beta$ . Le chauffage lent de  $T_{2H_2O}$  entraîne donc une transition cristal  $\rightarrow$  cristal vers une forme anhydre métastable, notée  $T_\alpha$ . Les raies de Bragg de cette phase possèdent une largeur trois fois supérieure à celle des pics de  $T_{2H_2O}$  et de  $T_\beta$ . Cette particularité sera discutée ultérieurement.

Pour connaître l'évolution en température de la phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation, et identifier clairement l'endotherme présent à  $130^\circ\text{C}$  sur les figures VII.2 et VII.3, nous avons réalisé une expérience de déshydratation de  $T_{2H_2O}$  suivie par DX résolue en temps. La DX résolue en temps permet d'étudier directement la transition  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$ , contrairement à l'ATD pour laquelle l'endotherme de déshydratation masque la transition. L'expérience a été effectuée dans les laboratoires d'Aventis, sur le Diffractomètre Bruker D5000. Elle consiste en l'acquisition rapide de diagrammes de DX (8 minutes par diagramme) au cours d'une rampe de température de  $20^\circ\text{C}$  à  $220^\circ\text{C}$ , à  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . L'expérience s'effectue sous balayage d'azote sec, afin de reproduire au mieux les conditions expérimentales de l'ATD et de l'ATG.

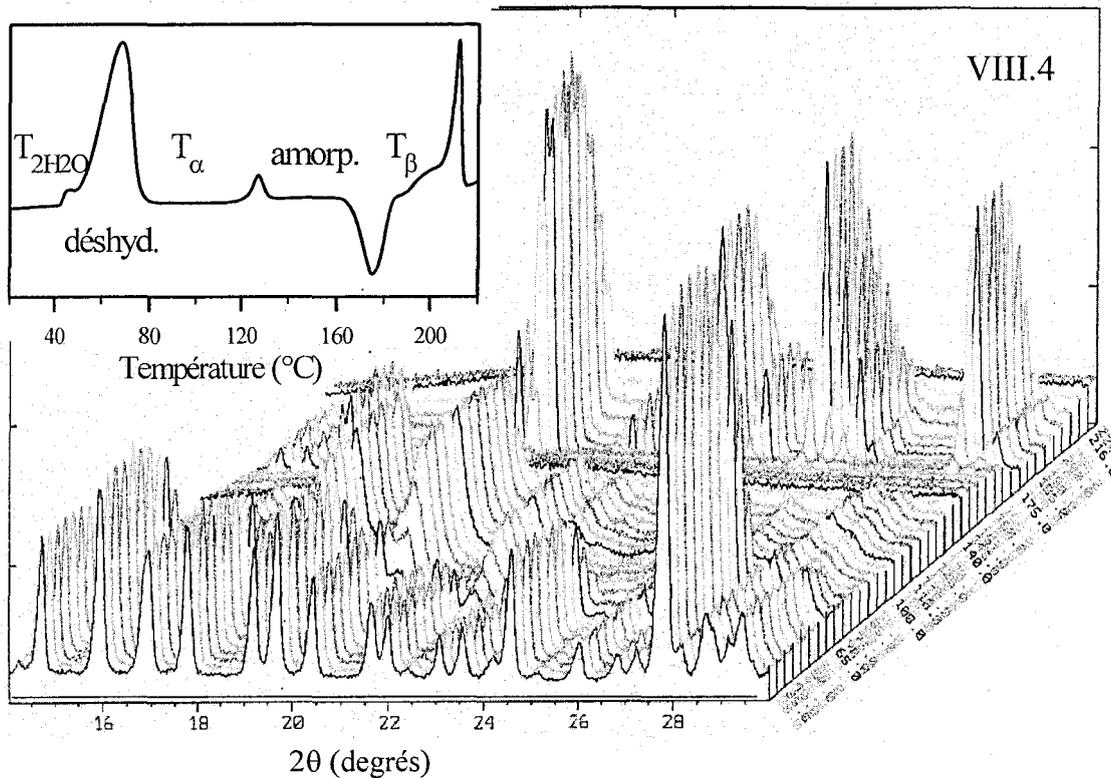
La **figure VII.4** présente l'évolution du diagramme de DX de l'échantillon au cours de la déshydratation. En insert, le thermogramme enregistré dans les mêmes conditions (précédemment montré en figure VII.2.b) permet d'observer les signatures calorimétriques des transitions observées en diffraction des rayons X.

**Entre  $20^\circ\text{C}$  et  $100^\circ\text{C}$** , c'est-à-dire pendant la déshydratation, la figure VII.4 montre que les pics de Bragg caractéristiques de  $T_{2H_2O}$  disparaissent progressivement (par exemple :  $2\theta = 27^\circ$ ). Parallèlement, on voit croître sur le diagramme de nouveaux pics, caractéristiques de la phase anhydre  $T_\alpha$  (par exemple :  $2\theta = 21^\circ$ ). Cette transformation n'est pas visible en ATD, puisqu'elle est occultée par l'endotherme de déshydratation.

**A partir de  $125^\circ\text{C}$** , la disparition des pics de Bragg de la phase  $T_\alpha$  au profit d'un halo de diffusion caractéristique d'un amorphe signale la fusion de la phase  $T_\alpha$ . L'endotherme situé à  $130^\circ\text{C}$ , visible sur le thermogramme placé en insert, correspond donc clairement à la fusion de la phase  $T_\alpha$ . A  $140^\circ\text{C}$ , l'échantillon de tréhalose est complètement amorphe.

A  $160^{\circ}\text{C}$ , il se développe des raies de Bragg caractéristiques de la phase anhydre  $T_{\beta}$ . Cette cristallisation correspond exactement au pic exothermique dont l'onset se trouve à  $160^{\circ}\text{C}$ , visible sur le thermogramme de l'insert.

Au delà de  $200^{\circ}\text{C}$ , la disparition des raies de Bragg de  $T_{\beta}$  signale la fusion finale de l'échantillon. Elle correspond sur le thermogramme au pic endothermique situé à  $190^{\circ}\text{C}$ . Après cette fusion, le tréhalose se trouve en phase liquide, et aucune autre transformation structurale ne se produit, avant la décomposition chimique.



*Figure VII.4 :*

Diagrammes de DX enregistrés au cours du chauffage à  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  ( $\lambda(\text{Co}, K_{\alpha}) = 1.791 \text{ \AA}$ ). Ils montrent la disparition progressive des raies de Bragg de la forme  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  au profit de celles de la forme  $T_{\alpha}$ . La fusion de cette phase se manifeste à partir de  $125^{\circ}\text{C}$  par la disparition des pics de Bragg. Au-delà de  $160^{\circ}\text{C}$ , c'est la forme  $T_{\beta}$  qui cristallise. En insert, thermogramme de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  enregistré à la même vitesse,  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

La dualité cristal ( $T_{\alpha}$ ) / verre au sein de l'échantillon déshydraté semble donc être à l'origine des caractéristiques variables de la transition vitreuse de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  reportées jusqu'à présent dans la littérature [8-13]. Ces incohérences concernent à la fois la température de transition vitreuse  $T_g$  et le niveau enthalpique du verre produit par déshydratation. Les résultats expérimentaux que nous avons obtenus [20] montrent que :

- les températures de transition vitreuse ( $118^{\circ}\text{C}$ ) et de fusion de la phase  $T_{\alpha}$  ( $125^{\circ}\text{C}$ ) sont très proches

- l'enthalpie de fusion de la phase  $T_\alpha$  est très faible (11.2 J/g à 5°C/min), et comparable au rattrapage enthalpique du verre formé par déshydratation rapide de  $T_{2H_2O}$ . La proximité et la similarité de ces deux accidents enthalpiques sont à l'origine de la difficulté de discerner nettement la transition vitreuse de la fusion de la phase  $T_\alpha$ . Ceci explique vraisemblablement les résultats variés et controversés quant à la nature de l'anhydre formé par déshydratation  $T_{2H_2O}$ . En particulier, l'enthalpie anormalement faible du verre formé par déshydratation, annoncée par Ding et al. [8], apparaît ici tout à fait classique. L'endotherme important observé dès 125°C doit en fait être attribué à la fusion de  $T_\alpha$ , et non au rattrapage enthalpique du verre à  $T_g$ .

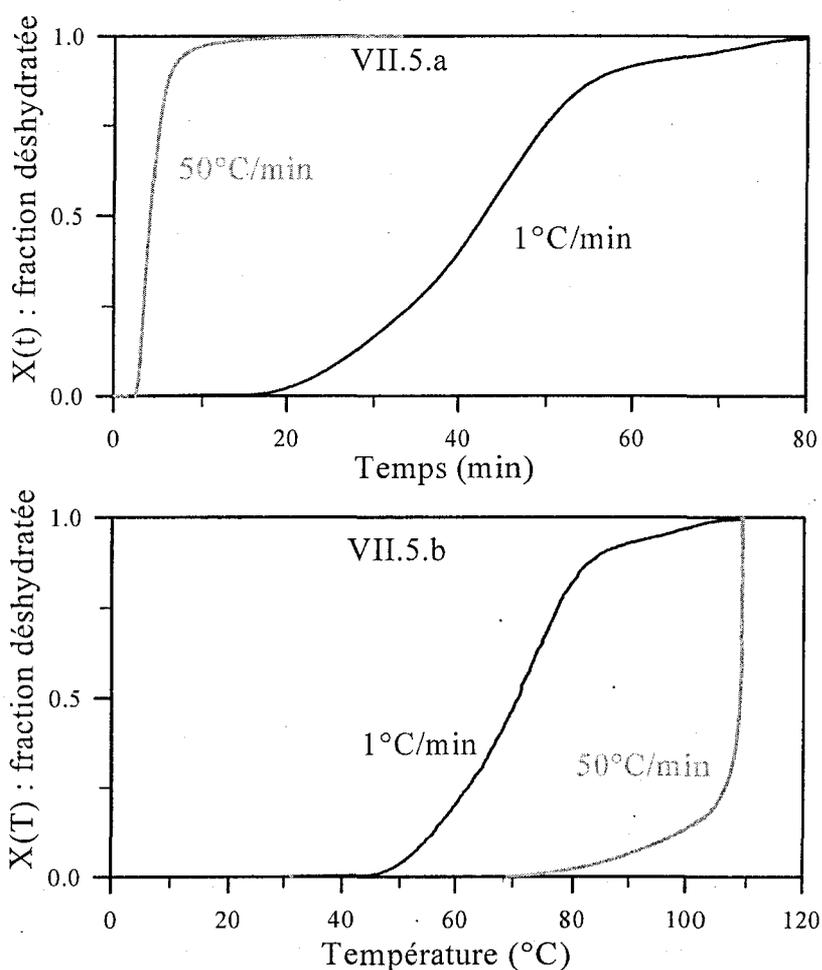
### A.3. Recherche des paramètres de contrôle du processus de déshydratation

L'un des principaux objectifs de cette étude est l'évaluation du caractère dynamique des transformations induites par déshydratation. A plus long terme, le but est d'établir des diagrammes de phases dynamiques permettant de prédire les transformations structurales subies par les hydrates lors de leur déshydratation. Une telle approche a déjà été mise en œuvre dans le cas du broyage de composés métalliques, pour lequel des paramètres de forçage ont été proposés (cf. chapitre II, section A). Au contraire, aucun travail de ce genre n'a jusqu'alors été entrepris pour les processus de déshydratation. Dans ce cas, les paramètres de forçage qui gouvernent les transformations restent à définir. Les diverses études menées sur les processus de déshydratation montrent que de nombreux facteurs sont susceptibles d'intervenir de manière décisive [21].

Nos résultats sur la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  ont mis en évidence que la dualité amorphe / cristal de l'anhydre obtenu après déshydratation dépendait fortement du protocole de chauffage utilisé pour déshydrater  $T_{2H_2O}$  :

- pour un chauffage lent (1°C/min), la déshydratation produit majoritairement une phase cristalline ( $T_\alpha$ )
- pour un chauffage rapide (50°C/min), la déshydratation produit principalement une phase amorphe
- pour des vitesses de chauffe intermédiaires, on obtient un composé mixte d'amorphe et de phase  $T_\alpha$ , en proportions fixées par le protocole de chauffage.

La **figure VII.5** montre l'évolution de la fraction de  $T_{2H_2O}$  déshydratée, en fonction du temps (VII.5.a) et de la température (VII.5.b), pour deux échantillons de tréhalose chauffés à 1 et 50°C/min.



*Figure VII.5 :*

*Evolution de la fraction déshydratée en fonction du temps (a) et de la température (b), pour des vitesses de chauffe de 1 et  $50^\circ\text{C}/\text{min}$*

Pour chaque vitesse de chauffe, la déshydratation du tréhalose est totale. La figure VII.5 mettent en évidence deux caractéristiques distinctes du processus de déshydratation :

- l'intervalle de temps nécessaire à la déshydratation complète de l'échantillon est considérablement plus court à  $50^\circ\text{C}/\text{min}$  (20 min) qu'à  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  (80 min). La cinétique de déshydratation est donc plus rapide si la vitesse de chauffe est élevée
- le domaine de température dans lequel s'effectue la déshydratation diffère sensiblement suivant la vitesse de chauffe : à  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , la déshydratation s'effectue continûment entre 40 et  $100^\circ\text{C}$ . A  $50^\circ\text{C}/\text{min}$ , l'endotherme de déshydratation est décalé vers les hautes températures. La déshydratation ne débute qu'à  $70^\circ\text{C}$ , et la majorité de l'eau contenue dans l'échantillon s'évacue violemment à  $105^\circ\text{C}$ .

Ces observations expérimentales mettent en évidence deux paramètres physiques qui semblent jouer un rôle prépondérant dans la détermination de la nature de l'anhydre obtenu :

**la température** et **la vitesse de déshydratation**, c'est-à-dire **le débit** avec lequel les molécules d'eau s'évacuent du tréhalose dihydrate. La vitesse de *déshydratation* se distingue clairement de la vitesse de *chauffage* : contrairement à cette dernière, la vitesse de déshydratation est un paramètre intrinsèque à l'échantillon, et qui n'est pas immédiatement accessible. Sa détermination constitue une difficulté majeure de l'étude.

Nous proposons ici d'évaluer l'influence respective de la température et de la vitesse de déshydratation sur la nature de l'anhydre obtenu après la déshydratation de  $T_{2H_2O}$ . Cette étude repose sur l'étude des déshydratations d'échantillons de  $T_{2H_2O}$ , effectuée à la fois au chauffage et en isotherme. Après avoir présenté les protocoles expérimentaux, nous évaluerons l'existence d'une éventuelle « température seuil » capable de déterminer les proportions de  $T_\alpha$  et d'amorphe dans le tréhalose déshydraté. Nous discuterons ensuite la pertinence d'un « débit seuil ». Pour accéder à ce paramètre, nous avons mis au point une méthode originale de traitement des résultats d'ATG. A chaque fois, nous étudierons séparément le cas de déshydratations induites par chauffage, et le cas de déshydratations induites par traitement isotherme.

### **1. Protocole expérimental**

#### ▪ Déshydratations au chauffage :

Les expériences ont été réalisées au LDSMM, sur les appareils ATG 7 de Perkin Elmer, et DSC 2920 de TA Instruments.

En ATG, l'échantillon de  $T_{2H_2O}$  est chauffé de 20 à 110°C, à une vitesse de  $x^\circ\text{C}/\text{min}$  ( $x = 1, 2, 5, 10, 20$  et  $50$ ). Il est ensuite laissé en isotherme à 110°C pendant 15 min pour permettre sa déshydratation totale (qui correspond à une perte de masse de 9.5%).

En ATD, l'échantillon est déshydraté avec le même traitement thermique qu'en ATG. Il est alors ramené à 20°C, puis chauffé à 5°C/min jusqu'à la fusion (220°C).

#### ▪ Déshydratations en isotherme :

Les expériences ont été réalisées dans les laboratoires d'Aventis, sur les appareils Q500 (ATG) et Q1000 (ATD) de TA Instruments.

En ATG, l'échantillon de  $T_{2H_2O}$  est amené le plus rapidement possible (de manière non contrôlée) à la température d'isotherme  $T_{iso}$  ( $T_{iso} = 40, 50, 60, 70$  et  $80^\circ\text{C}$ ). Il est maintenu à cette température pendant  $y$  minutes, jusqu'à ce que la déshydratation soit totale.

En ATD, l'échantillon est déshydraté de la même manière qu'en ATG. Après déshydratation, il est ramené à 20°C, puis chauffé à 5°C/min jusqu'à la fusion.

Ces protocoles sont résumés dans le **tableau VII.1** :

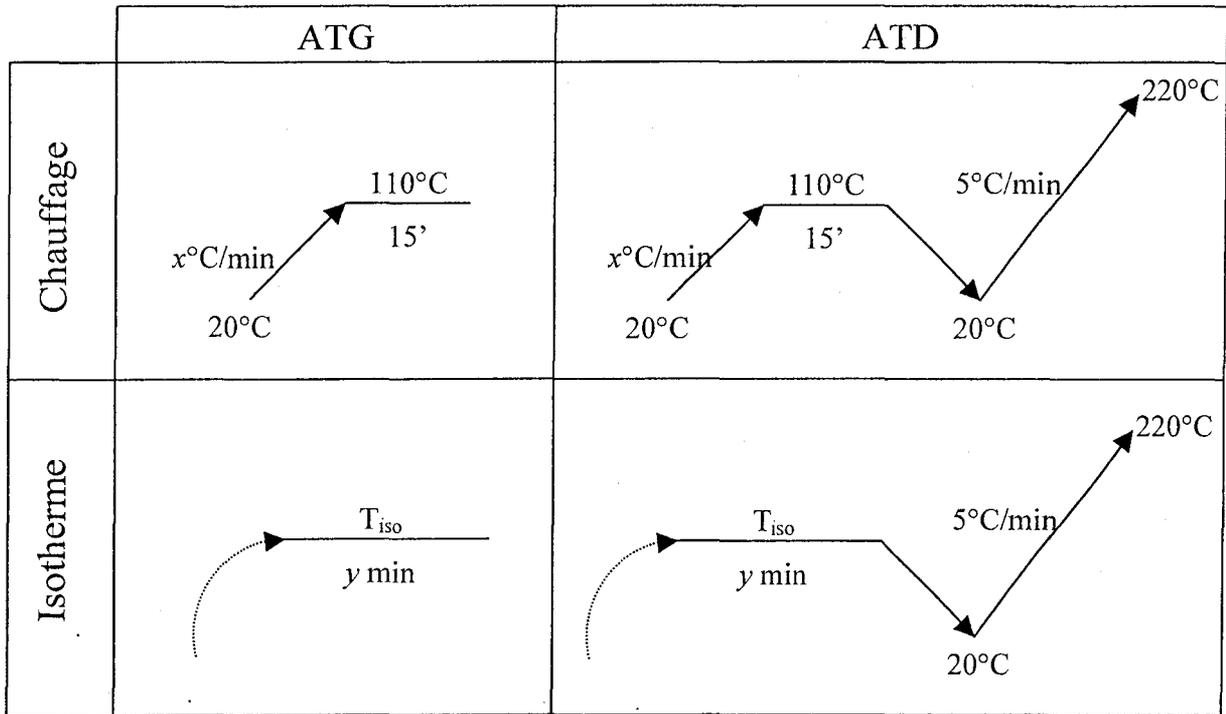


Tableau VII.1 :

Protocoles expérimentaux utilisés pour les expériences d'ATG et d'ATD présentées dans ce paragraphe. Pour les déshydratations au chauffage, la vitesse de chauffe  $x$  varie entre 1 et 50°C/min. Pour les déshydratations isothermes, la durée de l'isotherme est suffisante pour permettre la déshydratation totale de l'échantillon

### Déshydratations au chauffage

La figure VII.6 présente les résultats obtenus pour des échantillons de  $T_{2H_2O}$  déshydratés avec des vitesses de chauffe  $x = 1, 2, 5, 10, 20$  et 50°C/min (courbes (2) à (7)). Elle regroupe les cinétiques de déshydratation (figure VII.6.a), et les thermogrammes des échantillons préalablement déshydratés, enregistrés à 5°C/min (figure VII.6.b).

Les portions en trait plein des courbes (2) à (7) correspondent à la fraction de l'échantillon déshydratée pendant la rampe de température, tandis que les portions de courbes en pointillés correspondent à la fraction de l'échantillon déshydratée pendant l'isotherme complémentaire à 110°C. Ainsi, à 1°C/min, le temps nécessaire à la déshydratation totale de l'échantillon est de 80 minutes, et la quasi totalité du tréhalose se déshydrate pendant la rampe. Par contre, à 50°C/min, le temps nécessaire à la déshydratation est ramené à 20 minutes, mais la majeure partie (80%) de l'échantillon se déshydrate pendant l'isotherme à 110°C. L'augmentation de la vitesse de chauffe réduit donc la fraction d'échantillon déshydratée pendant la rampe de température, au profit de la fraction déshydratée pendant l'isotherme à 110°C.

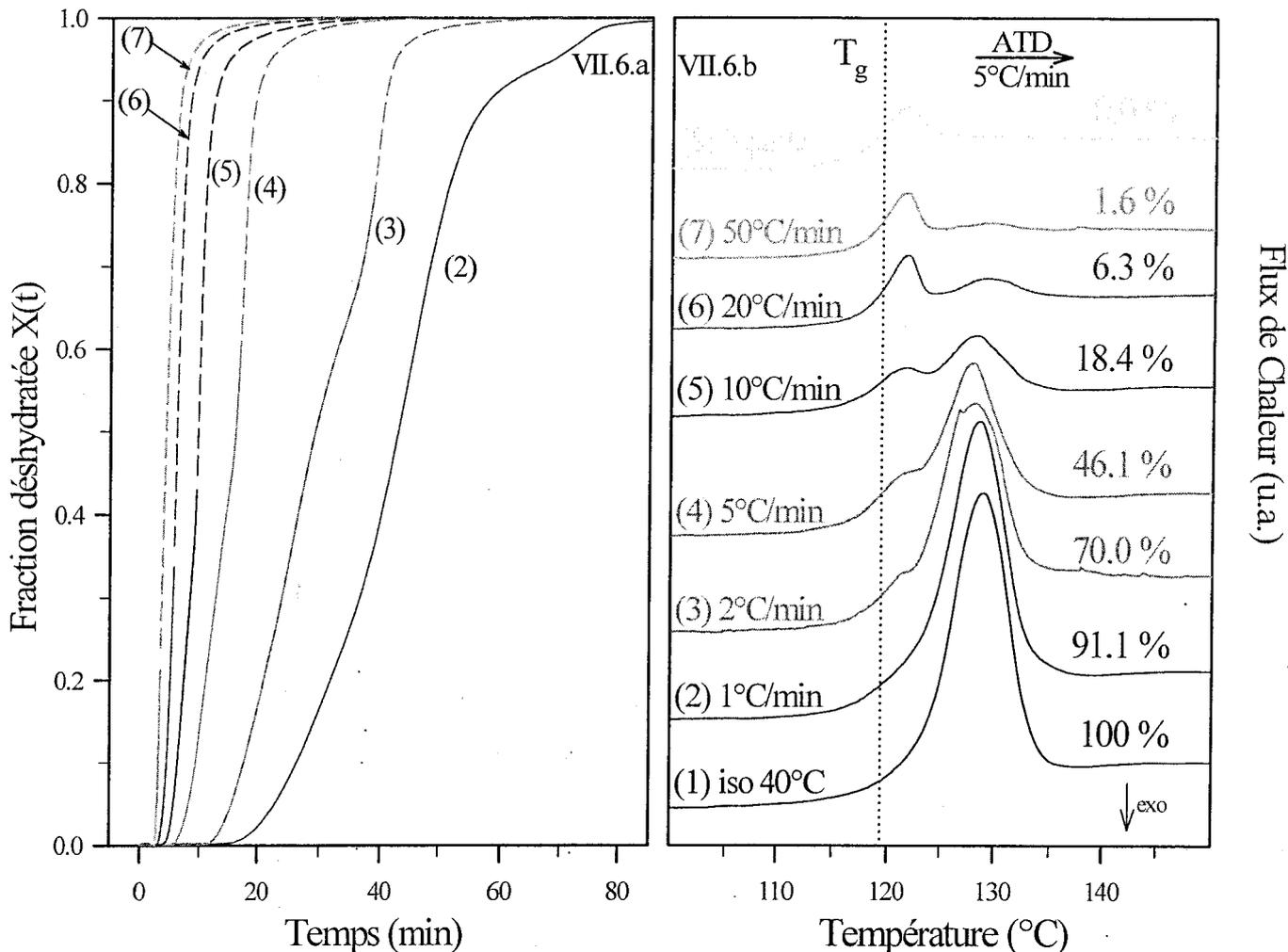


Figure VII.6 :

- a. évolution temporelle de la fraction déshydratée, pour des échantillons de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  chauffés à 1, 2, 5, 10, 20, 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (courbes (2) à (7)). Expériences d'ATG Florence Danède, LDSMM.
- b. thermogrammes enregistrés au chauffage à 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , des échantillons de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  préalablement déshydratés aux vitesses indiquées sur les courbes. Les thermogrammes correspondant au chauffage à 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  déshydraté par une isotherme à 40 $^{\circ}\text{C}$  (courbe (1)), et du verre de liquide (courbe (8)) sont donnés en tant que références.

Le thermogramme (1) de la figure VII.6.b correspond au chauffage d'un échantillon de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  préalablement déshydraté par une isotherme de 6 h à 40 $^{\circ}\text{C}$ . Le thermogramme (1) montre au réchauffage un endotherme à 125 $^{\circ}\text{C}$ , d'enthalpie 25.6 J/g, qui correspond à la fusion de la phase  $T_{\alpha}$ . La comparaison avec le thermogramme du verre de liquide (figure VII.6.b, courbe (8)) ne montre aucune trace, sur la courbe (1), du saut de  $C_p$  caractéristique de la transition vitreuse. Pour une isotherme à 40 $^{\circ}\text{C}$ , la transformation  $T_{2\text{H}_2\text{O}} \rightarrow T_{\alpha}$  apparaît donc totale.

Les thermogrammes (2) à (7) des échantillons préalablement déshydratés par chauffage sont ceux déjà présentés sur la figure VII.2.b. Ils montrent une diminution du pic de fusion de la phase  $T_{\alpha}$ , au profit du saut de  $C_p$  pour des vitesses de chauffe de plus en plus élevées. Ce comportement

indique que la proportion de phase  $T_\alpha$  dans l'échantillon totalement déshydraté est d'autant plus faible que la vitesse de chauffe est élevée, ce qui est cohérent avec les résultats présentés en section A.2.

La proportion de phase  $T_\alpha$  présente dans l'échantillon de  $T_{2H_2O}$  déshydraté a été estimée à partir des résultats d'ATD de la figure VII.9.b, grâce à la mesure de son enthalpie de fusion. Comme la fusion de  $T_\alpha$  intervient immédiatement après  $T_g$ , le pic endothermique de restitution enthalpique qui termine le saut de  $C_p$  se mêle avec le pic de fusion de  $T_\alpha$ . Il est par conséquent difficile de dissocier ces deux accidents et d'estimer directement leurs enthalpies respectives. Pour contourner ce problème, et évaluer au mieux la proportion de phase  $T_\alpha$  dans l'échantillon anhydre, nous avons cherché à ajuster aux thermogrammes des courbes (2) à (7) une combinaison linéaire des courbes (1) et (8). Les courbes (1) et (8) représentant respectivement les cas extrêmes d'un échantillon intégralement transformé en  $T_\alpha$ , et d'un échantillon complètement amorphisé par trempe thermique, les coefficients de leur combinaison linéaire donnent les proportions de  $T_\alpha$  et de tréhalose amorphe dans les échantillons déshydratés. La proportion de  $T_\alpha$  formée à l'issue de chaque déshydratation est reportée à droite de la figure VII.6.b, et dans le **tableau VII.2** :

Vitesse de chauffe (°C/min)	Proportion de $T_\alpha$ formée (%)
1	91.1
2	70.0
5	46.1
10	18.4
20	6.3
50	1.6

*Tableau VII.2 :*

*Proportion de phase  $T_\alpha$  contenue dans l'anhydre obtenu par déshydratation au chauffage*

### ➤ Déshydratations en isotherme

La **figure VII.7** rassemble les résultats obtenus pour des échantillons déshydratés par des isothermes à 40, 50, 60, 70 et 80°C. Les fractions déshydratées au cours du temps sont reportées sur la figure VII.7.a, et les thermogrammes, enregistrés à 5°C/min après déshydratations sont regroupés sur la figure VII.7.b. Le thermogramme du verre de liquide est également représenté.

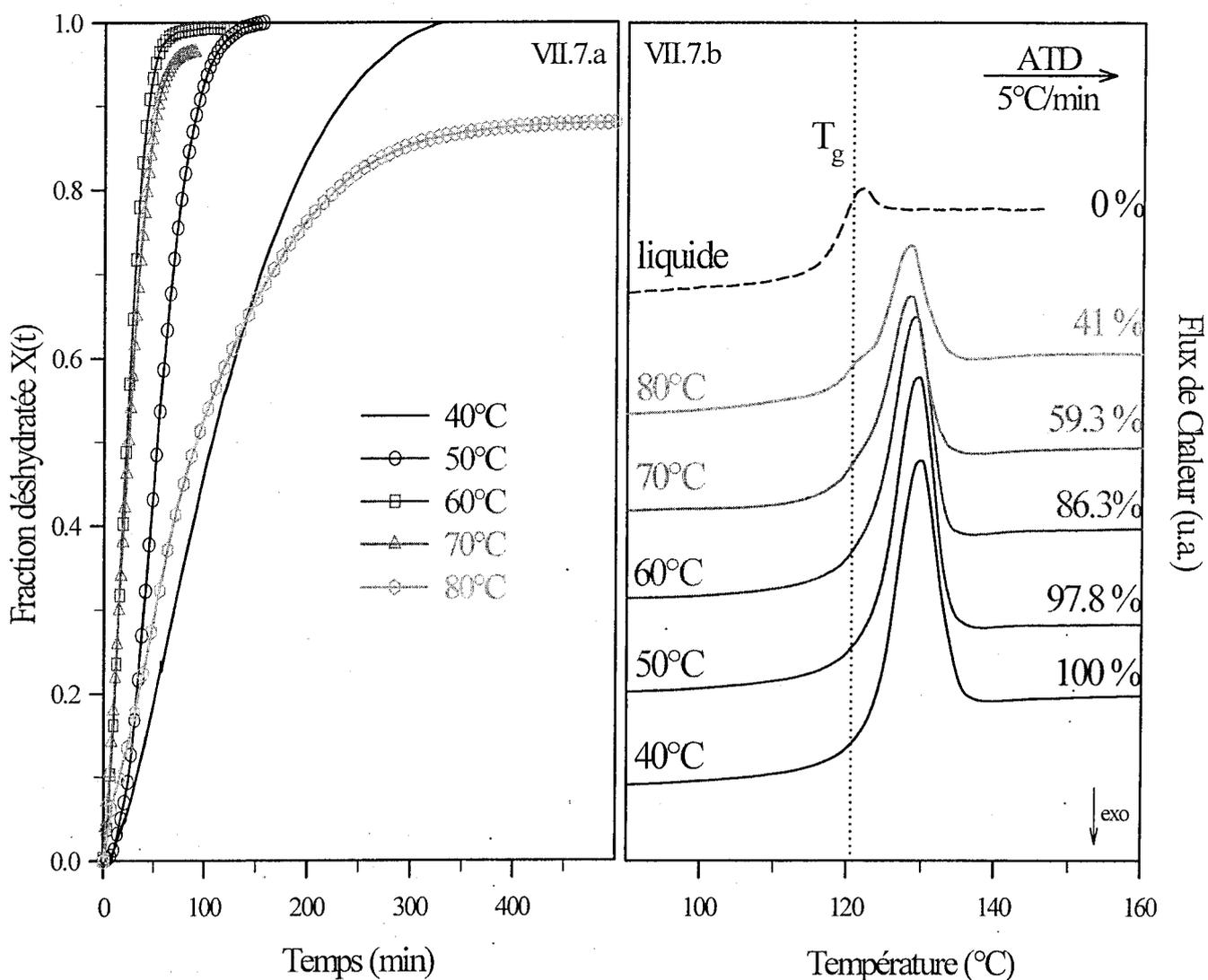


Figure VII.7 :

- Evolution temporelle de la fraction déshydratée pour des échantillons de  $T_{2H_2O}$  déshydratés par vieillissement isotherme à 40, 50, 60, 70, et 80°C/min.
- Thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min, des échantillons déshydratés aux températures indiquées sur la figure

Pour des températures d'isothermes supérieures à 60°C, la fraction déshydratée n'atteint pas la valeur limite de 1 correspondant à la déshydratation totale. Toutefois, nous avons pris soin de vérifier qu'à l'issue de toutes les expériences, les échantillons de  $T_{2H_2O}$  étaient complètement déshydratés. Ce comportement est donc à attribuer aux pertes d'eau survenant pendant l'étape initiale de chauffe (non représentée sur la figure VII.7), permettant d'atteindre la température à laquelle on réalise la déshydratation isotherme. Jusqu'à 60°C, ces pertes d'eau sont négligeables. Par contre, aux températures supérieures à 60°C, elles augmentent considérablement pour atteindre environ 15 % de la masse d'eau totale à 80°C.

L'évolution temporelle de la fraction d'échantillon déshydratée pendant les isothermes à 40, 50, et 60°C, indique que le temps nécessaire à la déshydratation totale de  $T_{2H_2O}$  diminue quand la température augmente. A 40°C, la déshydratation est totale après 320 min d'isotherme ; à 60°C, il ne faut que 100 min pour déshydrater complètement  $T_{2H_2O}$ . Aux « hautes températures », cette tendance s'inverse : à 70°C, le temps de déshydratation totale est quasiment le même qu'à 60°C. A 80°C, la déshydratation complète de  $T_{2H_2O}$  nécessite plus de 8 heures d'isotherme, soit 3 heures de plus qu'à 40°C. La figure VII.7 met donc en évidence un *changement de régime* qui se manifeste par un ralentissement de la cinétique de déshydratation pour une température avoisinant 70°C.

Les courbes en trait plein de la figure VII.7.b correspondent aux enregistrements ATD, au chauffage à 5°C/min, des échantillons de  $T_{2H_2O}$  préalablement déshydratés aux températures indiquées sur la figure. La courbe en traits pointillés montre à titre comparatif le thermogramme caractéristique du verre de liquide. Le thermogramme enregistré après déshydratation à 40°C présente un endotherme unique, correspondant à la fusion de  $T_\alpha$ , et ne montre aucune trace de saut de chaleur spécifique lié à la présence de tréhalose amorphe. Par ailleurs, des essais de déshydratation à plus basse température (30°C) ne conduisent pas à une enthalpie de fusion plus grande. A 40°C, la transformation  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  est donc totale. Sur les autres thermogrammes, on voit se développer un épaulement à 118°C, qui correspond à la transition vitreuse de la fraction de tréhalose amorphisée pendant la déshydratation. Cette fraction amorphe est d'autant plus importante que la température de l'isotherme est élevée. La détermination précise des enthalpies de fusion de la phase  $T_\alpha$  et de restitution enthalpique du verre est ici encore rendue délicate par la proximité de ces deux accidents. L'estimation de la fraction de  $T_\alpha$  formée pendant la déshydratation a donc été réalisée par combinaison linéaire des thermogrammes correspondant une isotherme à 40°C et du verre de liquide. Les proportions de phase  $T_\alpha$  formée aux différentes températures d'isothermes sont reportées sur la figure VII.7.b, et dans le **tableau VII.3** :

Température d'isotherme (°C)	Proportion de $T_\alpha$ formée
40	100 %
50	97.8 %
60	86.3 %
70	59.3 %
80	41.0 %

Tableau VII.3 :

*Proportion de phase  $T_\alpha$  formée à l'issue d'une déshydratation isotherme*

## 2. Rôle de la température dans le contrôle du processus de déshydratation

Pour évaluer la pertinence du paramètre « température » dans le contrôle du processus de déshydratation, nous avons cherché à savoir s'il existait une relation entre la température à laquelle les molécules d'eau quittent la structure du tréhalose dihydrate, et la nature structurale de l'anhydre ainsi généré. En d'autres termes, cela revient à se demander s'il existe une « température seuil »  $T_s$ , telle que :

- toute déshydratation à une température  $T < T_s$  produise du tréhalose  $T_\alpha$
- toute déshydratation à une température  $T > T_s$  produise du tréhalose amorphe

Si une telle température  $T_s$  existe, alors la fraction de  $T_{2H_2O}$  déshydratée en dessous de  $T_s$  doit nécessairement être égale à la proportion de phase  $T_\alpha$  générée par déshydratation, et ce indépendamment du traitement thermique utilisé pour aboutir à cette déshydratation. Nous avons donc déterminé, pour chacun des protocoles expérimentaux utilisés, une hypothétique température  $T'_s$  compatible avec la proportion de phase  $T_\alpha$  présente dans l'échantillon totalement déshydraté. La comparaison de ces hypothétiques températures seuil révélera, a posteriori, si la définition d'une température  $T_s$  indépendante du protocole de déshydratation s'avère possible.

### ➤ Déshydratations au chauffage

La figure VII.8 présente la fraction de l'échantillon déshydratée à une température  $T < T_0$ , au cours des protocoles de chauffage définis dans le tableau VII.1. Ces données ont été directement calculées des courbes de cinétique de départ d'eau de la figure VII.6. Ces cinétiques sont constituées de  $N$  points expérimentaux, correspondant aux fractions  $X_i$  déshydratées au temps  $t_i$ , quand l'échantillon se trouve à la température  $T_i$ . Formellement,  $X(t) = X_i(t_i, T_i)$  pour  $i = 1$  à  $N$ . De cette manière :

$$X(T \leq T_0) = \sum_{i=1}^N (X_i - X_{i-1}) \sigma_i \quad \text{où} \quad \sigma_i = 1 \text{ si } T_i \leq T_0 \quad (\text{VII.1})$$

$$\sigma_i = 0 \text{ si } T_i > T_0$$

Les courbes de la figure VII.8 caractérisent thermiquement le départ d'eau, pour chaque protocole de déshydratation. En particulier, elles montrent que la fraction de l'échantillon déshydratée à une température  $T_0$  donnée décroît quand la vitesse de chauffe augmente. Pour chaque protocole expérimental, on a calculé une température seuil  $T'_s$ , correspondant à la température en dessous de laquelle la fraction déshydratée est égale à la proportion  $X(T_\alpha)$  de phase  $T_\alpha$  obtenue après déshydratation.  $T'_s$  est donc la solution de l'équation  $X(T < T'_s) = X(T_\alpha)$ . Les valeurs de  $T'_s$  sont reportées sur la figure VII.8.

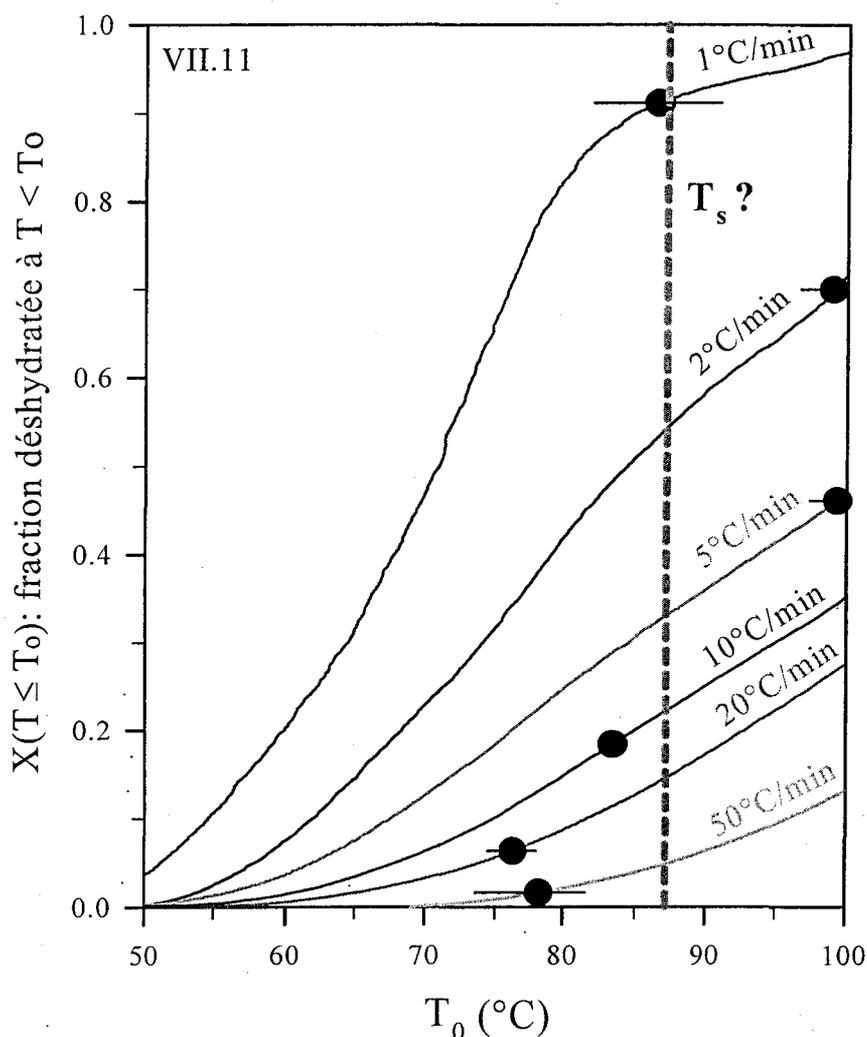


Figure VII.8 :

Recherche d'une corrélation entre le pourcentage de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation (points noirs) et la fraction déshydratée en dessous de la température  $T_0$  dans le cas de déshydratations au chauffage

Les températures seuil  $T_s'$  s'étendent sur une large gamme de températures, et présentent des variations erratiques avec la vitesse de chauffe. Elles varient de 76.3°C pour une vitesse de 20°C/min, à 99.4°C pour une vitesse de 5°C/min, montrant ainsi une déviation standard considérable (9.2°C) par rapport à leur valeur moyenne  $\langle T_s' \rangle = 87.2^\circ\text{C}$ . Cette dispersion importante réfute l'hypothèse d'une température seuil unique, indépendante du protocole de déshydratation.

### ➤ Déshydratations isothermes

Dans le cas de déshydratations en isotherme, l'évaluation du rôle de la température est plus immédiat. S'il existait une température seuil  $T_s$  en dessous de laquelle toute déshydratation donnerait lieu à la transformation  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  le pourcentage de tréhalose  $T_\alpha$  formé pendant la

déshydratation devrait être de 100 % pour une déshydratation effectuée à  $T < T_s$ , et de 0 % pour  $T > T_s$ . Ce comportement est illustré en pointillés sur la figure VII.9, à titre d'exemple, pour une hypothétique température seuil  $T_s = 65^\circ\text{C}$ .

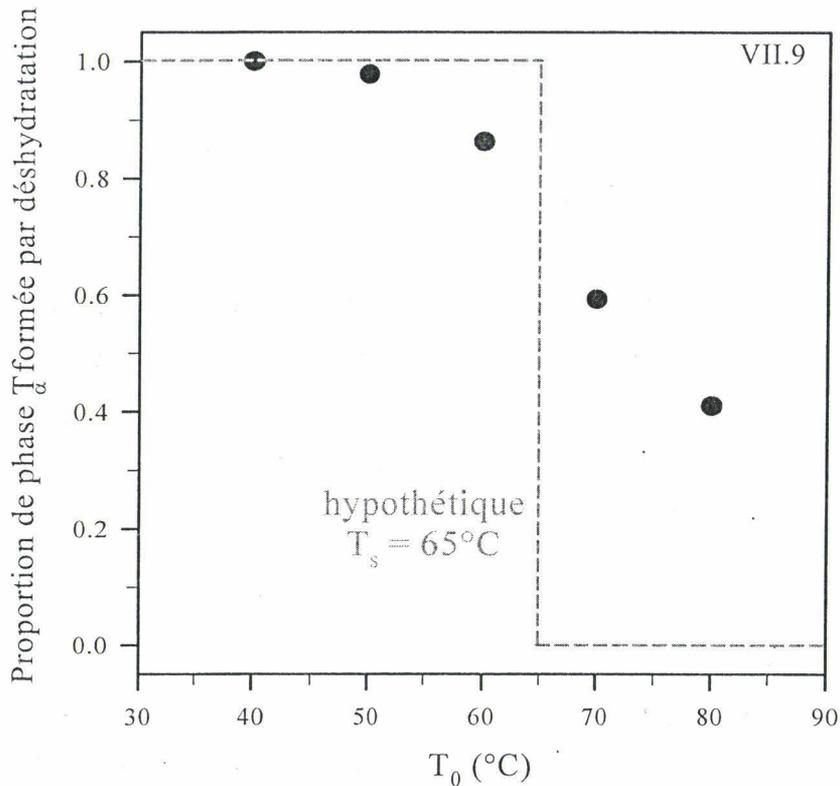


Figure VII.9 :

Recherche d'une corrélation entre le pourcentage de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation et la température  $T_0$ . La ligne pointillée représente la situation hypothétique où la fraction de l'échantillon déshydratée aux températures  $T < 65^\circ\text{C}$  serait entièrement transformée en phase  $T_\alpha$  et la fraction déshydratée à  $T > 65^\circ\text{C}$  serait entièrement amorphisée. Les points noirs sont les points expérimentaux donnant le pourcentage de phase  $T_\alpha$  obtenue à l'issue des isothermes.

Au contraire, nos résultats expérimentaux montrent une diminution progressive de la fraction de  $T_\alpha$  dans l'échantillon déshydraté avec l'augmentation de la température de l'isotherme (points expérimentaux de la figure VII.9). Un tel comportement est incompatible avec l'existence d'une température seuil déterminant la formation de  $T_\alpha$  ou d'amorphe pendant la déshydratation.

Il n'existe donc pas de température seuil conditionnant la nature de l'anhydre obtenu après déshydratation de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ . La température n'est donc pas le seul paramètre qui gouverne la transformation de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  vers  $T_\alpha$  ou vers l'amorphe.

### 3. Rôle du débit des molécules d'eau dans le contrôle du processus de déshydratation

Pour chaque protocole de déshydratation, l'évolution temporelle du débit absolu des molécules d'eau qui s'évacuent de la structure de  $T_{2H_2O}$ ,  $Q^{abs}$ , peut être obtenue à partir de la fraction déshydratée  $X(t) = X_i(t_i, T_i)$ ,  $i = 1$  à  $N$  (figures VII.6.a et VII.7.a), par l'équation :

$$Q_i^{abs} = \left( \frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right) (M_0 - M_\infty) \frac{1}{\rho_{H_2O}} \quad (VII.2)$$

Dans l'expression (VII.2),  $\rho_{H_2O}$  est la densité de l'eau, et  $M_0 - M_\infty$  est la différence entre la masse de l'échantillon avant et après la déshydratation, c'est-à-dire la masse de l'eau contenue dans la structure de l'échantillon initial.

Contrairement à la température, le débit des molécules d'eau est une variable extensive. Il dépend par exemple de la masse de l'échantillon à déshydrater. La comparaison du débit des molécules d'eau d'échantillons différents, à divers stades du processus de déshydratation, nécessite donc de normaliser le débit absolu par la masse de l'échantillon non encore déshydraté. Le débit normalisé est alors donné par l'expression (VII.3) :

$$Q_i = \frac{1}{1 - X_i} \left( \frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right) \left( \frac{M_0 - M_\infty}{M_0 \cdot \rho_{H_2O}} \right) \quad (VII.3)$$

Chaque protocole expérimental conduisant à une déshydratation totale de  $T_{2H_2O}$ , le dernier terme de l'équation (VII.3) est constant ; il peut s'exprimer en fonction de la masse molaire du tréhalose anhydre  $T_\beta$ ,  $\mathcal{M}(T_\beta) = 342.3 \text{ g.mol}^{-1}$ , et de la masse molaire du tréhalose dihydrate  $T_{2H_2O}$ ,  $\mathcal{M}(T_{2H_2O}) = 378.3 \text{ g.mol}^{-1}$ . Dans ce cas :

$$\left( \frac{M_0 - M_\infty}{M_0 \cdot \rho_{H_2O}} \right) = \frac{1 - (\mathcal{M}(T_\beta) / \mathcal{M}(T_{2H_2O}))}{\rho_{H_2O}} = 9.52 \cdot 10^{-5} \text{ l.g}^{-1} \quad (VII.4)$$

La **figure VII.10.a** présente les évolutions temporelles respectives de la fraction déshydratée  $X(t)$  et du débit normalisé  $Q_0$ , dans le cas d'une déshydratation au chauffage à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Pour construire la **figure VII.10.b**, on reporte pour chaque valeur de  $Q_0$  la fraction de l'échantillon déshydratée avec un débit  $Q$  inférieur à  $Q_0$ . L'exemple illustré sur la figure est celui d'un débit normalisé  $Q_0 = 2$ . D'après la figure VII.10.a,  $Q < Q_0$  pendant les 16 premières minutes de l'expérience. Cela correspond à une fraction déshydratée de 52 %. De la même manière, toute l'eau qui s'évacue entre 22 et 40 minutes d'expérience le fait aussi avec un débit inférieur à  $Q_0 = 2$ . Cette eau représente une fraction déshydratée de 5 %. Sur l'ensemble de l'expérience, l'eau évacuée avec un débit inférieur à  $Q_0 = 2$  représente donc 57 % de l'eau contenue l'échantillon. On reporte alors cette valeur sur la figure VII.10.b. En reproduisant cette analyse pour toutes les valeurs de  $Q_0$ , on

aboutit au tracé de la fraction de l'échantillon  $X(Q < Q_0)$  déshydratée avec un débit inférieur à  $Q_0$ , pour une vitesse de chauffe de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ .

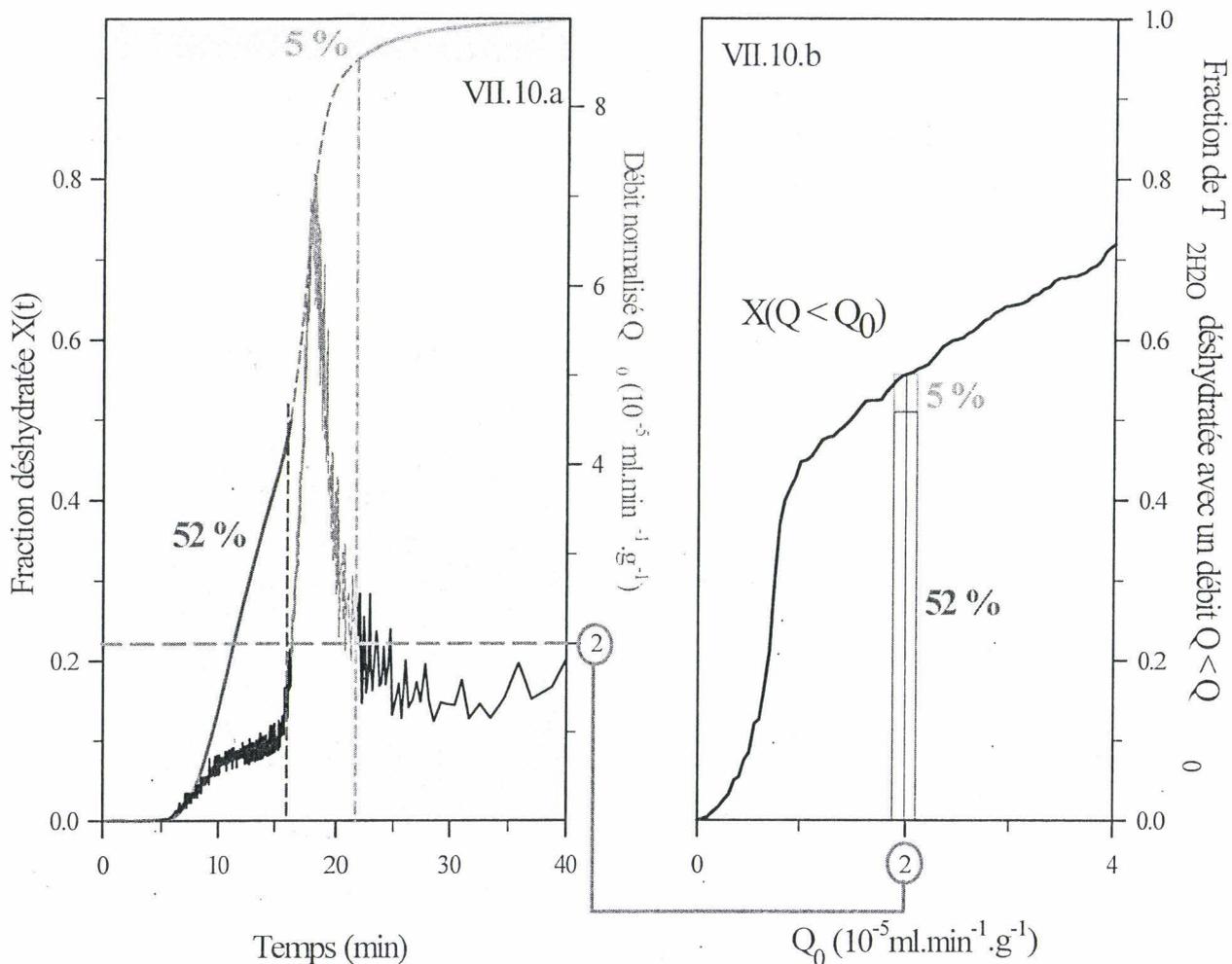


Figure VII.10 :

- a. évolutions temporelles de la fraction déshydratée, et du débit normalisé dans le cas d'une déshydratation par chauffage à  $5^\circ\text{C}/\text{min}$
- b. courbe représentant la fraction de l'échantillon déshydratée avec un débit  $Q < Q_0$ , établie d'après les résultats de la figure VII.13.a

S'il existe un débit seuil de départ d'eau, noté  $Q_s$ , alors la fraction d'échantillon déshydratée avec un débit  $Q < Q_s$  doit nécessairement être égale à la fraction de l'échantillon transformée en phase  $T_\alpha$ , et ce indépendamment du traitement thermique utilisé pour la déshydratation. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la même méthode que celle ayant servi à l'évaluation de l'existence d'une température seuil, détaillée au paragraphe 2. Pour chaque protocole de déshydratation (au chauffage ou en isotherme), nous avons déterminé un hypothétique débit seuil  $Q'_s$  compatible avec le pourcentage de phase  $T_\alpha$  présente dans l'anhydre finalement obtenu. La

comparaison de ces débits seuil hypothétiques révélera, a posteriori, s'il existe un débit seuil unique  $Q_s$  conditionnant la nature de l'anhydre formé par déshydratation de  $T_{2H_2O}$ .

### ➤ Déshydratations au chauffage

La figure VII.11 montre la fraction de l'échantillon  $X(Q < Q_0)$  déshydratée avec un débit inférieur à  $Q_0$  au cours de déshydratations induites par chauffage. Les données présentées sur la figure VII.11 ont été directement déduites de celles de la figure VII.6.a, par l'expression :

$$X(Q \leq Q_0) = \sum_{i=1}^N (X_i - X_{i-1}) \sigma_i \quad \text{où} \quad \sigma_i = 1 \text{ si } Q_i \leq Q_0$$

$$\sigma_i = 0 \text{ si } Q_i > Q_0 \quad (\text{VII.5})$$

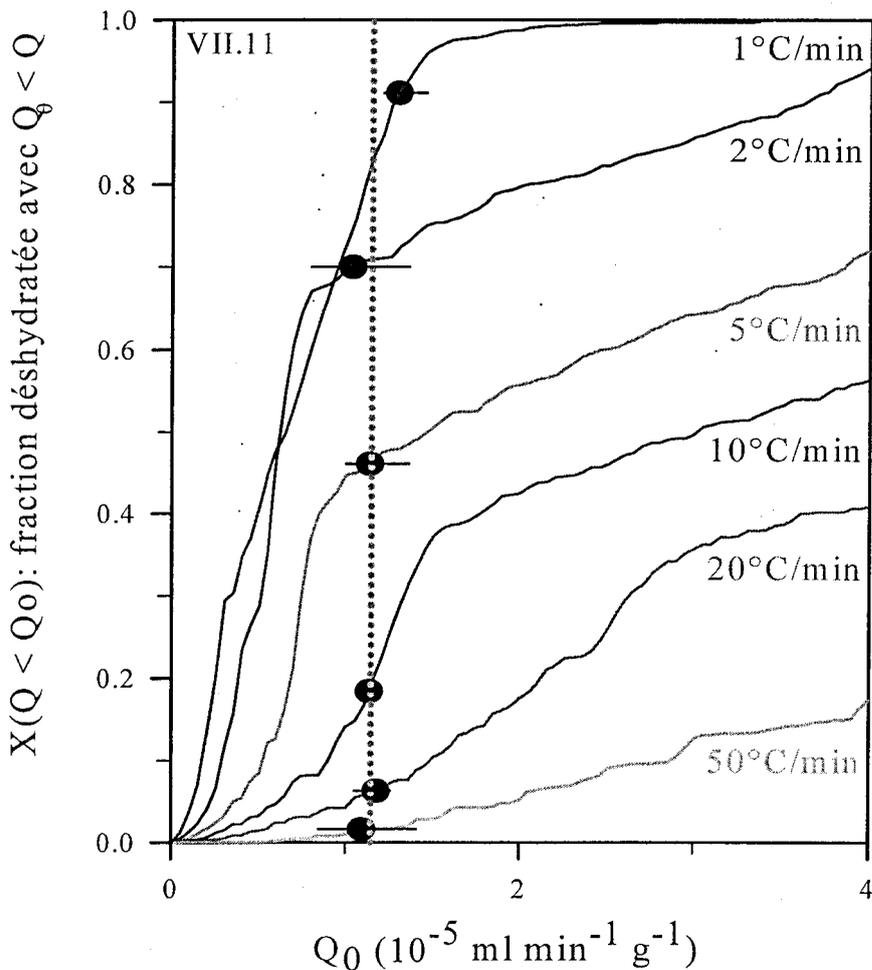


Figure VII.11 :

Recherche d'une correspondance entre la proportion de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation (points noirs), et la fraction déshydratée avec un débit  $Q < Q_0$ , pour des déshydratations par chauffage, aux vitesses indiquées sur les courbes

Pour chaque protocole de déshydratation, l'hypothétique débit seuil  $Q_s'$  a été évalué par résolution graphique de l'équation  $X(Q \leq Q_s') = X(T_\alpha)$ . Les solutions sont reportées sur la figure VII.11. Contrairement aux températures seuil  $T_s'$ , les débits seuil apparaissent très peu dispersés autour de leur valeur moyenne, symbolisée sur la figure VII.11 par une ligne pointillée. Il est donc possible de définir un débit seuil de départ d'eau  $Q_s' = 1.14 \cdot 10^{-5} \text{ ml.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ , tel que toute déshydratation s'effectuant à une vitesse inférieure transforme  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  en  $T_\alpha$ , et toute déshydratation se produisant à une vitesse supérieure transforme  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  en tréhalose amorphe [22].

> **Déshydratations en isotherme**

Les courbes de la figure VII.12 présentent la fraction de tréhalose déshydraté  $X(Q < Q_0)$  avec un débit inférieur à  $Q_0$ , au cours de déshydratations induites par traitement isotherme. Elles ont été directement déduites de celles de la figure VII.7.a.

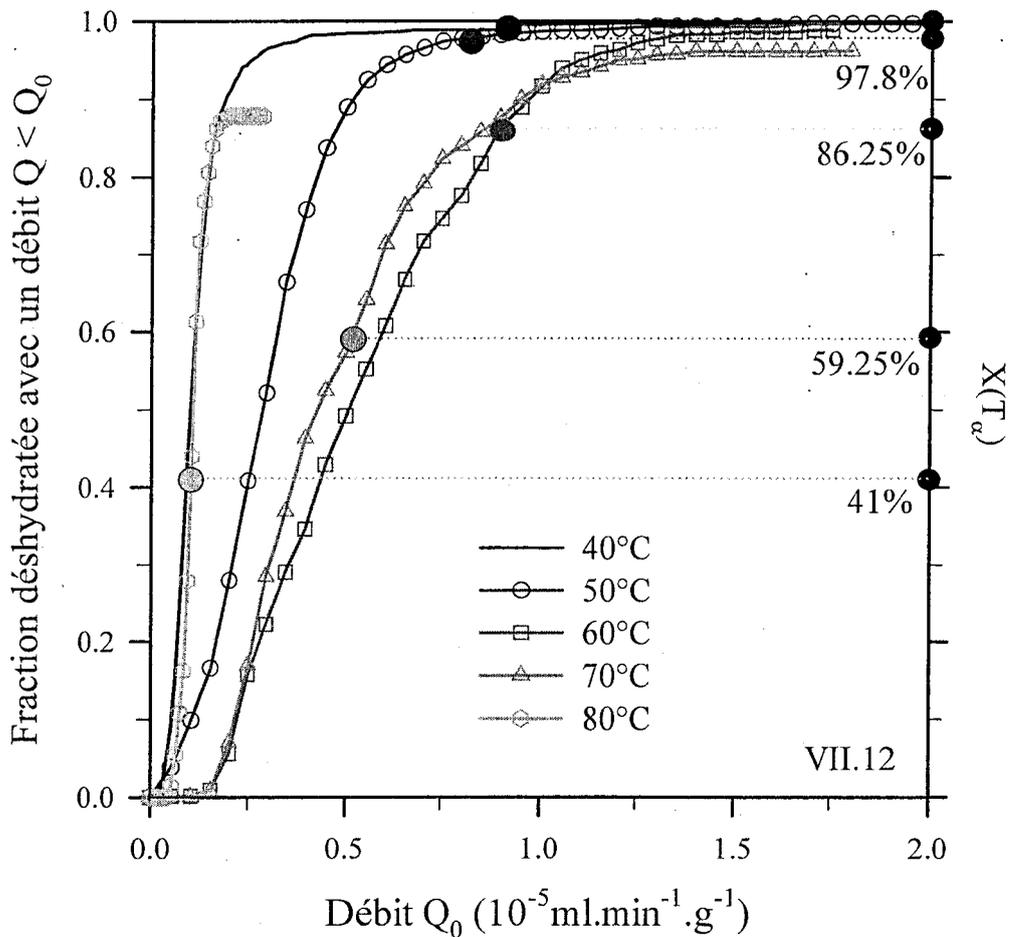


Figure VII.12 :

Recherche d'une correspondance entre la proportion de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation, et la fraction déshydratée avec un débit  $Q < Q_0$ , pour des déshydratations isothermes

La cohérence entre la proportion  $X(T_\alpha)$  de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation, et la fraction de l'échantillon déshydratée avec un débit inférieur à  $Q_0$  ne s'observe que pour les plus basses températures d'isotherme, à savoir 40, 50 et 60°C. Dans cette gamme de températures, il semble que la valeur  $Q_0 = 0.75 \cdot 10^{-5} \text{ ml.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  constitue la limite supérieure de la vitesse de déshydratation conduisant à la formation de phase  $T_\alpha$ . Pour les déshydratations à 70 et 80°C, le ralentissement de la cinétique de déshydratation constaté sur les courbes d'ATG de la figure VII.7 transparait également sur les courbes de débit. Il n'y a alors plus de corrélation entre la proportion de phase  $T_\alpha$  formée par déshydratation, et la valeur limite  $Q_0 = 0.75 \text{ ml.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$  définie pour les isothermes « basses températures ». La correspondance entre un éventuel débit critique unique et la proportion de  $T_\alpha$  formée par déshydratation, apparaît donc plausible pour des températures d'isotherme comprises entre 40 et 60°C, mais s'avère incorrecte au delà de 70°C.

Les résultats obtenus pour des déshydratations isothermes semblent en opposition avec les résultats obtenus lors de déshydratations au chauffage. L'existence d'un débit seuil comme unique paramètre déterminant la nature de l'anhydre obtenu par déshydratation est donc ici remise en cause.

#### **4. Discussion**

A la lumière des résultats présentés au paragraphe 2, il apparaît clairement que la température de déshydratation ne constitue pas, à elle seule, un paramètre suffisant pour gouverner l'état structural du tréhalose après sa déshydratation complète.

La vitesse de déshydratation, c'est-à-dire le débit avec lequel les molécules d'eau quittent la structure du tréhalose dihydrate, semble être le paramètre déterminant dans le cas de déshydratations induites par chauffage, mais les résultats sont moins probants pour les déshydratations isothermes. Aux « hautes températures » (70 et 80°C), le ralentissement de la cinétique de déshydratation mise en évidence sur la figure VII.7.a déplace considérablement la valeur de  $Q_s$ . Cette différence de comportement provient vraisemblablement de la nature des contraintes appliquées à l'échantillon :

- lors de déshydratations au chauffage, le protocole expérimental prévoit de porter l'échantillon à 110°C. Pendant le chauffage à vitesse contrôlée, l'augmentation de la température accroît continûment les contraintes thermiques agissant sur l'échantillon, et force la déshydratation. L'isotherme complémentaire, qui permet l'achèvement de la déshydratation, a lieu à 110°C, c'est-à-dire au delà de la température de vaporisation de l'eau. La cinétique de départ d'eau est donc gouvernée par le traitement thermique imposé à l'échantillon

- lors de déshydratations en isotherme, le tréhalose dihydrate est amené le plus rapidement possible à une température comprise entre 40 et 80°C. Il est ensuite laissé en isotherme jusqu'à ce que la déshydratation soit totale. Aucune contrainte thermique supplémentaire n'est imposée, et la cinétique de déshydratation est uniquement dictée par l'évolution des propriétés intrinsèques de l'échantillon à une température donnée. Or, aux températures très inférieures à  $T_g \cong 118^\circ\text{C}$ , la mobilité moléculaire est peu importante, et les réarrangements structuraux ne sont pas favorisés.

Les mécanismes à l'origine de la déshydratation de composés moléculaires sont nombreux, et on déjà fait l'objet d'investigations poussées [21]. Il a été suggéré que la déshydratation commence à la surface des grains, pour se propager progressivement vers le cœur de l'échantillon. Dans le cas du tréhalose dihydrate, un tel mécanisme aurait pour conséquence la formation, pendant le processus de déshydratation, d'une couche périphérique de tréhalose anhydre,  $T_\alpha$  ou amorphe, entourant un noyau de tréhalose dihydrate dont la taille diminuerait au fur et à mesure de l'expérience. Dans ce contexte, une différence de perméabilité des phases  $T_\alpha$  et amorphe pourrait être à l'origine de l'inversement de la cinétique de déshydratation observée pour une isotherme à 80°C : à cette température, le produit de la déshydratation est majoritairement du tréhalose amorphe. Si l'amorphe est peu perméable, la formation d'une couche extérieure de tréhalose amorphe empêche la diffusion des molécules d'eau, et ralentit la cinétique de déshydratation. L'expérience ayant lieu à température constante, aucun facteur extérieur ne vient accélérer le processus. Il semble donc difficile de dissocier complètement le débit des molécules d'eau quittant la structure cristalline de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ , de la température à laquelle a lieu cette déshydratation.

Par ailleurs, d'autres paramètres, intrinsèques à l'échantillon, sont susceptibles de jouer un rôle dans le processus de déshydratation du tréhalose. C'est le cas par exemple de la taille des grains, dont l'influence sur la déshydratation a déjà été étudiée. York et al. [23,24] ont mené plusieurs études sur la déshydratation isotherme du tréhalose dihydrate, en fonction de la granulométrie des échantillons. Pour les trois lots étudiés (grains de taille  $< 45\mu\text{m}$ ,  $> 425\mu\text{m}$ , et poudre mélangée), ils ont mis en évidence un changement de régime de déshydratation intervenant à 70°C pour les particules de taille  $< 45\mu\text{m}$ , et à 80°C pour les particules de taille  $> 425\mu\text{m}$  ou pour la poudre non tamisée. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les nôtres. York et al. attribuent le ralentissement de la cinétique à un changement de mécanisme de déshydratation : au delà de 70°C ou 80°C, suivant la taille des particules, le tréhalose subirait une transformation directe vers sa phase anhydre stable  $T_{2\text{H}_2\text{O}} \rightarrow T_\beta$ . Néanmoins, des expériences de DX réalisées au LDSMM sur le diffractomètre Panalytical Xpert Pro, avec un protocole expérimental analogue à

celui utilisé an ATD et ATG, n'ont révélé aucune raie de Bragg caractéristique de la forme  $T_\beta$  pendant le processus de déshydratation isotherme à 80°C. Elles confirment au contraire que l'échantillon déshydraté est constitué d'un mélange biphasique de tréhalose  $T_\alpha$  et de tréhalose amorphe.

#### **A.4. Propriétés physiques spécifiques de la phase anhydre $T_\alpha$**

Comme nous l'avons montré en section A.2, la formation de la phase anhydre  $T_\alpha$  à partir du tréhalose dihydrate ne peut se faire que dans des conditions de déshydratation extrêmement précises. La signature calorimétrique de  $T_\alpha$ , dont la fusion intervient à 125°C, peut facilement être confondue avec le pic endothermique terminant la transition vitreuse à  $T_g = 118^\circ\text{C}$ . Ainsi, malgré le nombre important d'études consacrées au tréhalose ces dernières années,  $T_\alpha$  n'a été que très rarement mentionnée. De ce fait, l'intérêt pour cette phase anhydre est relativement récent, et la structure cristallographique de  $T_\alpha$  n'a pas encore été résolue à ce jour.

Dans ce paragraphe, nous proposons une étude détaillée de la formation de la phase  $T_\alpha$ . Les techniques utilisées sont la diffraction des rayons X résolue en temps, et l'analyse thermique différentielle à modulation de température. Nous verrons ensuite comment évolue la stabilité de la phase  $T_\alpha$  en fonction de l'humidité relative.

##### **1. Caractéristiques de la transformation $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$**

###### **➤ Interconversion $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$ suivie en temps réel par diffraction des rayons X**

L'étude détaillée de la transformation  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  induite par déshydratation ne peut se faire par ATD standard : cette transformation est inévitablement masquée par le pic fortement endothermique généré par la déshydratation elle-même (cf. § A.2). La Diffraction des Rayons X résolue en temps permet de s'affranchir de ce problème, et d'étudier en temps réel les transformations structurales qui interviennent pendant le processus de déshydratation. Le suivi de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  a été effectué dans les laboratoires d'Aventis, sur le Diffractomètre Bruker D5000, équipé d'une chambre Anton Paar TTK 450.

L'expérience consiste en l'acquisition rapide de diagrammes de DX (2 min 40 s par diagramme) au cours d'une isotherme de 2 heures à 50°C. Ce protocole présente plusieurs avantages. D'abord, les résultats présentés au paragraphe A.3 montrent qu'avec une isotherme à 50°C, près de 98% de l'échantillon est transformé en phase  $T_\alpha$ . Ensuite, le temps nécessaire à la déshydratation complète de  $T_{2H_2O}$  (2 h) est long par rapport à la résolution temporelle des acquisitions (2 min 40 s) par diagramme.

La figure VII.13 montre l'évolution des diagrammes de DX du tréhalose au cours de l'isotherme à 50°C (seul un enregistrement sur quatre est reporté sur la figure par souci de clarté). Dès le début de l'isotherme, les pics de Bragg de  $T_{2H_2O}$  disparaissent progressivement, au profit de nouveaux pics caractéristiques de la phase  $T_\alpha$ . Ce comportement est particulièrement visible dans l'insert de la figure VII.13, qui présente les évolutions temporelles croisées :

- de la fraction de phase  $T_{2H_2O}$ , déterminée à partir de l'intensité de la raie de Bragg situé en  $2\theta = 27^\circ$ ,
- de la fraction de phase  $T_\alpha$ , déterminée à partir de l'intensité de la raie de Bragg située en  $2\theta = 21^\circ$

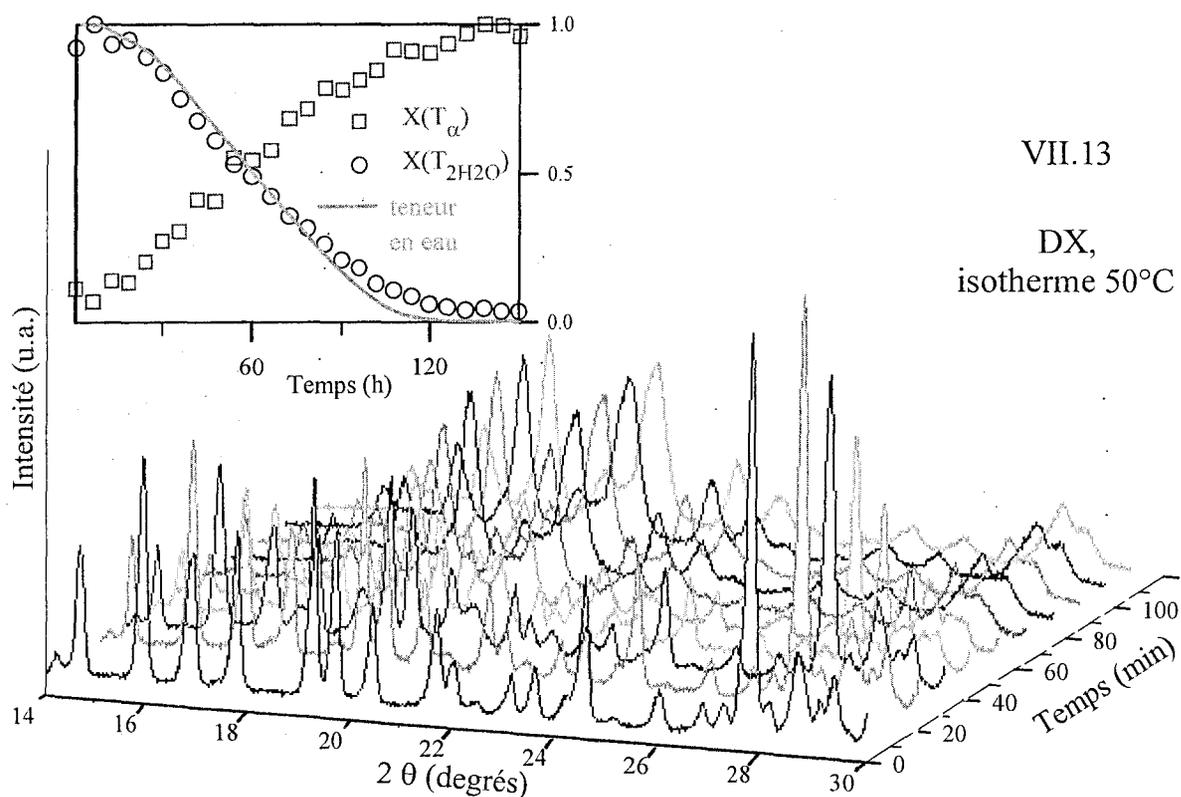


Figure VII.13 :

Diagrammes de DX d'un échantillon de  $T_{2H_2O}$  pendant une isotherme de 2 h à 50°C. Enregistrements sur le diffractomètre Bruker D5000 ( $\lambda(Co, K_{\alpha 1}) = 1.791 \text{ \AA}$ ). L'insert représente les évolutions temporelles des fractions de phase  $T_{2H_2O}$  (O) et  $T_\alpha$  (□), déterminées à partir des intensités de deux pics de Bragg les caractérisant. La signature ATG de l'échantillon est également représentée.

Ces résultats indiquent qu'après deux heures d'expérience, l'échantillon est totalement déshydraté. L'insert de la figure VII.13 montre également que les évolutions temporelles des phases  $T_{2H_2O}$  et  $T_\alpha$  sont croisées, et parallèles à la cinétique de déshydratation suivie par ATG. Il met ainsi

en évidence le processus d'**interconversion** de  $T_{2H_2O}$  vers  $T_\alpha$ . Le parallélisme entre la cinétique de déshydratation et la formation de  $T_\alpha$  suggère que cette phase se développe dans les zones de l'échantillon déshydratées, au moment où elles se déshydratent. En d'autres termes, la phase  $T_\alpha$  apparaît de manière erratique, au fur et à mesure de la création des zones anhydres. Le développement de cette phase n'est donc pas régi par un mécanisme classique de nucléation et croissance, mais plutôt par la dynamique du départ des molécules d'eau. La vitesse d'apparition de  $T_\alpha$  est alors limitée par la vitesse de formation des zones anhydres. Le développement de la phase  $T_\alpha$  s'effectue donc dans des conditions proches du confinement. Ce comportement pourrait être à l'origine de domaines de faible longueur de cohérence, susceptibles d'expliquer la largeur inhabituelle des pics de Bragg de la phase  $T_\alpha$ .

La courbe d'ATG correspondant au même traitement thermique est également représentée. Aucune autre évolution structurale n'a pu être détectée lors de la prolongation de l'isotherme.

➤ Etude de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  par ATD à modulation de température

L'ATD à modulation de température s'avère être un complément utile au suivi du processus de déshydratation, dans la mesure où elle permet de dissocier les composantes « réversible » et « non réversible » du flux de chaleur. D'après la théorie de l'ATD à modulation de température [25], la partie réversible du flux de chaleur est le reflet direct des variations de la chaleur spécifique de l'échantillon, et donc de ses propriétés intrinsèques. En revanche, la partie non réversible correspond aux contributions des effets cinétiques (telles les cristallisations et les relaxations enthalpiques).

La **figure VII.14** présente le flux de chaleur total, réversible et non réversible enregistrés lors de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  au chauffage, à  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . A cette rampe linéaire s'ajoute une modulation de température, de période 100 s et d'amplitude  $0.53^\circ\text{C}$ . Le choix de ces paramètres garantit que la dérivée de la vitesse de chauffe soit toujours positive.

La courbe en trait plein représente le flux de chaleur total. A cette vitesse de chauffe, l'endotherme de déshydratation apparaît scindé en deux composantes : la première, très intense, s'étend de  $25$  à  $80^\circ\text{C}$ . La seconde, d'amplitude beaucoup plus faible, intervient à  $95^\circ\text{C}$ . Le troisième endotherme que l'on distingue à partir de  $120^\circ\text{C}$  correspond à la fusion de la phase  $T_\alpha$  en proportion majoritaire dans l'échantillon anhydre avec le protocole de chauffage utilisé ici (cf. § A.3). Après fusion de  $T_\alpha$ , l'échantillon est complètement amorphe. Enfin, à partir de  $160^\circ\text{C}$  a lieu la recristallisation exothermique de l'amorphe vers la phase  $T_\beta$ , suivie de la fusion finale du tréhalose.

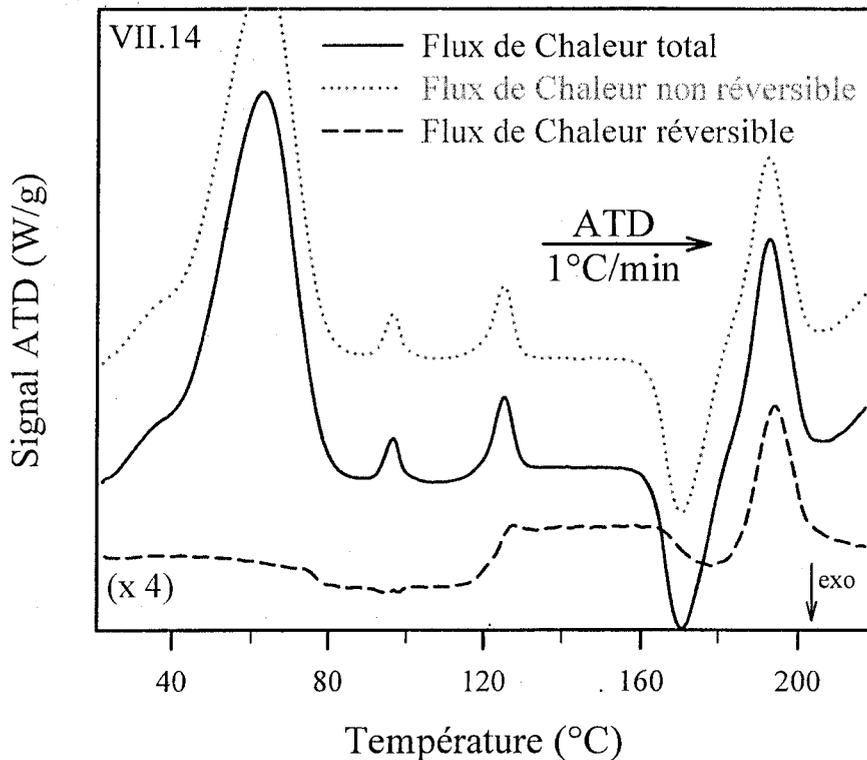


Figure VII.14 :

Flux de chaleur total, réversible et non réversible, enregistrés à  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  au chauffage d'un échantillon de  $T_{2H_2O}$ . La vitesse linéaire de chauffe est  $q = 1^\circ\text{C}/\text{min}$ , et les paramètres de modulation sont  $0.531^\circ\text{C}$  pour l'amplitude et  $100\text{ s}$  pour la période.

Si l'on considère maintenant les composantes réversible et non réversible du flux de chaleur, la figure VII.14 montre que :

- la totalité de l'endotherme de déshydratation se retrouve logiquement dans la partie non réversible du flux de chaleur. Pendant la déshydratation, la pente du flux de chaleur réversible est le reflet de la perte de masse qui accompagne le départ des molécules d'eau. Le changement de la valeur de la chaleur spécifique du tréhalose témoigne de la transformation de la phase dihydrate vers la phase  $T_\alpha$ . Le deuxième pic de déshydratation, intervenant à  $95^\circ\text{C}$ , ne modifie pas le flux de chaleur réversible. Il serait alors à attribuer à la vaporisation de l'eau non encore évacuée de l'enceinte du four, et non à la fin de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$ . Cependant, il pourrait aussi être lié à la déshydratation d'une petite fraction de l'échantillon présentant une granulométrie beaucoup plus importante que la moyenne, et qui nécessiterait donc un chauffage plus poussé pour se déshydrater
- l'absence de pic dans le flux de chaleur réversible, dans la gamme de températures où se produit la déshydratation, prouve que la transition  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  est progressive et continue pendant l'ensemble du processus. Contrairement à ce qui a été suggéré, il n'y a pas, au cours de la

déshydratation, de fusion du tréhalose dihydrate suivie d'une cristallisation vers l'anhydre  $T_\alpha$ . Ces résultats corroborent les conclusions tirées des diagrammes de DX de la figure VII.13, qui suggère un processus de transformation  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  concomitant au départ des molécules d'eau.

Ces résultats démontrent que la conversion  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  s'apparente à une *transition solide  $\rightarrow$  solide gouvernée par la déshydratation*. Il n'y a donc pas de fusion de  $T_{2H_2O}$  suivie d'une recristallisation vers  $T_\alpha$ . L'Analyse Thermique Différentielle à modulation de température s'avère être un outil efficace pour étudier les processus de déshydratation et les éventuelles transitions de phase sous-jacentes, masquées par les endothermes de départ d'eau.

## 2. Stabilité de la phase $T_\alpha$ en fonction de l'humidité relative

La technique de Dynamic Vapor Sorption (DVS) nous a permis d'étudier l'évolution de  $T_\alpha$  en fonction du taux d'humidité ambiante. Le DVS mesure les évolutions de masse d'un échantillon en fonction du degré d'humidité relative (HR). La technique et l'appareil utilisé sont décrits de manière plus précise au chapitre II. La phase  $T_\alpha$  de départ a été obtenue dans l'enceinte du DVS, à partir d'un échantillon de  $T_{2H_2O}$  déshydraté pendant 3 heures à 50°C, sous 0 % d'HR. Après l'isotherme, l'échantillon déshydraté (transformé en  $T_\alpha$ ) a été ramené à 25°C, toujours sous 0 % d'HR.

L'expérience constitue un cycle {sorption / désorption} appliqué à la phase  $T_\alpha$  à 25°C. L'étape de sorption consiste à faire augmenter le taux d'humidité relative de 0 % à 90 %, par paliers de 10 %. L'étape de désorption consiste au contraire à diminuer le taux de HR de 90 % à 0 %, toujours par paliers de 10 %. Le passage au palier d'HR suivant s'effectue pour l'une des conditions suivantes :

- la variation de masse  $dm/dt$  de l'échantillon devient inférieure à la limite imposée par l'expérimentateur (dans le cas présent cette limite est fixée à  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/min)
- la durée du palier atteint 6 heures

Les variations de masse de l'échantillon de  $T_\alpha$  en fonction de l'humidité relative sont reportées sur la figure VII.15.

**Au cours du cycle de sorption**, les variations de masse de l'échantillon, qui se trouve initialement en phase  $T_\alpha$ , sont symbolisées par les cercles reliés par un trait plein. Dès le premier palier, qui correspond à 10 % d'HR, on note une prise en masse de l'échantillon, nécessairement due à l'absorption de l'humidité contenue dans l'atmosphère du DVS. Ce gain de masse atteint 8 % pour un taux d'HR de 20, et 11 % pour un taux d'humidité relative de 40. L'augmentation de masse de

11 % correspond exactement à une concentration de deux molécules d'eau par molécule de sucre, ce qui suggère que le tréhalose  $T_\alpha$  bascule totalement vers la forme dihydrate  $T_{2H_2O}$ , à un taux d'HR inférieur à celui de l'air ambiant (généralement compris dans le laboratoire entre 50 et 60 %). Cette transformation  $T_\alpha \rightarrow T_{2H_2O}$  a été confirmée par l'acquisition du diagramme de DX de l'échantillon réhydraté à l'issue de l'expérience. Il n'est donc pas possible de conserver la forme  $T_\alpha$  dans les conditions ambiantes de température et d'humidité.

**Pendant le cycle de désorption**, la diminution du taux d'HR de 90 % à 0 % ne provoque aucune perte de masse de l'échantillon, même aux très faibles HR, sur l'échelle de temps de l'expérience. Il faut toutefois signaler qu'à la fin de l'expérience, l'échantillon n'est resté qu'une heure sous 0% d'HR. Ce laps de temps n'est pas suffisant pour pouvoir observer une éventuelle déshydratation de  $T_{2H_2O}$  vers  $T_\alpha$ , mais n'exclut pas que cette transformation puisse intervenir au cours d'une isotherme beaucoup plus longue, à 25°C sous 0 % d'HR. En effet, nous avons observé par ATG qu'à 30°C, sous balayage d'azote sec, la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  nécessitait 20 h d'isotherme.

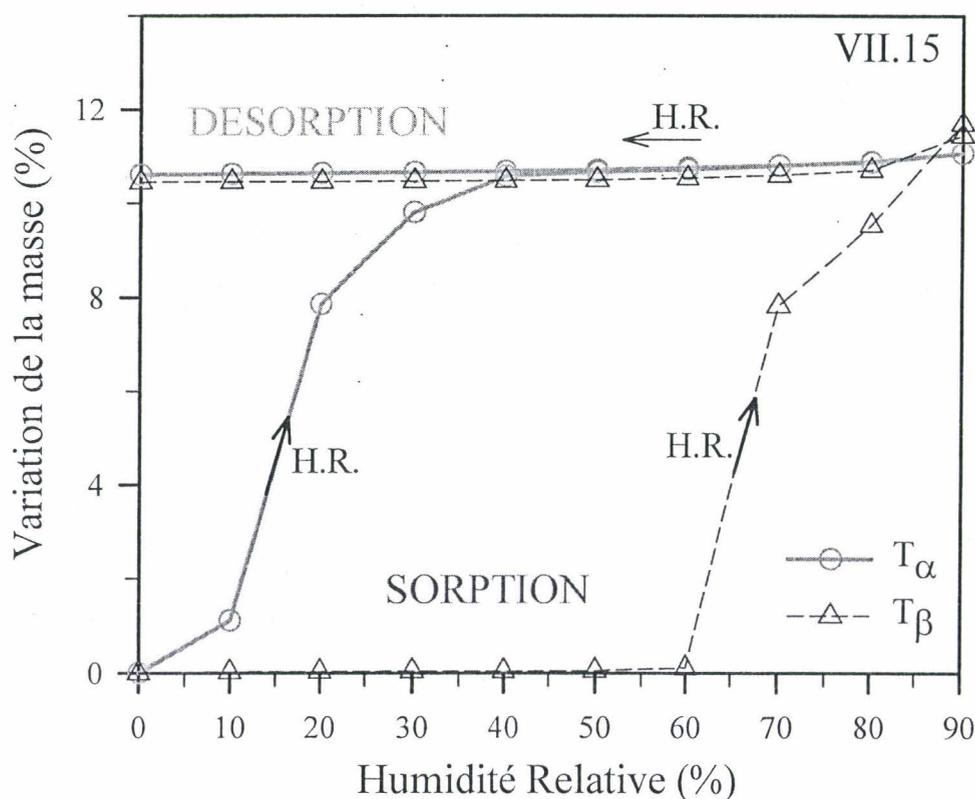


Figure VII.15 :

Cycles sorption/désorption pour les phases anhydres  $T_\alpha$  et  $T_\beta$ . Expériences Magali Sautel, Aventis

Ces résultats de DVS mettent en lumière le caractère fortement hygroscopique de la phase  $T_\alpha$ . A 25°C, sous humidité ambiante,  $T_\alpha$  cette phase se réhydrate facilement et bascule vers  $T_{2H_2O}$ .

La durée de vie de  $T_\alpha$  dans les conditions ambiantes est donc très limitée, de sorte que cette phase doit être manipulée dans des conditions strictes d'atmosphère sèche. La réversibilité de la transformation  $T_{2H_2O} \rightarrow T_\alpha$  impose des conditions strictes de manipulation des échantillons de phase  $T_\alpha$ .

A titre comparatif, la figure VII.15 montre également le résultat de la même expérience de DVS, appliquée cette fois à un échantillon de tréhalose anhydre se trouvant en phase  $T_\beta$ . Au cours de l'étape de sorption, l'expérience DVS ne montre aucune prise de masse de l'échantillon de  $T_\beta$  pour des taux d'HR variant de 0 % à 60 %. Cela signifie que la phase  $T_\beta$  peut être conservée sans modification sous humidité et température ambiantes, sur l'échelle de temps de l'expérience. Pour des taux d'HR plus élevés, l'échantillon subit une prise en masse de 11 %, ce qui correspond exactement à la quantité d'eau nécessaire pour former le tréhalose dihydrate. La conversion  $T_\beta \rightarrow T_{2H_2O}$  a été vérifiée par DX. L'excès de masse relevé pour 90 % d'HR correspond à un début de déliquescence du composé. Au cours de l'étape de désorption, le tréhalose  $T_\beta$  ne subit aucune perte de masse notable ; il reste donc dans sa forme dihydrate.

Ces courbes de DVS mettent en parallèle les facultés d'hydratation des phases anhydres  $T_\alpha$  et  $T_\beta$  du tréhalose. Elles montrent que la phase  $T_\alpha$  se convertit en tréhalose dihydrate beaucoup plus facilement que la phase  $T_\beta$ . De plus, les structures cristallographiques des phases  $T_{2H_2O}$  [26,27] et  $T_\beta$  [28] sont proches l'une de l'autre. Ces deux résultats indiquent que la phase  $T_\alpha$  possède certainement une structure très voisine de celle de  $T_{2H_2O}$ .

### 3. Spectre RMN $^{13}C$ de la phase $T_\alpha$

Les pics de Bragg de la phase  $T_\alpha$  sont beaucoup plus larges que ceux des deux autres phases stables du tréhalose (cf. figure VII.3). Deux explications sont possibles :

- la phase  $T_\alpha$  est mal cristallisée. Les raies de Bragg inhabituellement larges pourraient alors être l'enveloppe de plusieurs pics de Bragg bien définis
- la phase  $T_\alpha$  est nanostructurée, ce qui serait compatible avec le mécanisme de transformation mis en évidence par la figure VII.13.

Nous avons utilisé la RMN  $^{13}C$  pour obtenir des informations sur l'ordre intramoléculaire qui règne dans la phase  $T_\alpha$ . La **figure VII.16.a** présente les spectres CPMAS  $^{13}C$  des phases  $T_{2H_2O}$ ,  $T_\alpha$  et  $T_\beta$ , enregistré à 25°C sur un spectromètre Bruker ASX400 équipé d'une sonde MAS de 4 mm. La fréquence de rotation des rotors est de 10 kHz. La phase  $T_\alpha$  a été préparée par déshydratation de  $T_{2H_2O}$  sous vide, à 40°C.

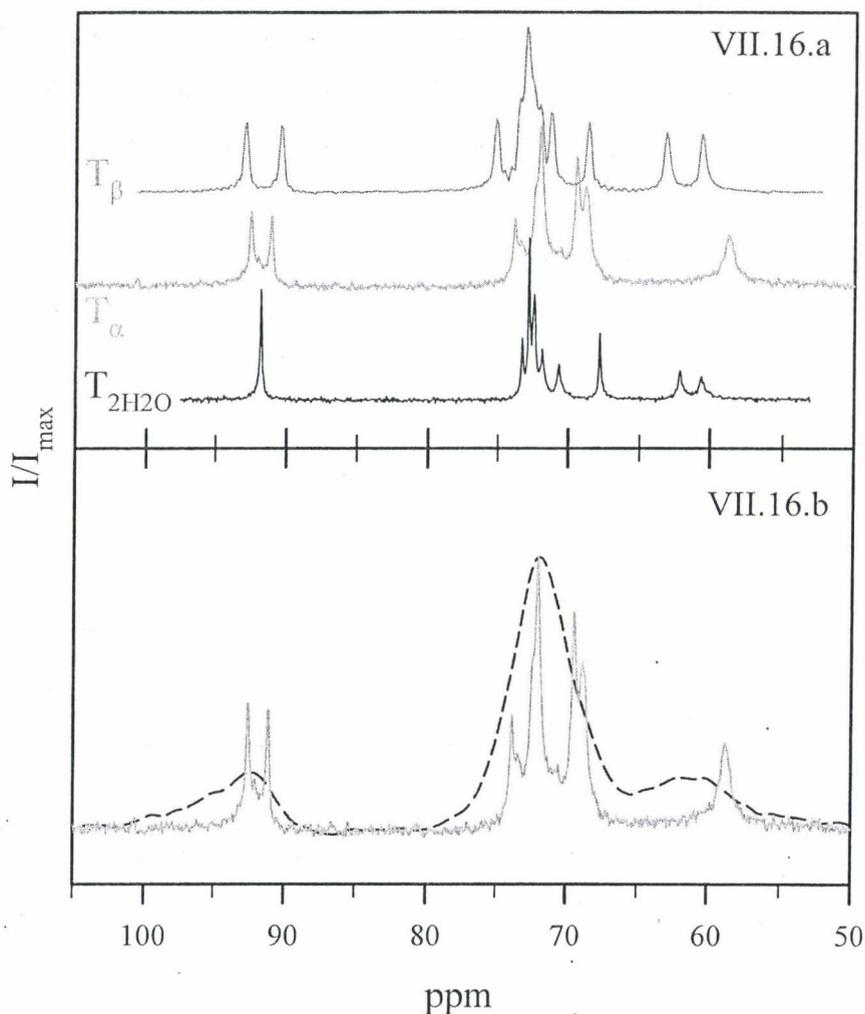


Figure VII.16 :

- Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  des phases  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ ,  $T_{\alpha}$  et  $T_{\beta}$  enregistrés à 25°C dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II.
- Spectres RMN enregistrés à  $T_{\text{amb}}$  : de  $T_{\alpha}$  (en trait plein), du tréhalose amorphisé par déshydratation rapide de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  (ligne pointillée)

Le spectre de la forme  $T_{\alpha}$  présente des caractéristiques qui n'apparaissent ni sur le spectre de la phase anhydre stable  $T_{\beta}$ , ni sur celui de la forme dihydrate reportés dans la littérature [28]. Par exemple, les pics observés pour  $T_{\alpha}$  à 70 ppm et 93 ppm, ne sont visibles pour aucune des deux autres phases. Cela prouve que la structure de  $T_{\alpha}$  diffère de celles de  $T_{\beta}$  et  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ . En outre, on ne repère aucun élargissement traduisant une fraction amorphe au sein de l'échantillon. Ceci prouve que la cristallinité de la phase  $T_{\alpha}$  est analogue à celle des deux autres phases du tréhalose.

Le spectre de  $T_{\alpha}$  est en tous points comparable à celui précédemment publié par Gil et Belton [29]. On retrouve dans les deux cas trois massifs de pics, attribués dans l'ordre des

fréquences décroissantes aux déplacements chimiques des carbones impliqués dans la liaison glycosidique, des autres carbones des cycles, et des groupements  $\text{CH}_2\text{OH}$  branchés sur les carbones 6 et 6'. On note également que le spectre de  $T_\alpha$  ne présente qu'un pic unique, large, entre 58 et 62 ppm, au lieu du doublet observé pour  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  et  $T_\beta$ . Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises :

- il peut s'agir d'un doublet de pics non résolu
- il peut aussi s'agir d'un échange dynamique entre les deux atomes de carbones : leur fréquence est tellement rapide que les conditions expérimentales appliquées ne permettent d'en visualiser qu'une moyenne
- les deux atomes de carbone C6 et C6' pourraient ne pas être équivalents.

La pureté de la phase  $T_\alpha$  a été discutée par Gil et Belton [29], qui attribuent les asymétries détectables dans le pied des raies des carbones C1 et C6 à la présence de tréhalose amorphe. Nos expériences préliminaires (cf. section A) ont montré que la déshydratation du tréhalose pouvait conduire à un anhydre constitué de phase  $T_\alpha$  et d'amorphe. C'est pourquoi nous avons superposé, sur la **figure VII.16.b**, les spectres de  $T_\alpha$  et du tréhalose amorphisé par déshydratation rapide de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ . Il apparaît clairement que les asymétries du spectre de  $T_\alpha$  ne correspondent pas au spectre RMN de l'amorphe. Par conséquent, le protocole de préparation de la phase  $T_\alpha$  utilisé ici produit vraisemblablement une phase pure.

Les résultats de RMN  $^{13}\text{C}$  exposés ci-dessus amènent deux conclusions principales :

- le spectre de la phase  $T_\alpha$  se distingue clairement de ceux de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  et  $T_\beta$ . En accord avec la diffraction des rayons X, la phase  $T_\alpha$  possède donc bien sa structure propre.
- la largeur des pics du spectre de  $T_\alpha$  est la même pour les trois phases (excepté pour le pic des atomes C6). Par conséquent, la largeur inhabituelle des pics de Bragg du diagramme de DX n'est pas due à une amorphisation partielle ou à une faible cristallinité de  $T_\alpha$ . Elle serait plutôt liée à une nanostructuration compatible avec le mode de formation de  $T_\alpha$ .

#### 4. Stabilité thermique de $T_\alpha$

Une fois formée à partir de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ , la phase  $T_\alpha$  peut subsister (sous atmosphère parfaitement sèche) sur un domaine de température assez vaste, qui s'étend du domaine sub-ambient à la température de fusion  $T_f(T_\alpha) = 125^\circ\text{C}$  (d'après des expériences de diffraction des rayons X en température non exposées ici).

Cette température de fusion constitue une propriété remarquable de cette phase. En effet, elle se situe juste au-dessus de la température de transition vitreuse  $T_g = 118^\circ\text{C}$ . Cela semble

indiquer que, même en dessous de  $T_g$ , la phase  $T_\alpha$  est instable par rapport à l'amorphe. Dans cette hypothèse, la phase  $T_\alpha$  serait générée dans un état de surfusion, et ne pourrait subsister qu'en raison de la dynamique trop faible pour permettre les réarrangements structuraux dans ce domaine de température.

Une autre interprétation possible de la proximité de  $T_f(T_\alpha)$  avec  $T_g$  est donnée par la théorie de Gibbs-Thomson [30]. Les fusions de phases nanostructurées peuvent se trouver déprimées en température. Dans le cas de la phase  $T_\alpha$ , la largeur des raies de Bragg du diagramme de DX est compatible avec une taille de cristallites de 20-50 Å. On ne peut donc pas exclure que le pic endothermique observé à 125°C corresponde à la fusion hors équilibre de la phase  $T_\alpha$ , considérablement déprimée par rapport à ce que serait la température de fusion d'un échantillon massif.

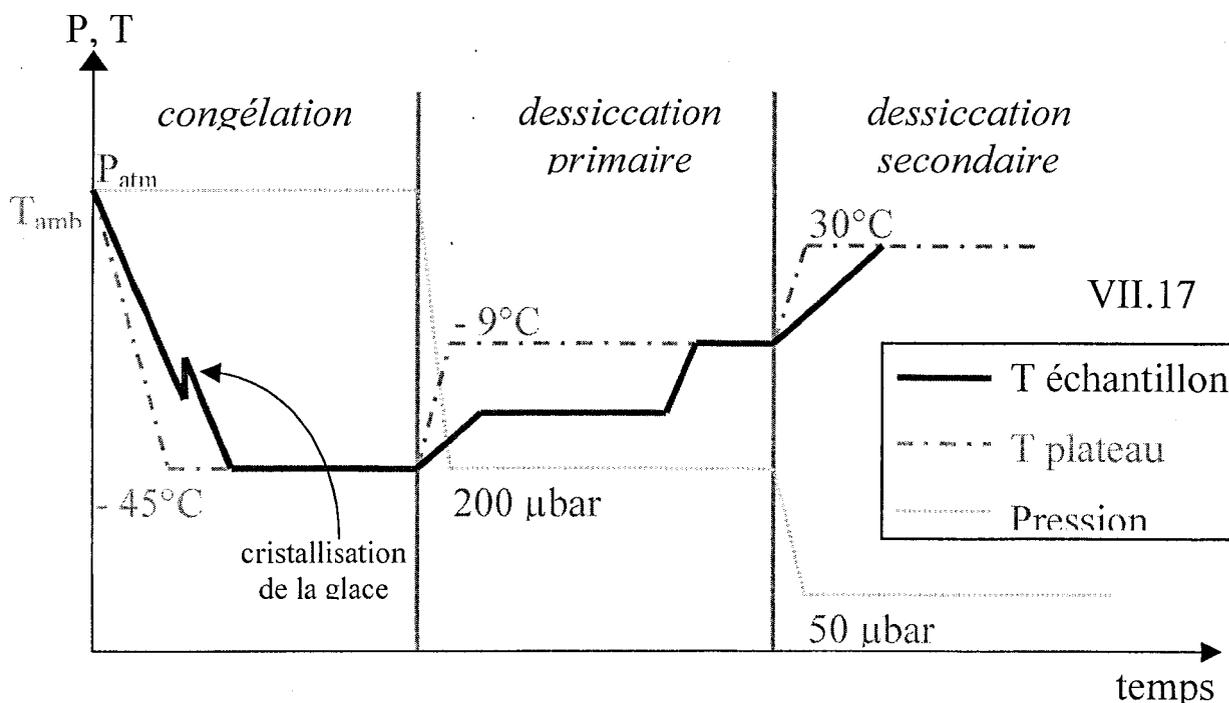
## B. ETUDE D'UN LYOPHILISAT DE TREHALOSE

La lyophilisation est un procédé de déshydratation couramment employé dans l'industrie pharmaceutique [31]. Il nécessite la congélation d'une solution aqueuse initiale, puis le séchage du mélange par sublimation de la glace. Le stockage et la manipulation des formulations thérapeutiques liquides étant délicats, la lyophilisation est utilisée pour élaborer des formulations solides, souvent plus stables et plus faciles à conserver que la forme en solution.

Pour les lyophilisations pharmaceutiques, les solutions de départ sont souvent des mélanges ternaires {principe actif / excipient / eau}. L'excipient est alors utilisé soit comme *agent de structure* dont le rôle est d'augmenter la quantité de matière sèche, soit comme *cryoprotecteur* aidant à protéger le principe actif, notamment lors de l'étape de congélation.

### B.1. Cycle de lyophilisation

Notre étude portant exclusivement sur le tréhalose, nous avons étudié le mélange binaire {tréhalose / eau} sans adjonction de principe actif. Les lyophilisats ont été préparés à partir d'une solution contenant 90% d'eau distillée et 10% de tréhalose. Le cycle de lyophilisation appliqué est résumé sur la **figure VII.17**.



*Figure VII.17 :*

*Cycle de lyophilisation utilisé pour la préparation des lyophilisats de tréhalose. On y distingue les étapes successives de congélation et de séchage (dessiccations primaire et secondaire). Lyophilisats préparés par Aurélia Chevallier, Aventis Pharma.*

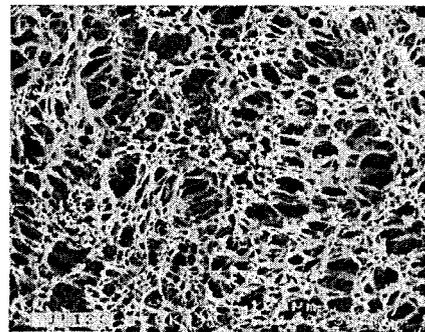
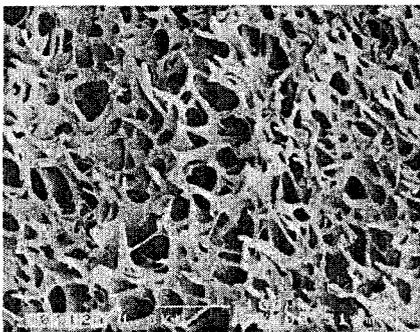
La courbe en traits pleins représente la réponse de l'échantillon aux sollicitations extérieures que sont la température et la pression. Le processus de lyophilisation se décompose en trois étapes :

- l'étape de congélation de la solution, qui consiste à refroidir le système à  $-45^{\circ}\text{C}$ , et à le maintenir à cette température pendant 2 h
- l'étape de dessiccation primaire, qui vise à sublimer la glace contenue dans le mélange. Cette étape consiste en une isotherme à  $-9^{\circ}\text{C}$ , sous 200  $\mu\text{bar}$  de pression, pendant 15 h
- l'étape de dessiccation secondaire, qui complète le séchage du lyophilisat. L'échantillon est amené à  $30^{\circ}\text{C}$ , puis maintenu à cette température pendant 15 h, sous une pression de 50  $\mu\text{bar}$

## **B.2. Caractérisation visuelle des lyophilisats de tréhalose**

Une inspection visuelle des lyophilisats indique que ceux-ci sont de couleur blanche, apparemment homogènes. Le volume occupé par le lyophilisat est le même que celui de la solution initiale, ce qui laisse penser que les phénomènes de « collapse » (l'effondrement de la microstructure du lyophilisat) [32] ont été évités. Le caractère « non collapsé » d'un lyophilisat est un critère extrêmement important pour juger de sa qualité et de sa stabilité.

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) se révèle être une technique de choix pour évaluer la qualité de la texture des lyophilisats au niveau microscopique. Les **photos VII.1 et VII.2** montrent que les lyophilisats de tréhalose présentent une texture peu dense mais très homogène. On ne relève pas sur ces clichés de zone de collapse, ce qui prouve que la microstructure des lyophilisats de tréhalose est de bonne qualité.



*Photos VII.1 et VII.2 :*

*Lyophilisats de tréhalose photographiés par MEB. La texture est alvéolaire et peu dense, mais homogène. Aucune zone d'effondrement n'apparaît sur les clichés. Photos de Sophie Noël, Aventis Pharma.*

### B.3. Caractéristiques structurales et thermodynamiques d'un lyophilisat de tréhalose

La figure VII.18 présente le diagramme de DX et le thermogramme enregistré à 5°C/min d'un lyophilisat de tréhalose. Le thermogramme de l'échantillon vitrifié par sous refroidissement du liquide est donné à titre comparatif.

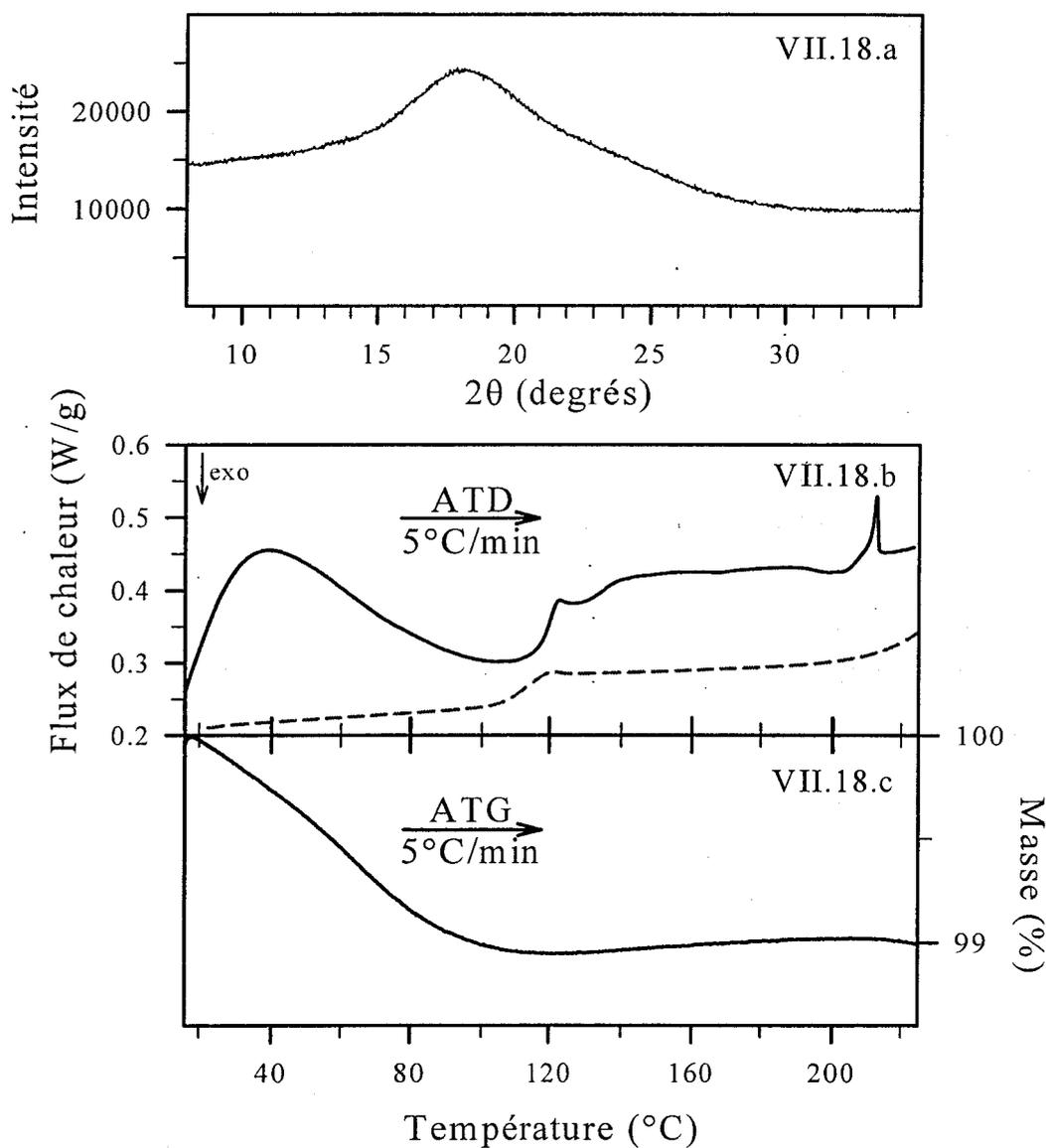


Figure VII.18 :

- diagramme de DX d'un lyophilisat de tréhalose, enregistré sur plaquette à  $T_{amb}$
- en traits pleins : thermogramme du tréhalose lyophilisé, enregistré au chauffage à 5°C/min. En pointillés : thermogramme du verre de liquide, enregistré dans les mêmes conditions
- signature ATG du lyophilisat de tréhalose, enregistré au chauffage à 5°C/min

L'absence de pics de Bragg sur le diagramme de la figure VII.18.a et l'existence d'un halo de diffusion indiquent que le lyophilisat est complètement **amorphe**. Le thermogramme correspondant (figure VII.18.b) présente quatre accidents enthalpiques distincts :

- un large endotherme qui s'étend de 10 à 90°C. Le domaine de température de l'endotherme correspond exactement au domaine sur lequel on mesure, par ATG, une perte de masse de 1% (figure VII.18.c). L'endotherme observé en ATD est donc attribué à l'évaporation d'eau résiduelle n'ayant pas été évacuée par les deux étapes de séchage du cycle de lyophilisation. Cette teneur en eau résiduelle n'est que de 1%, ce qui est relativement faible. A titre d'exemple, un lyophilisat de maltose préparé dans les mêmes conditions, contient environ 3 % d'eau résiduelle [32]. Le diagramme de DX de la figure VII.18.a ne présente pas de pic de Bragg. Ceci indique que l'eau présente dans l'échantillon ne provoque pas la cristallisation de  $T_{2H_2O}$
- un saut de  $C_p$  qui intervient à 118°C. Il est analogue à celui observé pour le verre de liquide, dont le thermogramme enregistré dans les mêmes conditions est donné sur la figure VII.18.b à titre comparatif. La présence de ce saut de  $C_p$  montre que la lyophilisation du tréhalose conduit à un **amorphe vitreux**.
- un pic exothermique à 190°C, de très faible enthalpie (1.35 J/g) attribué à la recristallisation d'une partie du lyophilisat amorphe vers la phase cristalline la plus stable à cette température, la phase anhydre  $T_\beta$
- un léger endotherme à 210°C, d'enthalpie 2.16 J/g. Ce pic correspond à la fusion finale de la totalité du tréhalose ayant recristallisé au chauffage. L'enthalpie de ce pic est très faible comparativement à l'enthalpie de fusion du tréhalose  $T_\beta$  (150 J/g). Elle indique que seul 1.5 % de l'échantillon cristallise et fusionne au réchauffage.

Ces résultats démontrent que la lyophilisation du tréhalose conduit à la formation d'un amorphe vitreux. La transition vitreuse du lyophilisat se situe à 118°C, tout comme celle des amorphes issus de la trempe thermique ou du broyage de  $T_\beta$ . La comparaison des propriétés des différents amorphes fait l'objet du chapitre VIII. D'un point de vue pratique, et dans l'optique de la lyophilisation de systèmes ternaires {principe actif / disaccharide / eau}, la formation d'une matrice amorphe minimise les risques d'altération du principe actif pendant l'étape de congélation. En conséquence, le caractère amorphe du lyophilisat de tréhalose lui confère potentiellement des applications pharmaceutiques en tant qu'excipient cryoprotecteur. Sa faible teneur en humidité résiduelle (1 %), sa température de transition vitreuse élevée (118°C), et sa bonne tenue mécanique constituent autant d'avantages appréciables pour la cryoprotection. Toutefois, son caractère amorphe, et son hygroscopicité potentielle peuvent aussi être à l'origine de recristallisations non souhaitées pendant le stockage.

## Conclusion

L'étude de la déshydratation du tréhalose dihydrate a révélé deux transformations possibles : soit une transition vers la forme cristalline métastable  $T_\alpha$ , soit l'amorphisation. L'ensemble des transformations étudiées ayant eu lieu en dessous de  $T_g$ , on assiste dans le deuxième cas à une réelle vitrification à l'état solide. La dualité {amorphe / phase  $T_\alpha$ } dans le produit anhydre obtenu dépend des conditions expérimentales appliquées. L'utilisation de protocoles expérimentaux soigneusement contrôlés nous a permis de clarifier une situation confuse. Nous avons pu établir les conditions de formation de l'amorphe et de la phase  $T_\alpha$ . Nous avons également déterminé avec précision la température de transition vitreuse de l'amorphe obtenu par une déshydratation « rapide », et la température de fusion de la phase  $T_\alpha$  obtenue par une déshydratation « lente ».

Les caractéristiques de l'amorphe obtenu par déshydratation seront étudiées au chapitre suivant. La phase  $T_\alpha$ , dont la structure n'est pas résolue à ce jour, est très fortement hygroscopique et présente une aptitude à se reconvertir rapidement en tréhalose dihydrate, à température et humidité ambiantes. Elle est donc très difficile à isoler et à manipuler. Son spectre RMN  $^{13}\text{C}$  présente des pics fins, qui témoignent d'une cristallinité comparable à celle de la phase anhydre stable  $T_\beta$ . La largeur inhabituelle des raies de Bragg observées par DX serait donc attribuable à une nanostructuration de  $T_\alpha$ . Cette hypothèse est compatible avec le mode de formation de cette phase révélé par DX :  $T_\alpha$  apparaît de manière erratique dans les zones de l'échantillon déshydratées, au moment même de leur déshydratation. Le fait que cette phase métastable fusionne à  $125^\circ\text{C}$ , immédiatement après la transition vitreuse, soulève des interrogations. Il s'agit en particulier de savoir si ce comportement provient d'une dépression de  $T_f(T_\alpha)$  par effet Gibbs-Thomson dû à la nanostructuration, ou si  $T_\alpha$  est générée hors de son domaine de stabilité, et maintenue dans un état de surfusion jusqu'à ce que la mobilité moléculaire lui permette de fondre.

La recherche des paramètres de contrôle du processus de déshydratation nous a amené à étudier les effets de la température et du débit des molécules d'eau qui s'évacuent des cristaux de  $\text{T}_{2\text{H}_2\text{O}}$ . Pour accéder à ce dernier paramètre, nous avons mis au point une méthode d'analyse originale des résultats d'ATG. Il ressort de ces travaux que la température de déshydratation ne contrôle pas, à elle seule, la nature de l'anhydre obtenu. Le débit des molécules d'eau semble être déterminant lors de déshydratations au chauffage. En revanche, pour des déshydratations isothermes, le ralentissement des cinétiques observées aux hautes températures ne permet pas d'affirmer que le débit soit le seul paramètre pertinent. En outre, d'autres études ont prouvé l'influence de paramètres extérieurs, telles la granulométrie des échantillons [23,24] ou les effets de

pression [19]. Les processus de déshydratation sont donc vraisemblablement gouvernés par un ensemble complexe de paramètres qu'il reste à définir et à étudier de manière systématique.

Enfin, la lyophilisation du tréhalose s'est révélée être une autre voie d'amorphisation de ce disaccharide. Les lyophilisats ont été étudiés du point de vue de leur microstructure et de leur comportement au réchauffage. Ils sont exempts de zones de collapse, et totalement amorphisés. Les caractéristiques dynamique de cet amorphe seront détaillées au chapitre VIII.

**REFERENCES**

1. R.K. Khankari, D.J.W. Grant, *Thermochimica Acta*, **248** (1995), 61
2. J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe, *Annu. Rev. Physiol.*, **60** (1998), 73
3. K.C. Fox, *Science*, **267** (1995), 1922
4. J. H. Crowe, L.M. Crowe, A.E. Oliver, N. Tsvetkova, W. Wolkers, F. Tablin, *Cryobiology*, **43** (2001), 89
5. A.K. Dash, Y. Mo, A. Pyne, *J. Pharm. Sci.*, **91**, 3 (2002), 708
6. A. Saleki-Gerhardt, J.G. Stowell, S.R. Byrn, G. Zograf, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 3 (1995), 318
7. N. Onodera, H. Suga, S. Seki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41** (1968), 2222
8. S. Ding, J. Fan, L. Green, Q. Lu, E. Sanchez, C.A. Angell, *J. Therm. Anal.*, **47** (1996), 1391
9. C. Macdonald, G.P. Johari, *J. Molec. Struct.*, **523** (2000), 19
10. F. Sussich, F. Princivalle, A. Cesaro, *Carbohydr. Res.*, **322** (1999), 113
11. F. Sussich, R. Urbani, F. Princivalle, A. Cesaro, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998), 7893
12. F. Sussich, R. Urbani, F. Princivalle, A. Cesaro, S. Brukner, *Carbohydr. Letters*, **2** (1997), 403
13. J.L. Green, C.A. Angell, *J. Phys. Chem.*, **93** (1989), 2880
14. Y.H. Roos, *Carbohydr. Res.*, **238** (1993), 39
15. G.A. Jeffrey, E. Nanni, *Carbohydr. Res.*, **137** (1985), 21
16. T. Taga, M. Senma, K. Osaki, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3258
17. G.M. Brown, D.C. Rohrer, D. Berking, C.A. Beevers, R.O. Gould, R. Simpson, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3145
18. H.J. Reisener, H.R. Goldschmid, G.A. Ledingham, A.S. Perlin, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **2** (1962), 403
19. J. Han, S. Gupte, R. Suryanarayanan, *Int. J. Pharm.*, **170** (1998), 63
20. J.F. Willart, A. De Gussemme, S. Hemon, M. Descamps, F. Leveiller, A. Rameau, *J. Phys. Chem. B*, **106** (2002), 3365
21. A.K. Galwey, *Thermochimica Acta*, **355** (2000), 181
22. J.F. Willart et al., accepté pour publication dans *J. Phys. Chem. B*.
23. L.S Taylor, P. York, *Int. J. Pharm.*, **167** (1998), 215
24. L.S. Taylor, A.C. Williams, P. York, *Pharm. Res.*, **15**, 8 (1998)

25. O. Bustin, M. Descamps, *J. Chem. Phys.*, **110**, 22 (1999), 10982
26. G.M. Brown, D.C. Rohrer, D. Berking, C.A. Beevers, R.O. Gould, R. Simpson, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3145
27. T. Taga, M. Senma, K. Osaki, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3258
28. G.A. Jeffrey, R. Nanni, *Carb. Res.*, **137** (1985), 21
29. A.M. Gil, P.S. Belton, V. Felix, *Spectrochimica Acta*, **A52** (1996), 1649
30. A. Keller, M. Hikosaka, S. Rastagi, A. Toda, P.J. Barham, G. Goldbeck-Wood, *J. Mater. Sci.*, **29** (1994), 2579
31. F. Franks, *Cryo-letters*, **11** (1990), 93
32. A. Rameau, communication

## **CHAPITRE VIII**

**Etude comparée des propriétés structurales et  
dynamiques du tréhalose amorphisé par quatre voies  
indépendantes**



Les résultats exposés dans les chapitres précédents montrent qu'il existe plusieurs voies d'amorphisation indépendantes du tréhalose. Nous en avons étudié quatre : la trempe thermique de la phase liquide, la déshydratation de  $T_{2H_2O}$ , la lyophilisation et le broyage mécanique de la forme anhydre  $T_\beta$ . La possibilité, pour un même composé, d'atteindre l'état amorphe par différentes voies complètement indépendantes constitue une particularité originale, qui confère au tréhalose un intérêt considérable pour l'étude de l'état amorphe. Il s'agit notamment de savoir si la structure locale, la stabilité, et la dynamique des amorphes obtenus sont identiques quelle que soit la méthode d'amorphisation, ou si au contraire, on génère de nouvelles situations de polymorphisme comparables à celles observées par exemple dans le triphénylphosphite [1,2] ou la glace [3].

D'autre part, la caractérisation de l'état amorphe lui-même s'inscrit comme une étape indispensable dans la compréhension des propriétés bioprotectrices du tréhalose. L'hypothèse de la formation de couches de tréhalose amorphe autour des molécules vivantes a été envisagée comme mécanisme de biopréservation [4,5]. L'Annexe 2 propose un récapitulatif des différentes possibilités suggérées pour expliquer l'action bioprotectrice du tréhalose. Par ailleurs, la mobilité moléculaire dans les amorphes est un paramètre important pour l'industrie pharmaceutique, puisqu'elle influence directement la stabilité des matériaux.

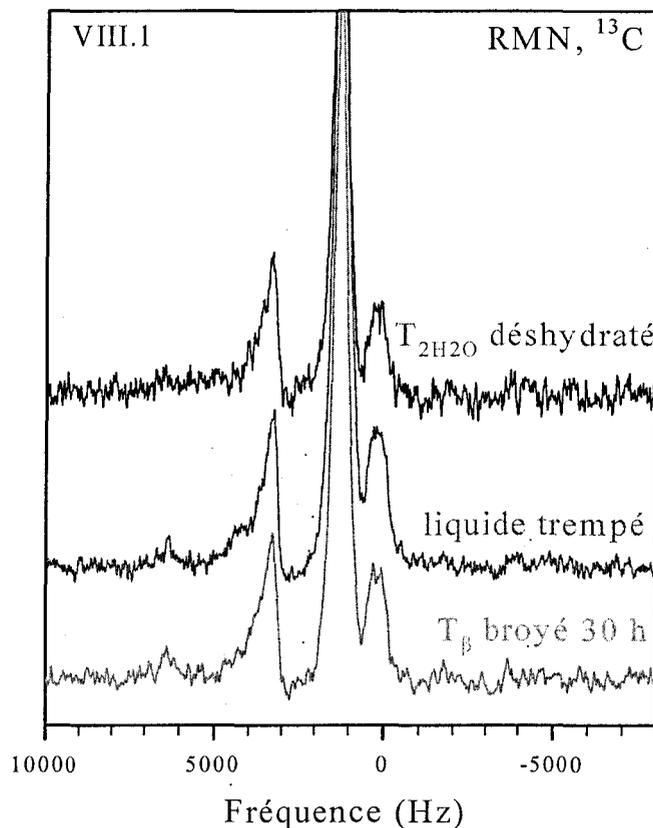
L'objet de ce chapitre est de comparer les propriétés des amorphes issus de la trempe thermique, du broyage mécanique, de la lyophilisation et de la déshydratation du tréhalose. La section A sera consacrée à la comparaison des caractéristiques structurales des différents amorphes, fondée sur les résultats expérimentaux de Résonance Magnétique Nucléaire. Dans la section B, nous étudierons les propriétés dynamiques du tréhalose dans le domaine métastable, puis dans le domaine vitreux en section C. Les techniques expérimentales mises en œuvre sont la spectroscopie diélectrique et la spectroscopie de chaleur spécifique. L'ensemble des résultats sera discuté en section D.

## **A. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DU TREHALOSE**

### **AMORPHISE PAR DIFFERENTES VOIES**

Les diagrammes de Diffraction des rayons X des amorphes, présentés dans les chapitres précédents, se caractérisent tous par un halo de diffusion et l'absence totale de pic de Bragg. Il est difficile de déduire de plus amples informations sur l'ordre local dans ces amorphes. La RMN  $^{13}C$ , au contraire, permet de sonder les déplacements chimiques des atomes de carbone, et donc d'étudier la structure intramoléculaire.

La **figure VIII.1** rassemble les spectres RMN  $^{13}\text{C}$ , enregistrés à  $T_{\text{amb}}$  dans les conditions expérimentales décrites au chapitre II, du tréhalose amorphisé par déshydratation, par trempe thermique de la phase liquide et par broyage mécanique. Le spectre du tréhalose  $T_{\beta}$  cristallin est reporté à titre comparatif.



*Figure VIII.1 :*

*De haut en bas : Spectres RMN du tréhalose amorphisé par déshydratation de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ , sous refroidissement de la phase liquide et broyage de  $T_{\beta}$  pendant 30 h*

Les spectres RMN de la figure VIII.1 permettent d'accéder à la structure intramoléculaire du tréhalose amorphe, en sondant les déplacements chimiques de chacun des atomes de carbone de la molécule. Les spectres présentent des similitudes évidentes : on retrouve pour tous les amorphes les trois massifs de pics détectés sur le tréhalose cristallin, qui correspondent respectivement à la liaison glycosidique, aux cycles glucose et aux groupements latéraux [6]. L'étalement fréquentiel de ces trois pics larges est le même quelle que soit la voie d'amorphisation utilisée. Ceci suggère que la distribution des déplacements chimiques est la même pour les trois amorphes, et permet au passage de vérifier que la dégradation thermique du verre de liquide est tout à fait négligeable.

En résumé, aucune différence entre les échantillons de tréhalose amorphisés par différentes voies n'a pu être mise en évidence ni par RMN ni par DX, ce qui peut signifier :

- qu'il n'y a pas de différence structurale entre les quatre amorphes étudiés
- qu'il existe des différences structurales, mais qu'elles interviennent sur une échelle non compatible avec celle des techniques expérimentales utilisées ici.

La figure VIII.2 regroupe les thermogrammes de quatre échantillons de tréhalose amorphisés par déshydratation, broyage, lyophilisation et trempe thermique du liquide. Ces thermogrammes ont été enregistrés dans les mêmes conditions, lors d'un chauffage à 5°C/min.

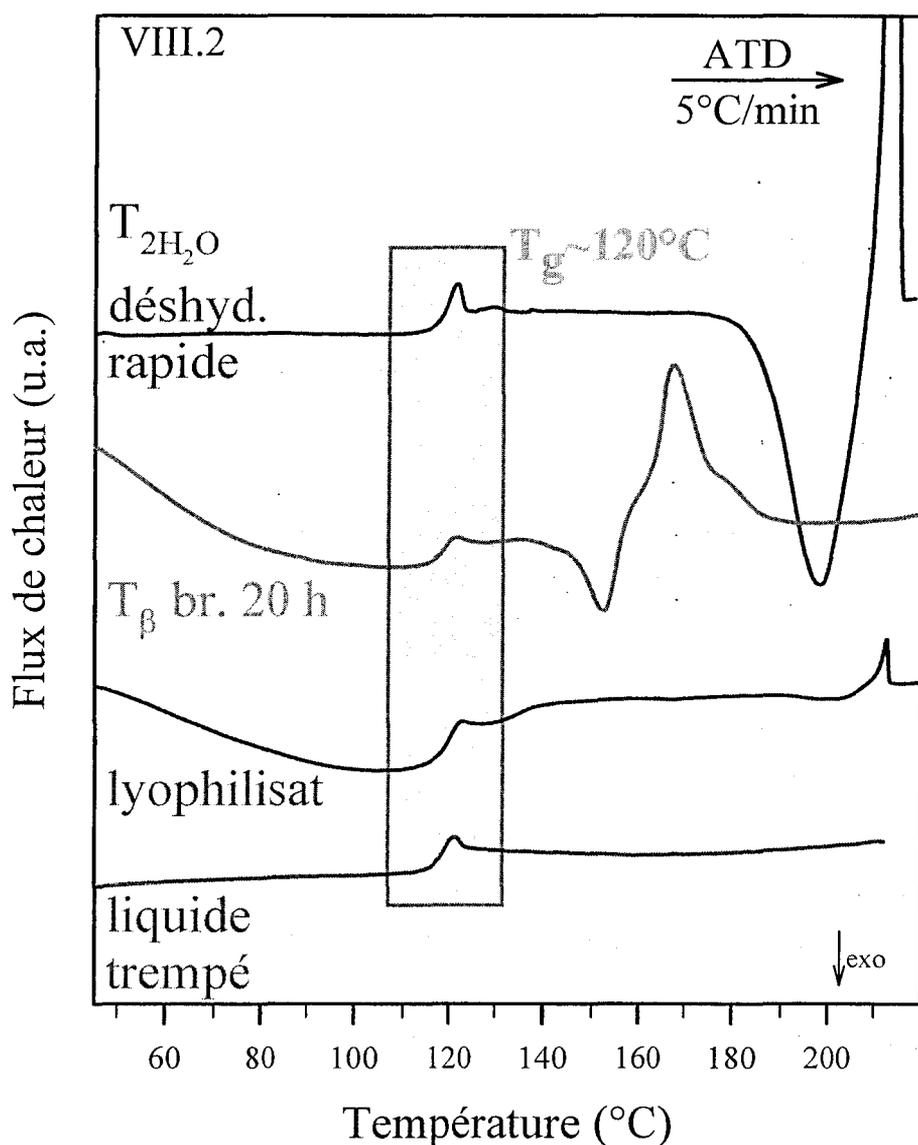


Figure VIII.2 :

Thermogrammes enregistrés au chauffage à 5°C/min d'échantillons de tréhalose amorphisés par déshydratation rapide de  $T_{2H_2O}$ , broyage prolongé de  $T_{\beta}$ , lyophilisation et trempe thermique du liquide.

Deux types de comportements apparaissent :

- les amorphes issus du broyage prolongé de  $T_\beta$  et de la déshydratation de  $T_{2H_2O}$  recristallisent vers la phase anhydre  $T_\beta$ . Dans le cas de l'échantillon broyé, la recristallisation peut être attribuée à la présence résiduelle, après le broyage, de germes de la phase  $T_\beta$  initiale. En revanche, cette raison ne peut être invoquée pour l'amorphe issu de la déshydratation, puisque la phase initiale ( $T_{2H_2O}$ ) n'est pas celle vers laquelle a lieu la cristallisation au chauffage ( $T_\beta$ )
- les amorphes issus de la trempe thermique du liquide ou de la lyophilisation ne recristallisent quasiment pas au réchauffage (seul 1.5 % du lyophilisat cristallise).

Les amorphes issus des phases cristallines semblent donc plus organisés localement, ce qui favorise leur recristallisation. Ceci tend à prouver qu'il existe dans l'amorphe une réminiscence de la structure initiale du composé, qui induirait des différences d'ordre local entre les différentes phases.

En conclusion, les signatures DX et RMN des amorphes préparés de différentes manières ne fournissent pas d'élément significatif permettant de les différencier d'un point de vue structural. Toutefois, les thermogrammes des échantillons amorphisés semblent montrer que ces différences existent, dans la mesure où le comportement de l'échantillon au réchauffage n'est pas le même si l'amorphe a été obtenu à partir d'une phase liquide ou à partir d'une phase solide.

## **B. MOBILITE MOLECULAIRE DU TREHALOSE DANS LE DOMAINE METASTABLE**

Malgré l'abondance des études concernant le tréhalose, on dénombre très peu d'investigations de la mobilité moléculaire du tréhalose pur. En effet, la plupart des études publiées jusqu'à présent concernent la dynamique du système {tréhalose / eau} [7,8]. Les études portant sur le tréhalose pur sont beaucoup moins nombreuses, et présentent une grande disparité de résultats. A titre d'exemple, Sussich et al. ont récemment mentionné des valeurs de l'indice de fragilité  $m$  (voir chapitre II, équation II.9) comprises entre 60 et 180 [9].

Nous présentons ici une étude comparative de la mobilité moléculaire dans le tréhalose amorphisé par trempe thermique, lyophilisation, broyage et déshydratation. Cette étude a nécessité l'utilisation conjointe de deux techniques spectroscopiques : la spectroscopie de chaleur spécifique et la spectroscopie diélectrique. Nous avons ainsi pu sonder la dynamique du tréhalose amorphe sur une large gamme de température, de part et d'autre de la transition vitreuse située à  $T_g = 118^\circ\text{C}$ .

Nous présenterons successivement les résultats obtenus par spectroscopie diélectrique, puis de chaleur spécifique. L'ensemble de ces résultats sera analysé au paragraphe B.3.

## **B.1. Spectroscopie diélectrique**

### ➤ **Protocole expérimental**

L'échantillon de tréhalose amorphisé par sous-refroidissement du liquide a été préparé directement sur une cellule interdigitée. Les autres méthodes d'amorphisation produisant des échantillons poudreux, ces derniers ont été compressés à la presse hydraulique, de manière à obtenir des pastilles homogènes adaptées à la géométrie des cellules de type « condensateur plan » (voir chapitre II, § B.8). Nous avons pris soin de nous assurer que la compression des échantillons était suffisante pour produire des pastilles homogènes sans altérer les propriétés diélectriques des échantillons. Par ailleurs, les expériences se sont toutes déroulées sous un balayage d'azote sec, pour éviter les risques d'absorption d'eau par la poudre, spécialement aux basses températures.

### ➤ **Résultats**

Pour déceler la présence des relaxations principales, nous avons d'abord effectué des acquisitions isochrones, au cours d'une rampe à 1°C/min, de 180 à 100°C. Le domaine fréquentiel couvert s'étend de 1 Hz à 2.10<sup>5</sup> Hz.

#### ▪ **Liquide sous refroidi**

La **figure VIII.3** présente, pour le liquide sous refroidi, l'évolution de la partie imaginaire de la permittivité diélectrique,  $\epsilon_T''(\omega)$ , en fonction de la température. Seules les courbes correspondant aux plus hautes fréquences, à savoir 2.10<sup>5</sup> Hz, 10<sup>5</sup> Hz et 7.10<sup>4</sup> Hz présentent un pic de relaxation correspondant à la relaxation primaire ou relaxation  $\alpha$ . Le pic est d'autant mieux résolu que la fréquence est élevée, et son maximum se décale vers les hautes températures ( $T_{\max} = 149^\circ\text{C}$  à 7.10<sup>4</sup> Hz, et 152°C à 2.10<sup>5</sup> Hz). Aux plus basses fréquences, les courbes  $\epsilon_T''(\omega)$  montrent une contribution de conductivité tellement importante qu'elle masque le processus de relaxation  $\alpha$  : à 3.10<sup>4</sup> Hz et 10<sup>4</sup> Hz, la relaxation n'apparaît qu'au travers d'un épaulement sur le signal de conductivité. Aux fréquences inférieures à 10<sup>4</sup> Hz, il est impossible de détecter le processus de relaxation diélectrique  $\alpha$ . Il faut également signaler qu'une telle conductivité gêne considérablement la réalisation de mesures isothermes.

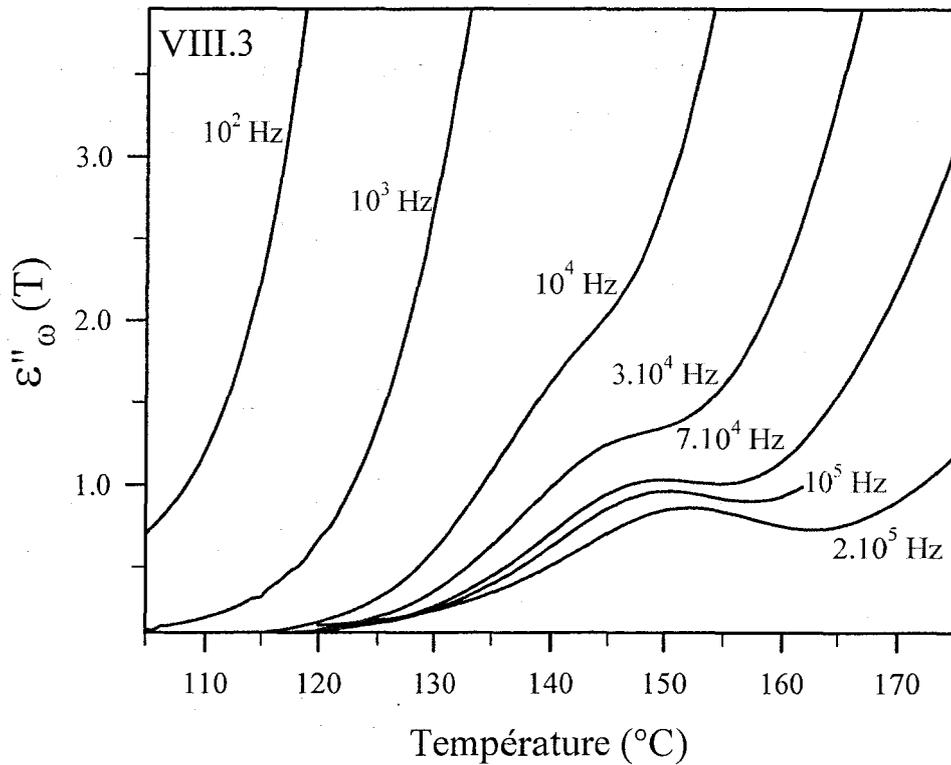


Figure VIII.3 :

Evolution en température de la partie imaginaire de la permittivité diélectrique du tréhalose amorphisé par trempe thermique. L'expérience a été effectuée lors d'un refroidissement à 1°C/min. La réponse diélectrique de l'échantillon est fortement perturbée par une importante contribution de la conductivité.

- Cas des amorphes préparés par lyophilisation, broyage et déshydratation

L'étude des relaxations diélectriques au-dessus de  $T_g$  n'a pas pu être réalisée pour les trois autres échantillons. La tenue mécanique des pastilles n'étant pas satisfaisante au chauffage, nous n'avons pas obtenu de signal diélectrique exploitable.

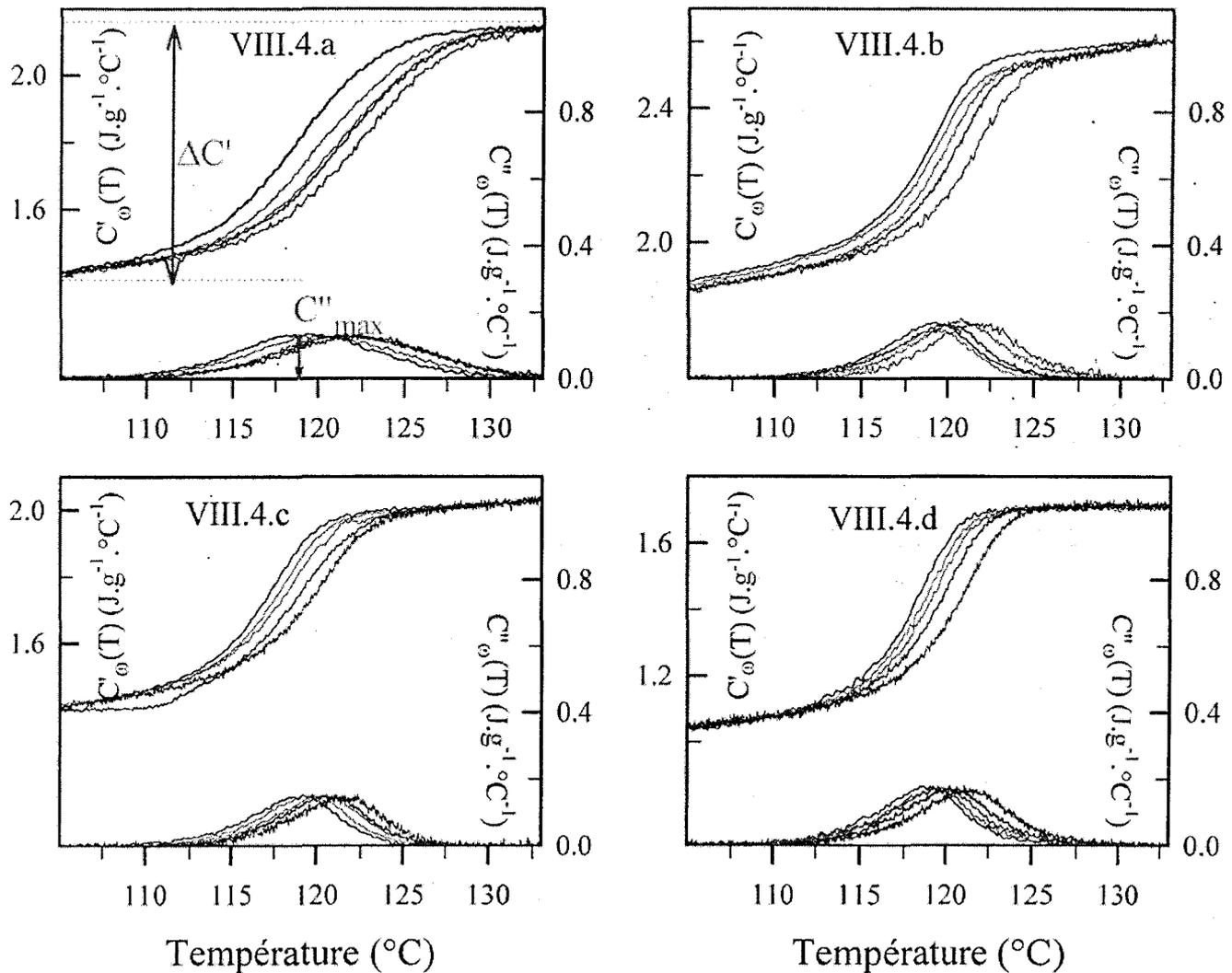
## B.2. Spectroscopie de chaleur spécifique

L'ATD à modulation de température offre la possibilité d'explorer un domaine de fréquences compris entre 0.01 Hz et 0.1 Hz. Cette technique permet donc de sonder les modes de relaxations enthalpiques au voisinage de la transition vitreuse, pour laquelle les temps caractéristiques de relaxation sont de l'ordre de 100 s.

Nous avons appliqué le même protocole expérimental aux quatre échantillons. Les données ont été enregistrées au cours de balayages en température, allant de 145°C à 95°C à la vitesse de 0.1°C/min. Travailler au refroidissement permet d'éviter les effets de rattrapage enthalpique caractéristiques des verres vieillis. En outre, la vitesse de refroidissement extrêmement lente permet

d'éviter les effets de distorsion du signal déjà discutés [10]. Chaque rampe de température correspond à une période de modulation  $P = 2\pi/\omega$  différente. Pour chaque période (20 s, 40 s, 60 s, 80 s et 100 s), l'amplitude  $A$  de la modulation a été ajustée de manière à ce que l'amplitude de la perturbation soit la même à chaque fréquence de balayage :  $A\omega = \pi/100^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ . Les expériences ont été réalisées sous balayage d'hélium, afin de prévenir toute hydratation des amorphes.

La **figure VIII.4** présente les parties réelle et imaginaire de la chaleur spécifique complexe  $C_p^*(T)$ , respectivement notées  $C'_\omega(T)$  et  $C''_\omega(T)$ , en fonction de la température (VIII.4.a : verre de liquide, VIII.4.b :  $T_\beta$  broyée 30 h, VIII.4.c :  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$  déshydraté et VIII.4.d : lyophilisat).



**Figure VIII.4 :**

Spectroscopies de chaleur spécifique pour les amorphes issus de la trempe du liquide (VIII.4.a), du broyage de  $T_\beta$  (VIII.4.b), de la déshydratation (VIII.4.c) et de la lyophilisation (VIII.4.d). Les courbes ont été enregistrées au refroidissement, à 0.1°C/min. Elles correspondent à des périodes de modulation de 100 s, 80 s, 60 s, 40 s et 20 s dans l'ordre croissant des températures.

Les courbes  $C''_{\omega}(T)$  présentent des pics dont les maxima, situés aux températures  $T_{\omega}$ , coïncident avec les points d'inflexion de courbes  $C'_{\omega}(T)$ . La température  $T_{\omega}$ , qui augmente avec  $\omega$ , est la température à laquelle le temps de relaxation caractéristique du matériau,  $\tau(T_{\omega})$ , est le plus probable. L'évolution en température des courbes  $C''_{\omega}(T)$  indique que le temps caractéristique de relaxation du tréhalose amorphe augmente quand la température diminue. Les quatre échantillons de la figure VIII.4 présentent un comportement similaire. La dépendance en température du temps caractéristique de relaxation enthalpique est mise en évidence sur le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.5.

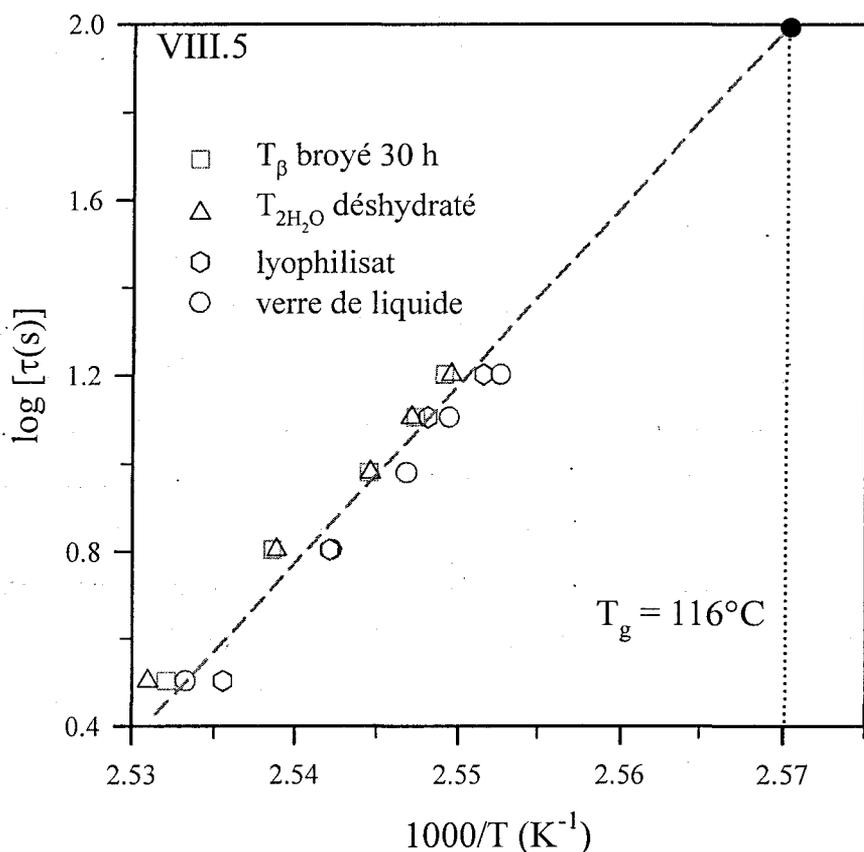


Figure VIII.5 :

Diagramme d'Arrhenius regroupant les données d'ATD à modulation pour les quatre amorphes de tréhalose.

Les similitudes de comportement relevées sur la figure VIII.4, apparaissent maintenant de manière claire sur la figure VIII.5 : l'évolution en température du temps de relaxation est la même pour les quatre amorphes. Compte tenu de l'étroitesse du domaine de fréquence étudié, le temps caractéristique de relaxation suit une évolution arrhenienne, à savoir :

$$\tau(T_{\omega}) = \tau_0 \exp\left(\frac{E}{T_{\omega}}\right) \quad (\text{VIII.1})$$

Les paramètres  $E$  et  $\tau_0$  de l'expression d'Arrhenius sont reportés dans le **tableau VIII.1** :

	<b>E (K)</b>	<b>Log(<math>\tau_0</math> (s))</b>	<b>T<sub>g</sub> (°C)</b>
<b>Liquide trempé</b>	96153	-105	116.8
<b>T<sub>β</sub> broyé 30 h</b>	90679	-99	116.0
<b>T<sub>2H<sub>2</sub>O</sub> déshydraté</b>	85415	-95	115.8
<b>Lyophilisat</b>	98739	-113	116.1

*Tableau VIII.1 :*

*Paramètres  $E$  et  $\tau_0$  de la loi d'Arrhenius, et température de transition vitreuse déduite du diagramme VIII.5 par extrapolation à  $\tau = 100$  s.*

Le préfacteur  $\tau_0$  de la loi d'Arrhenius correspond au temps de relaxation à température infinie ; il est généralement de l'ordre de  $10^{-14}$  s. Les valeurs de  $E$  et  $\tau_0$  du tableau VIII.1 n'ont donc visiblement pas de sens physique. Elles indiquent seulement que la dépendance en température du temps de relaxation du tréhalose amorphe doit être fortement non arrhenienne. Par contre, l'extrapolation des résultats de la figure VIII.5 permet de déterminer la température de transition vitreuse  $T_g$ , qui correspond au temps caractéristique de relaxation  $\tau(T_g) = 100$  s. Les valeurs de  $T_g$  déduites du diagramme d'Arrhenius sont également reportées dans le tableau VIII.1. Elles varient de 115.8°C à 116.8°C, et sont donc remarquablement proches pour les quatre amorphes. La valeur moyenne  $T_g = 116.2^\circ\text{C}$  est tout à fait comparable à la température de transition vitreuse mesurée par ATD conventionnelle (118°C à 5°C/min), ce qui atteste de la cohérence des temps de relaxation mesurés par spectroscopie de chaleur spécifique.

### **B.3. Analyse des résultats**

#### ➤ **Caractère non arrhénien des relaxations**

Il a été démontré que la spectroscopie de chaleur spécifique permettait d'évaluer le caractère non arrhenien des relaxations, en fournissant une mesure de l'indice de fragilité  $m$  [11]. Nous l'avons vérifié avec l'exemple de la fanansérine (chapitre III, section D). Cette propriété est particulièrement intéressante dans le cas du tréhalose : la spectroscopie diélectrique est fortement gênée par la conductivité, et ne fournit pas suffisamment de points expérimentaux pour pouvoir utiliser la loi VFT (chapitre II, équation II.8).

Le **tableau VIII.2** regroupe les valeurs des indices de fragilité des amorphes de tréhalose, déduites des résultats de la figure VIII.5. Les indices de fragilité ( $m = 102$ -107) sont sensiblement

les mêmes pour les quatre échantillons. La valeur élevée de  $m$  (105 en moyenne) témoigne du caractère très fragile du tréhalose, indépendamment de la voie d'amorphisation empruntée. L'évolution des temps caractéristiques des relaxations principales est donc fortement non arrhenienne, comme on pouvait le prévoir d'après les valeurs d'affinement du tableau VIII.1.

	Indice de fragilité $m$	Coefficient de non exponentialité $\beta_{KWW}$
Liquide trempé	107	0.30
$T_{\beta}$ broyé 30 h	102	0.39
$T_{2H_2O}$ déshydraté	102	0.40
Lyophilisat	109	0.43

*Tableau VIII.2 :*

*Indice de fragilité  $m$  et coefficient de non exponentialité  $\beta_{KWW}$  du tréhalose amorphisé par différentes méthodes, calculés à partir des données de spectroscopie de chaleur spécifique.*

### ➤ Caractère non exponentiel des relaxations

Il a été montré [12,13] que les seules données de spectroscopie de chaleur spécifique pouvaient fournir une estimation du caractère non exponentiel des relaxations, au moyen de l'exposant de non exponentialité  $\beta_{KWW}$  de la loi de Kolrausch-Williams-Watts (voir chapitre II, équation II.10). Les exposants de non exponentialité ont été déduits des courbes d'ATD modulée correspondant à une période de 100 s, selon la méthode proposée en référence [12]. Les valeurs de  $\beta_{KWW}$  sont toutes très inférieures à l'unité ( $0.3 < \beta_{KWW} < 0.43$ ), et traduisent le caractère fortement non exponentiel des relaxations. Ce résultat est cohérent avec les valeurs élevées de  $m$ . Böhmer et al. ont montré que le caractère non exponentiel des relaxations était d'autant plus marqué que la dynamique du système vitrifiable s'écartait du comportement arrhenien [14]. En d'autres termes, les composés très fragiles présentent le plus souvent des coefficients  $\beta_{KWW}$  faibles. Le tréhalose suit donc cette tendance quelle que soit la voie d'amorphisation empruntée.

Le tableau VIII.2 montre que les valeurs de  $\beta_{KWW}$  pour les amorphes issus du broyage, de la déshydratation et de la lyophilisation sont relativement proches, voisines de 0.4. Par contre, l'amorphe obtenu par trempe thermique du liquide, avec un coefficient de non exponentialité égal à 0.3 semble se distinguer des amorphes obtenus par voies non thermiques. Ce point remarquable sera discuté en section D.

## ➤ Conclusions

En conclusion, la réalisation d'une spectroscopie diélectrique du tréhalose amorphe, au-dessus de  $T_g$ , pose deux problèmes majeurs :

- pour les échantillons poudreux compactés, un manque de tenue mécanique de la pastille à haute température qui empêche les mesures diélectriques
- pour le verre de liquide, une contribution très forte de conductivité qui masque les relaxations primaires.

Les données recueillies pour le liquide trempé ne sont pas suffisamment nombreuses pour compléter de manière satisfaisante le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.5, et permettre l'affinement sur une loi de Vogel-Fülcher-Tamman rendant compte de la déviation des temps de relaxation par rapport au comportement arrhenien. Toutefois, la **figure VIII.6**, qui regroupe pour le liquide trempé les temps de relaxation issus des deux spectroscopies montre que les données d'ATD à modulation prolongent celles de l'analyse diélectrique, et que l'évolution globale des temps de relaxation mesurée par ces deux méthodes est cohérente. Ceci prouve également que les modes qui interviennent dans la relaxation diélectrique sont aussi impliqués dans les relaxations enthalpiques.

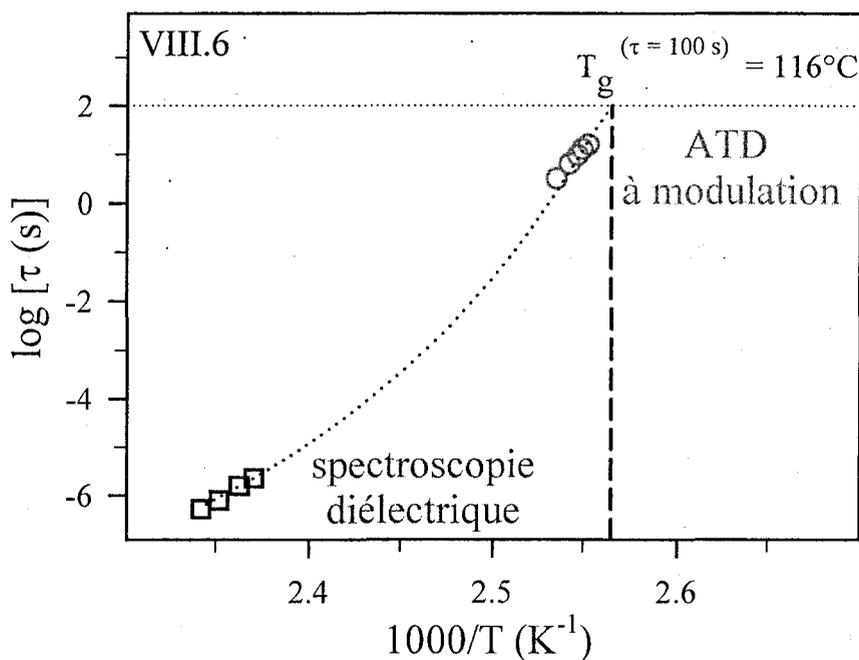


Figure VIII.6 :

Diagramme d'Arrhenius du tréhalose liquide, construit à partir des données d'ATD à modulation (o) et de spectroscopie diélectrique (□). La ligne pointillée est un guide pour l'œil ; elle permet de juger de l'alignement des points issus des deux techniques spectroscopiques utilisées.

L'évaluation des caractéristiques de la mobilité moléculaire du tréhalose dans le domaine métastable repose donc entièrement sur les résultats de spectroscopie de chaleur spécifique. Cette technique montre que les relaxations enthalpiques dans les quatre amorphes testés présentent les mêmes propriétés, à savoir un indice de fragilité très élevé ( $m = 102 - 107$ ) et des relaxations fortement non exponentielles.

## **C. MOBILITE MOLECULAIRE DU TREHALOSE DANS LE DOMAINE VITREUX**

Les relaxations dites « secondaires » témoignent de la mobilité moléculaire résiduelle dans l'état vitreux. Elles peuvent provenir de mouvements relaxationnels localisés de certains groupements atomiques [15], ou au contraire impliquer l'ensemble de la molécule. Ce dernier cas correspond aux relaxations de type « Johari-Goldstein » (JG) dont l'origine n'a pas encore été clairement identifiée [16]. Par ailleurs, ces relaxations sont également susceptibles de jouer un rôle actif dans la biopréservation, en conditionnant la stabilité du système.

Nous présentons dans cette section les résultats d'analyse diélectrique recueillis sur le tréhalose vitreux. Les spectres sont décrits en détails pour le verre de liquide, et plus succinctement pour les amorphes obtenus par les autres voies.

### **C.1. Cas du liquide sous refroidi**

#### **➤ Mise en évidence des relaxations secondaires**

Nous avons effectué sur le verre de liquide des mesures isochrones, au cours d'un balayage en température à 1°C/min, de 180°C à -120°C. La **figure VIII.7** présente la partie imaginaire de la permittivité diélectrique complexe, enregistrée pour 5 fréquences différentes comprises entre 30 Hz et 300 kHz.

Les courbes  $\epsilon''_{\omega}(T)$  montrent clairement des pics de relaxation dont le maximum se décale vers les hautes températures quand la fréquence augmente. Ceci traduit la présence de relaxations secondaires dans le tréhalose vitreux, qui témoignent d'une mobilité moléculaire résiduelle importante, 200°C en dessous de  $T_g$ . Tous les spectres diélectriques de la figure VIII.7 montrent une composante de conductivité à haute température. A 300 kHz, la courbe  $\epsilon''_{\omega}(T)$  présente un pic principal, signe d'une relaxation secondaire, dont le maximum se situe à 20°C. Elle montre aussi un deuxième pic qui se présente sous la forme d'un épaulement à 150°C, et qui correspond à la trace de

la relaxation primaire  $\alpha$ . Pour les autres fréquences, seul le pic caractéristique des relaxations secondaires apparaît sur les spectres. A 30 Hz et 300 Hz, on distingue dans le pied du pic principal une deuxième composante, d'amplitude beaucoup plus faible, qui signale l'existence d'un deuxième processus de relaxation secondaire. Ce deuxième pic apparaît clairement à 30 Hz ; son maximum est situé à 10°C. A 300 Hz, les pics sont beaucoup moins séparés, et le processus de moindre amplitude ne se manifeste qu'au travers d'un épaulement à 25°C.

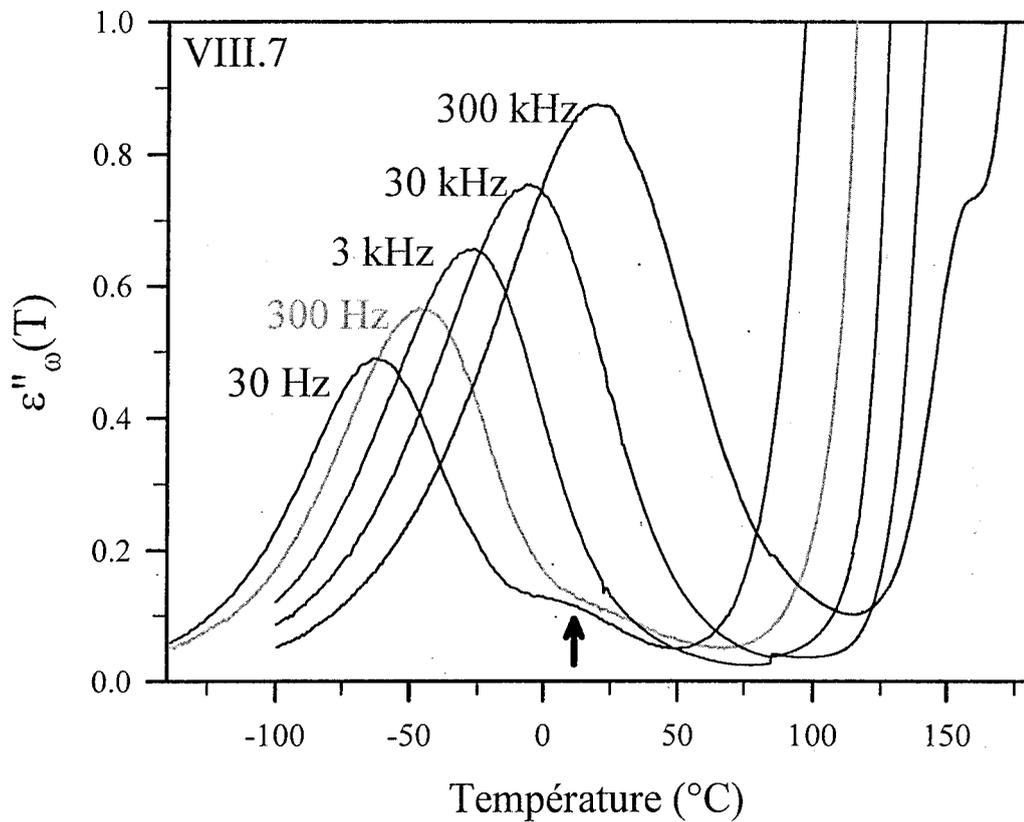


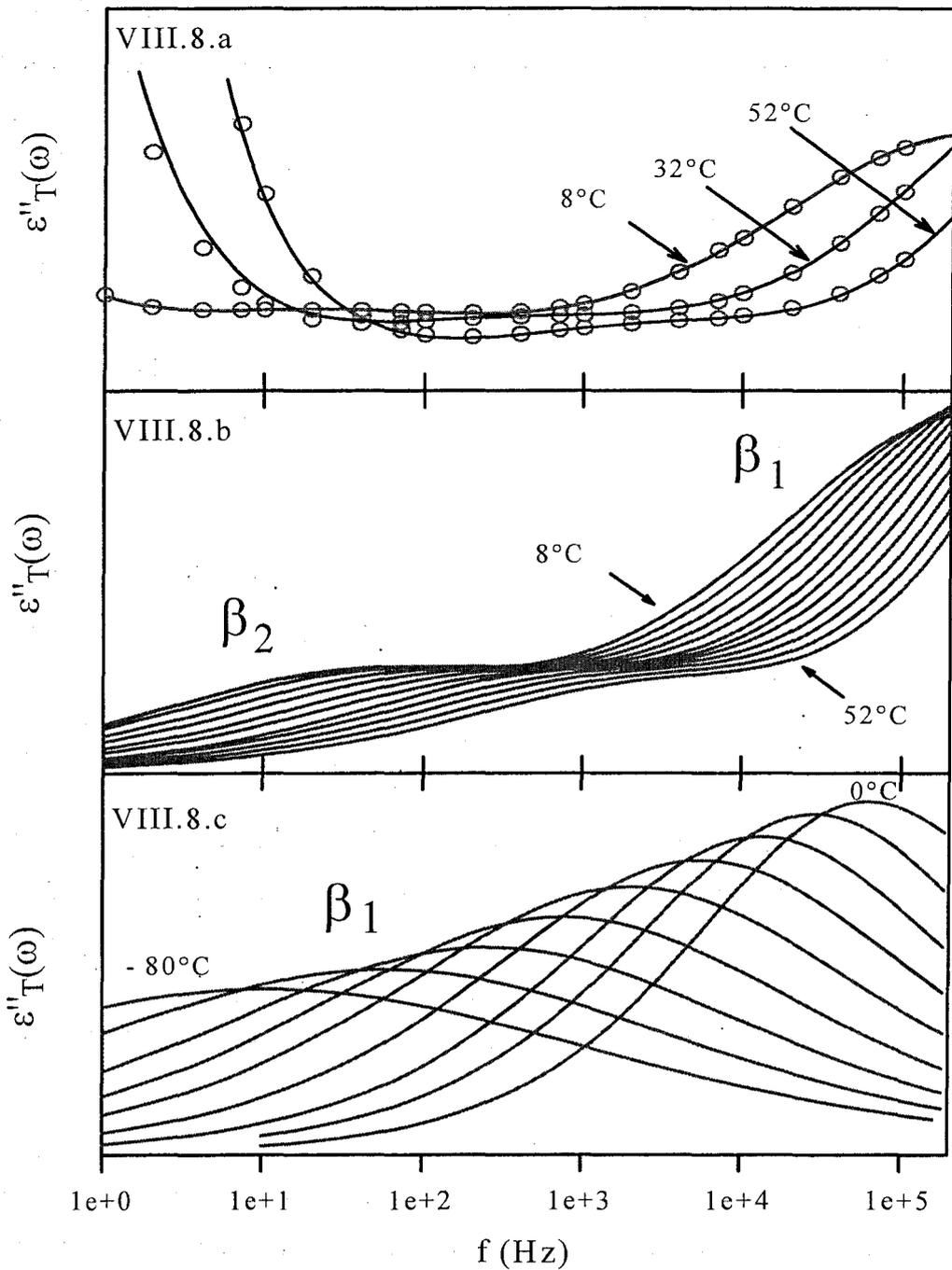
Figure VIII.7 :

Partie imaginaire de la permittivité diélectrique enregistrée au cours d'un refroidissement à 1°C/min. Les spectres « basses fréquences » (30 et 300 Hz) laissent apparaître deux pics distincts, qui révèlent l'existence de processus de relaxation multiples.

### ➤ Etude diélectrique des relaxations secondaires

La présence de processus de relaxations secondaires multiples, suggérée par les résultats de la figure VIII.7 nous a amené à procéder à une série d'expériences isothermes sur le tréhalose vitrifié par trempe. Nous avons exploré un domaine de température allant de -110°C à 52°. Les isothermes ont été effectuées tous les 10°C, de -110 à 0°C, puis par palier de 4°C, de 0 à 52°C. Au cours de chaque isotherme, 22 fréquences comprises entre  $3 \cdot 10^{-2}$  et  $3 \cdot 10^5$  Hz ont été balayées.

La figure VIII.8. présente les courbes  $\epsilon''(\omega)$  enregistrées sous  $T_g$ , pour le liquide trempé.



*Figure VIII.8 :*

- a. partie imaginaire de la permittivité diélectrique en fonction de la fréquence, enregistrée lors de trois isothermes à 8°C, 32°C et 52°C. Elle montre deux processus de relaxations secondaires distincts, ainsi qu'un fort signal dû à la conductivité. Les cercles représentent les points expérimentaux, et les courbes en traits pleins les affinements réalisés sur une combinaison d'expressions de Cole et Cole.
- b. Affinements pour les isothermes allant de 8°C à 52°C. La conductivité a été soustraite pour permettre l'observation des deux processus de relaxation
- c. Isothermes comprises entre -80°C et 0°C

Elle montre l'évolution en fréquence de la partie imaginaire de la susceptibilité diélectrique du tréhalose sous-refroidi, à trois températures : 8°C, 32°C et 52°C. Les spectres présentent :

- **un processus prédominant**, à haute fréquence, que nous appellerons «  $\beta_1$  », qui est clairement visible à 8°C, mais se décale hors de la fenêtre fréquentielle accessible pour des températures plus élevées
- **un deuxième processus** de plus faible amplitude, que nous appellerons «  $\beta_2$  », qui intervient à plus basse fréquence que le processus  $\beta_1$
- **une contribution importante de la conductivité**, qui gêne la détection des processus de relaxation aux basses fréquences. Ce phénomène est particulièrement marqué aux températures supérieures à 32°C.

Les pics correspondant aux relaxations secondaires étant symétriques, les affinements ont été réalisés avec une combinaison de deux fonctions de Cole et Cole (cf. chapitre II, section C), à laquelle a été ajouté un terme rendant compte de la conductivité :

$$\varepsilon^*(\omega) = \sum_{i=1}^2 \left( \varepsilon_{\infty i} + \frac{\varepsilon_{si} - \varepsilon_{\infty i}}{1 + (i\omega\tau_i)^{\alpha_i}} \right) + \sigma_{conduct} \quad (\text{VIII.2})$$

Les affinements sont représentés en traits pleins sur la figure VIII.8 ; ils sont en parfaite adéquation avec les résultats expérimentaux. La contribution de la conductivité a ensuite été retirée du signal total, afin de rendre les processus de relaxations secondaires plus visibles. Les données recueillies à « haute température », c'est-à-dire entre 8°C et 52°C, par paliers de 4°C, sont reportées sur la figure VIII.8.b, et les données recueillies à « basse température », soit entre -110°C et 0°C, par paliers de 10°C, sont représentées sur la figure VIII.8.c.

A haute température (figure VIII.8.b), l'observation des relaxations «  $\beta_1$  » est empêchée par la limite haute fréquence de l'analyseur diélectrique. En revanche, le processus  $\beta_1$  apparaît très clairement aux basses températures. Le fait que ce processus n'ait pu être détecté qu'aux basses températures (avec notre appareil), suggère qu'il soit faiblement activé. Le deuxième processus, noté  $\beta_2$ , intervient à plus basses fréquences ; il est aussi de plus faible amplitude que le processus  $\beta_1$ . Le décalage en fréquence des pics de relaxation est plus marqué pour le processus  $\beta_2$  que pour le processus  $\beta_1$ , ce qui suggère que son énergie d'activation  $E_2$  est supérieure à  $E_1$ .

#### ▪ Caractéristiques du processus de relaxation $\beta_1$

Le processus de relaxation  $\beta_1$  se caractérise par des pics symétriques dont la largeur à mi-hauteur est supérieure aux 1.14 décades prédites par le modèle de Debye pour une relaxation exponentielle. La figure VIII.8.c montre que les pics de la relaxation  $\beta_1$  deviennent plus étroits

quand la température augmente : le paramètre d'élargissement de la loi de Cole et Cole,  $\alpha_{\beta_1}(T)$ , passe de 0.29 à  $-80^\circ\text{C}$  à 0.5 à  $0^\circ\text{C}$ . Cependant, la largeur des pics demeurant très importante à toutes les températures étudiées, nous n'avons pas pu déduire de ces mesures l'évolution du paramètre  $\Delta\varepsilon_{\beta_1}(T) = (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)_{\beta_1}(T)$ . Les paramètres d'affinement  $\tau_{\beta_1}(T)$  et  $\alpha_{\beta_1}(T)$  ont été calculés sur le domaine de température où le processus  $\beta_1$  est distinctement observable. Ils sont reportés dans le **tableau VIII.3** :

Paramètres d'affinement des relaxations $\beta_1$ sur une loi de Cole et Cole		
T ( $^\circ\text{C}$ )	$\tau_{\beta_1}$ (s)	$\alpha_{\beta_1}$
- 80	$1.5 \cdot 10^{-2}$	0.29
- 60	$6.2 \cdot 10^{-4}$	0.36
- 40	$7.6 \cdot 10^{-5}$	0.41
-20	$1.2 \cdot 10^{-5}$	0.49
0	$2.6 \cdot 10^{-6}$	0.55

*Tableau VIII.3 :*

*Paramètres d'affinement des courbes  $\varepsilon''_T(\omega)$  du processus  $\beta_1$ , sur une loi de Cole et Cole (VIII.2)*

L'évolution des temps de relaxation  $\tau_{\beta_1}(T)$  reflète l'accélération de la dynamique avec l'augmentation de la température. La dépendance de  $\tau_{\beta_1}$  avec la température sera discutée ultérieurement, d'après le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.10.

▪ Caractéristiques du processus de relaxation  $\beta_2$

Les pics  $\varepsilon''_T(\omega)$  associés au processus  $\beta_2$  sont également symétriques. Il est intéressant de noter que le paramètre d'élargissement  $\alpha_{\beta_2}(T)$  ne montre pas d'évolution significative sur le domaine de température où le processus de relaxation apparaît clairement. Les paramètres de l'affinement, c'est-à-dire  $\alpha_{\beta_2}(T)$  et le temps caractéristique de la relaxation  $\tau_{\beta_2}(T)$ , sont reportés dans le **tableau VIII.4**.

L'évolution en température des temps de relaxation  $\tau_{\beta_2}(T)$  sera présentée sur le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.10, et discutée ultérieurement.

Paramètres d'affinement des relaxations $\beta_2$ sur une loi de Cole et Cole		
T (°C)	$\tau_{\beta 1}$ (s)	$\alpha_{\beta 1}$
4	$1.7 \cdot 10^{-2}$	0.47
16	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.46
28	$8.4 \cdot 10^{-4}$	0.46
40	$1.8 \cdot 10^{-4}$	0.45
52	$6.9 \cdot 10^{-5}$	0.48

*Tableau VIII.4 :*

*Paramètres d'affinement des courbes  $\varepsilon_T''(\omega)$  du processus  $\beta_2$ , sur une loi de Cole et Cole (VIII.2)*

La mise en évidence de deux processus de relaxations secondaires distincts dans le tréhalose vitrifié par trempé constitue un fait remarquable qui témoigne d'une mobilité résiduelle importante, bien en dessous de la température de transition vitreuse.

### C.2. Cas des amorphes obtenus par lyophilisation, broyage de $T_\beta$ et déshydratation de $T_{2H_2O}$ .

Nous avons mené le même type d'investigations sur les amorphes obtenus par les autres méthodes. Nous présentons successivement les résultats concernant le lyophilisat, et les amorphes obtenus par broyage et déshydratation. Les protocoles expérimentaux et les méthodes de traitement des données sont identiques à ceux utilisés pour l'étude du verre de liquide.

La **figure VIII.9** présente l'évolution en fréquence des courbes  $\varepsilon_T''(\omega)$  du tréhalose amorphisé par lyophilisation (figure VIII.9.a), par broyage mécanique (figure VIII.9.b) et par déshydratation (figure VIII.9.c). Par souci de lisibilité, les points expérimentaux n'ont été représentés que pour quelques températures. Les courbes en traits pleins correspondent aux affinements réalisés sur des expressions de Cole et Cole (VIII.2).

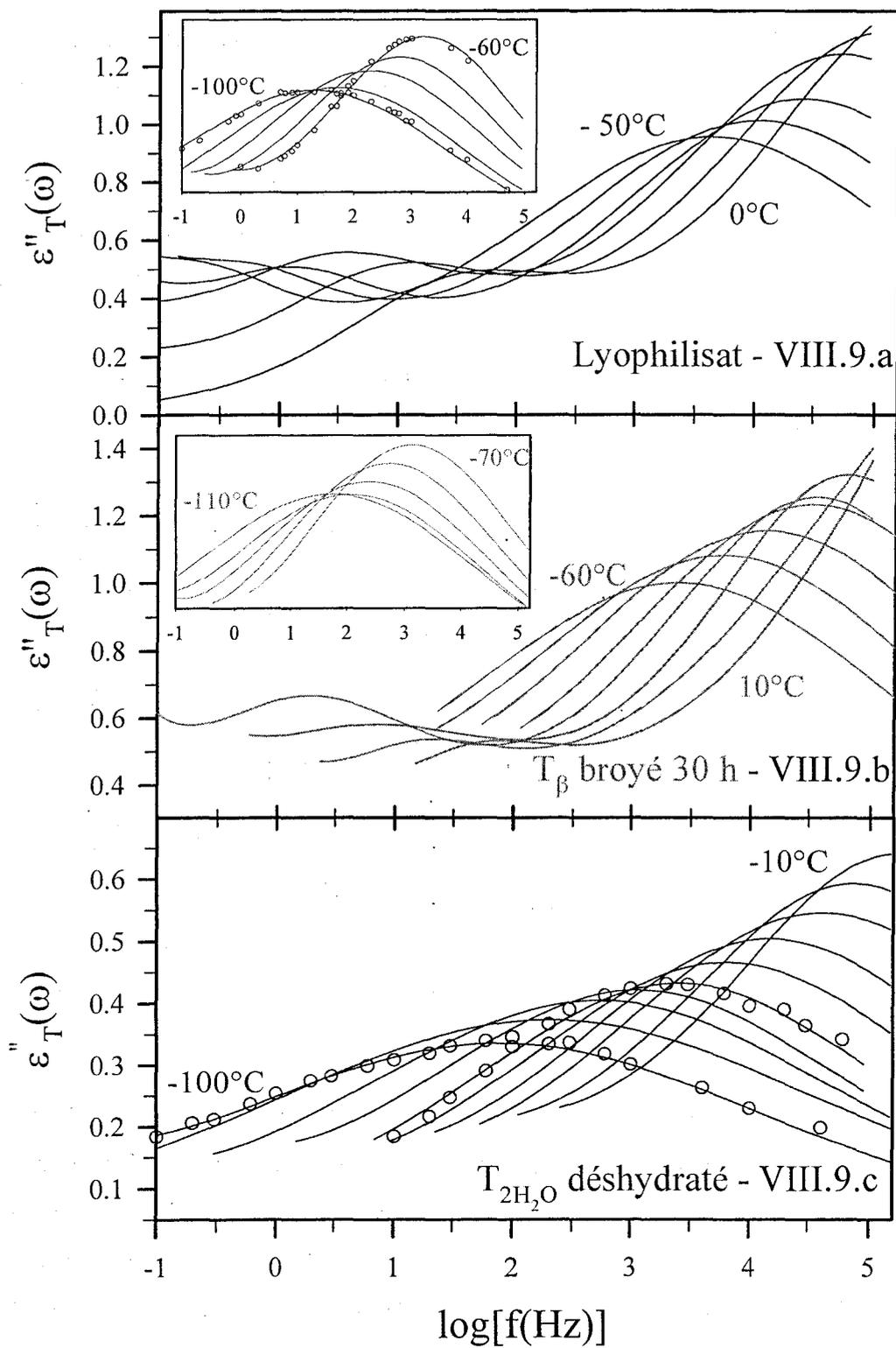


Figure VIII.9 :

Spectres diélectriques enregistrés lors d'isothermes, pour : (a) le tréhalose vitrifié par lyophilisation (expériences réalisées par Agnès Rameau), (b) le tréhalose  $T_\beta$  vitrifié par broyage mécanique, (c) le tréhalose  $T_{2H_2O}$  vitrifié par déshydratation.

Les cercles représentent les points expérimentaux, et les courbes en traits pleins les affinements sur des fonctions de Cole et Cole

➤ **Tréhalose lyophilisé**

Les spectres de la figure VIII.9.a présentent un aspect similaire à ceux obtenus pour le verre de liquide. On repère nettement, à partir de  $-100^{\circ}\text{C}$ , des pics de relaxation dont le maximum se décale vers les hautes fréquences quand la température augmente, de manière comparable à l'évolution observée pour le processus  $\beta_1$  du verre de liquide. A partir de  $-50^{\circ}\text{C}$ , ce processus devient difficilement observable, puisqu'il sort de la fenêtre fréquentielle accessible avec le DEA 2970. A cette même température, il apparaît sur les courbes  $\varepsilon''(\omega)$  un deuxième pic de relaxation, de faible amplitude, situé sur l'aile basse fréquence du pic le plus intense. Ce deuxième pic est d'autant mieux résolu que la température est élevée. Les paramètres des affinements sur une combinaison de fonctions de Cole et Cole sont reportés dans le **tableau VIII.5**.

Lyophilisat – processus « $\beta_1$ »			Lyophilisat – processus « $\beta_2$ »		
T ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\tau_{\beta_1}$ (s)	$\alpha_1$	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\tau_{\beta_2}$ (s)	$\alpha_2$
- 100	$3.41 \cdot 10^{-2}$	0.14	- 40	$2.87 \cdot 10^{-1}$	0.67
- 80	$2.47 \cdot 10^{-4}$	0.28	- 30	$1.21 \cdot 10^{-1}$	0.66
- 60	$8.47 \cdot 10^{-5}$	0.34	- 20	$4.94 \cdot 10^{-2}$	0.55
- 40	$1.45 \cdot 10^{-5}$	0.36	- 10	$1.78 \cdot 10^{-2}$	0.57
- 20	$2.88 \cdot 10^{-6}$	0.40	0	$5.19 \cdot 10^{-3}$	0.58

*Tableau VIII.5 :*

*Paramètres d'affinement des processus de relaxations secondaires notés «  $\beta_1$  » et «  $\beta_2$  » observés dans le tréhalose vitrifié par lyophilisation.  $\tau$  est le temps caractéristique de la relaxation, et  $\alpha$  le coefficient d'élargissement de la distribution*

L'augmentation du coefficient  $\alpha$  traduit une diminution de la largeur des pics de relaxation, c'est-à-dire une homogénéisation de la dynamique, quand la température augmente. Cependant, les valeurs du paramètre  $\alpha_2$  à  $-40$  et  $-30^{\circ}\text{C}$  semblent incohérentes avec cette évolution. Cela provient du fait qu'à ces températures, les pics caractérisant la relaxation «  $\beta_2$  » sont très peu intenses, et fortement mêlés aux pics du processus «  $\beta_1$  ». La détermination de leur largeur est donc imprécise. Cet inconvénient disparaît pour les plus hautes températures pour lesquelles les deux pics sont plus nettement séparés. Sur le domaine de température allant de  $-20$  à  $0^{\circ}\text{C}$ , le paramètre  $\alpha_2$  suit donc l'évolution habituellement observée : il augmente avec la température, ce qui signifie que la distribution des temps de relaxation rétrécit.

➤ Tréhalose amorphisé par broyage de  $T_\beta$

Les spectres de la figure VIII.9.b présentent, entre  $-110^\circ\text{C}$  et  $-30^\circ\text{C}$ , des pics caractéristiques d'un processus de relaxation secondaire. Leur évolution en fréquence, leur amplitude et leur largeur rappellent les caractéristiques des processus de type  $\beta_1$  observés pour le verre de liquide et le lyophilisat. Entre  $-20$  et  $10^\circ\text{C}$ , on peut observer un deuxième processus relaxationnel comparable au processus  $\beta_2$  observé précédemment. Toutefois, contrairement aux relaxations observées dans le verre de liquide et le lyophilisat, ce pic est d'autant moins séparé du pic  $\beta_1$  que la température est élevée. En conséquence, le domaine de température sur lequel nous avons pu affiner les résultats de manière fiable est très limité. Les résultats sont reportés dans le tableau VIII.6.

$T_\beta$ broyé – processus « $\beta_1$ »			$T_\beta$ broyé – processus « $\beta_2$ »		
T ( $^\circ\text{C}$ )	$\tau_{\beta_1}$ (s)	$\alpha_1$	T ( $^\circ\text{C}$ )	$\tau_{\beta_2}$ (s)	$\alpha_2$
-110	$2.94 \cdot 10^{-3}$	0.22	-30	$2.84 \cdot 10^{-1}$	0.53
-90	$6.62 \cdot 10^{-4}$	0.26	-20	$9.86 \cdot 10^{-2}$	0.51
-60	$6.48 \cdot 10^{-5}$	0.31	-10	$3.13 \cdot 10^{-2}$	0.42
-50	$2.63 \cdot 10^{-5}$	0.33	0	$1.12 \cdot 10^{-2}$	0.67
-30	$9.04 \cdot 10^{-6}$	0.40	10	$3.71 \cdot 10^{-3}$	0.67
-10	$2.28 \cdot 10^{-6}$	0.48	20	$1.39 \cdot 10^{-3}$	0.82

*Tableau VIII.6 :*

*Paramètres d'affinement des processus de relaxations secondaires notés «  $\beta_1$  » et «  $\beta_2$  » observés dans le tréhalose vitrifié par broyage mécanique de la forme anhydre  $T_\beta$ .  $\tau$  est le temps caractéristique de la relaxation, et  $\alpha$  le coefficient d'élargissement de la distribution*

Ce tableau met en évidence une augmentation continue du paramètre d'élargissement  $\alpha_1$ . Ce comportement indique que la distribution des temps de relaxation est d'autant plus étroite que la température est élevée. Par contre, le paramètre  $\alpha_2$  évolue de manière très inhabituelle: il diminue entre  $-30$  et  $-10^\circ\text{C}$ , ce qui reflète un élargissement de la distribution des temps de relaxation quand la température augmente. Les valeurs de  $\alpha_2$  pour  $0^\circ\text{C}$ ,  $10^\circ\text{C}$  et  $20^\circ\text{C}$  sont à considérer avec une grande précaution, puisqu'à l'inverse de ce que nous observons pour le lyophilisat et le liquide trempé, le processus  $\beta_2$  dans le tréhalose broyé tend à se confondre avec le processus  $\beta_1$  quand la température augmente, ce qui rend l'affinement des résultats plus délicat.

➤ Tréhalose amorphisé par déshydratation de T<sub>2H2O</sub>

Les spectres de la figure VIII.9.c présentent, à chaque température, un pic de relaxation unique dont les caractéristiques semblent ici encore proches de celles d'un processus de type  $\beta_1$ . Les paramètres d'affinement sont reportés dans le **tableau VIII.7** :

<b>T<sub>2H2O</sub> déshydraté – processus de type « <math>\beta_1</math> »</b>		
<b>T (°C)</b>	<b><math>\tau_{\beta_1}</math> (s)</b>	<b><math>\alpha_1</math></b>
- 100	$2.08 \cdot 10^{-3}$	0.26
- 80	$2.97 \cdot 10^{-4}$	0.29
- 60	$6.26 \cdot 10^{-5}$	0.32
- 40	$1.07 \cdot 10^{-5}$	0.34
- 20	$2.02 \cdot 10^{-6}$	0.39
0	$4.64 \cdot 10^{-7}$	0.46

*Tableau VIII.7 :*

*Paramètres d'affinement du processus de relaxations secondaires «  $\beta_1$  » observé dans le tréhalose vitrifié par déshydratation rapide de la forme dihydrate T<sub>2H2O</sub>.  $\tau$  est le temps caractéristique de la relaxation, et  $\alpha$  le coefficient d'élargissement de la distribution*

### C.3. Analyse des résultats

Le diagramme d'Arrhenius de la **figure VIII.10** rassemble les dépendances en température des temps caractéristiques des relaxations secondaires détectées pour chacun des amorphes étudiés. Il montre en premier lieu que les temps caractéristiques suivent l'évolution arrhenienne généralement observée pour les relaxations secondaires. Par ailleurs, cette figure permet de distinguer clairement le processus  $\beta_1$ , à haute fréquence et faiblement activé, du processus  $\beta_2$  présent dans le verre de liquide, le tréhalose broyé et le lyophilisat.

Les **processus de type «  $\beta_2$  »** sont comparables quelle que soit la voie d'amorphisation utilisée. Ils possèdent la même énergie d'activation, comme l'attestent les valeurs reportées dans le **tableau VIII.8**. Le domaine de température sur lequel le processus  $\beta_2$  est observable dépend de la manière utilisée pour vitrifier le tréhalose. Il n'est donc pas exclu que l'amorphe issu de la déshydratation rapide de T<sub>2H2O</sub> présente lui aussi des relaxations de type  $\beta_2$ , mais dans un domaine de température et de fréquence inaccessible avec notre appareil.

Les processus de type «  $\beta_1$  » présentent des caractéristiques différentes suivant la voie d'amorphisation empruntée. D'une part, les processus  $\beta_1$  détectés dans les échantillons broyé, déshydraté et lyophilisé, sont presque superposables. Ils présentent tous des énergies d'activation très proches (tableau VIII.8). Au contraire, le verre de liquide semble se différencier des autres amorphes en montrant un processus  $\beta_1$  plus activé.

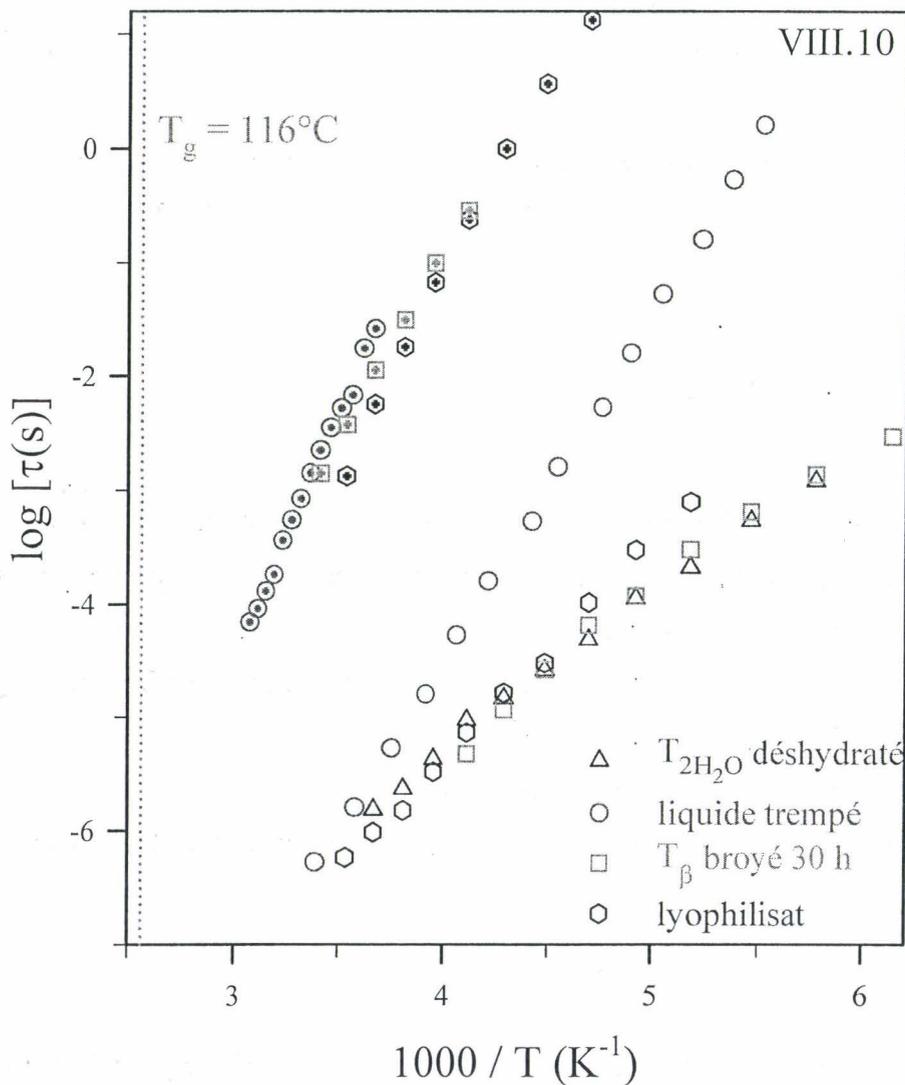


Figure VIII.10 :

Diagramme d'Arrhenius regroupant tous les processus de relaxations secondaires observés dans les différents échantillons de tréhalose vitrifiés. Les processus « basse température », représentés par des symboles ouverts, correspondent aux relaxations de type  $\beta_1$ . Les processus « haute température », représentés par les symboles pleins, correspondent aux relaxations de type  $\beta_2$ .

	Processus de type « $\beta_1$ »		Processus de type « $\beta_2$ »	
	$E_1$ (K)	Log( $\tau_0$ (s))	$E_2$ (K)	Log( $\tau_0$ (s))
<b>Liquide trempé</b>	3046	- 16.7	4456	- 17.9
<b>Lyophilisat</b>	1942	- 12.1	3427	- 14.8
<b>T<math>\beta</math> broyé</b>	1320	- 10.6	3306	- 14.1
<b>T<math>_{2H_2O}</math> déshydraté</b>	1370	- 10.8	-	-

*Tableau VIII.8 :*

Energies d'activation  $E$  et temps caractéristiques  $\tau_0$  des processus de relaxations secondaires observés pour les différents amorphes. Les résultats proviennent de l'affinement des résultats de la figure VIII.10 sur des lois d'Arrhenius.

## **D. ANALYSE ET DISCUSSION**

Les études dynamiques présentées dans ce chapitre ont mis en évidence des comportements dynamiques originaux, qui soulèvent des questions fondamentales de la physique des verres. Cette section s'articule autour de trois axes principaux :

- les caractéristiques des relaxations enthalpiques, et en particulier la relation entre fragilité et non exponentialité
- l'origine des différents processus de relaxation secondaires
- la question d'un éventuel polyamorphisme généré par des voies d'amorphisation différentes

### **D.1. Relation entre fragilité et non exponentialité**

La pertinence de l'utilisation de la spectroscopie de chaleur spécifique pour l'évaluation des paramètres  $m$  et  $\beta_{KWW}$  des systèmes formateurs de verre a été démontrée dans diverses publications [10,11]. Nous l'avons aussi vérifiée dans le cas de la fanansérine (chapitre III). Appliquée au tréhalose, cette technique a permis de mesurer un indice de fragilité très élevé ( $m = 105$  en moyenne, voir tableau VIII.2). Les données disponibles dans la littérature font état de valeurs de  $m$  très disparates pour le tréhalose pur, puisque les indices de fragilité mesurés varient entre 60 et 180 [9]. Les données d'ATD à modulation nous ont aussi permis d'évaluer la non exponentialité des relaxations, à travers le coefficient  $\beta_{KWW}$ . Ce coefficient vaut 0.30 pour le verre de liquide, et 0.39-0.43 pour les amorphes obtenus par d'autres méthodes (voir tableau VIII.2). D'après la corrélation

établie par Böhmer et al. [14], ces faibles valeurs de  $\beta_{KWW}$  sont cohérentes avec le caractère très fragile du tréhalose.

Toutefois, si l'on se réfère au comportement généralement observé pour des composés de poids moléculaire comparable, un indice de fragilité  $m = 105$  serait cohérent avec un coefficient de non exponentialité supérieur à 0.45. Dans le cas du tréhalose, le caractère non exponentiel des relaxations principales apparaît donc beaucoup plus marqué que celui prédit par la corrélation de Böhmer. Cela signifie que les temps caractéristiques de relaxation sont extrêmement distribués (cf. chapitre II, § C.2), et que la dynamique du tréhalose amorphe est très hétérogène.

Il se pose alors la question de savoir si le comportement fortement non exponentiel des relaxations principales est une caractéristique propre des disaccharides. Malheureusement, les études dynamiques concernant les composés purs sont très rares. Noel et al. ont réalisé en 1996 des mesures diélectriques sur le maltose, un isomère du tréhalose [17]. L'analyse des spectres des relaxations  $\alpha$  conduit à un exposant  $\beta_{KWW,malt}$  de 0.32. Comme le tréhalose, le maltose se révèle donc être un composé fragile possédant un exposant  $\beta_{KWW}$  inférieur à la valeur attendue. Chan et al. ont quant à eux étudié le comportement diélectrique du glucose [18]. La molécule de ce monosaccharide ( $C_6H_{12}O_6$ ) est l'unité constituante de la molécule de tréhalose. Les résultats reportés par Chan et al. donnent  $\beta_{KWW,gluc} = 0.47$ , et l'extrapolation de leur diagramme d'Arrhenius conduit à un indice de fragilité  $m_{gluc} = 75$ . Ces deux valeurs intègrent parfaitement le glucose dans la tendance générale énoncée par Böhmer et al [14].

Cette analyse permet de montrer que l'exposant de non exponentialité  $\beta_{KWW}$  est d'autant plus faible que la complexité moléculaire est grande. Néanmoins, la diminution de  $\beta_{KWW}$  est plus rapide que prévue dans le cas des disaccharides. Cet aspect demande donc à être confirmé par des expériences complémentaires.

## **D.2. Origine des différents processus de relaxation**

Le tréhalose vitreux présente deux processus secondaires distincts. Nous avons tenté de déterminer leur origine respective, et d'identifier celui correspondant aux relaxations de type Johari-Goldstein (JG).

La théorie des effets couplés (présentée au chapitre II, section C.2) établit une relation entre les temps caractéristiques à  $T_g$  des relaxations principales et des relaxations secondaires de type JG [18]. Dans ce contexte, il est possible d'estimer la localisation en fréquence des relaxations JG à partir du coefficient de non exponentialité  $\beta_{KWW}$  des relaxations principales, grâce à la relation :

$$\tau_{\beta} \approx \tau_0 = (t_c)^n (\tau_{KWW})^{1-n}$$

où  $t_c$  est un temps de « crossover » valant 2 ps,  $n$  le coefficient  $1-\beta_{KWW}$ , et  $\tau_{KWW}$  le temps caractéristique de la relaxation principale à  $T_g$  [19].

L'application de ce modèle aux relaxations du tréhalose devrait nous permettre de localiser le temps caractéristique des relaxations secondaires JG à  $T_g$ . L'objectif est de pouvoir dissocier ce type de relaxation secondaire, qui implique l'ensemble de la molécule et constitue une propriété intrinsèque au verre, d'un autre processus secondaire lié par exemple à des mouvements de groupements atomiques localisés. Le **tableau VIII.9** rassemble les temps caractéristiques  $\tau_\beta(T_g)$  prédits par la théorie des effets couplés, et les valeurs de  $\tau_\beta(T_g)$  mesurées pour les processus  $\beta_1$  et  $\beta_2$  :

	$\tau_\beta(T_g)$ prédit	$\tau_\beta(T_g)$ mesuré pour $\beta_1$	$\tau_\beta(T_g)$ mesuré pour $\beta_2$
<b>Verre de liquide</b>	$1.48 \cdot 10^{-8}$	$1.58 \cdot 10^{-9}$	$3.16 \cdot 10^{-7}$
<b>Lyophilisat</b>	$7.04 \cdot 10^{-7}$	$5.01 \cdot 10^{-9}$	$1.0 \cdot 10^{-6}$
<b><math>T_\beta</math> broyé 30 h</b>	$2.14 \cdot 10^{-7}$	$6.30 \cdot 10^{-8}$	$1.99 \cdot 10^{-6}$
<b><math>T_{2H_2O}</math> déshydraté</b>	$2.89 \cdot 10^{-7}$	$6.30 \cdot 10^{-8}$	-

*Tableau VIII.9 :*

*Temps caractéristiques des relaxations secondaires de type Johari-Goldstein, prédits par la théorie des effets couplés, et mesurés d'après le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.10*

Ce tableau montre que pour chaque échantillon, la valeur du temps de relaxation  $\tau_\beta(T_g)$  prédite par la théorie des effets couplés est encadrée par les valeurs de  $\tau_\beta(T_g)$  des processus  $\beta_1$  et  $\beta_2$  fournies par l'analyse diélectrique. Il n'est donc pas possible ici de distinguer précisément le processus Johari-Goldstein d'un processus secondaire localisé.

Toutefois, certaines de nos observations expérimentales fournissent des éléments de réponse à la question de l'attribution des processus :

- Le processus  $\beta_2$  n'intervient pas dans le tréhalose déshydraté. Par contre, ses caractéristiques sont superposables dans les trois autres cas. S'il s'agissait d'un mouvement local d'une partie de la molécule, il devrait apparaître aussi pour l'échantillon déshydraté, puisque ce dernier est constitué des mêmes molécules que les trois autres amorphes. Il est donc peu probable que les relaxations  $\beta_2$  correspondent à des mouvements individuels de certains groupements atomiques.

- D'après la théorie des effets couplés, les mouvements à l'origine des relaxations principales et des relaxations JG sont les mêmes. Dans la mesure où les relaxations principales semblent indépendantes du mode de préparation de l'amorphe, on peut s'attendre à ce que les relaxations secondaires JG soient aussi identiques, quelle que soit la voie d'amorphisation. Or, les processus de type  $\beta_2$ , dans les trois cas où ils ont été observés, sont superposables dans un diagramme d'Arrhenius.
- Le processus  $\beta_2$  intervient à des fréquences plus faibles que le processus  $\beta_1$ . Or, si, l'un de ces deux processus correspond à des mouvements locaux de petits groupements atomiques, on peut s'attendre à ce qu'il s'effectue à une fréquence rapide. Au contraire, le processus JG doit vraisemblablement posséder une dynamique plus lente.

Ceci nous pousse à associer le processus  $\beta_2$  du tréhalose aux relaxations secondaires de type Johari-Goldstein, d'après sa position en fréquence et les similarités relevées sur les différents amorphes. Le processus  $\beta_1$  serait quant à lui attribué aux mouvements localisés de groupements atomiques précis [20], n'impliquant pas nécessairement l'ensemble de la molécule. La différence d'énergie d'activation entre le verre de liquide et les autres échantillons pourrait donc être liée à une différence entre les groupes d'atomes qui à l'origine de la relaxation. On peut également signaler qu'une étude de la mobilité moléculaire de la cellobiose, un isomère du tréhalose, a révélé la présence de mouvements relaxationnels rapides (de fréquence  $10^6$  Hz à  $T_g - 200^\circ\text{C}$ ) attribués aux réarrangements de groupements latéraux de type OH ou  $\text{CH}_2\text{OH}$  [21]. Le processus  $\beta_1$  du tréhalose, plus lent à la même température, pourrait de ce fait correspondre à d'autres types de réarrangements locaux. Par ailleurs, on ne peut pas exclure qu'il existe dans le tréhalose vitreux d'autres processus de relaxations secondaires, situés en dehors des intervalles de fréquence et de température auxquels nous avons accès.

### **D.3. Le tréhalose présente-t-il un polyamorphisme ?**

Le problème d'un éventuel polyamorphisme généré par des méthodes d'amorphisation indépendantes a été abordé, dans cette étude, sous un aspect expérimental. Les investigations structurales, fondées sur la DX et la RMN, n'ont révélé aucune différence notable entre les différents amorphes. Les investigations dynamiques présentées en section B et C ont mis en évidence une possible différenciation entre les propriétés du verre de liquide et celles des amorphes obtenus par voies « non thermiques » (lyophilisation, broyage, déshydratation), au niveau de la non exponentialité des relaxations enthalpiques, et du processus de relaxation secondaire «  $\beta_1$  » :

- les relaxations enthalpiques du verre de liquide présentent un coefficient  $\beta_{KWW}$  légèrement inférieur à celui des autres amorphes, ce qui traduit un caractère non exponentiel plus marqué et une distribution des temps de relaxation plus importante
- l'énergie d'activation du processus  $\beta_1$  est plus grande pour le verre de liquide que pour les trois autres échantillons, ce qui peut révéler une mobilité moléculaire différente.

Ces différences sont toutefois minimales. Dans le domaine vitreux, cette analyse doit être nuancée par le fait que les points reportés sur le diagramme d'Arrhenius de la figure VIII.10 correspondent aux temps les plus probables des relaxations. Or, les coefficients  $\alpha_1$  des lois de Cole et Cole utilisées pour l'affinement des résultats sont, d'une part, très proches quelle que soit la voie de vitrification utilisée (par exemple, à  $-60^\circ\text{C}$ ,  $\alpha_1$  vaut 0.36 pour le liquide trempé, 0.34 pour le lyophilisat, 0.31 pour l'échantillon broyé et 0.32 pour l'échantillon déshydraté). D'autre part, à toute température, les valeurs de  $\alpha_1$  demeurent très inférieures à l'unité, ce qui indique une distribution des temps de relaxation importante. Le temps caractéristique  $\tau_1$  issu de l'affinement, et utilisé pour la construction du diagramme d'Arrhenius, ne reflète donc pas le comportement dynamique global de l'échantillon. En conséquence, bien que la figure VIII.10 distingue la relaxation  $\beta_1$  du verre de liquide de celle des autres échantillons, la largeur de la distribution des réponses diélectriques ne permet pas d'affirmer avec certitude que ces différences soient significatives. En outre, la mise en évidence d'un réel polyamorphisme suppose la démonstration de l'existence de transitions de phases entre les éventuels polyamorphes.

En conclusion, l'exploration des propriétés dynamiques du tréhalose amorphisé par quatre méthodes indépendantes a mis en évidence des propriétés originales de ce disaccharide.

Dans le domaine métastable, la spectroscopie de chaleur spécifique pallie efficacement au manque de données diélectriques disponibles (les relaxations principales étant masquées par une conductivité importante). Elle permet d'évaluer le caractère non arrhenien de la dynamique, et la non exponentialité des relaxations. Le tréhalose se caractérise par un indice de fragilité élevé ( $m \approx 105$ ), et un coefficient de non exponentialité  $\beta_{\text{KWW}}$  compris entre 0.3 et 0.43.

Dans le domaine vitreux, le tréhalose se caractérise par une mobilité moléculaire résiduelle très marquée. Deux processus secondaires ont pu être isolés par analyse diélectrique. Le plus rapide, noté  $\beta_1$ , pourrait être dû à des mouvements rapides de certaines parties de la molécule ; son origine précise reste à établir. Le plus lent, noté  $\beta_2$ , a été identifié pour trois des quatre méthodes d'amorphisation étudiées. Il présente des caractéristiques identiques, indépendamment du mode de préparation de l'échantillon, et pourrait correspondre à la relaxation de type Johari-Goldstein présente dans tous les verres.

Les investigations dynamiques mettent en évidence une différenciation entre les propriétés du verre de liquide et celles des amorphes obtenus par voies non thermiques (lyophilisation, broyage, déshydratation). Cette distinction, qui apparaît au niveau de la non exponentialité des relaxations enthalpiques, et du processus de relaxation secondaire «  $\beta_1$  », demande cependant à être plus clairement explorée, compte tenu de la largeur importante des distributions de temps de relaxation. Le problème d'un éventuel polyamorphisme dans le tréhalose ne peut donc pas être résolu de manière définitive au seul vu de nos résultats. D'autres investigations sont nécessaires pour compléter cette étude qui ouvre des perspectives extrêmement intéressantes, tant au niveau de la compréhension fondamentale de la physique des verres, qu'au niveau des applications pratiques en matière de bioprotection notamment.

## REFERENCES

1. A. Ha, I. Cohen, M. Iee, D. Kivelson, *J. Phys. Chem. Solids*, **100** (1996), 1
2. A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *Phys. Rev. B*, **58** (1998), 1
3. O. Mishima, *Nature*, **384** (1996), 546
4. S.P. Ding, J. Fan, J.L. Green, Q. Lu, E. Sanchez, C.A. Angell, *Journal of Thermal Analysis*, **47** (1996), 1391
5. J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe, *Ann. Rev. Physiol.*, **60** (1998), 73
6. P. Zhang, A.N. Klymachyov, S. Brown, J.G. Ellington, P.J. Grandinetti, *Solid State NMR*, **12** (1998), 221
7. C. Branca, S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo, V. Villari, A.P. Sokolov, *J. Phys.: Condens. Matter* (1999), **11**, 3823
8. M.E. Elias, A.M. Elias, *J. of Molec. Liq.* (1999), **83**, 303
9. F. Sussich, C. Skopec, J. Brady, A. Cesaro, *Carbohydr. Res.* (2001), **334**, 165  
Une correction à cet article concernant les valeurs de m a été publiée dans *Carbohydr. Res.* (2003), **338**, 11, 1259
10. O. Bustin, M. Descamps, *J. Chem. Phys.* (1999), **110**, 22, 10982
11. L. Carpentier, O. Bustin, M. Descamps, *J. Phys. D: Appl. Phys* (2002), **35**, 402
12. R. Böhmer, E. Sanchez, C.A. Angell, *J. Phys. Chem.* (1992), **96**, 23, 9089
13. C.T. Moynihan, L.P. Boesch, N.L. Laberge, *Phys. And Chem. of Glasses* (1973), **14**, 6, 122
14. R. Böhmer, K.L. Ngai, C.A. Angell, D.J. Plazek, *J. Chem. Phys.* (1993), **99**, 5, 4201
15. J. Einfeldt, D. Meißner, A. Kwasniewski, *Prog. Polymer. Sci.*, **26** (2001), 1419
16. C.A. Angell, K.L. Ngai, G.B. McKenna, P.F. McMillan, S.W. Martin, *J. of Applied Physics*, **88**, 6 (2000), 3113
17. T.R. Noel, R. Parker, S.G. Ring, *Carb. Res.* (1996), **282**, 193-206
18. R.K. Chan, K. Pathmanathan, G.P. Johari, *J. Phys. Chem.* (1986), **90**, 6358
19. K.L. Ngai, *J. Chem. Phys.*, **109**, 16 (1998), 6982
20. A. De Gusseme, L. Carpentier, J.F. Willart, M. Descamps,   
Accepté pour publication dans *J. Phys. Chem. B*
21. D. Meißner, J. Einfeldt, A. Kwasniewski, *J. of Non-Crystalline Solids* (2000), **275**, 199



# QUATRIEME PARTIE

Conclusions

Perspectives



Les travaux présentés dans ce mémoire ont été inspirés de problématiques relevant de l'industrie pharmaceutique. Au cours des procédés de formulation, les substances actives et les excipients sont soumis à des perturbations spécifiques (broyage, micronisation, mise en solution, désolvation, etc.) qui peuvent induire des changements d'état physique. Nous avons choisi d'explorer d'une part les effets du broyage mécanique, et d'autre part les interactions des composés pharmaceutiques avec l'eau, en particulier lors de déshydratations. Ces deux types de sollicitations entraînent des transformations de phases parfois inopinées, qui peuvent résulter de mises hors équilibre des composés. Elles ont donc un impact direct sur la biodisponibilité [1]. Du point de vue de la physique elle-même, ces perturbations sont originales, et n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet d'investigations systématiques dans le domaine des matériaux moléculaires. Elles donnent naissance à des situations complexes, mais d'une grande richesse.

**Le broyage mécanique** est actuellement très étudié en métallurgie [2,3]. Diverses interprétations de ses effets sur les matériaux métalliques ont été proposées [4-6], mais aucune de ces théories ne peut à ce jour rendre compte de tous les effets possibles du broyage. En particulier, elles ne tiennent pas compte des effets thermodynamiques impliquant la température de transition vitreuse  $T_g$  des matériaux amorphisés. De plus, les paramètres physiques permettant de décrire l'état du système sous broyage ne sont pas clairement définis.

Les transformations des matériaux moléculaires organiques induites par broyage n'ont pas été étudiées de manière systématique. Pourtant, ces matériaux possèdent des propriétés spécifiques pouvant favoriser ce type de transformations. En particulier, la grande variété de leurs interactions inter et intramoléculaires confère aux composés moléculaires organiques une potentialité considérable pour la formation de nouveaux matériaux. Par ailleurs, les composés moléculaires organiques présentent souvent une température de transition vitreuse proche de la température ambiante, et donc accessible expérimentalement, contrairement aux métaux qui possèdent des  $T_g$  beaucoup plus élevés. Enfin, le broyage mécanique est capable d'amorphiser un composé organique pur [7-8], contrairement aux métaux pour lesquels seuls des alliages ont pu être amorphisés de cette manière (à l'exception toutefois du sélénium [9]).

**La déshydratation** de matériaux moléculaires fait partie intégrante des procédés de formulation pharmaceutiques comme la lyophilisation. Par ailleurs les composés pharmaceutiques existent souvent à l'état d'hydrates, formant ce que l'on appelle des « pseudopolymorphes » [10]. Ceux-ci sont très sensibles à l'environnement de l'échantillon (température, humidité relative, pression). Les modifications de cet environnement ou les changements de surfaces spécifiques peuvent conduire à une déshydratation des cristaux moléculaires hydratés. Le réseau cristallin est

alors susceptible d'être déstabilisé par le retrait des molécules d'eau, suite à la rupture des liaisons hydrogène qu'elles forment avec les autres molécules. Il en résulte une réorganisation du réseau pouvant se traduire soit par une transformation vers une phase cristalline moins hydratée ou anhydre, soit par une amorphisation survenant bien en dessous de la température de fusion du composé anhydre. La classification de ces transformations a mené à la définition de critères permettant de différencier les processus de déshydratation [11]. Ces critères concernent principalement les mécanismes microscopiques de départ d'eau, et la relation structurale entre l'hydrate de départ et l'anhydre issu de la déshydratation [12]. Cependant, il n'existe à ce jour aucune approche globale permettant de rationaliser les effets de la déshydratation d'après des paramètres physiques extérieurs précisément définis.

## **A. RAPPEL DES PRINCIPAUX OBJECTIFS**

La complexité des problèmes liés aux transformations induites par broyage et par déshydratation, associée au nombre restreint d'études de ce type dans le domaine des matériaux moléculaires, ont conféré à ce travail des objectifs particulièrement larges et diversifiés. Il s'agissait en particulier :

- de tenter de rationaliser les effets du broyage mécanique sur les matériaux moléculaires organiques, en s'inspirant des modèles proposés pour les métaux. Ceci présuppose, pour un système donné, d'identifier toutes les transformations de phases induites par la sollicitation mécanique, et d'évaluer la pertinence des paramètres physiques proposés pour la description des systèmes métalliques sous broyage
- d'évaluer le rôle de la température de transition vitreuse  $T_g$ , qui n'intervient pas dans les modèles mis au point pour le broyage des métaux
- d'envisager le même type d'approche en terme de transition dynamique dans le cas de la déshydratation d'hydrates moléculaires. Cet aspect de l'étude était particulièrement ambitieux : en l'absence d'études antérieures comparables, il requérait d'abord de choisir un hydrate moléculaire adéquat, capable de produire des phases anhydres différentes suivant les conditions de déshydratation. Il nécessitait ensuite de définir l'ensemble des paramètres physiques extérieurs conditionnant le produit de la déshydratation
- de tester la possibilité d'amorphiser le même composé moléculaire par différentes voies indépendantes. Dans une telle éventualité, une question importante est de savoir si ces différents procédés génèrent des états amorphes semblables, ou si, au contraire, il est possible de les distinguer. Cela peut avoir un impact considérable du point de vue pharmaceutique car les

différents amorphes seraient alors susceptibles de présenter des solubilités - donc des biodisponibilités - différentes. Par ailleurs la question du polymorphisme est un sujet assez débattu en physique des verres depuis quelques années [16-18]. Une telle possibilité d'existence de phases amorphes différenciées n'a pu être identifiée clairement que dans de très rares cas. Il serait important de valider des voies d'amorphisation nouvelles permettant de multiplier ces modes d'obtention.

Pour aborder ces différents points, nous avons entrepris l'étude expérimentale des transformations de phases induites par broyage et déshydratation de deux composés pharmaceutiques : la fanansérine [19] et le tréhalose [20-24]. La réalisation des travaux a nécessité l'utilisation de techniques expérimentales variées. Les échantillons ont été principalement analysés par Analyse Thermique Différentielle et par Diffraction des Rayons X. L'étude de la déshydratation du tréhalose a requis l'utilisation de technologies complémentaires, comme l'Analyse ThermoGravimétrique ou la mesure des cinétiques d'absorption d'eau (« Dynamic Vapor Sorption »). La RMN  $^{13}\text{C}$  a apporté des précisions sur la structure intramoléculaire des différents échantillons. Par ailleurs, nous avons eu recours aux spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique pour analyser les propriétés dynamiques des échantillons amorphisés.

## **B. CONCLUSIONS**

Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de dégager les conclusions suivantes.

- Le **broyage de la fanansérine** a mis en évidence la possibilité d'obtenir des états polymorphes différents en fonction de la température de broyage :
  - une phase amorphe (au moins partiellement), lors d'un broyage sous  $T_g$ , à  $0^\circ\text{C}$
  - une phase cristalline métastable (phase I), lors d'un broyage au-dessus de  $T_g$ , à  $25^\circ\text{C}$ .

L'état final atteint par broyage ne dépend pas de la phase cristalline de départ (III ou IV).

Les expériences sont reproductibles et génèrent des états de mêmes caractéristiques calorimétriques et structurales. Le choix de la phase initiale influe en revanche de manière considérable sur la cinétique des transformations. En particulier, le broyage de la forme IV a révélé plusieurs étapes transitoires (apparition d'amorphe, de forme cristalline III) au cours de la transformation vers la forme I, tandis que seul un passage par l'état amorphe a pu être détecté dans le cas de la forme III, pour les mêmes conditions et durées de broyage. Cela tendrait à prouver que plus la phase de départ est stable, plus la cinétique de transformation est complexe. Néanmoins, notre protocole expérimental ne nous permet pas d'affirmer qu'il n'existe pas d'autres étapes intermédiaires.

Par ailleurs, cette étude démontre que l'amorphisation par broyage est générée d'autant plus facilement que la température de broyage est basse. Toutefois, l'amorphe formé par broyage *au-dessus de  $T_g$*  n'est observable qu'aux courts temps de broyage. Le verre issu du broyage *sous  $T_g$*  peut quant à lui être stabilisé à  $T_g - 50^\circ\text{C}$  sur une échelle de temps plus longue. Dans ces conditions, il recristallise au bout d'un mois, dans un domaine de température où la mobilité moléculaire est restreinte. Cela montre que le broyage permet de générer et stabiliser des états physiques qui ne sont pas les états d'équilibre thermodynamique du système hors broyage. L'étude de la stabilité ultérieure de ces états a montré qu'ils n'étaient pas eux même des états d'équilibre, mais ne semblaient exister que de manière stationnaire pendant l'application de la perturbation dynamique. Ces états sont atteints après des temps d'application de la sollicitation mécanique très longs (plusieurs heures, voire plusieurs dizaines d'heures, même près de  $T_g$ ) ; il convient donc de les distinguer de la suite de phases générées transitoirement pendant le broyage lui même.

Ce type de comportement semble conforter l'approche de Martin - Bellon en terme de « matériaux forcés » [6], qui se fonde sur une compétition entre les effets thermiques et les effets balistiques, ces derniers prévalant à basse température. Le concept de « température effective de broyage » peut aider à établir des prédictions de comportement. Ceci présuppose un contrôle précis des conditions de broyage (intensité, température). Il importe aussi de distinguer soigneusement les états *stationnaires* des états *transitoires*, notamment pour une application éventuelle aux matériaux micronisés, qui ne supportent le broyage que pendant quelques secondes.

- **L'étude de la déshydratation du tréhalose dihydrate** nous a permis de montrer que la nature de l'anhydre obtenu dépendait du protocole de déshydratation utilisé [25] :
  - une vitesse de chauffe élevée conduit à l'amorphisation du composé
  - une vitesse de chauffe lente génère préférentiellement la phase anhydre cristalline  $T_\alpha$
  - des vitesses intermédiaires produisent un mélange  $\{T_\alpha / \text{amorphe}\}$  ; la proportion de phase  $T_\alpha$  est d'autant plus grande que le chauffage est lent.

La transition vitreuse ( $T_g = 118^\circ\text{C}$ ) et la fusion de  $T_\alpha$  ( $T_f(T_\alpha) = 125^\circ\text{C}$ ) sont extrêmement proches, ce qui est vraisemblablement à l'origine des erreurs d'interprétation antérieures sur la nature et les caractéristiques du produit de la déshydratation.

Les résultats d'ATD et d'ATG nous ont incités à évaluer la pertinence de deux paramètres physiques susceptibles de jouer un rôle crucial dans le processus de déshydratation : la température et le débit des molécules d'eau qui s'évacuent de la structure cristalline de  $T_{2\text{H}_2\text{O}}$ . Ce deuxième paramètre n'étant pas immédiatement accessible, il nous a fallu mettre au point une méthode originale d'analyse des résultats d'ATG nous permettant de le déterminer. Nous avons montré que la température de broyage, considérée isolément, ne conditionnait pas la nature de l'anhydre formé

par déshydratation. Le débit des molécules d'eau s'est avéré être le paramètre déterminant lors de déshydratations au chauffage [26]. En revanche, l'existence d'un débit seuil unique est remise en cause par les déshydratations isothermes, qui montrent un changement de régime de déshydratation à une température proche de 70°C. Il apparaît donc que ni la température de déshydratation, ni le débit des molécules d'eau quittant la structure du tréhalose ne permettent de prédire la nature structurale de l'anhydre finalement obtenu de manière suffisamment générale. En revanche, nous ne pouvons pas exclure que ces deux grandeurs fassent partie d'un ensemble plus large de paramètres divers, capable de décrire de manière globale les effets de la déshydratation.

Nous avons également étudié les caractéristiques spécifiques de la phase anhydre métastable  $T_\alpha$ . En particulier, nous avons mis en évidence l'interconversion progressive de  $T_{2H_2O}$  vers  $T_\alpha$  lors d'une déshydratation isotherme à 50°C. L'étude de la stabilité de  $T_\alpha$  en fonction de l'humidité relative a prouvé que cette phase était très fortement hygroscopique, et basculait vers la forme dihydrate pour des taux d'humidité relative inférieurs à 40 %. Le comportement au chauffage de  $T_\alpha$  est surprenant puisque sa fusion intervient immédiatement après la température de transition vitreuse. De façon inhabituelle, cette phase semble être générée directement à basse température, dans un domaine qui est aussi celui de l'état de surfusion profond où le liquide est vitreux. Cette situation semble permettre, au chauffage, de maintenir la phase  $T_\alpha$  dans un état de surchauffe par rapport à l'état liquide, et de l'amener près de la limite d'instabilité absolue. Cela apparaît confirmé par la faiblesse de l'enthalpie de transition  $T_\alpha \rightarrow$  liquide enregistrée par ATD ( $\Delta H_f = 26$  J/g pour une déshydratation isotherme à 40°C), alors que la RMN a permis de conclure à une cristallinité comparable à celle du polymorphe  $T_\beta$ .

- Nous avons aussi montré pour la première fois qu'il était possible d'amorphiser et de vitrifier le tréhalose par broyage mécanique à température ambiante. Cette nouvelle voie d'amorphisation vient s'ajouter à la trempe thermique de la phase liquide, la déshydratation brutale de  $T_{2H_2O}$  et la lyophilisation. Ces amorphes présentent tous une température de transition vitreuse très élevée (118°C), ce qui facilite leur conservation à  $T_{amb}$ . Nous avons entrepris l'étude des propriétés dynamiques de ces amorphes au moyen de spectroscopies diélectrique et de chaleur spécifique. Ces investigations ont révélé que les échantillons présentaient deux processus de relaxation secondaire distincts [27]. Les amorphes possèdent le même indice de fragilité, mais des différences sont visibles au niveau des relaxations secondaires, sous  $T_g$ . En particulier, le verre obtenu par trempe thermique voit sa dynamique évoluer en température plus rapidement que les autres amorphes ( $E_1 = 3046$  K pour le verre de liquide, et  $1320$  K  $< E_1 < 1942$  K pour les autres amorphes). Ce résultat doit toutefois être nuancé par l'importance de la largeur des distributions de temps de

relaxation. En outre, la démonstration définitive de l'existence d'un polymorphisme nécessiterait de mettre en évidence une transition de phase entre deux « polymorphes » éventuels.

## **C. PERSPECTIVES**

Les prolongements à ces travaux sont nombreux. En ce qui concerne le broyage de la fanansérine, la compréhension des étapes intermédiaires du broyage, et l'identification précise des phases qui apparaissent transitoirement est indispensable à la maîtrise du processus de transformation sous broyage dans son ensemble. Des expériences complémentaires (comme le broyage du verre de liquide ou de la forme II) devraient permettre de mieux tester l'hypothèse, émise par Martin et al. [6], d'états stationnaires indépendants de l'état de départ. D'un point de vue pharmaceutique, il est à noter que les états métastables atteints par le broyage ne présentent pas une stabilité dans le temps satisfaisante, et sont sujets à des recristallisations inopinées lors de leur stockage. La synthèse de ces états lors des procédés de fabrication n'est donc pas souhaitable, puisqu'ils génèrent des transformations aléatoires potentiellement préjudiciables.

Les travaux présentés ici ont permis de révéler un certain nombre de propriétés physiques du tréhalose, qui lui confèrent de nombreuses applications potentielles en pharmacie notamment. Sa capacité à s'amorphiser au broyage, ainsi que sa température de transition vitreuse élevée, peuvent être avantageusement utilisées dans l'optique de formulations par co-broyage [28]. D'autre part, la qualité des lyophilisats de tréhalose et l'aptitude largement reconnue de ce disaccharide à protéger les molécules labiles permettent d'envisager son utilisation en tant qu'excipient. Même si le mécanisme de bioprotection du tréhalose n'est pas encore clairement élucidé, on peut supposer que plusieurs des propriétés physiques des mélanges {tréhalose / eau} y jouent un rôle important. Le polymorphisme du tréhalose et la variété des transformations induites par déshydratation doivent être en étroite relation avec ses capacités bioprotectrices [29]. En particulier :

- l'existence d'une forme cristalline dihydrate peut prévenir la formation de cristaux de glace, et réduire les effets plastifiants de l'eau sur le tréhalose amorphe. Dans l'hypothèse d'une gangue amorphe protégeant les biomolécules, cette propriété permet de conserver une température de transition vitreuse élevée et une dynamique ralentie
- la possibilité de former des états polymorphiques différents selon les conditions de déshydratation peut aussi jouer un rôle fondamental. La phase  $T_{\alpha}$ , dont la structure est vraisemblablement proche de celle de  $T_{2H_2O}$ . Elle est fortement hygroscopique et peut se

reconvertir en  $T_{2H_2O}$  à des taux d'humidité relative très bas. Cette propriété est susceptible de favoriser les échanges d'eau près des biomolécules.

Les paramètres de contrôle du processus de déshydratation des composés moléculaires ne sont pas encore précisément identifiés. Il est souhaitable de poursuivre les investigations dans ce sens, afin de tester l'adaptabilité des modèles de forçage proposés pour le broyage au cas de la déshydratation. Par ailleurs, la structure de la phase anhydre  $T_\alpha$  du tréhalose n'est pas résolue à ce jour. La capacité de réhydratation de  $T_\alpha$ , ainsi que les résultats que nous avons obtenus par RMN et par DX, tendent à prouver que la structure de  $T_\alpha$  est très proche de celle du tréhalose dihydrate, mais que cette phase est vraisemblablement nanostructurée. Enfin, le fait que la phase  $T_\alpha$  se forme à une température très basse, correspondant à un état de surfusion profond, peut offrir la possibilité d'approcher une limite absolue d'instabilité au réchauffage de cette phase.

L'opportunité d'amorphiser le tréhalose par au moins quatre voies indépendantes fait de ce sucre un composé prometteur pour l'étude et la compréhension des mécanismes d'amorphisation à l'état solide. Les analyses dynamiques peuvent mener à l'identification des processus de relaxations secondaires. En particulier, il s'agit de tester la réalité d'un paysage énergétique (« landscape »), présentant des barrières d'énergie de hauteurs différentes selon le mode de préparation de l'échantillon. L'autre possibilité est de modéliser la dynamique dans un schéma de type « effets couplés », proposé par Ngai [30], qui ne nécessite pas de référence au landscape dans la mesure où il suppose que les relaxations secondaires de type Johari - Goldstein ne seraient que le comportement aux temps courts du processus global de relaxation, avant que les coopérativités n'aient pu se développer.

## REFERENCES

1. T.P. Shakhshneider, V.V. Boldyrev, dans « Reactivity of Molecular Solids », édité par E. Boldyreva et V. Boldyrev, 1999
2. H. Bakker, G.F. Zhou, H. Yang, *Prog. Mat. Sci.*, **39** (1995), 159
3. P. Pochet, L. Chaffron, P. Bellon, G. Martin, *Ann. Chim. Sci. Mat.*, **22** (1997), 363
4. N.Q. Lam, P.R. Okamoto, *MRS Bulletin*, **XIX**, 7 (1994), 41
5. H.J. Fecht, W.L. Johnson, *Nature*, **334** (1988), 50
6. G. Martin, P. Bellon, *Solid State Phys.*, **50** (1997), 189
7. J. Font, J. Muntasell, E. Cesari, *Mat. Res. Bull.*, **32**, 12 (1997), 1691
8. J.F. Willart, A. De Gusseme, S. Hemon, G. Odou, F. Danede, M. Descamps, *Solid State Comm.*, **119** (2001), 501-505
9. K. Lu, F.Q. Guo, Y.H. Zhao, Z.H. Jin, *J. Metastable and Nanocrystalline Mat.*, **2-6** (1999), 43
10. R.K. Khankari, D.J.W. Grant, *Thermochimica Acta*, **248** (1995), 61
11. A.K. Galwey, *Thermochimica Acta*, **355** (2000), 181
12. S. Petit, G. Coquerel, *Chem. Mater.*, **8** (1996), 2247
13. L.S. Taylor, P. York, *Int. J. Pharm.*, **167**, 1-2 (1998), 215
14. M. Ono, Y. Tozuka, T. Ogushi, S. Yamamura, K. Yamamoto, *Int. J. Pharm.*, **239** (2002), 1
15. J. Han, S. Gupte, R. Suryanarayanan, *Int. J. Pharm.*, **170** (1998), 63
16. O. Mishima, H.E. Stanley, *Nature*, **296** (1998), 329
17. A. Ha, I. Cohen, M. Iee, D. Kievelson, *J. Phys. Chem. Solids*, **100** (1996), 1
18. A. Hédoux, Y. Guinet, M. Descamps, *Phys. Rev. B*, **58** (1998), 1
19. J. Giovannini, Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1, (2001), numéro d'ordre 2648
20. G.A. Jeffrey, R. Nanni, *Carb. Res.*, **137** (1985), 21
21. H.J. Reisener, H.R. Goldschmidt, G.A. Ledingham, A.S. Perlin, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **2** (1962), 403
22. G.M. Brown, D.C. Rohrer, D. Berking, C.A. Beevers, R.O. Gould, R. Simpson, *Acta Cryst.*, **B28** (1972), 3145
23. S.P. Ding, J. Fan, J.L. Green, E. Sanchez, C.A. Angell, *J. Therm. Anal.*, **47** (1996), 1391
24. F. Sussich, F. Princivalle, A. Cesaro, *Carbohydr. Res.*, **322** (1999), 113
25. J.F. Willart, A. De Gusseme, S. Hemon, M. Descamps, F. Leveiller, A. Rameau, *J. Phys. Chem. B*, **106** (2002), 3365

26. J.F. Willart et al., accepté pour publication dans *J. Phys. Chem. B*.
27. A. De Gusseme, L. Carpentier, J.F. Willart, M. Descamps, *J. Phys. Chem. B*, publication prévue en octobre 2003
28. M. Nagahama, H. Suga, *J. Mol. Liquids*, **95** (2002), 261
29. F. Sussich, C. Skopec, J. Brady, A. Cesaro, *Carb. Res.*, **334** (2001), 165
30. K.L. Ngai, *J. Chem. Phys.*, **109**, 16 (1998), 6982



# ANNEXES

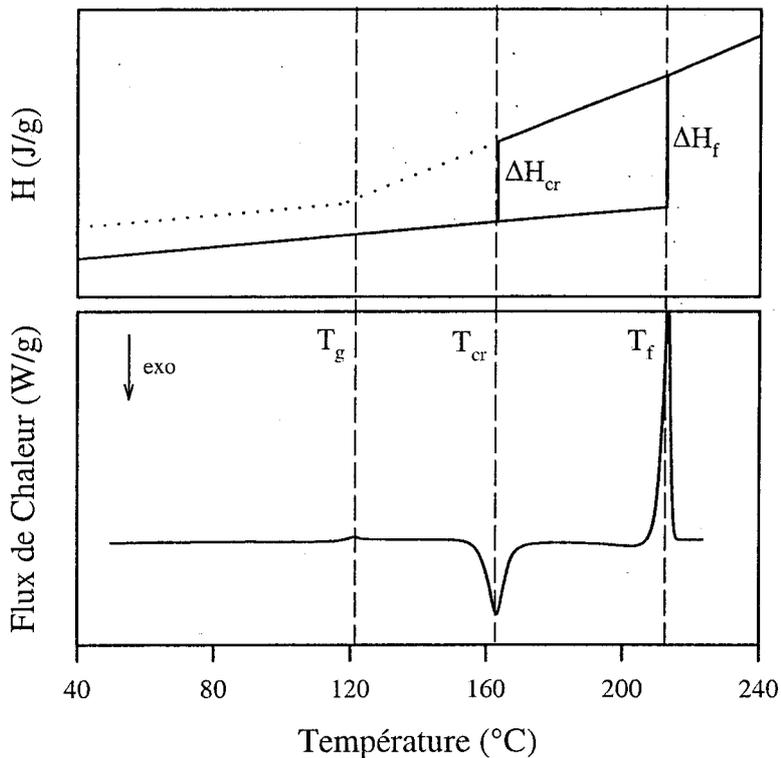


**ANNEXE 1 :****Calcul de la fraction amorphisée à partir des courbes d'ATD**

La fraction amorphisée est classiquement estimée à partir des résultats d'ATD en effectuant le rapport des enthalpies de cristallisation et de fusion de l'échantillon. L'enthalpie de cristallisation doit cependant être corrigée afin de tenir compte de la différence de température qui sépare ces deux accidents. La fraction amorphisée  $X_{\text{amorphe}}$  s'exprime alors :

$$X_{\text{amorphe}} = \Delta H_{\text{cr}}(T_f) / \Delta H_f$$

où  $\Delta H_f$  est l'enthalpie de fusion du composé cristallin et  $\Delta H_{\text{cr}}(T_f)$  l'enthalpie de recristallisation de la fraction amorphisée ramenée à la température de fusion  $T_f$  [1]. En effet, la valeur de  $\Delta H_{\text{cr}}$  dépend de la température à laquelle a lieu la recristallisation, comme l'illustre la figure suivante :



Dès lors, si la recristallisation de l'amorphe et la fusion du composé sont séparées par un grand intervalle de températures, l'échantillon amorphe peut recristalliser complètement sans que  $\Delta H_{cr}$  soit égale à  $\Delta H_f$ . Cela ne signifie pas forcément que l'amorphisation n'est pas totale. Plutôt que d'utiliser les valeurs expérimentales brutes, il faut donc estimer  $X_{amorphe}$  en corrigeant l'enthalpie de recristallisation. Si  $\Delta H_f$  désigne l'enthalpie de fusion du trehalose, et  $C_p$  sa capacité calorifique, alors :

$$\Delta H_{cr}(T_f) = \Delta H_{cr} + (T_f - T_{cr})[(\partial H^{liq}/\partial T) - (\partial H^{cr}/\partial T)]$$

$$= \Delta H_{cr} + (T_f - T_{cr})(C_p^{liq} - C_p^{cr})$$

$$\Delta H_{cr}(T_f) = \Delta H_{cr} + (T_f - T_{cr}) \cdot \Delta C_p$$

### Référence

1. E.Y. Grantsharova, I.A. Avramov, I.S. Gutsow,  
*Comptes rendus de l'Académie Bulgare des Sciences*, **tome 37** (1984), 11

## ANNEXE 2 :

### Pourquoi le tréhalose est-il aussi efficace pour la biopréservation ? Quelques tentatives d'explication

De nombreux organismes vivant dans des conditions climatiques extrêmes sont confrontés au manque d'eau. En cas de forte chaleur, l'eau s'évapore en desséchant les cellules ; en cas de gel, la formation de glace induit des contraintes mécaniques importantes qui détruisent la microarchitecture des cellules vivantes. Ces organismes ont donc développé des méthodes leur permettant de se déshydrater puis de se réhydrater, de manière réversible, sans dommage pour leur métabolisme [1]. En particulier, de nombreuses plantes en situation de sécheresse synthétisent des substances bioprotectrices comme les disaccharides. Parmi ces sucres, le tréhalose bénéficie d'un intérêt considérable. On le trouve dans des organismes comme les champignons, les levures, les bactéries, et diverses plantes, capables de produire du tréhalose à hauteur de 20 % de leur masse sèche en cas de manque d'eau liquide [2]. Leurs métabolismes entrent alors dans un état de quasi-inactivité, jusqu'à ce que les conditions d'humidité redeviennent favorables et leur permettent de recouvrer toute leur activité biologique [3]. Par ailleurs, il a été montré que l'adjonction de tréhalose exogène à des systèmes incapables d'en synthétiser améliorerait considérablement leur résistance aux contraintes thermiques [1].

Les mécanismes à l'origine de telles facultés sont encore mal compris à ce jour, bien que le tréhalose fasse l'objet d'études intensives, en raison des nombreuses applications potentielles notamment en matière de préservation de produits biologiques et médicaux [4-6]. En effet, les facultés bioprotectrices du tréhalose sont souvent qualifiées d'exceptionnelles comparativement à celles des autres disaccharides. En fait, l'examen attentif des données expérimentales disponibles révèle que l'efficacité du tréhalose est nettement supérieure dans des conditions d'expérience ou de conservation particulièrement défavorables, comme par exemple lors d'un stockage à haute température et forte humidité [2].

Nous résumons ici les principales hypothèses émises pour tenter d'expliquer les facultés bioprotectrices particulières du tréhalose.

#### ▪ Hypothèse du « remplacement de l'eau » :

L'eau interagit avec les protéines ou les membranes des cellules grâce à un réseau de liaisons hydrogène, en formant ainsi une couche protectrice autour des matériaux biologiques.

L'hypothèse du remplacement de l'eau stipule que le tréhalose, comme les autres sucres, est capable de développer un réseau de liaisons H s'adaptant exactement aux molécules labiles. De cette façon, en cas de manque d'eau liquide, celles-ci verraient leur conformation préservée par une interaction directe avec les molécules de sucre [7].

Toutefois, l'hypothèse d'une interaction directe entre les disaccharides et les membranes n'est pas universellement admise. Par ailleurs, compte-tenu de la diversité des matériaux bénéficiant de l'action bioprotectrice du tréhalose, il semble improbable que l'empreinte de son réseau de liaisons H soit spécifique à un nombre de biomolécules aussi important.

▪ **Rôle « destructurant » du tréhalose :**

Plusieurs études indépendantes ont montré que le système {tréhalose / eau} possédait une grande fragilité [7,8]. En d'autres termes, de petites variations thermiques peuvent modifier fortement la mobilité moléculaire, et faciliter les réarrangements structuraux. Une baisse de température entraîne la production de tréhalose. Les molécules de sucre adoptent une conformation incompatible avec le réseau tétraédrique des liaisons hydrogène de la glace, ce qui réduit la quantité d'eau congelable. De cette façon, la fraction d'eau liquide disponible pour les cellules vivantes serait maintenue à un niveau acceptable, même dans des conditions de température défavorables.

▪ **Propriétés du tréhalose amorphe – température de transition vitreuse**

Parmi les disaccharides, le tréhalose est celui qui possède la température de transition vitreuse la plus élevée ( $T_g \approx 120^\circ\text{C}$ ) [1,9,10]. Cette particularité se retrouve dans les solutions {tréhalose + eau} qui, à concentration égale, présentent systématiquement une  $T_g$  plus élevée que les autres systèmes {disaccharide + eau}. Ainsi, à une température de stockage donnée, un système {sucrose + eau} se trouvera au-dessus de  $T_g$ , dans un domaine de température où les réarrangements structuraux (et donc les risques de modifications irréversibles des cellules) sont possibles, tandis qu'un mélange {tréhalose + eau} de même concentration se trouvera encore dans le domaine vitreux, et présentera une mobilité moléculaire suffisamment faible pour empêcher toute modification des molécules labiles [11].

Cependant, des travaux récents ont montré que l'efficacité bioprotectrice du tréhalose se poursuivait au-dessus de  $T_g$ ; en conséquence l'état vitreux ne semble pas être un pré-requis fondamental pour la bioprotection. Par ailleurs, certains polysaccharides comme le dextran présentent une température de transition vitreuse plus élevée que celle du tréhalose, mais ne se révèlent pas pour autant plus efficaces en matière de bioprotection.[12].

▪ **Polymorphisme du tréhalose :**

L'existence d'une forme dihydrate est un atout supplémentaire pour la bioprotection : le tréhalose anhydre peut en effet « capturer » les molécules d'eau pour former du tréhalose dihydrate, et réduire ainsi la quantité d'eau susceptible de geler [13]. En outre, il a été montré que la mise en contact du tréhalose amorphe avec l'eau provoquait effectivement la cristallisation de tréhalose dihydrate, sans modifier la température de transition vitreuse de la fraction amorphe restante [14]. Lors du stockage, la cristallisation du tréhalose dihydrate peut donc être un moyen efficace d'éviter l'effet plastifiant de l'eau, et de préserver le système dans un état vitreux.

D'autre part, la forme anhydre métastable  $T_\alpha$  qui s'obtient par déshydratation « lente » de la phase dihydrate, possède la faculté de pouvoir se réhydrater facilement en  $T_{2H_2O}$ , à des taux d'humidité relative faibles [10,15]. La réversibilité  $T_{2H_2O} \leftrightarrow T_\alpha$  pourrait également jouer un rôle dans le mécanisme de bioprotection du tréhalose.

Aucune des hypothèses résumées ci-dessus ne permet d'expliquer à elle seule l'origine des facultés bioprotectrices du tréhalose. En revanche, elles ne sont pas incompatibles entre elles, et ont certainement un rôle à jouer dans un mécanisme plus général.

Sussich et al. ont récemment proposé une stratégie de bioprotection faisant intervenir certains des éléments présentés ici pour expliquer le mode d'action du tréhalose lors de déshydratations induites par élévation de la température. D'après eux, le mécanisme de bioprotection se décompose de la manière suivante [1] :

- l'application d'une contrainte thermique provoque le déclenchement de la production de tréhalose
- celui-ci cristallise au contact de l'eau en tréhalose dihydrate, à proximité des membranes biologiques, et capture les molécules d'eau résiduelles. Cette étape permet de préserver un réseau de liaisons hydrogène intact autour des molécules labiles.
- la poursuite de la déshydratation entraîne la transformation du tréhalose dihydrate en tréhalose  $T_\alpha$ . Comme ces étapes successives se déroulent toutes à des températures inférieures à  $T_g$ , la mobilité moléculaire très faible « gèle » le système et les fonctions vitales. La réhydratation est ensuite assurée par la réversibilité de la transformation  $T_{2H_2O} \leftrightarrow T_\alpha$ .

## Références

1. F. Sussich, C. Skopec, J. Brady, A. Cesaro, *Carb. Res.*, **334** (2001), 165
2. J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe, *Annu. Rev. Physiol.*, **6** (1998), 73
3. K.C. Fox, *Science*, (1995), **267**, 1922
4. J.H. Crowe, L.M. Crowe, *Science*, **223** (1984), 701
5. L. Diniz-Mendes, E. Bernardes, P.S. de Araujo, A.D. Panek, V.M. F. Paschoalin, *Biotechnology and Bioengineering*, **65**, 5 (1999), 572
6. T. Chen, J.P. Acker, A. Eroglu, S. Cheley, H. Bayley, A. Fowler, M. Toner, *Cryobiology*, **43**, 2 (2001), 124
7. C. Branca, S. Magazu, G. Maisano, P. Migliardo, V. Villari, A.P. Sokolov, *J. Phys.: Condens. Matter*, (1999), **11**, 3823
8. M.E. Elias, A.M. Elias, *J. Molec.Liq.*, **83** (1999), 303
9. B.C. Hancock, C.R. Dalton, *Pharm. Dev. Techn.*, **4**, 1, (1999), 125
10. J.F. Willart, A. De Gussemé, S. Hemon, M. Descamps, F. Leveiller, A. Rameau, *J. Phys. Chem. B* (2002), **106**, 3365
11. J.L. Green, C.A. Angell, *J. Phys. Chem*, (1989), **93**, 2880
12. J.H. Crowe, L.M. Crowe, A.E. Oliver, N.M. Tsvetkova, W.F. Wolkers, F. Tablin, *Cryobiology*, **43** (2001), 89
13. B.J. Aldous, A.D. Auffret, F. Franks, *Cryo-Letters*, **16** (1995), 191
14. L.M. Crowe, D.S. Reid, J.H. Crowe, *Biophys. J.*, **71** (1996), 2087
15. C. Branca, S. Magazu, *J. Phys.: Condens. Matter*, (1999), **11**, 3823

