



HAL
open science

Contributions à la compréhension des phénomènes de nucléation induite par laser : applications à la glycine et études préliminaires sur l'histidine et l'acide glutamique

Bertrand Clair

► **To cite this version:**

Bertrand Clair. Contributions à la compréhension des phénomènes de nucléation induite par laser : applications à la glycine et études préliminaires sur l'histidine et l'acide glutamique. Génie chimique. Ecole Centrale Paris, 2014. Français. NNT : 2014ECAP0056 . tel-01127388

HAL Id: tel-01127388

<https://theses.hal.science/tel-01127388>

Submitted on 7 Mar 2015

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

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



ÉCOLE CENTRALE DES ARTS ET MANUFACTURES

« ÉCOLE CENTRALE PARIS »

THÈSE

présentée par

Bertrand CLAIR

pour l'obtention du

GRADE DE DOCTEUR

Spécialité : Physico-chimie

Laboratoire d'accueil : Structure Propriétés Modélisations des Solides (UMR 8580)

SUJET : Contributions à la compréhension des phénomènes de nucléation induite par laser. Applications à la glycine et études préliminaires sur l'histidine et l'acide glutamique.

soutenue publiquement le : 21 novembre 2014

devant un jury composé de :

Mme Jacqueline Belloni

Président

Mr Stéphane Veesler

Examineur

Mme Valérie Génot

Examineur

Mr Yohann Corvis

Rapporteur

Mr Robert Anne Pansu

Rapporteur

Mme Anne Spasojevic de Biré

Directrice de thèse

Mr Philippe Scouflaire

Co-Directeur de thèse

2014ECAP0056

Résumé de la thèse

Résumé en français :

Le contrôle de la fabrication des structures cristallines des médicaments est un enjeu crucial pour l'industrie pharmaceutique. Plusieurs exemples ont montré qu'une mauvaise maîtrise du polymorphisme conduisait à des situations dramatiques. Récemment, une méthode permettant la maîtrise du polymorphisme de molécule organique dissoute en solution à l'aide de la polarisation d'un faisceau laser a été découverte aux Etats-Unis. Cette thèse étudie l'effet du laser sur des solutions aqueuses de molécules de glycine, L – (+) – histidine, D – (-) – et L – (+) – acide glutamique. Afin de réaliser l'étude, un montage expérimental a été construit permettant le contrôle de nombreux paramètres et une méthode spécifique de travail a été développée afin de limiter fortement l'aléa expérimental. Une étude multi-paramètres incluant l'effet comparé des polarisations linéaire et circulaire dans du H₂O et du D₂O de la nucléation induite par laser non-photochimique (*NPLIN*) de la glycine a été menée. Une étude préliminaire de l'effet du laser sur les solutions d'histidine et de l'acide glutamique a également été réalisée. Il est montré que le solvant est un facteur déterminant du contrôle du polymorphisme. Toutefois, la conjonction de la polarisation et de la concentration a une influence sur les polymorphes de glycine obtenus dans le H₂O. Les résultats obtenus permettent de contribuer à la compréhension du mécanisme en améliorant l'hypothèse initiale de l'effet Kerr.

Résumé en Anglais :

Polymorphism control of drug molecules is one of the main challenges facing drug companies. Several examples have shown that an uncontrolled polymorphism crystallization could lead to a dramatic situation. One of the most recent progress in the polymorphism control is the unwanted discovery of polymorphic selective crystallization of organic molecule dissolved in solution based on the laser beam polarization. This thesis deals with the implantation of this method in France for the first time based on a methodology limiting experimental hazard and a special design experimental device dedicated to this study. This work is based on an important review of known results of the field and published for the first time. An important multifactor study was done on glycine, histidine and glutamic acid, which allows to improve knowledge on the putative initial mechanism based on the Kerr effect. It has been established that the solvent is the dominant factor, letting laser polarization as the third factor for polymorphism control after concentration.

Remerciements

Pour paraphraser Honoré de Balzac qui affirmait à propos du *pouvoir humain* [qu'il] *est un composé de patience et de temps*, la thèse c'est non seulement de la patience et du temps mais aussi une aventure humaine dans laquelle plusieurs personnes interviennent diluant ainsi une réussite personnelle dans une réussite avant tout collective.

Ces remerciements sont d'abord adressés à Anne Spasojevic de Biré pour avoir initié un projet innovant et plein d'avenir et de m'avoir permis ainsi d'être l'un des jalons importants et moteur dans la mise en place de ce nouveau projet au sein de l'Ecole Centrale de Paris.

Cette thèse a présenté une opportunité particulière sur bien des aspects. En effet, énormément de choses étaient à faire même sur la base de l'ANR : bibliographie à développer, montage à créer, interactions avec le bureau d'études en fonction de nos besoins pour la construction du nouveau montage et avec les fournisseurs, étendre le domaine scientifique en cherchant des réponses à nos questions dans des domaines connexes ou encore mettre sur pied une stratégie expérimentale durable. A ce titre, cette expérience est transverse et je remercie Anne de me l'avoir proposée.

Je remercie l'équipe de la direction de la recherche pour son accueil et sa disponibilité : Catherine LHôpital, Géraldine Carbonel et Emmanuel Coplo et plus particulièrement Jean Hubert Schmidt, directeur de l'Ecole Doctorale 287 et de la recherche de l'Ecole Centrale de Paris jusque mi-2011, d'avoir créé les conditions financières pour la réalisation de cette thèse.

Je remercie également Gloria Foulet pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner à l'Ecole Centrale de Paris une matière que j'avais préalablement étudiée par mon travail de Master 2 : le phénomène de supraconduction¹.

Au sein du laboratoire SPMS, plusieurs personnes ont œuvré à la bonne réussite de ce projet : Thierry Martin et Gilles Boemare pour leurs disponibilités et gentillesse, Claire Calippe pour l'assistance à trouver nombre d'articles introuvables autrement, Fabienne Karolak et Christine Bogicevic pour leurs conseils apportés dans la phase chimie de la préparation des solutions, Pascale Gemeiner pour l'emploi du Raman, Nicolas Guiblin responsable du centre de diffraction des rayons X pour son inestimable investissement dans ce projet pour la bonne marche des équipements auquel s'ajoute une pensée pour le bon

¹Bertrand Clair, these de master, *A Raman spectroscopy study of pnictide and 2H-NbSe₂ superconductors*, Université Paris VII, Denis Diderot, 2010.

Article publié en relation avec ce travail : *Amplitude Higgs mode in the 2H-NbSe₂ superconductor*, M.-A. Méasson, Y. Gallais, M. Cazayous, B. Clair, P. Rodière, L. Cario, and A. Sacuto, **Physical Review B** **89**, 060503(R) (2014).

rétablissement d'Hubert, son assistant et Agnès Benard, responsable informatique du laboratoire.

Mention spéciale à Pierre Becker et Michel Jouan, professeurs émérites dont leurs contributions tant professionnelles que personnelles n'auront jamais de remerciement à leurs hauteurs.

L'encadrement administratif du laboratoire, pilier de la bonne marche des projets : Christine Vinée Jacquin et Pascale Salvini et la direction du laboratoire SPMS : le directeur Jean Michel Kiat jusqu'en 2013 pour sa disponibilité, son écoute et son sens de la diplomatie et son successeur Guilhem Dezanneau qui ne manque pas non plus de grandes qualités à ce poste.

Un bon environnement de travail garantit tout autant le succès que l'environnement technique adéquat. A ce titre, je tiens à remercier les *soon doctors* pour cet esprit de groupe : Gentien Thorner, Charles Paillard, Anastasia Iakoleva, Charlotte Cochard, Camille Rabache, Romain Faye, Xiao Xu, Xiaoshixuan Shi ; les permanents : Brahim Dkhil, Pierre-Eymeric Janolin, Pietro Cortona, Ingrid Canero Infante, Sandrine Geiger, Igor Kornev, Nouha El Hassan, Nouredine Ghermani et Jean Michel Gillet.

Le développement du montage a été réalisé au sein du laboratoire EM2C grâce à l'aide de Jérôme Beaunier, Erika Jean Bart et Yannick Le Teno. Je les remercie d'avoir apporté leurs compétences pour la réalisation de ce nouveau montage.

Ce travail a été mené en équipe : deux thésards : Aziza Ikni et moi-même puis deux ans plus tard Li Wenjing, deux encadrants : Anne et Philippe Scouflaire du laboratoire EM2C. L'effet de synergie a joué à plein grâce aux contributions de Philippe et d'Aziza. Qu'ils soient remerciés chacun dans leurs domaines. Aziza pour avoir été le compagnon de route de cette aventure et Philippe dans son rôle majeur d'encadrant.

L'ouverture de ce projet et l'intérêt pour l'état initial de la nucléation nous ont amenés à travailler avec Jonathan Farjon de l'université Paris Sud, spécialiste de RMN et son post doctorant mexicain Enrique. Je le remercie tant pour son humour que pour son accueil. Cette voie mérite de continuer à être creusée. Yann Chalopin du laboratoire EM2C pour avoir consacré son temps à un embryon de modélisation. Sûrement que cette étape était trop précoce et n'a pas bénéficié d'un travail de consolidation avant la modélisation proprement dite faute d'un temps disponible suffisant.

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'être examinateur ou rapporteur. Au-delà de l'évaluation de ce travail, certains ont apporté une aide importante notamment Stéphane Veessler en m'accueillant plusieurs fois au sein de son laboratoire pour effectuer

des mesures de solubilité et de limite de zone métastable mais aussi en apportant son expertise de développement de montage d'étude du phénomène de nucléation à l'université Aix Marseille III.

Yohann Corvis est, quant à lui, partenaire au sein de l'ANR « NPLIN – 4 – Drug ».

Robert Pansu pour les échanges intéressants et constructifs que nous avons eu à plusieurs reprises. A n'en pas douter, Robert Pansu travaillant sur la fluorescence de molécule apportera une contribution déterminante pour l'avenir de ce domaine de recherche.

Jacqueline Belloni que je n'ai pas eu l'occasion de rencontrer avant cette soutenance a de son côté travaillé sur la nucléation induite du KNO_3 et pourra elle aussi contribuer au bon développement de ce projet.

Au vu des multiples compétences de ce jury (fluorescence, co-cristallisation, nucléation et observation, stimulation par laser ...), j'espère qu'elles seront rassemblées pour former une synergie pour que ce projet continue y compris après le déménagement de l'Ecole Centrale à Saclay sûrement sous d'autres formes mais avec la même philosophie.

Il y a l'avant thèse, la thèse et l'après thèse. Au titre de la préparation de l'après thèse, je remercie François Xavier Regis, Conseil en Propriété Industrielle et mandataire européen du cabinet ALTERNIP, et Michel Abello, avocat du cabinet LOYER-ABELLO, pour leurs contributions à la construction d'un projet professionnel viable et durable.

Table des matières

RESUME DE LA THESE.....	3
REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	9
TABLE DES NOMENCLATURES	17
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA NUCLEATION.....	25
INTRODUCTION.....	25
I/ GENERALITES	26
I-1) <i>La solubilité</i>	26
I-2) <i>La sursaturation</i>	28
I-3) <i>Méthodes de cristallisation</i>	29
II/ LES THEORIES DE LA NUCLEATION	29
II-1) <i>Théorie classique de la nucléation</i>	30
II-1-1) Nucléation primaire	30
II-1-1-1) Nucléation primaire homogène.....	30
II-1-1-2) Nucléation primaire hétérogène	31
II-1-1-3) Fréquence de nucléation	32
II-1-1-4) Temps d'induction	32
II-1-2) Nucléation secondaire	33
II-2) <i>La nucléation en deux étapes</i>	34
II-3) <i>Croissance cristalline</i>	35
III/ LE PROBLEME DE L'ETAT INITIAL DE LA SOLUTION	36
III-1) <i>Mesure expérimentale de la distribution des tailles des particules</i>	36
III-2) <i>L'étude des solutions à l'équilibre</i>	37
IV/ POLYMORPHISME	38
IV-1) <i>Une définition</i>	38
IV-2) <i>Stabilité des polymorphes</i>	39
IV-3) <i>Le contrôle du polymorphisme</i>	40
IV-3-1) Quelques exemples illustrant l'importance du contrôle du polymorphe.....	40
IV-3-2) Facteurs conditionnant le contrôle du polymorphisme.....	41
BILAN	42
CHAPITRE 2 : ETAT DE L'ART SUR LA NUCLEATION INDUITE PAR LASER.....	43
INTRODUCTION.....	43
I/ LA NUCLEATION INDUITE PAR LASER.....	44
I-1) <i>La nucléation induite par laser : vue d'ensemble</i>	44
I-1-1) La nucléation photochimique	44

I-1-2) La nucléation photophysique	44
I-1-3) La nucléation induite par un ensemencement d'origine photophysique	45
I-2) <i>La méthode NPLIN utilisant un laser nanoseconde</i>	45
I-3) <i>Light Induced Nucleation et Non Photochemical laser Induced Nucleation</i>	46
II/ ETAT DE L'ART SUR LA NUCLEATION DES MOLECULES INDUITE PAR LASER	46
II-1) <i>Molécules étudiées et conditions expérimentales</i>	46
II-2) <i>Bilan sur les molécules et les méthodes</i>	50
II-2-1) Les méthodes d'induction de la nucléation.....	50
II-2-2) Bilan sur la méthode NPLIN utilisant un laser nanoseconde	51
II-3) <i>Etat de l'art des montages</i>	53
II-4) <i>Les différents mécanismes hypothétiques associés à la nucléation induite par NPLIN</i>	57
II-4-1) Théorie classique de la nucléation et effet Kerr induit par le laser	57
II-4-2) Le mécanisme lié à la cavitation	57
II-4-3) Le mécanisme lié au piégeage optique	58
II-4-4) Le mécanisme lié à l'hypothèse de l'effet Kerr	59
II-4-4-1) L'effet Kerr	60
II-4-4-2) La quantification de l'effet Kerr et ses implications	61
II-4-4-3) Les limites de la théorie de l'effet Kerr.....	62
BILAN	64
CHAPITRE 3 : ETAT DE L'ART DES MOLECULES ETUDIEES	65
INTRODUCTION.....	65
I/ GLYCINE	66
I-1) <i>Intérêt de la molécule</i>	66
I-2) <i>Polymorphes et stabilité</i>	67
I-3) <i>Conditions de formation des polymorphes α, β, γ</i>	69
I-4) <i>Solubilité</i>	71
I-5) <i>L'état d'équilibre en solution de la glycine</i>	72
I-6) <i>Faciès</i>	74
I-7) <i>Stratégie d'identification des polymorphes</i>	76
I-7-1) Identification par spectroscopie Raman.....	76
I-7-2) Diffraction à Rayons X.....	77
II/ HISTIDINE.....	78
II-1) <i>Intérêt de la molécule</i>	78
II-2) <i>Polymorphes et stabilité</i>	78
II-3) <i>Solubilité</i>	80
II-4) <i>Stratégie d'identification des polymorphes</i>	81
III/ ACIDE GLUTAMIQUE	81
III-1) <i>Intérêt de la molécule</i>	81
III-2) <i>Polymorphes et stabilité</i>	82

III-3) Conditions de formation des polymorphes A et B	83
III-4) Solubilité	84
III-5) Faciès	85
BILAN	86
CHAPITRE 4 : DEVELOPPEMENT D'UN MONTAGE DEDIE A L'ETUDE DE LA NUCLEATION	
INDUITE PAR LASER	87
INTRODUCTION.....	87
I/ PREMIER MONTAGE ET SON AMELIORATION	88
I-1) Premier montage	88
I-1-1) Limites physiques du premier montage	88
I-1-2) Effet de focalisation du tube	88
I-1-3) Autres limitations expérimentales	90
I-3) Cahier des charges.....	91
II/ LE DEVELOPPEMENT DU NOUVEAU MONTAGE.....	92
II-1) Le nouveau montage	92
II-1-1) Le banc optique	92
II-1-2) Le contrôle de la température.....	93
II-2) Automatisation	93
II-2-1) Constitution d'un cahier des charges	93
II-2-2) Développement des fonctions et la programmation LABVIEW	96
II-2-2-1) L'emploi du GRAFCET.....	96
II-2-2-2) Développement de l'interface utilisateur sous LABVIEW	97
BILAN	98
CHAPITRE 5 : METHODES EXPERIMENTALES	99
INTRODUCTION.....	99
I/ MESURES DE SOLUBILITE	100
I-1) La détermination de la courbe de solubilité	100
I-2) La détermination de la limite de zone métastable de travail.....	101
II) PREPARATIONS ET GESTIONS DES ECHANTILLONS	103
II-1) Préparation des solutions	103
II-2) Dissolution du soluté.....	104
III) EXPOSITIONS AU LASER.....	105
IV) CARACTERISATION DES CRISTAUX	106
IV-1) MORPHOLOGIE ET DENOMBREMENT DES CRISTAUX OBTENUS	106
IV-2) Analyse des faciès.....	107
IV-3) Spectroscopie Raman	109
IV-4) Diffraction des rayons X	111
IV-4-1) Diffraction sur monocristal.....	111
IV-4-2) Diffraction sur poudre	111
BILAN	111

CHAPITRE 6 : EFFET DE LA NUCLEATION INDUITE PAR LASER SUR LA GLYCINE	113
INTRODUCTION.....	113
I/ MESURE DE LA SOLUBILITE.....	114
<i>I-1) Résultats</i>	<i>114</i>
I-1-1) Solubilité dans H ₂ O	114
I-1-2) Solubilité dans D ₂ O	114
I-1-3) Ensemencement	115
<i>I-2) Discussion</i>	<i>116</i>
I-2-1) Solubilité du polymorphe α dans H ₂ O	116
I-2-2) Solubilité du polymorphe α dans D ₂ O	116
II/ NUCLEATION SPONTANEE ET DETERMINATION DE LA LIMITE DE ZONE METASTABLE	117
III/ ETUDE PRELIMINAIRE.....	118
<i>III-1) Démonstration de l'effet du laser</i>	<i>118</i>
<i>III-2) Efficacité de la nucléation : travail préliminaire.....</i>	<i>119</i>
IV/ METHODOLOGIE D'ETUDE	120
V/ EFFICACITE DE LA NUCLEATION EN FONCTION DE DIFFERENTS PARAMETRES.....	122
V-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la puissance	122
V-2) Efficacité en fonction de la concentration.....	124
V-3) Efficacité en fonction du temps de vieillissement	125
V-4) Efficacité en fonction de la durée d'exposition.....	126
VI/ SITE DE NUCLEATION	127
VI-1) Observation du site de nucléation.....	127
VI-2) Interactions entre le faisceau laser et l'interface air / solution	130
VI-3) Site de nucléation en fonction de la puissance.....	131
VI-4) Discussion	132
VII/ FACIES ET DENOMBREMENT DES CRISTAUX.....	133
VII-1) Dénombrement des cristaux	133
VII-1-1) En fonction de la puissance	133
VII-1-2) En fonction de la concentration	134
VII-1-3) En fonction de la durée d'exposition	135
VII-2) Faciès.....	135
VII-2-1) Faciès de nucléation spontanée	136
VII-2-2) Faciès obtenus par nucléation induite par laser	136
VIII/ ETUDE DU POLYMORPHISME	139
VIII-1) Suivant la puissance	139
VIII-2) Suivant la durée d'exposition	140
IX/ LE CONTROLE DU POLYMORPHISME EN FONCTION DE LA POLARISATION	140
IX-1) Dans H ₂ O.....	140
IX-1-1) Polymorphe d'origine α	140
IX-1-2) Polymorphe d'origine γ	141
IX-2) Dans D ₂ O.....	142

IX-3) Synthèse des résultats	143
X/ DISCUSSION.....	143
X-1) Vitesse de nucléation.....	143
X-2) Polarisation et contrôle du polymorphisme	144
X-2-1) Résultats antérieurs.....	144
X-2-2) L'influence du solvant.....	145
X-2-3) L'influence de la polarisation.....	146
X-3) Taille des cristaux obtenus et polymorphisme	147
BILAN	148
CHAPITRE 7 : ETUDE PRELIMINAIRE DE L'EFFET DE LA NUCLEATION INDUITE PAR LASER SUR L'HISTIDINE ET L'ACIDE GLUTAMIQUE	149
INTRODUCTION.....	149
I/ HISTIDINE.....	150
I-1) Motivation de l'étude	150
I-2) Solubilité et limite de zone métastable.....	150
I-2-1) Courbe de solubilité.....	150
I-2-1-1) Solubilité dans H ₂ O	150
I-2-1-2) Solubilité dans D ₂ O	151
I-2-1-3) Discussion et comparaisons des résultats	151
I-2-3) Limite de zone métastable dans différentes conditions	152
I-2-3-1) Dans H ₂ O	152
I-2-3-2) Dans D ₂ O	153
I-3) Méthodologie d'étude	153
I-4) Nucléation induite par laser	155
I-4-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la sursaturation.....	155
I-4-1-1) Dans H ₂ O	155
I-4-1-2) Dans D ₂ O	155
I-4-2) Efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie	156
I-5) Effet de la polarisation du laser	157
I-5-1) Dans H ₂ O.....	157
I-5-2) Dans D ₂ O.....	157
I-6) Site de nucléation	158
I-7) Discussion	158
II/ ACIDE GLUTAMIQUE	159
II-1) Motivations pour une étude préliminaire.....	159
II-2) Solubilité et limite de zone métastable	160
II-2-1) Courbe de solubilité.....	160
II-2-2) Limite de zone métastable	160
II-3) Méthodologie d'étude	160
II-4) Nucléation induite par laser	161

II-4-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la sursaturation.....	161
II-4-2) Effet de la polarisation du laser.....	162
BILAN.....	163
DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	165
DISCUSSION.....	165
<i>Quel mécanisme ?</i>	165
<i>Un mécanisme d'origine électrodynamique</i>	172
CONCLUSIONS.....	174
PERSPECTIVES	176
<i>Travaux expérimentaux sur la cristallisation photoinduite</i>	176
<i>Connaître les premières étapes de la nucléation</i>	177
<i>Modéliser la nucléation induite par laser</i>	178
<i>Améliorer le montage</i>	178
TABLE DES FIGURES	181
TABLE DES TABLEAUX	191
ANNEXES	193
ANNEXE A : ETAT DE L'ART DES RESULTATS OBTENUS EN NUCLEATION INDUITE PAR LASER.....	193
<i>Annexe A1 : Résumé des résultats expérimentaux obtenus pour chaque molécule d'après la littérature.</i>	193
A1-1) Glycine	193
A1-1-1) Nucléation photophysique	193
A1-1-1-1) Sous laser continu.....	193
A1-1-1-2) Sous laser nanoseconde	196
A1-1-1-3) Sous laser femtoseconde.....	197
A1-2) Urée	200
A1-2-1) Nucléation photophysique	200
A1-2-1-1) Sous laser nanoseconde	200
A1-2-1-2) Sous laser femtoseconde.....	201
A1-3) Acide acétique	201
A1-4) L – (+) – Histidine	203
A1-5) L – alanine.....	203
A1-6) L – Phenylalanine.....	204
A1-7) 4 - (Diméthylamino) - N - méthyl - 4 - stilbazolium Tosylate (DAST).....	204
A1-8) Hen Egg White Lysozyme.....	205
A1-8-1) Sous laser continu.....	205
A1-8-2) Sous laser nanoseconde	205
A1-8-3) Sous laser femtoseconde.....	206
A1-9) Bovine Pancréatine Tynine	208
A1-10) Chlorure de potassium (KCl) et Bromure de potassium (KBr).....	209

A1-10-1) Les travaux de l'équipe d'Andrew Alexander	209
A1-10-1-1) Chlorure de potassium	209
A1-10-1-1) Bromure de Potassium	210
A1-10-2) Les travaux de l'équipe de Bruce Garetz	210
A1-11) NaClO ₃	212
A1-12) KNO ₃	213
A1-13) KMnO ₄ et (NH ₄) ₂ SO ₄	214
A1-14) Glucose Isomérase et cytochrome C	214
A1-15) Anthracène	214
A1-16) Criblages de protéines	214
A1-17) Molécule d'intérêt pour la compréhension du phénomène : l'étude du CO ₂	215
A1-18) Carbamazépine	215
<i>Annexe A2</i>	215
<i>Annexe A3 : Statistiques concernant les publications liées au domaine NPLIN</i>	217
Annexe A3 – 1 : Evolution du nombre d'articles publiés liés au domaine NPLIN.	217
Annexe A3 – 2 : Evolution du nombre d'articles publiés par type de molécule.	217
Annexe A3 – 3 : Part des pays dans le volume des publications annuelles jusqu'au 1 ^{er} juillet 2014.....	218
<i>Annexe A4 : Liste des sigles utilisés pour définir la nucléation NPLIN.</i>	219
ANNEXE B : SOLUBILITES EXTRAITES DE LA LITTERATURE.....	221
<i>Annexe B1 : Valeurs de solubilité des polymorphes α et γ de la glycine dans D₂O, H₂O et en fonction du pH à différentes températures.</i>	221
Annexe B1 - 1 : Solubilité dans H ₂ O en fonction de la température.....	221
Annexe B1 - 2 : Solubilité dans H ₂ O et D ₂ O en fonction de la température.	223
Annexe B1 - 3 : Solubilité dans H ₂ O en fonction du pH à une température fixée.	224
<i>Annexe B2 : Valeurs de solubilité des polymorphes A et B du L (+) histidine dans H₂O à différentes températures.</i>	226
<i>Annexe B3 : Valeurs de solubilité des polymorphes A et B du L (+) acide glutamique ainsi que du D (-) et DL acide glutamique dans H₂O à différentes températures.</i>	227
Annexe B3 - 1 : Solubilité du L (+) acide glutamique dans H ₂ O en fonction de la température.	227
Annexe B3 - 2 : Solubilité du D L acide glutamique dans H ₂ O en fonction de la température.	231
Annexe B3 - 3 : Solubilité du D (-) acide glutamique dans H ₂ O en fonction de la température	232
ANNEXE C : DEVELOPPEMENT DU NOUVEAU MONTAGE	233
<i>Annexe C1 : gestion du fluide caloporteur</i>	233
Annexe C1-1 : Photographie de l'intérieur de carrousel. La photographie montre le dessin du carrousel et les logements pour les tubes HPLC.....	233
Annexe C1-2 : Schéma de principe de la gestion du fluide caloporteur dans le carrousel.....	233

Annexe C1-3 : Schéma montrant la circulation d'eau dans les coupes A-A et B-B.....	233
Annexe C2.....	234
Annexe C3 : Liste des spécifications établies sur la base du cahier des charges transmis à la société Arcalé pour la programmation LABVIEW.	236
Annexe C4 : Faces avant du logiciel LABVIEW	246
Annexe C4 - 1.....	247
Annexe C4 - 2.....	247
Annexe C4 - 3.....	248
Annexe C4 - 4.....	248
Annexe C4 – 5.....	249
Annexe C4 – 6.....	249
ANNEXE D : MESURES EXPERIMENTALES DE LA SOLUBILITE DE LA GLYCINE	251
Annexe D1 : Valeurs de la solubilité du polymorphe α de la glycine dans H_2O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au $CINaM$	251
Annexe D2 : Valeurs de la solubilité du polymorphe α de la glycine dans D_2O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au $CINaM$	251
ANNEXE E : MESURES EXPERIMENTALES DE LA SOLUBILITE DU L – (+) – HISTIDINE	252
Annexe E1 : Valeurs de la solubilité du polymorphe B du L - (+) - Histidine dans H_2O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au $CINaM$	252
Annexe E2 : Valeurs de la solubilité du polymorphe B du L - (+) - Histidine dans D_2O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au $CINaM$	252
ANNEXE F : ETUDE L'ETAT INITIAL DE LA SOLUTION	253
BIBLIOGRAPHIE.....	255
ARTICLES PUBLIES EN RELATION AVEC LA THESE.....	279
ANNALE DE CONGRES	309
AUTRES ARTICLES EVOQUANT LES RESULTATS OBTENUS	317

Table des nomenclatures

Les sigles utilisés dans les équations sont définis dans le tableau ci-dessous. Ils sont classés par ordre alphabétique suivant la prononciation. Certains sigles peuvent avoir une définition différente dans un autre chapitre. Ils sont alors définis dans la partie du tableau associée au chapitre considéré. Les éléments déjà défini au chapitre 1 ne sont pas réintroduit et les éléments introduit localement ne pas introduit dans ce tableau.

Sigle	Définition	Unité
Chapitre 1		
a	Coefficient de modélisation	variable
a_i	Activité de la solution	aucune
a_i^{sat}	Activité du soluté i à saturation par rapport à son état standard	aucune
a_i^{sol}	Activité du soluté solide en équilibre avec la solution saturée	aucune
α	Angle de contact entre le germe cristallin et le support	aucune
b	Coefficient de modélisation	variable
β	Degré de sursaturation	aucune
c	Coefficient de modélisation	variable
C	Concentration de la solution	mol.L ⁻¹
C_B	Concentration en bas de la colonne	mol.L ⁻¹
C_T	Concentration en haut de la colonne	mol.L ⁻¹
C_0	Concentration initiale	mol.L ⁻¹
C_{liq}	Concentration en solution	mol.L ⁻¹
C_S	Concentration à saturation	mol.L ⁻¹
D	Coefficient de diffusivité	m ² .s ⁻¹
D_S	Coefficient de diffusion à saturation	m ² .s ⁻¹
ΔC	Sursaturation absolue	mol.L ⁻¹
ΔG	Energie libre d'activation de germination	J
ΔG^*	Energie libre critique d'activation de germination maximum	J
ΔG_{het}	Energie libre de nucléation hétérogène	J
ΔG_{hom}	Energie libre de nucléation homogène	J
ΔH_i	Enthalpie molaire partielle du soluté en solution	J.mol ⁻¹
ΔH_i^*	Enthalpie molaire partielle apparente de la solution	J.mol ⁻¹
E	Energie minimale necessaire pour qu'un germe croisse jusqu'à la taille d'un nucleus.	J
g	Constante de pesanteur	m.s ⁻²
G	Enthalpie libre	J
γ	Tension interfaciale	J.m ⁻²
γ_a	Energie cristal - support	J.m ⁻²
γ_{hkl}	Energie de surface	J.m ⁻²
γ_i^{sat}	Coefficient d'activité du soluté	aucune
γ_S	Energie cristal - solution	J.m ⁻²
γ_0	Energie support solution	J.m ⁻²
H	Enthalpie	J

h	Hauteur de solution	m
J	Fréquence de nucléation	$m^{-3}.s^{-1}$
k	Constante de Boltzmann	$J.K^{-1}$
k'	Facteur cinétique	$m^{-3}.s^{-1}$
K_0	Facteur cinétique caractéristique d'un couple cristal - solution	$m^{-3}.s^{-1}$
M_0	Poids moléculaire	$g.mol^{-1}$
μ_2	Potentiel chimique de la solution sursaturée	$J.mol^{-1}$
μ_S	Potentiel chimique de la solution saturée	$J.mol^{-1}$
N	Nombre de cristaux par unité de volume	m^{-3}
N_A	Nombre d'Avogadro	mol^{-1}
n	Nombre moyen de molécule par « cluster »	aucune
Ω	Volume d'une particule contenue dans un germe	m^3
R	Constante des gaz parfaits	$J.mol^{-1}.K^{-1}$
r	Rayon du germe	m
r^*	Rayon critique du germe	m
ρ	Densité de la solution	$g.m^{-3}$
r_{het}^*	Rayon critique du germe en nucléation hétérogène	m
r_{hom}^*	Rayon critique du germe en nucléation homogène	m
S	Entropie	$J.K^{-1}$
S_a	Surface de l'interface entre le germe et le support	m^2
S_c	Entropie du cristal	$J.K^{-1}$
S_{hkl}	Surface défini par les indices de Miller	m^2
S_l	Surface entre le germe et le liquide	m^2
S_{liq}	Entropie de la solution	$J.K^{-1}$
σ	Sursaturation relative	aucune
T	Température	K
t_g	Temps nécessaire pour la formation d'un cristal détectable	s
t_{ind}	Temps d'induction	s
t_n	Temps nécessaire pour la formation d'un nucleus	s
t_r	Temps de relaxation pour atteindre un équilibre solution - « cluster »	s
v	Volume spécifique	$cm^3.g^{-1}$
Chapitre 2		
α	Polarisabilité	$J.m^2.V^{-2}$
α_p	Polarisabilité d'une molécule	$J.m^2.V^{-2}$
c	Vitesse de la lumière	$m.s^{-1}$
$\chi^{(1)}$	Susceptibilité linéaire	aucune
$\chi^{(3)}$	Susceptibilité nonlinéaire	aucune
∂_t	Opérateur dérivation d'ordre 1 par rapport au temps	s^{-1}
e	Ellipticité	aucune
E	Module du champ électrique	$V.m^{-1}$
\vec{E}	Vecteur champ électrique	$V.m^{-1}$
ϵ_L	Permittivité relative du solvant	aucune
ϵ_S	Permittivité relative du soluté	aucune

ϵ_0	Permittivité du vide	$F.m^{-1}$
\vec{H}	Champ magnétique	$A.m^{-1}$
H	Hamiltonien	J
i	$i^2 = -1$	aucune
J_{peak}	Densité d'énergie maximale	$W.m^{-2}$
k	Vecteur d'onde	m^{-1}
λ	Longueur d'onde	m
M	Masse molaire	$kg.mol^{-1}$
μ_0	Constante magnétique	$H.m^{-1}$
n	Indice de réfraction	aucune
n_m	Indice du milieu environnant	aucune
$\vec{\nabla}$	Opérateur Nabla	aucune
Ω	Angle solide	aucune
ω_0	Fréquence	s^{-1}
\vec{P}	Vecteur polarisation	$C.m^{-2}$
r_c	Rayon critique du germe	m
r_d	Distance entre deux dipôles	m
ρ_s	Densité du soluté	$kg.m^{-3}$
ρ_L	Densité de la solution	$kg.m^{-3}$
S	Sursaturation	aucune
σ_p	Section efficace de diffusion et d'absorption	m^2
t	Variable de temps	s
τ	Constante de temps	s
w	Fraction massique	aucune
w_0	« <i>Waist</i> » du faisceau laser	m
x	Variable d'espace selon l'axe x	m
y	Variable d'espace selon l'axe y	m
z	Variable d'espace selon l'axe z	m
Chapitre 4		
α	Angle de sortie du faisceau	aucune
α_0	Angle d'incidence du faisceau	aucune
d_a	Distance faisceau incident-axe de symétrie du système optique	m
d_s	Distance faisceau-axe de symétrie après le système optique	m
n_a	Indice de l'air	aucune
n_s	Indice de la solution	aucune
n_v	Indice du verre	aucune
r_{ext}	Rayon de courbure extérieur	m
r_{int}	Rayon de courbure intérieur	m
Chapitre 5		
S	Solubilité	$g.L^{-1}$
Chapitre 6		
C	Concentration	$g.L^{-1}$
C_{sD_2O}	Concentration à saturation mesurée dans D ₂ O	$g.L^{-1}$
C_{sH_2O}	Concentration à saturation mesurée dans H ₂ O	$g.L^{-1}$

C_s [Yang 2008]	Concentration issue des données de [Yang 2008]	g.L^{-1}
$\Delta C_{LP/CP}$	Ecart en concentration entre les polarisations circulaire et linéaire	g.L^{-1}
$E_r\%$	Ecart relatif	aucune

Introduction générale

M. C. Etter déclara en 1991 à propos de la science de la croissance cristalline : « *crystal growth is a science and an art. The scientist's role in the crystal growth process is that of an assistant who helps molecules to crystallize. Most molecules, after all, are very good at growing crystals. The scientist challenge is to learn how to intervene in the process in order to improve the final product* ».

L'art auquel fait référence M. C. Etter est la capacité de produire l'arrangement cristallin souhaité d'une molécule en maîtrisant les paramètres régissant le processus de nucléation et de croissance cristalline comme la température, les additifs, l'agitation de la solution² ... Une molécule peut cristalliser dans différents arrangements cristallins aussi appelé polymorphe : la molécule présente alors un polymorphisme. Certaines molécules peuvent cristalliser dans différentes phases parfois dans les mêmes conditions ce qui fait qu'il existe une phase stable d'un point de vue thermodynamique. Cela implique aussi qu'il existe des transitions d'une phase à une autre.

C'est dans la décennie 1820-1830 que l'on voit apparaître la notion de polymorphisme quand Mitscherlich a observé différentes structures cristallines dans des sels d'arsenate et de phosphate^{3,4}. En 1832, le premier exemple de polymorphisme est mis au jour par Wöhler et Liebig dans un composé organique le benzamide⁵. Le polymorphisme se trouve dans les composés organiques et inorganiques sachant qu'une écrasante majorité (plus de 80%) de composés organiques sont polymorphiques avec pour certains plus de dix polymorphes.

Les polymorphes possèdent des propriétés physico-chimiques différentes comme la stabilité, la solubilité, la densité, le point de fusion, le taux de dissolution, le faciès, la morphologie, la couleur ou encore des propriétés biologiques. Par exemple, le beurre de cacao a six polymorphes⁶ possédant différents points de fusion (I (17,3°C), II (23,3°C), III (25,5°C), IV (27,5°C), V (33,8°C), VI (36,3°C)). La forme VI est la plus stable mais c'est la forme V qui est préférée par l'industrie pour son point de fusion, sa texture et son brillant⁷. Dans le cadre de l'acide glutamique, molécule étudiée dans cette thèse, c'est sa forme A, métastable, qui est préférée par l'industrie agroalimentaire car la forme la plus stable ne peut pas être traitée pour la production⁸.

Certains polymorphes possèdent des propriétés d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique ou encore agroalimentaire, ce qui fait du contrôle du polymorphisme un enjeu de première importance pour l'industrie pharmaceutique qui garde en mémoire le problème posé par le ritonavir. Mis sur le marché en 1996 comme traitement contre le HIV-1, la forme polymorphique se transforma dans un polymorphe plus stable (forme II) aux biopropriétés

² [Kitamura^A 2002].

³ [Davey 2002].

⁴ [Bernstein 2002].

⁵ [Wöhler 1832].

⁶ [Wille 1966].

⁷ [Oh 2006].

⁸ [Sugita 1988].

inadéquates avec un usage médical, obligeant à un retrait du marché avec des conséquences majeures sur la santé publique et financières.

La mise sur le marché d'un médicament est un processus long qui commence dès la découverte d'une molécule d'intérêt pour traiter une pathologie. L'enjeu de ce processus est l'obtention d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) attestant de la sûreté du produit vendu et de ses capacités de médicament. Tout au long de la recherche, des études sont menées sur le polymorphisme afin de déterminer le diagramme de stabilité des polymorphes, les conditions de formation, les améliorations et les optimisations des biopropriétés qui peuvent venir de co-cristaux^{9,10} ou de sels¹¹.

L'obtention de certains polymorphes est très liée à leurs propriétés physico-chimiques car celles-ci déterminent la meilleure méthode pour cristalliser le polymorphe souhaité. A cette contrainte s'ajoute la nécessité de produire un certain type de faciès. Diverses méthodes ont été développées pour satisfaire ce délicat cahier des charges du contrôle du polymorphisme¹².

Ces méthodes sont multiples pour initier la cristallisation : méthodes optique, électrique, ultra-sonique, additifs, contrôle du solvant. Outre toutes ces méthodes, une a été découverte il y a un peu moins de vingt ans par une équipe américaine basée à New York. Cette découverte due à la sérendipité a montré la possibilité d'induire la cristallisation d'une solution d'urée par un laser nanoseconde à 1064 nm¹³. Les recherches de cette équipe (Pr B. Garetz, Polytechnic University of New York) ont démontré la possibilité de contrôler via la polarisation du faisceau incident le polymorphe obtenu dans le cas de la glycine¹⁴ et de la L-(+) - histidine¹⁵.

La nucléation induite par laser a donc démontré qu'elle peut apporter une contribution majeure dans le cadre du contrôle du polymorphisme de molécule et plus spécialement pour l'industrie pharmaceutique. A terme, il s'agit de démontrer la faisabilité industrielle de la nucléation induite par laser.

C'est donc au carrefour des enjeux économiques et sociaux du contrôle du polymorphisme et de la découverte de l'action de la polarisation comme facteur de contrôle de la cristallisation qu'a été conduite l'ANR « *NPLIN-4-Drug* » dont le but est d'étudier la nucléation induite par laser dont ce travail de thèse est issu.

Afin d'étudier la nucléation induite par laser, une méthode spécifique a été mise en place. Cette méthode repose sur une bibliographie du composé étudié afin de connaître son comportement en solution, sa solubilité, sa limite de zone métastable. Parallèlement au développement de cette méthode, un dispositif expérimental unique a été spécialement

⁹ [Corvis 2013]. Se référer au paragraphe V.3.c.

¹⁰ [Trask 2007].

¹¹ [Chow 2008].

¹² [Llinas 2008].

¹³ [Garetz 1996].

¹⁴ [Sun^A 2006].

¹⁵ [Sun^A 2008].

développé afin d'accroître la statistique et la qualité du contrôle des paramètres de l'expérience. La méthode et le montage ont été employés pour étudier plus en détail la glycine et étudier de manière préliminaire l'effet de la nucléation induite par laser sur les molécules d'histidine et d'acide glutamique.

Cette thèse se compose de sept chapitres. Les trois premiers chapitres décrivent un état de l'art, les deux suivants présentent les méthodes et matériels employés. Enfin, les deux derniers présentent les résultats obtenus sur les trois molécules.

Plus précisément :

Le premier chapitre de la thèse, « *Généralités sur la nucléation* », expose les généralités sur la nucléation et présente les différences entre la théorie classique de la nucléation et la théorie de la nucléation en deux étapes, hypothèse retenue pour expliquer les phénomènes de nucléation par laser⁹. Une bibliographie sur l'état de la solution permet de situer le débat sur l'existence d'agrégats en solution;

Le second chapitre, « *Etat de l'art sur la nucléation induite par laser* », propose une définition précise de la nucléation induite par laser, présente l'ensemble des résultats obtenus par différentes équipes sur différentes cibles expérimentales, les différents montages et configurations expérimentales ainsi qu'une brève bibliographie sur les mécanismes proposés pour expliquer la nucléation induite par laser;

Le troisième chapitre décrit l'« *Etat de l'art des molécules étudiées* ». Cet état de l'art est nécessaire car il permet de connaître les différents polymorphes et leurs conditions d'existence. La connaissance des différents faciès qui ont été utilisés pour identifier les polymorphes obtenus y est également présenté;

Le quatrième chapitre présente le « *Développement d'un montage dédié à l'étude de la nucléation induite par laser* ». Ce nouveau montage automatisé permet de contrôler des paramètres clés comme la température, le temps d'exposition, la densité d'énergie, accroît sensiblement la statistique des expériences et permet le suivi optique de la cristallisation;

Le cinquième chapitre, « *Méthodes expérimentales* », présente les matériels et méthodes utilisés pour la détermination de la solubilité, la limite de zone métastable, la méthode associée à l'exposition et l'observation et les différentes méthodes utilisées pour caractériser les polymorphes obtenus;

Le sixième chapitre, « *Effet de la nucléation induite par laser sur la glycine* », présente la méthodologie de l'étude multiparamètre utilisée (densité d'énergie, sursaturation, solvant, polarisation, faciès, site de nucléation, ...) pour induire la nucléation par laser de la glycine ainsi que l'ensemble des résultats associés;

Le septième chapitre, « *Etude préliminaire de l'effet de la nucléation induite par laser sur l'histidine et l'acide glutamique* », rassemble les résultats d'une étude préliminaire menée sur la L - (+) - histidine et l'acide glutamique D et L;

Enfin, le dernier chapitre « *Discussion, conclusion et perspectives* » récapitule les résultats et amène à une discussion sur la base de ces résultats et de la bibliographie sur les mécanismes. La conclusion se termine sur les perspectives : évolution du montage expérimental, problème de la simulation numérique de la nucléation induite par laser, nouveaux travaux expérimentaux.

Chapitre 1 : Généralités sur la nucléation

Introduction

La cristallisation est un changement d'état qui conduit, à partir d'une phase liquide ou gazeuse, à un solide appelé cristal, de structure régulière et organisée.

On distingue trois types de cristallisation :

- en phase gazeuse,
- en bain fondu,
- en solution.

La maîtrise d'un procédé de cristallisation fait appel à de larges champs de connaissance :

- thermodynamique (équilibre de phases),
- cinétique (nucléation et croissance de la phase cristalline),
- génie chimique (transfert de matière et de chaleur),
- sciences industrielles (géométrie des cristalliseurs).

Ce chapitre explicite quelques concepts fondamentaux de la cristallisation en solution. Dans un premier temps, quelques rappels de définitions, la solubilité, la sursaturation puis différents aspects de la nucléation sont présentés du point de vue thermodynamique et cinétique. La théorie classique de la nucléation, la théorie de la nucléation en deux étapes sont explicités en montrant les différents modèles cinétiques théoriques de la nucléation. Enfin l'importance du polymorphisme et les modalités de son contrôle sont abordés.

I/ Généralités

La cristallisation est une transition de phase du premier ordre où l'état désordonné évolue vers un état ordonné. La cristallisation peut s'opérer à partir d'une phase liquide ou gazeuse et peut s'initier lorsqu'il y a sursaturation d'un composé. La nucléation désigne les phénomènes d'agrégation à petite échelle et la cristallisation désigne la formation du cristal.

I-1) La solubilité

La solubilité est la quantité maximale de solide ou de soluté capable de se dissoudre dans un solvant donné. Elle est fonction de plusieurs paramètres : composition de la solution, pression, présence ou non d'une phase solide et des solvants ou encore d'antisolvants. D'un point de vue physicochimique, la solubilité du couple solvant-soluté se mesure au travers de sa capacité à former des liaisons mixtes ions-dipôles, liaisons dipôles-dipôles, liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals, ou à former des liaisons mixtes avec le solvant.

Les typologies des liaisons qui se forment au sein de la solution vont donc avoir un effet majeur sur la solubilité. Il existe plusieurs types de solvant : polaire, apolaire, protique, aprotique, ionique, non ionique. Par exemple, une molécule riche en groupements – OH aura une solubilité aqueuse importante et une solubilité dans un solvant organique plus faible. *A contrario*, un soluté riche en liaisons C-C a une plus grande solubilité dans un alcane.

Une définition générale de la solubilité a été donnée par Guggenheim en 1959 [Guggenheim 1959] (équation [1 – 1]) :

$$\left(\frac{\partial C_{\text{liq}}}{\partial T}\right)_{P,\text{sat.}} = \left(\frac{S_{\text{liq}} - S_c}{\frac{\partial \mu_s}{\partial C_{\text{liq}}}}\right)_{T,P} \quad [1 - 1]$$

La différence $S_{\text{liq}} - S_c$ est l'entropie de dissolution (normalement) positive. Il existe des courbes de solubilité en fonction de la température, du pH ou d'autres paramètres. Lorsque la différence d'entropie est positive, la solubilité croît avec la température : on parle d'une solubilité directe (figure 1-1a), c'est le cas de la majorité des molécules. Sinon, la solubilité est inverse (figure 1-1b). C'est le cas pour l'aprotinine ou encore le sulfate de chrome III.

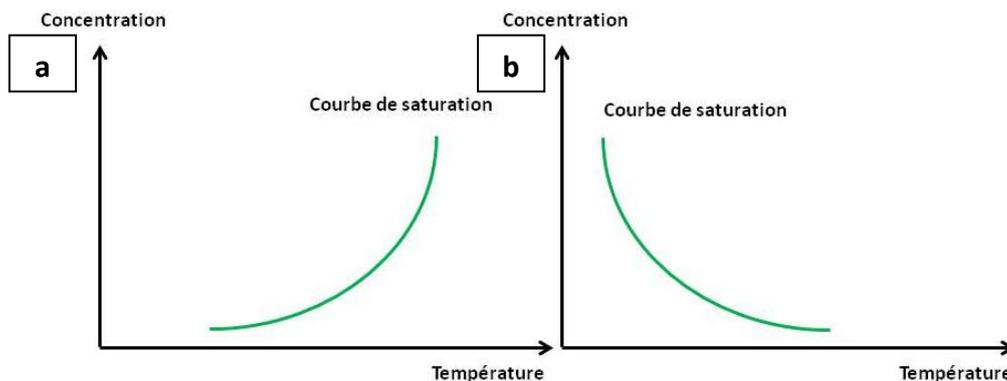


Figure 1-1 : (a) : Diagramme de solubilité directe, (b) : solubilité indirecte.

Lorsque les solutions ont un comportement idéal (rapport de la concentration d'une solution à son activité égal à 1), à pression et température constante et sans transition de phase, nous avons l'isochore de Van't Hoff [1 – 2] ([Grant 1984], [Revalor 2009]) :

$$\frac{d \ln a_i^{\text{sat}}}{dT} = \frac{\Delta H_i}{RT^2} \quad [1 - 2]$$

par ailleurs, on peut écrire

$$a_i^{\text{sat}} = a_i^{\text{sol}} = \gamma_i^{\text{sat}} \cdot C_s \quad [1 - 3]$$

d'où il vient [1 – 4]

$$\frac{d \ln C_s}{dT} = \frac{\Delta H_i^*}{RT^2} \quad [1 - 4]$$

avec

$$\Delta H_i^* = \Delta H_i \left(\frac{d \ln C_s}{da_i} \right)_{T,P} \quad [1 - 5]$$

Dans le cas d'une solution idéale, $\left(\frac{d \ln C_s}{da_i} \right)_{T,P} = 1$ [Hollenbeck 1980]. On peut considérer que l'expression ΔH_i^* varie de manière linéaire en fonction de la température d'où [Grant 1984] :

$$\Delta H_i^* = a + bT \quad [1 - 6]$$

d'où il vient

$$\frac{d \ln C_s}{dT} = \frac{a}{RT^2} + \frac{b}{RT} \quad [1 - 7]$$

et on obtient après intégration

$$\ln C_s = -\frac{a}{RT} + \frac{b}{R} \ln T + c \quad [1 - 8]$$

Cette équation donne la variation de la solubilité en fonction de la température dans le cas d'une solution non idéale. Si on considère que le terme associé au coefficient b est négligeable [Grant 1984], l'équation [1 – 8] se simplifie en [1 – 9] nommé l'équation de Van't Hoff.

$$\ln C_s = -\frac{a}{RT} \quad [1 - 9]$$

De cette équation, il est possible de tirer des grandeurs thermodynamiques : l'évolution de la solubilité exprimée en fraction molaire de la molécule en fonction de $1/T$ est une droite

pour les solutions diluées idéales. Une non linéarité de la courbe de solubilité traduit la présence d'une autre espèce de polymorphe ou la présence de solvates.

I-2) La sursaturation

Une solution est en sursaturation lorsque la quantité de soluté dissoute est supérieure à celle de la courbe de solubilité correspondant à la saturation. La sursaturation β correspond à la force (en terme de potentiel chimique) à appliquer pour franchir la barrière énergétique afin d'obtenir la cristallisation. La force chimique $\Delta\mu$ permettant la cristallisation est définie par la différence entre les potentiels chimiques de la solution saturée (μ_s) et sursaturée (μ_2), équation [1 – 10].

$$\Delta\mu = \mu_2 - \mu_s = kT \cdot \ln\left(\frac{C}{C_s}\right) [1 - 10]$$

La sursaturation ou degré de sursaturation est définie par :

$$\beta = \frac{C}{C_s} [1 - 11]$$

La sursaturation relative σ est définie par :

$$\sigma = \frac{C - C_s}{C_s} [1 - 12]$$

La sursaturation absolue ΔC est définie par :

$$\Delta C = C - C_s [1 - 13]$$

Dans le diagramme de solubilité le plus usité, trois zones se dégagent (figure 1-2) :

- La zone sous-saturée dans laquelle il est possible de continuer à dissoudre du soluté,
- La zone sursaturée métastable. La largeur de la zone métastable est conditionnée par différents paramètres tels que le pH, la vitesse de refroidissement, la présence d'anti-solvant ou de co-solvant ...
- La zone sursaturée ou zone labile dans laquelle les cristaux apparaissent et croissent de manière spontanée sans intervention extérieure dans des temps courts. La cristallisation dans cette zone est dite spontanée. Par conséquent, pour démontrer l'existence d'une nucléation induite par un paramètre extérieur, il convient de se placer dans la limite de zone métastable.

Il y a différents procédés pour obtenir la sursaturation :

- évaporation du solvant,
- refroidissement (pour les composés à solubilité inverse, rare) ou réchauffement de la solution. Le refroidissement provoque la cristallisation,

- ajout d'un co-solvant miscible avec le premier mais qui ne solubilise pas le soluté,
- par variation du pH,
- par réaction chimique avec l'obtention d'un produit de plus faible solubilité.

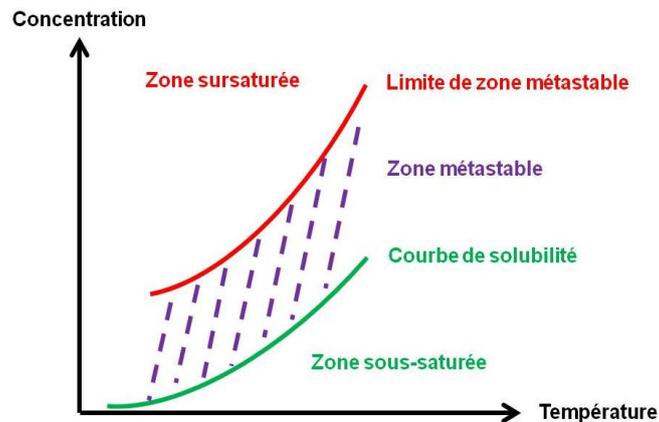


Figure 1-2 : Courbe de solubilité directe. Les trois zones sont représentées : zone sursaturée, zone métastable et zone sous saturée.

I-3) Méthodes de cristallisation

A partir d'une sursaturation métastable, il est possible de stimuler la cristallisation via :

- un refroidissement [Astier 2008],
- une évaporation [Shahidzadeh-Bonn 2008],
- l'ajout d'un anti-solvant [El Bazi 2011],
- la sursaturation (son augmentation réduit l'énergie d'activation) [Sun^B 2013],
- l'agitation [Sypek 2012],
- le champ électrique ([Revalor 2009], [Aber 2005])
- le champ magnétique [Gao 2009],
- le pH qui influe directement sur la solubilité mais aussi sur la largeur de la zone métastable [Revalor 2009],

ou par les méthodes suivantes :

- l'usage d'ultrasons [Revalor 2009],
- l'usage de champ électrique AC/DC imposé soit à l'intérieur de la solution soit à l'extérieur. L'équipe de Stéphane Veessler au Cinam Marseille a induit la cristallisation par des champs internes DC dans des solutions de lysozyme et de BPTI. Peu d'expérimentations ont été menées en utilisant des champs AC ([Hammadi 2009b], [Veessler 2009]),
- par irradiation lumineuse soit par de la lumière laser [Sun^A 2006] soit de la lumière non cohérente (lampe à Xénon) [Veessler 2006].

II/ Les théories de la nucléation

Actuellement, les mécanismes de nucléation sont peu connus et de nombreuses expériences et modélisations théoriques tentent d'en cerner les contours. Il existe la théorie classique de la nucléation et la théorie de la nucléation en deux étapes. Ce paragraphe montre les

théories en vigueur pour expliquer la formation du germe stable. Le sous-paragraphe II-3 va succinctement évoquer la croissance cristalline.

II-1) Théorie classique de la nucléation

La théorie classique de la nucléation est basée sur cinq hypothèses principales [Myerson 2008b] :

- Les « clusters »¹⁶ sont considérés comme sphériques ayant une densité interne uniforme égale à celle de la phase solide au niveau macroscopique et préalablement ordonnés.
- La croissance se produit par l'addition d'un monomère à la fois. Les « clusters » n'ont pas de mouvements de rotation, ni vibration ni translation. Les collisions et leurs effets sont ignorés.
- Les « clusters » sont incompressibles, la formation des « clusters » ne changent pas les conditions en pression.
- Les facteurs cinétiques sont dans un état stationnaire.
- Le rayon de courbure de la tension de surface est négligé et l'énergie de surface est considérée comme étant indépendante de la température.

Il existe plusieurs formes de nucléation détaillées dans les paragraphes qui suivent.

II-1-1) Nucléation primaire

II-1-1-1) Nucléation primaire homogène

La nucléation primaire homogène est une nucléation volumique dans une solution où aucune autre particule ne permet de fixer ou induire le phénomène de nucléation. Si le germe contient n molécules, l'énergie libre d'activation de germination ΔG s'écrit [Revalor 2009] [1 – 14] :

$$\Delta G = -nkT \cdot \ln\beta + \sum_{hkl} S_{hkl} \gamma_{hkl} \quad [1 - 14]$$

On considère que les faces du germe ont la même énergie de surface et ce dernier est une sphère, l'équation [1 – 14] devient [1 – 15] :

$$\Delta G_{\text{hom}} = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} kT \cdot \ln\beta + 4\pi r^2 \gamma \quad [1 - 15]$$

Il existe une taille critique à partir de laquelle le germe va soit continuer à grossir après l'ajout d'une molécule soit se redissoudre après le retrait d'une molécule. Cette taille critique se détermine par la minimisation de l'énergie libre en fonction du rayon :

$$\frac{\partial \Delta G}{\partial r} = 0 \quad [1 - 16]$$

¹⁶ On appelle « cluster » un agrégat d'atomes ou de molécules. Le premier terme est un anglicisme, le second sa traduction française. On peut aussi utiliser le terme de germe. Les trois termes sont employés sans distinction.

On obtient alors la valeur du rayon critique r^* du germe associé à une énergie critique ΔG^* :

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT\ln\beta} \quad [1 - 17]$$

La figure 1-3 explique sous forme de graphe les termes contributifs à l'énergie d'activation. L'énergie libre de Gibbs s'accroît comme le montre l'équation [1 – 15] par l'agrégation des molécules, les interactions entre elles et l'interaction surface-liquide. L'augmentation de l'énergie se produit jusqu'à un maximum caractérisant l'instabilité du « cluster ». A ce point, si une molécule est rajoutée, le cristal va croître ; si une molécule est enlevée, le germe va se dissoudre.

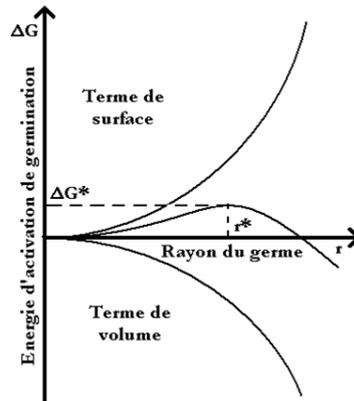


Figure 1-3 : Energie libre d'activation de nucléation homogène et représentation graphique des contributions de surface et de volume. Figure reprise de [Revalor 2009].

II-1-1-2) Nucléation primaire hétérogène

La nucléation primaire hétérogène est la formation d'un germe sur un support, une paroi, une impureté. Le germe n'a plus de forme sphérique mais une forme tronquée avec une croissance qui peut être privilégiée suivant une direction. Le germe tronqué garde le même rayon critique : $r_{\text{hom}}^* = r_{\text{het}}^*$.

Il y a trois types d'énergie à prendre en compte (figure 1-4) : l'énergie cristal - solution γ_s , l'énergie cristal - support γ_a , l'énergie solution - support γ_0 . L'énergie d'activation dans le cas de la nucléation primaire hétérogène est donnée par l'équation [1 – 18] :

$$\Delta G_{\text{het}} = -nkT\ln\beta + S_l\gamma_s + S_a(\gamma_a - \gamma_0) \quad [1 - 18]$$

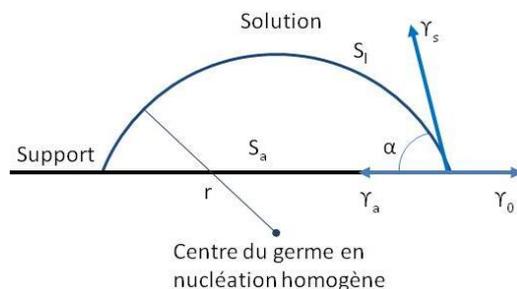


Figure 1-4 : Aires et énergies mises en jeu lors de la nucléation hétérogène.

Les termes d'énergies sont reliés par l'équation de Young [1 – 19] :

$$\gamma_0 = \gamma_a + \gamma_s \cos \alpha \quad [1 - 19]$$

Les équations de la nucléation homogène sont modifiées par l'introduction d'un facteur d'angle (α) [1 – 20].

$$\Delta G_{\text{het}} = \Delta G^* \left[\frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \alpha + \frac{1}{4} \cos^3 \alpha \right] \quad [1 - 20]$$

On remarque $\Delta G_{\text{het}} < \Delta G_{\text{hom}}$: le mécanisme de nucléation hétérogène est privilégié par rapport à celui de la nucléation homogène.

II-1-1-3) Fréquence de nucléation

Les développements précédents correspondent à l'approche thermodynamique du phénomène de nucléation. L'approche cinétique cherche à déterminer la vitesse à laquelle apparaissent les germes ou fréquence de nucléation J , nombre de germes apparus par unité de temps et de volume [1 – 21].

$$J = \frac{dN}{dt} = k' e^{-\frac{E}{RT}} = K_0 e^{-\frac{\Delta G^*}{kT}} \quad [1 - 21]$$

Dans le cadre où le germe est de forme sphérique, cette fréquence est donnée par l'équation [1 – 22] [Puel 2005]. Cette équation montre que le nombre de nucléi dépend du degré de sursaturation.

$$J = K_0 e^{-\frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{3(kT)^3(\ln\beta)^2}} \quad [1 - 22]$$

II-1-1-4) Temps d'induction

Le temps d'induction (t_{ind}) est la période qui s'écoule entre la création de la sursaturation et l'apparition du premier nucleus détectable. Il peut être décomposé en trois contributions : le temps nécessaire pour la formation d'un cristal détectable (t_g), le temps de relaxation pour atteindre un équilibre solution – « cluster » (t_r), le temps nécessaire pour la formation d'un germe critique (t_n) [1 – 23] [Laval 2007] :

$$t_{\text{ind}} = t_r + t_n + t_g \quad [1 - 23]$$

Le temps nécessaire pour la formation d'un germe (t_n) est inversement proportionnel à la fréquence de nucléation [El Bazi 2011] [1 – 24].

$$t_n \propto \frac{16\pi\Omega^2\gamma^3}{e^{3(kT)^3(\ln\beta)^2}} \quad [1 - 24]$$

D'un point de vue pratique, le temps d'induction dépend en particulier des conditions expérimentales comme la température, le pH, la sursaturation [Boistelle 1985] ou un facteur extérieur agissant comme catalyseur comme un champ électrique externe et permet de

réduire le temps d'induction par rapport à la durée moyenne d'obtention d'un cristal en nucléation spontanée [Revalor 2009]. Dans le cas de la nucléation spontanée, ce temps d'induction va conditionner la largeur de la limite de zone métastable définie au paragraphe I-2. Dans la zone métastable, pour une durée déterminée, aucune nucléation spontanée n'existera.

La largeur de la limite de zone métastable expérimentale peut être conditionnée par la sursaturation comme cela a été démontré précédemment ou encore par des facteurs expérimentaux comme le mode de refroidissement. Ainsi, il a été montré pour la glycine qu'en fonction de la vitesse de refroidissement, la largeur de la zone métastable évolue [Bonin-Paris 2011]. Le tableau 1-1 montre l'évolution de la limite de zone métastable en fonction de la vitesse de refroidissement appliquée au système.

Vitesse de refroidissement (°C/minute)	Limite de zone métastable (g/L)
0,1	34,5
0,3	36
0,5	37,5
1	38,5
1,5	39

Tableau 1-1 : Evolution de la limite de zone métastable en fonction de la vitesse de refroidissement. La température de référence est 35 °C et la saturation est de 30 g/L. Tableau adapté de [Bonin-Paris 2011].

II-1-2) Nucléation secondaire

La nucléation secondaire se produit à faible sursaturation et y est prépondérante. Elle n'existe qu'en solution. Il s'agit de la formation de germes à partir des cristaux déjà présents dans la solution ou ajoutés volontairement (ensemencement). Il existe trois familles de nucléation secondaire : la nucléation secondaire de contact, de surface et apparente [Puel 2005].

- La nucléation secondaire de contact ou encore d'attrition présente la formation de cristaux aux zones de contacts cristal/cristal, cristal/agitateur et cristal/parois fixes d'une cuve de cristallisation. C'est un processus mécanique ne nécessitant, dans un premier temps, aucune sursaturation.

- La nucléation secondaire de surface correspond à une formation des cristaux à partir de la solution : sous l'effet des gradients de concentration au sein du liquide, des heurts entre cristaux et parois ou entre cristaux, des agrégats de molécules se détachent pour donner naissance à de nouveaux cristaux. Ce mécanisme dépend beaucoup de la sursaturation et conduit à la croissance ou à la dissolution des agrégats détachés.

- La nucléation secondaire apparente concerne les cristallisations ensemencées, méthode utilisée en industrie pour favoriser la croissance d'une semence en évitant la nucléation primaire. Des fragments cristallins apparents proviennent de la surface des cristaux de semence et en sont séparés après leurs mises en suspension par agitation mécanique.

II-2) La nucléation en deux étapes

Dans les paragraphes précédents, nous avons présenté la théorie classique de la nucléation. Toutefois, cette théorie a montré ses limites dans l'interprétation des phénomènes de nucléation car cette dernière sous estime de plus de dix ordres de grandeur les vitesses de croissance ([Erdemir 2009], [Vekilov 2010]). Une théorie alternative a été développée pour rendre compte des phénomènes observés : la nucléation en deux étapes ([Vekilov 2010], [Vekilov 2004], [Kashchiev 2005], [Gebauer 2014]). La figure 1-5 présente une illustration du mécanisme de nucléation en deux étapes : en (a) est représentée la vision microscopique en terme d'évolution de la structure en fonction de la concentration ; la concentration locale augmente jusqu'à atteindre un point critique où l'agencement structural commence. En (b) est représentée la vision macroscopique du processus en pointillé en (a). Un « *liquid like cluster*¹⁷ » se forme car la concentration est accrue jusqu'au début de la croissance cristalline.

La figure 1-3 montre l'aspect thermodynamique dans le cadre de la théorie classique de la nucléation. La théorie de la nucléation en deux étapes modifie cet aspect en abaissant l'énergie de seuil à partir de laquelle la nucléation se produit. En effet, avant la formation du cristal, il y a la formation d'une phase dense aqueuse comme le montre la figure 1-6. Au niveau du point local de stabilité, il existe des « *cluster* » stable par rapport à la solution mais métastable par rapport au cristal. Les précurseurs des « *clusters* » est une phase métastable dite « *liquid like cluster* » à la fois vis à vis de la solution et du cristal. Dans ce dernier cas, cette phase existe pour une durée déterminée [Vekilov 2004].

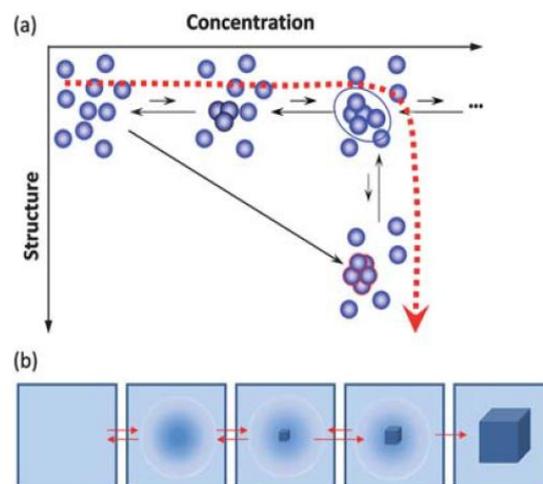


Figure 1-5 : (a) vision microscopique en terme d'évolution de la structure en fonction de la concentration, la concentration locale augmente jusqu'à atteindre un point critique où l'agencement structural commence, (b) vision macroscopique du processus en pointillé en (a). La flèche noire représente la théorie classique de la nucléation. Figure reprise de [Vekilov 2010].

¹⁷ Un « *liquid like cluster* » est une zone de la solution très dense et dont le comportement se rapproche de celui des premiers agrégats. C'est un précurseur d'un « *cluster* ».

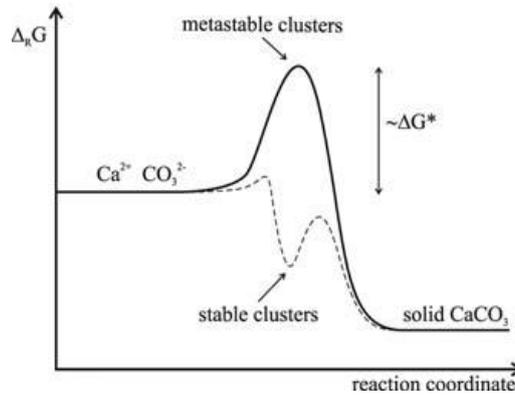


Figure 1-6: Représentation schématique de la modification du tracé de l'enthalpie libre en fonction des coordonnées de réaction dans le cas de la nucléation en deux étapes (ligne pointillée). Figure reprise de [Cölfen 2008].

Il est possible de résumer la théorie classique de la nucléation et la théorie de la nucléation en deux étapes par le schéma présenté dans la figure 1-7.

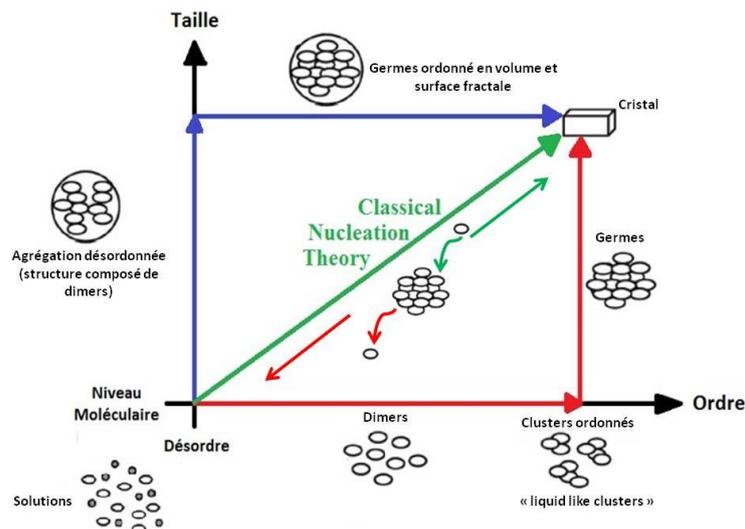


Figure 1-7 : Représentation schématique des deux théories. La flèche verte représente la théorie classique qui ne privilégie ni l'ordre ni la taille. La flèche bleue est la variante de l'approche en deux étapes qui considère qu'il y a premièrement une augmentation en taille sans structure ordonnée puis, passé une taille critique, le « cluster » s'ordonne et continue de croître. La flèche rouge est la variante dans laquelle il existe au niveau moléculaire des « clusters » préformés et ordonnés. Ces « clusters » s'agrègent pour aboutir au cristal. Elements de la figure repris de [Velikov 2010].

II-3) Croissance cristalline

Lorsque le germe atteint la taille critique à la fin de la nucléation, le processus de croissance cristalline commence et il ne s'arrête qu'une fois la sursaturation consommée donc lorsqu'un équilibre est retrouvé au sein de la solution. La croissance dépend des caractéristiques propres du cristal parmi lesquels la structure, les liaisons, les défauts et des caractéristiques du milieu de croissance comme la sursaturation, la température, les conditions hydrodynamiques autour du cristal, le solvant, les additifs. La combinaison de ces paramètres aboutit à des mécanismes et à des cinétiques de croissance différentes dont vont découler des faciès cristallins variés.

Pour décrire un cristal, il existe deux notions : le faciès et la morphologie. Le faciès ou encore habitus (« *crystal habit* » en anglais) est la forme extérieure d'un cristal (figure 1-8). La morphologie est l'ensemble des faces du cristal formées, celles-ci se déduisent les unes des autres par les éléments de symétrie donnés par le groupe d'espace auquel appartient le cristal. La différence entre le faciès et la morphologie est montrée dans la figure 1-9.

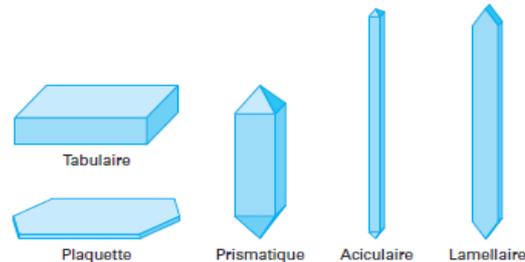


Figure 1-8 : Représentation schématique des principaux types de faciès. Figure reprise de [Bauer^A AF3640], elle même adaptée de [Haleblian 1969].

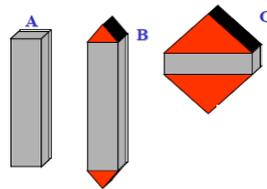


Figure 1-9 : Différence entre morphologie et faciès. A et B : même faciès mais morphologie différente, B et C : même morphologie (même face) mais différent faciès. Figure adaptée des planches orales de Stéphane Veessler.

III/ Le problème de l'état initial de la solution

La compréhension de la nucléation en général et, dans notre étude, sur le cas particulier de *NPLIN* passe par une connaissance au plus près possible des premiers stades de la nucléation.

III-1) Mesure expérimentale de la distribution des tailles des particules

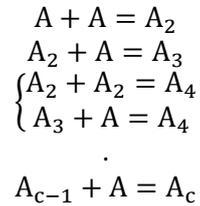
L'étude des premiers stades de la nucléation s'effectue en déterminant la taille critique des germes ou en la calculant. Néanmoins, cela n'est possible que sous les hypothèses formulées dans le cadre de la théorie classique de la nucléation qui impliquent une restriction forte. Par ailleurs, il peut être intéressant d'étudier le phénomène de nucléation par d'autres moyens comme les dispositifs optiques permettant de connaître la distribution de la taille des agrégats en solution à l'équilibre. Les dispositifs expérimentaux permettant de détecter la présence de cristaux sont [Veessler 2003] :

- les analyseurs de particules par diffraction laser,
- la mesure de turbidité,
- les sondes FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*),
- l'analyse d'image,
- la spectroscopie proche infrarouge,
- la spectroscopie Raman,

ou encore les mesures de diffusion. Chacune de ces techniques possède ses avantages propres surtout en volume sondé et en taille détectée.

III-2) L'étude des solutions à l'équilibre

Les fluctuations locales de concentration aboutissent à des agrégations pouvant amener à la nucléation. Le mécanisme d'agrégation postulé pour une molécule A est le suivant :



Allan Myerson et Rajiv Ginde [Ginde 1992] ont cherché à déterminer expérimentalement la taille des « clusters » en solution par deux méthodes expérimentales : à partir de la mesure de diffusion puis à partir des données de concentration. On définit le poids moyen moléculaire de deux façons : la première est donnée par [1 – 25] où M_x est la masse du « cluster » contenant N_x molécules, la seconde par [1 – 26] où w_x est la fraction pondérale du « cluster » x.

$$M_n = \frac{\sum_{x=1}^N M_x N_x}{\sum_{x=1}^N N_x} \quad [1 - 25]$$

$$M_w = \sum_{x=1}^N M_x w_x \quad [1 - 26]$$

Le nombre n de molécules dans un « cluster » s'obtient en divisant la quantité M_n par M_0 . Une première approche consiste à étudier le comportement des « clusters » d'une molécule organique dans un champ gravitationnel. La fonction d'énergie libre est modifiée pour y inclure l'énergie potentielle de pesanteur comme le montre l'équation [1 – 27]. En partant de la nouvelle expression de l'énergie libre, les auteurs [Ginde 1992] introduisent la fraction pondérale [1 – 28] et le diamètre d'un « cluster » d_w [1 – 29].

$$G = G_0 + RT \ln(a_i C) - M_0 g \quad [1 - 27]$$

$$M_w = \frac{RT}{(1 - \rho v)hg} \frac{C_B - C_T}{C_0} \quad [1 - 28]$$

$$d_w = 2 * \left(\frac{0,75 * M_w}{4\pi\rho N_A} \right)^{\frac{1}{3}} \quad [1 - 29]$$

Les résultats obtenus par cette méthode sont conditionnés à une hauteur de fluide qui a, suivant les molécules, une influence importante. Le tableau 1-2 ci-dessous résume les résultats obtenus par Ginde *et al.* [Ginde 1992] n est le nombre moyen de molécule par « cluster ». On remarque une fluctuation de la mesure comme le montre le n de l'urée où les mêmes conditions opératoires amènent une variation de près de 33 %. La seconde méthode mesure le coefficient de diffusivité D dans la solution à différents moments et pour différentes concentrations à une température donnée. De cette donnée, il est possible de remonter au nombre moyen de molécules par « cluster » [1 – 30] où la quantité D_s est le coefficient de diffusion à saturation.

$$n \cong \left(\frac{D_s}{D}\right)^{\frac{1}{5}} [1 - 30]$$

La figure 1-10 montre l'évolution du nombre de molécules de glycine par « cluster » en fonction de la concentration à 25 °C : plus la concentration augmente, plus le nombre moyen de molécules par « cluster » augmente. Jusqu'à une concentration de 170 g/L, la distribution s'oriente plus vers des monomères, et au-delà vers des dimères.

Molécule	T (°C)	Vieillessement (h)	Hauteur de solution (cm)	Sursaturation	n
Glycine	15	28	100	1,188	2,12
Acide citrique	16	24	30	2,19	102,3
	20	24	30	1,25	4,2
	22,6	71	40	1,055	49,7
	25	71	20	1,384	55,1
	25	24	30	1,2	10,3
	25,2	336	40	1,185	27,4
	28,2	70	40	1,055	16
	30	92	40	1,173	107
Urée	26,2	24	30	1,11	77,6
	26,2	24	30	1,11	51,9

Tableau 1-2 : Estimation de la taille des « clusters » à partir des données de concentration. Ces données sont issues de [Ginde 1992], [Larson 1986], [Lo 1989].

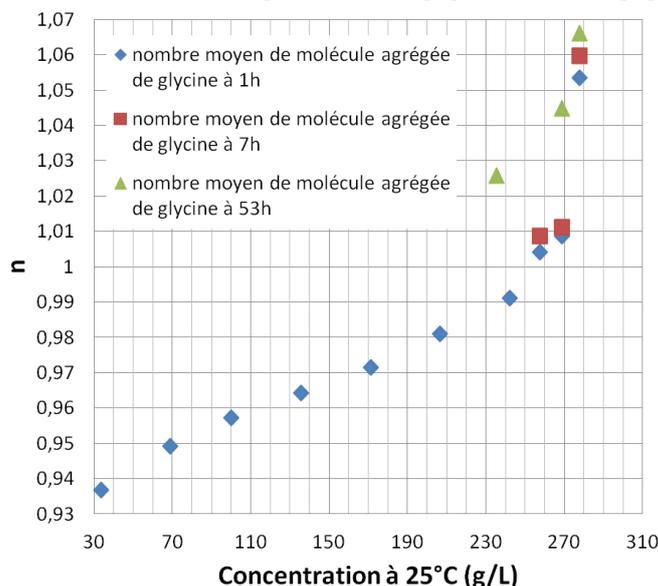


Figure 1-10 : Evolution du nombre moyen de molécules de glycine par « cluster » en fonction de la sursaturation à 25°C. Données d'après [Ginde 1992].

IV/ Polymorphisme

IV-1) Une définition

Le polymorphisme est la faculté que possède une molécule de cristalliser dans des structures différentes selon les conditions ambiantes (polymorphe A, B, figure 1-11). Ces structures ont des arrangements structuraux différents [Bernstein 2002].

Ainsi, on distingue le polymorphisme d'empilement, quand la différence est due à l'empilement cristallin, le polymorphisme de conformation quand il est dû à la différence de conformation (figure 1-11). Cette figure introduit brièvement d'autres structures présentant un ordre comme les co-cristaux ou l'inclusion dans la structure cristalline d'une quantité stœchiométrique de molécules de solvant au sein du cristal du soluté créant une entité différente de celle de départ car il ne s'agit plus de la même phase. Si le solvant est de l'eau, on parle d'hydrate et s'il s'agit de solvant organique, on parle de solvate.

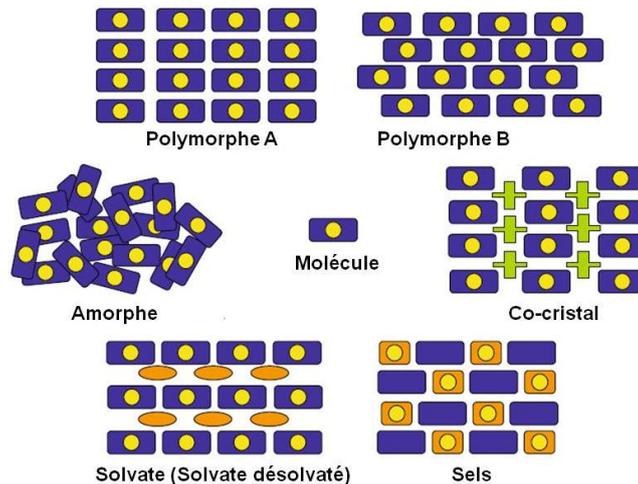


Figure 1-11 : Représentations schématiques des différences entre polymorphes : les polymorphes A et B diffèrent par l'empilement. Figure reprise de [Braga 2009].

IV-2) Stabilité des polymorphes

Il existe des variations dans la cristallisation notamment lorsque plusieurs phases cristallines d'une même molécule coexistent aux mêmes conditions. Il y a une phase (1) thermodynamiquement stable lorsque son énergie libre [1 – 31] est inférieure à celle de la forme (2). Lorsque qu'il y a n formes, il s'agit d'un minimum local car la forme (2) n'est pas nécessairement métastable sur l'ensemble du diagramme de phase.

$$G(T) = H(T) - TS(T) \quad [1 - 31]$$

$(G_1 < G_2) \Leftrightarrow$ (la forme 1 est plus stable thermodynamiquement que la forme 2)

$(G_2 < G_1) \Leftrightarrow$ (la forme 2 est plus stable thermodynamiquement que la forme 1)

$(G_1 = G_2) \Leftrightarrow$ (les formes 1 et 2 sont en équilibre thermodynamique)

Une forme métastable peut être favorisée cinétiquement. Dans la figure 1-12 (a), le système est monotropique, les courbes de solubilité ne se croisent pas, la forme (1) est la plus stable et la forme (2) est métastable et dans la figure 1-12 (b), le système est énantropique, les courbes de solubilité se croisent et les deux courbes de solubilité se croisent en un point caractérisant une transition de phase à une température donnée.

Ainsi, dans un système monotropique avec deux phases (polymorphes I et II), seule la forme I (forme stable) devrait nucléer. Il arrive très souvent que la forme II (forme métastable) cristallise avant la forme I. Cela signifie que la forme II présente une vitesse de nucléation et de croissance plus importante que celle de la forme I. Cela est vrai aussi dans un système énantiotropique en tenant compte de la température. Si on se situe à une température

inférieure à celle de la transition de phase, la forme I est la plus stable; si on se situe à une température supérieure, la forme II est la plus stable.

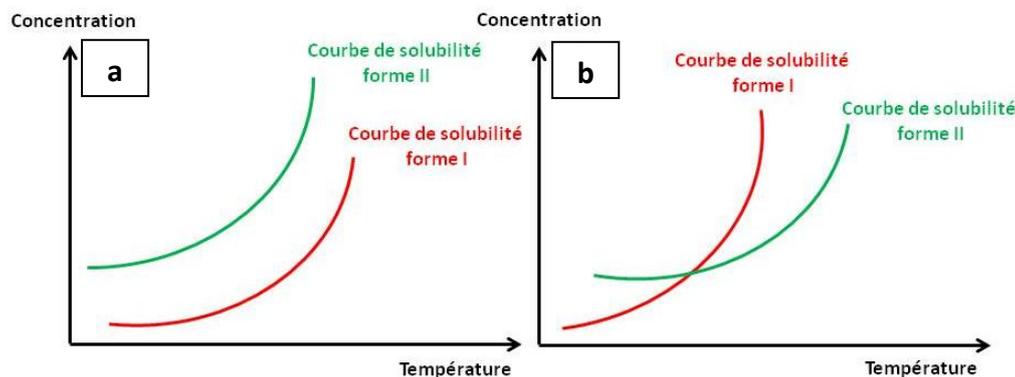


Figure 1-12 : (a) : Courbe de solubilité dans le cas d'un système monotropique, (b) : Courbe de solubilité dans le cas d'un système énantiotropique.

La transition polymorphique est donc due au fait que la cristallisation est à la fois un processus thermodynamique et cinétique [Bernstein 2002] :

- la cinétique peut favoriser la formation de la forme métastable,
- la thermodynamique peut favoriser la formation de la forme stable.

Le polymorphe qui cristallise n'est donc pas nécessairement le plus stable. Cette observation expérimentale montrant l'interaction entre la cinétique et la thermodynamique a été actée par la loi dite des états correspondant d'Ostwald énoncée en 1897 [Ostwald 1897] : tout système quittant un état métastable évoluera vers l'état métastable le plus proche voisin d'énergie libre inférieure et non vers l'état le plus stable.

Le fait que le polymorphe le plus stable ne se forme pas nécessairement peut poser problème ou au contraire apporter une solution à un problème dans l'industrie pharmaceutique. En effet, les polymorphes ont des structures cristallines différentes ce qui implique des énergies de réseau différentes donc des propriétés physico-chimiques différentes comme la température de fusion, la solubilité, la vitesse de dissolution, les propriétés optiques, la réactivité chimique, la biodisponibilité, la processabilité galénique ou la stabilité ([Rodriguez-Spons 2004], [Huang 2004]). Dès lors, la compréhension de la formation des polymorphes devient un enjeu capital dans le contrôle du polymorphisme.

IV-3) Le contrôle du polymorphisme

IV-3-1) Quelques exemples illustrant l'importance du contrôle du polymorphe

Le polymorphisme est un enjeu pour l'industrie pharmaceutique car certaines formes cristallines métastables peuvent être de premier intérêt dans le traitement de certaines pathologies car les biopropriétés de la forme métastable sont supérieures à la forme stable [Bauer^A AF3642]. Dans cet objectif, l'optimisation de la forme polymorphique du produit mis sur le marché est très importante. Il est donc nécessaire de connaître les propriétés des formes polymorphiques d'une molécule afin de mettre sur le marché la forme la plus stable. Néanmoins, il arrive parfois que cela ne suffise pas.

L'un des exemples qui fut traumatisant pour l'industrie pharmaceutique est celui du Ritonavir[®]. Le Ritonavir[®] est un médicament anti HIV qui possède plusieurs polymorphes. Jusqu'à sa mise sur le marché, seule la forme I a été découverte [Bauer^B 2001]. En 1998, une forme d'énergie plus faible donc plus stable a été mise en évidence (forme II) qui avait des propriétés de biodisponibilité orale très réduite par rapport à la forme I. Jusqu'à cette découverte, la forme I était commercialisée et bien sûr, la découverte de la forme II a entraîné un rappel massif du produit mis en vente pour un coût de 2 000 000 000 \$US. La forme II nucléée très difficilement [Sear 2012], c'est pour cela qu'elle n'avait pas été découverte auparavant.

La forme efficace du Ritonavir[®] était la forme I, métastable. Il s'agit ici d'une transformation polymorphique. Néanmoins, il est possible de souhaiter produire une forme particulière, métastable dans certaines conditions (voir IV-3-2). Le tableau 1-3 montre différentes situations suivant la situation thermodynamique de la forme souhaitée pour le contrôle des polymorphes.

Forme souhaitée	Forme générée par nucléation primaire hétérogène	Situation thermodynamique	Situation cinétique	Stratégies d'obtention
Stable	Stable	Très favorable	Très favorable	Ensemencement de sécurité de la forme stable recommandé, si présence éventuelle de la forme métastable lors de la nucléation primaire hétérogène
Stable	Métastable	Favorable	Indifférente	Ensemencement de la forme stable en remplacement de la nucléation primaire
Métastable	Métastable	Défavorable	Indifférente	Ensemencement de sécurité de la forme métastable pour prévenir la nucléation primaire éventuelle de forme stable. Néanmoins, le procédé est de fait soumis à un risque de transition erratique à la forme stable
Métastable	Stable	Très défavorable	Très défavorable	Ensemencement de la forme métastable ne sera peut être pas suffisant car le risque d'apparition de la forme stable est important. Il n'est pas sûr que le procédé puisse délivrer la bonne forme régulièrement.

Tableau 1-3 : Résumé de quatre situations possibles et des stratégies à adopter pour le contrôle des variétés polymorphiques. Tableau repris et adapté de [Vesler 2003].

IV-3-2) Facteurs conditionnant le contrôle du polymorphisme

Kitamura [Kitamura^A 2002] propose un classement des facteurs influençant la nucléation en distinguant les facteurs principaux :

- la sursaturation,
- la température,

- l'ensemencement,
- la vitesse d'agitation,
- le taux de mélange,
- la solubilité,

des facteurs secondaires :

- les solvants¹⁸,
- les additifs,
- le pH,
- les interfaces,

Et aussi les impondérables physiques comme la stabilité relative des polymorphes et les transformations polymorphiques qui en découlent.

Bilan

Nous avons montré dans ce chapitre qu'il existe plusieurs façons d'obtenir des cristaux avec des méthodes très différentes (champ magnétique, champ électrique, réduction de la température, évaporation, mise sous vide).

La nucléation dépend de nombreux paramètres qu'il est important de connaître comme la structure des polymorphes, leurs stabilités relatives, la solubilité. La modification de ces paramètres permet potentiellement de faire nucléer un polymorphe par rapport à un autre et ainsi aboutir au contrôle du polymorphisme.

Le chemin qui aboutit au cristal est encore sujet à débat. La théorie classique de la nucléation a été la première explication théorique proposée pour saisir les phénomènes de nucléation. Toutefois, face à certaines faiblesses expérimentales, une théorie en deux étapes a été proposée selon laquelle les molécules s'agrègent dans un liquide très concentré qui nécessite un faible apport en énergie afin de stimuler la nucléation.

¹⁸ Ce classement peut être critiqué en arguant du fait que le solvant est un élément très important ce qui est le cas comme nous le montrerons.

Chapitre 2 : Etat de l'art sur la nucléation induite par laser

Introduction

L'invention du LASER¹⁹ (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, en français : amplification de la lumière par émission stimulée de rayonnement) a permis de développer de très nombreuses technologies. La puissance véhiculée dans le faisceau, sa cohérence en phase, sa monochromaticité, sa faible divergence et des impulsions de plus en plus courtes de l'ordre de l'attoseconde ([Brabec 2000], [Krausz 2009]) en font un outil très utilisé. Toutefois, ce n'est qu'assez récemment que le laser a été employé comme outil potentiel de manipulation d'objet ([Kitamura^B 2003], [Yamaguchi 2008]), de fabrication de nanoparticules [Asahi 2008] et de contrôle spatiotemporel de la nucléation [Miura 2013] ouvrant des potentialités de recherche et d'application très importantes.

Une telle découverte pourrait être utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour le contrôle du polymorphisme et le contrôle du faciès en plus du panel de méthodes de cristallisation à disposition et présentées dans le chapitre I. L'usage du laser comme moyen d'induire la nucléation remonte à 1996.

Ce chapitre fait un état exhaustif de l'art de la nucléation induite après l'avoir précisément définie. La nucléation induite par laser est un sujet en pleine expansion depuis 1996 ([Garetz 1996], [Hotta 1996]). Trois différentes familles de composés ont été étudiées : des molécules organiques, des composés inorganiques et des protéines, par un nombre restreint d'équipes : six équipes dans cinq pays : Etats-Unis, Japon, Ecosse, France et Pays Bas avec des niveaux d'activité divers. Les japonais ont produit jusqu'à maintenant²⁰ 68 % du volume de publications montrant ainsi qu'ils ont développé une vraie capacité dans ce domaine. Les écossais ont contribué à augmenter la compréhension de la méthode *NPLIN* initiée par l'équipe de Garetz.

Un court rappel bibliographique pour chacun des composés ou des molécules étudiés est effectué montrant l'apport des résultats obtenus à la compréhension du phénomène. Un état de l'art des différents types de montage montre là aussi une certaine pluralité. Enfin, un court résumé sur l'état des discussions sur le mécanisme est proposé.

¹⁹ Le sigle LASER est devenu un nom commun et sera dans la suite de ce document remplacé par le nom laser.

²⁰ 1^{er} juillet 2014

I/ La nucléation induite par laser

I-1) La nucléation induite par laser : vue d'ensemble

La nucléation induite par laser se caractérise par l'obtention de cristaux après interaction du laser avec la solution sursaturée. Cette définition vaste englobe deux familles :

- la nucléation photochimique; cette nucléation va se produire après une modification de la structure chimique de la molécule initiale,
- la nucléation photophysique; cette nucléation va se produire après stimulation d'un composé en solution. Elle fait intervenir un mécanisme qui n'altère pas la molécule initiale.

I-1-1) La nucléation photochimique

La nucléation se produit suite à une réaction photochimique induite par la lumière. La première publication évoquant ce phénomène date de 1896 [Tyndall 1896]. La photochimie comme source d'obtention de molécules nouvelles insolubles qui précipitent en cristaux a été démontrée par plusieurs articles sur différentes cibles.

Un laser nanoseconde (355 nm, 30 ns, fréquence de répétition de 10 Hz) sur le benzophenone dans une solution mixte d'éthanol et d'eau a permis d'obtenir des cristaux de benzopinacol après la production de radicaux de benzophénone ketyl dans la solution [Okutsu 2004]. Il est donc possible de cristalliser *via* l'aide d'un intermédiaire une molécule donnée. Les cristaux obtenus sont identiques à ceux obtenus par d'autres méthodes. Néanmoins, l'obtention de ces cristaux passe par une modification chimique de la molécule initiale.

La même équipe a démontré que le Lysozyme pouvait être cristallisé *via* un processus photochimique en utilisant une lampe (lumière visible) à gaz Xe à 300 W ([Okutsu 2005], [Veesler 2006]). L'irradiation d'une durée comprise entre 10 et 60 secondes effectuée sur des solutions à pH 4,5 (ajout de NaCl) avec une sursaturation de $\beta = 9$ produit un intermédiaire par un processus à un photon : des radicaux du tryptophane augmentent la probabilité de nucléation par une augmentation de l'interaction entre molécules. La durée de l'irradiation augmente le nombre de cristaux de lysozyme obtenus qui sont de petite taille. Toutefois, au-delà de 60 secondes, le lysozyme est irrémédiablement endommagé. Le même mécanisme a été mis en avant pour la thaumatine dont le radical intermédiaire est le tryptophane qui évolue en un radical tryptophanyle [Okutsu 2007] et le ribonucléase A, qui produit comme intermédiaire le radical libre Tyr [Furuta 2008].

I-1-2) La nucléation photophysique

La nucléation photophysique a été observée pour la première fois en 1975 sur des particules de césium mises en phase gazeuse en présence d'hydrogène [Tam 1975]. La nucléation photophysique est la stimulation directe ou indirecte de la nucléation sans altérer la molécule par réaction photochimique. Elle s'oppose donc sur ce dernier point à la nucléation photochimique, ce qui en fait une nucléation non photochimique. Dès lors, nous pouvons

utiliser le terme de *NPLIN* pour *Non Photochemical LASER Induced Nucleation*²¹. La notion de stimulation indirecte se traduit par la création d'un intermédiaire comme par exemple une onde de choc dans une solution aboutissant à la cristallisation. Le laser a donc un effet direct sur la nucléation de la molécule ([Garetz 1996], [Yuyama 2012b], [Sugiyama 2012], [Soare 2011]).

I-1-3) La nucléation induite par un ensemencement d'origine photophysique

Une autre forme de nucléation s'obtient par l'ablation de cristaux en solution basé sur l'emploi de laser dans l'ultraviolet ($\lambda < 200$ nm). Cela entraîne une dégradation directe des liaisons C-C et C-N des protéines comme le Hen Egg White Lysozyme (HEWL) [Yoshikawa 2014]. Cela revient à créer un macro germe dans la solution. Cette méthode est utilisée pour détruire des zones de cristaux endommagés. Les cristaux produits par cette méthode présentent là aussi des données cristallographiques identiques aux cristaux obtenus par d'autres méthodes. Cette méthode a été utilisée sur différentes molécules : glucose isomerase, lysozyme humain, Acriflavine resistance proteine B ([Murakami 2004], [Kitano 2005]). Les lasers femtoseconde, grâce au processus d'ablation, découpent une petite partie d'un cristal entraînant la croissance depuis la zone atteinte [Yoshikawa 2006b] ou encore permettant l'ensemencement de la solution par des microcristaux ([Sugiyama 2011], [Yoshikawa 2014]). Il s'agit de nucléation secondaire.

I-2) La méthode *NPLIN* utilisant un laser nanoseconde

La méthode *NPLIN* (*Non Photochemical LASER Induces Nucleation*) a été découverte en 1996 par l'équipe de Bruce Garetz du *Polytechnic University* à New York sur l'urée. Cette découverte a été relatée dans un article publié dans la *Physical Review Letters* [Garetz 1996]. La figure 2-1 représente schématiquement le principe.

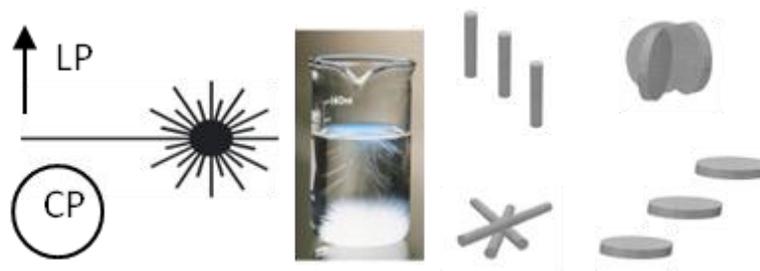


Figure 2-1 : Représentation schématique de la méthode *NPLIN*

Le faisceau d'un laser d'une longueur d'onde de 532 nm ou 1064 nm avec une polarisation linéaire (LP²²) ou circulaire (CP²³) ou elliptique est envoyé sans focalisation sur une solution sursaturée²⁴ d'un composé. L'interaction entre le laser et la solution va aboutir à la nucléation puis à la cristallisation du composé.

²¹ Le sigle *NPLIN* a été employé par Bruce Garetz dans son article de 1996 [Garetz 1996] pour caractériser ses résultats de nucléation induite par laser avec un laser nanoseconde non focalisé. Nous avons choisi d'étendre l'emploi de ce sigle.

²² Dans le reste du manuscrit, le sigle LP (ou L) signifie polarisation linéaire.

²³ Dans le reste du manuscrit, le sigle CP (ou C) signifie polarisation circulaire.

²⁴ Lors des expériences faites par Garetz, il n'est fait aucune référence à la limite de zone métastable.

La fenêtre de basculement est l'élément le plus important de la méthode *NPLIN*. Elle permettrait de rendre viable l'usage de cette méthode pour la cristallisation sélective d'un polymorphe ou d'un autre suivant la polarisation du laser. On pourrait parler de polymorphe « *on demand* ». Toutefois, de nombreux autres paramètres entrent en compte et peuvent rendre aléatoire ou renforcer son utilisation (pH, température, solvant ...).

I-3) *Light Induced Nucleation et Non Photochemical laser Induced Nucleation*

Le paragraphe I-1 a montré qu'il existe deux grandes familles de nucléation induite par laser discriminé suivant le fait que la molécule initiale ait été altérée ou non lors du processus de nucléation. Dans ce travail, on s'est intéressé plus particulièrement à la nucléation non photochimique induite par laser et en excluant la nucléation induite par l'ablation de cristaux déjà présents en solution. Il s'agit donc de nucléation photophysique ne faisant intervenir aucun processus photochimique.

Plusieurs acronymes ont été donnés pour désigner spécifiquement les résultats obtenus. Le premier, *NPLIN*, a été donné par Garetz dès 1996 pour nommer la façon dont ils ont obtenu les cristaux d'urée puis un second apparaît en 2003, *LIGHT (LASER Irradiated Growth Technique)*, suite à la cristallisation du HEWL par un laser femtoseconde. Dans les différentes publications et citations, *NPLIN* est associé aux travaux de Garetz.

Dans les faits, toutes les études menées sur la nucléation induite par laser relèvent du principe *NPLIN* quand il y a absence de photochimie et d'ensemencement induit par le laser. Dès lors, nous considérerons qu'une nucléation induite est non photochimique si elle correspond au critère défini dans le paragraphe I-1-2. Ainsi, on lui appliquera l'acronyme *NPLIN* en élargissant le périmètre du terme introduit par Bruce Garetz [**Garetz 1996**].

II/ Etat de l'art sur la nucléation des molécules induite par laser

Cette partie présente un rapide état de l'art des résultats obtenus et des configurations expérimentales. La partie II-2 évoque les modèles proposés pour modéliser la nucléation induite par laser.

II-1) Molécules étudiées et conditions expérimentales

Plusieurs molécules de différentes familles (organiques, protéines et inorganiques) ont été étudiées par différents moyens dans différentes conditions. Les tableaux 2-1a, 2-1b, 2-1c, 2-1d résument les diverses configurations expérimentales (solvant et laser) pour chaque molécule étudiée et les résultats importants apportés par l'étude sont précisés. Un descriptif poussé des résultats molécule par molécule est présenté dans l'annexe A1.

Tableau 2-1a : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser continu focalisé.

Molécule	Solvant	Continu	λ (nm)		Observations	Références
		Focalisé	1064			
Glycine	D ₂ O	•	•		Accroissement du taux de formation d'un polymorphe en fonction de l'énergie et suivant la polarisation.	[Sugiyama 2007], [Rungsimanon 2010a, 2010b], [Masuhara 2011], [Miura 2013], [Yuyama 2010a, 2010b, 2012b]
L - (+) - Alanine	H ₂ O	•	•		Rotation des cristaux dans un sens ou un autre en fonction de la polarisation du faisceau laser	[Yuyama 2013a]
L - (+) - Phénylalanine	D ₂ O H ₂ O	•	•			[Yuyama 2013a, 2013b]
Hen Egg White Lysozyme	D ₂ O	•	•			[Tu 2014], [Tsuboi 2007]

Tableau 2-1b : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser picoseconde.

Molécule	Solvant	Picoseconde	λ (nm)		Observations	Références
			1064	532		
Hen Egg White Lysozyme	H ₂ O et NaCl (pH=4,5)	•	•	•		[Lee 2008a]
F Lysozyme		•		•	Aucun effet de la polarisation	[Yennemar 2010]
Glucose dehydrogenase	PEG	•		•	Idem	[Yennemar 2010]
Sorbitol dehydrogenase	PEG	•		•	Idem	[Yennemar 2010]
Fructose dehydrogenase	PEG	•		•	Idem	[Yennemar 2010]
Myoglobine	H ₂ O	•		•	Idem	[Yennemar 2010]
Ribonuclease B	H ₂ O	•		•	Idem	[Yennemar 2010]

Tableau 2-1c : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser nanoseconde.

Molécule	Solvant	Nanoseconde		λ (nm)		Observations	Références
			Focalisé	1064	532		
Glycine	H ₂ O	•			•	Production d'un polymorphe particulier suivant la polarisation.	[Zaccaro 2001], [Garetz 2002], [Sun 2006]
Urée	H ₂ O	•			•		[Garetz 1996, 2002], [Matic 2005b],
L - (+) - Histidine	H ₂ O	•			•		[Sun 2008]
L - (+) - Alanine	H ₂ O	•		•		Possible formation d'un polymorphe P21 (seule structure connue P212121). Aucune confirmation ultérieure par publication.	[Matic 2005a]
DAST 4 - (Diméthylamino) - N - méthyl - 4 - stilbazolium Tosylate	Non précisé		•	•			[Tsunesada 2002]
Acide acétique	Aucun	•		•			[Ward 2012a]
KCl	H ₂ O et gel agarose	•			•	Effet de la teneur en gel sur la nucléation	[Duffus 2009]
	H ₂ O	•			•		[Alexander 2009], [Ward 2009, 2012b]
	H ₂ O		•		•	Nucléation induite dans un confinement électrodynamique	[Fang 2014]
KBr	H ₂ O	•			•		[Ward 2012b]
KNO ₃	H ₂ O		•		•	Etude de la cinétique de nucléation	[Jacob 2012]
KMnO ₄	H ₂ O		•		•		[Soare 2011]
NaClO ₃	Aucun	•		•			[Ward 2011]
(NH ₄) ₂ SO ₄	H ₂ O		•		•		[Soare 2011]
Hen Egg White Lysozyme	H ₂ O et NaCl (pH=4,5)	•		•	•		[Lee 2008a]
Bovine Pancreatine Tynine	H ₂ O, CaCl ₂	•		•	•		[Lee 2008a]

Tableau 2-1d : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser femtoseconde.

Molécule	Solvant	Femtoseconde	λ (nm)			Observations	Références
			Focalisé	800	780		
Glycine	D ₂ O	•	•			Influence de l'énergie sur le taux de nucléation.	[Miura 2013]
	H ₂ O	•	•				[Liu ^B 2013]
Urée	H ₂ O	•	•			L'énergie influence le temps d'induction de la nucléation. La concentration influence le taux de nucléation.	[Yoshikawa 2006a],
DAST	Methanol	•	•				[Hosokawa 2005]
Anthracène	Cyclohexane	•	•				[Nakamura 2007b]
Paracétamol	H ₂ O, gel agarose	•	•	•			[Nakayama 2013]
Hen Egg White Lysozyme	H ₂ O, NaCl (pH=4,5) et gel agarose	•	•	•		Effet de la distance zone de focalisation - gel sur le taux de nucléation. Effet de la concentration en gel sur le taux de nucléation	[Nakayama 2013], [Murai 2010]
	H ₂ O, NaCl (pH=4,5) et PEG 6000	•	•				[Nakamura 2007a]
	H ₂ O et NaCl (pH=4,5)	•		•	•	Effet du taux de répétition sur le nombre de cristaux produits. Pas d'effet de la longueur d'onde	[Adachi 2003], [Murai 2011]
F Lysozyme	H ₂ O et NaCl (pH=4,5)	•		•			[Yoshikawa 2009]
Glucose isomerase	H ₂ O, HCl (pH=4,5), CaCl ₂ et PEG	•		•			[Iefuji 2011]
	H ₂ O et PEG	•		•	•	Pas d'effet de la longueur d'onde	[Murai 2011]
Thaumatine	H ₂ O, ADA et gel agarose	•		•			[Yoshikawa 2009]
Acriflavine resistance proteine B	H ₂ O, PEG 6000 et gel agarose	•	•	•			[Nakayama 2013]

II-2) Bilan sur les molécules et les méthodes

II-2-1) Les méthodes d'induction de la nucléation

Le tableau 2-1 a montré qu'il y a un grand nombre de paramètres qui influencent la nucléation. Ils sont résumés dans le tableau 2-2. Il est cependant possible d'isoler quelques paramètres communs à toutes les molécules notamment sur l'usage des lasers. La figure en annexe A2 montre que certaines molécules ont été étudiées seulement avec un seul laser et d'autres comme la glycine et le HEWL l'ont été avec plusieurs lasers.

Paramètre	Influence	Références
Polarisation	Production d'un polymorphe particulier	[Sun ^A 2006]
Focalisation	Le site de nucléation	[Sugiyama 2012]
Taux de répétition	Nombre de cristaux	[Liu ^B 2013], [Adachi 2003]
	Taux de nucléation	[Adachi 2003]
	Propriété chimique de la solution	[Adachi 2003]
Domaine impulsional	Nombre de cristaux	[Miura 2013]
	Temps d'induction	[Yuyama 2012b], [Duffus 2009]
Ajout d'un gel	Taux de nucléation	[Alexander 2009], [Murai 2010]
	Site de nucléation	[Duffus 2009]
Energie	Taux de nucléation	[Liu ^B 2013], [Miura 2013]
	Accroissement du taux de formation d'un polymorphe	[Yuyama 2012b], [Masuhara 2011]
	Temps d'induction	[Miura 2013], [Yoshikawa 2006a]

Tableau 2-2 : Paramètres ayant une influence sur le résultat de la nucléation obtenu suite à une exposition au laser.

Les différents auteurs ont proposé divers mécanismes afin d'expliquer leurs résultats. Ces mécanismes semblent être communs aux types de laser employés. D'après les différentes publications et leurs auteurs, on peut distinguer quatre mécanismes répondant à la définition de *NPLIN* permettant d'obtenir des cristaux par induction laser :

- par effet Kerr [Matic 2005a],
- par la génération d'une onde de choc au sein de la solution par la focalisation d'un laser nanoseconde [Jacob 2012],

- par la formation d'une bulle de cavitation au sein de la solution. Cette méthode augmente la probabilité de nucléation mais pas la vitesse de nucléation, les cristaux se formant aléatoirement autour de la bulle de cavitation [Miura 2013],

- par la formation d'un cristal à l'interface air / solution grâce à la focalisation d'un laser continu dans l'infrarouge [Yuyama 2012b]. Un seul cristal est formé au point focal et il a été observé une redissolution dans certains cas une fois le laser éteint [Miura 2013]. Cette méthode offre la possibilité de contrôler spatialement la nucléation en stimulant la nucléation au point focal.

Les chercheurs japonais travaillent avec les lasers femtoseconde ou continus et l'équipe autour de Garetz comme celle autour d'Alexander travaillent avec des lasers nanoseconde. La focalisation est employée dans 100 % des cas avec des lasers continu et femtoseconde, 26 % avec des lasers nanoseconde. Les molécules organiques représentent 58 % des cibles expérimentales, les protéines 25 % et les inorganiques 17 %. Le tableau 2-3 résume le volume de publications par type de laser et la part des études impliquant une focalisation²⁵ (voir Annexe A3). L'énergie des impulsions nanoseconde est de 0,4 à 2 GW / cm² [Sun^A 2006] et de 60 TW / cm² pour les impulsions femtoseconde [Uwada 2012].

Type du laser	Volume de publication (%)	Part des études impliquant une focalisation (%)
laser continu	35,5	100
laser nanoseconde	40	26
laser picoseconde	4,2	0
Laser femtoseconde	20,3	100

Tableau 2-3 : résumé du volume de publication par type de laser et la part des études impliquant une focalisation.

L'étude du CO₂ a montré que dans le cas de la nucléation induite par laser nanoseconde des bulles pouvaient se former [Knott 2011a]. L'eau deutérée D₂O est très régulièrement utilisée et cela dès 1996 par les équipes japonaises [Hotta 1996] car l'élévation de température due à un laser continu focalisé est de 22-24 K/W dans H₂O et de 2 K/W dans D₂O [Tu 2014].

Le taux de répétition lors de l'usage des lasers femtoseconde a un effet sur le nombre de cristaux obtenus : plus il est élevé, plus le nombre de cristaux augmente comme cela a été montré dans le cas de l'urée [Adachi 2003]. De plus, le comportement de la glycine face à l'augmentation du taux de répétition montre deux choses : il existe un seuil en dessous duquel, aucune nucléation n'a été observée et, la morphologie des cristaux dépend du taux de nucléation avec la disparition de monocristaux au delà de 250 Hz [Liu^B 2013]. Ce paramètre n'a pas été étudié avec des lasers nanoseconde.

II-2-2) Bilan sur la méthode *NPLIN* utilisant un laser nanoseconde

La méthode *NPLIN* a été utilisée sur différentes molécules de différentes familles : composés organiques, inorganiques et protéines comme le résume le tableau 2-4. Parmi tous ces composés, seuls deux ont présenté un comportement intéressant vis-à-vis de la polarisation.

²⁵ Données calculées sur l'ensemble des publications de la thématique *NPLIN* telle que nous l'avons défini. Les publications sont antérieures au 1^{er} juillet 2014.

En effet, selon les travaux de Garetz [Sun^A 2006], il existe un intervalle de sursaturation de 145 % à 155 % à 17 °C pour une exposition à 532 nm dans lequel l'application de la polarisation circulaire permet d'obtenir le polymorphe α de la glycine et la polarisation linéaire permet d'obtenir le polymorphe γ de la glycine. La L - (+) - Histidine montre un comportement similaire mais moins marqué car les deux polymorphes sont obtenus avec une polarisation linéaire contre un seul avec une polarisation circulaire.

L'emploi de deux longueurs d'impulsion a montré que le paramètre pertinent pour quantifier l'efficacité de NPLIN est la densité de puissance (W/cm^2). La longueur de l'impulsion n'a pas d'incidence sur la fraction d'échantillons qui ont nucléé [Ward 2009]. La cristallisation du $NaClO_3$ soulève quelques interrogations sur le mode de formation du cristal. En effet, un effet mémoire semble guider la formation des énantiomères d et l de cette molécule [Ward 2011].

Dans les articles, la densité de puissance D est donnée en W/cm^2 . L'équation [2 - 1] donne la modalité de calcul de la densité de puissance où E est une donnée mesurée par un dispositif adéquat en J, S est la surface du faisceau déterminé expérimentalement et t est la durée de l'impulsion (donnée constructeur).

$$D = \frac{P}{S} = \frac{E}{S * t} [2 - 1]$$

Molécule	Cristallisations obtenues	Fenêtre de changement de polymorphe	Observations	Références
Glycine	532 nm et 1064 nm, L et C	OUI : formation du polymorphe α avec CP, du polymorphe γ avec LP à 17°C (532 nm) et 17°C - 24°C (1064 nm) pour une sursaturation entre 1,45 et 1,55.	Aucune	[Garetz 2002], [Sun ^A 2006]
L - (+) - Histidine	532 nm, L et C	OUI : formation du polymorphe A avec CP, du polymorphe A + B avec LP à 25°C pour une sursaturation entre 1,4 et 1,6	Aucune	[Sun ^A 2008]
Urée	532 nm et 1064 nm, L et C	Aucune	Aucune	[Garetz 1996], [Matic 2005a, 2005b]
Acide Acétique	1064 nm, L	Aucune	Aucune	[Ward 2012a]
BPT	532 nm et 1064, L	Aucune	Aucune	[Lee 2008b]
HEWL	532 nm et 1064, L	Aucune	Aucune	[Lee 2008b]
KCl	1064 nm, L et C	Aucune	Aucune	[Alexander 2009], [Dufus 2009], [Ward 2009, 2012b]
	532 nm, L	Aucune	Effet du confinement	[Fang 2014]
KBr	1064 nm, L et C	Aucune	Aucune	[Ward 2012b]
$NaClO_3$	1064 nm, L et C	Aucune	Effet mémoire stimulé	[Ward 2011]

Tableau 2-4 : Résumé des cibles de la méthode NPLIN utilisant un laser nanoseconde pulsé.

II-3) Etat de l'art des montages

Un état de l'art des montages employés pour l'étude de la nucléation induite par laser a été établi suivant plusieurs critères : les caractéristiques du laser (longueur d'impulsion, taux de répétition, longueur d'onde, énergie, durée d'impulsion), la finalité du faisceau (temps d'exposition, focalisation ou non), ainsi que le porte-échantillon (contrôle de la température, interface laser / solution, type de porte cellule) et le type de suivi de la nucléation et de caractérisation.

Cette étude rassemble les montages utilisés dans les 44 publications *NPLIN* dans 15 montages type numérotés M0 à M14 (Tableau 2-5) dont la variable de classement principal est l'interaction laser / solution mais aussi d'autres éléments comme la méthode de caractérisation *in situ* de la nucléation et les caractéristiques du laser.

Les interactions dépendent de plusieurs paramètres (volume du porte échantillon, présence d'additif comme le gel, technique de caractérisation, technique de suivi *in situ*). Deux groupes se distinguent : les volumes allant de 2 μL à 500 μL et ceux allant de 1 mL à 10 mL. Ces derniers nécessitent des porte-cellule plus gros tels que les tubes pyrex ou HPLC. Il y a dix configurations d'interface réparties sur deux familles (figure 2-2) :

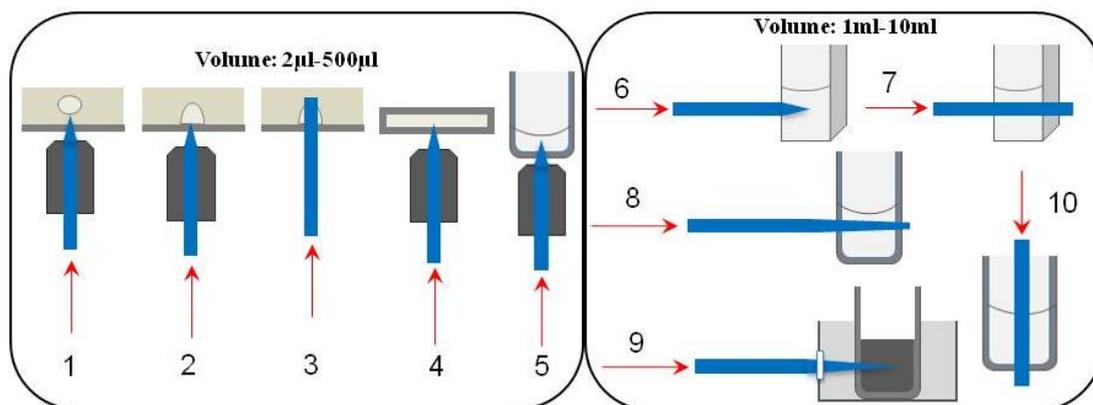


Figure 2-2 : Représentation schématique des différentes interactions faisceau laser - solution.

- configuration N°1 : Une goutte est déposée dans un gel sans contact avec l'interface, le faisceau est focalisé sur la goutte.
- configurations N°2 et 3 : Une goutte est déposée sur une interface. Le faisceau est focalisé sur la goutte (n°2) ou la goutte peut être simplement traversée par ce faisceau (n°3).
- configuration N°4 : Focalisation à travers l'une des faces d'un tube en quartz.
- configuration N°5 : Focalisation à travers la base d'un tube HPLC.
- configuration N°6 : Le faisceau est focalisé à travers une cellule de section carrée.
- configuration N°7 : Le faisceau passe à travers une cellule de section carrée.
- configuration N°8 : Le faisceau passe au travers de la face cylindrique d'un tube pyrex. Cela implique une focalisation.

- configuration N°9 : Le faisceau passe au travers de la face cylindrique d'un tube pyrex après une focalisation.

- configuration N°10 : Le faisceau passe à travers le haut d'un tube HPLC rencontrant le ménisque de l'interface air / solution.

Au-delà du type de laser utilisé et de la focalisation du faisceau ou non sur l'échantillon, il est intéressant de remarquer que, majoritairement, les équipes ont opté pour une zone d'observation et d'exposition commune, c'est-à-dire que l'observation s'effectue au même endroit que celui de l'échantillon sans déplacement de ce dernier. Parfois l'observation et l'exposition sont simultanées : un ensemble de miroirs et de filtres permet de protéger l'unité d'observation.

Le suivi optique est très important dans l'étude de la nucléation et va donner trois informations : le temps d'induction de la nucléation, la durée de la croissance et la localisation du site de nucléation. La plupart des groupes ont choisi des caméras ultra rapides pour suivre la nucléation. Seul un groupe a choisi d'étudier ce qui se passe *in situ* à une échelle bien plus petite que celle accessible par l'optique en mesurant l'évolution de la turbidité **[Jacob 2012]**.

La majorité des groupes ont opté pour des expériences à faible statistique, alors que la nucléation est un phénomène stochastique **[Izmailov 1999]**. Deux groupes ont employé le microbatch comme porte échantillon. Garetz pour l'étude des protéines HEWL et BPT **[Lee 2008a]** alors qu'il a par ailleurs utilisé les tubes pyrex et l'équipe Adachi lors de l'étude du HEWL **[Adachi 2003]**.

L'équipe étudiant *NPLIN* autour de Garetz a développé un montage original permettant la stimulation de la nucléation sans confinement de la solution par un tube **[Fang 2014]**. Le confinement est effectué par un dispositif électrodynamique **[Ehre 2011]**. Cette méthode appliquée au KCl permet d'induire la nucléation directement au sein d'une bulle de solution en lévitation électrodynamique (voir annexe A1, A1-10-2).

Montage	laser ^[1]	λ (nm)	Interface ^[2]	Observation <i>In situ</i> ^[3]	Observation <i>Ex situ</i>	Méthode de caractérisation ^[4]	Composé(s) étudié(s)	References
M0	P - ns - nfoc	532, 1064	8	SHG [Sun ^A 2006] CCD Caméra [Ward 2012a]		SHG [Sun ^A 2006] PXR [Zaccaro 2001], [Garetz 2002], [Sun ^A 2006, 2008],	Glycine, Urée, L histidine, Acide acétique	[Garetz 1996, 2002], [Zaccaro 2001], [Matic 2005a, 2005b], [Sun ^A 2006, 2008], [Knott 2011], [Ward 2012a]
M1	P - fs - foc	780, 800	2 - m	CCD Caméra [Nakamura 2007a], [Murai 2010], [Nakayama 2013]		SCXRD [Yennawar 2010] Fluorescence [Murai 2010]	Lysozyme, Ribonuclease B, Sorbitol dehydrogenase, Glucose dehydrogenase, Fructose dehydrogenase, Myoglobine, Paracetamole	[Adachi 2003], [Nakamura 2007a], [Murai 2010], [Yennawar 2010], [Nakayama 2013]
M2	P - fs - foc	800	9 - c - m			SCXRD	4-(diméthylamino)-N- méthyl-4-stilbazolium tosylate	[Tsunesada 2002], [Hosokawa 2005]
M3	P - fs - foc	800	4	CCD Caméra			Anthracene	[Nakamura 2007b]
M4	P - ns – nfoc P - ps - nfoc	532, 1064	3 - m	CCD Caméra			Lysozyme, Bovine Pancreas Trypsin	[Lee 2008b]
M5	P - fs - foc	780	2	CCD caméra			Lysozyme, Thaumatine	[Yoshikawa 2009]
M6	P - ns - nfoc	532, 1064	7		Photographie [Duffus 2009], [Ward 2012a], [Ward 2012b]		KCl, KBr	[Alexander 2009], [Duffus 2009], [Ward 2009, 2011, 2012b],
M7	CW - foc	1064	5	CCD caméra		FTIR [Yuyama 2012b]	Glycine, L alanine, L phenylalanine, Urée	[Rungsimanon 2010a, 2010b], [Yuyama 2010b, 2012b], [Yuyama 2012c], [Miura 2013], [Yuyama 2013a, 2013b]
M8	CW - foc	1064	2 - c	CCD Caméra		Morphologie [Tu 2014]	Glycine, Lysozyme	[Yuyama 2010a], [Tu 2014]
M9	P - fs - foc	780	1	CCD Caméra	Photographie	Morphologie	Glucose Isomerase	[Iefuji 2011]
M10	P - ns - foc	532	2	CCD Caméra			KMnO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄	[Soare 2011]

M11	CW - foc	1064	2	CCD Caméra Raman [Tsuboi 2007]	Photographie [Tsuboi 2007]	Fluorescence [Uwada 2012]	Glycine, Lysoyme	[Murai 2011], [Yuyama 2012a], [Uwada 2012], [Tsuboi 2007]
M12	P - ns - foc	532	7	Analyse de turbidité	Image AFM		KNO ₃	[Jacob 2012]
M13	P - fs - foc	800	5	CCD Caméra Photographie [Miura 2013]	Photographie [LiuB 2013]	PXRD, SCXRD [LiuB 2013]	Glycine	[Liu ^B 2013] [Miura 2013]
M14	P- ns - foc	532	1	Raman, laser IR			KCl	[Fang 2014]
ECP	P - ns - nfoc	532	10 - c - m	CCD Caméra	Photographie	Faciès, PXRD, SCXRD, Raman	Glycine, Carbamazepine, L histidine, D et L acide glutamique, Sulfathiazole	[Clair 2014] [Ikni 2014]

Tableau 2-5 : Tableau recensant l'ensemble des montages types employés dans les différentes publications des travaux NPLIN.

[1] : type de laser, P = pulsé, CW = continu, ns = nanoseconde, ps = picoseconde, fs = femtoseconde; foc = focalisation, nfoc = non focalisé. [2] : voir figure 2-2, m = multipuits, c = contrôle de température; [3] : SHG = Second Harmonic Generation; [4] : PXRD = Powder X-ray Diffraction, SCXRD = Single Crystal X-ray Diffraction, FTIR = Fast Transform Infrared Spectroscopy.

II-4) Les différents mécanismes hypothétiques associés à la nucléation induite par *NPLIN*

La description des différents résultats et des conditions dans lesquelles ils ont été obtenus a montré une pluralité d'effets observés parfois dans les mêmes conditions d'emploi du laser. Cette partie décrit l'état de l'art des mécanismes associés à *NPLIN*. Selon les auteurs, il y a trois mécanismes majeurs avec des variations : l'effet Kerr, la cavitation, le piégeage optique et sauts de concentration locale.

II-4-1) Théorie classique de la nucléation et effet Kerr induit par le laser

Dans le chapitre 1, nous avons introduit la barrière énergétique à franchir que doit passer le germe afin de croître [2 – 2]. La croissance du germe va continuer à condition que son rayon soit supérieur à sa valeur critique donnée par [2 – 3].

$$\Delta G_{\text{hom}} = -\frac{4\pi r^3}{3\Omega} kT \cdot \ln\beta + 4\pi r^2 \gamma \quad [2 - 2]$$

$$r^* = \frac{2\Omega\gamma}{kT \ln\beta} \quad [2 - 3]$$

Partant de là, Alexander et *al.* ont modélisé l'effet du laser sur la réduction du terme critique ([Alexander 2009], [Ward 2012b]). La modification de l'énergie libre est d'ordre volumique et tient compte de l'apport d'énergie du laser à un germe [2 – 4].

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3} kT (A \ln S + aE^2) + 4\pi r^2 \gamma \quad [2 - 4]$$

$$\text{Avec } \gamma = \frac{2}{6^{1/3}} kT \left(\frac{\rho_S N_A}{\pi M} \right)^{2/3} \ln \left(\frac{\rho_S}{w\rho_L} \right), \quad A = \frac{\rho_S RT}{M}, \quad aE^2 = \frac{3j_{\text{peak}} \varepsilon_L}{c} \left(\frac{\varepsilon_S - \varepsilon_L}{\varepsilon_S + 2\varepsilon_L} \right)$$

Le rayon critique est modifié de la manière suivante [2 – 5] :

$$r_c(E) = \frac{2\gamma}{A \ln S + aE^2} \quad [2 - 5]$$

Cette équation montre que le rayon critique est diminué par le champ électrique, ce qui favorise la nucléation par rapport à une situation sans champ.

II-4-2) Le mécanisme lié à la cavitation

Ce mécanisme a été proposé pour des lasers femtoseconde dont le faisceau est focalisé ([Sugiyama 2011], [Yoshikawa 2014]). En effet, la focalisation du faisceau entraîne un accroissement de l'énergie ouvrant à un processus d'absorption multiphotons (figure 2-3) excitant les molécules du solvant et du soluté. Ce phénomène non linéaire nécessite l'apport d'énergie suffisante pour faire franchir à un électron la barrière d'ionisation [Leyder 2013]. Cela entraîne une accumulation de chaleur et de pression créant un phénomène de cavitation par des bulles de vapeur formées par l'effet de focalisation. Ces bulles augmentent localement la sursaturation aboutissant à la cristallisation (figure 2-4).

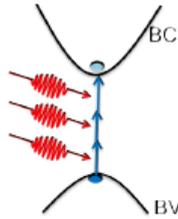


Figure 2-3 : Schéma explicitant le principe de l'absorption multiphotons [Leyder 2013].

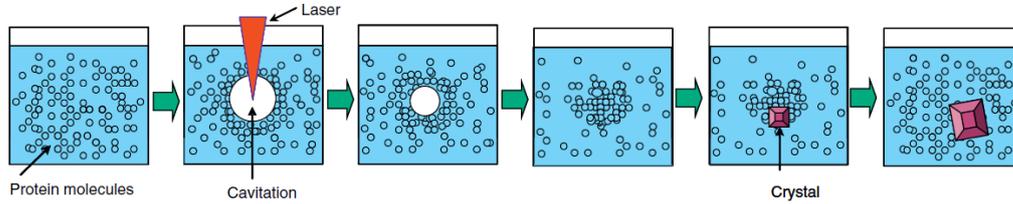


Figure 2-4 : Schéma explicitant le principe de la cavitation. Figure reprise de [Iefuji 2011].

II-4-3) Le mécanisme lié au piégeage optique

Le piégeage optique se fait grâce à la création d'un potentiel dans la zone irradiée. Cette méthode a été découverte en 1970 [Ashkin 1970] et appliquée par Masuhara sur les micelles démontrant ainsi l'application du piégeage optique aux micelles en provoquant leurs agrégations en solution ([Hotta 1996], [Hotta 1998]). Le piégeage optique provient de la pression de radiation et de la force de gradient (figure 2-5). La force est d'autant plus élevée que l'objet en solution est grand et polarisable ([Sugiyama 2011], [Usman 2013b]). Le piégeage peut être décrit par trois forces :

- Une force provenant des variations spatiales du champ électrique dite force de gradient [2 – 6] :

$$\vec{F}_{\text{grad}} = (\vec{P} \cdot \vec{\nabla}) \vec{E} + \alpha \mu_0 \partial_t \langle \vec{E} \times \vec{H} \rangle \quad [2 - 6]$$

- Une force due à la pression de radiation proportionnelle au vecteur de Poynting [2 – 7] :

$$\vec{F}_{\text{scatt}} = \left(\frac{n_m \sigma_p}{c} \right) \langle \vec{E} \times \vec{H} \rangle_t \quad [2 - 7]$$

- Une force temporelle [2 – 8] :

$$\vec{F}_{\text{temp}} = \mu_0 \partial_t \langle \vec{P} \times \vec{H} \rangle \quad [2 - 8]$$

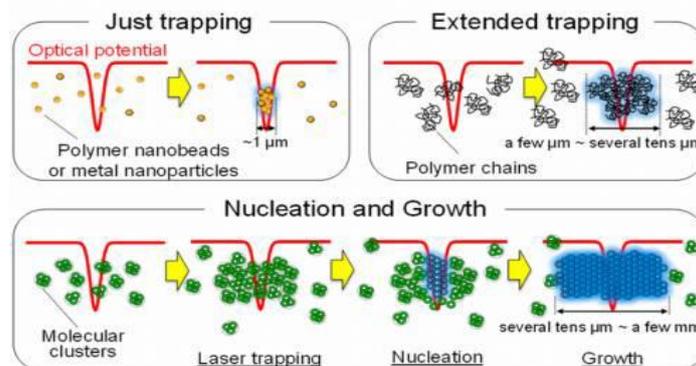


Figure 2-5 : Schéma explicitant le principe du piégeage optique. Figure reprise de [Sugiyama 2012].

Dans l'équation [2 – 6], la partie dépendante du temps est nulle dans le cadre des lasers continus. Pour un laser continu, l'énergie potentielle de piégeage est donnée par l'équation [2 – 9] dans le cas d'un faisceau continu polarisé linéairement, par l'équation [2 – 10] dans le cas d'un faisceau pulsé polarisé linéairement. Le champ E_x est donné par [2 – 11] dans le cas de laser continu et par [2 – 12] dans le cas des impulsions courtes.

$$U_{\text{trap}} = -n_m^2 \varepsilon_0 \alpha E_x^2 \quad [2 - 9]$$

$$U_{\text{trap}} = -\frac{1}{2} \alpha \{ (1 + K^2 \rho^2) |E_x|^2 - \check{\alpha} ([1 + K^2 \rho^2] |E_x|^2)^2 \} \quad [2 - 10]$$

$$E_x = E_0 \frac{i}{i + 2\mu} e^{i(\omega_0 t - kz - \frac{2\mu\varphi^2}{1+4\mu^2})} e^{-\frac{\varphi^2}{1+4\mu^2}} \quad [2 - 11]$$

$$E_x = E_0 \frac{i}{i + 2\mu} e^{i(\omega_0 t - kz - \frac{2\mu\varphi^2}{1+4\mu^2})} e^{-\frac{\varphi^2}{1+4\mu^2}} e^{-\frac{t^2}{\tau^2}} \quad [2 - 12]$$

$$\mu = \frac{z}{kw_0^2}, \rho = \frac{x}{w_0}, \varphi^2 = \left(\frac{x}{w_0}\right)^2 + \left(\frac{y}{w_0}\right)^2, \check{\alpha} = -\frac{3\chi^{(3)}}{4\chi^{(1)}}, K = \frac{2}{kw_0}$$

La modélisation complète a été effectuée par ([Usman 2012], [Chiang 2013], [Usman 2013b]) montrant l'évolution au cours du temps des trois forces principales.

II-4-4) Le mécanisme lié à l'hypothèse de l'effet Kerr

Garetz [Garetz 1996] propose comme hypothèse l'effet Kerr. Les travaux de l'équipe d'Alexander (voir annexe A1, A1-10-1) [Alexander 2009c] sur le chlorure de potassium en ont amélioré la compréhension.

L'hypothèse de Garetz se base sur l'effet Kerr : le champ électrique incident induit un moment dipolaire au sein du pré-« cluster » puis va interagir avec lui pour aligner l'axe de plus grande polarisabilité sur celui du champ. Le milieu devient biréfringent avec l'axe optique parallèle à la direction du champ appliqué. L'énergie d'interaction entre le champ du laser et le moment dipolaire est minimisée et cela réduit la contribution de l'entropie à l'énergie libre d'activation de la nucléation. La barrière énergétique pour enclencher le processus de nucléation est plus faible.

Dans les solutions, plusieurs « clusters » se font et se défont à chaque instant. Le champ électrique agit en organisant les « clusters » désordonnés facilitant l'agrégation des autres molécules pour obtenir la taille critique.

Alexander *et al.* ont affiné l'hypothèse de fonctionnement de *NPLIN* dans leur dernière publication sur le sujet [Alexander 2009c]. Comme expliqué dans la partie précédente, il y a deux mécanismes microscopiques :

- Pendant l'application du champ électrique, suffisamment de soluté est attiré pour former un « *cluster* » aboutissant sur son augmentation en taille jusqu'à atteindre la taille critique pour ne pas avoir de décroissance une fois le champ disparu.
- Le champ électrique induit un réarrangement structural dans un « *cluster* » en dessous de la taille critique. Ceci induit une transition d'un liquide à une phase cristalline.

L'hypothèse admise sur *NPLIN* : le champ induit le réarrangement structural d'un « *cluster* » sous-critique.

II-4-4-1) L'effet Kerr

L'effet Kerr a été mis en évidence en 1875 par le physicien écossais John Kerr. C'est un phénomène électro-optique qui fait que certains milieux peuvent devenir biréfringents sous l'action d'un champ électrique. Une molécule placée dans un champ électrique s'oriente en se plaçant parallèlement au champ. Cette orientation est due à un moment dipolaire induit par le champ lui-même ou par un moment permanent.

Une substance soumise à un champ électrique \vec{E} se comporte comme un cristal uniaxial et aura deux indices de réfraction, un ordinaire n_p et un extraordinaire n_n . Lors de la traversée du milieu (de longueur l) par une onde de longueur d'onde λ , le déphasage $\Delta\Phi$, l'épaisseur du milieu l et le champ électrique \vec{E} sont liés par la relation [2 – 13]. $K(\lambda, T)$ est la constante de Kerr du matériau.

$$\frac{\Delta\Phi}{2\pi} = \frac{l}{\lambda} (n_p - n_n) = K(\lambda, T)E^2 \quad [2 - 13]$$

Si un champ de la forme $\vec{E} = \vec{E}_0 + \vec{E}_\omega \cos(\omega t)$ est appliqué, plusieurs effets sont obtenus dont l'effet de lentille Kerr qui est une autofocalisation du faisceau. L'autofocalisation s'explique par la dépendance en fonction de l'intensité de l'indice de réfraction. L'indice de réfraction du matériau peut être modifié en fonction de l'intensité I de l'impulsion par l'expression suivante [2 – 14] [Leyder 2013] :

$$n = n_0 + n_1 I \quad [2 - 14]$$

L'intensité du faisceau est beaucoup plus élevée au centre qu'au bord pour un faisceau gaussien ainsi, le front d'onde va devenir progressivement plus courbé lors de sa propagation et engendrer une distorsion radiale agissant comme une lentille convergente (lentille Kerr). Il existe une puissance critique P_{cr} [Boyd 2008] appelée puissance critique qui lorsqu'elle est atteinte, provoque un effondrement catastrophique du faisceau prévisible (autofocalisation) et cela entraîne des effets critiques comme l'endommagement catastrophique du matériau [2 – 15] [Leyder 2013].

$$P_{cr} = \frac{\pi(0,61)^2 \lambda^2}{8 n_0 n_1} \quad [2 - 15]$$

II-4-4-2) La quantification de l'effet Kerr et ses implications

Nous avons explicité l'hypothèse de *NPLIN* à savoir un réarrangement structural d'un agrégat sous critique par le faisceau laser. Cette tendance à l'alignement entre en concurrence avec l'augmentation naturelle de l'entropie qui est due aux effets d'orientation aléatoires des molécules sous l'effet de la température [Sun^A 2006]. Il faut quantifier la probabilité d'avoir un alignement suivant une direction particulière qui est définie dans l'équation [2 – 16] [Matic 2005a]. Cette probabilité est aussi appelée paramètre d'ordre.

$$K_i = \langle a_i^2 \rangle = \langle \cos^2 \theta_i \rangle = \frac{\int_{\text{tout l'espace}} a_i^2 e^{-\frac{H}{kT}} d\Omega}{\int_{\text{tout l'espace}} e^{-\frac{H}{kT}} d\Omega} \quad [2 - 16]$$

L'indice *i* représente l'axe étudié dans le référentiel du laboratoire (*x,y,z*), *dΩ* la variation élémentaire d'angle solide et *H* l'Hamiltonien d'interaction [2 – 17] entre le champ électrique et la molécule ou le groupe de molécules représenté par son tenseur de polarisabilité α_m [2 – 18] qui est exprimé dans le repère de la molécule (*a,b,c*) avec *a*, axe de rotation. *C* et \tilde{C} sont (resp.) la matrice de passage du référentiel propre de la molécule au référentiel du laboratoire et sa transposée.

$$H = -\frac{1}{2} \vec{E} C \alpha_m \tilde{C} \vec{E} \quad [2 - 17]$$

$$\alpha_m = \begin{pmatrix} \alpha_a & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_b & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_b \end{pmatrix} \quad [2 - 18]$$

L'ensemble des calculs ont été faits par Jelena Matic dans l'appendice A de sa thèse [Matic 2005a]. Les résultats sont résumés dans le système d'équations [2 – 19], *e* est l'excentricité du faisceau et *E* l'intensité du champ électrique appliqué, $\Delta\alpha = \alpha_a - \alpha_b$. Les équations suivantes donnent les paramètres d'ordre dans le référentiel du laboratoire pour un faisceau polarisé elliptiquement dont le grand axe de l'ellipse suivant l'axe *x* pour un champ électrique se propage selon la direction *z*.

Lorsque $\alpha_a > \alpha_b$, le tenseur de polarisabilité est « *rodlike* » et l'ellipsoïde des paramètres d'ordre est prolate, pour $\alpha_a < \alpha_b$, le tenseur est « *disklike* » et l'ellipsoïde est oblate (voir figure 2-6). A noter la présence du rapport $\frac{\Delta\alpha E^2}{2kT}$ qui est le rapport entre l'énergie d'interaction et l'énergie due à la thermalisation.

$$\begin{cases} K_x^{EP} = \frac{1}{3} + \frac{\Delta\alpha E^2}{90kT} \left(\frac{2 - e^2}{1 + e^2} \right) \\ K_y^{EP} = \frac{1}{3} + \frac{\Delta\alpha E^2}{90kT} \left(\frac{2e^2 - 1}{1 + e^2} \right) \\ K_z^{EP} = \frac{1}{3} - \frac{\Delta\alpha E^2}{90kT} \end{cases} \quad [2 - 19]$$

Les paramètres d'ordres doivent satisfaire à la condition $K_x + K_y + K_z = 1$. Les résultats se résument dans le triangle de la figure 2-7.

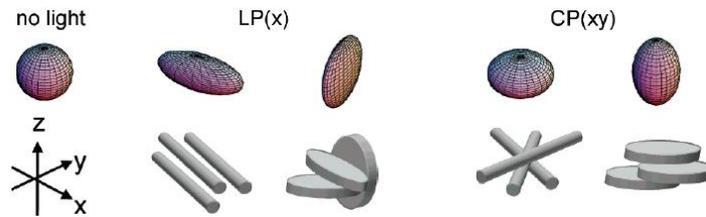


Figure 2-6 : Ellipsoïde des paramètres d'ordre pour différentes valeurs de $\Delta\alpha$ et suivant différentes polarisations. Le sens de propagation est suivant l'axe z, dans le premier cas, la polarisation est suivant l'axe x et dans le second est contenue dans le plan (xy). Les ellipsoïdes ont été calculés dans le cas $\frac{1}{2} \frac{\Delta\alpha E^2}{kT} = 5$. Les schémas en gris sont les structures cristallines théoriques obtenues suite à l'interaction soit de type « bâtonnet » (LP-gauche, CP-gauche), soit de type « feuillet » (LP-droite, CP-droite). Figure reprise de [Sun^A 2006].

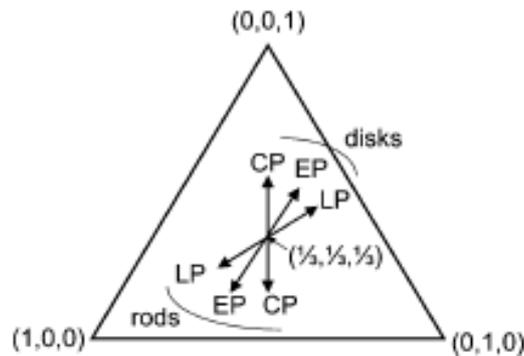


Figure 2-7 : Triangle des paramètres d'ordre montrant les valeurs que prend le trinombre (K_x, K_y, K_z) suivant la polarisation imposée et la forme du tenseur de polarisabilité. Le point central (centre de gravité du triangle, $(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3})$) correspond à une non exposition. Suivant la polarisation et la forme du tenseur, diverses combinaisons d'alignement vont se faire. Pour un tenseur « disklike » et une polarisation circulaire, $(K_x, K_y, K_z) = 1$ d'où $K_y = 1$ soit un alignement complet suivant l'axe y. Figure reprise de [Sun^A 2006].

II-4-4-3) Les limites de la théorie de l'effet Kerr

La première observation est l'impossibilité pour une molécule de glycine et son dipôle permanent de s'aligner sur le champ électrique : la fréquence du champ oscillant dans le visible est de l'ordre de 10^{14} Hz [Sear 2012]. Néanmoins, le champ électrique induit un dipôle μ_{ind} donné par l'équation [2 – 20] au sein de la molécule qui va interagir avec les molécules voisines. L'énergie d'interaction entre deux dipôles u_{ind} est donnée par la relation [2 – 21] :

$$\mu_{\text{ind}} = \alpha_p E \quad [2 - 20]$$

$$u_{\text{ind}} = \frac{\alpha_p^2 E^2}{4\pi\epsilon_0 r_d^3} \quad [2 - 21]$$

Sous champ électrique, l'interaction entre deux molécules de glycine distante de 1 nm est de 10^{-25} J ce qui correspond à 10^{-4} kT ce qui est très faible. Il faut donc un « cluster » de 100

molécules d'urée pour obtenir une énergie d'échange de l'ordre de kT [Sear 2012]. Basant son raisonnement sur la constante de diffusion de la glycine ($\sim 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), R. P. Sear conclut à l'impossibilité pour un ensemble de 100 molécules de glycine de passer outre la barrière de nucléation et de croître avant la fin de l'impulsion. Toutefois, les comportements de nucléation pourraient être compris par l'existence au sein de la nucléation de molécules hautement polarisables [Sear 2012].

Un début de vérification de l'hypothèse de Garetz a été effectué par Knott *et al* [Knott 2011b]. Le but principal de cette expérience numérique était de vérifier qu'un laser puisse induire une orientation dans une solution. L'étude montre que l'effet Kerr comme producteur de l'alignement n'est pas suffisant. En effet, l'énergie nécessaire pour un tel effet est de plusieurs ordres de grandeur supérieur à celle fournie par le laser.

De plus, le travail sur la molécule de CO_2 a montré la possibilité d'induire la formation de bulles dans des solutions sursaturées [Knott 2011a] exposé à un laser nanoseconde non focalisé et à trois longueurs d'onde : 1064 nm, 532 nm et 355 nm. En plus du travail sur le CO_2 , une expérience a été faite par la même équipe en associant de l'argon dissous dans une solution de glycine. Les bulles d'argon ont induit la cristallisation de la glycine ouvrant la voie éventuellement à l'existence de bulles comme intermédiaire de nucléation. La formation de bulles de très petites tailles pourraient être une hypothèse pour comprendre la nucléation mais pas forcément la sélection polymorphique rapportée par Garetz et ses collaborateurs suivant la polarisation [Sun^A 2006]. Les auteurs soulignent l'importance de se pencher sur la photochimie et le phénomène de cavitation à l'avenir.

Bilan

Ce chapitre a présenté un état de l'art exhaustif de la nucléation induite par laser mettant en avant les différents résultats obtenus et les méthodes. Ces résultats ont été obtenus sur différentes molécules allant du plus simple acide aminé aux grosses protéines.

Une définition élargie du sigle *NPLIN* a été proposée la faisant évoluer de la nucléation induite par laser nanoseconde à l'ensemble des nucléations non photochimiques et non secondaires, quel que soit le type de laser employé.

On peut distinguer quatre méthodes répondant à la définition de *NPLIN* permettant d'obtenir des cristaux par induction laser :

- par l'effet Kerr ou du moins, le mécanisme sous-jacent à l'emploi des lasers nanoseconde non focalisé.
- par la génération d'une onde de choc au sein de la solution par la focalisation d'un laser nanoseconde.
- par la formation d'une bulle de cavitation au sein de la solution. Cette méthode n'accélère pas la vitesse de nucléation et les cristaux se forment aléatoirement autour de la bulle de cavitation.
- par la formation d'un cristal à l'interface air / solution grâce à la focalisation d'un laser continu dans l'infrarouge. Un seul cristal est formé au point focal et il a été observé une redissolution dans certains cas, une fois le laser éteint.

Les paramètres influençant la cristallisation et les cristaux sont le domaine impulsionnel du laser (nanoseconde, femtoseconde ou continu), l'énergie, la focalisation, le taux de répétition, la polarisation, le solvant ou l'ajout d'un gel. La combinaison de ces facteurs permet de modifier le résultat de la cristallisation en agissant sur les éléments suivants : production d'un polymorphe particulier, le contrôle du site de nucléation, du nombre de cristaux, du taux de nucléation, du temps d'induction.

Chapitre 3 : Etat de l'art des molécules étudiées

Introduction

Ce chapitre présente une synthèse des différentes molécules étudiées dans ce travail, les différentes structures cristallines, les conditions de cristallisation, les données de solubilité et les différents faciès.

La solubilité est importante : le non respect ou la méconnaissance de la courbe compromet la préparation de la solution et l'interprétation du résultat expérimental. Dans les données de solubilité, deux sources sont à considérer : la littérature et les mesures expérimentales. Ce point justifie une importante étude bibliographique comme base de travail.

L'identification et la caractérisation des polymorphes se sont faits à partir des moyens du laboratoire : diffraction des rayons X, spectroscopie Raman, microscopie électronique. Le développement d'un moyen optique au sein de notre montage permet l'identification par faciès.

I/ Glycine

I-1) Intérêt de la molécule

La glycine ($\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$) est l'acide aminé non chiral le plus simple et le plus étudié (figure 3-1). En optique non linéaire, les acides aminés jouent un rôle crucial, la plupart d'entre eux présentent des propriétés optiques non linéaires issues des groupes NH_2 (donneur) et COOH (accepteur) et des transferts de charge possible. C'est le cas des molécules d'acide aspartique, glutamique, arginine, lysine, L-alanine et γ -glycine qui montrent des propriétés optiques non linéaires pour les raisons décrites ci-dessus.

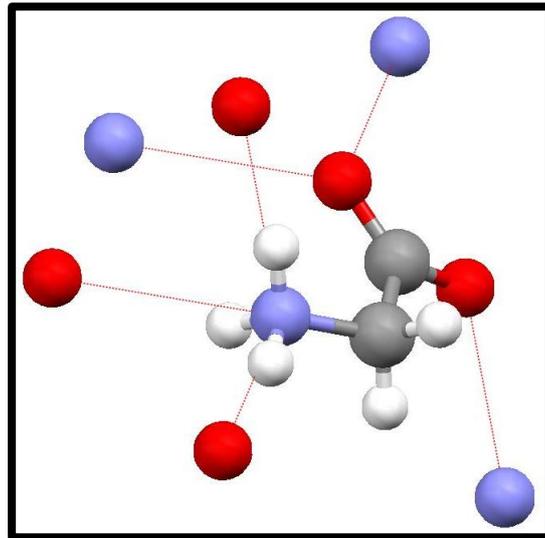


Figure 3-1 : Molécule de glycine. La figure montre les liaisons hydrogène (GLYCIN88, polymorphe α).

Dans le cadre de ce projet, la glycine est la première molécule à réagir à la polarisation incidente du faisceau du laser [Sun^A 2006]. Cette molécule présente un intérêt à être étudiée afin de mieux comprendre le phénomène de la cristallisation sélective des polymorphes par la polarisation. Un autre point associé à ce projet est l'application du contrôle du polymorphe à des médicaments dont fait partie la glycine.

En effet, la glycine est une molécule très utilisée dans l'industrie pharmaceutique puisqu'elle est présente dans 174 médicaments [Rabesiaka 2006]. Elle contribue à la synthèse d'une enzyme, le glutathion, qui possède des effets anti-âge et anti-dépendance, ainsi que des propriétés limitant le stress, la surexcitation et l'agressivité [Rabesiaka 2006]. Elle agit aussi comme un coagulant pour le glutamate sur le récepteur NMDA²⁶ (N-méthyl-D-aspartate).

²⁶ Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes activés dans des conditions physiologiques par le glutamate et la glycine¹ qui sont essentiels à la mémoire et à la plasticité synaptique. Ce sont les seuls récepteurs au glutamate à être spécifiquement activés par l'agoniste pharmacologique N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ils sont perméables aux cations monovalents (sodium, potassium) et au calcium. En raison de la perméabilité au sodium et au potassium, le potentiel de réversion des NMDAR est autour de 0 mV. L'entrée de calcium dans le neurone via les récepteurs de NMDA serait un mécanisme d'induction de la plasticité synaptique. Les récepteurs NMDA sont bloqués par l'ion magnésium qui occupe l'entrée du pore, et qui peut être libéré en cas d'inversion de potentiel électrochimique. La glycine et le glutamate sont nécessaires à l'activation des récepteurs NMDA.

Une étude ([Markel 2010], [Markel 2011]) montre l'efficacité du polymorphe γ de la glycine dans le traitement de psychopathologies comme la schizophrénie (contre le symptôme négatif), mais aussi contre l'anxiété, l'insomnie ou l'addiction à l'opium. Markel *et al.* [Markel 2011] montrent l'influence du polymorphe de la glycine en tant que médicament à une crise de catalepsie. La γ -glycine est plus efficace que le polymorphe α et, d'une manière générale, les rats traités avec la glycine ont une anxiété moindre [Markel 2011].

I-2) Polymorphes et stabilité

La molécule de glycine possède un dipôle et n'est pas optiquement active car elle ne possède pas de carbone asymétrique. Le point de fusion de la glycine est de 233°C mais la décomposition de la glycine commence dès 60 °C en jaunissant [El Bazi 2011].

La glycine possède six polymorphes : α , β , γ , δ , ε , ζ . Parmi ces polymorphes, trois sont connus depuis longtemps car ils se forment à température et pression ambiantes : α , β , γ . Le polymorphe α cristallise dans une structure centrosymétrique, non émettrice d'harmonique de seconde génération. Au contraire, le polymorphe γ cristallise dans une structure noncentrosymétrique et devient un candidat intéressant pour les applications d'optique non linéaire (le polymorphe β a une structure centrosymétrique).

Les structures cristallines des polymorphes α , β , γ ont été résolues par différents groupes. ([Ficher 1905], [Bernal 1931]²⁷, [Albrecht 1939], [Marsh 1958], [Iitaka 1958], [Iitaka 1960], [Iitaka 1961], [Perlovich 2001]). Récemment, pas moins de trois nouveaux polymorphes ont été découverts : les polymorphes δ , ε [Dawson 2011], ζ [Goryainov 2006]. Ces polymorphes ont été mis en évidence à haute pression par une transition de phase à partir du polymorphe γ . Jusqu'à 23 GPa, il n'y a aucune transition structurale du polymorphe α ([Boldyreva 2003a], [Murli 2003]). Cette absence de transition est aussi observée en fonction de la température ([Murli 2005], [Boldyreva 2005]). Toutefois, cela n'est pas le cas du polymorphe γ pour lequel les trois polymorphes sont obtenus à haute pression ([Boldyreva 2003b], [Goryainov 2006], [Dawson 2011]). En phase cristalline, la glycine est zwitterionique. L'ensemble des paramètres des polymorphes sont résumés dans le tableau 3-1.

La structure cristalline du polymorphe γ lui confère des propriétés attendues : la piézoélectricité et la pyroélectricité. Seule une forte et uniaxiale piézoélectricité a été

La perturbation par des substances ou des troubles psychologiques de ces récepteurs peut induire des effets dits dissociatifs, c'est-à-dire une déconnexion de certaines bases de la conscience, comme la conscience de soi ou de l'environnement. Les troubles associés sont la déréalisation et la dépersonnalisation. Cette expérience est extrêmement choquante pour les personnes qui la vivent, à tel point que certains hallucinogènes dit dissociatifs entraînent un syndrome post-hallucinoïde persistant, qui se traduit par un trouble de la dépersonnalisation, une impossibilité de retour à la réalité. Un traitement médicamenteux en urgence à base de tranquillisants et d'antidépresseurs est envisageable.

Source : http://fr.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9cepteur_NMDA repris *in extenso* et consulté le 21 mai 2014.

²⁷ Il est à préciser que le groupe d'espace rapporté par [Bernal 1931] dans le cadre de la β -glycine est faux ce qui n'a pas été sans poser de problème d'interprétation sur les propriétés de cette forme polymorphique [Matic 2005a].

clairement établie [Iitaka 1954]. Récemment, un travail a montré l'existence de ferroélectricté à l'échelle nanométrique ainsi que la possibilité de faire commuter le vecteur polarisation de la γ glycine au niveau nanométrique [Heredia 2012]. Enfin, une étude des propriétés diélectrique et piézoélectrique de la γ glycine est publiée et montre l'intérêt à l'utiliser pour des applications en optique non linéaire [Kumar 2011]. Plus inattendue, la glycine a montré un effet magnétoélectrique basé sur la dynamique de la chiralité du spin (N^+H) qui induit une polarisation et produit la pyroélectricté du polymorphe α à 304 K sous un champ magnétique de ∓ 1 T [Shen 2008].

Polymorphe	α	β	γ
CSD REFCODE	GLYCIN 88	GLYCIN 26	GLYCIN 66
Système cristallin	monoclinique	monoclinique	trigonale
Groupe d'espace	$P2_1/n$	$P2_1$	$P3_2$
a (Å)	5,104(1)	5,079(0)	6,862(0)
b (Å)	11,966(2)	6,192(0)	6,862(0)
c (Å)	5,462(1)	5,387(0)	5,428(0)
β (°)	111,790(3)	113,35(0)	90
Z	4	2	3

Tableau 3-1 : Tableau résumant les données cristallographiques à température et pression ambiantes.

Polymorphe α : Le polymorphe α , est composé d'une double couche antiparallèle liée par les liaisons hydrogène, de groupe d'espace centrosymétrique donc optiquement inactive. Les dipôles moléculaires dans chaque couche sont orientés dans la même direction correspondant à l'axe c, les dipôles dans les plans adjacents sont antiparallèles ressemblant en cela aux anti-ferroélectriques [Langan 2002]. L'unité élémentaire de construction du polymorphe α est une double couche d'un dimère cyclique lié par liaison hydrogène (deux molécules de glycine antiparallèle) [Yu 2002]. Les couches sont liées entre elles suivant l'axe b par les forces de Van der Waals.

Polymorphe β : Le polymorphe β est composé de couches de molécules liées par liaison hydrogène ressemblant fort au polymorphe α qui comme ce dernier s'empile suivant l'axe b. La ressemblance s'arrête car dans le polymorphe β , deux couches simples de molécule sont liées alors qu'avec le polymorphe α , deux couches sont liées pour former des doubles couches liées par les forces de Van der Waals.

Polymorphe γ : Le polymorphe γ se compose d'une structure hélicoïdale orientée droite ou gauche sous forme de chaîne liée par des liaisons hydrogènes s'agréant le long de l'axe c par des liaisons hydrogène. Le polymorphe γ est le plus polarisable avec ses molécules alignées suivant l'axe c suivi par le polymorphe β avec ses molécules alignées suivant l'axe b. La structure centrosymétrique du polymorphe α fait qu'il ne possède pas de polarisation rémanente [Allen 2002]. La figure 3-2 montre l'agencement cristallin des polymorphes α et γ .

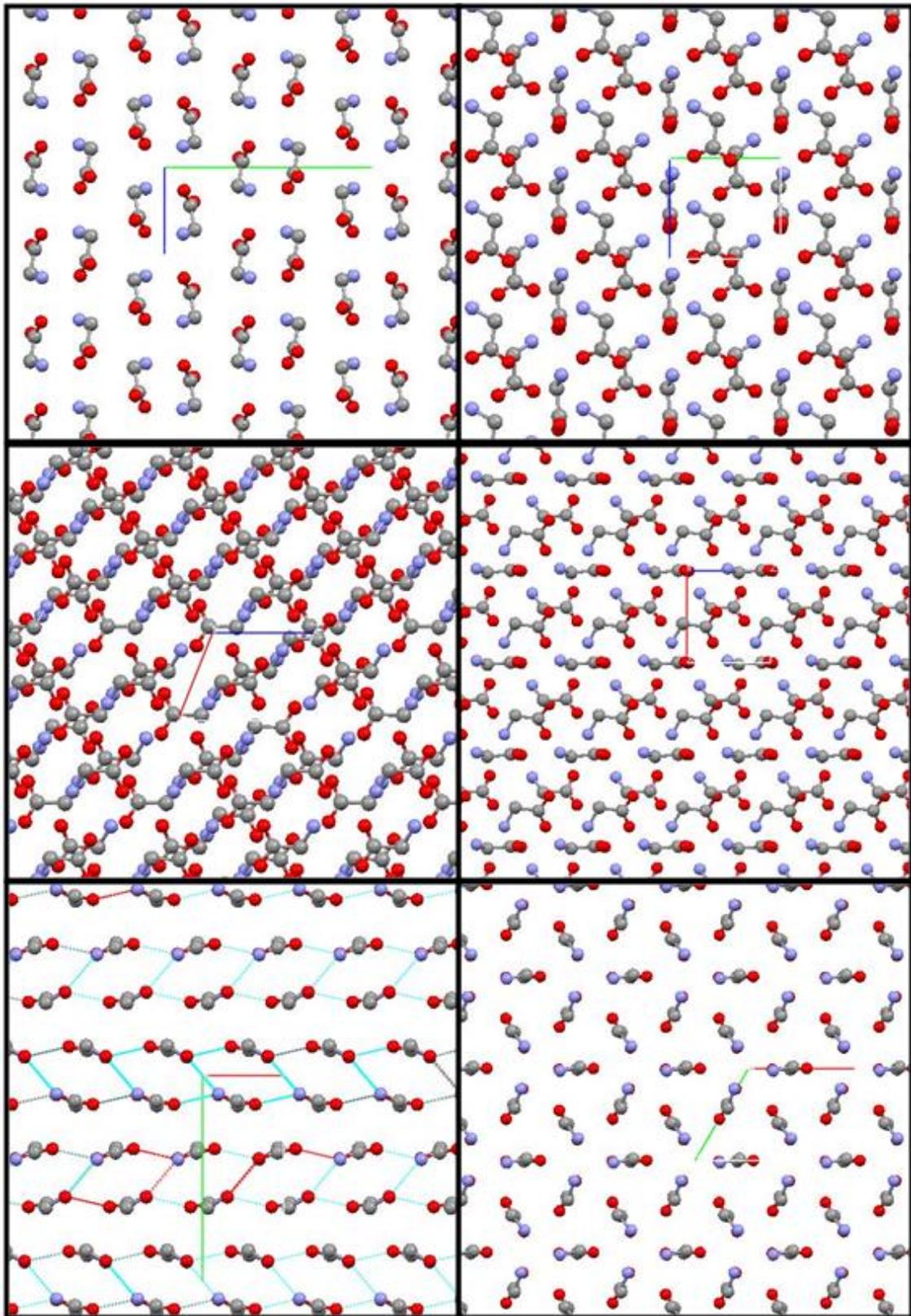


Figure 3-2 : Projection des polymorphes de la glycine selon les axes a , b et c . A gauche: polymorphe α (GLYCIN88). A droite : polymorphe γ (GLYCIN66).

I-3) Conditions de formation des polymorphes α , β , γ

La glycine est un système monotrope. A température ambiante, le polymorphe le plus stable est γ suivie du polymorphe α et du polymorphe β : $\gamma > \alpha > \beta$ [Boldyreva 2003c]. Cela implique que la transformation $\alpha \rightarrow \gamma$ est irréversible et la transformation $\gamma \rightarrow \alpha$ est interdite. Toutefois, l'ordre de stabilité s'inverse à partir d'une température située dans

l'intervalle [160 °C, 200 °C], au-delà des températures d'ébullition des solvants de cristallisation : $\alpha > \gamma > \beta$ ([Iitaka 1960], [Chongprasert 2001], [Perlovich 2001], [Park 2003], [Boldyreva 2003c], [Srinivasan^A 2008]). Une telle variation dans la température de transition peut venir de plusieurs facteurs comme : le traitement mécanique et thermique, les conditions de croissance ou encore la géométrie cristalline. De plus, [Destro 2000] a montré que le polymorphe α ne subit pas de transformation de phase de -250 °C à 18 °C.

Plusieurs études ([Bernal 1931], [Albrecht 1939], [Marsh 1958], [Boldyreva 2003c]) ont mis en avant la stabilité des polymorphes α et γ à température ambiante. Néanmoins, [Sakai 1992] a mis en évidence que 5 % des cristaux de glycine du polymorphe α se transforment sous 30 jours en polymorphe γ alors que 100 % se transforment sous 10 jours s'ils sont humides à un taux d'humidité de 70 %. Cette transition est plus rapide dans le D₂O en se produisant en moins de 24 h [Hughes 2009].

Bien que le polymorphe β soit le plus instable, il peut être conservé en conditions ambiantes dans un air sec [Drebushchak 2002] mais se transforme en polymorphe α dans un air humide [Iitaka 1960]. Une transformation en solution se produit du polymorphe β au polymorphe α ([Ferrari 2003], [Srinivasan^A 2008]) ou γ dans l'acide acétique ([Iitaka 1961], [Drebushchak 2002]).

Le broyage peut être un facteur de transition polymorphique. En effet, la transformation $\beta \rightarrow \alpha$ due au broyage a été observée [Iitaka 1961] ainsi que la transformation $\gamma \rightarrow \alpha$ [Perlovich 2001] bien que cette étude ne corrobore pas la première. Une étude plus poussée ([Boldyreva 2003c], [Drebushchak 2002]) a montré que le polymorphe β était stable au broyage allant du simple mortier à des dispositifs mécaniquement intenses à condition d'être sec ce qui n'est pas le cas pour des cristaux humides qui se transforment dans le polymorphe α . Le polymorphe α est stable au broyage comme le polymorphe γ qui peut se transformer en α lors d'une exposition à l'humidité lors du broyage ou lors d'un broyage autrement plus intense que celui manuel dans un mortier.

L'effet de l'humidité sur les transformations polymorphiques est connu depuis très longtemps ([Brautlecht 1923]). [Boldyreva 2003c] a démontré l'influence de la phase gazeuse sur la transformation polymorphique en exposant un polymorphe de départ à différents gaz.

Une transition structurale a lieu à haute pression à partir du polymorphe γ . Jusqu'à 23 GPa, aucune transition structurale n'a été induite sur le polymorphe α de la glycine ([Boldyreva 2003a], [Murli 2003]). Les trois autres formes cristallines sont produites à partir de différentes pressions δ , ε , ζ .

La cristallisation de la glycine et l'obtention d'un polymorphe particulier dépend très fortement du solvant. Comme expliqué au paragraphe précédent, le polymorphe γ de la glycine est le polymorphe le plus stable mais le polymorphe α est celui qui est le plus favorisé d'un point de vue cinétique.

Le polymorphe obtenu à température ambiante et aux concentrations utilisées et à pH neutre (6,2) est le polymorphe α . Il peut être obtenu par l'ajout d'additifs tels que des

amino-acides α qui interfèrent positivement en permettant de cristalliser le polymorphe α [Weissbuch 1994].

Le polymorphe β cristallise depuis des solutions aqueuses contenant de l'éthanol ([Iitaka 1959], [Iitaka 1960]), de l'acide acétique avec un ratio 5 pour 1 avec un refroidissement de 323 K à 288 K [Drebushchak 2002]. Le polymorphe β cristallise à partir d'une sublimation d'un polymorphe α ou γ [Liu^A 2008].

Le polymorphe γ cristallise depuis des solutions acides ou basiques à pH basique (>8) et acides (< 4) [Yu 2002]. Cela est aussi possible par évaporation lente, un lent refroidissement [Kunihisa 1974] ou encore en présence de D₂O [Iitaka 1961], [Kunihisa 1974]. Le polymorphe γ cristallise depuis des solutions contenant de l'acide acétique (à hauteur de 4 %), de l'acide sulfurique [Weissbuch 1994], NaCl [Srinivasan^A 2007], NaNO₃ [El Bazi 2011], KNO₃ [Srinivasan^A 2011].

I-4) Solubilité

En solution, la glycine est sous forme zwitterionique soit un ion bipolaire composé d'un anion COO⁻ et un cation NH₃⁺ [Ajimoto 1963].

La connaissance des courbes de solubilité des différents polymorphes ainsi que la limite de zone métastable est capitale pour appréhender le phénomène de nucléation induit par laser. La méthodologie que nous utilisons pour étudier la zone métastable sera abordée au chapitre 5. Un état de l'art sur le sujet a été effectué : plusieurs groupes ont étudié la solubilité de la glycine dans différentes conditions :

- H₂O en fonction de la température ([Dunn 1933], [Kunihisa 1974], [Jelinska-Kazimierczuk 1996], [Ramasami 2002], [Park 2003], [Srinivasan^A 2008], [Yang 2008], [Bonin-Paris 2011], [Yogambal 2014]),
- D₂O en fonction de la température [Jelinska-Kazimierczuk 1996],
- H₂O en fonction du pH à une température fixée ([Carta 1996], [Pradhan 1998], [Lu 2006], [Han 2012]),
- solvant organique à différentes fractions à une température fixée ([Lu 2006], [Bouchard 2007]),
- H₂O en fonction de la pression jusqu'à 400 MPa [Matsuo 2002].

Les deux dernières familles de courbes de solubilité n'ont pas été exploitées dans le cadre de ce travail. Les valeurs extraites de la littérature sont présentées sous forme de tableau en annexe B1. Toutes les équipes donnent la solubilité du polymorphe α (ou lorsque cela n'est pas précisé, par défaut c'est le polymorphe α qui a été considéré comme étudié). Si on écarte les mesures de Park [Park 2003], les données de solubilité sont contenues dans l'intervalle défini par [Dunn 1933] et [Yang 2008] soit une variation de 7,5 %. Dans son étude de 2008, Yang [Yang 2008] a aussi mesuré la solubilité du polymorphe γ . Ce résultat montre que le polymorphe γ est monotropique.

Plusieurs groupes se sont penchés sur la solubilité de la glycine dans H₂O à différentes températures en fonction de l'acidité. L'étude la plus complète est celle de [Han 2012] aboutissement d'une thèse du même auteur [Han 2007]. Dans cette étude, il a été démontré que l'usage d'une base ou d'un acide modifie la solubilité de la glycine par rapport à une autre base ou un autre acide dans des proportions allant jusqu'à 30 %. Il a été choisi de ne pas reporter tout ces résultats dans ce chapitre. Ces courbes de solubilité montrent deux choses : à température plus élevée, la solubilité est accrue. De même, la solubilité du polymorphe α reste plus élevée que celle du polymorphe γ .

Par ailleurs, la limite de zone métastable a été mesurée par [Bonin-Paris 2011] et [Yogambal 2014] en réduisant la température au cours du temps.

I-5) L'état d'équilibre en solution de la glycine

Les résultats expérimentaux obtenus par le groupe de Carlo Segre [Chattopadhyay 2005], [Erdemir 2007] tendent à montrer que la glycine existe majoritairement à l'état de dimères. L'étude a été faite en utilisant le dispositif SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) permettant d'étudier les échelles de longueur typique où se produit la nucléation. Ces résultats expliquent pourquoi il est plus facile d'obtenir le polymorphe α de la glycine. Celui-ci a une structure centrosymétrique en double couche maintenu par les liaisons hydrogènes entre les dimères cycliques. La prépondérance du polymorphe α dû à l'existence de dimères en solution (à hauteur de 87 %) est corroborée par l'obtention d'une prépondérance du polymorphe γ pour des solutions acidifiées pour lesquelles il y a une majorité de monomères. Ces résultats suggèrent un lien direct entre l'association des molécules au niveau moléculaire et la structure cristalline.

L'étude ci-dessus a apporté aussi aux débats des éléments supplémentaires allant dans le sens d'un mécanisme de nucléation en deux étapes (figure 3-3) : il y a dans un premier temps la formation d'une structure fractale volumique qui est la signature d'une agrégation, puis dans un second temps une évolution vers une structure fractale en surface ce qui traduit un ordonnancement au sein de la structure.

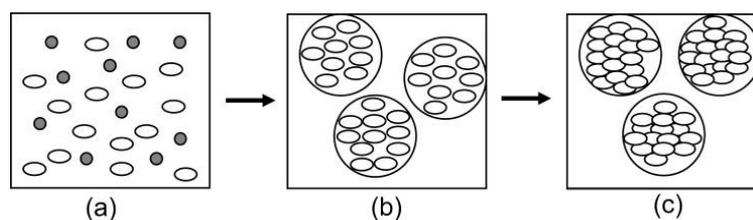


Figure 3-3 : Représentation schématique de la nucléation dans une solution sursaturée de glycine. (a) : solution composée de monomères (cercle noir) et de dimères (ellipse blanche). (b) : Formation de structure « liquid like » de dimères. La viscosité et la concentration sont plus élevées au sein de ces agrégats. (c) : Réorganisation structurale de ces « clusters ».

Figure reprise de [Chattopadhyay 2005].

Le groupe de Ruiz-Lopez a étudié les états d'ionisation et les conformations des dimères de glycine par des simulations basées sur des calculs de chimie quantique [Friant - Michel 2010]. Cette étude a considéré différentes situations d'interactions : neutre-neutre, zwitterion-zwitterion et neutre-zwitterion. Les conclusions de l'étude de Ruiz-Lopez sont déclinées suivant quatre axes :

- en phase gazeuse, la structure la plus stable est un dimère plan non ionisé avec les groupes COOH qui interagissent au travers des liaisons hydrogènes,
- en solution aqueuse, différents dimères ioniques sont stabilisés et possèdent une double ionisation,
- aucune forme ionique de type cation-anion n'a été trouvée,
- les calculs suggèrent une grande concentration de dimères dans les solutions aqueuses sursaturées de glycine,

Les recherches menées par le groupe de Yu [Huang 2008] tendent à montrer que la glycine existe principalement à l'état de monomères différents suivant le pH de la solution comme le montre la figure 3-4. Ces résultats sont confirmés par des modélisations numériques ([Yani 2012], [Chen 2010], [Cheong 2010]).

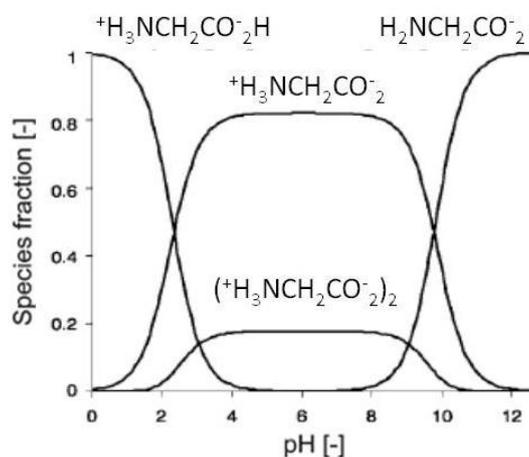


Figure 3-4 : Courbe des fractions molaires des espèces de la glycine en fonction du pH. La dépendance en pH de la glycine a été étudiée dans une solution aqueuse de 3,33 mol/kg d'eau (solubilité de la α glycine) à 25 °C. $pK_1 = 2,35$ (acide carboxylique); $pK_2 = 9,78$ (amine).
Figure reprise de [Huang 2008] et adaptée de [Daldrup 2011].

Toutefois, les résultats obtenus lors des études de SAXS et plus largement, le débat monomère / dimère est limité par l'emploi des techniques expérimentales qui se focalisent sur des points de mesure particuliers. En effet, les rayons X diffusés permettent de tester différentes zones et structures. La figure 3-5 montre les différents régimes de l'analyse par rayons X.

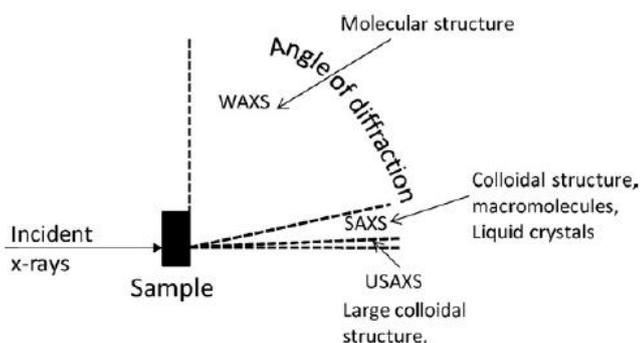


Figure 3-5 : Les différents régimes renvoyant aux structures sondés par les rayons X. Figure reprise de [Dong 2011].

L'emploi d'un certain outil de mesure ne permet de sonder qu'une zone restreinte. En effet, l'usage du SAXS sur des lignes de 30 kV n'a permis que d'étudier les petites structures sans pour autant permettre de conclure sur l'existence d'éventuelles grosses agrégations. Deux études, dont une effectuée par le groupe d'Alexander ayant produit plusieurs publications sur *NPLIN* ont démontré l'existence de « clusters » préexistants à la cristallisation dans le cas de l'urée [Ward 2013].

Une étude poussée faite sur la glycine [Jawor-Baczynska 2012] en combinant plusieurs méthodes telles que le SAXS, le NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) ou la DLS (*Dynamic Light Scattering*) ont montré l'existence d'une distribution d'agrégats de différentes tailles (figure 3-6) et que ces agrégats, pouvant aller jusqu'à 250 nm coexistent en solution sans pour autant initier la nucléation. Les auteurs montrent également que l'efficacité de la nucléation devient efficace quand la croissance commence à partir d'agrégats de 500 nm.

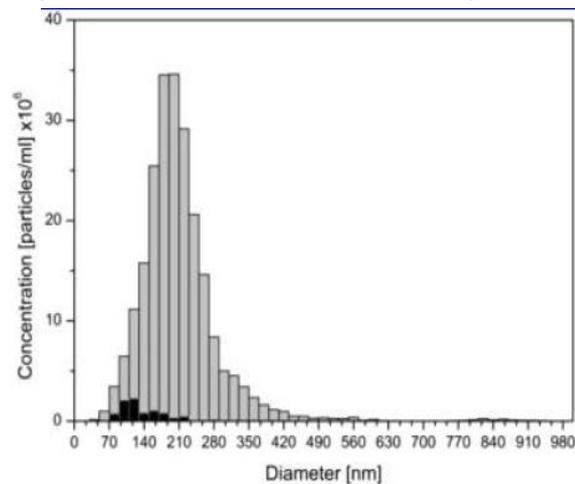
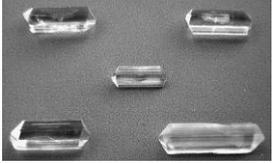
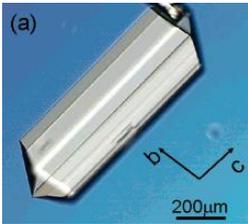
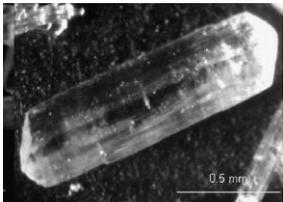
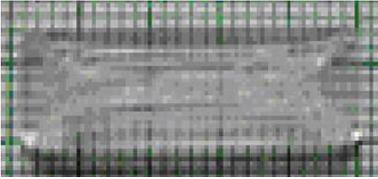
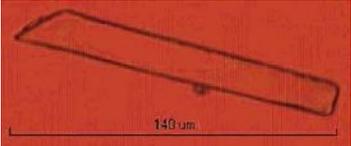
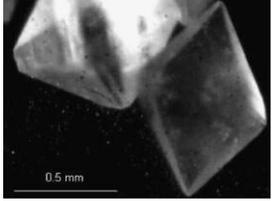


Figure 3-6 : Distribution des diamètres hydrodynamiques à 25 °C pour une solution de glycine d'une concentration de 270 mg/mL filtrée avec des filtres PTFE de 100 nm (histogrammes gris) et une solution d'eau filtrée dans les mêmes conditions (histogrammes noirs). Figure reprise de [Jawor-Baczynska 2012].

Cette étude bibliographique a montré l'importante probabilité pour la glycine et plus généralement pour des molécules la possibilité d'exister en solution sous forme de large agrégat moléculaire. L'existence de larges agrégats moléculaire en solution aurait pour incidence de modifier l'interprétation des résultats issus des expériences *NPLIN*. De plus, le vieillissement deviendrait un paramètre crucial dans ces expériences.

I-6) Faciès

Un même polymorphe peut présenter plusieurs faciès. La littérature fait état de différents faciès associés à un polymorphe pour des conditions différentes (tableau 3-2). Ces faciès sont obtenus par plusieurs groupes et sont donc reproductibles.

N°	Photo du faciès	Référence	Polymorphe	Condition de formation
a		[Srinivasan ^A 2007]	α	Solution aqueuse
b		[Poornachary 2007]	α	Solution aqueuse (pH = 6,3).
c		[Rabesiaka 2010]	α	Cristallisation semi continue d'une solution aqueuse
d		[Srinivasan ^B 2011]	α	Solution aqueuse, cristallisation obtenue par une évaporation lente.
e		[Sankar 2010]	α	Solution aqueuse
f		[Ferrari 2003]	β	Solution d'eau et d'éthanol.
g		[Rabesiaka 2010]	γ	Cristallisation discontinue d'une solution aqueuse

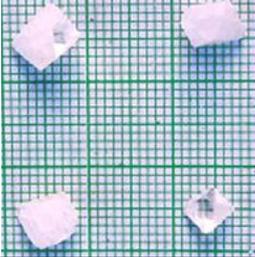
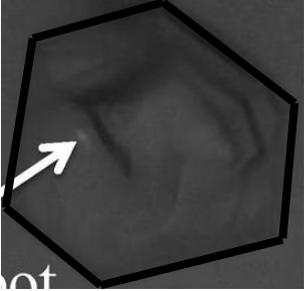
h		[Sankar 2010]	γ	Solution aqueuse
i		[Masuhara 2011]	Non spécifié	Cristallisation après une exposition de 60 s à un laser continue (0,8 – 1,4 W) de 1064 nm.

Tableau 3-2 : Résumé des différents faciès associés à un polymorphe obtenus dans différentes conditions. Les échelles n'étaient pas toutes fournies dans les publications.

I-7) Stratégie d'identification des polymorphes

Il est important de choisir une méthode d'identification rapide, éventuellement non destructive n'induisant pas une éventuelle transition de phase lors du broyage préliminaire à une identification par diffraction sur poudre.

I-7-1) Identification par spectroscopie Raman

Plusieurs travaux d'étude en spectroscopie Raman ont été publiés ([Baran 2005], [Murli 2005], [Surovtsev 2011], [Shi 2005], [Lee 2008b]). Les polymorphes α et γ possèdent des vibrations assez proches à l'exception de quelques modes propres notamment dans les basses énergies comme le montre le tableau 3-3.

Tableau 3-3 : Mode de vibration Raman des polymorphes α et γ de la glycine. Tableau repris de [Shi 2005].

α - glycine (cm^{-1})	γ - glycine (cm^{-1})	Attribution
	41	Interactions non covalentes
52		
74		
	91	
110		
	154	
163		
180		
198		
356	358	CCN courbure
491		NH ₃ torsion
510	507	CO ₂ rotation
602	612	CO ₂ balancement
694	686	CO ₂ courbure
894	896	C-C élongation
1035	1036	C-N élongation
1108		
1133	1141	NH ₃ rotation
1329	1336	CO ₂ élongation symétrique
1409	1401	CH ₂ courbure
1446	1450	CH ₂ déformation angulaire
1574		NH ₃ déformation angulaire
1673		CO ₂ asymétrique
2976	2962	CH ₂ combinaison symétrique
3008	3002	CH ₂ asymétrique
3150		N-H élongation

I-7-2) Diffraction à Rayons X

La diffraction par rayons X a été utilisée à la fois sur poudre et sur monocristal. La figure 3-7 montre les diffractogrammes poudre des polymorphes α et γ .

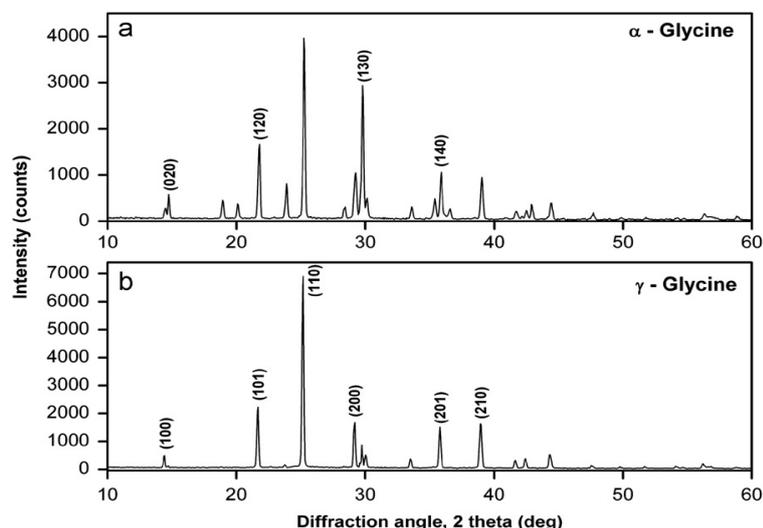


Figure 3-7 : (a) Diffractogramme du polymorphe, α (b) Diffractogramme du polymorphe γ de la glycine avec indexation des plans diffractants. Figure reprise de [Sankar 2010].

II/ Histidine

II-1) Intérêt de la molécule

La molécule d'histidine ($C_6N_3O_2H_9$) est une molécule chirale [True 2011] (figure 3-8). Elle a été étudiée sous champ laser : une réponse lors de l'exposition en fonction de la polarisation circulaire ou linéaire a été montrée. Le polymorphe A est majoritairement formé à plus de 70 % avec la polarisation circulaire et la polarisation linéaire permet la formation de ce même polymorphe à 50 %; dans les autres situations, les deux polymorphes sont obtenus simultanément [Sun^A 2008].

II-2) Polymorphes et stabilité

Le L - (+) - Histidine possède deux polymorphes : le polymorphe A qui est orthorhombique [Madden 1972b] et le polymorphe B qui est monoclinique [Madden 1972a] (tableau 3-4). Les deux polymorphes sont monotropiques et le polymorphe A est le plus stable aux conditions de température et de pression ambiantes [Roelands 2006].

Polymorphe	A	B
CSD REFCODE	LHISTD10	LHISTD04
Système cristallin	orthorhombique	monoclinique
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$	$P2_1$
a (Å)	5,177(5)	5,166(6)
b (Å)	7,322(7)	7,385(5)
c (Å)	18,87(20)	9,465(4)
β (°)	$(\alpha = \gamma = \beta) 90^\circ$	98,16(5)
Z	4	2

Tableau 3-4 : Tableau résumant les données cristallographiques des deux polymorphes du L-(+)-Histidine.

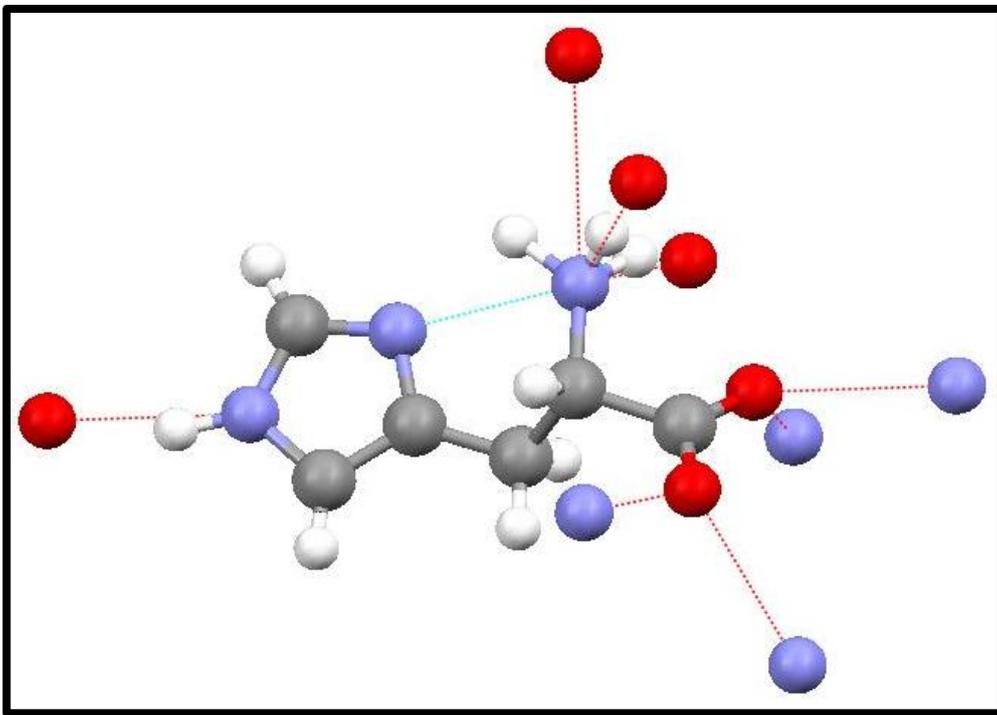


Figure 3-8 : Molécule de L - (+) - histidine. La figure montre les liaisons hydrogène (LHISTD04, polymorphe B).

En solution, il existe une transition de phase du polymorphe B vers le polymorphe A. En solution aqueuse, les deux polymorphes se forment. Cela est attribué à la proximité des deux polymorphes [Sun^A 2008]. Cela implique des vitesses de nucléation très proches [Roelands 2006]. La figure 3-9 montre l'empilement des deux polymorphes suivant les axes a, b et c.

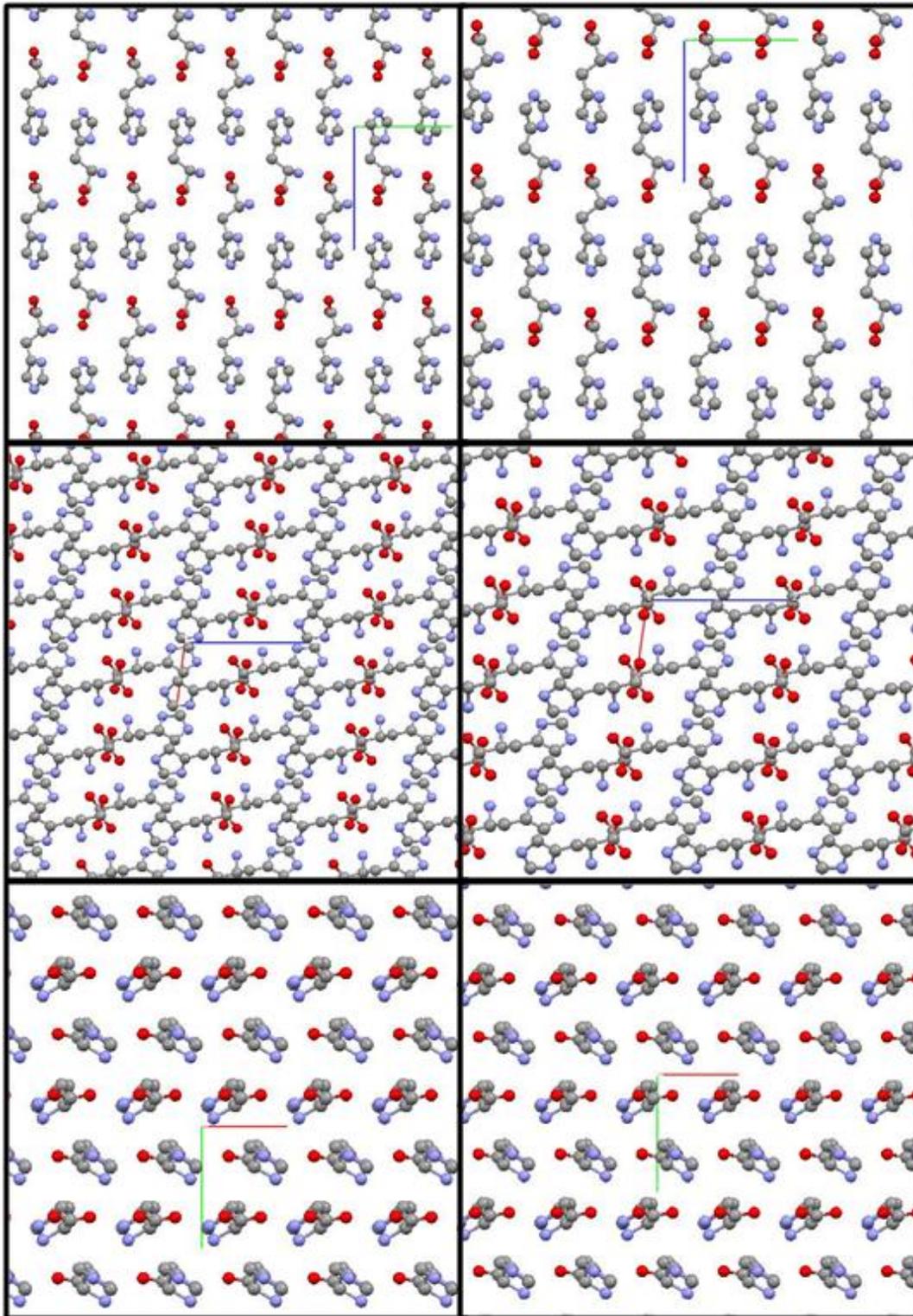


Figure 3-9 : Projection des polymorphes de l'histidine selon les axes a, b et c. A gauche: polymorphe A (LHISTD10). A droite : polymorphe B (LHISTD04).

II-3) Solubilité

Un seul article traite de la solubilité des deux polymorphes du L - (+) - Histidine dans H₂O : [Kitamura^A 1993], un autre groupe a publié les données de la solubilité du polymorphe A [Kustov 2006]. Les données de solubilité venant de [Kitamura^A 1993] sont disponibles en

annexe C2. Des points de solubilité avec différentes fractions d'éthanol ont été mesurés par [Roelands 2006] et [Kitamura^A 2003].

II-4) Stratégie d'identification des polymorphes

Les spectres Raman des polymorphes A et B sont similaires, ce qui complique une identification par cette méthode [Jiang 2009]. Cette situation est la même pour la diffraction X [Kitamura^A 1993]. Malheureusement, les faciès des deux polymorphes sont très proches ce qui empêche aussi une identification visuelle [Kitamura^A 1993].

III/ Acide glutamique

III-1) Intérêt de la molécule

L'acide glutamique (figure 3-10) est une molécule chirale [Svang-Ariyaskul 2009] dont l'énantiomère L, le plus facile à synthétiser, possède deux polymorphes [Wu 2010]. L'acide glutamique est un élément nécessaire pour synthétiser le sucre et les graisses et pour aider le transport du potassium à travers la barrière sang / cerveau [Smith 2000]. En plus des fonctions coporelles, l'acide glutamique est utilisé comme additif alimentaire (codes E620 - 629) [Smith 2000], dans le traitement contre les ulcères [Tsai 2005], l'hypoglycémie [Gomez 1961], l'épilepsie et les maladies neurologiques comme la maladie de Parkinson ([Lloyd 1973], [Isacson 2008]).

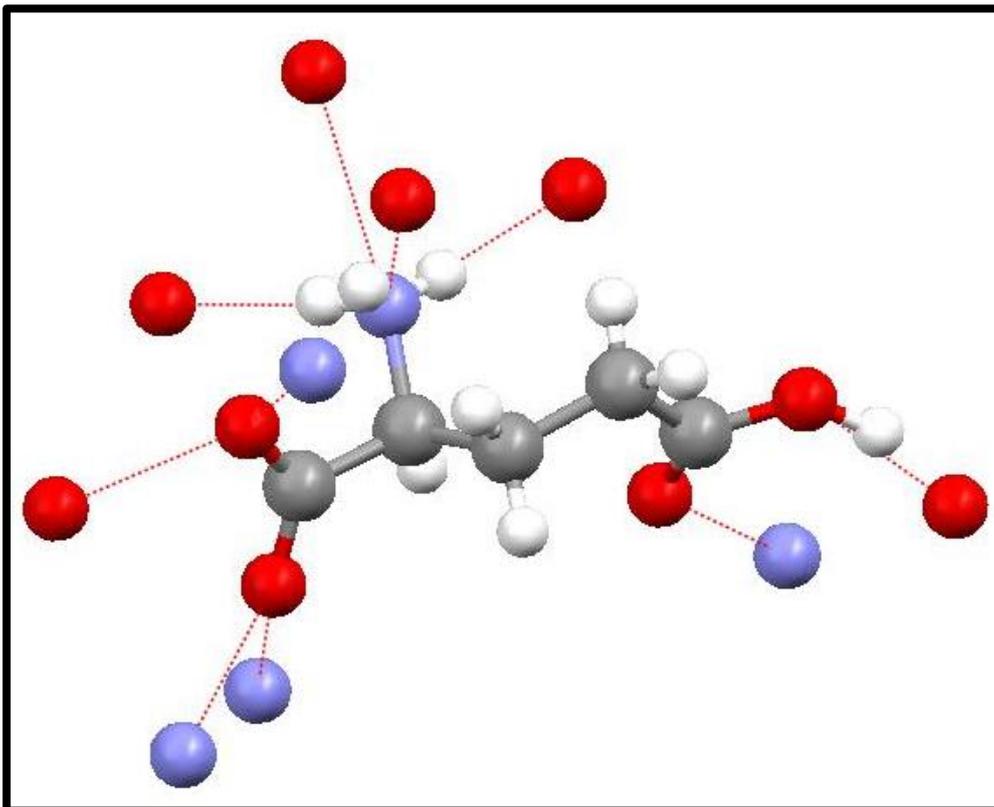


Figure 3-10 : Molécule de L - (+) - acide glutamique. La figure montre les liaisons hydrogène (LGLUAC01, polymorphe B).

La chiralité offre la possibilité de tester la cristallisation d'un énantiomère par rapport à l'autre dans un mélange racémique comme cela a été fait par d'autres méthodes ([Yokota 2006], [Svang-Ariyaskul 2009]). L'acide L glutamique offre une zone d'existence stable de la forme A ($T < 9\text{ }^{\circ}\text{C}$) et une zone d'existence stable de la forme B ($T > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) comme le montre la figure 3-11 [Srinivasan^A 2011]. Un tel comportement de zones d'existence des formes polymorphiques a été relevé pour le paracétamol en fonction de la sursaturation [Sudha 2014].

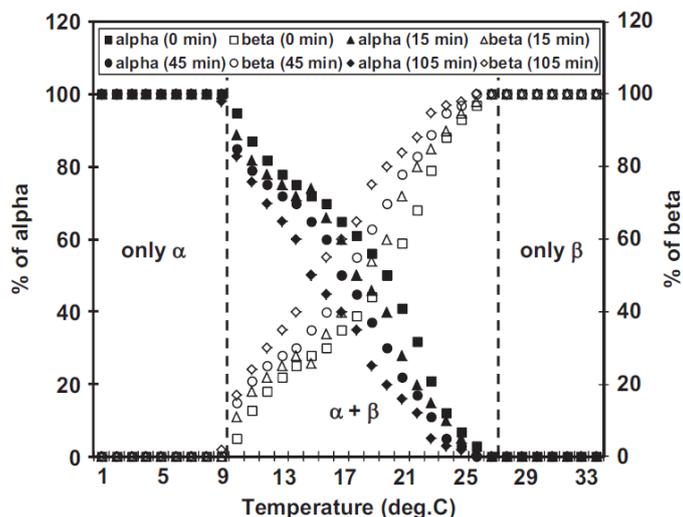


Figure 3-11 : Evolution du taux de formation des formes A (α) et B (β) du L - acide glutamique en fonction de la température. Figure reprise de [Srinivasan^A 2011].

III-2) Polymorphes et stabilité

Le L acide glutamique est un système dimorphique possédant deux polymorphes : le polymorphe A (appelé aussi α) et le polymorphe B (appelé aussi β) (voir tableau 3-5). Le polymorphe A est métastable alors que le polymorphe B est stable [Wu 2010]. Les deux polymorphes sont orthorhombiques et appartiennent au même groupe d'espace $P2_12_12_1$. Le polymorphe A a été étudié par [Lehmann 1980], et le polymorphe B par [Lehmann 1972] et d'autres groupes [Hirayama 1980]. Dans les polymorphes A et B, les molécules sont des conformères ce qui implique un polymorphisme de conformation [Wu 2010], la figure 3-12 montre l'empilement des molécules.

Polymorphe	A	B
CSD REFCODE	LGLUAC 03	LGLUAC 01
Système cristallin	orthorhombique	orthorhombique
Groupe d'espace	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
a (Å)	10,282(10)	5,154(1)
b (Å)	8,779(8)	6,942(1)
c (Å)	7,068(7)	17,274(3)
β (°)	($\alpha = \gamma = \beta$) 90°	($\alpha = \gamma = \beta$) 90°
Z	8	8

Tableau 3-5 : Tableau résumant les données cristallographiques des deux polymorphes du L-(+)-acide glutamique.

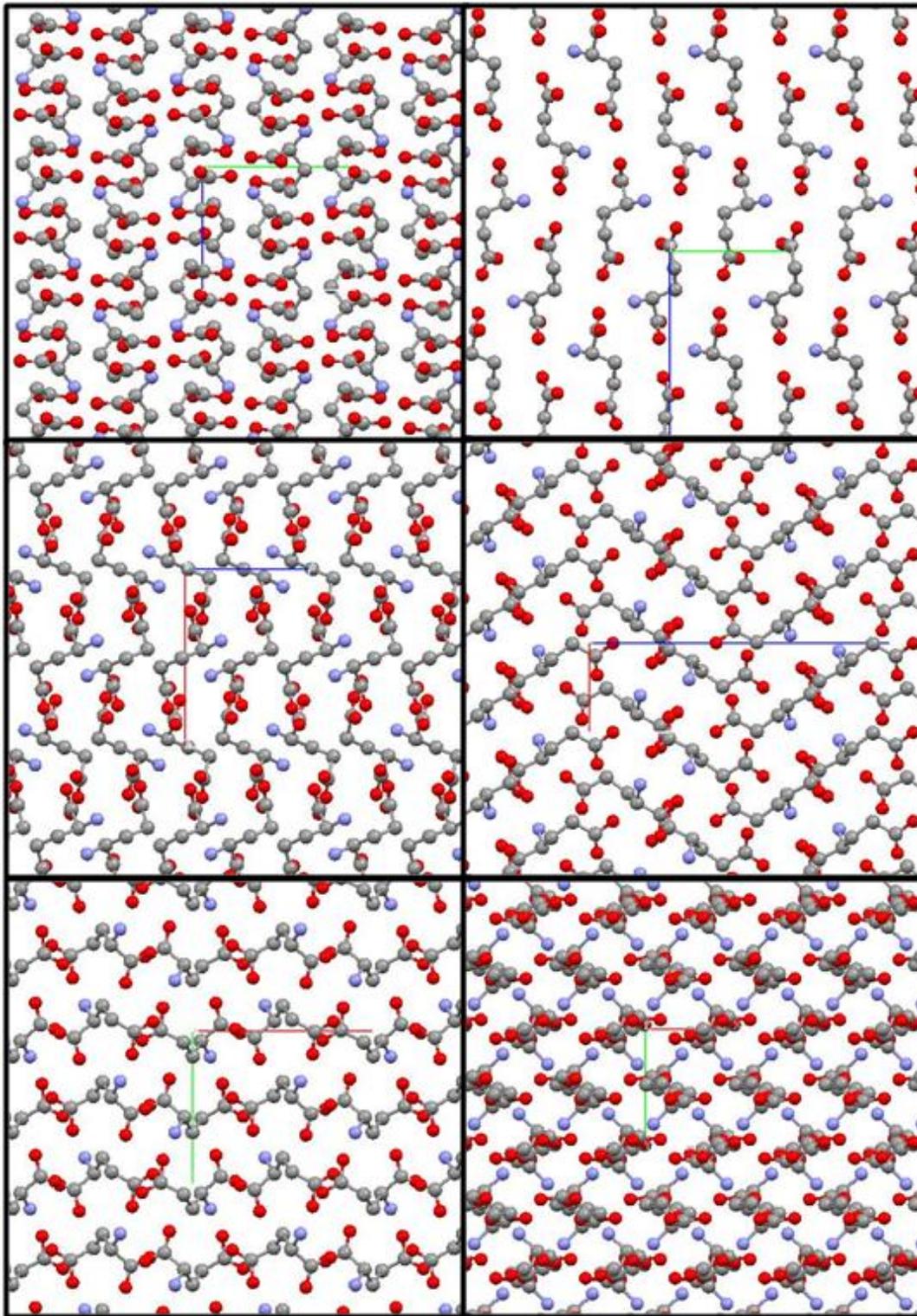


Figure 3-12 : Projection des polymorphes de l'acide glutamique selon les axes *a*, *b* et *c*. A gauche: polymorphe A (LGLUAC03). A droite : polymorphe B (LGLUAC01).

III-3) Conditions de formation des polymorphes A et B

En solution, l'acide glutamique existe à l'état de zwitterion ([Molliet 2008], [Kirk-Othmer 1991]). Le comportement en solution de l'acide glutamique a été étudié en détail par [Molliet 2008].

Les cristaux du polymorphe A sont formés à partir de solution aqueuse de pH = 3,2 ([Kitamura^A 1989], [Garti 1997], [Cashell 2004]), par un lent refroidissement de 70 °C à 20 °C

([Kitamura^A 1989], [Cashell 2004]) ou en utilisant une modification du pH qui consiste à ajouter de l'acide hydrochlorique à une solution glutamate monosodium [Schöll 2006b].

Les cristaux du polymorphe B sont formés à partir de la transformation du polymorphe A vers le polymorphe B par un refroidissement rapide de 80 °C à 45 °C après une attente à 45°C [Ferrari 2004]. Le polymorphe B étant le plus stable, ce phénomène est en accord avec la loi d'Ostwald [Cashell 2004]. Une importante sursaturation à 45 °C permet la formation exclusive de la forme B.

Enfin, les travaux de [Srinivasan^A 2011] (figure 3-9) montre l'influence de la température : entre 1 °C et 9 °C la formation du polymorphe A est favorisée alors que celle du polymorphe B est favorisée dans la gamme 27 °C – 34 °C. Ainsi, les basses sursaturations favorisent le polymorphe B et les hautes sursaturations favorisent le polymorphe A (la température de départ du refroidissement est de 40 °C où le système est à saturation). Les sursaturations sont générées par la réduction de température.

Il existe une transition de phase en solution du polymorphe A au polymorphe B ([Kitamura^A 1989], [Ferrari 2004], [Dharmayat 2006], [Schöll 2006]). Les cristaux du polymorphe A sont métastable mais lorsqu'ils sont séparés de la solution et séchés, ils ne subissent pas de transition de phase vers le polymorphe B et peuvent être conservés indéfiniment ([Kitamura^A 1989], [Davey 1997], [Ono 2004]). Enfin, les additifs ont un effet sur le polymorphe obtenu ([Molliet 2008], [Cashell 2004]) ainsi que ceux de la température sur les transitions de phase de A vers B ou de B vers A et sur la décomposition des formes cristallines [Wu 2010].

III-4) Solubilité

La solubilité des polymorphes A et B du L-(+)- acide glutamique a été étudiée par plusieurs groupes en solution aqueuse ([Kitamura^A 1989], [Manzurola 2002], [Schöll 2006a], [Lindenberg 2009], [Srinivasan^A 2011], [Mo 2011a], [Mo 2011b]), en fonction du pH à 25°C et 35°C pour le polymorphe B [Mo 2011a], en solution aqueuse contenant différente fraction d'éthanol, de 1-propanol ou d'acétone [Mo 2011b], dans le DMSO, le méthanol, l'éthanol, le 1-propanol, l'acétone et l'acide formique pour la forme A [Long 2011]. L'effet de certains additifs sur la solubilité des polymorphes A et B a été étudié [Mo 2011a]. Certaines des solubilités en solution aqueuse pour les polymorphe A et B ont été relevées et sont disponibles en Annexe B3.

Les solubilités aqueuses sont cohérentes entre les différents auteurs ([Sakata 1961], [Mo 2011a], [Mo 2011b], [Manzurola 2002], [Schöll 2006a]). L'intervalle d'erreur entre les courbes de solubilité du polymorphe A est de 1,8 % à 20 °C et de 3,6 % à 50 °C et pour le polymorphe B de 4,4 % à 20 °C et de 6,9 % à 50 °C. Les courbes de [Kitamura^A 1989] sont au-dessus des autres courbes avec une différence relative par rapport à [Schöll 2006a] de 23 % à 45 °C pour le polymorphe A et de 25,7 % à 45 °C pour le polymorphe B.

Les solubilités du DL acide glutamique et D-(-)-acide glutamique ont été établies par [Dunn 1933] et [Dalton 1933]. Les solubilités du D et L sont identiques ce qui ne constitue pas une surprise.

III-5) Faciès

L'acide glutamique a deux polymorphes possédant deux faciès bien identifiés autorisant une identification visuelle aisée (tableau 3-6). Le polymorphe A a un faciès le rapprochant d'un losange alors que le polymorphe B croît sous forme d'aiguille ([Srinivasan^A 2011], [Kitamura^A 1989], [Garti 1997], [Davey 1997], [Schöll 2006a]). Il a été montré une influence des additifs sur la forme du faciès ([Cashell 2004], [Dhanasekaran 2013]).

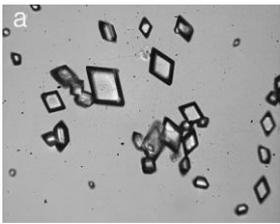
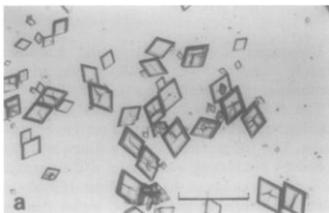
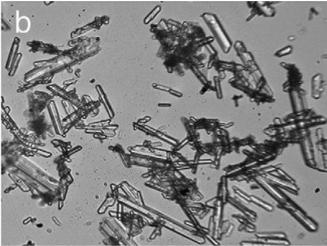
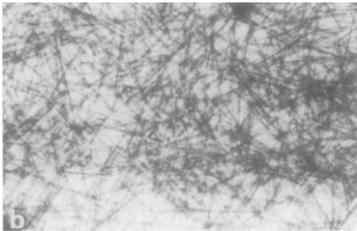
Photo du faciès	Référence	Polymorphe	Condition de formation
	[Srinivasan ^A 2011]	A	Solution aqueuse à T < 9°C
	[Kitamura ^A 1989]	A	Solution aqueuse
	[Srinivasan ^A 2011]	B	Solution aqueuse à T > 24°C
	[Kitamura ^A 1989]	B	Solution aqueuse

Tableau 3-6: Résumé des différents faciès associées à un polymorphe obtenus dans différentes conditions.

Bilan

Ce chapitre a dressé une synthèse des informations utiles à la cristallisation des molécules étudiées. Il permet l'identification des formes polymorphiques à partir des données recueillies notamment au travers des différents faciès.

Les données de solubilité sont cohérentes d'un auteur à l'autre. Cela constitue une base de travail pour la préparation des solutions pour les expériences présentées dans le chapitre 5 pour la molécule d'acide glutamique.

Ce travail a aussi permis de recenser les risques de transformation polymorphique en solution, lors du stockage ou lors de la préparation des échantillons pour la caractérisation par diffraction des rayons X nécessitant un broyage. Il est important de sécher rapidement les cristaux obtenus pour éviter une transformation de phase due à leur maintien dans la solution ou la présence d'un air humide. Le risque de transformation de la glycine lors du broyage préparatoire à la diffraction sur poudre n'est pas exclu limitant l'emploi de cette méthode.

Aucun faciès n'a été recensé dans le cas de la L – (+) – Histidine, deux faciès bien identifiables existent pour le L – (+) – Acide Glutamique et une pluralité existe en ce qui concerne les polymorphes de la glycine rendant l'emploi de l'identification par faciès aléatoire dans certaines situations. La méthode d'identification des polymorphes de la molécule d'histidine retenue est la diffraction par rayons X sur poudre. L'identification pour l'acide glutamique se fera par l'observation des faciès et pour la glycine, la spectroscopie Raman et l'observation des faciès seront utilisées en complémentarité.

Chapitre 4 : Développement d'un montage dédié à l'étude de la nucléation induite par laser

Introduction

L'un des objectifs initiaux de l'ANR « *NPLIN-4-Drug* » était le développement d'un montage expérimental capable de fournir en grand nombre des résultats expérimentaux afin d'obtenir une statistique fiable avec des conditions expérimentales contrôlées. Cette étape de la thèse est importante puisqu'il s'agit de développer l'outil de travail conditionnant le succès des expériences *NPLIN*.

Le premier montage utilisé, basé sur celui de Bruce Garetz, a permis d'obtenir des résultats dans les années antérieures à la thèse²⁸. Ces résultats ont permis d'avancer sur la définition scientifique du projet d'étude de la nucléation induite par laser en incluant dans un projet ANR le développement d'un nouveau montage.

Ce chapitre évoque la définition des besoins sur la base du retour d'expérience, la rédaction du cahier des charges, la réalisation technique et la programmation.

²⁸ Les années 2006 - 2011

I/ Premier montage et son amélioration

I-1) Premier montage

Il est constitué d'un laser Nd-YAG impulsif d'une durée d'impulsion de quelques nanosecondes (7 ns) (figure 4-1). La fréquence d'émission est de 10 Hz et la polarisation de sortie est linéaire verticale à 99 %. La longueur d'onde de travail utilisée est 532 nm. Il est utilisé afin d'apporter de l'énergie à la solution.

La stimulation de la nucléation nécessite une densité d'énergie 50 MW/cm^2 pour l'urée **[Matic 2005b]**. Toutefois, pour atteindre des valeurs plus élevées telles que 300 MW/cm^2 , l'ajout d'un dispositif optique permettant de réduire la surface afin d'augmenter la densité d'énergie est nécessaire. Un condenseur est ajouté pour accroître la densité d'énergie. Il réduit la dimension du rayon du faisceau d'un facteur 2 ce qui implique l'augmentation de la densité d'énergie d'un facteur 4 dans le cas d'un faisceau circulaire. Ce condenseur est un télescope et doit être continuellement alimenté en azote gaz pour éviter le claquage dans l'air au point focal et la formation d'un plasma. L'ajout d'une lame quart d'onde permet d'obtenir une polarisation circulaire ou elliptique. Ce montage n'utilise que des tubes pyrex (diamètre 1,3 cm et, hauteur de 11 cm) placés manuellement dans un porte échantillon.

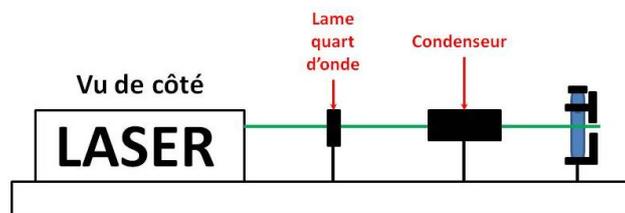


Figure 4-1 : Premier montage utilisé pour l'étude de NPLIN.

I-1-1) Limites physiques du premier montage

Dans cette configuration expérimentale, le faisceau pénètre la solution par la face cylindrique du tube pyrex (figure 4-2). Il a été observé à plusieurs reprises un claquage du tube allant d'un simple dégât sur le tube à un trou de 1 mm de diamètre. La focalisation produit un plasma à proximité de la face de sortie du tube cylindrique ayant pour conséquence de percer le tube. Ce perçage engendre immédiatement une importante nucléation à l'extérieur. L'occurrence avec laquelle ce phénomène se produit entraîne un échec complet de certaines manipulations.

Ce phénomène est interprété comme la conjonction de l'effet de lentille du tube avec une modification d'indice de la solution et du tube. Le soluté a une importance majeure dans cet effet de claquage. Des essais ont été menés sur des tubes contenant uniquement de l'eau et aucun perçage n'a eu lieu, le phénomène est donc directement lié au composé.

I-1-2) Effet de focalisation du tube

Afin de comprendre ce phénomène, un petit modèle a été établi par Bellani *et al.* **[Bellani 2007]**. Le faisceau arrive sur la surface courbée du tube et est focalisé à travers l'épaisseur en verre du tube (figure 4-2). Un calcul à l'aide de l'optique matricielle donne le facteur de

diminution de la surface du faisceau. En général, la matrice de réfraction T à travers une couche courbée s'écrit [4 – 1] :

$$T = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \left(\frac{n_1}{n_2} - 1\right) \frac{1}{r} & \frac{n_1}{n_2} \end{pmatrix} [4 - 1]$$

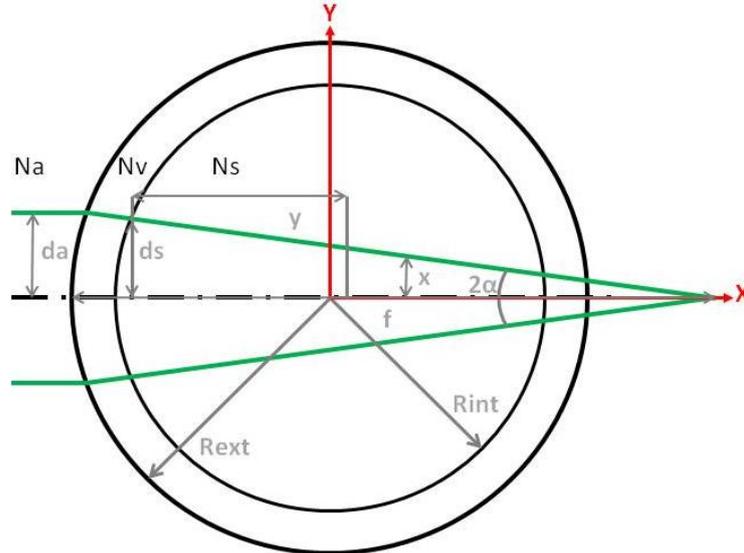


Figure 4-2 : Etude de l'effet lentille dû au tube pyrex. L'ensemble des quantités utilisées pour le calcul est reporté sur le schéma.

Dans l'équation précédente, n_1 et n_2 désignent les indices de réfraction des deux milieux concernés et r est le rayon de la couche courbée. Il y a réfraction à travers un cylindre en verre, alors le faisceau est réfracté à travers deux couches courbées. La matrice à considérer est donc le produit des matrices des deux couches courbées et du trajet du faisceau au sein de la paroi [4 – 2] :

$$\begin{pmatrix} d_s \\ \alpha \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \left(\frac{n_v}{n_s} - 1\right) \frac{1}{r_{int}} & \frac{n_v}{n_s} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \left(\frac{n_a}{n_v} - 1\right) \frac{1}{r_{ext}} & \frac{n_a}{n_v} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} d_a \\ \alpha_0 \end{pmatrix} [4 - 2]$$

C'est une légère approximation puisque formellement, nous devrions tenir compte du déplacement dans le verre. Avec $\alpha_0 = 0$, on obtient [4 – 4] :

$$\begin{cases} d_s = d_a \\ \alpha = \alpha_0 \frac{n_a}{n_s} + d_a \left[\left(\frac{n_v}{n_s} - 1\right) \frac{1}{r_{int}} + \frac{n_v}{n_s} \left(\frac{n_a}{n_v} - 1\right) \frac{1}{r_{ext}} \right] \end{cases} [4 - 3]$$

$$\alpha_0 = 0$$

$$\begin{cases} d_s = d_a \\ \alpha = d_a \left[\left(\frac{n_v}{n_s} - 1\right) \frac{1}{r_{int}} + \frac{n_v}{n_s} \left(\frac{n_a}{n_v} - 1\right) \frac{1}{r_{ext}} \right] \end{cases} [4 - 4]$$

La distance focale s'obtient par le calcul de la tangente : $\tan \alpha = \frac{d_s}{f}$ d'où $f = \frac{d_s}{\tan \alpha}$

Géométriquement, on a la relation $\frac{x}{d} = \frac{f-y}{f}$ donnant la relation entre la distance depuis le point focal et le diamètre du faisceau $x(y) = \frac{d}{f}(f - y)$.

Pour les données suivantes : $r_{\text{int}} = 5,5 \text{ mm}$; $r_{\text{ext}} = 6,5 \text{ mm}$; $N_a = 1$; $n_v = 1,53$; $n_s = 1,33$; $d_a = 2 \text{ mm}$; l'intensité augmente du facteur ($f = 29,3 \text{ mm}$) $f_{\text{tube}} = \left(\frac{d_a}{d_x}\right)^2 = 1,59$.

I-1-3) Autres limitations expérimentales

D'autres facteurs limitant l'expérimentation sont apparus au cours des manipulations :

- l'obligation de changer les tubes à la main nécessite de fermer l'obturateur du laser entre chaque exposition,
- la mesure de puissance du faisceau incident se fait manuellement,
- le choc possible du tube lors de son installation sur le porte échantillon,
- le positionnement du tube sur le porte échantillon dont l'orientation peut légèrement varier d'un tube à l'autre puisque le tube est bloqué à mi-hauteur alors que sa base hémisphérique est simplement posée sur une surface plane (figure 4-1),
- la température non contrôlée et difficilement mesurable : les sursaturations retenues pour l'expérience sont indexées sur la température et pour cela, la température au sein du tube doit être connue et maîtrisée.

Suite à cette expérience, plusieurs besoins ont été recensés :

- un contrôle et une régulation précis en température pouvant être modifiés à tout moment et conservés sur plusieurs jours,
- le souhait de connaître en temps réel la densité d'énergie du faisceau,
- la gestion du faisceau par un obturateur électronique,
- l'étude simultanée de plusieurs tubes,
- un carrousel permettant de supporter plusieurs tubes,
- le suivi des échantillons.

I-3) Cahier des charges

Tableau 4-1 : Tableau résumant le travail de la définition des besoins et des solutions techniques associées.

Secteur de l'expérience	Besoins	Solutions
Préparation des échantillons	Limiter la quantité de matière employée	Tupe HPLC
Zone échantillon	Amélioration de la statistique expérimentale	Un porte échantillon de 90 tubes prenant modèle sur les portes diapositives circulaires
	Supprimer l'effet de focalisation du tube	Insertion du faisceau par le haut
	Assurer le maintien en température des échantillons	Adapter le carrousel à la circulation d'un fluide caloporteur
	Placer les échantillons les uns après les autres sous le laser et le microscope	Carrousel motorisé par un moteur pas à pas
	Permettre l'insertion du faisceau dans les tubes HPLC	Bouchon troué avec une plaque en verre. L'étanchéité sera assurée par un joint
Régulation en température	Contrôler la température des échantillons	Fluide caloporteur
	Distribution et gestion du fluide caloporteur	Cryothermostat (circuit fermé)
	Contrôler la température du fluide	Thermocouples
Banc optique	Contrôler le temps d'exposition	Shutter électronique
	Suivre l'évolution de la puissance du faisceau	Wattmètre
	Connaître à tout moment la puissance du faisceau	Prélever un peu du faisceau par une lame semi réfléchissante
	Permettre l'insertion du faisceau dans les tubes HPLC	Miroir et réflexion à 90°
Suivi <i>in situ</i>	Disposer d'un outil de suivi de la nucléation <i>in situ</i>	Suivi optique
	Suivre optiquement la manipulation	Microscope inversé
	Suivre une nucléation en temps réel	Caméra
Contrôle de la manipulation	Interfacier tous les périphériques et les synchroniser	Développement d'un logiciel
	Développement d'un logiciel pour le contrôle	Programmation sous <i>LABVIEW</i>
Ergonomie	Accès à tout moment aux informations de l'expérience	Développement d'un interface homme / machine
	Mettre l'opérateur en sécurité	Capot mobile pour complètement isoler la zone optique de l'extérieur
	Permettre le déplacement de la manipulation	Chariot mobile

II/ Le développement du nouveau montage

II-1) Le nouveau montage

Au sein du nouveau montage, trois parties sont identifiables : le banc optique, le suivi optique *in situ* et la régulation en température. L'implantation de ces zones doit tenir compte de l'encombrement du laser et du microscope ajouté au souhait d'avoir un dispositif expérimental mobile.

Le microscope est placé à 180° de la zone d'exposition avec une exposition par le dessus du tube pour des raisons de sécurité laser. Le microscope est du type inversé ou métallurgique afin de faire des observations par-dessous. La figure ci-dessous (figure 4-3) détaille précisément l'emplacement des éléments du nouveau montage sur le banc expérimental. Le porte-échantillon appelé carrousel dans la suite de ce document peut porter jusqu'à 90 tubes HPLC spécialement étudiés pour être utilisés avec le laser (figure 4-4).

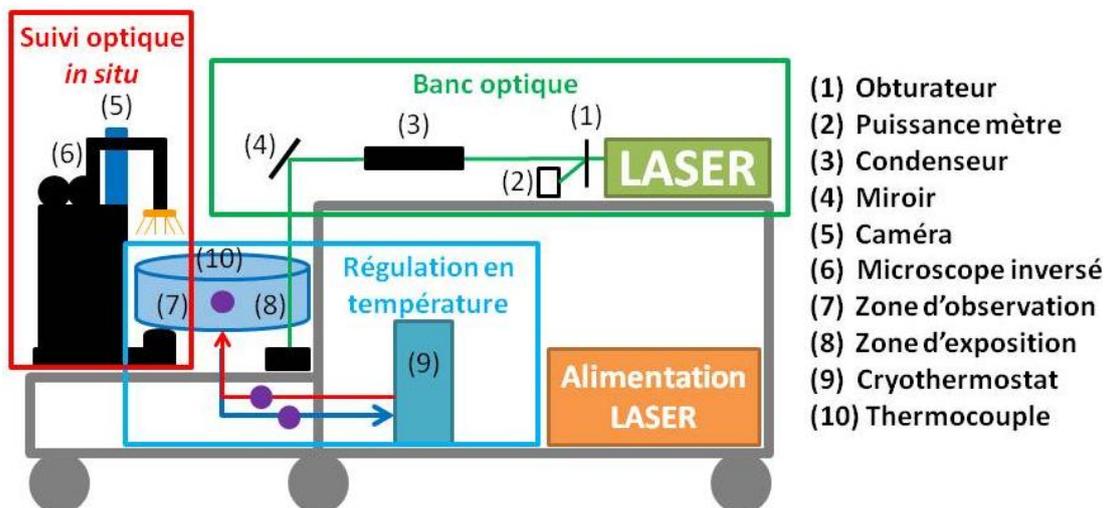


Figure 4-3 : Schéma du nouveau montage.

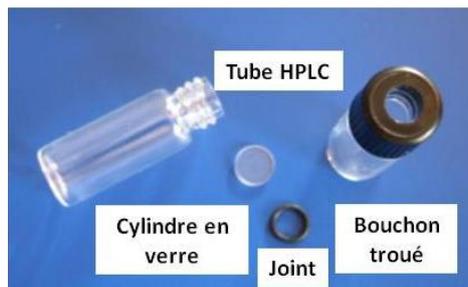


Figure 4-4 : Tubes HPLC étudiés pour le passage du laser.

II-1-1) Le banc optique

Un obturbateur électronique permet de contrôler très précisément la durée d'exposition. Une lame semi réfléchissante renvoie quelques pourcents du faisceau vers un puissance mètre. La puissance totale est obtenue en incluant un facteur correctif dans le logiciel du dispositif de mesure de la puissance. La taille du faisceau continu est réduite par un condenseur. Un miroir fixé à 45° envoie directement le faisceau dans le tube HPLC. La figure 4-5 montre l'emplacement des éléments d'optique sur la ligne.

La lame quart d'onde peut être installée pour travailler avec la polarisation circulaire ou une polarisation elliptique. La finalité de la ligne optique est essentiellement de modifier les polarisations incidentes qui vont être envoyées sur les solutions et d'augmenter la densité d'énergie en diminuant la surface du faisceau grâce au condensateur.

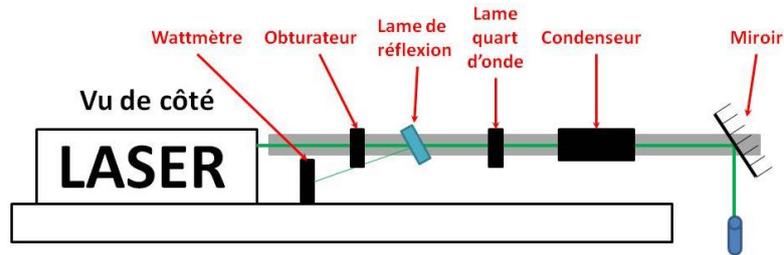


Figure 4-5 : Schéma optique de l'expérience.

II-1-2) Le contrôle de la température

Il est nécessaire de contrôler la température. Afin de répondre à ce besoin, un dispositif de régulation en température performant a été mis en place. La principale difficulté technique résidait dans la gestion du fluide caloporteur au niveau du transfert vers le carrousel en phase de rotation (voir Annexe C1). Le fluide caloporteur évolue en circuit fermé à partir d'un cryothermostat qui le maintient à la température programmée ou lui fait subir un cycle préprogrammé.

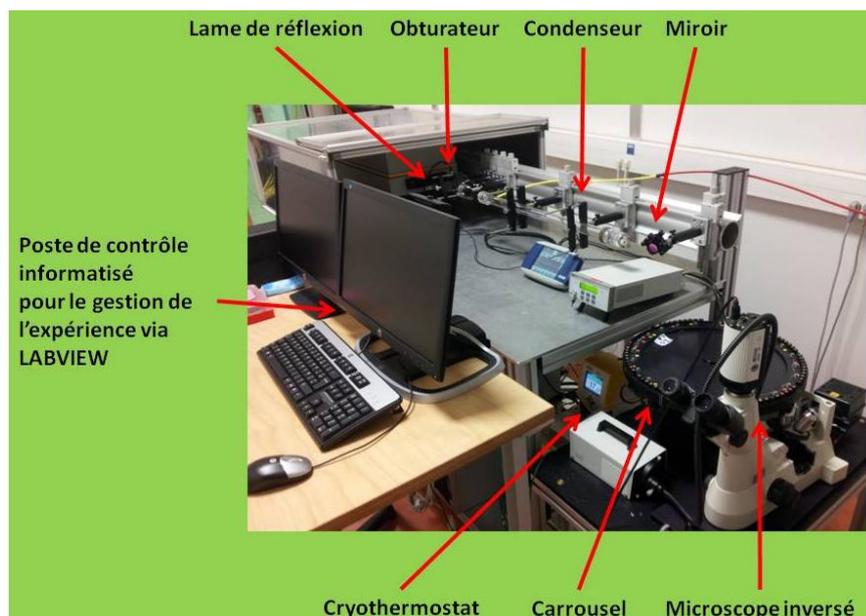


Figure 4-6 : Photographie du nouveau montage complété des emplacements des éléments.

II-2) Automatisation

Un programme LABVIEW a été développé afin de coordonner l'ensemble des périphériques et d'automatiser l'expérience.

II-2-1) Constitution d'un cahier des charges

Un premier travail a été effectué afin d'établir le cahier des charges de l'automatisation. Le programme de pilotage doit pouvoir permettre :

- de prendre la saisie de tous les paramètres donnés par l'utilisateur,
- de contrôler les différents éléments indiqués dans le tableau 4-2,
- de permettre le pilotage de l'expérience suivant différentes séquences,
- de stocker les données mesurées d'une façon facilement exploitable,
- de permettre à l'utilisateur d'observer les résultats pendant ou après l'expérience.

Périphérique	Fonction
Caméra	Suivi optique de la nucléation
Thermocouples	Capteur de la température de l'eau circulant dans le carrousel
Platine rotative	Contrôler la rotation du carrousel
Circulateur Thermostaté	Fournir l'eau circulant dans le carrousel
Shutter	Contrôler le passage du faisceau
Puissance mètre	Mesurer la puissance du laser

Tableau 4-2 : Liste des éléments à contrôler par LABVIEW

Une boucle de contrôle est construite afin que l'utilisateur puisse connaître en temps réel les paramètres importants de l'expérience : puissance, température. Le tableau 4-3 résume l'origine des données à traiter par LABVIEW et le tableau en annexe C1 détaille les données de type programmation du tableau 4-3.

Nom de la famille	Source de la donnée	Type de donnée
Paramètres de l'expérience	Saisie utilisateur	Programmation
Séquences de la manipulation	Saisie utilisateur	Programmation
Température des échantillons	Thermocouples	Mesure passive
Intensité du laser	Wattmètre	Mesure passive
Position du carrousel	Moteur (Newport URS-BCC)	Sortante / Contrôlée
Images de la solution	Microscope (Nikon) et caméra	Entrante

Tableau 4-3 : Origine des données à traiter par LABVIEW

L'automatisation permet de passer d'une configuration expérimentale où l'opérateur est omniprésent car il doit gérer chaque étape à une configuration où celui-ci gère l'expérience en se concentrant sur les paramètres expérimentaux et sa stratégie expérimentale. En adaptant le protocole expérimental utilisé pour le premier montage, une séquence expérimentale est définie en six points et sert aux développements ultérieurs de l'automatisation. Cette séquence est présentée dans le tableau 4-4.

Numéro d'étape	Action associée à l'étape
Etape 1	Saisie des données initiales par l'utilisateur
Etape 2	Choix par l'utilisateur du type de séquence (manuelle, automatique, programmée par l'utilisateur)
Etape 2.1 et 2.2	Vérification des paramètres (puissance laser, température, contrôle du bain thermostaté)
Etape 3	Réalisation de la séquence
Etape 3.1	Sauvegarde et post-traitement des images
Etape 3.2	Observation des images pendant l'expérience.

Tableau 4-4 : Séquence retenue lors du développement du cahier des charges.

Etape 1 : l'expérimentateur définit l'ensemble des données primaires²⁹ et les données secondaires³⁰ propres aux échantillons. Ces données secondaires sont réémises lors du rapport de l'expérience une fois celle-ci terminée.

²⁹ Les données primaires est l'ensemble des termes obligatoires pour le contrôle de la manipulation : nombre d'échantillons, durée d'exposition, intensité du laser et température.

Etape 2 : l'expérimentateur choisit le type de séquence. L'étape 2.1 est une étape de vérification avant le lancement de l'expérience. L'étape 2.2 s'effectue en continu tout au long de l'expérience au travers d'une prise d'information passive qui le cas échéant signale une inadéquation entre la mesure et le souhait de l'expérimentateur.

Etape 3 : la séquence programmée est réalisée. Les images ont un rôle important dans l'étude de la nucléation, il est donc nécessaire de sauvegarder les images et éventuellement d'y accéder pendant l'expérience. Le groupe optique correspondra à un sous ensemble lors de la programmation (étapes 3.1 et 3.2).

L'étape 2 est caractérisée par le choix du type de séquence. Trois modes de fonctionnement sont étudiés : une séquence manuelle, une séquence automatique et une séquence semi automatique. Ces trois séquences correspondent à trois régimes différents. La séquence manuelle est développée pour un faible nombre d'échantillons ou pour des situations où l'opérateur va jouer un rôle très important comme lors de l'étude d'un paramètre point par point. La séquence automatique est utilisée pour l'étude d'un grand nombre de solutions et la séquence semi-automatique doit permettre à l'opérateur de modifier en cours de marche certains paramètres. Par définition elle est hybride et ouvre sur la possibilité d'utiliser le carrousel pour des utilisations hors *NPLIN* comme la mesure des courbes de solubilité. A chaque mode va correspondre plusieurs besoins.

Le mode manuel doit permettre de piloter séparément l'ensemble des éléments suivants : carrousel, bain thermostaté, obturateur, et d'acquérir les informations venant des éléments : caméra, thermocouples, puissance-mètre. Cela se traduit par la possibilité de :

- 1 - Positionner le carrousel ou le microscope sur le tube que l'on souhaite,
- 2- Régler la température du bain thermostaté et connaître à tout moment la température du bain en plus de celle venant des thermocouples,
- 3 - Ouvrir ou fermer l'obturateur sur demande,
- 4 - Suivre ce qui est observé sur le microscope, via la caméra. Cette observation doit inclure la prise de vidéo en sus de la prise d'image,
- 5 - Acquérir la température relevée par les 3 thermocouples,
- 6 - Acquérir les informations du puissance mètre,
- 7 - Sauvegarder sur un fichier indépendant la température et la puissance du faisceau,
- 8 - Synchroniser le temps pour ultérieurement réassembler les données enregistrées.

³⁰ Les informations secondaires permettent de consigner plusieurs données telles que date, nom d'expérimentateur, l'objectif de la manipulation, molécule, solvant, composition, concentration, polarisation, longueur d'onde et pH.

Le mode automatique permet d'effectuer une exposition successive des tubes au faisceau laser, puis de suivre *via* le microscope le fond du tube. Cette séquence a deux parties : exposition et observation (phase 1) et uniquement l'observation (phase 0 et 2). Les temps d'exposition (t_{exp}), les temps d'observation (t_{obs}) et le nombre de photos prises (N_{photo}) sont choisis par l'utilisateur et communs à tous les tubes de la séquence. L'ensemble des phases doit s'articuler comme suit :

Phase 0 : tour d'observation (expérimentalement justifié par le fait de connaître l'état de la solution avant l'exposition).

Phase 1 : Exposition au laser puis observation.

Phase 2 : Observation (expérimentalement justifiée par le fait de connaître l'évolution de l'état de la solution après l'exposition).

Ce mode va piloter l'ensemble des éléments mentionnés dans le mode précédent suivant la séquence suivante lors de l'exposition (phase 1) avec à tout moment la mesure passive des températures et de la puissance du faisceau.

Dans le cas de l'exposition, l'enchaînement retenu pour un tube (n) du fait de l'implantation du microscope :

Mise en place du tube dans la zone d'exposition

Ouverture de l'obturateur suivant le temps programmé

1 - Exposition (n)

Fermeture de l'obturateur

Mouvement jusqu'à la zone d'observation

Ouverture de l'obturateur suivant le temps programmé

2 - Exposition (n+45) et observation (n)

Fermeture de l'obturateur

Mouvement jusqu'à la zone d'observation

3 - Observation (n+45)

Puis passage au tube suivant (n+1)

Le mode semi-automatique permet à l'utilisateur de choisir sa séquence (ordre, t_{exp} , t_{obs} , N_{photo}) pour chacun des tubes. Son fonctionnement reste proche du mode automatique.

II-2-2) Développement des fonctions et la programmation LABVIEW

II-2-2-1) L'emploi du GRAFCET

Le GRAFCET est un mode de représentation et d'analyse d'un automatisme, particulièrement bien adapté aux systèmes à évolution séquentielle, c'est-à-dire décomposable en étapes. Il est dérivé du modèle mathématique des réseaux de Pétri. Le GRAFCET est un langage graphique représentant le fonctionnement d'un automatisme par un ensemble d'étapes auxquelles sont associées des actions, des transitions entre étapes associées à des

conditions de transition dites réceptivités. Il sert directement la programmation et indique ce que doit faire la machine pour réagir à chaque étape.

Il constitue une étape intermédiaire entre le cahier des charges et l'élaboration du programme LABVIEW en offrant la possibilité d'avoir un banc d'essai du programme avant toute étape de programmation. La figure 4-7 montre un exemple de GRAFCET développé pour la mesure de l'intensité.

Le programme se décompose en trois blocs :

1 - La saisie des données pour la réussite de l'expérience, à savoir la programmation des données primaires et des données secondaires. Cela inclut aussi la vérification d'entrée des données, à savoir la saisie correcte des paramètres dans la page de préparation. L'ensemble des données primaires et secondaires est dans le tableau en annexe C2.

2 - Vérification du montage : vérification de la température, de l'intensité du laser et du positionnement du carrousel.

3 - Contrôle / réalisation de la manipulation : contrôle en temps réel de la température et de la puissance, enregistrements à une fréquence donnée et pilotage de la rotation du carrousel.

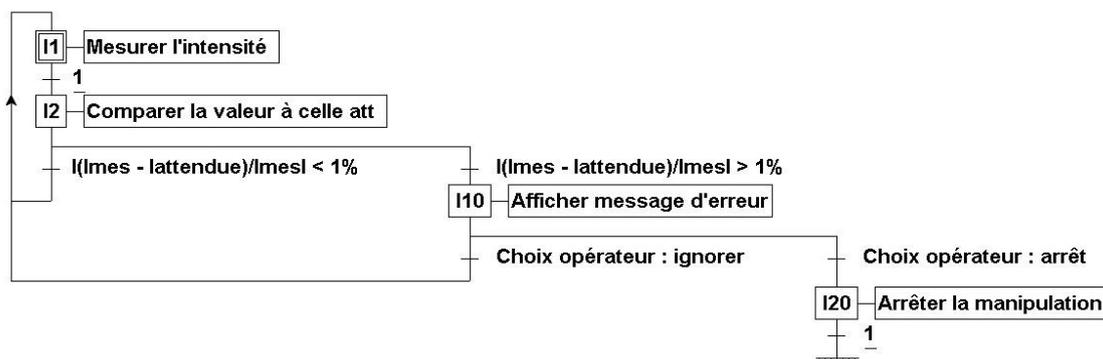


Figure 4-7 : Processus GRAFCET montrant le fonctionnement de la fonction « mesure de l'intensité ». Un intervalle de tolérance est fixé, si l'intensité du laser dépasse cet intervalle une alarme informe l'opérateur. En cas de problème, l'opérateur peut choisir d'ignorer ou d'arrêter, cela met un terme à la manipulation. Ce GRAFCET est le même pour la température. Seules les réceptivités changent.

II-2-2-2) Développement de l'interface utilisateur sous LABVIEW

Le programme d'interfaçage des périphériques choisi est LABVIEW (*Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench*). Ce logiciel permet l'acquisition de nombreuses données ainsi que leurs traitements. La programmation est orientée objet c'est-à-dire que celle-ci consiste en une superposition de programmes et de sous-programmes représentés par des icônes appelé VI (*Virtual Instruments*).

Concrètement, il y a dans un VI trois composantes : un diagramme qui intègre le code graphique, une face-avant personnalisable par l'utilisateur et un panneau de connexions pour les icônes servant d'entrées/sorties pour les variables sous forme de fils. La face avant

permet de saisir des valeurs à l'écran et de visualiser les sorties ou des résultats de calculs. Une fois programmé, le VI est représenté par une icône pour être intégré dans un nouveau diagramme ce qui en fait un sous-VI ou sous programme.

La programmation a été faite par la société spécialisée ARCALE. Le recours à un prestataire de service a été fait pour avoir un logiciel opérationnel rapidement. Le cahier des charges a été traduit sous forme de spécification (voir Annexe C3). La programmation LABVIEW n'est pas produite dans ce tapuscrit mais les faces avant permettant un contrôle *via* une interface sont présentées en annexe C4.

Bilan

Ce travail a permis le développement d'un nouvel équipement unique pour l'étude de la nucléation induite par laser. Ce nouveau montage permet aujourd'hui d'exposer jusqu'à 90 solutions préparées dans différentes conditions mais à une température définie. Le contrôle précis de la température peut servir à mesurer des points de solubilité ou à contrôler des valeurs de solubilité issues de la littérature.

L'expérimentateur observe grâce au microscope inversé la croissance cristalline au plus près. L'observation *in situ* et pratiquement simultanée avec l'exposition donne la possibilité d'obtenir des informations sur le site de nucléation et les différents faciès obtenus après l'exposition au laser. L'enregistrement des images par la caméra augmente la visibilité des résultats dans les conférences et publications. L'automatisation du dispositif a accru l'autonomie de l'utilisateur et améliore la gestion de l'expérience en centralisant sur un ordinateur les fonctions de commande et de suivi.

Chapitre 5 : Méthodes expérimentales

Introduction

Dans le cadre de l'étude de la nucléation, une fois la molécule sélectionnée et son solvant, reste à déterminer le domaine expérimental (T, sursaturation ...). Pour cela il est nécessaire de connaître la solubilité dans le solvant avant de préparer des échantillons.

Ce chapitre présente les méthodes employées à chacune des étapes suivantes : étude de la solubilité, préparation et dissolution des échantillons, exposition et enfin caractérisation. L'ensemble des méthodes décrites dans ce chapitre n'ont pas toutes été utilisées pour chaque molécule et cela sera précisé dans les chapitres dédiés aux molécules.

I/ Mesures de solubilité

La solubilité est un élément clé de la réussite des expériences de cristallisation photoinduite. Il est donc important de déterminer la courbe de solubilité et la limite de la zone métastable.

I-1) La détermination de la courbe de solubilité

La sursaturation est un paramètre clé dans le processus de nucléation. Le paramètre de sursaturation est contrôlable à condition de connaître la courbe de solubilité du composé dans ce solvant mais certaines solubilités n'ont jamais été mesurées. Il a été nécessaire de mesurer les solubilités de l'histidine et de la glycine dans H₂O et D₂O. Ces mesures ont été effectuées au Centre Interdisciplinaire des Nanosciences de Marseille (CINaM) par la méthode des ajouts successifs. Ce procédé est essentiellement basé sur un contrôle visuel.

Pour réaliser la mesure d'une solubilité à une température donnée, on utilise des béchers double enveloppe reliés à un bain thermostaté (figure 5-1). Il y a dans chaque cellule un barreau aimanté pour agiter la solution afin d'accroître la vitesse de dissolution. Le montage est constitué de deux béchers dédiés à la mesure et d'un bécher de référence permettant de contrôler la température.

Un volume de 10 mL de solvant est introduit dans chaque bécher. Ensuite, on ajoute de petites quantités du soluté étudié. Ces ajouts successifs doivent avoir la même masse Δm , le suivant étant rajouté après la dissolution complète de l'ajout précédent. Une lampe polychromatique puissante permet à l'expérimentateur de constater la disparition des éléments du soluté visible à l'œil nu. La solubilité à la température de mesure est déterminée dès que le soluté ne se dissout plus au bout en général de plusieurs heures : plus on se rapproche de la saturation, plus la dissolution est lente.

Les deux béchers permettent d'effectuer un encadrement précis du point de solubilité déterminé entre l'ajout n et $n+1$: $n \frac{\Delta m}{V} < s < (n + 1) \frac{\Delta m}{V}$. Une fois le point relevé, deux vérifications ont lieu :

- Lors du relevé du point, on vérifie le type de solubilité de la solution en augmentant la température de quelques degrés Celsius³¹. Si on constate la dissolution de l'excès de matière, alors la solubilité est directe.

- Une fois l'ensemble des points obtenus, il faut vérifier que la courbe de solubilité suit la loi de Van't Hoff [5 – 1]. Sinon, cela signifie que le modèle n'est pas pertinent pour le système considéré ou qu'il y a la présence d'une nouvelle phase (voir chapitre I).

$$\ln(S) = a * \frac{1}{T} + b [5 - 1]$$

Une fois les mesures terminées, un bécher sur deux estensemencé avec le produit de départ de l'ordre de plus au moins de Δm . Une rampe descendante de température depuis la

³¹ Si une augmentation de 1 ou 2°C est nécessaire pour dissoudre alors on peut considérer que c'est la même phase. Par contre si il faut significativement la température (5 °C voire 10 °C) alors il y a eu la nucleation d'une phase plus stable.

dernière température de mesure jusqu'à 5 °C est imposée. Les cristaux obtenus sont analysés par diffraction des rayons X. Cette dernière expérience vise à comparer le polymorphe obtenu avec ensemencement dans le cas où une forme autre que celle de départ est obtenue. Cela permet de vérifier que l'on mesure la bonne phase.

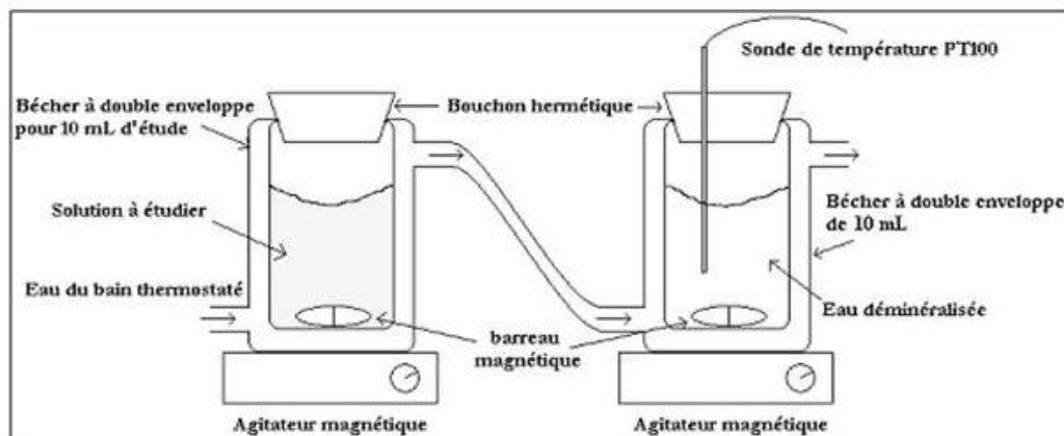


Figure 5-1 : Représentation schématique du montage de mesure des solubilités. Ce type de montage permet essentiellement de balayer la gamme de température de 5°C à 50°C, gamme essentiellement utilisée pour les études des molécules organiques.

I-2) La détermination de la limite de zone métastable de travail

Dans la zone métastable, aucune nucléation spontanée ne se produit. C'est dans cette zone qu'il faut se placer pour induire la nucléation. Sa mesure n'est pas aisée : elle se fait de manière indirecte en observant le moment où se produit la première nucléation, cette dernière marquant l'entrée dans la zone de nucléation spontanée.

Il existe deux façons de déterminer la limite de zone métastable : une méthode dynamique, où la température diminue suivant une vitesse de refroidissement imposée (figure 5-2) et une méthode statique où l'on se place à une température et l'on attend l'apparition du premier cristal (figure 5-3).

La limite de zone métastable dépend donc de la vitesse de refroidissement : plus la vitesse de refroidissement est lente, plus la limite de zone métastable est proche de la courbe de solubilité. Réciproquement, plus la vitesse de refroidissement est élevée, plus la limite de zone métastable est éloignée de la courbe de saturation [Bonin-Paris 2011].

Expérimentalement, la limite de zone métastable pour la glycine et l'histidine a été déterminée par la méthode dynamique au CINaM. Les solutions sont préparées pour être en état de sous-saturation à une température initiale puis placés dans la régulation en température. Un dispositif LABVIEW permet de coordonner le suivi optique avec la régulation en température (figure 5-4).

La température de départ des expériences était de 60 °C. Cette température a été conservée pendant 24 h puis une rampe de 1 °C/h a été programmée pour atteindre une température de 5 °C. Une photo de chaque puits a été prise toutes les 30 minutes. Lorsqu'il y a cristallisation, l'heure et la température sont connues. Cela permet de remonter à la

sursaturation lors de la cristallisation : ainsi est définie la largeur de la zone métastable de travail.

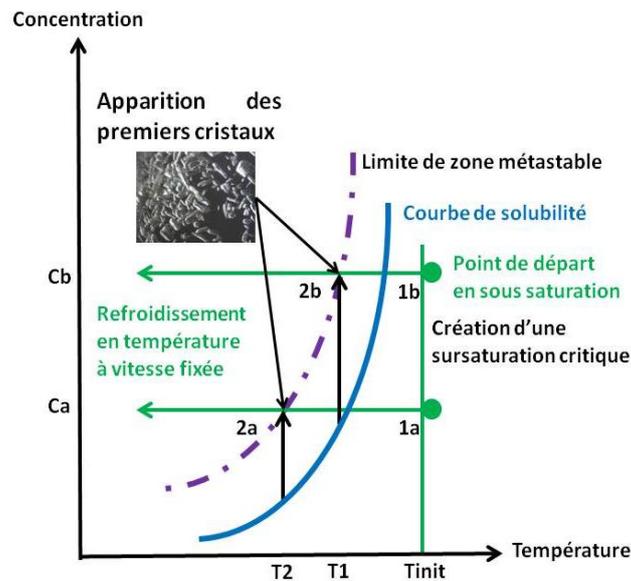


Figure 5-2 : Schéma de principe expliquant la détermination de la limite de zone métastable en régime dynamique où la température est diminuée à vitesse constante. L'expérience débute en état de sous-saturation (1a, 1b : trait vert) puis la température diminue à une vitesse constante pour amener la solution en état de sursaturation (2a, 2b : flèches noires). Le début de la nucléation signifie la limite de la zone métastable.

$\beta_{C_{molécule, polymorphe, solvant}}(T1) = Cb$. Avec une concentration inférieure à Cb pour la température T1, la solution est dans la limite de la zone métastable.

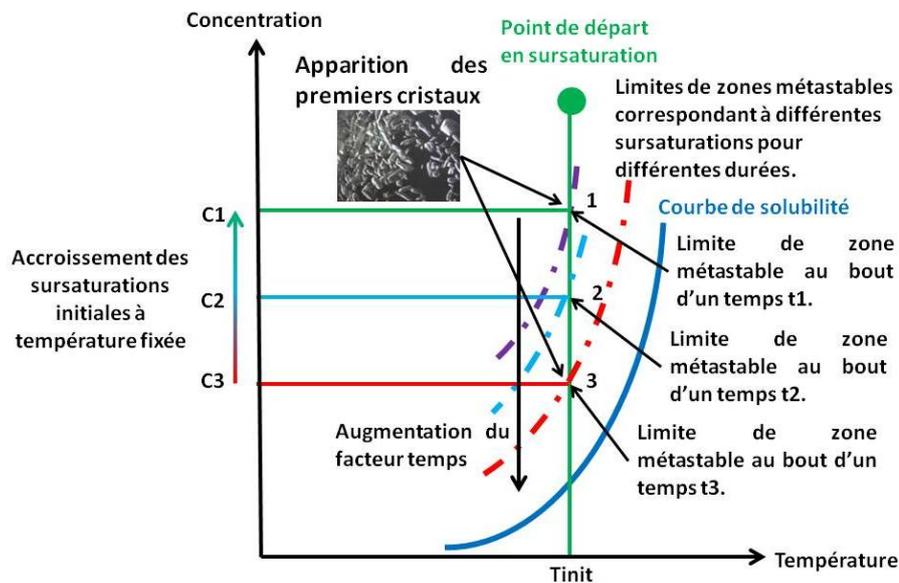


Figure 5-3 : Schéma de principe expliquant la détermination de la limite de zone métastable en régime statique. L'expérience débute en état de sursaturation à une température fixée (Tinit) puis on laisse le temps faire son œuvre. La nucléation signifie la limite de la zone métastable, ce qui implique que la limite de zone métastable est valable uniquement pour un temps donné. $\beta_{C_{molécule, polymorphe, solvant}}(t1) = C1$.



Figure 5-4 : Dispositif expérimental utilisé au CINaM pour étudier la limite de zone métastable. Les modules permettent d'étudier de 24 à 96 tubes suivant l'ampleur de la statistique souhaitée ou de la disponibilité du soluté et du solvant (gauche). Les deux modules sont montés sur une plaque mobile horizontalement dans deux directions. L'ensemble est contrôlé en température et un programme LABVIEW gère le déplacement de la table porte échantillon, la vitesse de refroidissement et la caméra.

II) Préparations et gestions des échantillons

II-1) Préparation des solutions

Les produits de départ sont utilisés sans purification supplémentaire. La méthode de préparation est assez similaire entre les tubes pyrex (utilisés les premiers mois) et les tubes HPLC : préparation tube par tube ou solution mère.

Première méthode : préparation tube par tube :

La quantité de matière souhaitée est placée dans les tubes puis le solvant est ajouté (figure 5-5).

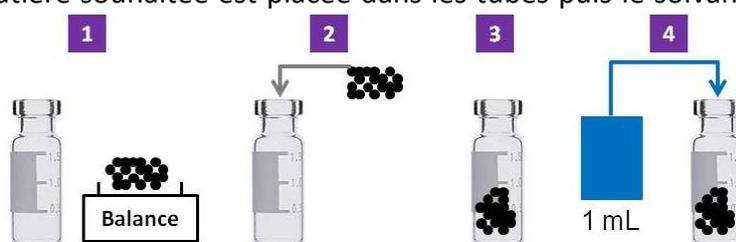


Figure 5-5 : Représentation schématique de la pesée tube par tube.

Seconde méthode : préparation par solution mère :

Avec cette méthode, une solution à une certaine concentration est préparée. Elle est dissoute puis pipetée tube par tube (figure 5-6).

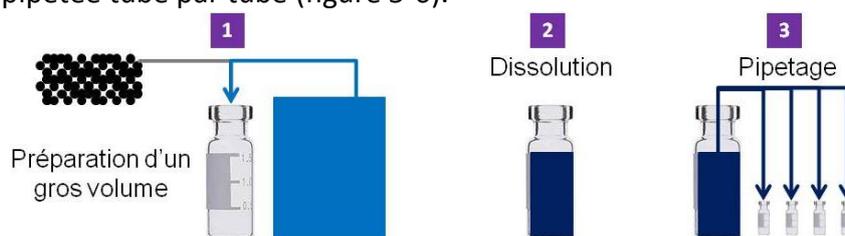


Figure 5-6 : Représentation schématique de la préparation par solution mère.

Cette seconde méthode est à mettre en œuvre s'il est nécessaire de filtrer la solution ou si certains paramètres ne peuvent pas être contrôlés au niveau du tube comme le pH. Cette méthode permet de limiter les erreurs de pesée ou de volume par rapport à l'approche tube par tube puisque l'erreur est uniformément répartie sur l'ensemble des tubes mais elle pose un problème lors du pipetage de la solution mère vers les tubes. En effet, il y a une rupture pouvant, dans le cas de sursaturation élevée, augmenter l'incertitude en sursaturation si la solution mère n'est pas constamment homogénéisée (pipetage possible dans des zones à basse sursaturation et haute sursaturation).

L'incertitude relative est définie par l'équation [5 – 2]. L'équation montre aussi que dans le cas d'une solution mère fabriquée avec une incertitude $\frac{\Delta C}{C}$, cette erreur sera répartie sur l'ensemble des n tubes de façon égale dans le cadre d'une homogénéité de la solution lors du pipetage. Avec la méthode de préparation tube par tube, il n'est pas possible de diminuer l'incertitude commise par tube puisqu'elle sera inhérente à chacun.

$$\frac{\Delta C}{C} = \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta V}{V} \quad [5 - 2]$$

Dans notre situation, l'incertitude sur la masse Δm est l'incertitude venant de la balance soit 1 mg, l'erreur sur le volume ΔV est l'incertitude venant des pipettes automatiques soit 0,01 mL. Cela implique une incertitude sur la concentration ΔC pour une concentration souhaitée de 270 mg/mL de 3,7 mg/mL. L'incertitude relative est donc 1,37 %.

Sauf mention contraire, la méthode de préparation des échantillons systématiquement utilisée est une pesée tube par tube puis un ajout du solvant comme représenté sur la figure 5-5 puis le soluté est dissous dans la solution.

II-2) Dissolution du soluté

Deux méthodes ont été utilisées : ultrasons et température. Cette seconde méthode a été utilisée après la mise en service du carrousel thermostaté à l'Ecole Centrale Paris. Une fois la dissolution terminée, la solution reste plusieurs jours à température de travail. L'avantage du carrousel est la possibilité de choisir la vitesse de refroidissement.

Dans le cadre de la solution mère, la dissolution a lieu pour l'ensemble du volume puis les tubes sont remplis à la pipette puis placés sur le carrousel. La dissolution se fait soit thermiquement soit en combinant ultrason et haute température. Une fois la matière dissoute, la solution est transvasée par pipette dans les tubes (pyrex ou HPLC). Néanmoins, cette méthode peut imposer une rupture comme un choc thermique. Dans ces situations là, le pipetage doit être réalisé à température élevée. Il est important de transférer très rapidement les tubes dans un environnement avec une température élevée avant d'effectuer la descente vers la température de travail.

Les choses diffèrent pour la pesée tube par tube puisque la dissolution est réalisée dans le tube. Lors de l'emploi des tubes pyrex, les solutions étaient dissoutes aux ultrasons à haute température (60 °C) pendant plusieurs heures puis laissées au repos jusqu'à atteindre la température ambiante de manière naturelle.

Avec la modification du montage, l'étape de dissolution est uniquement thermique. Cela ajoute un paramètre supplémentaire et requiert plus de temps. En effet, pour une solution de glycine sursaturée à 150 % (280 mg/mL), 1 h de dissolution est nécessaire à 60 °C avec les ultrasons ; ce temps monte à 24 h avec la dissolution thermique de glycine. La figure 5-7 montre les différentes méthodes de dissolutions utilisées. Une fois la dissolution effectuée, les échantillons sont stockés jusqu'à l'exposition.

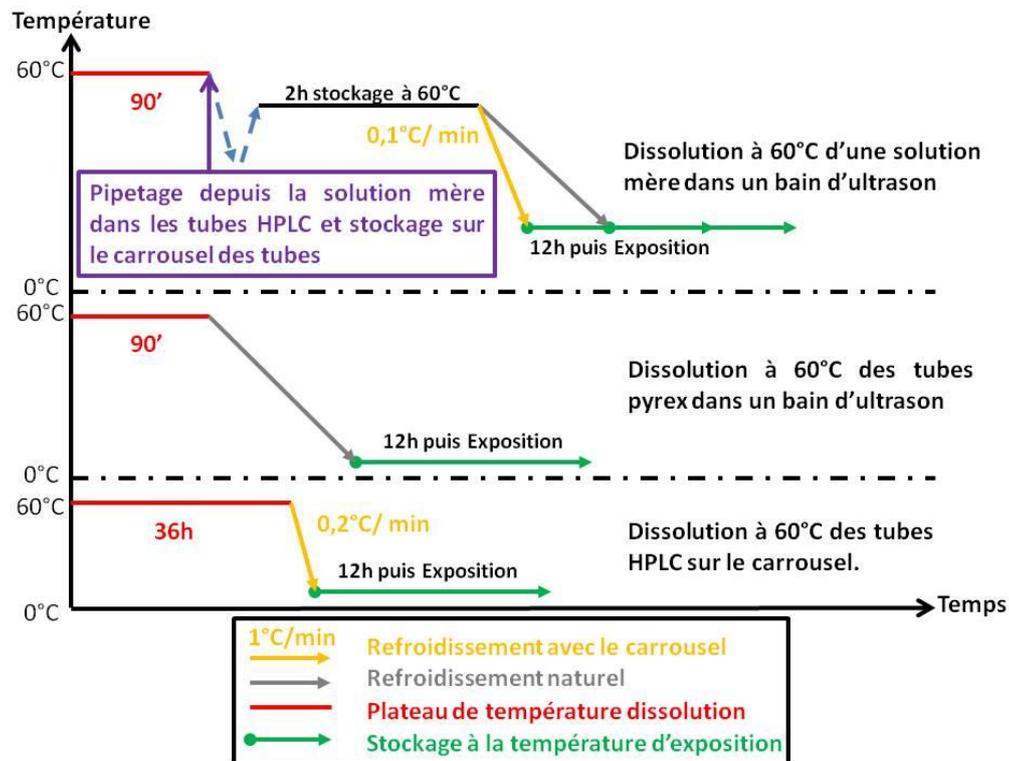


Figure 5-7 : Différentes méthodes utilisées dans le cadre de la dissolution thermique. Les cycles de température ont été décalés en hauteur pour plus de visibilité. Les flèches pointillées bleues représentent la rupture en température lors du pipetage puisque la régulation en température n'est plus assurée à ce moment là. Les durées affichées dépendent de la molécule utilisée. Il s'agit dans ce cas de la molécule de glycine. Ce schéma n'est pas à l'échelle sur l'axe des températures ni sur l'axe du temps, il a une valeur illustrative.

Sauf mention contraire, la méthode de dissolution des échantillons utilisée est une méthode thermique effectuée à partir du carrousel. A l'issue de la dissolution, les tubes sont amenés et conservés à la température de travail pour y être exposés ou pour étudier le comportement de la nucléation spontanée sans manipulation et sans changement autre que la température.

III) Expositions au laser

Les solutions dissoutes et stabilisées en température sont exposées au laser. Cette étape est effectuée à l'aide d'un logiciel spécialement développé permettant d'exposer successivement les différents tubes en contrôlant précisément les différents paramètres : la température des solutions, la durée du temps d'exposition, le suivi dans le temps de la solution (voir chapitre précédent). Une fois l'exposition terminée, les solutions sont conservées à la température d'exposition afin de suivre optiquement la cristallisation. En fin de processus, les solutions sont filtrées et les cristaux préparés pour l'identification.

Le calcul de la densité d'énergie a été fait en utilisant l'équation [2 – 1] (chapitre 2, II-2-2). La puissance est mesurée par un wattmètre et la surface du faisceau est obtenue en utilisant un papier marquant spécifique (figure 5-8). La forme du faisceau a évolué au cours du temps, oscillant entre une ellipse et un cercle. La figure 5-8 montre l'ellipse utilisée afin de déterminer la surface du faisceau.



Figure 5-8 : Photographie du papier marquant après irradiation du laser. L'ellipse permet de mesurer précisément la surface du faisceau.

IV) Caractérisation des cristaux

Dans le cadre de l'étude *NPLIN*, la connaissance de la forme cristalline obtenue après exposition est capitale. En effet, l'intérêt majeur de cette méthode de cristallisation réside dans la sélection du polymorphe obtenu suivant la polarisation du faisceau incident. Cette caractérisation a été faite de plusieurs façons : par observation du faciès, par spectroscopie Raman ou par diffraction des rayons X sur poudre ou sur monocristal. La conjonction de l'observation du faciès et l'analyse Raman ou X permet de connaître la répartition des phases cristallines obtenues en fonction de plusieurs paramètres tels que la température, la sursaturation, l'énergie injectée dans la solution.

IV-1) Morphologie et dénombrement des cristaux obtenus

L'effet du laser sur le faciès a été étudié mais aussi son effet sur le nombre de cristaux obtenus dans le tube. Le relevé de cette information au sein des tubes a été fait en classant les tubes de la manière suivante : MC(1) correspond à un tube avec un seul monocristal, MC(n) correspond à l'obtention de monocristaux disjoints (en général n est compris entre 2 et 4), MC(N) correspond à des cristaux joints ou très nombreux (N cristaux) et de petite taille, P correspond à la formation d'une poudre ressemblant à celle de départ. La notion de taille est variable pour chacune des catégories. Les monocristaux (MC(1) et MC(n)) varient de 5 mm à 11 mm de longueur et de 5 mm à 2 mm de largeur, les cristaux joints (MC(N)) varient de 2 mm à 5 mm, que ce soit pour la longueur ou la largeur. La figure 5-9 montre la réalité physique de ces notations.

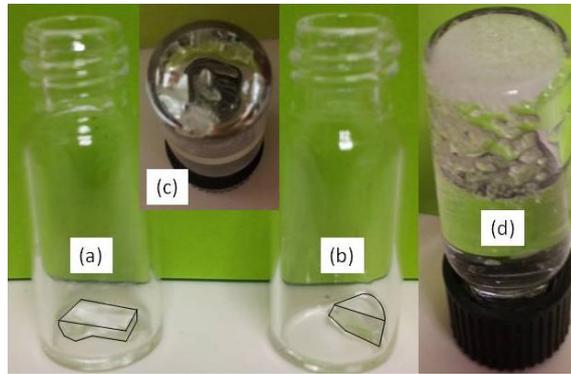


Figure 5-9 : Représentation de la classification expliquée ci dessus. (a) et (b) : classement MC(1), (c) : classement MC(N), (d) : classement P.

IV-2) Analyse des faciès

L'identification de la phase par l'observation du faciès permet de connaître la phase dès les premières observations, par les photographies prises juste après l'exposition au laser et durant les heures qui suivent. La relative facilité de mise en place et d'accessibilité de l'information peut être compliquée par une nucléation trop rapide ou hors champ. Enfin, cette méthode nécessite d'avoir à disposition une bibliographie des faciès des polymorphes. Il est possible aussi qu'un faciès ne soit pas référencé ou, soit inconnu, auquel cas, d'autres méthodes de caractérisations seront utiles.

La reconnaissance des faciès est limitée par trois situations présentées dans la figure 5-10 :

- une cristallisation rapide de multiples cristaux couvrant le fond du tube ou s'agrégeant pour former un amas de cristaux,
- une cristallisation rapide d'un monocristal couvrant totalement ou partiellement le fond du tube,
- une cristallisation survenant en dehors du champ de la caméra.

Le tableau 5-1 présente les surfaces visibles grâce au microscope et le logiciel LABVIEW pour l'ensemble des objectifs disponibles. Ces surfaces ont été traduites en pourcentage de la surface initiale du tube 78,5 mm². La figure 5-11 montre schématiquement la vision réelle du tube en fonction des objectifs et du mode d'observation : microscope ou logiciel.

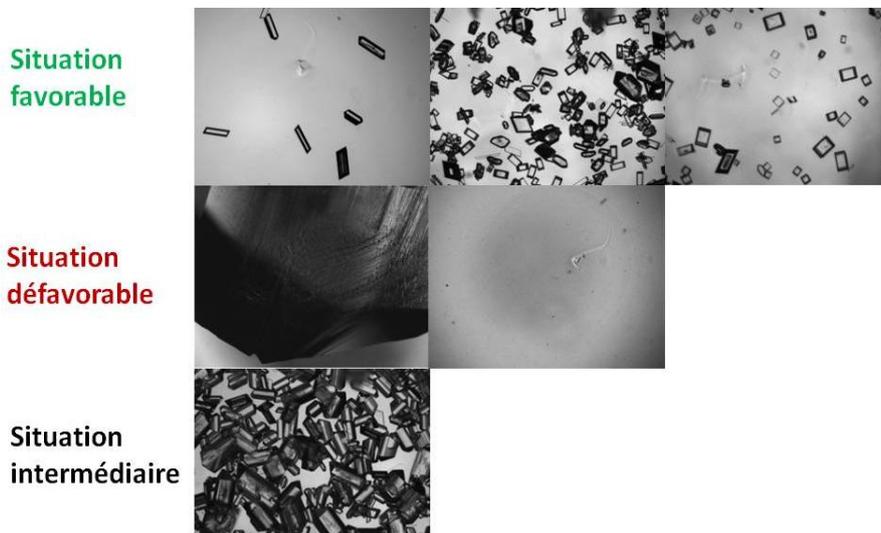


Figure 5-10 : Figure résumant les trois situations auxquelles fait face l'expérimentateur lors d'une identification par morphologie : situation favorable soit une nucléation dans le champ de la caméra combinée à une nucléation débutante où les cristaux restent visibles, situation intermédiaire soit une nucléation dans le champ de la caméra mais rapide (ou une observation tardive) qui empêche une observation distinctive des cristaux, situation défavorable soit une nucléation hors champ (diffusion du germe ou nucléation au ménisque) ou la formation d'un monocristal rendant invisible les limites du faciès.

Objectif	Surface visible par observation directe au microscope normée à la surface du tube (%)	Surface visible par observation via la combinaison de la caméra et du logiciel normée à la surface du tube (%)	Surface visible par observation directe au microscope normée à la surface du laser (%)	Surface visible par observation via la combinaison de la caméra et du logiciel normée à la surface du laser (%)
x 2,5	54,76	6,4	718	84
x 5	16	1,44	210	18,9
x 10	4	Impossible à déterminer Estimée : ~ 0,46 - 0,36	52,5	Impossible à déterminer Estimée : ~ 6 - 4,7
x 20	1	Impossible à déterminer Estimée : ~ 0,12 - 0,09	13,12	Impossible à déterminer Estimée : ~ 1,57 - 1,18

Tableau 5-1 : surfaces visibles grâce au microscope et par le logiciel LABVIEW pour l'ensemble des objectifs disponibles. Ces surfaces ont été traduites en pourcentage de la surface initiale du tube qui fait environ 78,5 mm².

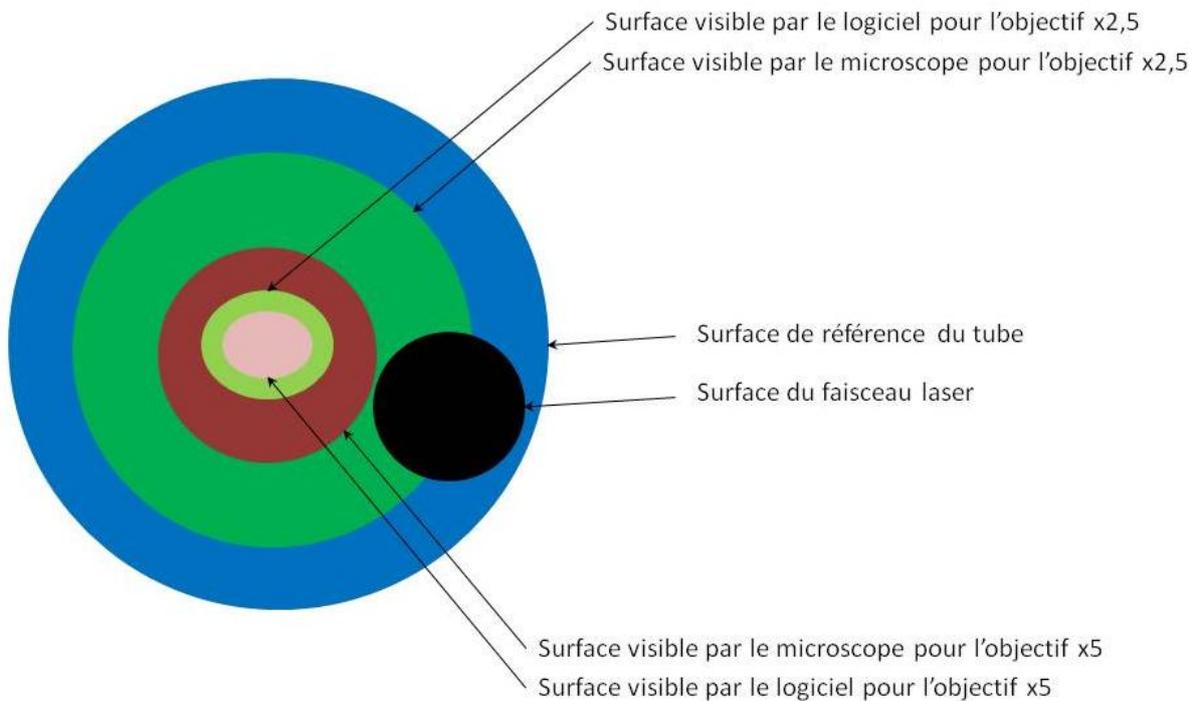


Figure 5-11 : représentation schématique de ce que l'on voit réellement du tube en fonction des objectifs et du mode d'observation : microscope ou logiciel.

Enfin, la dernière situation plus problématique et indiscernable par les techniques de caractérisation Raman et X est la transformation polymorphique vers une forme stable qui conserve le même faciès.

IV-3) Spectroscopie Raman

Cette méthode est utilisée en adéquation avec l'analyse des faciès. Elle possède deux avantages : sa rapidité de mise en œuvre (10 secondes d'acquisition par spectre) et la non destruction des cristaux. Une telle méthode est très adaptée pour caractériser les monocristaux de toutes les tailles. La spectroscopie Raman a été effectuée en utilisant un laser continu à 638 nm. La figure 5-12 montre les spectres Raman des polymorphes α et γ des produits de base utilisés pour les expériences. Lors de la caractérisation, la zone comprise entre 60 cm^{-1} et 180 cm^{-1} est utilisée pour déterminer le polymorphe.

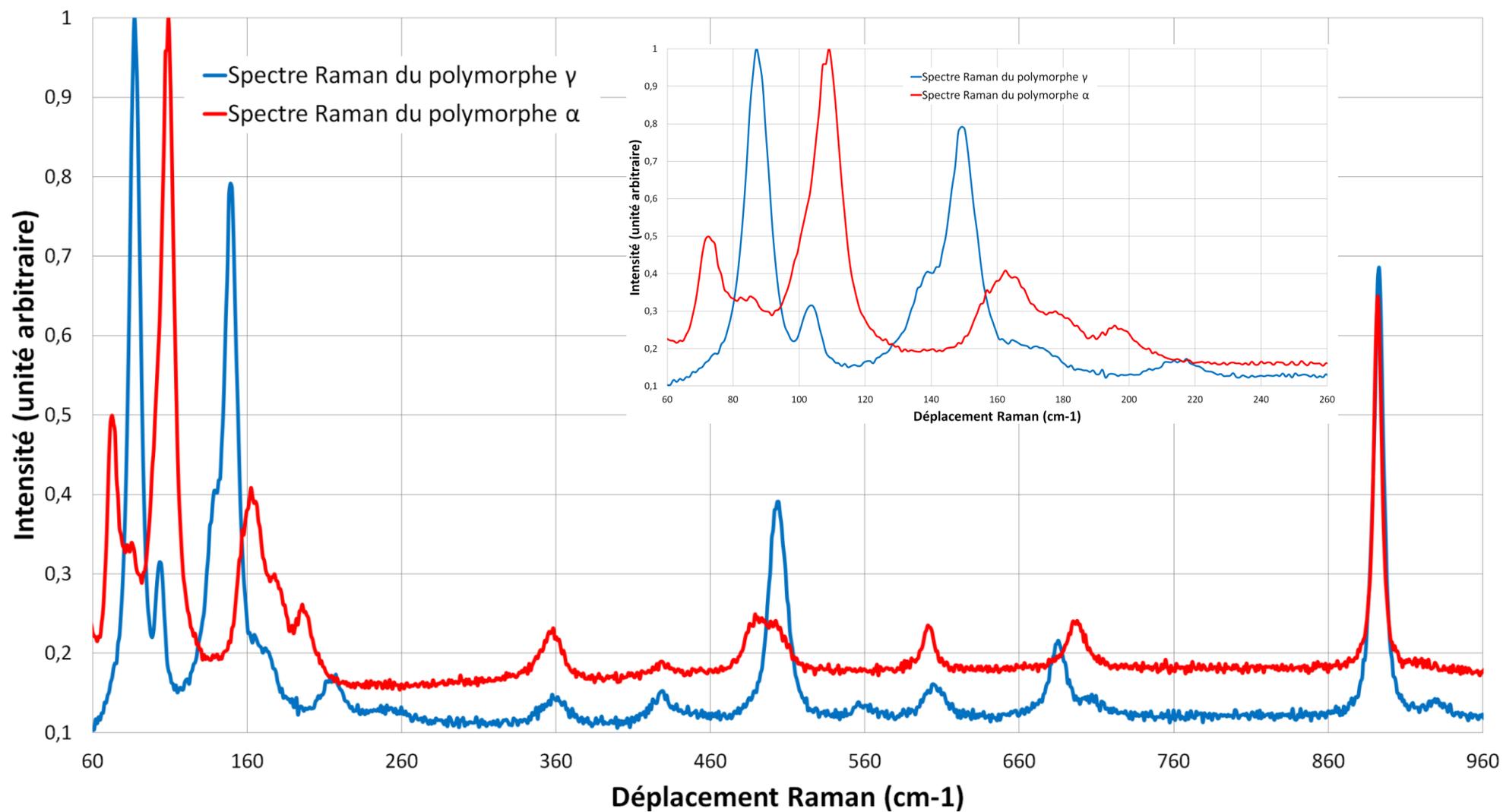


Figure 5-12 : Spectre Raman des poudres utilisées. En rouge, le spectre Raman du polymorphe γ , en bleu, le spectre Raman du polymorphe α . L'insert est un détail dans la zone $60\text{ cm}^{-1} - 260\text{ cm}^{-1}$ du spectre Raman des poudres utilisées.

IV-4) Diffraction des rayons X

Les échantillons ont été caractérisés par deux appareils : le premier, le *D2 Phaser* (Brüker), permet des mesures courtes de quelques minutes à condition d'avoir un signal fort, mais cela implique la destruction des cristaux; le second, le *D8 Venture* (Brüker), permet des mesures non destructives et d'associer un faciès à un polymorphe, mais au prix d'un temps de mesure de plusieurs heures ne permettant pas une caractérisation systématique.

IV-4-1) Diffraction sur monocristal

Cette méthode a été rarement utilisée pour caractériser le polymorphe associé à un faciès non référencé.

IV-4-2) Diffraction sur poudre

Les cristaux sont séchés puis broyés dans un mortier. La poudre obtenue est placée dans un porte échantillon et analysée. La figure 5-13 montre les diffractogrammes des deux poudres initiales de la glycine. Cette méthode a été progressivement abandonnée. Deux raisons à cela : son indisponibilité et la suspicion de l'effet du broyage sur une transition de phase du polymorphe α de la glycine vers le polymorphe γ de la glycine.

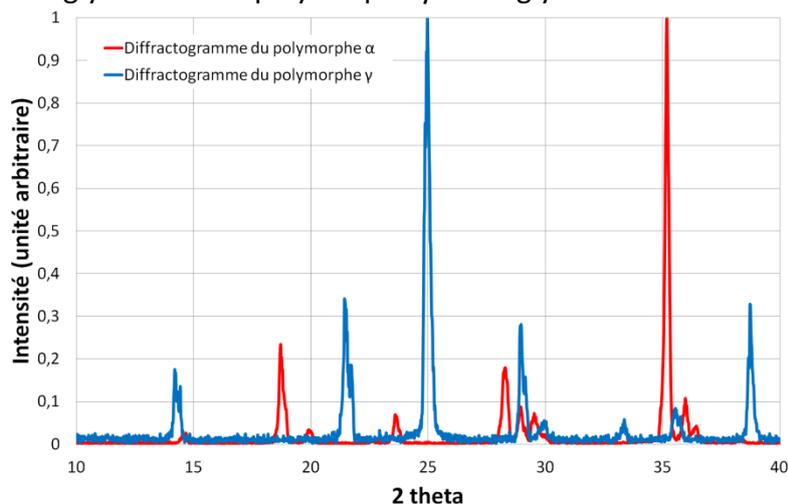


Figure 5-13 : Diffractogramme des poudres utilisées de glycine. En rouge, le diffractogramme du polymorphe α , en bleu, le diffractogramme du polymorphe γ .

Bilan

Dans ce chapitre, nous avons explicité la méthode de mesure de la solubilité et de la détermination de la limite de zone métastable, les méthodes de préparation des solutions, les profils de dissolution thermique, et les outils employés pour la caractérisation des cristaux obtenus ont été détaillés.

Afin de caractériser la cristallisation, nous avons introduit une variable : le dénombrement des cristaux. Nous faisons la distinction entre une poudre similaire au produit de départ, des cristaux disjoints et des cristaux dont le phénomène de croissance les a amenés à se joindre. Cette variable est utilisée dans le chapitre suivant.

Chapitre 6 : Effet de la nucléation induite par laser sur la glycine

Introduction

La nucléation induite de la glycine par laser a été étudiée depuis 2001 avec un laser nanoseconde [Zaccaro 2001] et par d'autres équipes avec d'autres conditions depuis 2007 [Yuyama 2012b]. La possibilité de cristalliser de manière sélective l'un de ses polymorphes a été établie par Sun *et al.* [Sun^A 2006]. Cette propriété remarquable nous a conduit à réétudier systématiquement la nucléation de cette molécule grâce au nouveau montage et à la méthodologie que nous avons développés.

Cette étude systématique a porté sur un grand nombre de variables : vitesse de nucléation, influence de la polarisation, de la puissance, de la sursaturation et du solvant.

I/ Mesure de la solubilité

I-1) Résultats

I-1-1) Solubilité dans H₂O

Les résultats obtenus dans H₂O pour la glycine α issue d'un lot de glycine venant de la marque VWR (les valeurs sont données en annexe D1) sont présentés ci-dessous (figure 6-1a). Cette mesure a eu lieu au CINaM suivant la méthodologie exposée dans le chapitre 5 partie I-1. La courbe moyenne représentée est issue de la moyenne arithmétique entre la valeur basse et la valeur haute mesurée à chaque température.

Le second graphique présente la vérification de la loi de Van't Hoff [6 – 1] (figure 6-1b). Le logarithme de la solubilité doit être une fonction linéaire de l'inverse de la température en Kelvin. La régression linéaire effectuée par le logiciel Excel[®] confirme avec un R² de 0,9994 que le système étudié suit la loi de Van't Hoff avec l'équation [6 – 2].

$$\ln C_s = -\frac{a}{RT} [6 - 1]$$

$$\ln C_s = -\frac{1942,8}{T} + 11,949 [6 - 2]$$

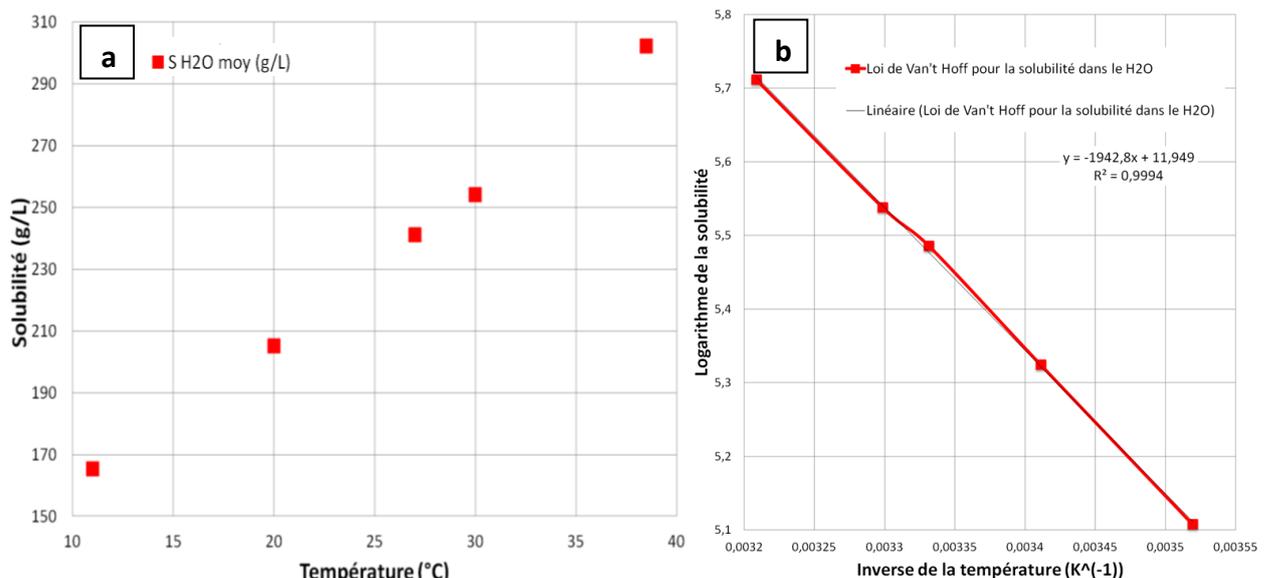


Figure 6-1 : (a) : Courbe de solubilité du polymorphe α dans H₂O.
(b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.

I-1-2) Solubilité dans D₂O

La solubilité du même lot de glycine venant de VWR a été déterminée dans D₂O (les valeurs sont données en annexe D2, figure 6-2a). Le second graphique présente la vérification de la loi de Van't Hoff (figure 6-2b). La régression linéaire effectuée par le logiciel Excel[®] confirme avec un R² de 0,9967 que le système étudié suit la loi de Van't Hoff avec l'équation [6 – 3].

$$\ln C_s = -\frac{1901,2}{T} + 11,776 \quad [6 - 3]$$

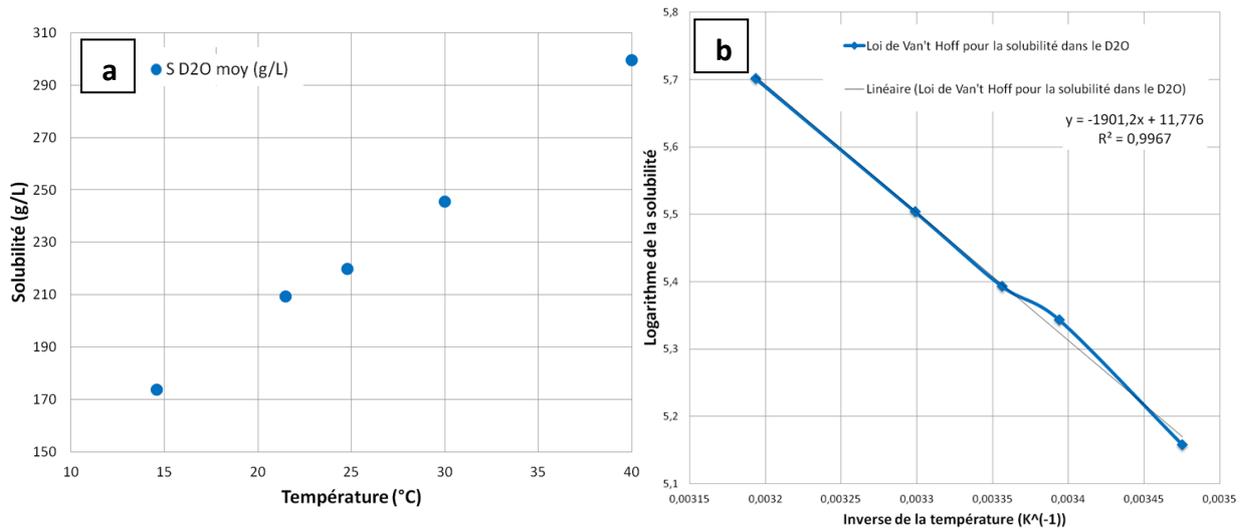


Figure 6-2 : (a) : Courbe de solubilité du polymorphe α dans D_2O .
(b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.

I-1-3) Ensemencement

A l'issue de la mesure de la solubilité, une partie des solutions ont étéensemencées par de la poudre venant du produit initial avant d'être refroidies à une température de 5 °C. Cette expérience a pour objectif d'étudier le polymorphe cristallisé par l'ensemencement et de le comparer à celui obtenu sans ensemencement après la rampe de température.

Dans H_2O et sans ensemencement, le polymorphe α est toujours cristallisé. Alors que l'ensemencement induit une augmentation du taux de formation du polymorphe γ : sur les trois solutionsensemencées, une ne présente aucune trace du polymorphe γ , une présente quelques traces du polymorphe γ et une dernière a permis la cristallisation de 20% à 30% du polymorphe γ . Dans D_2O et sans ensemencement, le polymorphe α est toujours cristallisé. Alors que l'ensemencement par le polymorphe α induit la cristallisation du polymorphe γ à 100 % (tableau 6-1).

Polymorphe d'origine	Solvant	Nucléation spontanée	Nucléation après ensemencement
α	H_2O	α	α avec de 1 % à 30 % de γ
α	D_2O	α	γ

Tableau 6-1 : Résumé des polymorphes obtenus avant et après ensemencement.

Ces résultats montrent l'influence de l'ensemencement sur la caractérisation de la cristallisation ainsi que l'effet du solvant. L'effet du solvant est démontré par la cristallisation à 100 % du polymorphe γ là où dans les mêmes conditions avec H_2O , on obtient seulement quelques traces du même polymorphe.

I-2) Discussion

I-2-1) Solubilité du polymorphe α dans H_2O

Nos mesures dans H_2O sont très proches de celles de [Yang 2008a] (figure 6-3a) avec un écart relatif à 20 °C de - 3,2 % si on applique l'équation [6 – 4]. Ces différences très faibles sont intrinsèques au produit utilisé et intègre la marge d'incertitude du processus de mesure expérimental. La proximité de nos mesures avec celles de Yang [Yang 2008a] sur le polymorphe α nous a permis d'utiliser la solubilité du polymorphe γ dans H_2O publié par Yang *et al.* (figure 6-3b).

$$E_{r\%} = 100 * \frac{C_s [\text{Yang 2008}] - C_{s H_2O}}{C_s [\text{Yang 2008}]} \quad [6 - 4]$$

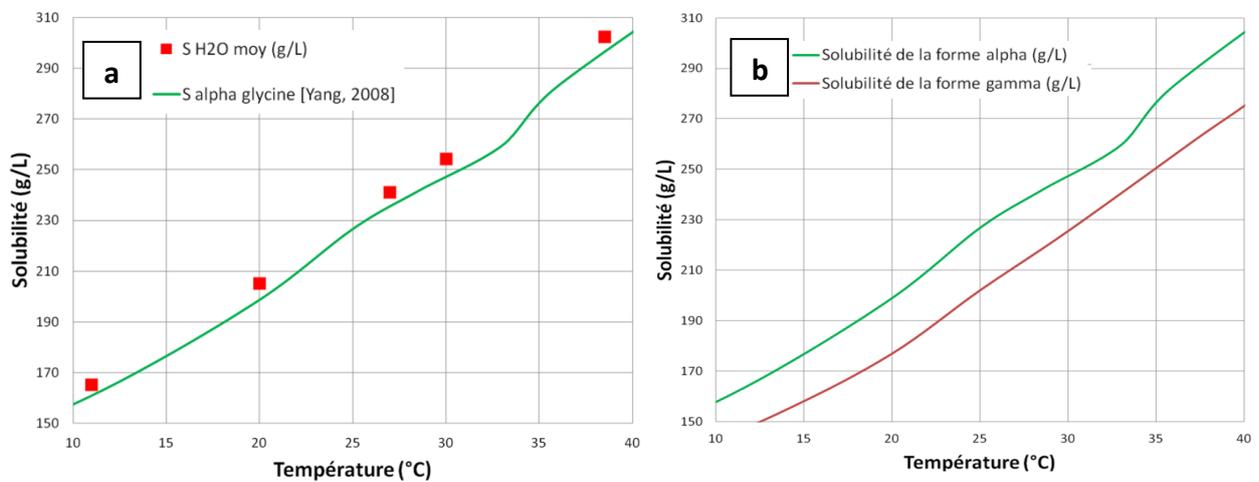


Figure 6-3 : (a) : Comparaison de nos résultats de solubilité avec ceux de [Yang 2008a].
(b) : Courbe de solubilité des polymorphes α et γ d'après [Yang 2008a].

I-2-2) Solubilité du polymorphe α dans D_2O

Le résultat montre que la solubilité du polymorphe α dans D_2O est proche de celle dans H_2O (figure 6-4) comme cela est le cas pour [Kunihisa 1974] (figure 6-4a). En appliquant à D_2O la relation [6 – 5], on montre la proximité de la solubilité dans D_2O et H_2O .

$$E_{r\%} = 100 * \frac{C_{s H_2O} - C_{s D_2O}}{C_{s H_2O}} \quad [6 - 5]$$

L'écart relatif à 30 °C est de -1,7 % pour les points de [Kunihisa 1974] et de +3,4 % pour nos points, montrant la proximité des courbes entre elles. La comparaison de nos résultats avec ceux de [Jelinska-Kazmierczuk 1996] (figure 6-4b) montre un comportement différent de la glycine dans D_2O . A 25 °C, la différence de solubilité est de 48 g/L soit un écart de 20 % : le D_2O a un effet sur la solubilité : cela s'explique par un effet de masse et un accroissement des interactions entre molécules dû à D_2O comme cela a été montré pour le BPTI [Budayova-Spano 2000].

En conclusion, la solubilité que nous avons mesurée dans H₂O est très proche de celle dans D₂O. Ce résultat est cohérent avec [Kunihisa 1974] mais diffère de celui de [Jelinska-Kazimierczuk 1996].

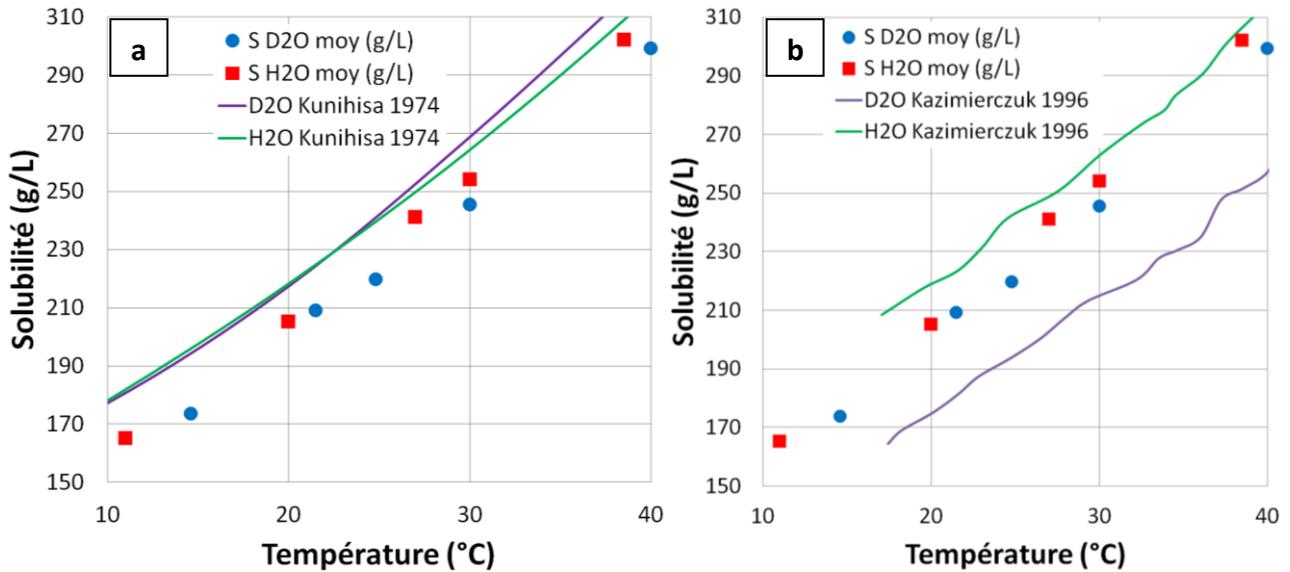


Figure 6-4 : (a) : Comparaison de nos résultats avec ceux publiés par [Kunihisa 1974].
 (b) : Comparaison de nos résultats avec ceux publiés par [Jelinska-Kazimierczuk 1996].

II/ Nucléation spontanée et détermination de la limite de zone métastable

Peu de travaux discutent de la limite de zone métastable (LZM³²) de la glycine. Dans sa thèse, Eve Revalor, fait état de la grande difficulté à la mesurer [Revalor 2009]. Les travaux de Johanne Bonin-Paris ont permis de déterminer la limite de zone métastable de la glycine en fonction des vitesses de refroidissement [Bonin-Paris 2011] (voir chapitre I, II-1-1-4). Nous avons déterminé la limite de zone métastable à 17 °C pour le polymorphe α et le polymorphe γ par la méthode statique détaillée au chapitre V (voir chapitre V, I-2).

La limite de zone métastable définit la zone où aucune nucléation ne se produit du moins pour un certain temps. Toutefois, cela n'exclut pas le phénomène d'agrégation / dissolution dès lors que l'énergie critique n'est pas franchie pour aboutir à la croissance cristalline. L'étude de la limite de zone métastable a été faite en régime statique. Il n'a pas été possible de la faire en régime dynamique car le plateau de 24 h à 60 °C fait avant l'abaissement de la température n'a pas été suffisant pour obtenir la dissolution complète des solutions.

La figure 6-5 montre la caractérisation de la limite de zone métastable des polymorphes α et γ à 17 °C dans H₂O et D₂O. La LZM du polymorphe α est donnée pour un temps de 168 h et de 36 h. Celle-ci est large et va jusqu'à 317 mg/mL à 36 h ce qui signifie que des expériences avec un temps d'attente de 24 h peuvent être menées jusqu'à une concentration de 317 mg/mL sans risque. On introduit la notation suivante, le β critique, β_c qui est la sursaturation maximale au bout d'un temps donné à partir duquel des cristaux peuvent se former. On a donc à partir des données expérimentales représentées dans la figure 6-5 :

³² Le terme Limite de Zone métastable pourra apparaître sous son abréviation LZM.

$$\beta_{c, \gamma, H_2O}(168 \text{ h}) = 280 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, \alpha, H_2O}(168 \text{ h}) = \beta_{c, \alpha, D_2O}(168 \text{ h}) = 317 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, \alpha, H_2O}(36 \text{ h}) = 335 \text{ mg/mL}$$

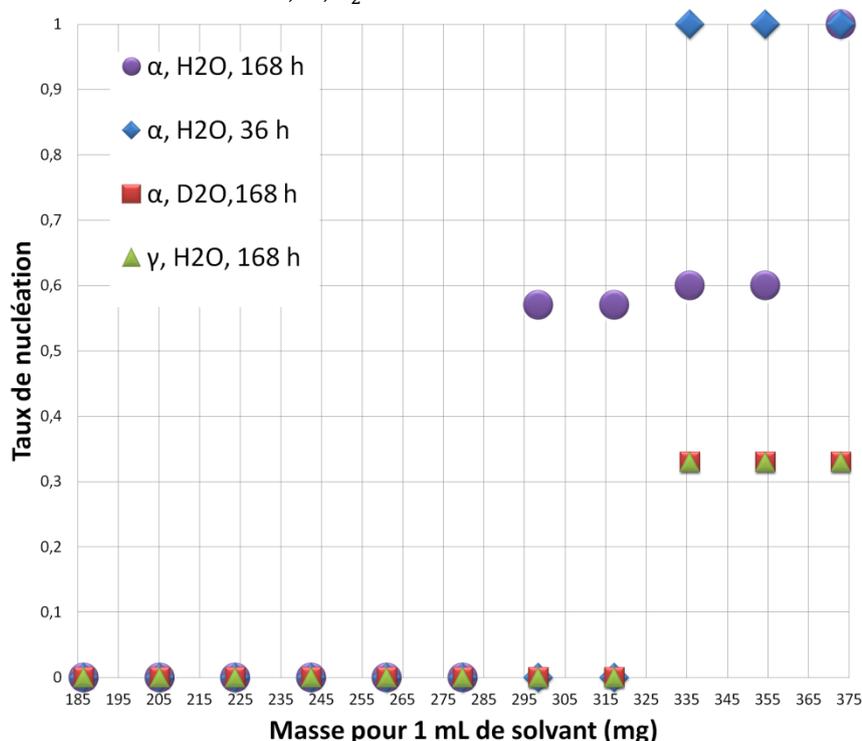


Figure 6-5 : Limite de zone métastable pour les polymorphes utilisés α et γ de la glycine à 36h et 168h dans H_2O et D_2O .

Les tubes présentant une cristallisation ont été caractérisés afin de déterminer le polymorphe obtenu en nucléation spontanée. Dans D_2O , le polymorphe obtenu dans 100 % des cas est le polymorphe γ . Dans H_2O , le polymorphe obtenu dans 100 % des cas est le polymorphe α .

III/ Etude préliminaire

III-1) Démonstration de l'effet du laser

Jusqu'à maintenant, tous les travaux effectués ([Garetz 1996], [Zacarro 2001], [Matic 2005a, 2005b], [Sun^A 2006], [Bavière 2006], [Bellani 2007], [Sun^A 2008], [Miret 2009], [Degand 2010]) l'ont été à l'aide de tubes pyrex qui induisaient un effet de focalisation naturel (voir chapitre 4, I-1-2). La conception du nouveau montage a introduit une nouvelle géométrie (figure 6-6) avec un faisceau traversant l'interface air / solution avant de traverser la solution ce qui n'était pas le cas dans la configuration précédente.

Le nouveau montage dont la conception a été détaillée au chapitre 4 permet de filmer la nucléation quasiment après l'exposition. Cela a permis de filmer la cristallisation après une exposition de la glycine. La figure 6-7 montre la chronologie de la cristallisation de la glycine

α exposée à 532 nm pendant 60 s à 1,4 GW/cm². La solution de glycine dans H₂O présente une sursaturation à 17 °C de 1,45 ce qui correspond à une concentration de 270 mg/mL.

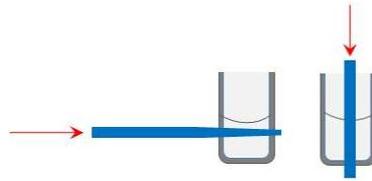


Figure 6-6 : Comparaison entre la configuration utilisée précédemment dans les tubes pyrex (gauche) et celle que nous avons utilisée avec les tubes HPLC impliquant la traversé de l'interface air / solution (droite).

L'enregistrement présenté ci dessous est reproductible. La figure 6-7 montre que dans cette configuration d'expérience, la cristallisation est d'une durée inférieure à 60 s (flèche noire). Nous observons aussi la chute (cercle rouge et bleu) de cristaux déjà formés qui continuent leur croissance (rectangle violet, flèches jaunes et vertes).

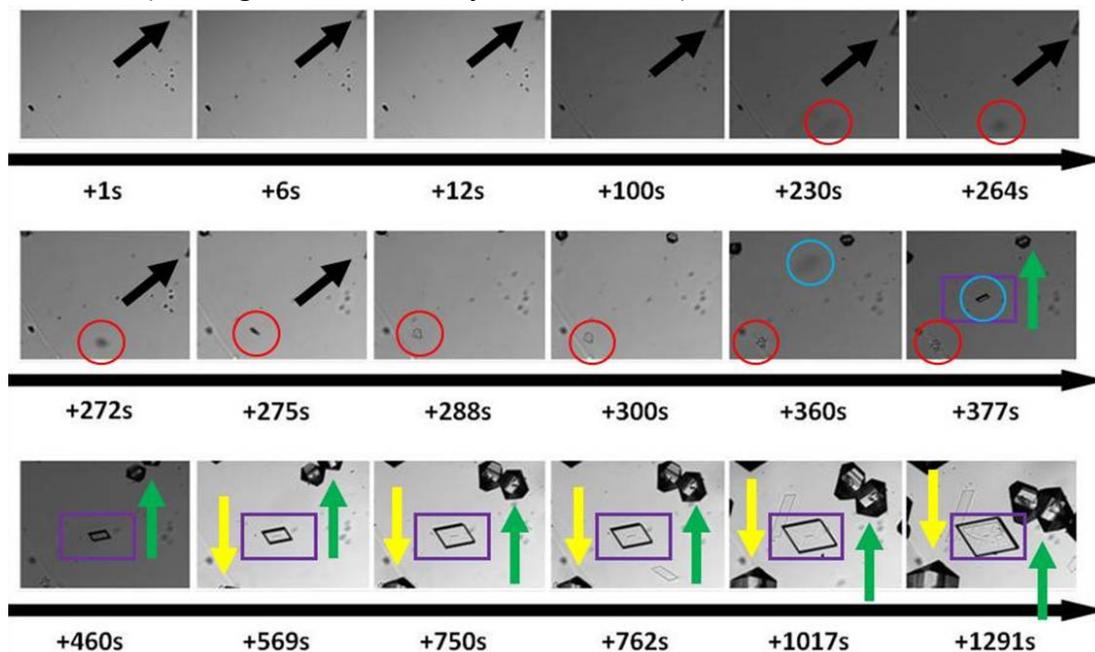


Figure 6-7 : Chronologie de la cristallisation de la glycine α exposée à 532 nm pendant 60 s à 1,4 GW/cm². La solution de glycine avait une sursaturation à 17 °C de 1,45 ce qui correspond à une concentration de 270 mg/mL.

III-2) Efficacité de la nucléation : travail préliminaire

Après avoir observé visuellement sur quelques tubes la cristallisation induite par laser, le premier travail a consisté à étudier sur un grand nombre de tubes la cristallisation soit le taux de tubes présentant des cristaux au bout d'un temps donné (quelques minutes à quelques heures) pour un ensemble de paramètres donnés (sursaturation, température, densité d'énergie, polarisation du laser). Nous avons donc choisi d'effectuer toutes les expériences à 17 °C (293 K). Les premiers essais sur 25 tubes ont montré un taux de cristallisation³³ compris entre 0,8 et 1,0, que ce soit en polarisation linéaire ou en

³³ Le taux de nucléation aussi appelé fraction est défini comme le rapport du nombre de tube présentant une cristallisation sur le nombre de tube initial de la condition.

polarisation circulaire (figure 6-8a). Lorsque nous avons voulu renouveler ces expériences pour augmenter la statistique, nous n'avons pas obtenu de cristallisation dans les mêmes conditions. Afin de comprendre cette variation surprenante, nous avons analysé le produit de départ.

Il s'est avéré que le polymorphe du produit de départ était de la α -glycine pour les premières mesures et γ -glycine pour les secondes mesures³⁴. Nous avons essayé de comprendre l'origine de ces différences en émettant une première hypothèse de dissolution incomplète du soluté au sein de la solution.

Or les mesures de la LZM, et l'absence de cristallisation des tubes témoins des premières expériences ne permettent pas d'étayer cette hypothèse. Nous sommes revenus aux courbes de solubilité des deux polymorphes. Nous avons choisi de travailler à une sursaturation de 1,45, soit 270 mg/mL pour la α -glycine et 245 mg/mL pour la γ -glycine. En conséquence, dans un tube préparé à partir de α -glycine pour une sursaturation 1,45 il y a $3,59 \cdot N_A$ molécules de glycine alors qu'il y a $3,22 \cdot N_A$ molécules de glycine pour un tube préparé à partir de γ -glycine. Il est donc clair que la probabilité de rencontres de deux molécules de glycine dans le tube préparé avec de la γ -glycine est plus faible. Par conséquent, nous avons choisi de refaire des expériences à concentration égale et non à sursaturation égale. Les résultats sont présentés sur la figure 6-8b. On voit clairement que dans ce cas, on ne distingue plus de différences significatives selon le type de polymorphe utilisé pour la préparation des tubes.

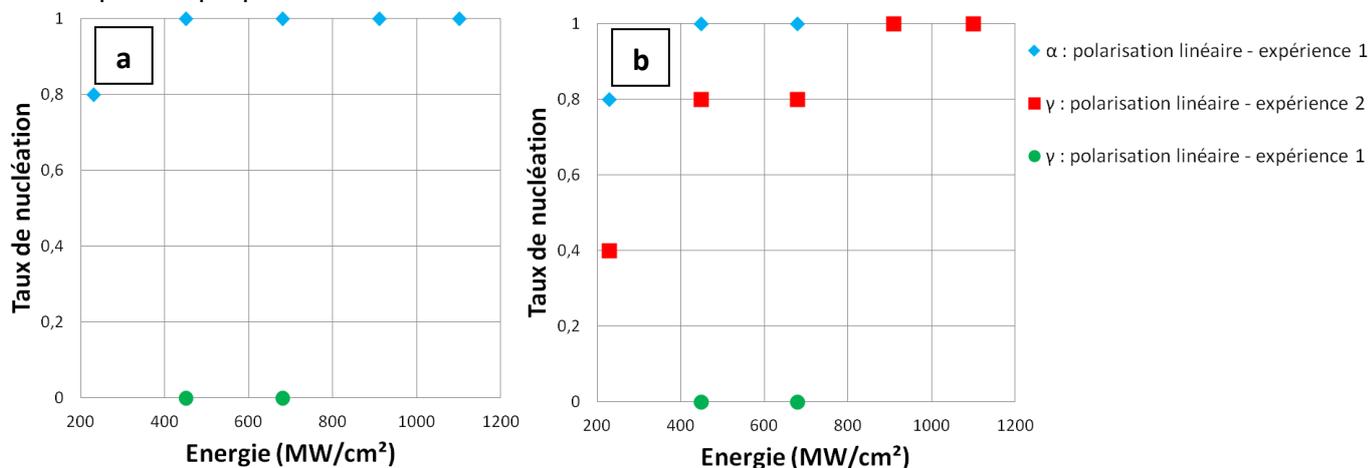


Figure 6-8 : Fraction des échantillons ayant cristallisés en fonction de la puissance. **(a)** : sursaturation de 1,45 à 17 °C pour une durée d'exposition de 60 secondes. **(b)** : concentration de 270 mg/mL pour une durée d'exposition de 60 secondes. Les expériences ont été faites avec 5 solutions dans chaque condition.

IV/ Méthodologie d'étude

L'étude a été la plus large possible en tenant compte de paramètres susceptibles de modifier la forme du cristal, le nombre de cristaux ainsi que le taux de formation des polymorphes. La

³⁴ En effet, à notre surprise, nous avons découvert qu'un lot de poudre G7126 provenant de Sigma Aldrich était composé du polymorphe γ alors qu'antérieurement, ce lot était composé du polymorphe α . Nous avons dès lors choisi d'étudier l'influence du polymorphe.

température d'étude est 17 °C et le temps d'exposition est de 60 secondes. Un seul paramètre a été modifié à la fois et les paramètres étudiés sont les suivants :

- origine du polymorphe,
- effet de la polarisation (linéaire ou circulaire),
- effet de la puissance,
- effet de la sursaturation,
- durée d'exposition.

Le choix de la température de 17 °C est motivé par l'unique observation du basculement des polymorphes en fonction de la polarisation à 532 nm à cette température [Sun^A 2006].

Le protocole d'étude utilisé est représenté schématiquement sur la figure 6-9 pour la polarisation linéaire dans H₂O et D₂O et sur la figure 6-10 pour la polarisation circulaire dans H₂O et D₂O. A une concentration fixée, un criblage en fonction de la puissance a été effectué. Enfin, au taux de nucléation maximal, nous avons fait varier la durée d'exposition. Dans le cas de D₂O, l'influence de la puissance a été mesurée uniquement avec la polarisation circulaire et pour le polymorphe α .

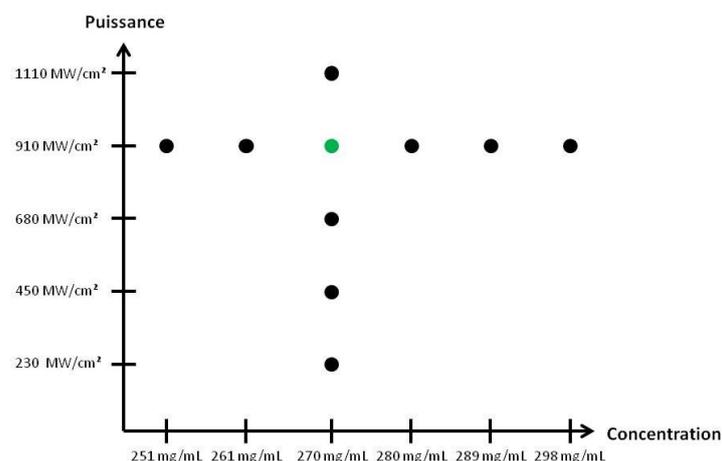


Figure 6-9 : Représentation du protocole d'étude utilisé pour la polarisation linéaire avec la concentration employée dans H₂O.

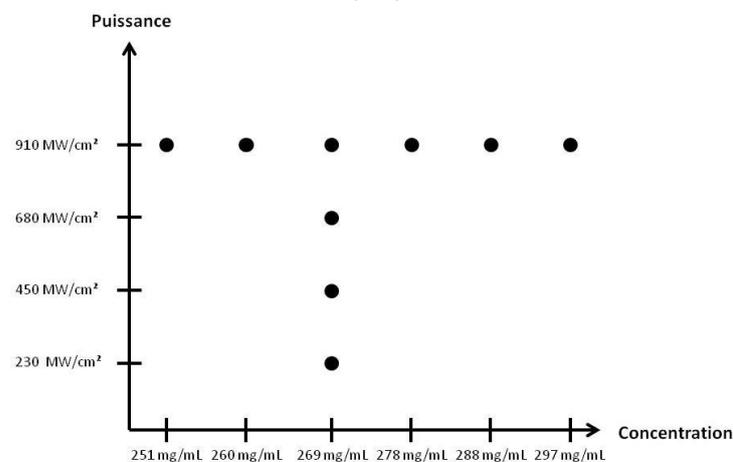


Figure 6-10 : Représentation du protocole d'étude utilisé pour la polarisation circulaire avec la concentration employée dans H₂O.

Dans H₂O, l'effet de la durée d'exposition a été étudié avec la polarisation linéaire ainsi que l'effet du temps de vieillissement avec les deux polarisations à une concentration de 270 mg/mL et à une puissance de 910 MW/cm² (point vert de la figure 6-9) selon le protocole représenté sur la figure 6-9.

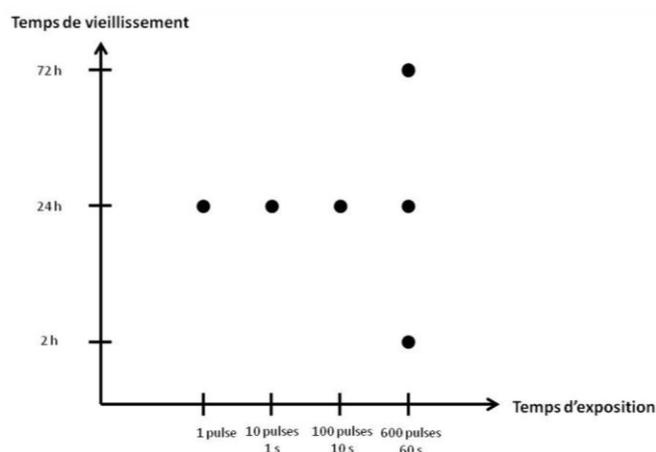


Figure 6-11 : Représentation du protocole utilisé pour étudier l'influence des durées d'exposition et du vieillissement.

Les informations qui peuvent être obtenues à partir des tubes sont résumées sur la figure 6-12. Ainsi, il est possible de savoir s'il y a eu nucléation ou non. Si il y a eu nucléation, il est possible de relever le site de nucléation ou plus exactement de croissance, d'identifier les polymorphes obtenus par utilisation de la spectroscopie Raman ou par identification visuelle comme expliqué dans le chapitre 5 (chapitre 5, IV-2) ainsi que le dénombrement des cristaux.

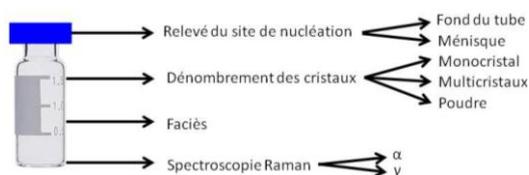


Figure 6-12 : Informations issues des tubes

V/ Efficacité de la nucléation en fonction de différents paramètres

V-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la puissance

Avant la mise en place du protocole (18 mois avant) détaillé au paragraphe IV, l'efficacité de la nucléation en fonction de la puissance a été étudiée avec le polymorphe α à une concentration de 270 mg/mL (correspondant à une sursaturation de 1,45) uniquement en polarisation linéaire et à une température de 290 K. Cette étude a été faite en utilisant les tubes HPLC.

La figure 6-13 montre le taux de nucléation *NPLIN* pour quatre énergies par impulsion : 50 mJ, 100 mJ, 250 mJ et 300 mJ (120 MW/cm², 240 MW/cm², 600 MW/cm², 720 MW/cm²). Deux séries expériences ont été conduites. Ce taux de nucléation augmente jusqu'à 600 MW/cm² quelles que soient les séries d'expériences. Au point de plus haute énergie (720 MW/cm²), les deux expériences donnent des taux différents : 0,58 et 1. Cela montre qu'aux hautes énergies, la reproductibilité devient moins bonne.

En utilisant le protocole décrit dans le paragraphe IV, l'effet de la puissance sur le taux de nucléation et sur le taux des formations des polymorphes a été étudié pour les polarisations linéaire et circulaire pour cinq énergies différentes : 50 mJ, 100 mJ, 150 mJ, 200 mJ et 250 mJ (230 MW/cm², 450 MW/cm², 680 MW/cm², 910 MW/cm², 1100 MW/cm²). Ces expériences ont été menées en partant du polymorphe α ou du polymorphe γ . La concentration dans H₂O employée est de 260 mg/mL. La même étude a été faite dans D₂O à la même concentration en polarisation circulaire pour un polymorphe α et pour trois énergies : 50 mJ, 100 mJ et 200 mJ.

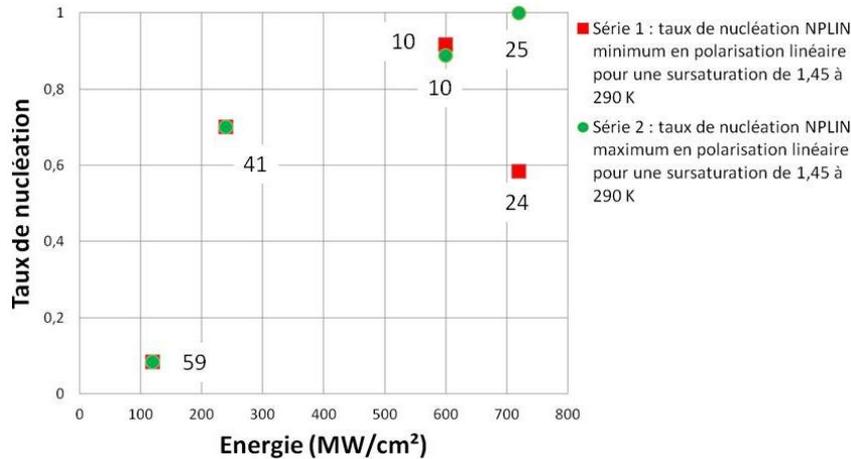


Figure 6-13 : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans H₂O à 17 °C pour une polarisation linéaire. Le nombre de tubes est indiqué à côté de chaque point.

Les figures 6-14a et 6-14b montrent la fraction des échantillons ayant cristallisés en fonction de la puissance du laser pour les deux polarisations et les différentes origines des polymorphes. La puissance a un effet direct dans le cas du polymorphe γ puisque le taux de nucléation augmente. Le polymorphe de départ a une influence et cela bien que la concentration soit identique. En effet, le taux de nucléation du polymorphe γ est plus faible que celui du polymorphe α . Le solvant D₂O a un effet important sur le taux de nucléation car il est faible aux basses énergies (figure 6-15). Toutefois, au delà de 910 MW/cm², le taux de nucléation est de 100 % et cela dans quasiment toutes les configurations.

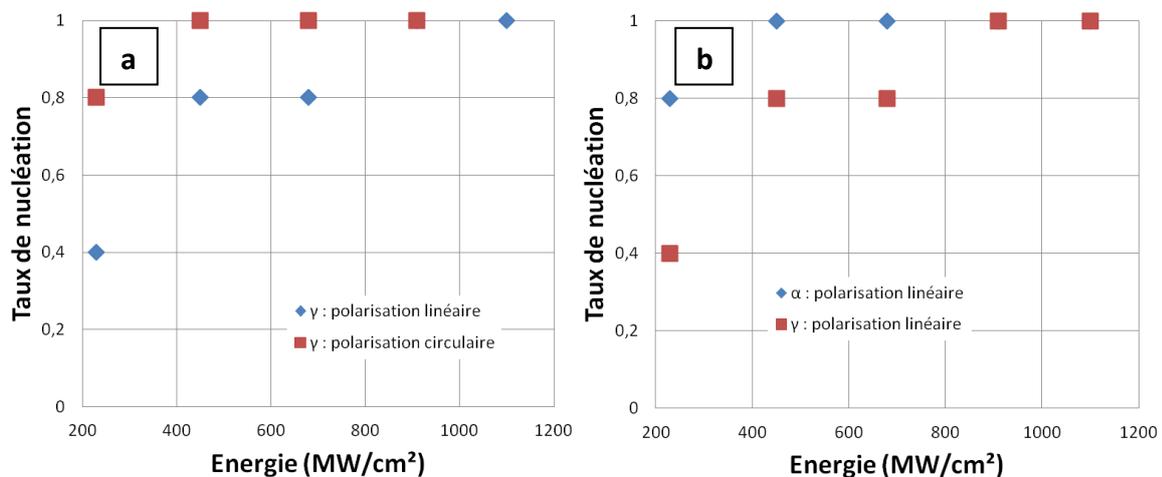


Figure 6-14 : (a) : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe γ dans H₂O, (b) : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans H₂O. 5 échantillons par point.

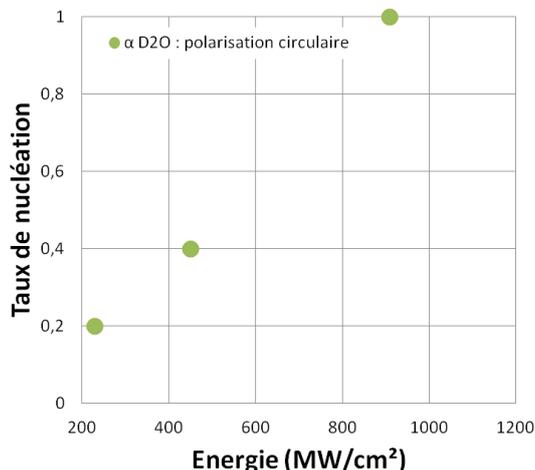


Figure 6-15 : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans D_2O . 5 échantillons par point.

V-2) Efficacité en fonction de la concentration

Avant la mise en place du protocole (8 mois avant) détaillé au paragraphe IV, l'efficacité de la nucléation en fonction de la concentration a été étudiée avec le polymorphe α à différentes concentrations uniquement en polarisation linéaire et à une température de 290K.

La figure 6-16 montre l'évolution du nombre de tubes présentant une nucléation à 17 °C à différents moments après l'exposition au laser. L'exposition ayant été effectuée au sein de la limite de zone métastable, nous pouvons affirmer que le laser a un effet sur les solutions en induisant la nucléation et en réduisant le temps d'induction en cristallisation spontanée de 168 h à quelques minutes seulement.

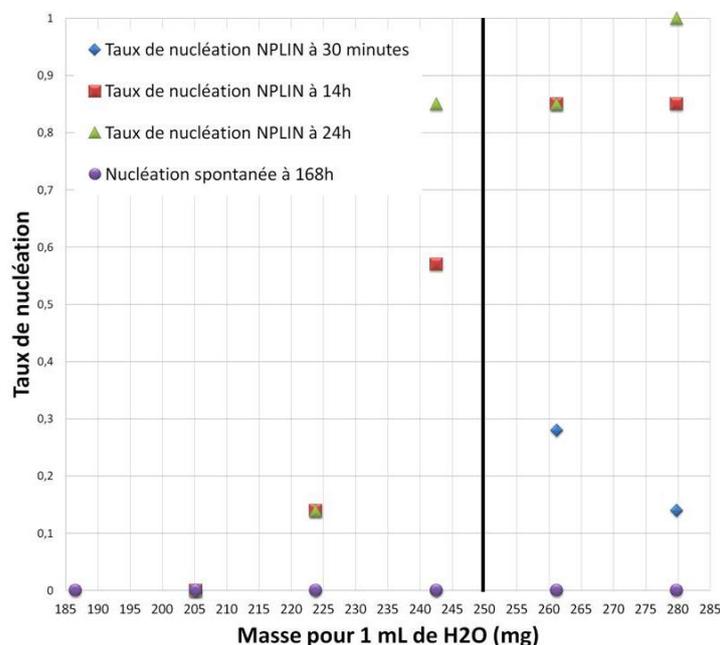


Figure 6-16 : Evolution du nombre de tubes ayant nucléé à 17°C à différents moments après l'exposition au laser suite à exposition à 1200 MW/cm². La barre noire montre le point à partir duquel le protocole a été fait.

La figure 6-17 présente le taux de nucléation pour la polarisation linéaire (6-17a) et circulaire (6-17b) pour les polymorphes α et γ dans H_2O et D_2O .

Polymorphe α , H_2O : les taux de nucléation diminuent à la concentration de 263 mg/mL avant de remonter pour atteindre 1 au delà d'une concentration de 269 mg/mL pour la polarisation linéaire. On remarque une seconde diminution du taux de nucléation à 280 mg/mL et à 285 mg/mL pour la polarisation circulaire.

Polymorphe γ , H_2O : les taux de nucléation ont tendance à augmenter et atteignent le taux maximum pour les concentrations supérieures à 270 mg/mL (respectivement 280 mg/mL) pour la polarisation linéaire (respectivement circulaire). Le taux de formation de la polarisation circulaire suit celui de la polarisation linéaire [6 – 6]. L'efficacité de l'accrétion avec la polarisation est relativement moins efficace, ce qui semble montrer que la perturbation du système induite par le laser P_{LASER} est moins importante de telle sorte que :

$$P_{LASER,CP}(C) = P_{LASER,LP}(C - \Delta C_{LP/CP}) [6 - 6]$$

Polymorphe α , D_2O : les résultats montrent et confirment que la polarisation circulaire a une efficacité moindre. De plus, l'efficacité dans D_2O est plus faible que dans H_2O .

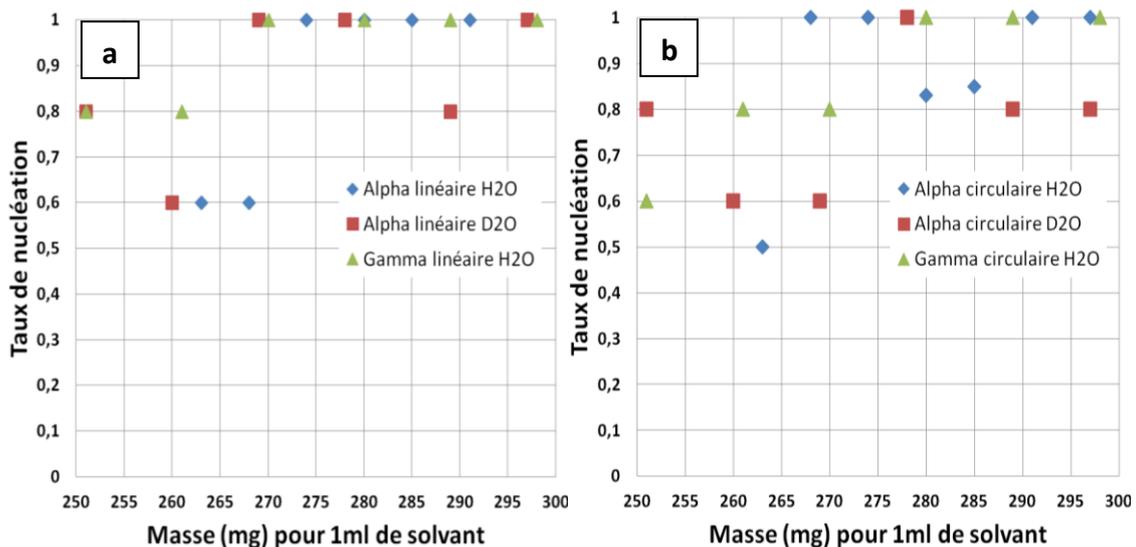


Figure 6-17 : Taux de nucléation au bout de 24 h à 17 °C et exposés à une énergie de 910 MW/cm². 5 échantillons par point.
(a) polarisation linéaire
(b) polarisation circulaire

V-3) Efficacité en fonction du temps de vieillissement

Le vieillissement ou « *aging time* » a été étudié afin de voir si le vieillissement modifiait le taux de nucléation. Cette expérience est motivée par la possible existence de pré-« *clusters* » au sein de la solution : le temps de vieillissement est supposé augmenter la taille de ces pré-« *clusters* » et donc réduire le temps de nucléation.

Cette hypothèse fait suite aux travaux détaillés dans le chapitre 1 (chapitre 1, III-2) et le chapitre 3 (chapitre 3, I-5) qui montrent l'existence d'agrégats parfois de grande taille en

solution et à ceux de Garetz *et al.* qui montraient que le temps de vieillissement avait une incidence ([Garetz 1996], [Garetz 2002]). Toutefois, ce dernier n'a pas été confirmé sur l'urée par Jelena Matic [Matic 2005a, 2005b] montrant ainsi l'absence d'influence du vieillissement.

Les tubes maintenus à 17 °C ont été exposés aux deux polarisations à une énergie de 910 MW/cm². Trois lots ont été étudiés : un lot de tubes conservés à température pendant 2 h, un second lot stocké pendant 24 h et un troisième pendant 72 h. La concentration employée est 280 mg/mL correspondant à une sursaturation de 1,5 pour le polymorphe α et 1,67 pour le polymorphe γ . La figure 6-18 synthétise ces résultats. Le vieillissement n'a pas, en l'état des résultats, d'influence notable sur l'efficacité de la nucléation.

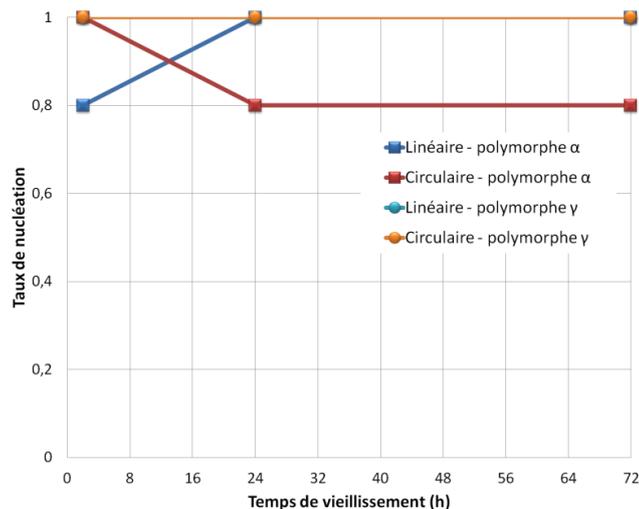


Figure 6-18 : Evolution du taux de nucléation en fonction du temps de vieillissement 3 h après l'exposition. 5 échantillons par point.

V-4) Efficacité en fonction de la durée d'exposition

L'influence de la durée d'exposition a été étudiée : les solutions d'une concentration de 270 mg/mL à 17°C ont été exposées uniquement à la polarisation linéaire avec une énergie 200 mJ (910 MW/cm²). La variable étudiée est la durée d'exposition allant de 1 pulse à 600 pulses ce qui correspond à une durée d'exposition de 60 s soit les conditions habituelles. Le tableau 6-2 résume ces résultats.

Nombre d'impulsion	1	10	100	600
α : polarisation linéaire : fraction des échantillons ayant cristallisés	0	1	0,75	1
γ : polarisation linéaire : fraction des échantillons ayant cristallisés	0	0,5	1	1

Tableau 6-2 : Evolution de la fraction des échantillons ayant cristallisés en fonction de la durée d'exposition traduite en nombre d'impulsions. 4 échantillons pour chaque condition.

L'évolution du taux de nucléation dépend très fortement du temps d'exposition et atteint son maximum au bout d'une seconde pour le polymorphe α et 10 secondes pour le polymorphe γ . Au bout de 60 secondes, le taux maximum est atteint, ce qui confirme les résultats présentés ci-dessous (voir IV-1). Il est à noter que cette expérience a été menée sur

seulement quatre tubes pour chaque condition, ce qui ne permet pas d'avoir une statistique satisfaisante.

Néanmoins, cette étude a montré qu'une durée d'exposition d'une seconde à 910 MW/cm² est suffisante pour stimuler la nucléation, qu'à 10 secondes, le taux de nucléation est supérieur à 75 % et maximale au-delà et qu'une seule impulsion n'est pas suffisante pour induire la nucléation.

VI/ Site de nucléation

Nous avons observé la chute de cristaux vers le fond du tube (figure 6-7). Ce comportement est reproductible. Fort de ce constat, l'étude du site de nucléation a été effectuée afin d'observer d'éventuelles structures se formant en fonction des sursaturations.

VI-1) Observation du site de nucléation

Le relevé du site de nucléation concerne deux sites possibles : le ménisque et le fond du tube. La nucléation sur les parois a été trop peu observée pour la considérer comme reproductible et donc significative. La figure 6-19 montre une photographie de deux tubes ayant des cristaux à la fois au ménisque et au fond du tube. Dans cet exemple, les cristaux au ménisque possèdent une répartition : un monocristal (figure 6-19a), plusieurs cristaux (figure 6-19b). Les rectangles rouges montrent les cristaux au ménisque. Les tailles des cristaux présentent une grande dispersion : le plus gros monocristal mesuré (figure 6-20) avait une longueur de 6 mm, le plus petit monocristal présent dans un ensemble de monocristaux au sein d'un même tube avait une dimension de 0,5 mm.

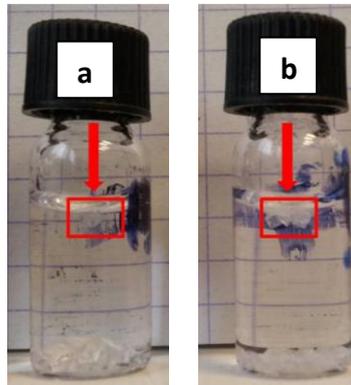


Figure 6-19 : Photographie de deux tubes ayant des cristaux à la fois au ménisque et au fond du tube. Les deux tubes sont constitués d'une solution de α glycine à une sursaturation de 1,5 à 17 °C soit une concentration de 280 mg/mL.

L'observation du site de nucléation se fait visuellement en sortant le tube HPLC de son logement. Il est possible d'observer les cristaux tombés mais la configuration optique empêche d'observer la nucléation au ménisque à l'exception de gros monocristaux comme le montre la figure 6-20 en observant l'ombre portée.

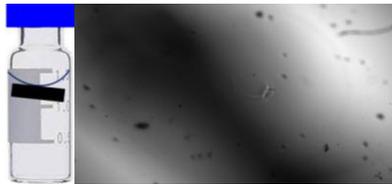


Figure 6-20 : Photographie de l'ombre portée sur le fond du tube par un gros monocristal de glycine α ayant nucléé au ménisque dans la configuration donnée par l'image de gauche.

La figure 6-21 montre la croissance d'aiguille du polymorphe γ (figure 6-21a et 6-21d) de la glycine à partir du ménisque (figure 6-21c). La position du ménisque est représentée par la courbe bleue. La figure 6-21b montre l'agrégat situé à la base du ménisque dont la surface fait 4,90 mm² ce qui correspond globalement à la surface du laser 3,14 mm². Cela montre l'effet spatial du laser sur la nucléation : une agrégation se forme dans la zone irradiée suivie de la croissance. Les effets du laser ont des implications légèrement au-delà de la zone irradiée.

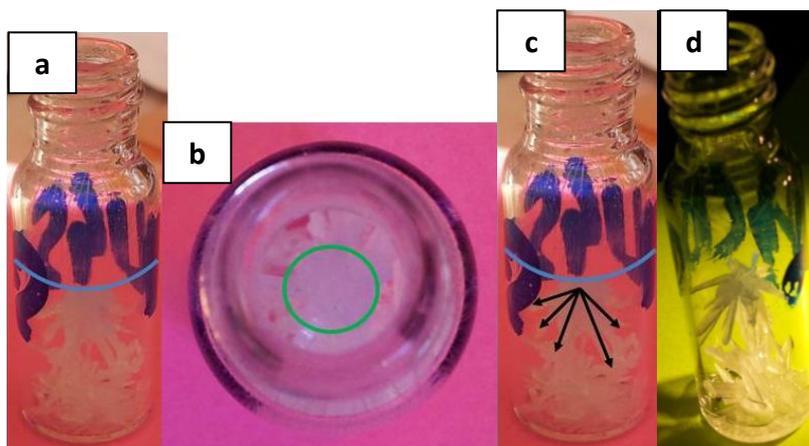


Figure 6-21 : Démonstration de l'effet d'agrégation dû au laser au niveau du ménisque.

(a) : photographie de croissance de cristaux à partir du ménisque (γ , 145 %, D₂O, linéaire).

(b) : surface de l'agrégation au niveau du ménisque environ égale à celle du laser.

(c) : représentation des directions de croissance des aiguilles à partir du ménisque.

(d) : photographie de cristaux ayant crû à partir du ménisque (α , 145 %, H₂O, linéaire).

Le tableau 6-3 montre les paramètres utilisés dans l'expérience du relevé du site de nucléation pour les deux formes de la glycine et pour trois différentes concentrations. Les tubes ont été exposés à une polarisation linéaire, à 17 °C, et à une énergie de 200 mJ (910 MW/cm²).

Masse correspondante pour 1 mL pour le polymorphe α (mg)	242	280	317
Masse correspondante pour 1 mL pour le polymorphe γ (mg)	242	280	317
Nombre de solutions pour chaque condition	6	6	6

Tableau 6-3 : Concentrations utilisées pour le relevé du site de nucléation.

La figure 6-22 montre l'évolution du site de nucléation spontanée observé en fonction de la sursaturation de la solution en glycine α ou γ dans les mêmes conditions à 17 °C. On remarque que dans le cas du polymorphe γ , uniquement le fond du tube HPLC a été observé comme site de nucléation. Cela peut s'expliquer par le fait qu'uniquement des gros monocristaux ont été observés et pas de petits cristaux comme le montre la figure 6-19. A contrario, dans le cadre du polymorphe α , des cristaux se forment au ménisque dans une proportion inférieure à celle observée pour le polymorphe γ en nucléation spontanée.

Toutefois, dans tous les cas, le ménisque comme seul site de nucléation n'est pas observé.

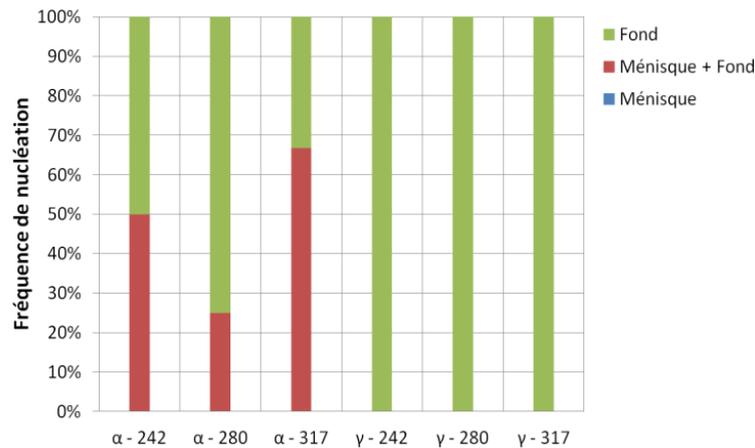


Figure 6-22 : Evolution de l'implication des sites de nucléation spontanée en fonction de la sursaturation pour les deux polymorphes α et γ de la glycine à 17 °C.

La figure 6-23 montre les différents sites de nucléation obtenus pour différentes concentrations (à 17 °C) après une exposition de 60 s à 532 nm à une densité d'énergie de 840 GW/cm² sur des solutions de glycine α et γ à concentration égale. On remarque qu'à basse concentration (242 mg / mL), le ménisque est le seul site de nucléation dans 80 % des cas. Au delà (280 mg / mL et 317 mg / mL), le ménisque n'apparaît quasiment plus comme unique site de nucléation mais est conjugué avec le fond du tube. Toutefois, plus la concentration augmente, plus l'implication du fond du tube comme site de nucléation augmente alors que celle du ménisque reste constante à quelques variations près.

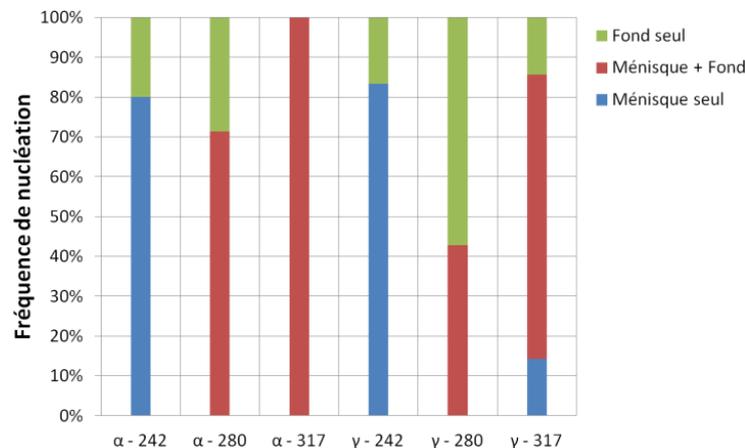


Figure 6-23 : Evolution de l'implication des sites de nucléation en fonction de la sursaturation pour les deux polymorphes α et γ de la glycine exposé à une énergie de 840 GW/cm² à 17 °C.

Ces résultats tendraient à montrer que le site de nucléation principal est le ménisque et que le fond du tube n'est qu'un site de croissance après que des germes sont tombés sur le fond du tube comme le montre la figure 6-7. En effet, lorsque la concentration est faible, un cristal ou plusieurs petits cristaux peuvent grossir au ménisque et y rester. Lorsque la concentration est plus élevée, il y a plus de molécules à disposition pour la croissance cristalline, plusieurs cristaux peuvent croître simultanément et s'agréger. Dans certains cas, ces cristaux peuvent tomber notamment lorsqu'il y a un choc mécanique, un contact

ménisque - cristal faible. Néanmoins, cette interprétation devrait être confirmée par des mesures *in situ*.

VI-2) Interactions entre le faisceau laser et l'interface air / solution

Les résultats tendent à montrer que le ménisque est un site de nucléation majeur alors que le fond du tube HPLC est un site principalement de croissance. Le changement de la géométrie n'explique pas tout et il est possible que cela ne fasse que stimuler certaines prédispositions du systèmes à nucléer au ménisque. Lors de la préparation des tubes, le soluté est placé au fond du tube puis le solvant est ajouté comme le montre des étapes 1 à 4 de la figure 6-24. Lors de la préparation des tubes, du soluté s'accroche sur le ménisque. Après la dissolution, il n'est plus possible de voir à l'oeil nu des agrégats situés au ménisque mais cela n'exclut en rien la possibilité que des agrégats de taille microscopique ou nanoscopique se situent au ménisque ou aux environs du ménisque.

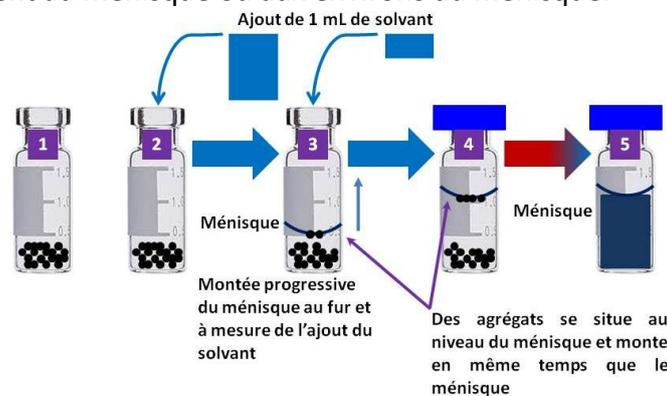


Figure 6-24 : Etape de fabrication des tubes montrant la possibilité que des éléments du soluté s'accrochent au ménisque lors de la montée du solvant dans le tube HPLC.

Un mécanisme expliquant l'importance du ménisque comme lieu de nucléation est schématiquement représenté sur la figure 6-25. D'un point de vue chronologique, il se situe entre les étapes 4 et 5 de la figure 6-24. Des agrégats sont accrochés au ménisque avant la dissolution (étape 1), la montée en température implique la dissolution et une réduction des agrégats au ménisque (étape 2), après le refroidissement et la mise à température d'expérience des agrégats restent au niveau du ménisque (étape 3), enfin lorsque le laser est appliqué il passe par l'interface et les forces (transmission de moment par l'interaction laser - matière, puits de potentiel et force électromagnétique dû à l'interaction, dipôle-champ électrique) rapprochent les agrégats le long de la courbure du ménisque aboutissant à la nucléation (étape 4).

Les cristaux tombent verticalement comme l'illustre la figure 6-26. La chute se fait à proximité du point du laser le plus intense. En effet, dans certains cas le laser endommageait légèrement le fond du tube. Ce que montre la figure 6-25 c'est qu'un cristal s'est formé au ménisque sous la zone d'intensité la plus forte (dans ce cas 1,2 GW/cm² pour une solution de 1,5 d'une solution de α glycine à une sursaturation à 17 °C soit une concentration de 280 mg / mL.) car il tombe à proximité de l'endommagement de surface. La formation de multicristaux est en réalité une superposition de plusieurs monocristaux qui se chevauchent comme le montre la figure 6-27.

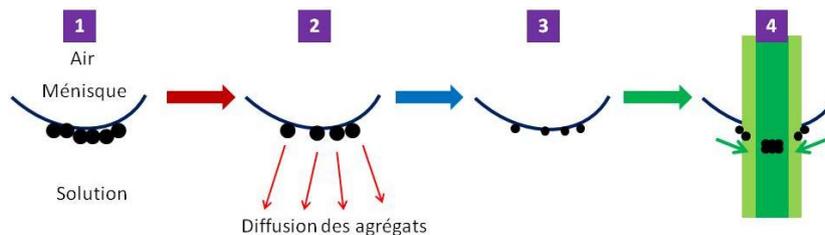


Figure 6-25 : Schéma expliquant la nucléation au ménisque dans le cas de la glycine.

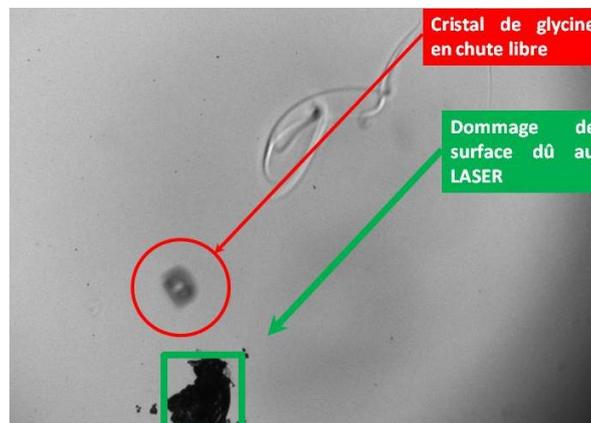


Figure 6-26 : Démonstration de la chute d'un cristal à proximité du point ayant été touché par la plus grande intensité du laser. La solution de α glycine est à une sursaturation de 1,5 à 17 °C soit une concentration de 280 mg/mL et l'énergie est de 1,2 GW/cm².



Figure 6-27 : Photographie montrant l'effet de chevauchement de cristaux aboutissant à des multicristaux.

Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience supplémentaire a été conduite. Elle consiste à vérifier si lorsqu'on évite le dépôt d'agrégat au niveau du ménisque, l'occurrence de l'observation d'un cristal au ménisque diminue. Dans cette expérience, la poudre a été dissoute dans un erlenmeyer selon la méthode 2 expliquée dans le chapitre 5 (chapitre 5, II-1) puis les tubes ont été remplis avec une pipette un à un. Une masse de 269 mg/mL de H₂O a été prise pour le polymorphe α . La dissolution ayant déjà eu lieu avant le pipetage, le mécanisme proposé figure 6-25 n'est plus valide. Toutefois, il a été observé que le ménisque était un lieu où un cristal était observé en moyenne dans 70 % des tubes. Cela montre que même lorsque de la poudre macroscopique n'est pas adsorbée au niveau du ménisque lors de la préparation des tubes, le ménisque reste un site de nucléation et de croissance (le fond du tube étant au moins un site de croissance).

VI-3) Site de nucléation en fonction de la puissance

L'influence de la puissance sur le site de nucléation a été relevée. Les figures 6-28 et 6-29 montrent l'évolution de l'implication des sites de nucléation dans H₂O pour les polymorphes α et γ et les deux polarisations.

On remarque une différence entre polarisation circulaire et linéaire sur le lieu de nucléation. En effet, avec la polarisation circulaire on obtient la même fraction des tubes avec une nucléation au fond du tube et au ménisque sans effet de l'énergie. La polarisation linéaire modifie ces constats avec une fraction de nucléation au ménisque plus faible.

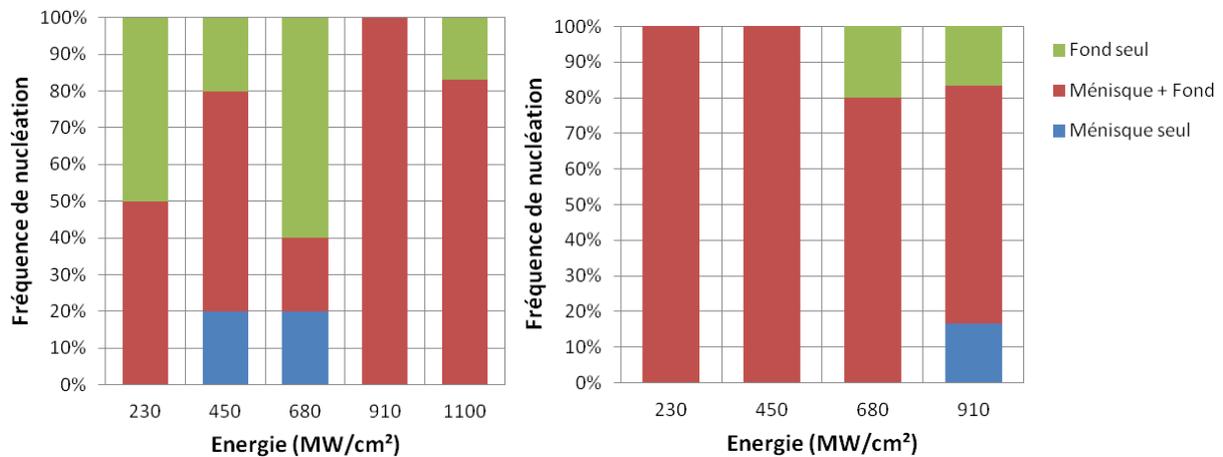


Figure 6-28 : Evolution de l'implication des sites de nucléation induite par laser en fonction de l'énergie pour le polymorphe α dans H_2O à 17 °C. 5 tubes par densité d'énergie.
(droite) polarisation circulaire.
(gauche) polarisation linéaire.

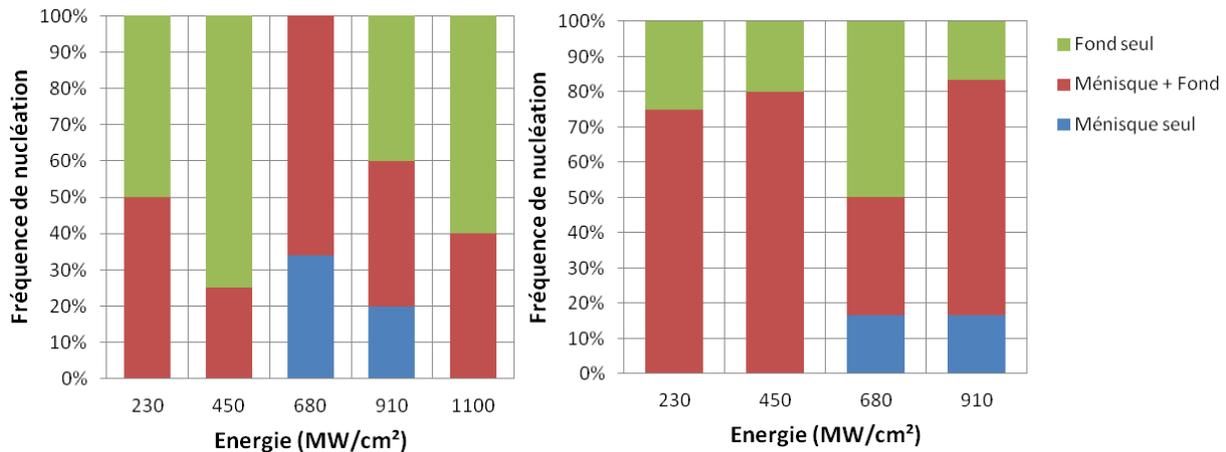


Figure 6-29 : Evolution de l'implication des sites de nucléation induite par laser en fonction de l'énergie pour le polymorphe γ dans H_2O à 17 °C. 5 tubes par densité d'énergie.
(droite) polarisation circulaire.
(gauche) polarisation linéaire.

VI-4) Discussion

Le lieu de nucléation est très important afin de contrôler spatialement la nucléation. Il a été démontré la possibilité de contrôler temporellement et spatialement la nucléation avec un laser continu par l'emploi de la focalisation ([Yuyama 2012b], [Miura 2013]) : la cristallisation d'un monocristal au niveau du point focal a été obtenu par Miura *et al.* [Miura 2013]. Le contrôle spatial de la nucléation en utilisant un laser nanoseconde n'a pas été démontré puisqu'aucun cristal n'a été produit à un endroit souhaité.

Liu *et al.* [Liu^B 2013] ont démontré que le ménisque était un site de nucléation principal. La géométrie est la même que la nôtre (configuration n°5, figure 2-2, chapitre 2 et figure 6-6).

En-dessous de 10 Hz du taux de répétition, la nucléation a lieu uniquement au ménisque et aucune nucléation en-dessous de 5 Hz. Toutefois, au-dessus de 10 Hz la fraction du tube avec une nucléation au fond du tube augmente de 50 % (10 Hz) à 80 % (100 Hz) [Liu^B 2013]. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le taux de nucléation dépend très fortement du site de focalisation : le taux est maximal au ménisque, de 60 % au fond du tube et de 20 % à 40 % au sein de la solution [Liu^B 2013], montrant là aussi une disposition à une nucléation au ménisque. Ils concluent que le ménisque est le site le plus efficace pour la nucléation par laser femtoseconde.

Rejoignant l'hypothèse émise plus haut, les auteurs de l'étude pensent que les molécules de glycine pourraient être adsorbées à l'interface et le laser aurait pour effet de diminuer la barrière d'énergie de la transition solution - cristal ([Weissbuch 1990], [Sugimura 1994]). Les observations que nous avons faites nous permettent de conclure à la même hypothèse mais cette fois-ci pour un laser nanoseconde.

VII/ Faciès et dénombrement des cristaux

VII-1) Dénombrement des cristaux

Le rdénombrement des cristaux au sein des tubes a été fait en classant les tubes de la manière suivante : MC(1) correspond à un tube avec un seul monocristal, MC(n) correspond à l'obtention de monocristaux disjoints (en général, n est compris entre 2 et 4), MC(N) correspond à des cristaux joints ou très nombreux et de petite taille³⁵, P correspond à la formation d'une poudre ressemblant à celle de départ. L'influence de la puissance, de la concentration et de la durée d'exposition a été étudiée afin d'observer une corrélation entre le dénombrement des cristaux et ces paramètres.

VII-1-1) En fonction de la puissance

Les figures 6-30 et 6-31 montrent l'évolution des types de cristaux obtenus en fonction de l'énergie dans H₂O pour les polymorphes α et γ à 17 °C, les deux polarisations et une concentration de 270 mg/mL. La polarisation circulaire produit majoritairement des MC(N) agglomérés avec la production de poudre aux hautes énergies (680 MW/cm² et 910 MW/cm²). A ces mêmes énergies mais pour une origine γ , on remarque la formation de monocristaux.

Ces monocristaux sont formés avec une polarisation linéaire dans les mêmes conditions que précédemment à toutes les énergies. Comparé à celui obtenu à partir du polymorphe α , ce dernier montre que les monocristaux ne sont pas formés à 910 MW/cm² et 1100 MW/cm². Globalement, la tendance est à une très forte obtention de polycristaux au sens large (incluant MC(n) et MC(1)) et une forte obtention de polycristaux (au sens de MC(N)).

³⁵ Les monocristaux (MC(1) et MC(n)) varient de 5 mm à 11 mm de longueur et de 5 mm à 2 mm de largeur, les cristaux joints (MC(N)) varient de 2 mm à 5 mm que ce soit pour la longueur ou la largeur.

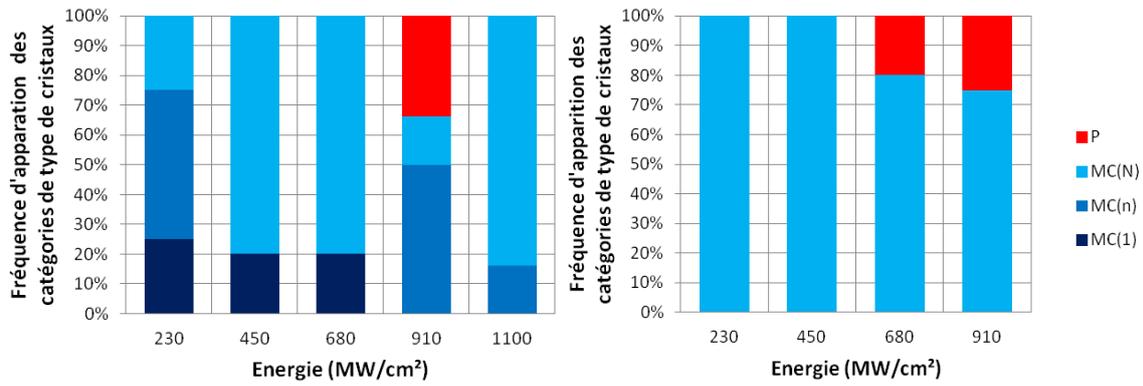


Figure 6-30 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine α dans H_2O . 5 tubes par densité d'énergie.
(droite) : pour une polarisation circulaire.
(gauche) : pour une polarisation linéaire.

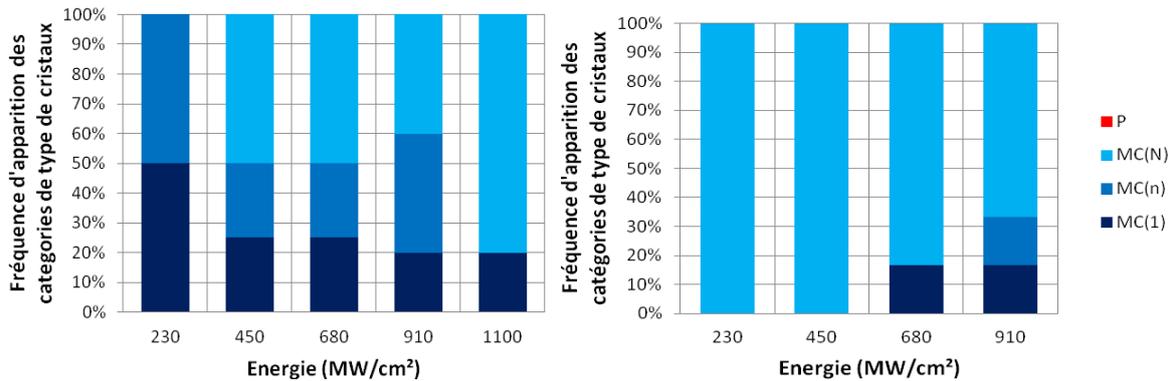


Figure 6-31 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine γ dans H_2O . 5 tubes par densité d'énergie.
(droite) : pour une polarisation circulaire.
(gauche) : pour une polarisation linéaire.

VII-1-2) En fonction de la concentration

L'influence de la concentration sur le dénombrement des cristaux a été relevée après une exposition à 910 MW/cm² pendant 60 secondes (figure 6-32 et figure 6-33). Globalement, ce sont principalement des MC(N) qui sont formés avec plus rarement la formation de deux ou trois cristaux. Il n'y a pas de structure qui se dégage mis à part la formation à toutes les concentrations de monocristaux (MC(1)) pour la polarisation linéaire (figures 6-32 et 6-33).

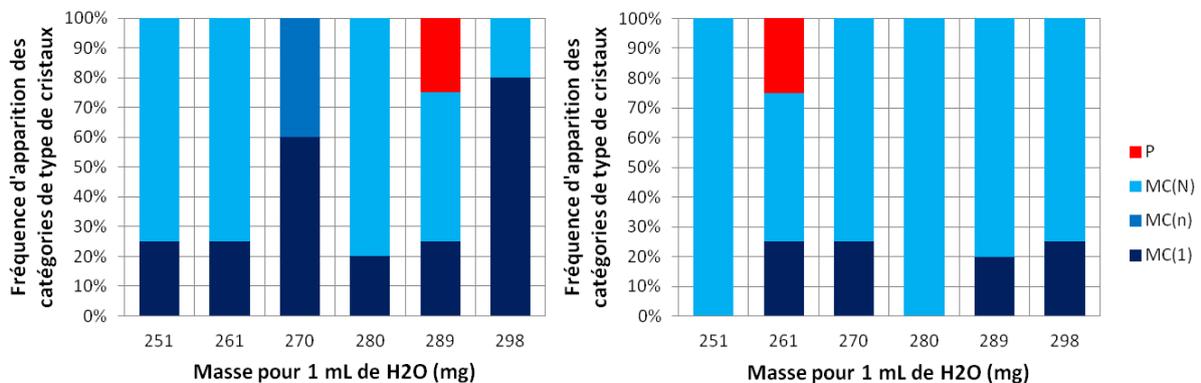


Figure 6-32 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine γ dans H_2O . 5 tubes par concentration.
(droite) : pour une polarisation circulaire.
(gauche) : pour une polarisation linéaire.

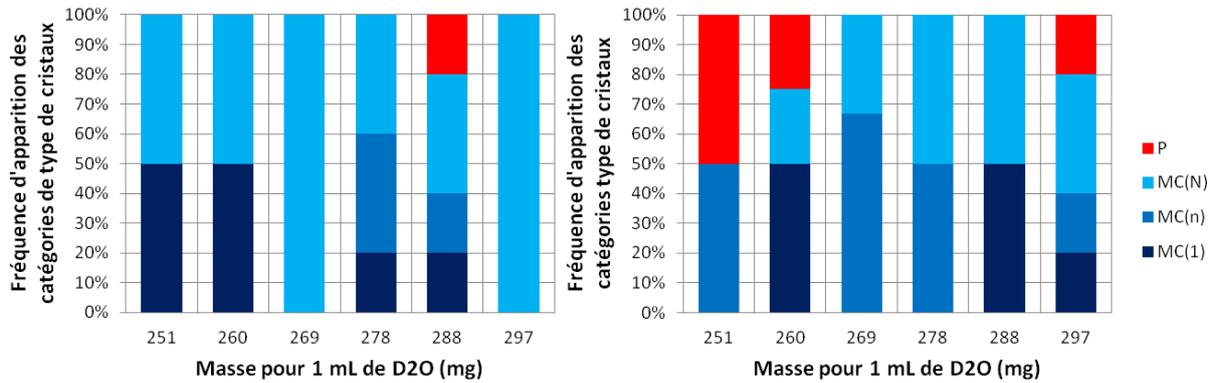


Figure 6-33 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine α dans D_2O . 5 tubes par concentration.
(droite) : pour une polarisation circulaire.
(gauche) : pour une polarisation linéaire.

VII-1-3) En fonction de la durée d'exposition

Le dénombrement des cristaux montre une forte tendance à la formation de MC(N) (figure 6-34) et minoritairement, on obtient des monocristaux (MC(1)). Dans le cas du polymorphe α , on remarque l'apparition d'une forme poudre. Cette apparition comme on l'a vu plus haut est ponctuelle et ne semble pas évoluer en fonction de la durée d'impulsion *a contrario* de l'effet de la puissance. On retiendra que la durée d'impulsion n'a pas d'effet sur la typologie des cristaux obtenus, sur le type de polymorphe obtenu hormis sur le taux de nucléation lui-même.

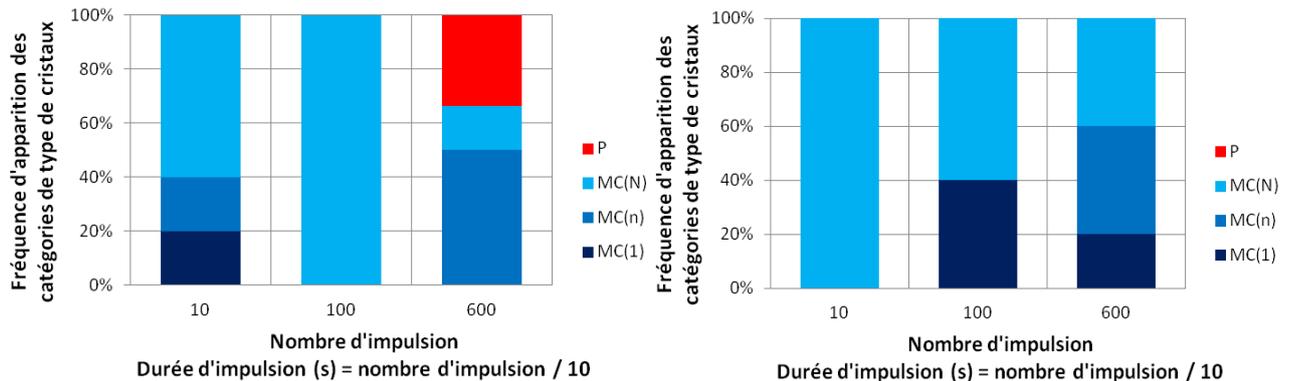


Figure 6-34 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction du nombre d'impulsions. 5 tubes par nombre d'impulsion.
(droite) : pour une origine γ .
(gauche) : pour une origine α .

VII-2) Faciès

La figure 6-7 a montré l'existence d'au moins trois différents faciès. Ces trois faciès sont du polymorphe α bien que le polymorphe d'origine soit γ et que lui-même ait un faciès différent comme le montre la figure 6-35.

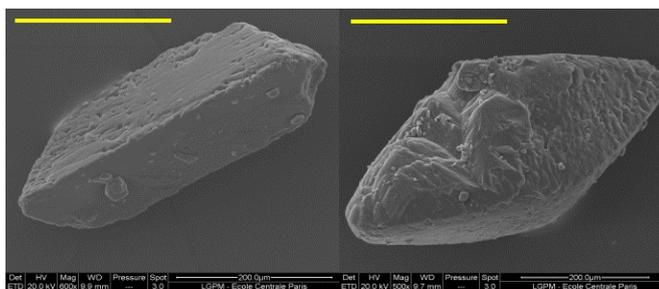


Figure 6-35 : Image MEB d'un constituant de la poudre du polymorphe commerciale α (gauche) et de la poudre commerciale du polymorphe γ (droite). Le trait noir représente 200 μm .

VII-2-1) Faciès de nucléation spontanée

Le contrôle du faciès présente un des nombreux avantages possibles de la technique *NPLIN* comme nous allons le montrer. Afin de différencier les faciès obtenus par *NPLIN* de ceux de nucléation spontanée, une bibliographie a été rédigée (I-6, chapitre 3) puis des expériences de nucléation spontanée ont été réalisées. Ces expériences croisées avec la bibliographie ont permis d'établir qu'il existe un faciès obtenu très majoritairement avec la nucléation spontanée en solution aqueuse ([Srinivasan^A 2007], [Poornachary 2007], [Rabesiaka 2010]). Il est montré dans la figure 6-36.

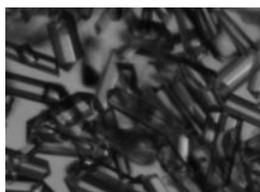


Figure 6-36 : Polymorphe α de la glycine obtenu à 17 °C en nucléation spontanée à partir de la poudre du polymorphe γ .

VII-2-2) Faciès obtenus par nucléation induite par laser

Les faciès obtenus par la nucléation induite par laser lors des expériences où la concentration était le paramètre étudié ont été relevés. Toutefois, ces relevés ont été limités par certaines situations (figure 5-10, chapitre 5). Le tableau 6-4 montre les faciès obtenus et les conditions dans lesquelles ils ont été observés : concentration, énergie, polarisation, solvant et polymorphe d'origine. Ces faciès ont tous été formés à 910 MW/cm² et certains d'entre eux à 1200 MW/cm² (n°1, 2 et 3).

Faciès indépendants des conditions de nucléation : n°5, 6, 7. Le faciès n°9 a été obtenu dans toutes les conditions de nucléation, mais il est le seul à être obtenu pour les concentrations supérieures à 270 mg/mL.

Faciès spécifiques à D₂O : n°10 et 11. Cela montre ainsi l'effet du solvant sur le faciès. Il est à noter que le faciès n°11 a aussi été obtenu précédemment dans une solution aqueuse contenant du KCl [Yogambal 2014].

Faciès spécifique à H₂O : n°1, 2. Ces faciès n'ont été obtenus que dans H₂O, montrant là aussi un effet du solvant sur le faciès.

Faciès du polymorphe α : n°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Faciès du polymorphe γ : n°9, 10, 11.

Faciès indépendant à l'origine du polymorphe : n°5 et 6 pour le polymorphe α , n°9, 10, 11 pour le polymorphe γ .

Faciès obtenus dans des conditions uniques : n°4 et 8. Ces deux faciès ont été obtenus dans H₂O pour une seule concentration et une seule polarisation. La littérature ne les a pas recensés ce qui tend à montrer que c'est la première fois qu'ils sont obtenus. Toutefois, il n'est pas exclu, au vu de leurs ressemblances, que le faciès n°4 soit une croissance en cours du faciès n°6.

Le faciès n°2 a déjà été obtenu en nucléation induite par laser [**Masuhara 2011**] sans pour autant l'associer à un polymorphe. Les faciès n°6 et 11 ont été obtenus en nucléation spontanée ([**Srinivasan^A 2007**], [**Poornachary 2007**], [**Rabesiaka 2010**], [**Yogambal 2014**]). La plupart des faciès du tableau 6-4 sont rapportés pour la première fois, en particulier après une nucléation induite par laser.

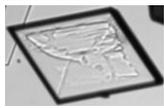
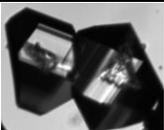
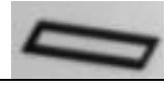
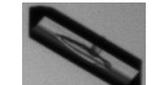
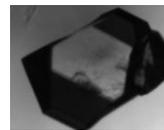
N°	Photo du faciès	Polymorphe d'origine	Polymorphe identifié	Solvant	Polarisation	Densité d'énergie	Masse (mg) pour 1 mL	Faciès de référence
1		α	α	H ₂ O	LP, CP	1200 MW/cm ² 910 MW/cm ²	270, 274, 280, 285, 297	g
2		α	α	H ₂ O	LP, CP	1200 MW/cm ² 910 MW/cm ²	263, 268, 270, 274, 280, 285, 291, 297	i
3		α	α	H ₂ O D ₂ O	LP CP	1200 MW/cm ² 910 MW/cm ²	270 278	f
4		α	α	H ₂ O	LP	910 MW/cm ²	251	
5		α γ	α	H ₂ O, D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	274, 280, 285, 291, 297	d
6		α γ	α	H ₂ O, D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	251, 274, 280, 285, 297	a, b, c
7		α	α	H ₂ O, D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	269, 274, 280, 285, 291, 297	
8		α	α	H ₂ O	LP	910 MW/cm ²	280	
9		α γ	γ	H ₂ O, D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	285, 291, 297	
10		α γ	γ	D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	251, 260, 269, 278, 288, 297	
11		α γ	γ	D ₂ O	LP, CP	910 MW/cm ²	251, 260, 269, 278, 288, 297	

Tableau 6-4 : Recensement des différents faciès et de leurs conditions d'obtention obtenus par nucléation induite par laser. Les faciès sont rapportés à ceux recensés dans le tableau 3-2, chapitre 3.

VIII/ Etude du polymorphisme

VIII-1) Suivant la puissance

L'effet de la puissance sur la distribution des polymorphes est un paramètre qui n'a pas été étudié en détail jusqu'à maintenant dans la littérature. Les figures 6-37 et 6-38 représentent sous forme d'histogrammes la distribution des polymorphes en fonction de l'énergie pour les deux origines : le polymorphe α et le polymorphe γ . Il y a des situations dans lesquelles les deux polymorphes sont formés simultanément.

Le relevé de la distribution polymorphique en fonction de la puissance a été fait uniquement dans le cas de H₂O. On remarque deux comportements suivant la polarisation. Avec la polarisation linéaire, il y a une production majoritaire du polymorphe α et cela pour toutes les énergies. Il y a une tendance à la réduction de la formation de la polymorphe γ pour une poudre d'origine α : à 230 MW/cm² et 450 MW/cm². Un tel comportement n'est pas observé avec le polymorphe γ comme origine. Avec la polarisation circulaire, il y a une augmentation de la formation du polymorphe γ qui croît à 45 %. Pour les deux polarisations, la tendance est à l'augmentation du taux de formation du polymorphe α pour une augmentation de l'énergie.

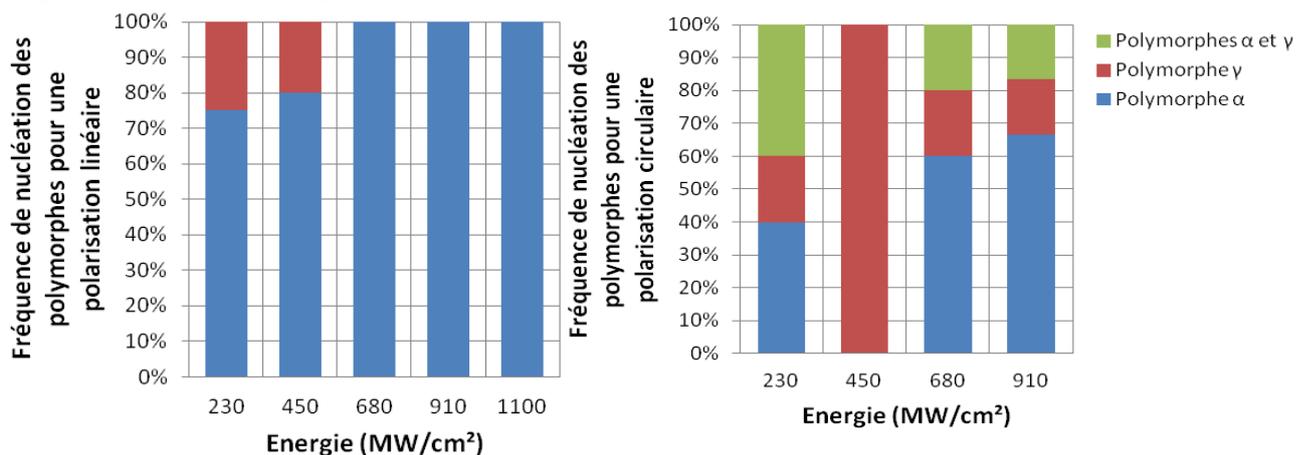


Figure 6-37 : Représentation sous forme d'histogramme de la fréquence de nucléation des polymorphes pour un produit initial d'origine α à 17 °C en fonction de l'énergie. 5 tubes par densité d'énergie.

(droite) polarisation circulaire.

(gauche) polarisation linéaire.

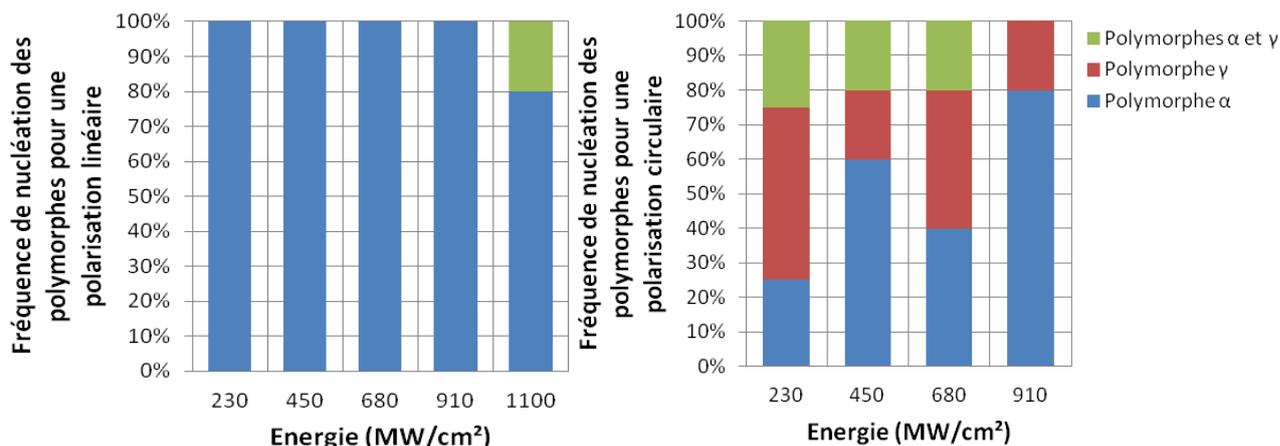


Figure 6-38 : Représentation sous forme d'histogramme de la fréquence de nucléation des polymorphes pour un produit initial d'origine γ à 17 °C en fonction de l'énergie. 5 tubes par densité d'énergie.

(droite) polarisation circulaire.

(gauche) polarisation linéaire.

VIII-2) Suivant la durée d'exposition

La distribution des polymorphes par polymorphe d'origine et en fonction du nombre d'impulsions est donnée dans le tableau 6-5. Cette expérience a été menée sur des solutions dans H₂O, d'une concentration de 270 mg/mL et exposée à 910 MW/cm². Le polymorphe α est toujours formé ce qui confirme la tendance à cette concentration évoquée dans la partie VI.

Nombre d'impulsions		1	10	100	600
Origine α	Taux de formation de la forme α	0	1	1	1
	Taux de formation de la forme γ	0	0	0	0
Origine γ	Taux de formation de la forme α	0	1	1	1
	Taux de formation de la forme γ	0	0	0	0

Tableau 6-5 : Evolution du taux de formation des polymorphes α et γ en fonction de l'origine du polymorphe et en fonction de la durée d'exposition traduite en nombre d'impulsions. 600 impulsions correspondent à une durée d'exposition de 60 secondes. 5 tubes par nombre d'impulsion.

IX/ Le contrôle du polymorphisme en fonction de la polarisation

Démonstré par Garetz *et al.* [Sun^A 2006] le contrôle du polymorphisme par la polarisation a été réétudié suite à la modification de la géométrie du montage.

IX-1) Dans H₂O

IX-1-1) Polymorphe d'origine α

La figure 6-39 représente sous forme d'histogramme la distribution des polymorphes en fonction de la concentration. Il y a quelques occurrences relevées dans lesquelles les deux polymorphes sont formés simultanément. Afin d'améliorer la lecture de ces résultats, ces histogrammes ont été traduits sous forme de courbe (et cela est le cas pour les autres résultats) et donne l'évolution du taux de formation en fonction de la concentration. Les

situations dans lesquelles les deux polymorphes sont produits ont été traitées comme suit : le taux de formation a été divisé par deux et ajouté à celui du polymorphe α et à celui du polymorphe γ .

La polarisation linéaire permet une production élevée du polymorphe α , ce qui est aussi le cas pour la polarisation circulaire sauf aux concentrations élevées. Toutefois, pour une concentration de 291 mg/mL une inversion du taux de formation des polymorphes est observée avec pour les concentrations supérieures une légère diminution.

En polarisation linéaire, le taux moyen de formation du polymorphe α est d'environ 90 %. Cela évolue en polarisation circulaire puisque au-dessous de 291 mg/mL, le taux de formation du polymorphe α est de plus de 94 % pour chuter au-delà de 291 mg/mL à 30 %.

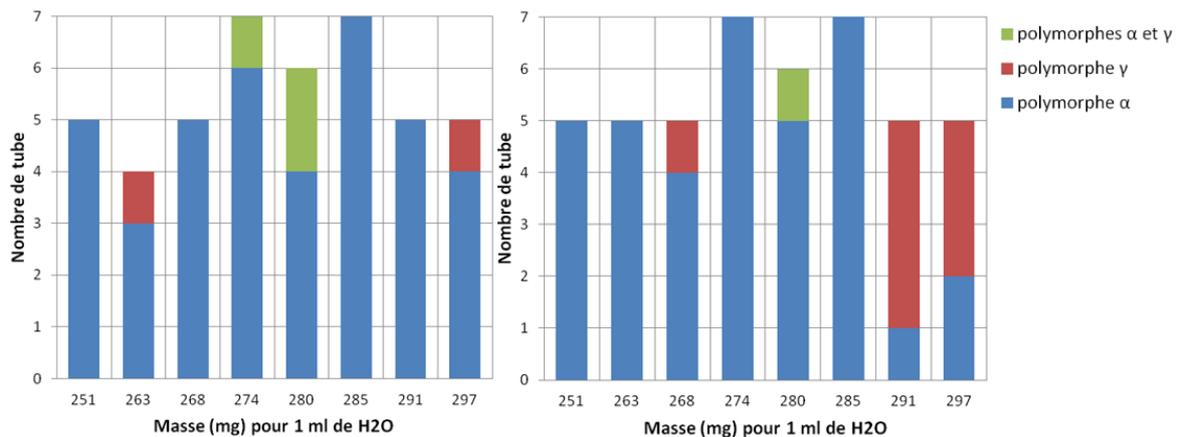


Figure 6-39 : Représentation sous forme d'historgramme du nombre de tubes contenant un ou plusieurs polymorphes pour un produit initial d'origine α à 17 °C et exposé à une énergie de 910 MW/cm².

(droite) polarisation circulaire.

(gauche) polarisation linéaire.

IX-1-2) Polymorphe d'origine γ

La figure 6-40 représente sous forme d'historgramme la distribution des polymorphes en fonction de la concentration. Il y a quelques occurrences relevées dans lesquelles les deux formes sont formées simultanément.

En polarisation linéaire, le taux moyen de formation du polymorphe α est d'environ 84 %. Cela évolue en polarisation circulaire puisque au-dessous de 280 mg/mL, le taux de formation du polymorphe α est de plus de 95 % pour s'équilibrer au environ de 50 % au-delà de 280 mg/mL.

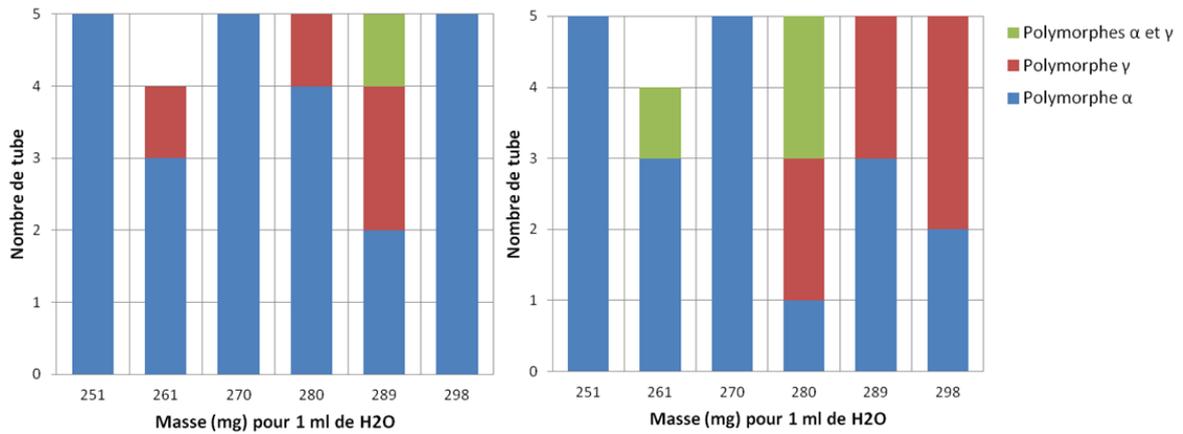


Figure 6-40 : Représentation sous forme d'histogramme du nombre de tube contenant un ou plusieurs polymorphes pour un produit initial d'origine γ à 17 °C et exposé à une énergie de 910 MW/cm².

(droite) polarisation circulaire.

(gauche) polarisation linéaire.

IX-2) Dans D₂O

La figure 6-41 représente sous forme d'histogramme la distribution des polymorphes en fonction de la concentration. Il y a quelques occurrences relevées dans lesquelles les deux polymorphes sont formés simultanément.

Globalement, les taux de formation s'inversent en polarisation linéaire ainsi qu'en polarisation circulaire montrant que D₂O favorise clairement le polymorphe γ . A la plus basse sursaturation (251 mg/mL), les taux de formation sont inversés. Toutefois, on remarque pour les deux polarisations une augmentation du taux de formation du polymorphe γ puis une diminution progressive jusqu'à 60 % puis une brutale remontée à 297 mg/mL dans le cas de la polarisation linéaire.

On remarque que les courbes, hormis le point de plus basse sursaturation, possèdent le même comportement avec un léger retard de la polarisation circulaire évoquant celui décrit plus haut et traduit par l'équation [6 – 7]. Cela montre que les deux polarisations ont le même effet dans D₂O malgré un taux moyen de formation inférieure dû à la formation du polymorphe α à la plus basse sursaturation pour une polarisation circulaire.

$$P_{\text{LASER,CP}}(C) = P_{\text{LASER,LP}}(C - \Delta C_{\text{LP/CP}}) \quad [6 - 7]$$

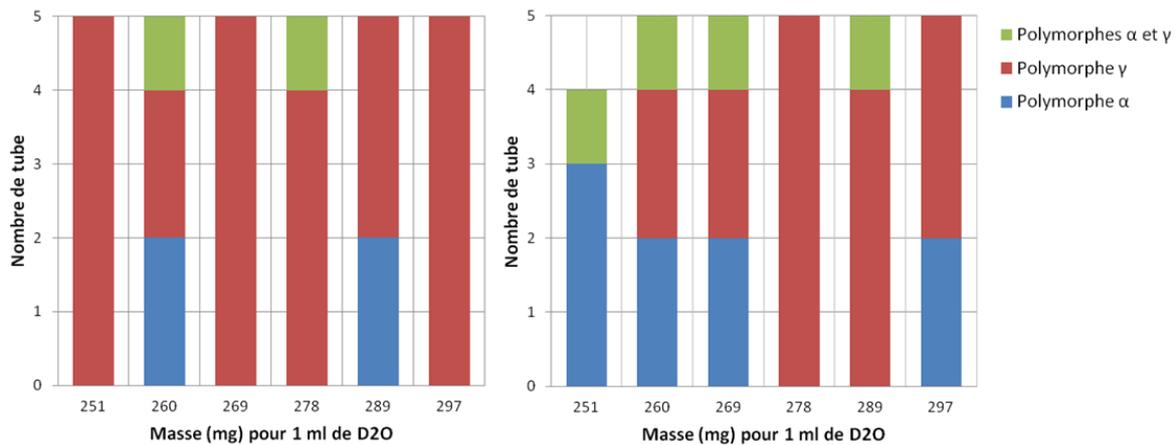


Figure 6-41 : Représentation sous forme d'histogramme du nombre de tube contenant un ou plusieurs polymorphes pour une poudre d'origine α à 17°C et exposé à une énergie de 910 MW/cm².

(droite) polarisation circulaire.

(gauche) polarisation linéaire.

IX-3) Synthèse des résultats

Lorsqu'on compare les taux de formation, on remarque les points suivants :

- Le polymorphe α a un fort taux de formation en polarisation linéaire dans H₂O et cela quelle que soit la forme initiale. Ce taux est supérieur à 90 % pour une origine α et à 84 % pour une origine γ .
- Dans H₂O, on observe un seuil pour la polarisation circulaire à partir duquel le taux de formation du polymorphe γ est significativement accru : 280 mg/mL pour une origine α et 270 mg/mL pour une origine γ .
- On observe que D₂O a une influence capitale sur le taux de formation du polymorphe γ le mettant en moyenne à plus de 80 %.
- Dans D₂O, le profil de formation du polymorphe γ est très similaire sur l'intervalle [260 mg/mL, 297 mg/mL] pour les deux polarisations avec un décalage en sursaturation.

X/ Discussion

X-1) Vitesse de nucléation

La vitesse de nucléation et son corollaire le temps d'induction ont été étudiés. Les tubes ont été exposés à la polarisation linéaire et à une énergie de 910 MW / cm² et l'évolution du taux de nucléation en fonction du temps post exposition est représenté dans la figure 6-42. Cette expérience a été menée à une concentration égale. On distingue deux groupes de vitesse de nucléation pour les concentrations supérieures à 280 mg/mL et pour les concentrations inférieures à 242 mg/mL. Il est à noter qu'avec une concentration de 223,4 mg/mL, il n'y a pas d'induction de la nucléation par laser.

La différence entre ces deux groupes de nucléation montre l'effet de la concentration sur le taux de nucléation au cours du temps. Toutefois, pour les concentrations de 223,4 mg/mL la première nucléation a été enregistrée à 2 h ce qui fait qu'elle a eu lieu entre 30 minutes et 2

h montrant la lenteur de la nucléation à cause d'une concentration plus faible. Cela est à comparer aux quelques minutes seulement nécessaires pour induire la nucléation pour des concentrations supérieures à 242 mg/mL.

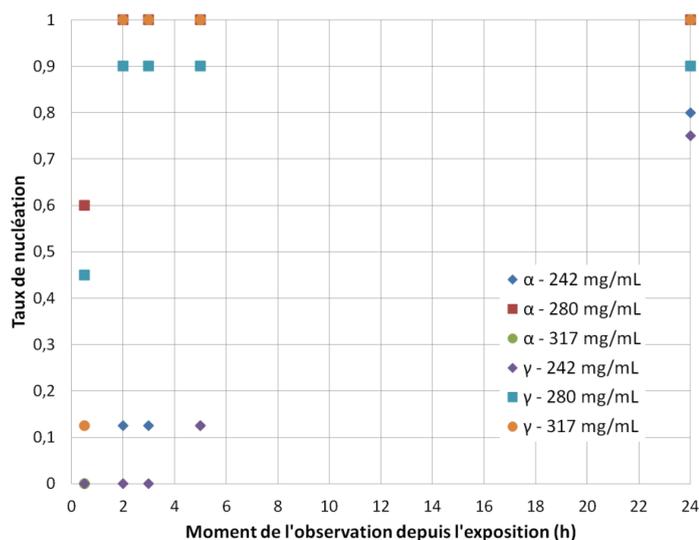


Figure 6-42 : Evolution du taux de nucléation en fonction du temps post exposition.

X-2) Polarisation et contrôle du polymorphisme

X-2-1) Résultats antérieurs

La nucléation de la glycine par *NPLIN* a montré l'existence d'un « *polarization switching* » traduit par basculement polymorphique. Il s'agit de la formation préférentielle d'un polymorphe par rapport à un autre dans certaines conditions d'application de la polarisation [Sun^A 2006]. Le paramètre qui conditionne cette évolution polymorphique est la sursaturation mais cela peut être l'ellipticité, la polarisation ou la température [Sun^A 2006].

La nucléation induite par laser (*NPLIN*) est implantée à l'Ecole Centrale depuis 2006 grâce aux projets d'élèves sur différentes molécules comme la glycine ([Bavière 2006], [Bellani 2007]) ou la carbamazépine ([Degand 2010], [Miret 2009]). Les travaux préliminaires sur la glycine permettent dans une certaine mesure de tester la reproductibilité des résultats sur le basculement polymorphique.

Dans les travaux de [Bellani 2007], 24 solutions de glycine avec une sursaturation comprise entre 139 % et 159,4 % ont été exposées à un faisceau polarisé linéairement. Le taux de nucléation *NPLIN* est de 1 et sur les 20 tubes caractérisés par diffraction des rayons X sur poudre, 80 % était du polymorphe γ . 40 solutions avec une sursaturation comprise entre 139 % et 159,4 % ont été exposées à un faisceau polarisé linéairement réduit par le condenseur d'un facteur 2³⁶. Le taux de nucléation *NPLIN* est de 0,95 et sur les 26 tubes caractérisés aux rayons X, 84,6% était du polymorphe γ . Ces résultats montrent que la polarisation linéaire induit une formation préférentielle du polymorphe γ .

Dans les mêmes travaux, la formation du polymorphe α a été étudiée en soumettant des solutions à une polarisation circulaire. 16 solutions avec une sursaturation comprise entre

³⁶ La focalisation est le terme un peu maladroite qui fait état de l'usage du condenseur afin de réduire la taille du faisceau par 2.

141,6 % et 155 % ont été exposées à un faisceau polarisé circulairement. Le taux de nucléation *NPLIN* était de 93,75 % et sur les 15 tubes caractérisés aux rayons X, 40 % était du polymorphe α et 60 % était du polymorphe γ . 16 solutions avec une sursaturation comprise entre 141,1 % et 156,7 % ont été exposées à un faisceau polarisé circulairement réduit par le condenseur d'un facteur 2. Le taux de nucléation *NPLIN* était de 0,6875 et sur les 11 tubes caractérisés par diffraction des rayons X sur poudre, 36,4 % était du polymorphe α 63,6 % était du polymorphe γ . Ces résultats montrent que la polarisation circulaire induit une potentialité accrue de la formation du polymorphe γ .

Les auteurs expliquent les résultats obtenus en utilisant la polarisation circulaire qui sont inattendus par « *des erreurs p[ro]v[en]ant être liées à un réglage pas assez exact de l'axe de la lame par rapport à la polarisation rectiligne. Le réglage de la lame était difficile car on ne possédait qu'un seul polariseur. Nous avons vérifié la polarisation circulaire seulement avec un puissancemètre. Cette méthode ne permet pas une très grande exactitude. On estime l'erreur du désalignement de l'axe de la lame autour de 10 %.* ». Ceci serait cohérent avec les résultats obtenus par Garetz à propos de l'effet de l'ellipticité.

Les élèves [Bellani 2007] constatent que l'emploi du condenseur n'influe pas sur le taux de nucléation *a contrario* du groupe de Garetz un taux de formation accru du polymorphe γ : 80 % de taux de formation pour une densité d'énergie de 0,188 GW/cm², 84,6 % de taux de formation pour une densité d'énergie de 0,766 GW/cm².

Or, les résultats publiés par Garetz [Sun^A 2006] ne sont valides qu'à une température : 290 K (17°C) pour la longueur d'onde de 532 nm. Ceci pourrait expliquer pourquoi les élèves n'arrivent pas à reproduire les résultats de Garetz. L'explication de cet écart par l'ellipticité du faisceau non contrôlée impliquant une marge d'erreur élevée est cohérente avec les résultats de Garetz; néanmoins dans son article, Garetz n'explique pas comment il peut être si précis ni la marge d'erreur de son dispositif expérimental.

La reproductibilité des résultats doit être posée et les conditions expérimentales doivent être étudiées. En effet, dans les études relatées ici, les auteurs ne précisent ni la solubilité ni la Limite de Zone Métastable. Ce point est critique car la connaissance de la limite de zone métastable à un temps donné permet d'éviter de faire des expériences dans la zone du diagramme de phase (C,T) où la nucléation spontanée est majoritaire. Cela relativise la portée des résultats dans le sens où le laser ne serait qu'un stimulateur de nucléation plus qu'un réel initiateur ce qui réduit la portée des résultats de la fenêtre de basculement polymorphique. Les critiques formulées sur les travaux de Garetz et sur les premiers travaux faits à l'Ecole Centrale Paris ont été intégrées dans le protocole de travail présenté dans le chapitre 5.

X-2-2) L'influence du solvant

Le solvant a un effet très important sur l'effet de la nucléation de la glycine. Dans H₂O, la polarisation linéaire engendre la création massive du polymorphe α et cela quel que soit le polymorphe d'origine. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à un pH de 6,1, le polymorphe α est majoritairement formé (tableau 6-6). Le point isoélectrique de la glycine est à 6,2 et le pH d'une solution de glycine dans de l'eau distillée une fois a été mesuré à 7,1. Le tableau 6-7 montre les taux de formation des polymorphes α , β et γ pour deux différents pH. Il est clair

que la formation majoritaire du polymorphe α peut s'expliquer par un pH qui la favorise. En revanche, D₂O influe sur la création du polymorphe γ . Toutefois, il n'existe aucune publications dans la littérature étudiant de manière exhaustive la formation de la glycine dans D₂O. En conduisant l'étude dans H₂O et D₂O, nous avons montré l'effet du solvant sur le taux de formation.

Concentration (mg/mL)	Fréquence de nucléation du polymorphe α à pH = 6,1 (%)	Fréquence de nucléation du polymorphe β à pH = 6,1 (%)	Fréquence de nucléation du polymorphe γ à pH = 6,1 (%)
120	90,3	7,3	2,4
180	88,3	5,8	5,9
240	92,2	2,9	4,9
Concentration (mg/mL)	Fréquence de nucléation du polymorphe α à pH = 10,1 (%)	Fréquence de nucléation du polymorphe β à pH = 10,1 (%)	Fréquence de nucléation du polymorphe γ à pH = 10,1 (%)
120	58,2	6,4	35,4
180	68,2	10,3	21,5
240	83,8	4,9	11,3

Tableau 6-6 : Taux de nucléation des trois formes de la glycine pour trois différentes concentrations à 23 °C en fonction du pH dans H₂O. Tableau adapté de [Lee 2008b].

X-2-3) L'influence de la polarisation

La polarisation a un effet important dans H₂O comme l'ont montré les résultats. Il est intéressant de noter que selon nos résultats, la polarisation circulaire provoque à partir d'un seuil en concentration, une augmentation du taux de formation du polymorphe γ . Nos résultats semblent s'opposer à ceux du groupe de Garetz comme le montre le tableau 6-7.

Variable	Référence	[Sun ^A 2006]	Cette thèse
Interface		verre-solution	air-solution
Densité d'énergie		240 MW/cm ²	910 MW/cm ²
Longueur d'onde (nm)		532	532
Polymorphe d'origine		inconnu	α (γ)
Solvant		H ₂ O	H ₂ O (D ₂ O)
Température		17 °C	17 °C
Concentration		[240,2 mg/mL ; 292,76 mg/mL]	[251 mg/mL ; 298 mg/mL]
Polarisation linéaire		100 % de α en-dessous de 255,2 mg/mL 100 % de γ à partir de 255,2 mg/mL	Production très majoritaire du polymorphe α (90 %) à toute concentration
Polarisation circulaire		100 % de α à partir et en-dessous de 255,2 mg/mL 100 % de γ au dessus de 255,2 mg/mL	En dessous de 285 mg/mL : production très majoritaire du polymorphe α (93 %), Au dessus de 285 mg/mL : production très majoritaire du polymorphe γ (70 %)

Tableau 6-7 : Comparaison des résultats concernant la fenêtre de basculement entre ceux obtenus par Garetz et al. [Sun^A 2006] et ceux présents dans ce travail de thèse.

Dans le cas de D₂O, la polarisation ne semble pas avoir d'effets majeurs, montrant que la variable principale semble être la concentration. Le seul effet qui semble se dégager est un décalage vers les hautes concentrations de début de la décroissance du taux de formation du polymorphe γ : 260 mg/mL pour la polarisation linéaire et 270 mg/mL pour la polarisation circulaire.

X-3) Taille des cristaux obtenus et polymorphisme

La taille des cristaux obtenus comme le polymorphisme a été étudiée. Cette partie discute de l'influence du second sur le premier. L'obtention de la forme poudre est associée au polymorphe α quel que soient les conditions expérimentales. Au delà de ce constat, il est possible de faire état des tendances suivantes :

- Polarisation Circulaire et solvant D₂O : augmentation de l'occurrence P.
- Polarisation Circulaire et solvant H₂O : augmentation de l'occurrence MC(N).
- Polarisation Linéaire et solvant H₂O : taux de formation de MC(1) et MC(n) élevé.
- Polarisation Linéaire et solvant H₂O : un plus grand nombre de monocristaux est obtenu.
- Polarisation Circulaire et solvant D₂O : taux de formation de MC(1) et MC(n) élevé.
- Polarisation Circulaire et solvant H₂O : augmentation de la formation de MC(N) par rapport à la Polarisation Linéaire.
- Pas d'effet de la concentration.
- Pas d'effet de l'énergie
- Pas d'effet de la nature du polymorphe initial.

La tendance selon laquelle la nature du polymorphe initial a une influence permet de faire un pas dans la discussion sur l'influence du nombre d'impulsion. Les résultats obtenus figure 6-34 ont été agrégés puisque le polymorphe initial n'a pas d'influence (figure 6-43) ce qui permet de doubler la statistique par condition. On remarque une tendance inattendu à savoir un accroissement du nombre de monocristaux mais une diminution du nombre de multicristaux pour une durée d'exposition de 60 secondes.

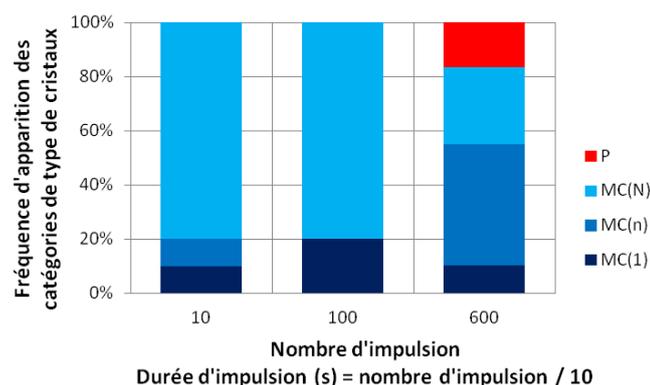


Figure 6-43 : Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction du nombre d'impulsion. 5 tubes par nombre d'impulsion. Agrégation des résultats présentés figure 6-34.

Bilan

Nous avons appliqué à la glycine la méthode que nous avons détaillé dans le chapitre 5. La mesure de la solubilité de la glycine dans D₂O et dans H₂O a montré un comportement similaire confirmant des travaux passés mais entrant en contradiction avec d'autres. La limite de zone métastable de la glycine dans H₂O et dans D₂O est très large, ce qui a permis la réalisation des expériences à une concentration jusqu'à 300 mg/mL 24 h après la mise des échantillons à 17 °C, tout en écartant tout risque de nucléation spontanée.

Connaissant la limite de zone métastable, une étude portant sur plusieurs paramètres a été basée sur le constat de la littérature du chapitre 2 et de l'annexe A1. Contrôler la nucléation, c'est contrôler le polymorphe mais aussi le lieu et le moment de nucléation et d'autres éléments tels que le type de cristal (monocristal, plusieurs de petite taille ou encore de la poudre), le faciès. Ces paramètres peuvent être contrôlés comme l'a montré la littérature par la puissance, le taux de répétition, la polarisation.

En se plaçant dans la limite de zone métastable, il a été possible de démontrer que le laser a un effet direct permettant de réduire le temps d'induction de $6,0 \cdot 10^5$ s (nucléation spontanée) à $2,3 \cdot 10^2$ s soit 3 ordre de grandeur.

Les résultats ont montré que le solvant a une influence prépondérante sur la nucléation du solvant car D₂O provoque un taux de nucléation du polymorphe γ plus élevé que H₂O. Dans H₂O, il y a un très fort taux de formation du polymorphe α et l'on note l'influence de la polarisation à partir d'un seuil où l'on observe l'augmentation du taux de formation du polymorphe γ .

La variation de la puissance en polarisation linéaire ne montre pas d'influence particulière sur le taux de formation des polymorphes sauf à basse puissance où le polymorphe γ est formé en minorité. La polarisation circulaire a une incidence plus prononcée permettant la formation du polymorphe γ à un taux en moyenne de 50 %. Ainsi, la polarisation circulaire influe sur la formation du polymorphe γ en lui permettant de passer de quelques pourcents à 50 % en moyenne. Ce résultat ne confirme pas les résultats antérieurs obtenus par Garetz *et al.* [Sun^A 2006] qui associaient la formation du polymorphe α à la polarisation circulaire et la formation du polymorphe γ à la polarisation linéaire. Ce comportement différent pourrait venir de la modification de la géométrie du montage puisque dans ce travail, le faisceau traverse une interface air/solution.

Chapitre 7 : Etude préliminaire de l'effet de la nucléation induite par laser sur l'histidine et l'acide glutamique

Introduction

Dans ce chapitre, nous traitons de l'effet du laser sur la cristallisation de l'histidine et l'acide glutamique.

Le contrôle du polymorphisme est un enjeu important pour la cristallisation photoinduite. Selon Garetz *et al.* [Sun^A 2006], il est possible de contrôler le polymorphisme de la glycine dans certaines conditions de concentration et d'énergie. Par ailleurs, l'équipe de Garetz [Sun^A 2008] a également étudié l'histidine et a montré l'influence de la polarisation sur le taux de formation du polymorphe A. Dans le cadre de l'étude de la compréhension du mécanisme, nous avons choisi d'étudier à nouveau la molécule d'histidine avec notre nouveau montage et notre nouvelle méthode. A cet effet, nous avons mesuré la solubilité de l'histidine dans H₂O et pour la première fois dans D₂O, puis nous l'avons exposé au laser dans différentes conditions.

Nous avons choisi d'étudier aussi l'acide glutamique. Cette molécule présente une nucléation spontanée sous différents polymorphes en fonction de la température [Srinivasan^A 2011], ce qui semble un candidat intéressant pour la nucléation induite par la photoinduction. L'objet de la seconde partie de ce chapitre est d'effectuer l'étude préliminaire de l'acide glutamique.

I/ Histidine

I-1) Motivation de l'étude

La molécule d'histidine a déjà été étudiée et il a été démontré qu'elle pouvait être cristallisée par des lasers nanoseconde dans H₂O [Sun^A 2008]. Nous avons alors choisi d'appliquer le même protocole que celui que nous avons développé pour la glycine, à l'histidine dans H₂O et D₂O. La modification de l'interface solution-laser est susceptible d'entraîner une modification de la réaction aux polarisations par rapport aux travaux de Sun *et al.* [Sun^A 2008]. De plus, l'instrumentation optique donne une nouvelle dimension à cette étude en y incluant potentiellement l'analyse des faciès.

I-2) Solubilité et limite de zone métastable

Nous avons mesuré la solubilité d'un lot de L – (+) – Histidine venant de Merck contenant le polymorphe B dans H₂O et D₂O. Cette mesure a eu lieu au CINaM suivant la méthodologie exposée dans le chapitre 5.

I-2-1) Courbe de solubilité

I-2-1-1) Solubilité dans H₂O

Les résultats obtenus dans H₂O pour le polymorphe B du L – (+) – Histidine sont présentés ci-dessous (figure 7-1a) (les valeurs sont données en annexe E1). Le second graphique présente la vérification de la loi de Van't Hoff (figure 7-1b). La régression linéaire effectuée par le logiciel Excel[®] confirme avec un R² de 0,9994 que le système étudié suit la loi de Van't Hoff avec l'équation [7 – 1]. La régression le montre et la mesure de solubilité est utilisable pour des travaux ultérieurs.

$$\ln C_s = -\frac{1804,2}{T} + 9,8148 \quad [7 - 1]$$

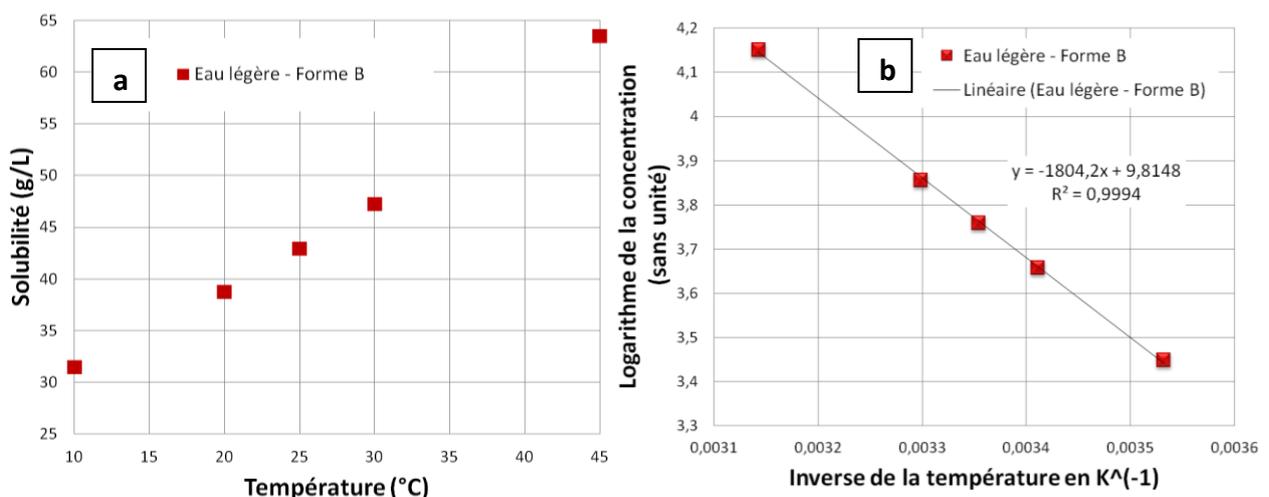


Figure 7-1 : (a) : Courbe de solubilité du polymorphe B de la L – (+) – Histidine dans H₂O en fonction de la température.

(b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.

I-2-1-2) Solubilité dans D₂O

Les résultats obtenus dans D₂O pour le polymorphe B du L – (+) – Histidine sont présentés ci-dessous (figure 7-2a) (les valeurs sont données en annexe E2). Le second graphique présente la vérification de la loi de Van't Hoff (figure 7-2b). La régression linéaire effectuée par le logiciel Excel[®] confirme avec un R² de 0,9993 que le système étudié suit la loi de Van't Hoff avec l'équation [7 – 2].

$$\ln C_s = -\frac{1955,2}{T} + 10,173 \quad [7 - 2]$$

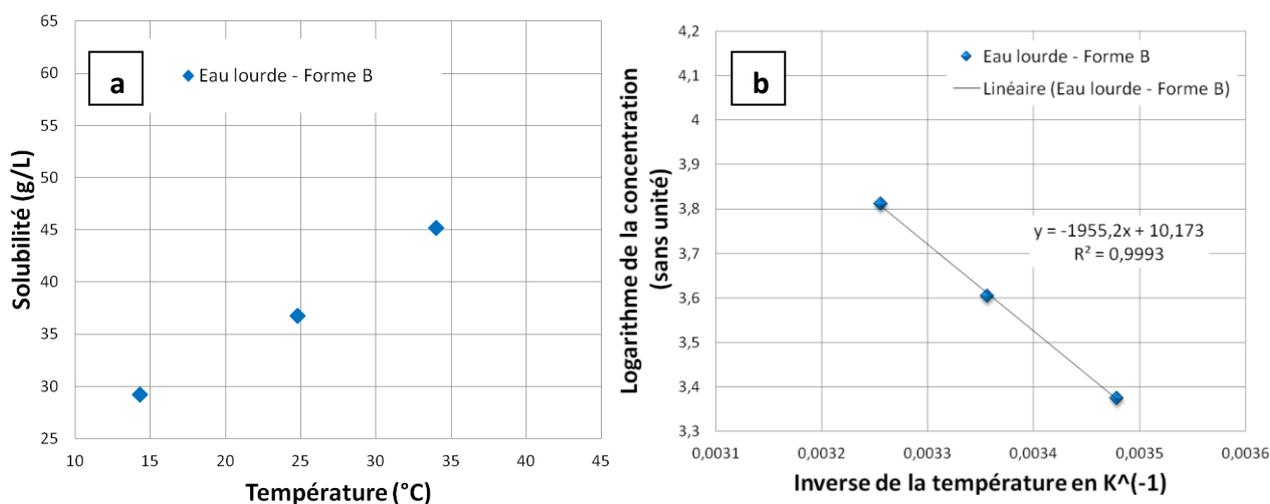


Figure 7-2 : (a) : Courbe de solubilité du polymorphe B de la L – (+) – Histidine dans D₂O en fonction de la température.

(b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.

I-2-1-3) Discussion et comparaisons des résultats

Les résultats obtenus dans H₂O ont été comparés à ceux disponibles dans la littérature. Seul Kitamura [Kitamura^A 1993] a mesuré la solubilité de l'histidine. Nos points de solubilité s'accordent parfaitement avec ceux de Kitamura comme le montre la figure 7-3.

La solubilité de l'histidine dans D₂O n'a pas été reportée dans la littérature. Nous avons remarqué un décalage dans les valeurs de la solubilité par rapport à celles dans H₂O (figure 7-3). Ce comportement diffère de celui observé pour la glycine. Peu d'études ont porté sur l'effet isotopique entre les solvants H₂O et D₂O sur la solubilité, excepté les travaux de Jelinska-Kazmierczuk *et al.* [Jelinska Kazmierczuk 1996]. Le comportement que l'on observe pour l'histidine est cependant similaire à celui observé sur la protéine BPTI [Budayova-Spano 2000].

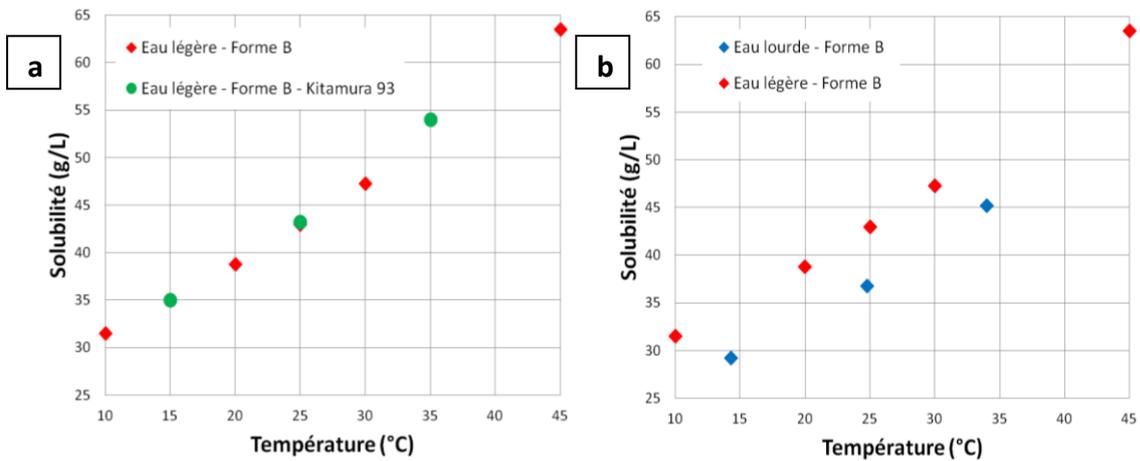


Figure 7-3 : (a) Comparaison entre la courbe de solubilité de la L - (+) - Histidine mesurée au CINaM dans H₂O et celle mesurée par Kitamura [Kitamura^A 1993] pour le polymorphe B. (b) Comparaison entre les courbes de solubilité de la L - (+) - Histidine dans D₂O et dans H₂O.

I-2-3) Limite de zone métastable dans différentes conditions

I-2-3-1) Dans H₂O

La limite de zone métastable dans H₂O a été mesurée en régime dynamique et en régime statique. En régime dynamique, la limite de zone métastable a été mesurée en partant de 60°C pour trois concentrations : 56,21 mg/mL; 60,09 mg/mL; 65,9 mg/mL. Les échantillons dissous ont été soumis à une rampe de 2 °C/h et suivis par vidéo, ce qui a permis de relever la température de nucléation spontanée (figure 7-4). L'autre méthode plus adaptée pour la détermination de la limite de zone métastable dans le cas de la méthode *NPLIN* est la méthode statique. Cela est dû au fait que le temps de stockage sur le carrousel est un paramètre très important puisqu'un temps trop long peut conduire à un début de nucléation spontanée.

Le temps auquel se produit la nucléation spontanée a été relevé (figure 7-4). A 2 h, la limite de zone métastable correspond à une sursaturation de 1,78 (76,6 mg/mL), à 12 h elle correspond à 1,5 (64 mg/mL) et à 24 h elle correspond à 1,4 (59,6 mg/mL). En nucléation spontanée, le polymorphe A est obtenu à 100 %.

$$\beta_{c, B, H_2O}(2 \text{ h}) = 76,6 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, B, H_2O}(12 \text{ h}) = 64 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, B, H_2O}(24 \text{ h}) = 59,6 \text{ mg/mL}$$

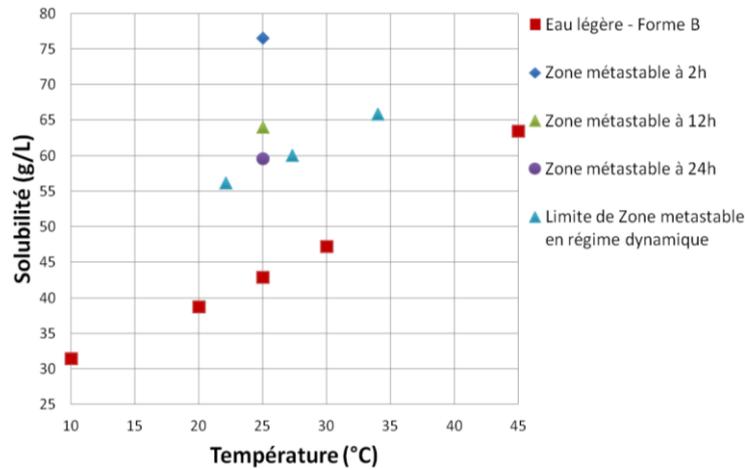


Figure 7-4 : Limite de zone métastable de la L - (+) - Histidine mesurée à 25 °C dans H₂O de deux manières différentes : par la méthode statique et la méthode dynamique.

I-2-3-2) Dans D₂O

Dans D₂O, la limite de zone métastable a été déterminée par la méthode statique. Pour plusieurs sursaturations le temps auquel se produit la nucléation a été relevé (figure 7-5). A 24 h, la limite de zone métastable correspond à une sursaturation de 1,5 (55,4 mg/mL), à 48 h elle correspond à 1,3 (48,28 mg/mL) et à 72 h elle correspond à 1,1 (40,7 mg/mL). En nucléation spontanée, le polymorphe A est obtenu à 100 %.

$$\beta_{c, B, D_2O}(24 \text{ h}) = 55,4 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, B, D_2O}(48 \text{ h}) = 48,28 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, B, D_2O}(72 \text{ h}) = 40,7 \text{ mg/mL}$$

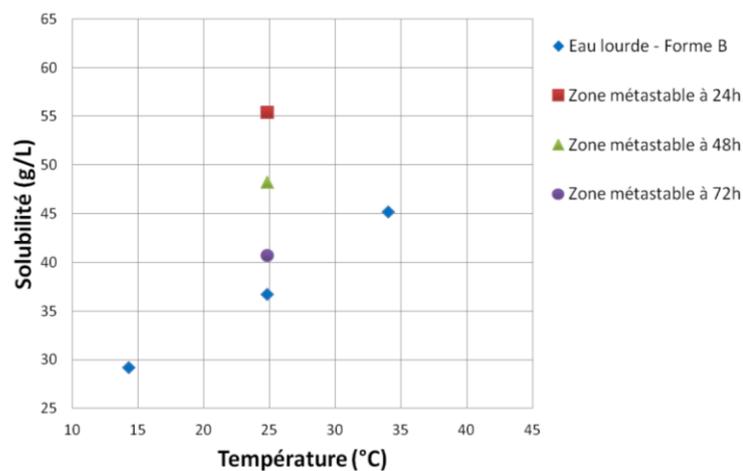


Figure 7-5 : Limite de zone métastable de la L - (+) - Histidine mesurée à 24,8 °C dans D₂O par la méthode statique.

I-3) Méthodologie d'étude

L'étude a été basée sur celle de Garetz *et al.* [Sun^A 2008] : la température d'étude est 25 °C et le temps d'exposition est de 60 secondes. Quatre paramètres ont été étudiés :

- effet de la polarisation (linéaire ou circulaire),
- effet de la puissance,
- effet de la sursaturation,
- effet du solvant.

Le choix de la température de 25 °C est motivé par l'unique observation du basculement des polymorphes en fonction de la polarisation à 532 nm à cette température.

La méthodologie d'étude utilisée est représentée schématiquement sur la figure 7-6 pour les polarisations linéaire et circulaire dans H₂O, dans la figure 7-7 pour D₂O. L'effet de la puissance a été uniquement étudié dans H₂O en exposant les solutions à 150 mJ (680 MW/cm²) et à 200 mJ (910 MW/cm²). Le nombre de tubes utilisés pour chaque condition est de 5. Les cristaux obtenus ont été caractérisés par la diffraction des rayons X sur poudre.

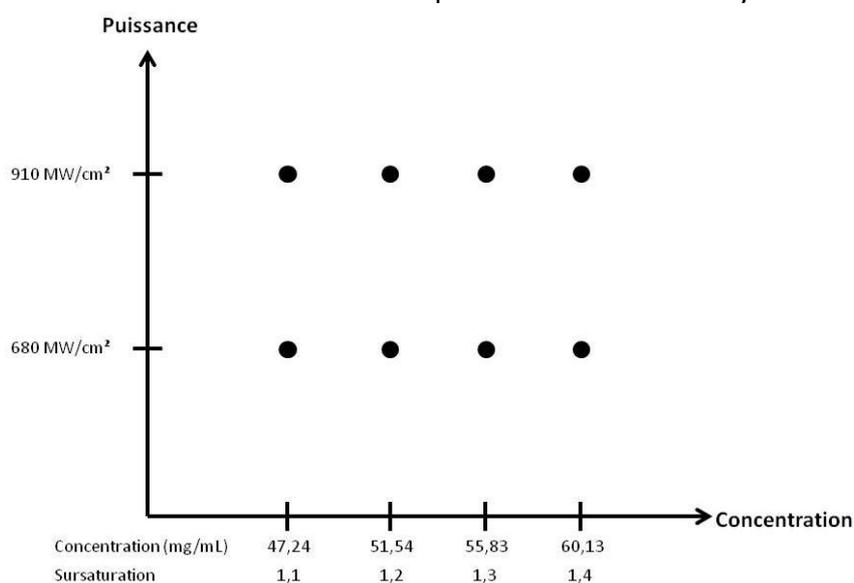


Figure 7-6 : Représentation du protocole d'étude utilisé pour les polarisations linéaire et circulaire dans H₂O.

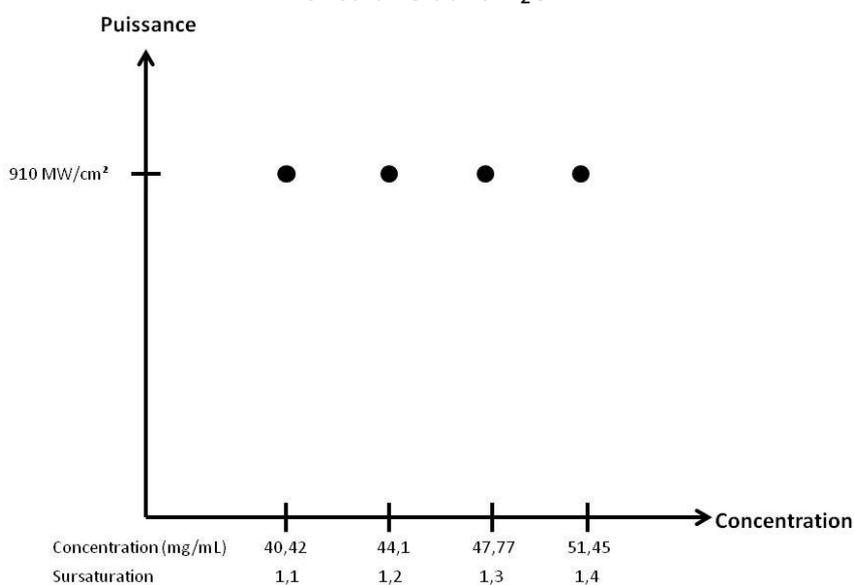


Figure 7-7 : Représentation du protocole d'étude utilisé pour les polarisations linéaire et circulaire dans D₂O.

I-4) Nucléation induite par laser

I-4-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la sursaturation

I-4-1-1) Dans H₂O

Les expériences ont été menées au sein de la zone métastable correspondant à 24 h. Le tableau 7-1 détaille les concentrations étudiées pour une durée d'exposition de 60 s à 200 mJ (910 MW/cm²).

Sursaturation à 25 °C	1,1	1,2	1,3	1,4
Masse pour 1 mL de H ₂ O (mg)	47,25	51,54	55,84	60,13

Tableau 7-1 : Détail des sursaturations et des concentrations associées.

La figure 7-8 montre le taux de nucléation 24 h après l'exposition. Les expériences ont été conduites sur cinq tubes pour chaque conditions ce qui ne permettra de dégager que des tendances. Comme pour d'autres molécules (glycine (§6-V-2) et carbamazépine [Ikni 2014], il existe une limite en terme de concentration en dessous de laquelle le laser pour cette densité d'énergie n'induit pas de nucléation. La polarisation semble influencer sur le taux de nucléation avec une efficacité accrue de la polarisation linéaire à faible concentration.

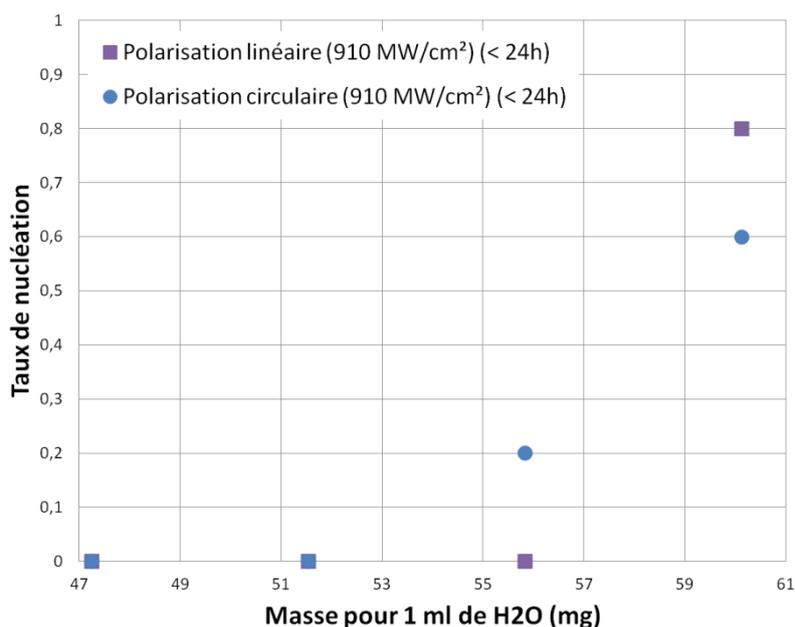


Figure 7-8 : Taux de nucléation 24 h après l'exposition pour une densité d'énergie de 910 MW/cm² avec polarisation linéaire et circulaire. 5 tubes pour chaque condition.

I-4-1-2) Dans D₂O

Les expériences ont été menées au sein de la zone métastable correspondant à 24 h. Le tableau 7-2 détaille les concentrations qui ont été étudiées.

Sursaturation à 24,8 °C	1,1	1,2	1,3	1,4
Masse pour 1 mL de D ₂ O (mg)	40,43	44,1	47,77	51,45

Tableau 7-2 : Détail des sursaturations et des concentrations associées.

La figure 7-9a montre l'évolution du taux de nucléation pour une énergie de 910 MW/cm² à différents moments après l'exposition. La figure 7-9b montre le taux de nucléation à 24 h pour la polarisation linéaire et la polarisation circulaire pour une énergie de 910 MW/cm². Le taux de nucléation est identique pour les deux polarisations, ce qui tend à montrer l'absence d'effet de la polarisation sur le taux de nucléation.

Toutefois, on note une divergence entre les figures 7-9a et 7-9b pour la polarisation linéaire à 24 h : le taux de nucléation est plus faible pour la sursaturation de 1,4 (51,45 mg/mL) pour la figure 7-9b et le seuil en sursaturation est plus élevé. La figure 7-9b représente les résultats d'une expérience qui a eu lieu 12 mois après celle de la figure 7-9a. Cela montre la faiblesse d'obtention d'une reproductibilité. Cela est dû au faible nombre de tubes par condition.

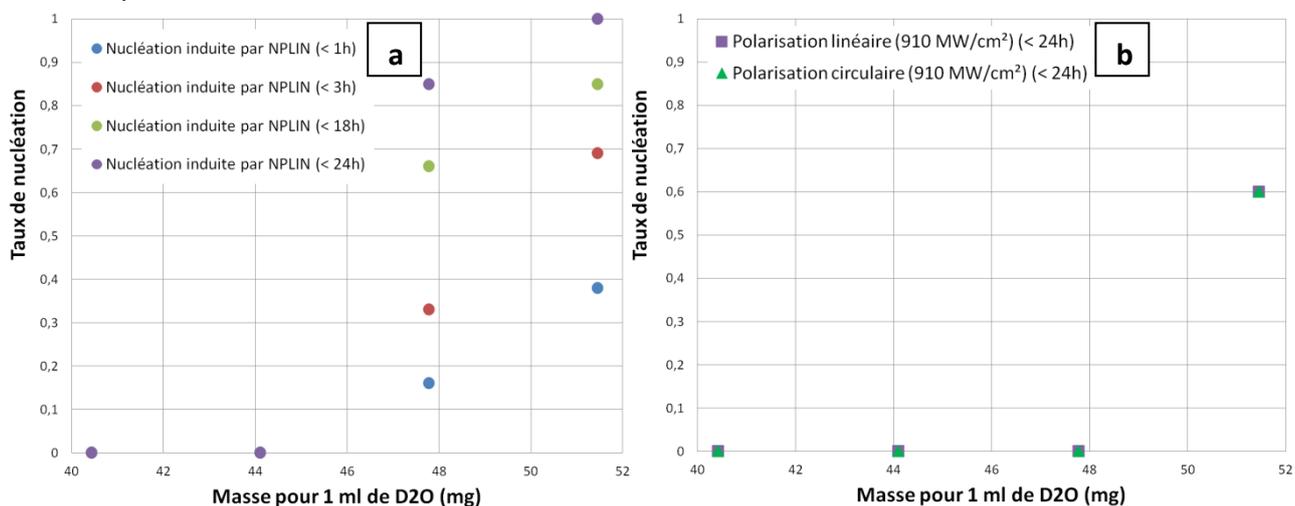


Figure 7-9 : (a) : Taux de nucléation à différents moments pour une énergie de 910 MW/cm² et une polarisation linéaire.

(b) : Taux de nucléation pour les deux polarisations à 910 MW/cm² à 24 h.

I-4-2) Efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie

Les solutions ont été exposées à deux énergies différentes afin d'observer l'effet de la puissance. La figure 7-10 montre les résultats obtenus à 150 mJ (680 MW/cm²) et les compare avec ceux obtenus à 200 mJ. On remarque l'apparition de la cristallisation à partir de 60,13 mg/mL sauf pour la polarisation circulaire. Le taux de nucléation de l'histidine est sensiblement le même pour les deux énergies dans chacune des polarisations. Ce résultat tend à montrer que la limite de la densité d'énergie pour laquelle le laser n'induit pas la nucléation est plus faible que les 680 MW/cm² utilisés dans ces expériences. La polarisation semble avoir un petit effet sur la fraction des tubes ayant présenté une nucléation, mais ces résultats ne sont qu'une tendance vu le petit nombre de tubes utilisés.

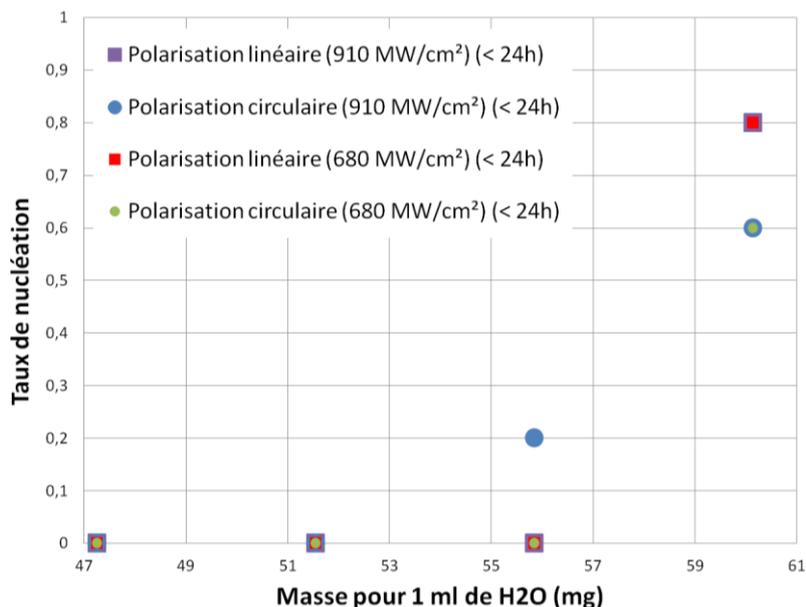


Figure 7-10 : Evolution de l'efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie (910 MW/cm² et 680 MW/cm²) dans H₂O.

I-5) Effet de la polarisation du laser

I-5-1) Dans H₂O

La figure 7-11 montre le taux de formation des polymorphes pour la sursaturation 1,4. La polarisation circulaire induit la nucléation des polymorphes A et B à 100 % aux deux énergies. La polarisation linéaire induit surtout la nucléation du polymorphe A et l'augmentation d'énergie semble accentuer cette tendance.

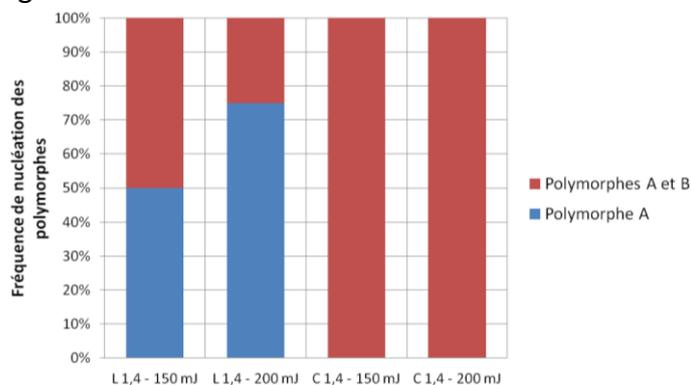


Figure 7-11 : Fréquence de nucléation des polymorphes A et B pour la sursaturation 1,4 (60,13 mg/mL) à 150 mJ (680 MW/cm²) et 200 mJ (910 MW/cm²).

I-5-2) Dans D₂O

Les polymorphes obtenus pour une sursaturation de 1,4 sont le polymorphe A pour la polarisation linéaire et le polymorphe A à 33 % et le polymorphe B à 66 % pour la polarisation circulaire (figure 7-12).

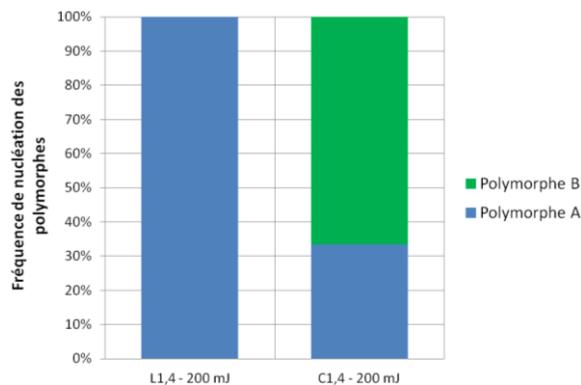


Figure 7-12 : Fréquence de nucléation des polymorphes A et B pour la sursaturation 1,4 (51,45 mg/mL) à 200 mJ (910 MW/cm²) pour la polarisation linéaire et circulaire dans D₂O.

I-6) Site de nucléation

Comme pour la glycine, le site de nucléation a été relevé. Les cristaux se forment à trois endroits : au fond du tube, sur la paroi au niveau de la zone de contact entre le ménisque et la paroi du tube et au ménisque. La figure 7-13 montre ces trois sites où les cristaux peuvent croître. Les fréquences des sites de cristallisation sont similaires en nucléation spontanée et en nucléation induite par laser dans D₂O et H₂O (figure 7-14).



Figure 7-13 : Photographie d'un tube montrant l'existence d'un cristal au ménisque, sur la paroi et un second au fond du tube.

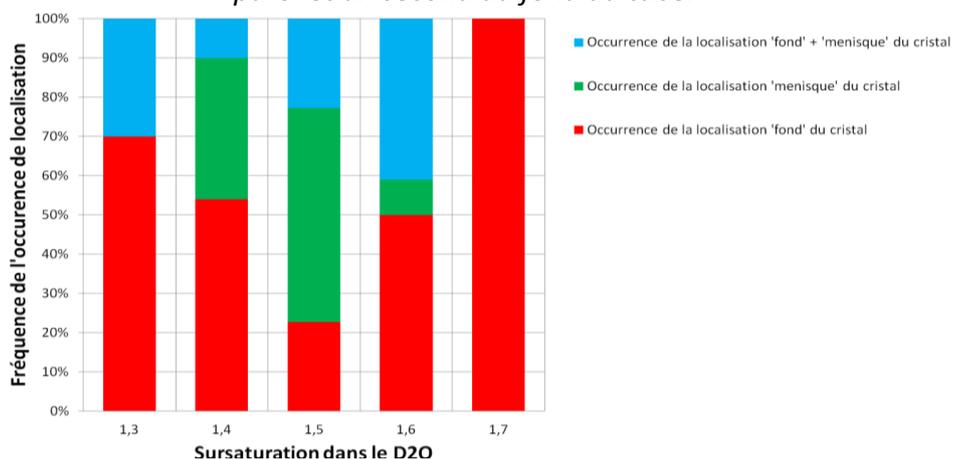


Figure 7-14 : Relevé du site de nucléation en nucléation spontanée pour la L - (+) - Histidine dans D₂O.

I-7) Discussion

Seuls les travaux de Garetz [Sun^A 2008] sont disponibles dans la littérature pour comparer nos résultats dans H₂O (tableau 7-3).

Source	Interface	Sursaturation	Pourcentage des échantillons uniquement composés du polymorphe A (%)		
			Spontanée	Polarisation linéaire	Polarisation circulaire
[Sun ^A 2008]	verre-solution	1,4	50 ± 15 (8)	60 ± 15 (10)	60 ± 13 (10)
Cette thèse	air-solution		100 (8)	50 (6)	0 (5)
[Sun ^A 2008]	verre-solution	1,5	40 ± 15 (8)	33 ± 14 (9)	75 ± 14 (8)
Cette thèse	air-solution		100 (10)	hors LZM à 24 h	hors LZM à 24 h
[Sun ^A 2008]	verre-solution	1,6	29 ± 15 (7)	18 ± 11 (8)	LCP : 45 ± 9 (13)
					RCP : 50 ± 9 (14)
Cette thèse	air-solution		100 (10)	hors LZM à 24 h	hors LZM à 24 h

Tableau 7-3 : Tableau comparatif des résultats obtenus dans cette thèse avec ceux de Garetz dans les solutions de H₂O [Sun^A 2008]. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux nombres de tubes.

L'histidine n'a pas montré un comportement de basculement du polymorphe mais une tendance par l'augmentation du taux de formation du polymorphe A après une application de la polarisation circulaire. Nos résultats semblent s'opposer à ceux de Garetz pour lesquels le maximum de formation du polymorphe A est obtenu pour la polarisation linéaire. Avec la polarisation circulaire, nous avons obtenu les polymorphes A et B au sein du même amas de cristaux.

La modification de la géométrie du montage est un élément factuel différenciant les deux montages (interface air/solution et interface verre solution). De plus, en solution il existe une transition de phase du polymorphe B (polymorphe le plus stable) vers le polymorphe A [Sun^A 2008]. Il est à noter qu'en solution aqueuse, les deux polymorphes se forment. Cela est attribué au fait que les deux polymorphes sont structurellement proches [Sun^A 2008] ce qui implique une vitesse de nucléation très proche [Roelands 2006]. Une explication cinétique semble devoir être privilégiée. Par conséquent, une très légère modification des conditions initiales peut alors avoir un impact important sur le polymorphe obtenu rendant le contrôle du polymorphisme, même induit par laser, très difficile.

II/ Acide glutamique

II-1) Motivations pour une étude préliminaire

Une étude préliminaire a été menée sur l'acide glutamique. Cette molécule est chirale et peut cristalliser en deux polymorphes différents A et B en fonction de la température [Srinivasan^A 2011] (voir chapitre 3, partie III). Bien que l'effet du laser ait été déjà étudié par Jelena Matic sur l'acide glutamique mais sans succès³⁷ [Matic 2005a], nous avons décidé d'utiliser le terrain favorable de la sélection polymorphique en fonction de la température. La possibilité d'induire une cristallisation sélective *via* la polarisation du laser a motivé l'étude de l'acide glutamique.

³⁷ Dans sa thèse, Jelena Matic ne détaille pas la méthodologie d'étude ni les résultats. Elle se contente de faire état d'un résultat négatif. Aucun article n'évoque la nucléation induite par laser de l'acide glutamique.

II-2) Solubilité et limite de zone métastable

II-2-1) Courbe de solubilité

La solubilité n'a pas été mesurée mais a été reprise de la littérature et nous avons utilisé la solubilité publiée par [Manzurola 2002]. Nous avons utilisé la forme B de l'acide glutamique. Le L - (+) - acide glutamique vient de chez Merck et le D - (-) - acide glutamique vient de chez Alpha Aesar.

II-2-2) Limite de zone métastable

La limite de zone métastable à 24 h dans H₂O correspond à une sursaturation de 280 % à 30°C et à 310 % à 40 °C (figure 7-15). A 17 °C, aucun tube n'avait cristallisé après 36 h. Il est à noter que le D - (-) - acide glutamique n'a pas cristallisé dans une durée inférieure à 36 h.

$$\beta_{c, L(+), B, D_2O, 30^\circ C(24 h)} = 28,73 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, L(+), B, D_2O, 30^\circ C(36 h)} = 21,56 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, L(+), B, D_2O, 40^\circ C(24 h)} = 49,4 \text{ mg/mL}$$

$$\beta_{c, L(+), B, D_2O, 17^\circ C(36 h)} = \text{aucune observation observée au bout de 36 h}$$

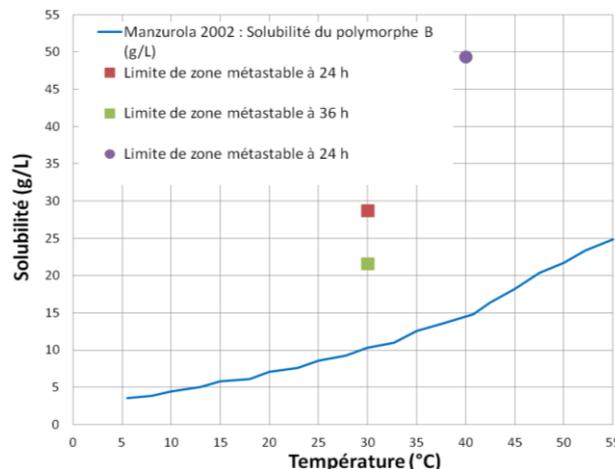


Figure 7-15 : Limite de Zone Métastable du L-(+)- acide glutamique à 30 °C et 40 °C.

II-3) Méthodologie d'étude

Deux méthodes d'études ont été employées (figure 7-16a et 7-16b).

La première méthode a été limitée au L - (+) - acide glutamique et s'inspire de celle de [Srinivasan^A 2011] : une solution d'une concentration correspondant à une sursaturation à 40 °C soit 14,51 mg/mL est préparée et mise à 40 °C sur le carrousel. La température est abaissée afin d'atteindre des températures caractéristiques de la courbe de la figure 3-11 : 30 °C (100 % polymorphe B), 22 °C (80 % polymorphe B), 19 °C (50 % polymorphe B), 13 °C (20 % polymorphe B), 5 °C (100 % polymorphe A) selon [Srinivasan^A 2011]. Cet abaissement de la température induit l'augmentation de sursaturation : 100 % à 40 °C, 140 % à 30 °C, 207% à 19 °C, 260 % à 13 °C, 340 % à 5 °C (figure 7-16a).

La seconde méthode a été employée pour les deux stéréo-isomères D et L à 17 °C et 30 °C. A ces deux températures, l'étude s'est portée sur les sursaturations suivantes : 150 %, 180 %, 210 % et 280 %. Le tableau 7-4 donne les équivalences entre la sursaturation et la concentration.

Sursaturation (%) / Température (°C)	17	30
150	9 mg/mL	15,4 mg/mL
180	10,8 mg/mL	18,5 mg/mL
210	12,6 mg/mL	21,5 mg/mL
280	16,8 mg/mL	28,7 mg/mL

Tableau 7-4 : Tableau d'équivalence entre la sursaturation et la concentration.

L'inexistence de courbe de solubilité du stéréo-isomère D récemment publiée³⁸ n'est pas un problème puisque, étant stéréo-isomères, D et L ont les mêmes courbes de solubilité. Ces deux températures correspondent à une zone où le polymorphe B est unilatéralement formé (30°C) et à une autre où le polymorphe B est formé entre 40 % et 60 % (17 °C). Il s'agit ici d'observer si l'une des deux polarisations pouvait induire la cristallisation d'une forme par rapport à l'autre (figure 7-16b).

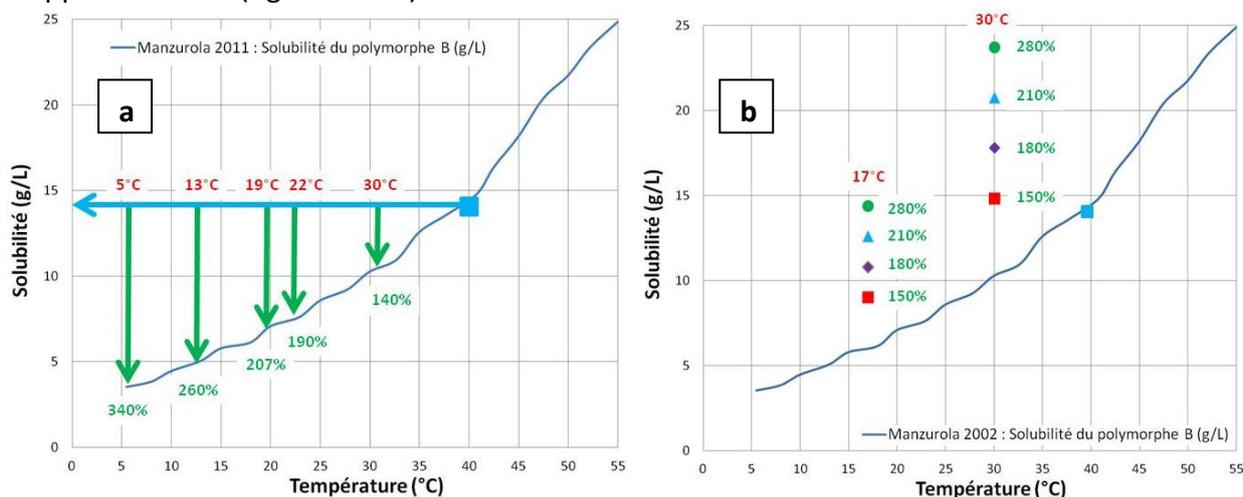


Figure 7-16 : (a) Premier protocole d'étude de l'acide glutamique, (b) Second protocole d'étude.

II-4) Nucléation induite par laser

Les solutions ont été exposées à une énergie de 910 MW/cm² pour une durée d'exposition de 60 s aux deux polarisations

II-4-1) Efficacité de la nucléation en fonction de la sursaturation

On remarque dans la figure 7-17 une augmentation progressive du taux de nucléation à mesure qu'augmente la sursaturation. Dès lors que la nucléation a lieu à l'intérieur de la LZM, on en conclut que le laser a un effet sur la solution et induit la nucléation.

³⁸ La courbe de solubilité de l'acide D – (-) – glutamique la plus récente trouvée a été publiée en 1933 par Dunn *et al.* et Dalton *et al.*

La seconde méthode s'est restreinte aux températures de 17 °C et 30 °C pour les stéréoisomères. A 30 °C, la nucléation a été observée et est représentée figure 7-18. Les taux sont les mêmes pour les deux polarisations ce qui semble montrer que la polarisation n'a pas d'effet sur le taux de nucléation. Contrairement à ce que nous avons montré figure 7-17, un fort taux de nucléation est relevé pour des sursaturations inférieures à 260 %.

Une hypothèse pouvant expliquer ce constat est l'effet de la température qui accroît l'agitation thermique favorisant de manière cinétique la nucléation par rapport au potentiel chimique apporté par une sursaturation supérieure. Ce constat de l'effet de la cinétique dû à la température semble être confirmé par l'observation d'aucune nucléation induite par le laser à 24 h pour une température de 17 °C.

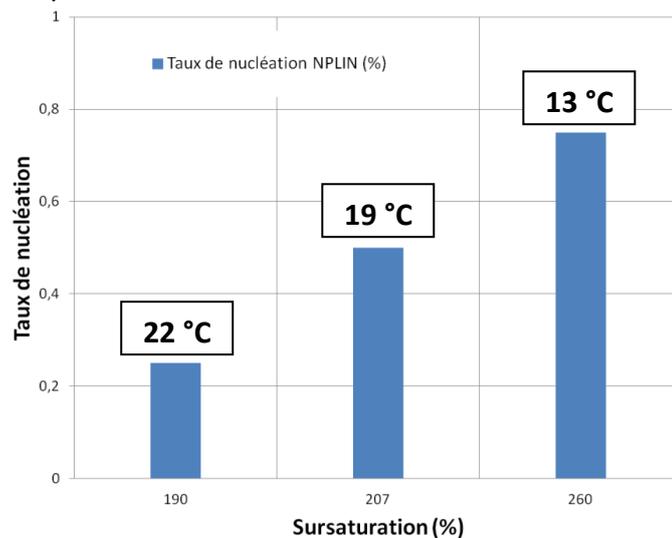


Figure 7-17 : Taux de nucléation à 24 h en fonction de la sursaturation obtenu avec la première méthode pour une exposition pendant 60 secondes à une densité d'énergie de 910 MW/cm². La sursaturation est calculée sur la base de la concentration initiale à 40 °C (14,51 mg/mL). 10 tubes pour chaque condition expérimentale.

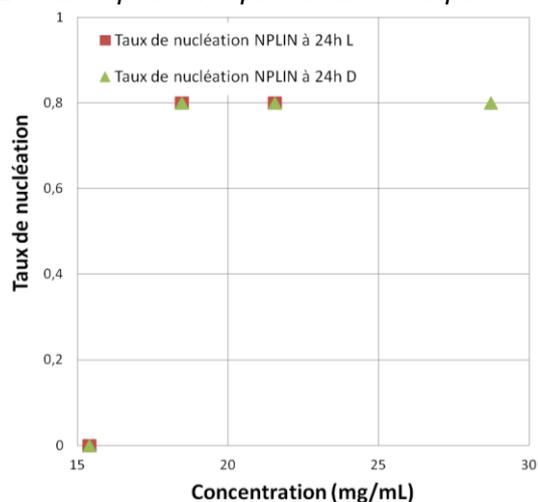


Figure 7-18 : Taux de nucléation à 24 h à 30 °C pour une exposition à une densité d'énergie de 910 MW/cm² en fonction de la concentration obtenu avec la seconde méthode.

II-4-2) Effet de la polarisation du laser

La fréquence de formation des polymorphes a été déterminée :

Avec la seconde méthode, à 30 °C seul, le polymorphe B est obtenu quelle que soit la polarisation (figure 7-19). Ce résultat tend à montrer que malgré une nucléation induite par le laser, la polarisation n'a aucun effet sur les polymorphes obtenus.

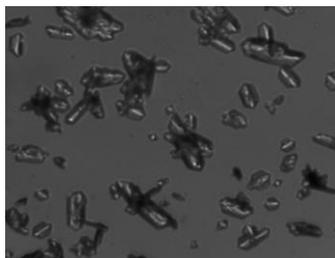


Figure 7-19 : Photographie de cristaux du polymorphe B du L – (+) – acide glutamique obtenus à 30 °C.

La première méthode a permis de montrer que là aussi le laser ne fait que stimuler la nucléation sans pour autant agir sur le polymorphisme. En effet, les taux de formation des polymorphes A et B par le laser restent analogue à ceux obtenus par [Srinivasan^A 2011] en nucléation spontanée comme le montre la figure 7-20.

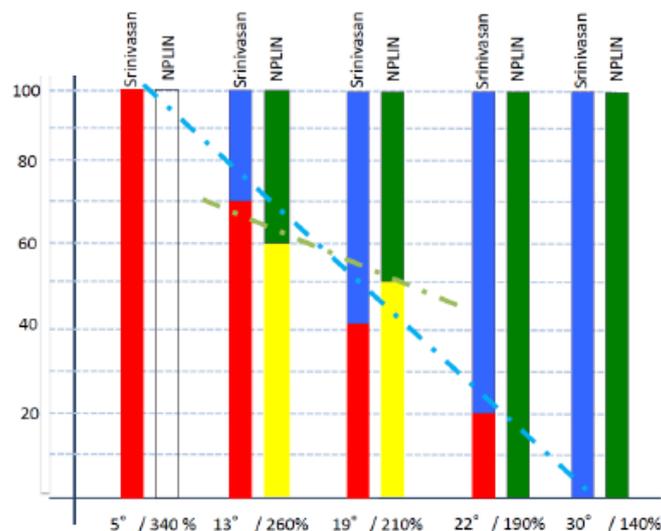


Figure 7-20 : Comparaison des taux de formation des polymorphes A et B pour une polarisation linéaire appliquée au L – (+) – acide glutamique : rouge : polymorphe A, bleu : polymorphe B, nucléation spontanée [Srinivasan^A 2011], jaune : polymorphe A, vert : polymorphe B (NPLIN).

Bilan

Nous avons étudié les molécules de L – (+) – histidine et de L – (+) – et D – (-) - acide glutamique avec notre nouveau montage. Sur l'histidine, nous avons démontré que le laser a un effet sur la nucléation dans H₂O et D₂O.

La polarisation linéaire, à l'inverse des résultats de Garetz, stimule la production dans H₂O du polymorphe A qui est le polymorphe métastable et l'augmentation de la densité d'énergie semble accentuer cela. Dans D₂O, la polarisation linéaire permet d'obtenir uniquement le polymorphe A. Le polymorphe B est produit par la polarisation circulaire. Nous avons effectué une étude préliminaire sur l'acide glutamique. Elle a montré que le laser a un effet sur la nucléation sans pour autant réussir à montrer l'influence de la polarisation.

Discussion, conclusions et perspectives

Ce dernier chapitre synthétise les résultats obtenus sur la glycine et les croise avec les éléments de bibliographie mis en valeur dans le chapitre 2 afin d'émettre de nouvelles hypothèses sur le mécanisme de la nucléation non photochimique induite par laser. Cette discussion amène à conclure sur ce travail de thèse puis à évoquer les perspectives.

Discussion

De nombreux résultats ont été obtenus du fait de l'étude multiparamétrique mais ils doivent être mis en perspective et synthétisés. Le tableau 1 résume paramètre par paramètre les résultats obtenus. Les résultats sur l'efficacité de la nucléation en fonction de la sursaturation et de la puissance, les faciès et le dénombrement des cristaux sont publiés pour la première fois puisque Garetz³⁹ s'est focalisé sur le contrôle du polymorphisme. Le tableau 2 compare les différences dans les protocoles expérimentaux, les tableaux 3 et 4 comparent nos résultats obtenus sur les caractérisations des polymorphes en fonction de différents paramètres avec ceux obtenus par d'autres équipes.

Comme nous le remarquons dans la partie X du chapitre 6, nos résultats sur la caractérisation des polymorphes ne corroborent pas ceux du groupe de Garetz⁴⁰ car nous n'obtenons pas, contrairement à eux, le basculement polymorphique. Nous montrons que le polymorphe α est formé très majoritairement dans H₂O et que le polymorphe γ a son taux de formation accru par la polarisation circulaire au-delà d'un seuil. En fonction de la densité d'énergie, la polarisation circulaire permet en moyenne la formation équiprobable des deux polymorphes alors que la polarisation linéaire stimule très majoritairement la formation du polymorphe α . Dans D₂O, le taux de formation s'inverse en faveur du polymorphe γ et, pour les concentrations étudiées, les deux polarisations donnent le même résultat.

Quel mécanisme ?

L'étude bibliographique sur les mécanismes présentée au chapitre 2 permet de dégager quelques éléments importants pour chacun des trois mécanismes décrits dans la littérature afin d'expliquer l'effet de l'exposition au laser : piégeage optique, cavitation et effet Kerr. Ces éléments sont résumés dans le tableau 5.

³⁹ [Sun^A 2006].

⁴⁰ *Ibid.*

Paramètres (solvant, polymorphe d'origine) / Effet		Contrôle du polymorphisme		Dénombrement des cristaux
Concentration Polarisation linéaire	H2O	α	Production très majoritaire du polymorphe α (90 %)	Non étudié
		γ	Production très majoritaire du polymorphe α (85 %)	Production similaire de MC(n) (50 %) et de MC(N) (50 %)
	D2O	α	Production majoritaire du polymorphe γ (65 %)	Production très majoritaire de MC(N) (70 %)
Concentration Polarisation circulaire	H2O	α	En dessous de 285 mg/mL production très majoritaire du polymorphe α (93 %), au dessus de 285 mg/mL production très majoritaire du polymorphe γ (70 %)	Non étudié
		γ	En dessous de 289 mg/mL production très majoritaire du polymorphe α (95 %), au dessus de 289 mg/mL production similaire des polymorphes α et γ (50 %)	Production très majoritaire de MC(N) (80 %)
	D2O	α	Production majoritaire du polymorphe γ (60 %)	Production similaire de MC(n) (43 %) et de MC(N) (44 %), A noter l'augmentation du nombre de poudre (P) (13 %)
Densité d'énergie Polarisation linéaire	H2O	α	Au-delà de 600 MW/cm ² , 100 % du polymorphe α, en dessous 80 % du polymorphe α.	Production similaire de MC(N) (55 %) et de MC(n) (45 %)
		γ	Sur l'ensemble de l'intervalle étudié, 98 % du polymorphe α.	Production similaire de MC(N) (40 %) et de MC(n) (60 %)
Densité d'énergie Polarisation circulaire	H2O	α	Sur l'ensemble de l'intervalle étudié, 50 % du polymorphe α.	Production très majoritaire de MC(N) (90 %)
		γ	Sur l'ensemble de l'intervalle étudié, 50 % du polymorphe α.	Production très majoritaire de MC(N) (85 %)
Durée d'exposition	H2O	α	100 % du polymorphe α produit	Production majoritaire de MC(N) (60 %)
		γ	100 % du polymorphe α produit	Production majoritaire de MC(N) (66 %)

Tableau 1 : Résumé des résultats par paramètre.

Variable \ Référence	[Sun ^A 2006]	[Yuyama 2012b]	Cette thèse
Interface	verre-solution	air-solution	air-solution
Densité d'énergie	240 MW/cm ²	[280 MW/cm ² ; 490 MW/cm ²]	910 MW/cm ²
Focalisation	Non	Oui	Non
Longueur d'onde (nm)	532	1064	532
Domaine impulsionnel	nanoseconde	continu	nanoseconde
Polymorphe d'origine	inconnu	inconnu	α (γ)
Solvant	H ₂ O	D ₂ O	H ₂ O (D ₂ O)
Température	17°C	23°C	17°C
Concentration	[240,2 mg/mL ; 292,76 mg/mL]	300 mg/mL, 220 mg/mL, 150 mg/mL	[251 mg/mL ; 298 mg/mL]
Polarisation linéaire	Voir tableau 3	Voir tableau 4	Voir tableau 3
Polarisation circulaire	Voir tableau 3	Voir tableau 4	Voir tableau 3

Tableau 2 : Comparaison des résultats obtenus avec ceux de [Sun^A 2006] et [Yuyama 2012b].

Référence	Concentration (mg/mL)	240	251	255	263	268	274	277,5	280	285	291	292,5	297
[Sun ^A 2006]	240 MW/cm ² - LP	α	-	γ	-	-	-	γ	-	-	-	γ	-
	240 MW/cm ² - CP	α	-	α	-	-	-	γ	-	-	-	γ	-
Cette thèse	910 MW/cm ² - LP	-	α	-	0,75 α / 0,25 γ	α	0,92 α / 0,08 γ	-	0,83 α / 0,17 γ	α	α	-	0,8 α / 0,2 γ
	910 MW/cm ² - CP	-	α	-	α	0,8 α / 0,2 γ	α	-	0,83 α / 0,17 γ	α	0,2 α / 0,8 γ	-	0,4 α / 0,6 γ

Tableau 3 : Résumé des résultats de caractérisation des polymorphes suivant différents paramètres obtenus avec un laser nanoseconde. Les « - » symbolisent le fait que ce paramètre n'a pas été étudié par la référence.

Référence	Densité d'énergie (MW/cm ²)	280	350	385	420	455	490
[Yuyama 2012b]	300 mg/mL - LP	α	α	0,8 α / 0,2 γ	0,7 α / 0,3 γ	0,6 α / 0,4 γ	0,8 α / 0,2 γ
	300 mg/mL - CP	α	0,9 α / 0,1 γ	0,5 α / 0,5 γ	0,7 α / 0,3 γ	α	α
	220 mg/mL - LP	0,7 α / 0,3 γ	0,7 α / 0,3 γ	0,6 α / 0,4 γ	0,6 α / 0,4 γ	0,5 α / 0,5 γ	0,8 α / 0,2 γ
	220 mg/mL - CP	0,7 α / 0,3 γ	0,6 α / 0,4 γ	0,2 α / 0,8 γ	0,3 α / 0,7 γ	0,4 α / 0,6 γ	0,6 α / 0,4 γ
	150 mg/mL - LP	α	α	α	0,9 α / 0,1 γ	0,1 α / 0,9 γ	0,7 α / 0,3 γ
	150 mg/mL - CP	α	α	α	α	α	0,6 α / 0,4 γ

Tableau 4 : Résumé des résultats de la caractérisation des polymorphes suivant différents paramètres obtenus avec un laser continu.

Mécanisme	Observations et type de laser
Piégeage optique	laser continu focalisé
	obtention d'un monocristal au point focal
Effet Kerr	laser nanoseconde
	fenêtre de basculement polymorphique
Onde de choc	laser nanoseconde focalisé
	observation de la création puis de la disparition d'une bulle au sein de la cavitation
Cavitation	laser femtoseconde focalisé
	observation de la création puis de la disparition d'une bulle au sein de la cavitation

Tableau 5 : *Éléments importants pour chacun des mécanismes liés à la cristallisation photoinduite.*

Nos résultats ne sont pas similaires à ceux de Garetz en terme de taux de production des polymorphes α et γ en fonction de la concentration et de la polarisation. Il est donc nécessaire de s'interroger sur les mécanismes possibles.

Le premier mécanisme est la création d'une variation locale de la concentration au sein de la solution par une onde de choc comme l'avancent Jacob *et al.*⁴¹ et Belloni *et al.*⁴². Cela est soutenu par les résultats obtenus dans $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et KMnO_4 ⁴³. La différence de ces travaux avec celui de cette thèse est l'utilisation de la focalisation du faisceau au sein de la solution. Cette focalisation peut impliquer aussi la création de bulles comme le montrent Soare *et al.*⁴⁴. L'effet de la polarisation n'a pas été étudié dans le cadre des lasers nanoseconde focalisés. Lorsque cela a été fait avec un laser femtoseconde focalisé sur une solution de glycine, aucun effet de la polarisation n'a été montré puisque seul le polymorphe α a été cristallisé⁴⁵.

Le faisceau non focalisé utilisé dans le cadre ce travail de thèse a une densité d'énergie de $0,91 \text{ GW/cm}^2$, le faisceau focalisé utilisé par Jacob *et al.*⁴⁶ a une densité d'énergie de 15 GW/cm^2 . La focalisation permet dans ce cas de multiplier par un facteur 263 la densité d'énergie initiale du laser et de focaliser l'énergie⁴⁷ (rapport entre la densité d'énergie au point focal et celle en sortie du laser). Outre l'énergie, la focalisation a pour effet de déclencher la cristallisation au bout d'une impulsion unique de quelques nanosecondes. Nous avons montré qu'une impulsion n'était pas suffisante pour déclencher la cristallisation et qu'il en fallait au moins dix. Néanmoins, l'intervalle entre une et dix impulsions n'a pas été étudié. Cela laisse la porte ouverte à des bulles induites au sein de la solution par le faisceau du laser comme l'ont démontré Knott *et al.*⁴⁸ en induisant la création de bulles de CO_2 , gaz préalablement dissous.

⁴¹ [Jacob 2012].

⁴² [Belloni 2014]. Se référer au résumé.

⁴³ [Soare 2011].

⁴⁴ *Ibid*

⁴⁵ [Liu^B 2013].

⁴⁶ [Jacob 2012].

⁴⁷ *Ibid*

⁴⁸ [Knott 2011a].

L'effet de la polarisation tendrait à montrer que la cristallisation induite due à des bulles est peu probable. En effet, une bulle possède une symétrie sphérique indépendante de la polarisation incidente et qui par conséquent ne répercutera pas l'effet de la polarisation.

On peut dès lors émettre l'hypothèse que le mécanisme ne génère pas une onde de choc ou une bulle au sein de la solution et qu'il faut se tourner vers des effets électrodynamiques pouvant notamment rendre compte de la fenêtre de basculement polymorphique (« *polarization switching* ») et donc de l'effet de la polarisation. D'autres auteurs ont évoqué le fait d'avoir fait cristalliser de manière sélective des polymorphes^{49,50}.

Il faut à ce stade préciser ce qu'on appelle « *polarization switching* » ou basculement des polymorphes. Les travaux du groupe de Garetz *et al.* sur la glycine⁵¹ montre un basculement des polymorphes puisque en fonction de la sursaturation et de la polarisation, il est obtenu 100 % du polymorphe α ou 100 % du polymorphe γ (voir tableau 3). C'est actuellement le seul exemple connu d'un tel basculement car ni sur l'histidine, ni sur la carbamazépine, ni sur la glycine exposée à un laser continu n'ont été obtenus de tels résultats. Dans les trois cas cités précédemment, un accroissement du taux de formation d'un des polymorphes a été obtenu respectivement par la polarisation⁵², la conjonction de la polarisation et du solvant⁵³, la conjonction de l'énergie et de la polarisation⁵⁴.

Le mécanisme proposé pour expliquer la cristallisation sélective de la glycine est l'effet Kerr. L'effet Kerr optique se manifeste par l'alignement de pré-« *clusters* » avec des polarisabilités « *rod-like* » pour la polarisation linéaire (les précurseurs du polymorphe γ sont des chaînes hélicoïdales) et des polarisabilités « *disk-like* » pour la polarisation circulaire (les précurseurs du polymorphe α sont des dimères cycliques). Cette hypothèse implique la présence en solution de dimères cycliques comme élément précurseur du polymorphe α et de chaînes hélicoïdales comme élément précurseur du polymorphe γ ⁵⁵. Les auteurs se basent sur une étude pour appuyer l'hypothèse des dimères cycliques⁵⁶ mais, à notre connaissance, aucune observation ne permet d'étayer le fait qu'il existe des éléments précurseurs pour le polymorphe γ ⁵⁷.

Dans le cas de la glycine, les groupes japonais et américains se basent sur l'existence de précurseurs dans la solution. Cette hypothèse validerait *de facto* la théorie classique de la nucléation sans pour autant réussir à expliquer l'importante réduction du temps de nucléation^{58,59}. Afin d'appuyer et de démontrer l'hypothèse Kerr, Garetz *et al.* ont démontré que la glycine peut être cristallisée par un champ électrique externe statique d'une valeur

⁴⁹ [Ikni 2014].

⁵⁰ [Yuyama 2012b].

⁵¹ [Sun^A 2006].

⁵² [Sun^A 2008].

⁵³ [Ikni 2014].

⁵⁴ [Yuyama 2012b].

⁵⁵ [Sun^A 2006].

⁵⁶ [Carter 1994].

⁵⁷ [Sun^A 2006].

⁵⁸ [Sun^A 2006].

⁵⁹ [Sugiyama 2012].

$E_{dc} = 6 \times 10^5 \text{ V.M}^{-1}$ de deux ordres de grandeur inférieur à celui du laser^{60,61}. Le polymorphe γ de la glycine est cristallisé, ce qui d'après Garetz *et al.* montre la validité de l'hypothèse Kerr en actant l'existence de dimères cycliques et de précurseurs γ .

Une hypothèse pour expliquer le basculement des polymorphes est l'existence de précurseur « *rodlike* » ou « *disklike* ». D'importants débats ont été engagés autour de l'existence de ces précurseurs. Notons pour le moment que la brutale apparition et disparition du phénomène de sélection polymorphique en fonction de la sursaturation n'a pas été expliquée. Actuellement, aucunes preuves expérimentales n'existent pour étayer leur existence dans les solutions de carbamazépine ou d'histidine, à la raison essentielle d'une lacune d'études expérimentales.

Une étude a été menée par une autre équipe afin d'étudier l'effet d'un champ électrique externe continu et alternatif sur des solutions de glycine dans un dispositif spécialement adapté⁶². Les résultats montrent que le champ électrique induit la cristallisation unique du polymorphe α (y compris dans les conditions où Garetz *et al.* ont affirmé avoir obtenu le polymorphe γ) et que l'hypothèse de bloc élémentaire de dimère cyclique pour le polymorphe α n'est plus valable. Se basant sur leurs résultats, Di Profio *et al.*⁶³ avancent comme explication l'accroissement du potentiel chimique de la solution $\Delta\mu_0$ dû à l'existence du champ électrique (équation⁶⁴ [1]).

$$\Delta\mu_E = \frac{1}{2} \sum_j \left(2\Delta\mu_0^j + \Omega_L^j \frac{\partial \varepsilon_L}{\partial X_L^j} E - \Omega_S^j \left(\frac{\varepsilon_L}{\varepsilon_S} \right)^2 \frac{\partial \varepsilon_S}{\partial X_S^j} E \right) [1]$$

La variable j représente l'espèce chimique $j^{\text{ième}}$, les indices S et L signifient respectivement solide et liquide; Ω est le volume molaire, E est l'intensité du champ électrique, X est la fraction molaire, ε est la valeur diélectrique du système.

Dans le cas de la glycine, le polymorphe α a une constante diélectrique inférieure à celle du polymorphe γ . Si on considère que les permittivités en phase liquide sont les mêmes pour les deux polymorphes, alors le potentiel chimique modifié du polymorphe α sera supérieur à celui du polymorphe γ , accroissant aussi la probabilité de formation du polymorphe α . Di Profio *et al.* montrent que les facteurs contrôlant le polymorphisme de la glycine sont les suivants par ordre d'importance d'effet : effet électrodynamique > pH > sursaturation > concentration. La conclusion de ce travail est l'existence au sein de la solution de dimères ouverts qui sont les éléments élémentaires permettant la cristallisation du polymorphe α ou polymorphe γ .

L'inexistence de précurseurs comme des dimères cycliques au sein de la solution est montré par plusieurs études expérimentales et numériques. Des études montrent que la glycine

⁶⁰ [Aber 2005].

⁶¹ Les auteurs montrent que le polymorphe γ est cristallisé. Il est à noter que la LZM n'a pas été déterminée, les sursaturations sont élevées à 20°C (1,8 à 2,0) et le temps d'attente de nucléation est de plusieurs jours.

⁶² [Di Profio 2013].

⁶³ *Ibid.*

⁶⁴ [Koizumi 2010].

existe majoritairement sous forme de monomères en solution⁶⁵. La présence de dimère en solution est attestée par une expérience de simulation numérique : la fraction des monomères à 25°C (280 mg/mL) est de 55 %, des dimères est 25 %, des clusters plus gros est de 20 %⁶⁶. Ces dimères sont des dimères ouverts (« *open dimers* ») et sont considérés comme pouvant être les éléments précurseurs des polymorphes α et γ ⁶⁷. A cela, s'ajoute l'existence démontrée expérimentalement de « *nanodroplets* » de 250 nm au sein des solutions (10⁹ entités par mL) qui sont trop petites pour aboutir à une nucléation spontanée⁶⁸ mais suffisamment grosses pour interagir avec le laser⁶⁹.

En l'état des connaissances, la génération de bulles au sein de la solution semble exclue pour les trois raisons suivantes : absence de focalisation, absence de nucléation induite après une impulsion et l'effet de la polarisation sur la nucléation des polymorphes.

Un mécanisme d'origine électrodynamique

Le mécanisme proposé prend racine dans les constatations de l'existence de larges structures dans les solutions de glycine⁷⁰ et d'urée⁷¹, l'effet du solvant et celui de la polarisation. Le terme électrodynamique renvoie à l'emploi du champ électrique du laser dépendant du temps.

Nos résultats s'accommoderaient avec l'explication des effets électrodynamiques comme l'électromigration pour expliquer la formation très majoritaire du polymorphe α dans H₂O avec la polarisation linéaire : les éléments polarisés sont amenés à osciller dans une direction perpendiculaire à celle de propagation du faisceau. Une telle configuration favoriserait la cristallisation du polymorphe α pour des questions de cinétique car il est établi que ce polymorphe est cinétiquement favorisé⁷² et croît à une vitesse jusqu'à 500 fois plus rapide^{73,74} que celle du polymorphe γ .

Néanmoins l'effet de la polarisation circulaire reste à être interprété puisque celle-ci accroît la formation du polymorphe γ . Sugiyama *et al.*⁷⁵ dans un article de revue citant Yuyama *et al.*⁷⁶ propose comme mécanisme celui du piégeage optique par trois forces optiques⁷⁷ dont celle de gradient due à l'intensité du laser I (α est la polarisabilité de la particule) [2] qui assure un piégeage dans un plan perpendiculaire à celui de la direction de propagation du faisceau⁷⁸.

⁶⁵ Se référer au chapitre 3, I-5.

⁶⁶ [Yani 2012].

⁶⁷ [Di Profio 2013].

⁶⁸ [Jawor-Baczynska 2012].

⁶⁹ [Chiang 2013].

⁷⁰ [Jawor-Baczynska 2012].

⁷¹ [Ward 2013].

⁷² [Lee 2008b].

⁷³ [Chew 2007].

⁷⁴ [Han 2010].

⁷⁵ [Sugiyama 2012].

⁷⁶ [Yuyama 2012b].

⁷⁷ [Usman 2012b], [Usman 2013], [Chiang 2013].

⁷⁸ [Usman 2013].

$$F_{\text{grad}} = \frac{1}{2} \alpha \nabla I = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2 \quad [2]$$

Le piégeage optique est bien établi pour les lasers continus et il a été démontré pour les lasers femtoseconde⁷⁹ et picoseconde⁸⁰ avec des objets possédant une taille allant de 5 nm à 50 nm. Cela nous amène à supposer que le piégeage pourrait exister avec les lasers nanoseconde même sans focalisation. Des objets peu ordonnés d'une taille moyenne de 50 nm au sein de la solution de glycine pourraient être piégés et commencer à adopter un ordre sous l'effet de l'électromigration. La caractérisation du polymorphe serait conditionné par les propriétés de la solution. Ce qui nous amène à nous orienter vers un tel phénomène est l'énergie que nous utilisons, 910 MW/cm², qui est du même ordre de grandeur que l'énergie issue de la focalisation du faisceau continu dans Yuyama *et al*⁸¹ qui est de 385 ± 100 MW/cm².

L'accroissement de la formation du polymorphe γ avec la polarisation circulaire proviendrait de l'amélioration du piégeage dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation. En effet, l'amélioration du piégeage se fait avec le concours de l'augmentation de la concentration qui aboutit à la formation du polymorphe γ selon le mécanisme proposé par Sugiyama *et al*⁸². L'aspect cinétique privilégiant le polymorphe α est dans cette situation mis en concurrence avec l'augmentation locale de la densité de glycine. Cette mise en concurrence semble être attestée par un taux de formation qui reste autour de 50 %.

Le polymorphe initial ne semble pas avoir une influence majeure sur la caractérisation du polymorphe. On voit comparativement à ce que nous observons avec le polymorphe α que le seuil de la polarisation circulaire est plus bas et que le taux de formation avec la polarisation linéaire est légèrement plus élevé. L'augmentation du taux de formation du polymorphe γ lorsqu'on utilise un polymorphe d'origine γ tendrait à montrer que des éléments ordonnés du polymorphe γ subsistent dans la solution, ce qui abaisserait le seuil en concentration pour la polarisation circulaire. Cela rejoint les explications avancées par Boldyreva *et al*.⁸³ pour justifier la nucléation du polymorphe γ ⁸⁴ en solution.

En l'état des connaissances, il est difficile de conclure sur la validité ou non de l'hypothèse Kerr avancée par Garetz et son groupe. La modification de l'interface semble donc avoir une incidence importante sur la possibilité de contrôler le polymorphe.

⁷⁹ [Chiang 2013].

⁸⁰ [Wang 2011].

⁸¹ [Yuyama 2012b].

⁸² [Sugiyama 2012].

⁸³ [Boldyreva 2003c].

⁸⁴ [Boldyreva 2003c]. *Actually, the success of crystallizing the γ -polymorph seemed to depend much more on the presence of the seeds of this polymorph in the powder used for preparing a saturated solution, than on the solvent used. [...] One can suppose the clusters of glycine zwitter-ions keeping memory of the parent crystal structure to remain in solutions also after the dissolution of the γ -form. Since the chemicals used for the crystallization of glycine polymorphs never contain the β -form, but, generally, a mixture of the α - and the γ -forms in different ratios, these two forms are also most easily crystallized from freshly prepared solutions the γ -form if the formation of dimers is prevented, the α -form if not.*

La conséquence immédiate dans H₂O serait finalement une limitation de la possibilité de pleinement contrôler le polymorphisme avec seulement la polarisation comme le montrent nos résultats. Ainsi, à un critère géométrique⁸⁵ de l'empilement basique cristallin, il faudrait substituer un critère de permittivité conditionné par l'environnement du soluté donc le solvant.

En conclusion de cette discussion, la nucléation se ferait dans un premier temps par, l'accroissement de la densité locale dû à l'electromigration puis une fois la densité critique atteinte, la nucléation commence. Ceci oriente vers un processus en deux étapes décrit dans le chapitre I à l'opposé de la théorie classique de la nucléation qui nécessite seulement l'existence d'entités possédant déjà la symétrie du cristal final. Nous pouvons classer les facteurs contrôlant le polymorphisme de la glycine dans le cadre de la nucléation photoinduite par ordre d'importance d'effet de la façon suivante : solvant > concentration > polarisation > polymorphe d'origine.

Conclusions

Ce travail de thèse a permis au travers de ses différents chapitres de permettre d'accroître les connaissances dans le domaine de la nucléation induite par laser. Nous allons ici brièvement résumer les apports importants des différents chapitres.

Dans le chapitre 1 « *Généralités sur la nucléation* », nous avons explicité quelques concepts fondamentaux de la cristallisation en solution et détaillé les différences entre la théorie classique de la nucléation et celle de la nucléation en deux étapes.

Dans le chapitre 2 « *Etat de l'art sur la nucléation induite par laser* », nous avons proposé une définition précise de la notion de nucléation induite par laser excluant la photochimie et la nucléation secondaire. Sur la base de cette définition, un état de l'art détaillé sur la nucléation induite par laser a été établi. Il montre que cette méthode est plurielle à la fois sur les types de laser utilisés, sur les configurations expérimentales et sur les molécules étudiées. L'étude de la nucléation induite par laser de différentes molécules dans des conditions différentes a montré que plusieurs paramètres influençaient le résultat de la cristallisation. Ces différentes méthodes sont, d'après la littérature, associées à différentes hypothèses sur les mécanismes impliqués (effet Kerr, onde de choc, cavitation et création de bulles, piégeage optique).

Dans le chapitre 3 « *Etat de l'art des molécules étudiées* », nous avons établi un état des lieux des connaissances (nucléation, cristallisation, polymorphisme – nature et caractérisation) sur les trois molécules étudiées : la glycine, l'histidine et l'acide glutamique. Le polymorphe α de la glycine est favorisé dans les conditions normales par sa cinétique de croissance. L'histidine a également deux polymorphes dont les vitesses de formation sont similaires, ce qui s'explique par des structures cristallines très proches. L'acide glutamique possède aussi deux polymorphes dont les domaines d'existence dépendent de la température.

⁸⁵ Se référer à la demande ANR pour le projet NPLIN-4-Drug. Document consulté le 1^{er} juillet 2014.

Dans le chapitre 4 « *Développement d'un montage dédié à l'étude de la nucléation induite par laser* », nous avons présenté le travail de développement de notre montage. Ce montage associe automatisation, capacité de 90 tubes, observation en temps réel et contrôle des conditions de l'expérience. Il est le fruit d'une étude minutieuse des montages existants et de l'établissement de nos besoins.

Dans le chapitre 5 « *Méthodes expérimentales* », nous avons détaillé les méthodes utilisées en amont et en aval de l'irradiation de la solution par le laser. La solubilité a été déterminée soit expérimentalement au CINaM de Marseille par la méthode des ajouts successifs soit d'après les données existantes dans les publications de la littérature notamment pour l'acide glutamique. La méthode d'identification optique grâce à notre caméra a été centrale dans ce travail.

Dans le chapitre 6 « *Effet de la nucléation induite par laser sur la glycine* », nous avons effectué une étude détaillée de la nucléation induite par laser de la molécule de glycine. Ce travail s'est basé sur la mesure de la solubilité de la glycine dans H₂O et dans D₂O. Il est intéressant de constater la divergence des résultats provenant de la littérature sur l'effet de D₂O. Notre étude a montré l'absence d'effet dû à D₂O. L'étude de la glycine a montré grâce à la vidéo que le laser a un effet direct permettant de réduire le temps d'induction de $6,0 \cdot 10^5$ s (nucléation spontanée) à $2,3 \cdot 10^2$ s soit 3 ordre de grandeur. Les résultats ont montré que le solvant a une influence prépondérante sur la nucléation du solvant car D₂O provoque un taux de nucléation du polymorphe γ plus élevé que dans H₂O. Dans H₂O, il y a un très fort taux de formation du polymorphe α et l'on note l'influence de la polarisation circulaire à partir d'un seuil où l'on observe l'augmentation du taux de formation du polymorphe γ . Ce travail a également montré que le ménisque est un site de nucléation et de croissance alors que le fond du tube pourrait n'être qu'un site de croissance. Contrairement aux résultats de Garetz, nous n'avons pas reproduit la spectaculaire fenêtre de basculement des polymorphes par l'effet de la polarisation. Toutefois, nous avons montré que la polarisation a un effet dans H₂O sur le taux de formation des polymorphes. Cet effet est très limité dans D₂O. Nous attribuons cela à la modification de la géométrie entre les deux montages puisque dans le nôtre, le faisceau passe par l'interface air/solution. Enfin, nous avons montré l'effet du laser sur la morphologie par la nucléation de faciès non référencé à notre connaissance dans la littérature.

Dans le chapitre 7 « *Etude préliminaire de l'effet de la nucléation induite par laser sur l'histidine et l'acide glutamique* », nous avons étudié l'effet du laser sur l'histidine et l'acide glutamique. Préalablement, la solubilité de l'histidine dans D₂O et dans H₂O a été mesurée. Cela a permis de montrer l'effet de D₂O sur la solubilité, à l'inverse de ce que nous avons établi pour la glycine. Nous avons montré l'effet du laser dans les solutions de D₂O et de H₂O. Cela a permis de mettre en avant l'effet du solvant sur les polymorphes obtenus. Concernant l'acide glutamique, nous avons montré l'effet du laser sur la nucléation sans pour autant réussir à initier un contrôle du polymorphisme.

Dans la discussion, nous avons mis en exergue l'absence de certitudes autour de l'effet Kerr comme mécanisme dès lors que les conditions nécessaires à son existence ne sont pas remplies (existence de précurseur) et que nos résultats montrent une préférence différente

dans la nucléation des polymorphes par rapport à ce que Garetz *et al.*⁸⁶ ont obtenu. Le mécanisme à privilégier pourrait être d'origine électrodynamique incluant la probabilité du piégeage de « cluster » ordonné ou non par les forces optiques.

La nucléation induite par laser a débuté en France par ce travail de thèse combiné à celui d'Aziza Iknî. Ce travail a permis d'établir une méthode systématique d'étude des molécules permettant de démontrer l'effet du laser sur la nucléation.

Cette thèse a apporté de nouvelles données concernant les solubilités de la glycine et de l'histidine. Elle a montré que le site de nucléation est le ménisque et cela pour les trois molécules : glycine, histidine et acide glutamique. Notre étude exhaustive de la glycine a mis en avant l'importance du solvant concernant les faciès obtenus et les polymorphes nucléés.

Dans l'introduction, l'objectif à terme était défini comme la démonstration de la faisabilité industrielle de la nucléation induite par laser. A l'issue de ce travail, il est clair que cet objectif est encore loin d'être réalisé car le mécanisme est encore mal compris rendant le contrôle du polymorphisme par la nucléation induite par laser difficile pour le moment. Toutefois, ce travail a ouvert sur des perspectives qui contribueront à rendre cette méthode industrialisable.

Perspectives

Cette thèse est un jalon de plus pour comprendre les effets de photoinduction de la cristallisation. Elle a en outre montrée le besoin de continuer les travaux de recherche dans ce domaine. Les équipes japonaises et américaines continuent à publier montrant la vitalité de ce domaine. Dès lors, quelles sont les perspectives associées à ce travail et les possibilités d'évolution pour l'étude de la cristallisation photoinduite à l'Ecole Centrale ?

Travaux expérimentaux sur la cristallisation photoinduite

L'incertitude issue des travaux sur l'effet de la polarisation et le problème de la reproductibilité concomitant au faible nombre de tubes par condition expérimentale montrent qu'une troisième série de mesures sur la glycine doit être entreprise en augmentant sensiblement la statistique. Une nouvelle série d'études combinant les deux types d'interfaces (voir figure 6-6) devrait permettre de conclure sur l'effet de la polarisation et celui de l'interface.

De plus, des travaux complémentaires sur l'acide glutamique et l'histidine doivent être menés. L'étude préliminaire a montré que le laser a un effet sur sa cristallisation et peu de paramètres ont été étudiés. L'acide glutamique présente des zones d'existence de polymorphe en fonction de la température, et pourrait réagir à l'évolution de la puissance ou à d'autres paramètres que l'étude bibliographique du chapitre 3 n'a pas mis en évidence. L'évolution des résultats sur la glycine a montré que de petits changements pouvaient avoir un effet important sur la caractérisation des résultats⁸⁷.

⁸⁶ [Sun^A 2006].

⁸⁷ Nous faisons ici référence notamment au changement de l'interface solution-laser.

L'histidine est une molécule chirale. Nous avons montré que D₂O a un effet sur le polymorphe obtenu. Une continuité de ce travail préliminaire consisterait à étudier le stéréo-isomère D de cette molécule et à continuer à étudier l'effet de D₂O.

D'autres paramètres peuvent avoir un effet comme le pH ou la focalisation du faisceau. Plusieurs expériences ont été tentées avec le pH mais sans succès, ce qui n'exclut pas de s'intéresser à ce paramètre dont l'effet sur la caractérisation polymorphique a été démontré en nucléation spontanée⁸⁸. La focalisation du faisceau en régime nanoseconde n'a pas été effectuée jusqu'à maintenant. La mise en place de ce nouveau paramètre sur des solutions de glycine, actuellement la molécule où le plus de données ont été récoltées, permettrait d'améliorer les connaissances sur la photoinduction de la nucléation.

A cela, s'ajoute l'étude de nouvelles molécules ou d'association de molécules. Actuellement, la molécule de sulfathiazole est étudiée mais d'autres associations pourraient être intéressantes comme les co-cristaux à base de menthol et de lidocaïne⁸⁹, d'autant plus que le menthol est une molécule chirale⁹⁰ et sa structure récemment résolue⁹¹. L'étude de solutions aqueuses combinant un composé organique comme la glycine et des sels comme le KCl serait intéressante puisque ces deux composés ont démontré leurs capacités à cristalliser sous l'effet d'un champ laser.

Connaître les premières étapes de la nucléation

Les premières étapes de la nucléation sont peu connues et sont pourtant capitales pour connaître l'effet réel du laser et ainsi optimiser la cristallisation. Ainsi, des travaux doivent être menés dans cette voie tels ceux d'Alexander *et al.* sur l'urée⁹² ou de Chattopadhyay *et al.* sur la glycine⁹³.

A ce titre, des expériences préliminaires de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ont été menées en partenariat avec Jonathan Farjon de l'ICMO (Paris XI) sur la glycine ainsi que l'emploi de la DLS (voir Annexe F). Ces expériences pourraient apporter des informations supplémentaires sur le processus de nucléation spontanée en solution. Un tel travail pourrait trouver son aboutissement dans une expérience de grande ampleur au synchrotron SOLEIL à l'image de ce qui a été fait pour l'étude SAXS⁹⁴ de la glycine : le suivi de la nucléation spontanée puis celui de la nucléation photoinduite apporterait une contribution majeure à la compréhension du phénomène de nucléation induite par laser.

En parallèle de ces expériences, un pôle de simulation numérique pourrait être développé. De nombreuses équipes ont étudié numériquement les phénomènes de nucléation mais des outils doivent encore être développés, notamment pour inclure l'effet du laser. Des travaux existent et peuvent servir de base de travail.

⁸⁸ [Lee 2008b].

⁸⁹ [Corvis 2010].

⁹⁰ [Corvis 2012].

⁹¹ [Corvis 2013]. Se référer à la page 158.

⁹² [Ward 2014].

⁹³ [Chattopadhyay 2005].

⁹⁴ *Ibid*

Modéliser la nucléation induite par laser

La modélisation de la nucléation a été effectuée par plusieurs auteurs sur plusieurs molécules différentes. Dirk Zahn qui a étudié la nucléation du NaCl remarque que malgré des outils expérimentaux de plus en plus performants, les premières étapes de la nucléation sont encore peu connues⁹⁵. Les études s'intéressant uniquement à la structure et aux comportements des dimères de la glycine^{96,97} par exemple ne sont pas suffisantes car elles se limitent aux configurations dans la solution et ne tiennent pas compte d'autres études ayant montré l'existence de gros agrégats⁹⁸. Dès lors, des simulations complexes sont à préconiser comme cela a été fait sur l'acide glutamique⁹⁹ et en multipliant les paramètres¹⁰⁰.

La modélisation du phénomène de nucléation induite par laser pose plusieurs problèmes à commencer par le choix de la méthode et du modèle. Les équations qui régissent les effets du laser¹⁰¹ sont complexes et dépassent une première approche par la force de Lorentz [3] :

$$\vec{F} = q\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B} \quad [3]$$

Le choix du modèle va conditionner le résultat final. Un modèle basé sur les forces électrodynamiques pourrait montrer la possibilité que ces forces induisent la nucléation comme ceux développés par Chiang *et al.*¹⁰², Usman *et al.*¹⁰³.

Améliorer le montage

L'avenir du montage est le développement et l'amélioration du suivi *in situ* de la nucléation. Cela se fera grâce à la DLS (*Dynamic Light Scattering*) et à la spectroscopie de fluorescence de molécules spécialement choisies pour leurs propriétés de fluorescence. En effet, les spectres de fluorescence, la durée de vie et la polarisation de l'échantillon dépendent de la forme agrégée, de la stœchiométrie et de l'orientation.

L'analyse des données générées va donc donner des informations sur la conformation cristalline des agrégats de cette forme cristalline. Dimères et oligomères présentent des spectres de fluorescence rouge décalés en raison de la stabilisation des états excités par couplage dipolaire entre les molécules. En utilisant le temps résolu de comptage de photon unique, nous pourrions suivre la dynamique des agrégats dans l'ordre de la nanoseconde et nous devrions être en mesure de sonder le déplacement de l'équilibre au sein de la population des agrégats induite par le laser *NPLIN*. La nucléation et des éventuelles transformations polymorphiques pourraient être suivies par l'analyse de la turbidité¹⁰⁴.

⁹⁵ [Zahn 2004].

⁹⁶ [Yani 2012].

⁹⁷ [Hamad 2008].

⁹⁸ [Jawor-Baczynska 2012].

⁹⁹ [Molliet 2008].

¹⁰⁰ [Kuks 2014].

¹⁰¹ [Usman 2012, 2013b] et [Chiang 2013].

¹⁰² *Ibid.*

¹⁰³ *Ibid.*

¹⁰⁴ [Sypek 2012] et [Jacob 2012].

La compréhension du mécanisme passera par l'emploi d'outils de diagnostics spécifique afin de tester les deux hypothèses majeures : onde de choc ou effet électrique. Cela ne pourra se faire qu'avec l'usage d'instruments de précision comme les lasers à même de mesurer des surpressions locales et la possibilité de filmer le processus de nucléation en même temps que l'irradiation du laser. Il reste aujourd'hui à démontrer la stabilité du processus de photoinduction de la cristallisation par une reproductibilité contrôlée.

Enfin, la constitution d'un pôle de recherche dédié à la photoinduction constitué des équipes de l'Ecole Centrale de Paris, de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan et de l'Université Paris Sud offrira une mutualisation des moyens et des personnes accroissant la visibilité internationale et la qualité des résultats obtenus.

Table des figures

Figure	Descriptif	Source
Chapitre 1		
Figure 1-1	(a) Diagramme de solubilité directe, (b) : solubilité indirecte.	
Figure 1-2	Courbe de solubilité directe. Les trois zones sont représentées : zone sursaturée, zone métastable et zone sous saturée.	
Figure 1-3	Energie libre d'activation de nucléation homogène et représentation graphique des contributions de surface et de volume.	[Revalor 2009]
Figure 1-4	Aires et énergies misent en jeu lors de la nucléation hétérogène	
Figure 1-5	(a) vision microscopique en terme d'évolution de la structure en fonction de la concentration, la concentration locale augmente jusqu'à atteindre un point critique où l'agencement structural commence, (b) vision macroscopique du processus en pointillé en (a). La flèche noire représente la théorie classique de la nucléation.	[Vekilov 2010]
Figure 1-6	Représentation schématique de la modification du tracé de l'enthalpie libre en fonction des coordonnées de réaction dans le cas de la nucléation en deux étapes (ligne pointillé).	[Cölfen 2008]
Figure 1-7	Représentation schématique des deux théories. La flèche verte représente la théorie classique qui ne privilégie ni l'ordre ni la taille. La flèche bleue est la variante de l'approche en deux étapes qui considère qu'il y a premièrement une augmentation en taille sans structure ordonnée puis, passé une taille critique, le cluster s'ordonne et continue de croître. La flèche rouge est la variante dans laquelle il existe au niveau moléculaire des « clusters » préformés et ordonnés. Ces « clusters » s'agrègent pour aboutir au cristal.	[Velikov 2010]
Figure 1-8	Représentation schématique des principaux types de faciès.	[Bauer 3640] [Haleblan 1969]
Figure 1-9	Différence entre morphologie et faciès. A et B : même faciès mais morphologie différente, B et C : même morphologie (même face) mais différent faciès.	
Figure 1-10	Evolution du nombre moyen de molécules de glycine par « cluster » en fonction de la sursaturation à 25°C.	[Ginde 1992]
Figure 1-11	Représentations schématiques des différences entre polymorphes : les polymorphes A et B diffèrent par l'empilement.	[Braga 2009]
Figure 1-12	(a) : Courbe de solubilité dans le cas d'un système	

	monotropique, (b): Courbe de solubilité dans le cas d'un système énantiotropique.	
Chapitre 2		
Figure 2-1	Représentation schématique de la méthode <i>NPLIN</i>	
Figure 2-2	Représentation schématique des différentes interactions faisceau laser - solution.	
Figure 2-3	Schéma explicitant le principe de l'absorption multiphotons.	[Leyder 2013]
Figure 2-4	Schéma explicitant le principe de la cavitation.	[Iefuji 2011]
Figure 2-5	Schéma explicitant le principe du piégeage optique.	[Sugiyama 2012]
Figure 2-6	Ellipsoïde des paramètres d'ordre pour différentes valeurs de $\Delta\alpha$ et suivant différentes polarisations. Le sens de propagation est suivant l'axe z, dans le premier cas, la polarisation est suivant l'axe x et dans le second est contenue dans le plan (xy). Les ellipsoïdes ont été calculés dans le cas $\frac{1}{2} \frac{\Delta\alpha E^2}{kT} = 5$. Les schémas en gris sont les structures cristallines théoriques obtenues suite à l'interaction soit de type « bâtonnet » (LP-gauche, CP-gauche), soit de type « feuillet » (LP-droite, CP-droite).	[Sun ^A 2006]
Figure 2-7	Triangle des paramètres d'ordre montrant les valeurs que prend le trinombre (K_x, K_y, K_z) suivant la polarisation imposée et la forme du tenseur de polarisabilité. Le point central (centre de gravité du triangle, $(\frac{1}{3}, \frac{1}{3}, \frac{1}{3})$) correspond à une non exposition. Suivant la polarisation et la forme du tenseur, diverses combinaisons d'alignement vont se faire. Pour un tenseur « <i>disklike</i> » et une polarisation circulaire, $(K_x, K_y, K_z) = 1$ d'où $K_y = 1$ soit un alignement complet suivant l'axe y.	[Sun ^A 2006]
Chapitre 3		
Figure 3-1	Molécule de glycine. La figure montre les liaisons hydrogène (GLYCIN88, polymorphe α).	
Figure 3-2	Projection des polymorphes de la glycine selon les axes a, b et c. A gauche: polymorphe α (GLYCIN 88). A droite: polymorphe γ (GLYCIN 66).	
Figure 3-3	Représentation schématique de la nucléation dans une solution sursaturée de glycine. (a): solution composée de monomères (cercle noir) et de dimères (ellipse blanche). (b): Formation de structure « liquid like » de dimères. La viscosité et la concentration sont plus élevées au sein de ces agrégats. (c): Réorganisation structurale de ces « clusters ».	[Chattopadhyay 2005]
Figure 3-4	Courbe des fractions molaires des espèces de la glycine en fonction du pH. La dépendance en pH de la glycine a été étudiée dans une solution aqueuse de 3,33 mol/kg d'eau	[Huang 2008] [Daldrup 2011]

	(solubilité de la α glycine) à 25 °C. $pK_1 = 2,35$ (acide carboxylique); $pK_2 = 9,78$ (amine).	
Figure 3-5	Les différents régimes renvoyant aux structures sondés par les rayons X.	[Dong 2011]
Figure 3-6	Distribution des diamètres hydrodynamiques à 25 °C pour une solution de glycine d'une concentration de 270 mg/mL filtrée avec des filtres PTFE de 100 nm (histogrames gris) et une solution d'eau filtrée dans les mêmes conditions (histogrames noirs).	[Jawor-Baczynska 2012]
Figure 3-7	(a) Diffractogramme du polymorphe α , (b) Diffractogramme du polymorphe γ de la glycine avec indexation des plans diffractants.	[Sankar 2010]
Figure 3-8	Molécule de L - (+) - histidine. La figure montre les liaisons hydrogène (LHISTD04, polymorphe B).	
Figure 3-9	Projection des polymorphes de l'histidine selon les axes a, b et c. A gauche: polymorphe A (LHISTD 10). A droite : polymorphe B (LHISTD 04).	
Figure 3-10	Molécule de L - (+) - acide glutamique. La figure montre les liaisons hydrogène (LGLUAC01, polymorphe B).	
Figure 3-11	Evolution du taux de formation des formes A (α) et B (β) du L - acide glutamique en fonction de la température.	[Srinivasan 2011]
Figure 3-12	Projection des polymorphes de l'acide glutamique selon les axes a, b et c. A gauche: polymorphe A (LGLUAC 03). A droite : polymorphe B (LGLUAC 01).	
Chapitre 4		
Figure 4-1	Premier montage utilisé pour l'étude de <i>NPLIN</i> .	
Figure 4-2	Etude de l'effet lentille dû au tube pyrex. L'ensemble des quantités utilisées pour le calcul est reporté sur le schéma.	
Figure 4-3	Schéma du nouveau montage.	
Figure 4-4	Tubes HPLC étudiés pour le passage du laser.	
Figure 4-5	Schéma optique de l'expérience.	
Figure 4-6	Photographie du nouveau montage complété des emplacements des éléments.	
Figure 4-7	Processus GRAFCET montrant le fonctionnement de la fonction « mesure de l'intensité ». Un intervalle de tolérance est fixé, si l'intensité du laser dépasse cet intervalle une alarme informe l'opérateur. En cas de problème, l'opérateur peut choisir d'ignorer ou d'arrêter, cela met un terme à la manipulation. Ce GRAFCET est le même pour la température. Seules les réceptivités changent.	
Chapitre 5		
Figure 5-1	Représentation schématique du montage de mesure des solubilités. Ce type de montage permet essentiellement de balayer la gamme de température de 5°C à 50°C, gamme essentiellement utilisée pour les études des molécules	

	organiques.	
Figure 5-2	Schéma de principe expliquant la détermination de la limite de zone métastable en régime dynamique où la température est diminuée à vitesse constante. L'expérience débute en état de sous-saturation (1a, 1b : trait vert) puis la température diminue à une vitesse constante pour amener la solution en état de sursaturation (2a, 2b : flèches noires). Le début de la nucléation signifie la limite de la zone métastable. $\beta_{\text{molécule, polymorphe, solvant}}(T1) = Cb$. Avec une concentration inférieure à Cb pour la température T1, la solution est dans la limite de la zone métastable.	
Figure 5-3	Schéma de principe expliquant la détermination de la limite de zone métastable en régime statique. L'expérience débute en état de sursaturation à une température fixée (Tinit) puis on laisse le temps faire son œuvre. La nucléation signifie la limite de la zone métastable, ce qui implique que la limite de zone métastable est valable uniquement pour un temps donné. $\beta_{\text{molécule, polymorphe, solvant}}(t1) = C1$.	
Figure 5-4	Dispositif expérimental utilisé au CINaM pour étudier la limite de zone métastable. Les modules permettent d'étudier de 24 à 96 tubes suivant l'ampleur de la statistique souhaitée ou de la disponibilité du soluté et du solvant (gauche). Les deux modules sont montés sur une plaque mobile horizontalement dans deux directions. L'ensemble est contrôlé en température et un programme LABVIEW gère le déplacement de la table porte échantillon, la vitesse de refroidissement et la caméra.	
Figure 5-5	Représentation schématique de la pesée tube par tube.	
Figure 5-6	Représentation schématique de la préparation par solution mère.	
Figure 5-7	Différentes méthodes utilisées dans le cadre de la dissolution thermique. Les cycles de température ont été décalés en hauteur pour plus de visibilité. Les flèches pointillées bleues représentent la rupture en température lors du pipetage puisque la régulation en température n'est plus assurée à ce moment là. Les durées affichées dépendent de la molécule utilisée. Il s'agit dans ce cas de la molécule de glycine. Ce schéma n'est pas à l'échelle sur l'axe des températures ni sur l'axe du temps, il a une valeur illustrative.	
Figure 5-8	Photographie du papier marquant après irradiation du laser. L'ellipse permet de mesurer précisément la surface du faisceau.	
Figure 5-9	Représentation de la classification expliquée ci dessus. (a) et (b) : classement MC(1), (c) : classement MC(N), (d) : classement P.	
Figure 5-10	Figure résumant les trois situations auxquelles fait face	

	l'expérimentateur lors d'une identification par morphologie : situation favorable soit une nucléation dans le champ de la caméra combinée à une nucléation débutante où les cristaux restent visibles, situation intermédiaire soit une nucléation dans le champ de la caméra mais rapide (ou une observation tardive) qui empêche une observation distinctive des cristaux, situation défavorable soit une nucléation hors champ (diffusion du germe ou nucléation au ménisque) ou la formation d'un monocristal rendant invisible les limites du faciès.	
Figure 5-11	Représentation schématique de ce que l'on voit réellement du tube en fonction des objectifs et du mode d'observation : microscope ou logiciel.	
Figure 5-12	Spectre Raman des poudres utilisées. En rouge, le spectre Raman du polymorphe γ , en bleu, le spectre Raman du polymorphe α . L'insert est un détail dans la zone 60 cm^{-1} - 260 cm^{-1} du spectre Raman des poudres utilisées.	
Figure 5-13	Diffractionogramme des poudres utilisées de glycine. En rouge, le diffractionogramme du polymorphe α , en bleu, le diffractionogramme du polymorphe γ .	
Chapitre 6		
Figure 6-1	(a) : Courbe de solubilité du polymorphe α dans H ₂ O. (b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.	
Figure 6-2	(a) : Courbe de solubilité du polymorphe α dans D ₂ O. (b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.	
Figure 6-3	(a) : Comparaison de nos résultats de solubilité avec ceux de [Yang 2008a]. (b) : Courbe de solubilité des polymorphes α et γ d'après [Yang 2008a].	[Yang 2008a]
Figure 6-4	(a) : Comparaison de nos résultats avec ceux publiés par [Kunihisa 1974]. (b) : Comparaison de nos résultats avec ceux publiés par [Jelinska-Kazmierczuk 1996].	[Kunihisa 1974] [Jelinska-Kazmierczuk 1996]
Figure 6-5	Limite de zone métastable pour les polymorphes utilisés α et γ de la glycine à 36h et 168h dans H ₂ O et D ₂ O.	
Figure 6-6	Comparaison entre la configuration utilisée précédemment dans les tubes pyrex (gauche) et celle que nous avons utilisée avec les tubes HPLC impliquant la traversé de l'interface air / solution (droite).	
Figure 6-7	Chronologie de la cristallisation de la glycine α exposée à 532 nm pendant 60 s à 1,4 GW/cm ² . La solution de glycine avait une sursaturation à 17 °C de 1,45 ce qui correspond à une concentration de 270 mg/mL.	
Figure 6-8	Fraction des échantillons ayant cristallisés en fonction de la puissance. (a) : sursaturation de 1,45 à 17 °C pour une durée d'exposition de 60 secondes. (b) : concentration de 270 mg/mL pour une durée d'exposition de 60 secondes.	

	Les expériences ont été faites avec 5 solutions dans chaque condition.	
Figure 6-9	Représentation du protocole d'étude utilisé pour la polarisation linéaire avec la concentration employée dans H ₂ O.	
Figure 6-10	Représentation du protocole d'étude utilisé pour la polarisation circulaire avec la concentration employée dans H ₂ O.	
Figure 6-11	Représentation du protocole utilisé pour étudier l'influence du temps d'exposition et du vieillissement.	
Figure 6-12	Informations issues des tubes.	
Figure 6-13	Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans H ₂ O à 17 °C pour une polarisation linéaire. Le nombre de tubes est indiqué à côté de chaque point.	
Figure 6-14	(a) : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe γ dans H ₂ O, (b) : Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans H ₂ O. 5 échantillons par point.	
Figure 6-15	Taux de nucléation en fonction de la puissance pour le polymorphe α dans D ₂ O. 5 échantillons par point.	
Figure 6-16	Evolution du nombre de tubes ayant nucléé à 17°C à différents moments après l'exposition au laser suite à exposition à 1200 MW/cm ² . La barre noire montre le point à partir duquel le protocole a été fait.	
Figure 6-17	Taux de nucléation au bout de 24 h à 17 °C et exposés à une énergie de 910 MW/cm ² . 5 échantillons par point. (a) polarisation linéaire (b) polarisation circulaire	
Figure 6-18	Evolution du taux de nucléation en fonction du temps de vieillissement 3 h après l'exposition. 5 échantillons par point.	
Figure 6-19	Photographie de deux tubes ayant des cristaux à la fois au ménisque et au fond du tube. Les deux tubes sont constitués d'une solution de α glycine à une sursaturation de 1,5 à 17 °C soit une concentration de 280 mg/mL.	
Figure 6-20	Photographie de l'ombre portée sur le fond du tube par un gros monocristal de glycine α ayant nucléé au ménisque dans la configuration donnée par l'image de gauche.	
Figure 6-21	Démonstration de l'effet d'agrégation dû au laser au niveau du ménisque. (a) : photographie de croissance de cristaux à partir du ménisque (γ , 145 %, D ₂ O, linéaire). (b) : surface de l'agrégation au niveau du ménisque environ égale à celle du laser. (c) : représentation des directions de croissance des aiguilles à partir du ménisque.	

	(d) : photographie de cristaux ayant crû à partir du ménisque (α , 145 %, H ₂ O, linéaire).	
Figure 6-22	Evolution de l'implication des sites de nucléation spontanée en fonction de la sursaturation pour les deux polymorphes α et γ de la glycine à 17 °C.	
Figure 6-23	Evolution de l'implication des sites de nucléation en fonction de la sursaturation pour les deux polymorphes α et γ de la glycine exposé à une énergie de 840 GW/cm ² à 17°C.	
Figure 6-24	Etape de fabrication des tubes montrant la possibilité que des éléments du soluté s'accrochent au ménisque lors de la montée du solvant dans le tube HPLC.	
Figure 6-25	Schéma expliquant la nucléation au ménisque dans le cas de la glycine.	
Figure 6-26	Démonstration de la chute d'un cristal à proximité du point ayant été touché par la plus grande intensité du laser. La solution de α glycine est à une sursaturation de 1,5 à 17 °C soit une concentration de 280 mg/mL et l'énergie est de 1,2 GW/cm ² .	
Figure 6-27	Photographie montrant l'effet de chevauchement de cristaux aboutissant à des multicristaux.	
Figure 6-28	Evolution de l'implication des sites de nucléation induite par laser en fonction de l'énergie pour le polymorphe α dans H ₂ O à 17 °C. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.	
Figure 6-29	Evolution de l'implication des sites de nucléation induite par laser en fonction de l'énergie pour le polymorphe γ dans H ₂ O à 17 °C. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.	
Figure 6-30	Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine α dans H ₂ O. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) : pour une polarisation circulaire. (gauche) : pour une polarisation linéaire.	
Figure 6-31	Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine γ dans H ₂ O. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) : pour une polarisation circulaire. (gauche) : pour une polarisation linéaire.	
Figure 6-32	Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine γ dans H ₂ O. 5 tubes par concentration. (droite) : pour une polarisation circulaire. (gauche) : pour une polarisation linéaire	
Figure 6-33	Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction de l'énergie pour une poudre d'origine	

	<p>α dans D₂O. 5 tubes par concentration. (droite) : pour une polarisation circulaire. (gauche) : pour une polarisation linéaire.</p>	
Figure 6-34	<p>Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction du nombre d'impulsions. 5 tubes par nombre d'impulsion. (droite) : pour une origine γ. (gauche) : pour une origine α.</p>	
Figure 6-35	<p>Image MEB d'un constituant de la poudre du polymorphe commerciale α (gauche) et de la poudre commerciale du polymorphe γ (droite). Le trait jaune représente 200 μm.</p>	
Figure 6-36	<p>Polymorphe α de la glycine obtenu à 17 °C en nucléation spontanée à partir de la poudre du polymorphe γ.</p>	
Figure 6-37	<p>Représentation sous forme d'histogramme de la fréquence de nucléation des polymorphes pour un produit initial d'origine α à 17 °C en fonction de l'énergie. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.</p>	
Figure 6-38	<p>Représentation sous forme d'histogramme de la fréquence de nucléation des polymorphes pour un produit initial d'origine γ à 17 °C en fonction de l'énergie. 5 tubes par densité d'énergie. (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.</p>	
Figure 6-39	<p>Représentation sous forme d'histogramme du nombre de tubes contenant un ou plusieurs polymorphes pour un produit initial d'origine α à 17 °C et exposé à une énergie de 910 MW/cm². (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.</p>	
Figure 6-40	<p>Représentation sous forme d'histogramme du nombre de tube contenant un ou plusieurs polymorphes pour un produit initial d'origine γ à 17 °C et exposé à une énergie de 910 MW/cm². (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire.</p>	
Figure 6-41	<p>Représentation sous forme d'histogramme du nombre de tube contenant un ou plusieurs polymorphes pour une poudre d'origine α à 17°C et exposé à une énergie de 910 MW/cm². (droite) polarisation circulaire. (gauche) polarisation linéaire</p>	
Figure 6-42	<p>Evolution du taux de nucléation en fonction du temps post exposition.</p>	
Figure 6-43	<p>Fréquence de formation des différents types de formes de cristaux en fonction du nombre d'impulsion. 5 tubes par</p>	

	nombre d'impulsion. Agrégation des résultats présentés figure 6-34.	
Chapitre 7		
Figure 7-1	(a) : Courbe de solubilité du polymorphe B de la L - (+) - Histidine dans H ₂ O en fonction de la température. (b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.	
Figure 7-2	(a) : Courbe de solubilité du polymorphe B de la L - (+) - Histidine dans D ₂ O en fonction de la température. (b) : Vérification de la loi de Van't Hoff.	
Figure 7-3	(a) Comparaison entre la courbe de solubilité de la L - (+) - Histidine mesurée au ClNaM dans H ₂ O et celle mesurée par Kitamura [Kitamura ^A 1993] pour le polymorphe B. (b) Comparaison entre les courbes de solubilité de la L - (+) - Histidine dans D ₂ O et dans H ₂ O.	[Kitamura^A 1993]
Figure 7-4	Limite de zone métastable de la L - (+) - Histidine mesurée à 25 °C dans H ₂ O de deux manières différentes : par la méthode statique et la méthode dynamique.	
Figure 7-5	Limite de zone métastable de la L - (+) - Histidine mesurée à 24,8 °C dans D ₂ O par la méthode statique.	
Figure 7-6	Représentation du protocole d'étude utilisé pour les polarisations linéaire et circulaire dans H ₂ O.	
Figure 7-7	Représentation du protocole d'étude utilisé pour les polarisations linéaire et circulaire dans D ₂ O.	
Figure 7-8	Taux de nucléation 24 h après l'exposition pour une densité d'énergie de 910 MW/cm ² avec polarisation linéaire et circulaire. 5 tubes pour chaque condition.	
Figure 7-9	(a) : Taux de nucléation à différents moments pour une énergie de 910 MW/cm ² et une polarisation linéaire. (b) : Taux de nucléation pour les deux polarisations à 910 MW/cm ² à 24 h.	
Figure 7-10	Evolution de l'efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie (910 MW/cm ² et 680 MW/cm ²) dans H ₂ O.	
Figure 7-11	Fréquence de nucléation des polymorphes A et B pour la sursaturation 1,4 (60,13 mg/mL) à 150 mJ (680 MW/cm ²) et 200 mJ (910 MW/cm ²).	
Figure 7-12	Fréquence de nucléation des polymorphes A et B pour la sursaturation 1,4 (51,45 mg/mL) à 200 mJ (910 MW/cm ²) pour la polarisation linéaire et circulaire dans D ₂ O.	
Figure 7-13	Photographie d'un tube montrant l'existence d'un cristal ayant nucléé au ménisque, sur la paroi et un second au fond du tube. Le surlignage noir est le cristal sur la paroi, le surlignage rouge est le cristal ayant nucléé au ménisque, le surlignage bleu est le cristal au fond du tube.	
Figure 7-14	Relevé du site de nucléation en nucléation spontanée pour la L - (+) - Histidine dans D ₂ O.	
Figure 7-15	Limite de Zone Métastable du L-(+)- acide glutamique à 30°C et 40 °C.	

Figure 7-16	(a) Premier protocole d'étude de l'acide glutamique, (b) Second protocole d'étude.	
Figure 7-17	Taux de nucléation à 24 h en fonction de la sursaturation obtenu avec la première méthode pour une exposition pendant 60 secondes à une densité d'énergie de 910 MW/cm ² . La sursaturation est calculée sur la base de la concentration initiale à 40 °C (14,51 mg/mL). 10 tubes pour chaque condition expérimentale.	
Figure 7-18	Taux de nucléation à 24 h à 30 °C pour une exposition à une densité d'énergie de 910 MW/cm ² en fonction de la concentration obtenu avec la seconde méthode.	
Figure 7-19	Photographie de cristaux du polymorphe B du L – (+) – acide glutamique obtenus à 30 °C.	
Figure 7-20	Comparaison des taux de formation des polymorphes A et B pour une polarisation linéaire appliquée au L – (+) – acide glutamique : rouge : polymorphe A, bleu : polymorphe B, nucléation spontanée [Srinivasan ^A 2011], jaune : polymorphe A, vert : polymorphe B (NPLIN).	[Srinivasan ^A 2011]

Table des tableaux

Tableau	Descriptif	Source
Chapitre 1		
Tableau 1-1	Evolution de la limite de zone métastable en fonction de la vitesse de refroidissement. La température de référence est 35°C et la saturation est de 30 g/L.	[Bonin-Paris 2011]
Tableau 1-2	Estimation de la taille des clusters à partir des données de concentration	[Ginde 1992] [Larson 1986] [Lo 1989]
Tableau 1-3	Résumé de quatre situations possibles et des stratégies à adopter pour le contrôle des variétés polymorphiques.	[Veesler 2003]
Chapitre 2		
Tableau 2-1	a : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser continu focalisé. b : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser picoseconde. c : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser nanoseconde. d : Résumé des diverses configurations expérimentales pour les molécules étudiées par un laser femtoseconde.	
Tableau 2-2	Paramètres ayant une influence sur le résultat de la nucléation obtenus suite à une exposition au laser.	
Tableau 2-3	Résumé du volume de publication par type de laser et la part des études impliquant une focalisation.	
Tableau 2-4	Résumé des cibles de la méthode <i>NPLIN</i> utilisant un laser nanoseconde pulsé.	
Tableau 2-5	Tableau recensant l'ensemble des montages types employés dans les différentes publications des travaux <i>NPLIN</i> . [1] : type de laser, P = pulsé, CW = continu, ns = nanoseconde, ps = picoseconde, fs = femtoseconde; foc = focalisation, nfoc = non focalisé. [2] : voir figure 2-2, m = multipuits, c = contrôle de température; [3] : SHG = Second Harmonic Generation; [4] : PXRD = Powder X-ray Diffraction, SCXRD = Single Crystal X-ray Diffraction, FTIR = Fast Transform Infrared Spectroscopy.	Multiples : voir tableau
Chapitre 3		
Tableau 3-1	Tableau résumant les données cristallographiques à température et pression ambiantes.	Se référer à la CSD
Tableau 3-2	Résumé des différents faciès associés à un polymorphe obtenus dans différentes conditions. Les échelles n'étaient pas toutes fournies dans les publications.	Multiples : voir tableau
Tableau 3-3	Mode de vibration Raman des formes α et γ de la glycine.	[Shi 2005]
Tableau 3-4	Tableau résumant les données cristallographiques des deux polymorphes du L-(+)-Histidine	Se référer à la CSD
Tableau 3-5	Tableau résumant les données cristallographiques des deux	Se référer à la

	polymorphes du L-(+)-acide glutamique.	CSD
Tableau 3-6	Résumé des différentes morphologies associées à un polymorphe obtenus dans différentes conditions.	[Srinivasan 2011] [Kitamura ^A 1989]
Chapitre 4		
Tableau 4-1	Tableau résumant le travail de la définition des besoins et des solutions techniques associées.	
Tableau 4-2	Liste des éléments à contrôler par LABVIEW	
Tableau 4-3	Origine des données à traiter par LABVIEW	
Tableau 4-4	Séquence retenue lors du développement du cahier des charges.	
Chapitre 5		
Tableau 5-1	Surfaces visibles grâce au microscope et par le logiciel LABVIEW pour l'ensemble des objectifs disponibles. Ces surfaces ont été traduites en pourcentage de la surface initiale du tube qui fait environ 78,5 mm ² .	
Chapitre 6		
Tableau 6-1	Résumé des polymorphes obtenus avant et après ensemencement.	
Tableau 6-2	Evolution de la fraction des échantillons ayant cristallisés en fonction de la durée d'exposition traduite en nombre d'impulsions. 4 échantillons pour chaque condition.	
Tableau 6-3	Concentrations utilisées pour le relevé du site de nucléation.	
Tableau 6-4	Recensement des différents faciès et de leurs conditions d'obtention obtenus par nucléation induite par laser. Les faciès sont rapportés à ceux recensés dans le tableau 3-2, chapitre 3.	
Tableau 6-5	Evolution du taux de formation des polymorphes α et γ en fonction de l'origine du polymorphe et en fonction de la durée d'exposition traduite en nombre d'impulsions. 600 impulsions correspondent à une durée d'exposition de 60 secondes. 5 tubes par nombre d'impulsion.	
Tableau 6-6	<i>Taux de nucléation des trois formes de la glycine pour trois différentes concentrations à 23 °C en fonction du pH dans H₂O.</i>	[Lee 2008b]
Tableau 6-7	Comparaison des résultats concernant la fenêtre de basculement entre ceux obtenus par Garetz et al. [Sun ^A 2006] et ceux présents dans ce travail de thèse.	[Sun ^A 2006]
Chapitre 7		
Tableau 7-1	Détail des sursaturations et des concentrations associées.	
Tableau 7-2	Détail des sursaturations et des concentrations associées.	
Tableau 7-3	Tableau comparatif des résultats obtenus dans cette thèse avec ceux de Garetz dans les solutions de H ₂ O [Sun ^A 2008].	[Sun ^A 2008]
Tableau 7-4	Tableau d'équivalence entre la sursaturation et la concentration.	

Annexes

Annexe A : Etat de l'art des résultats obtenus en nucléation induite par laser

Annexe A1 : Résumé des résultats expérimentaux obtenus pour chaque molécule d'après la littérature.

La nucléation induite par laser (*NPLIN*) est un domaine jeune et en pleine croissance. De nombreuses publications sont apparues au cours de la thèse représentant 44 % du volume total d'articles publiés (l'annexe A3 condense les statistiques des publications publiées avant le 1^{er} juillet 2014). Il était donc important de bien maîtriser la connaissance de ce qui a été publié sur la méthode. Par conséquent, cette annexe condense un résumé des résultats obtenus pour chaque molécule. Les données expérimentales sont reproduites *in extenso* à partir de la littérature.

A1-1) Glycine

A1-1-1) Nucléation photophysique

A1-1-1-1) Sous laser continu

L'équipe de Masuhara a montré qu'il est possible de cristalliser la glycine par un laser continu à 1064 nm (0,4 GW/cm² au point focal) en focalisant le faisceau sur l'interface air/solution en utilisant comme solvant de D₂O ([**Sugiyama 2007**], [**Sugiyama 2009**]). Les solutions étaient faites à partir de 0,30 g de glycine dissous dans 1 g de D₂O à 23°C.

Les travaux précédents ont été poursuivis avec les mêmes conditions expérimentales ([**Ruugsimanon 2010a**], [**Ruugsimanon 2010b**], [**Yuyama 2012b**]). Les solutions ont été préparées pour 23°C à trois sursaturations différentes 138 % (0,30 g pour 1 g de D₂O), 100 % (0,22 g pour 1 g de D₂O), 68 % (0,15 g pour 1 g de D₂O).

Le faisceau est focalisé à l'interface air/solution ce qui permet d'accroître l'efficacité car les « *clusters* » sont limités par l'interface et peuvent avoir une taille plus importante et les molécules sont orientées à l'interface par le laser. Il est important de noter que lorsque le laser est à l'arrêt, le cristal se dissout. Le mécanisme de nucléation proposé est celui du piège optique.

Les travaux de Yuyama [**Yuyama 2012b**] ont montré la possibilité de cristalliser les polymorphes α et γ sans pour autant induire un basculement des polymorphes *via* l'usage de la polarisation linéaire ou circulaire. Le mécanisme proposé diffère de celui de Garetz. En

effet, la formation du polymorphe α est cinétiquement favorisée et est produit grâce à la préexistence de « cluster » du polymorphe α . A saturation et en sursaturation, la polarisation linéaire va opérer un piégeage inefficace des clusters amenant à la formation d'un cristal du polymorphe α ; la polarisation circulaire va opérer un piégeage efficace et donc une augmentation locale de la sursaturation ouvrant la voie à la cristallisation du polymorphe γ . Toutefois, l'augmentation de la température réduit la sursaturation permettant la formation du polymorphe α . Ce dernier point est mis en avant par le décalage vers les basses puissances du taux de nucléation du polymorphe γ (figure A1-1).

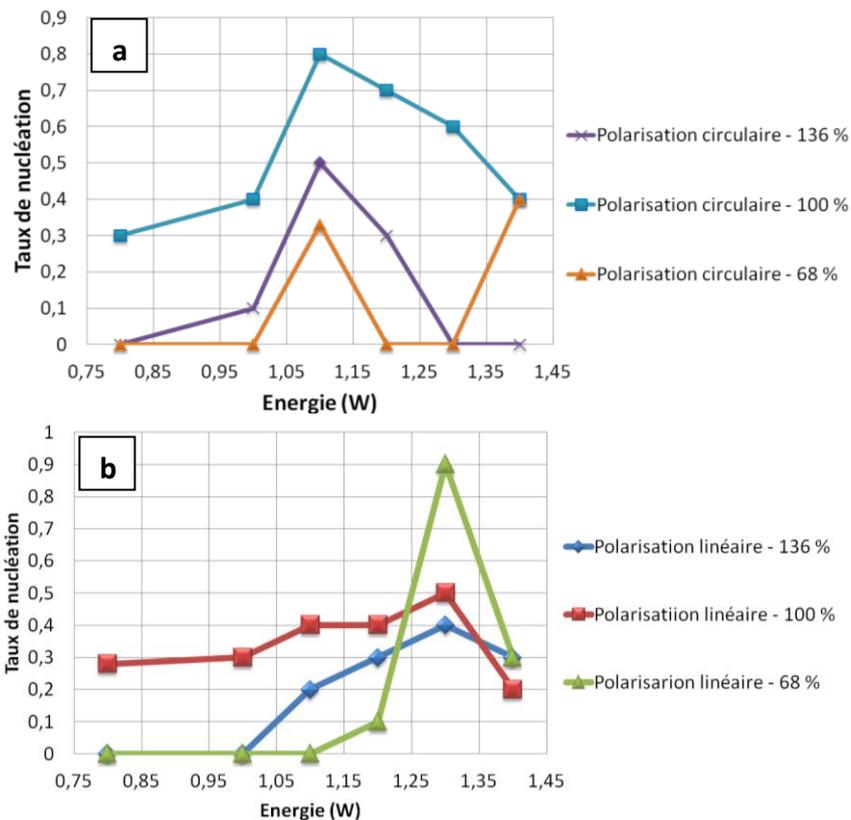


Figure A1-1 : Probabilité à 23°C de formation du polymorphe γ à différente sursaturation suivant la polarisation incidente : linéaire ou circulaire.

(a) : Taux de nucléation du polymorphe γ en fonction de l'énergie pour la polarisation circulaire.

(b) : Taux de nucléation du polymorphe γ en fonction de l'énergie pour la polarisation linéaire. Figures adaptées de [Yuyama 2012b].

Dans le cas de la faible sursaturation selon le mécanisme proposé, la polarisation linéaire facilite la nucléation de structure « rod like » amenant à la formation de cristaux du polymorphe γ , la polarisation circulaire amène à la formation du polymorphe α . Toutefois, l'augmentation de la température réduit la sursaturation permettant la formation du polymorphe α et l'augmentation locale de la sursaturation aboutis à la formation du polymorphe γ [Sugiyama 2012]. Ces mécanismes sont résumés dans la figure A1-2.

D'autres travaux [Yuyama 2012a] et [Yuyama 2010a] réalisés par la même équipe ont montré un comportement similaire et ont servi de base de travail aux résultats décrits dans les paragraphes précédents [Yuyama 2012b]. Le laser employé est un laser continu à 1064

nm focalisé sur une solution sursaturée de glycine dans du D₂O à 3,7 M (sursaturation de 136 %). Ils montrent la possibilité de former une gouttelette (d'une sursaturation de 7,0 M) par l'application du laser focalisé.

La cristallisation de la glycine dans H₂O a amené un résultat intéressant qui est la preuve de la nucléation du polymorphe β (tableau A1-1). Ce polymorphe est normalement instable et sa formation n'a jamais été rapportée dans D₂O. Après 30 minutes, il s'est naturellement transformé dans le polymorphe α [Masuhara 2011].

Puissance du laser (W)	Fréquence d'obtention du polymorphe α (%)	Fréquence d'obtention du polymorphe β (%)	Fréquence d'obtention du polymorphe γ (%)
0,8	85	0	15
1	85	0	15
1,1	89	11	0
1,2	90	10	0
1,4	100	0	0

Tableau A1-1 : Taux d'obtention des formes polymorphiques de la glycine en fonction de la puissance du laser dans H₂O. Tableau reproduit de [Masuhara 2011].

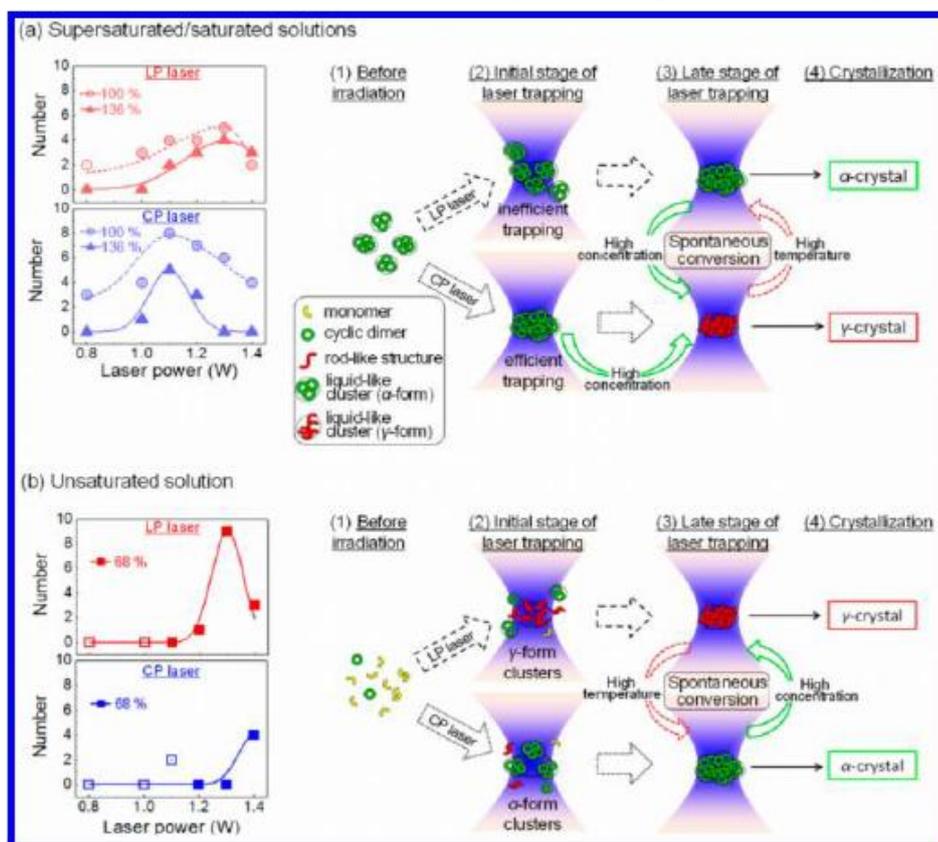


Figure A1-2 : Mécanisme de formation des polymorphes α et γ de la glycine suivant le régime de la solution (saturée et sursaturée ou sous saturée). La probabilité de formation du polymorphe γ est présentée à gauche de la figure. Figure reprise de [Sugiyama 2012].

A1-1-1-2) Sous laser nanoseconde

La glycine est la seule molécule à avoir montré une dépendance à la polarisation de sa cristallisation sous une irradiation par un laser nanoseconde [Garetz 2002]. La première étude sur la glycine [Zaccaro 2001] a montré la possibilité de cristalliser le polymorphe γ de la glycine par une irradiation laser ce qui est un résultat surprenant car le polymorphe α est cinétiquement le plus favorisé et le polymorphe γ est thermodynamiquement le plus stable.

La solution de glycine sursaturée à 21°C dans H₂O (les concentrations sont dans l'intervalle 3,7 M à 3,9 M pour une valeur de saturation de 2,69 M) a été exposée à un laser « *Q – switched* » (l'absence d'amplificateur induit l'absence de nucléation) à 1064nm pour une durée d'impulsion de 9 ns et une densité d'énergie de 0,7 ($\pm 10\%$) GW/cm². Les mêmes conditions amènent à la démonstration d'une fenêtre de basculement polymorphique. En effet, pour une polarisation circulaire, 100 % des cristaux sont du polymorphe α et pour une polarisation linéaire, 47 % des cristaux sont du polymorphe γ [Garetz 2002].

L'étude la plus complète sur la glycine a été faite par B. Garetz et X. Sun [Sun^A 2006]. Les solutions ont été exposées dans les mêmes conditions que précédemment à différentes températures de 287 K à 300 K, les sursaturations allant de 119 % à 200 % et irradiées à 1064 nm et 532 nm. La densité d'énergie est de 0,46 GW/cm² et 0,24 GW/cm² à 1064 nm et 0,24 GW/cm² à 532 nm. Les résultats concernant la glycine sont montrés dans la figure A1-3. La zone de basculement est plus large à 1064 nm qu'à 532 nm et se résume à un point. La dépendance à l'ellipticité du faisceau a été aussi étudiée en fonction de la sursaturation. Ce résultat montre que l'ellipticité a une influence sur l'obtention du polymorphe. Il est à noter que le basculement polymorphique a été observé à 532 nm pour une seule température.

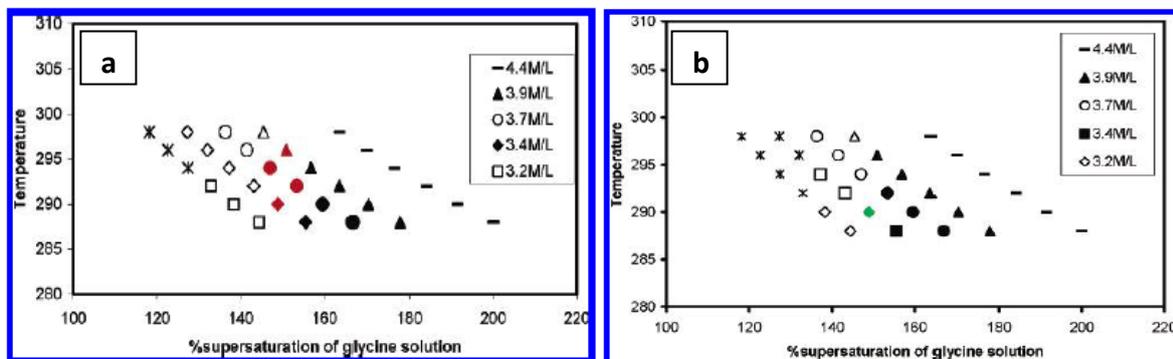


Figure A1-3 : Dépendance du polymorphe obtenu en fonction de la température et de la sursaturation. Les symboles ouverts définissent la zone où les deux polarisations forment le polymorphe α , les symboles fermés définissent la zone où les deux polarisations forment le polymorphe γ . Les symboles de couleur montrent l'existence d'un basculement polymorphique : la polarisation linéaire entraîne la formation du polymorphe γ , la polarisation circulaire entraîne la formation du polymorphe α . Les astérisques correspondent à la zone où aucun effet de NPLIN n'a été observé. Figures reprises de [Sun^A 2006].

(a) : Solutions irradiées à 1064 nm à une énergie de 0,46 GW/cm².

(b) : Solutions irradiées à 532 nm à une énergie de 0,24 GW/cm².

A1-1-1-3) Sous laser femtoseconde

Les récents travaux de Liu *et al* [Liu^B 2013] ont apporté un éclairage intéressant sur la cristallisation de la glycine. Les études ont été menées à 22°C avec des concentrations allant de 3 M à 4 M correspondant à un degré de sursaturation de 100 % à 133 % dans H₂O. La solution de glycine d'un volume de 0,5 mL a été exposée à un faisceau focalisé provenant d'un laser femtoseconde d'une longueur d'onde de 800 nm et d'une largeur d'impulsion de 160 fs. Pour une sursaturation de 130 % (4 M) la probabilité de cristallisation augmente à mesure de l'accroissement de l'énergie injectée dans la solution (figure A1-4). Il a été démontré l'existence d'un seuil en énergie.

L'originalité de cette étude par rapport aux autres est une analyse poussée du type de cristaux obtenus rapportée aux conditions du laser ainsi que de la localisation du site de nucléation. La figure A1-5 montre la probabilité de cristallisation en fonction de la position du point focal (en mm) par rapport au ménisque. Ce résultat montre que le ménisque est un site de nucléation hétérogène facilitant l'accroche des germes de glycine. La nucléation homogène est moins efficace. De plus, l'étude du site de nucléation en fonction du taux de répétition (figure A1-6) montre qu'il est maximum pour l'interface air / solution et croît en fonction de ce taux de répétition pour l'interface verre / solution avec un seuil à 10 Hz. Le site de nucléation dépend aussi de la sursaturation (figure A1-7).

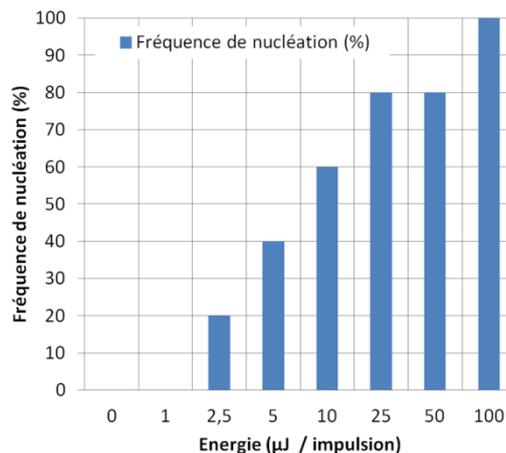


Figure A1-4 : Taux de nucléation de la glycine sursaturée à 130 % à 22°C. Figure adaptée de [Liu^B 2013].

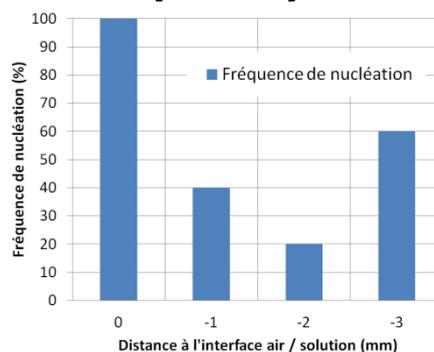


Figure A1-5 : Taux de nucléation de la glycine sursaturée à 130 % à 22°C en fonction de la distance au ménisque (mm). Le point -3 mm correspond au fond du tube HPLC. Figure adaptée de [Liu^B 2013].

Le taux de répétition de l'irradiation a une influence intéressante déjà mise en avant par [Adachi 2003]. En effet, pour un faible taux de répétition on a principalement la cristallisation de monocristaux jusqu'à la fréquence de 250 Hz (figure A1-8). Sur l'ensemble de la gamme explorée, on observe l'augmentation de la fréquence de création de plusieurs cristaux de petites tailles, ce taux commence à diminuer au delà de 500 Hz. De 50 Hz à 1000 Hz est observée l'augmentation de la morphologie poudre (figure A1-9). C'est un résultat attendu car la répétition entraîne une ablation des cristaux en formation qui vont devenir des germes offrant des sites de nucléation secondaire. Dans cette étude, uniquement le polymorphe α de la glycine a été obtenu. Le mécanisme est celui lié à l'usage des lasers femtoseconde : la formation de bulles par cavitation.

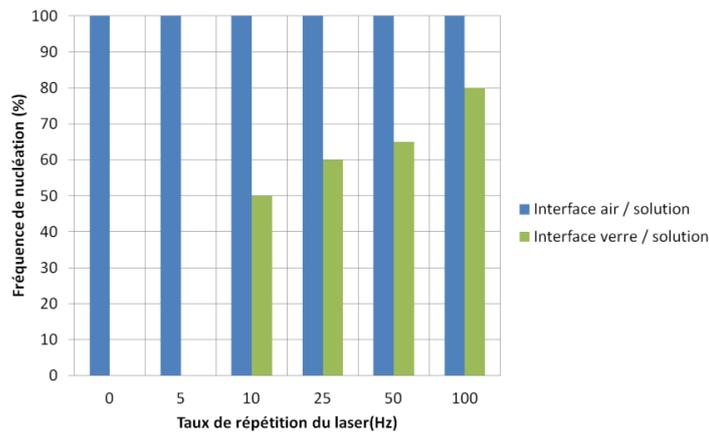


Figure A1-6 : Taux de nucléation de la glycine sursaturée à 1,3 à 22°C en fonction de la distance au ménisque (0 mm). Le point -3 mm correspond au fond du tube HPLC. Figure adaptée de [Liu^B 2013].

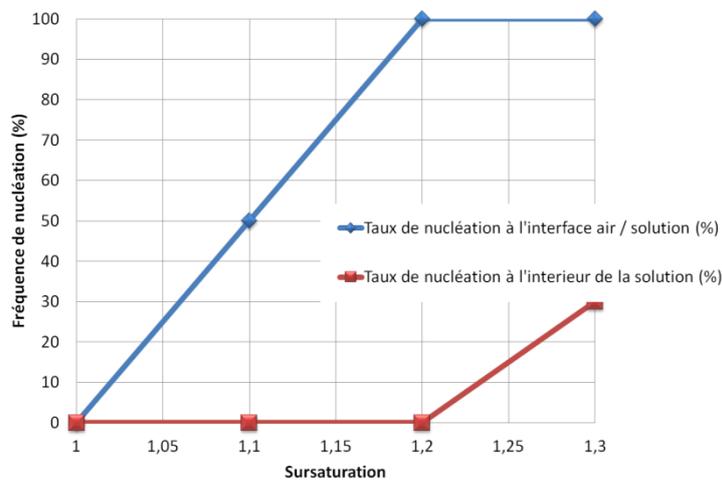


Figure A1-7 : Taux de nucléation de la glycine sursaturée à 22°C dans la solution ou à l'interface air / solution en fonction de la sursaturation. L'énergie par impulsion employée est de 50 μ J, le temps d'irradiation est de 10 minutes. Figure adaptée de [Liu^B 2013].

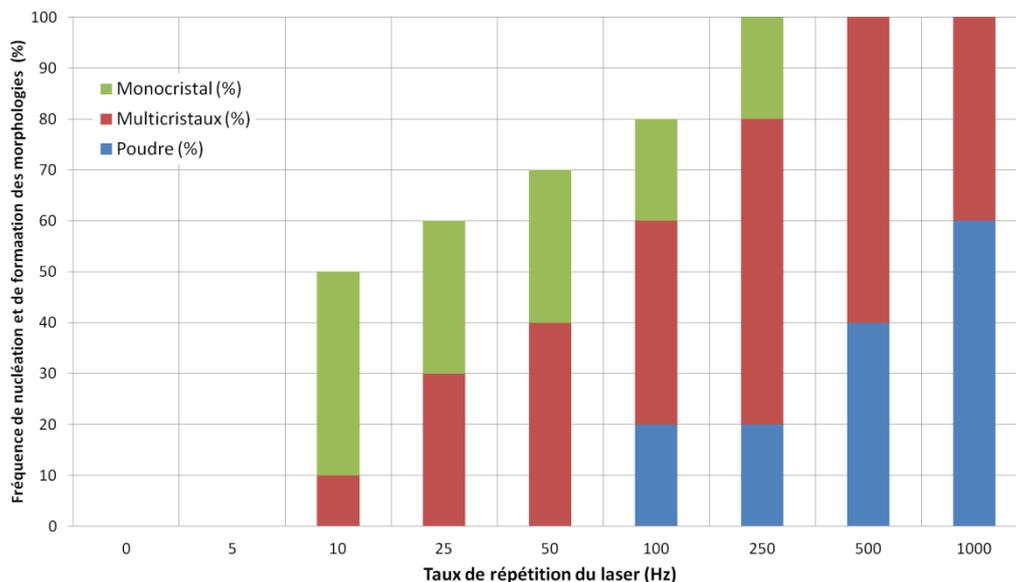


Figure A1-8 : Taux de nucléation de la glycine sursaturée à 22°C à 1,3 par cristallinité de cristaux obtenus : poudre, multi cristaux ou monocristaux (voir figure 2-11) en fonction du taux de répétition. L'énergie par impulsion employée est de 100 μ J, le temps d'irradiation est de 10 minutes. Figure adaptée de [Liu^B 2013].

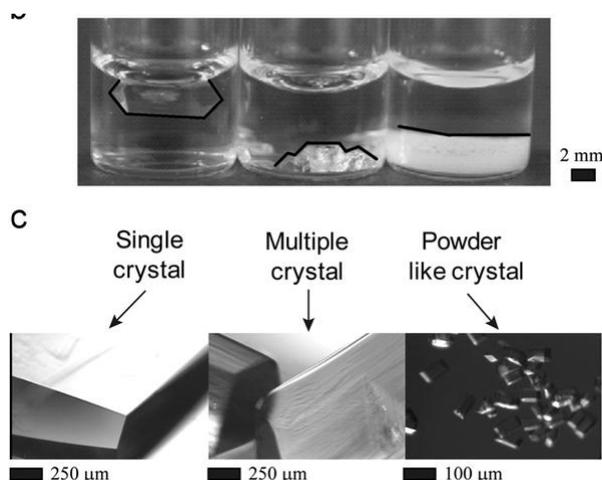


Figure A1-9 : Morphologie des cristaux obtenus : monocristaux, multicristaux ou type poudre. Figure reprise de [Liu^B 2013].

Une étude a été menée par [Miura 2013] comparant la nucléation induite par un laser femtoseconde et un laser continu dans une solution de D₂O de glycine d'une sursaturation entre 0,9 et 1,0. La figure A1-10 montre la comparaison de l'efficacité et du temps d'induction de la nucléation pour les deux types de laser. Avec le laser femtoseconde, le premier cristal apparaît au bout de 600 s contre 1200 s pour le laser continu. Toutefois, seul un cristal est formé avec le second laser alors qu'avec le laser femtoseconde, un polycristal se forme. Cela est attribué à une dégradation de la surface suite à la répétition des impulsions femtoseconde pouvant engendrer une nucléation secondaire. La probabilité d'obtention de cristal en sous-saturation est bien plus élevée avec un laser femtoseconde.

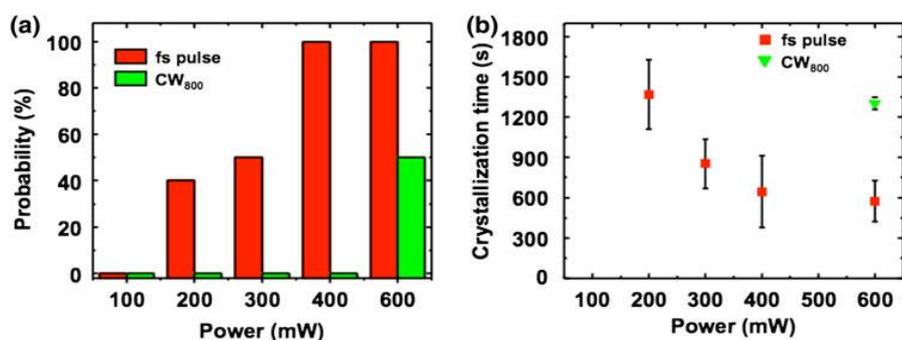


Figure A1-10 : (a) : probabilité de cristallisation en fonction de la puissance. (b) : temps d'induction de la cristallisation. La sursaturation est de 0,9. Figure reprise de [Miura 2013].

A1-2) Urée

A1-2-1) Nucléation photophysique

De façon comparable à la méthode adoptée par Yuyama *et al.* [Yuyama 2010a], l'urée a été cristallisée *via* la formation d'une goutte [Yuyama 2010b].

A1-2-1-1) Sous laser nanoseconde

C'est la molécule qui a permis à Garetz [Garetz 1996] de découvrir l'effet photophysique de *NPLIN* par cristallisation de l'urée à 1024 nm par un laser nanoseconde polarisé linéairement. L'expérience a été conduite à 25°C (solubilité de 10,47 M) avec des sursaturations allant de 1,10 à 1,29 dans H₂O. La nucléation est observée après un seuil en énergie et au dessus de la valeur de 0,5 GW/cm², le nombre de solutions nucléées atteint un plateau [Garetz 2002]. Suite aux observations de la cristallisation, il a été vérifié l'absence d'absorption : l'urée n'a pas de bande d'absorption électronique au-dessus de 200 nm, pas de bande vibrationnelle en-dessous de 1400 nm et les processus multiphoton à 1064 nm sont insignifiants (*sic*).

Une seconde étude de l'urée a été faite à deux longueurs d'ondes (532 et 1024 nm) et pour deux polarisations (LP et CP). La sursaturation retenue pour les expériences est de 11,9 M à 21°C soit la dissolution de 3,150 g d'urée dans 2 g de H₂O (la saturation est à 9,7 M soit 1,05 g / mL) [Matic 2005b]. L'existence d'un seuil en intensité du laser est clairement montrée ainsi qu'une dépendance non linéaire en intensité. Ce seuil n'est pas le même pour toutes les configurations. En effet, le seuil de nucléation à 532 nm est plus élevée qu'à 1064 nm et la nucléation est plus efficace à 532 nm alors qu'on s'attend à aucune différence notable si ce n'est des taux de nucléation plus faibles avec une densité d'énergie plus faible. L'absorption thermique de H₂O à 1024 nm est supérieure à celle à 532 nm, cela implique d'éviter l'usage de la longueur d'onde de 1024 nm pour les expériences futures de *NPLIN*.

La plus grande efficacité de la polarisation linéaire s'explique par l'effet Kerr qui aligne les molécules de type « *rodlike* » : l'urée forme des « *n-mers* » avec les liaisons C=O parallèle augmentant la polarisabilité dans la direction de l'empilement. Lorsqu'un champ linéaire est appliqué, celui-ci va faciliter la nucléation en faisant coïncider le champ du laser avec la polarisabilité des « *n-mers* ». Cela est moins le cas avec une polarisation circulaire qui ne

contraint pas l'axe C=O et laisse les groupes de molécule avec un angle azimutal aléatoire [Sun^A 2008].

A1-2-1-2) Sous laser femtoseconde

La cristallisation de l'urée a été étudiée par des lasers femtoseconde par l'équipe de Masuhara [Yoshikawa 2006a] Cette méthode utilise un laser femtoseconde à 800 nm focalisé qui permet d'obtenir dans un court laps de temps des cristaux d'urée (figure A1-11). La longueur d'impulsion est 120 fs avec un train de répétition de 1 kHz. Les solutions sursaturées (de 10,5 M à 12 M) ont été exposées à 20°C à des énergies allant de 10 μJ /impulsion à 340 μJ /impulsion. La courbe d'efficacité est visible figure A1-11. Il est signalé une importante nucléation spontanée pour la sursaturation de 12,5 M.

Toutefois, le mécanisme est différent de celui postulé pour *NPLIN* puisque un agrégat préformé subit une ablation explosive en passant dans la zone de focalisation du laser [Yoshikawa 2014]. Cette méthode est importante pour offrir des possibilités exploratoires dans le mécanisme de nucléation et dans les états de prénucléation. Des travaux identiques ont été conduits sur le F lysozyme et la thaumatine [Yoshikawa 2009].

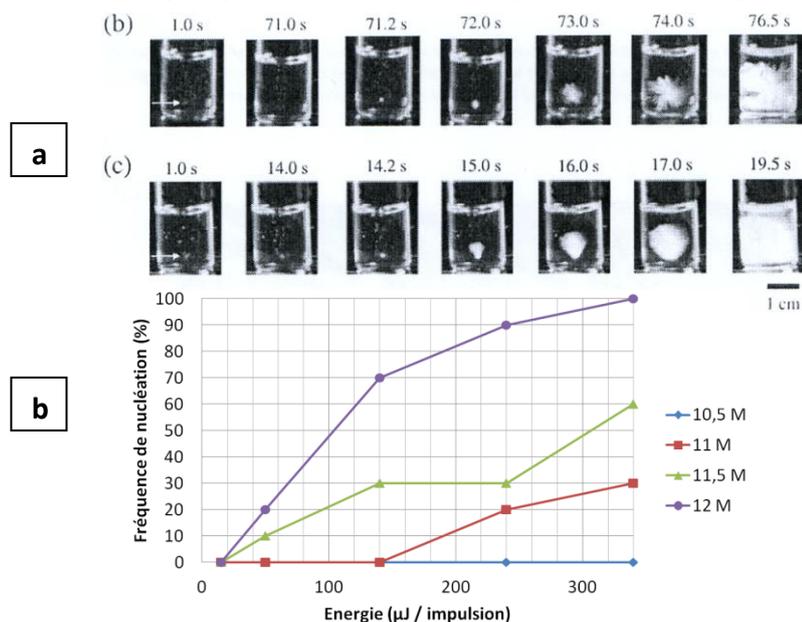


Figure A1-11 : (a) : Photos séquentielles de la nucléation induite par un laser femtoseconde à 800 nm avec une fréquence de 1 kHz. La concentration est de 12 M et le point focal est indiqué par la flèche blanche. L'énergie déposée est de 50 μJ /impulsion (b) et de 340 μJ /impulsion (c). (b) : Taux de nucléation des solutions d'urée en fonction de l'énergie injectée pour différentes sursaturations. L'abscisse est en μJ /impulsion. Figures reprise ou adaptée de [Yoshikawa 2006a].

A1-3) Acide acétique

En plus des sels KCl et NaClO₃ (voir plus bas), l'équipe dirigée par Alexander a étudié l'acide acétique CH₃COOH (température de fusion à 16,6°C) [Ward 2012a]. La cristallisation de cette molécule diffère des autres cas puisqu'elle a été obtenue à basse température : - 9°C et sans solvant. Ceci s'explique par le fait qu'à 3°C, il n'est pas possible d'induire la cristallisation par laser ou par choc mécanique. De plus, une petite fluctuation de - 1°C à une température de -

9 °C induit une cristallisation spontanée. Comme pour la glycine et l'urée, un seuil en puissance est observé à $9,0 \pm 4,2 \text{ MW/cm}^2$ ainsi qu'une saturation du nombre d'échantillons ayant nucléés au-delà de 200 MW/cm^2 à 75 %. La dépendance en puissance est linéaire jusqu'à atteindre le seuil au environ de 100 MW/cm^2 avec une pente de $7,5 \pm 1,5 * 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{MW}$.

La longueur d'onde de 1064 nm (coefficient d'absorption de $0,0370 \text{ cm}^{-1}$) est utilisée avec des impulsions de 7 ns pour un temps d'exposition de 10 s et un diamètre de 2,5 mm. En dessous de 40 MW/cm^2 , les tubes nécessitent bien plus d'impulsion que les autres afin d'induire la nucléation. Le temps moyen d'exposition pour obtenir la nucléation est de 3 s (figure A1-12). Une limite expérimentale a été imposée : les tubes ayant nucléés au delà de 10 s n'ont pas été considérés. L'échauffement du laser est négligeable sauf aux hautes puissances pour des longs temps d'exposition où l'échauffement peut avoir une conséquence. Ceci peut être l'explication d'un seuil à 75 % ($\pm 24 \%$). En effet, l'augmentation de température locale réduit la sursaturation et rend la solution plus rétive à la nucléation.

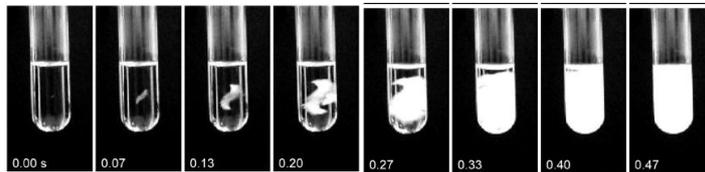


Figure A1-12 : Séquence d'image illustrant une nucléation NPLIN de l'acide acétique à -9°C (diamètre de tube : 13 mm). La polarisation du laser est horizontale. La nucléation se produit en 0.5s, "time code" en bas à gauche sur les photos soit : 0 s; 0,07 s; 0,13 s; 0,2 s; 0,27 s; 0,33 s; 0,4 s; 0,47 s. Figure reprise de [Ward 2012a].

La structure cristalline est orthorhombique Pna21 et se construit comme des chaînes linéaires de molécule (figure A1-13). Les deux axes de plus grande polarisabilité (la direction des chaînes de molécules) sont quasiment perpendiculaires ce qui est incompatible avec l'hypothèse NPLIN formulé par Garetz d'un alignement par effet Kerr optique suivant l'axe de plus grande polarisabilité. De plus, les calculs effectués dans le cadre de l'acide acétique montrent que l'énergie en jeu (estimé à $\Delta W \sim 10^{-3} k_B T$) est en réalité plus faible que celle nécessaire pour engendrer un effet Kerr optique et sont incapables à expliquer l'existence d'un seuil de puissance dans la nucléation.

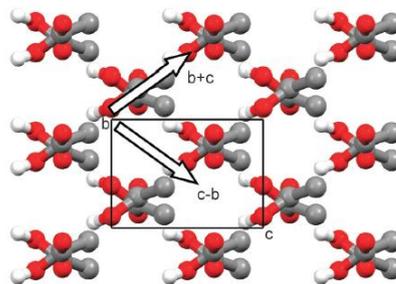


Figure A1-13 : Structure cristalline de l'acide acétique, la vue est suivant l'axe a. La cellule de base est le carré. Les chaînes de molécule se forment suivant les axes (b+c) et (c-b). L'axe de plus grande polarisabilité parallèle à la liaison carbone - carbone est dans la direction des chaînes linéaires. Figure reprise de [Ward 2012a].

A1-4) L – (+) – Histidine

Cette molécule a présenté lors des études faites par Garetz [Sun^A 2008] une fenêtre de basculement mais de manière beaucoup moins nette que pour la glycine. Les solutions sursaturées de 140 % à 180 % sur une base d'une saturation de 0,270 mol/kg à 25°C dans H₂O ont été exposées à un faisceau laser d'un diamètre de 1,85 mm avec une densité d'énergie de 0,24 GW/cm² à 532 nm avec une impulsion de 7 ns pendant une minute. La L-(+)-Histidine a deux polymorphes, le polymorphe A est orthorhombique (P₂₁2₁2₁) et le polymorphe B est monoclinique (P₂₁).

La fenêtre de basculement s'est manifestée dans l'intervalle de sursaturation [1,4 ; 1,6] avec la formation du polymorphe A lorsque la solution était exposée à une polarisation circulaire et par la formation d'une mixture du polymorphe A et du polymorphe B avec la polarisation linéaire. L'interprétation de l'empilement moléculaire fait que les briques élémentaires de A sont « *disklike* » et de B sont « *rodlike* » donc pour une polarisation circulaire le polymorphe A est majoritairement cristallisé. La formation des polymorphes A et B avec la polarisation linéaire est expliqué par la proximité structurale suivant l'axe c qui est faible entre les deux polymorphes.

A1-5) L – alanine

Jelena Matic a étudié lors de sa thèse la L alanine. Cette molécule C₃H₇NO₂ appartient au groupe d'espace orthorhombique P₂₁2₁2₁. La solution a été exposée à une longueur d'onde de 1064 nm et a donné un polymorphe classé inconnu qui d'après le logiciel employé appartiendrait au groupe d'espace P₂₁ [Matic 2005a]. Les travaux du groupe Garetz n'ont pas abouti à une publication.

La molécule de L-alanine a été cristallisée par l'emploi d'un laser continu à 1064 nm focalisé dans une solution de D₂O à 23°C (0,165 g pour 1,0 g de D₂O) [Yuyama 2012c]. Le L-alanine est une molécule zwitterionique en solution (point isoélectrique à 6,1047) La solution a été exposée à la polarisation circulaire droite et gauche et à une puissance entre 1 W et 1,4 W pendant 30 minutes. Les résultats montrent que le temps moyen d'induction évolue en fonction de la puissance sans différence significative sauf pour une puissance de 1,3 W où le temps moyen d'induction diffère de près de 100 s (figure A1-14).

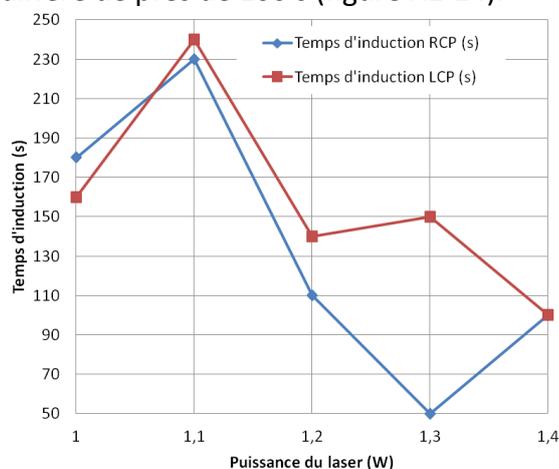


Figure A1-14 : Temps moyen d'induction du L-alanine après exposition au laser. Figure adaptée de [Yuyama 2012c].

La nucléation procède du piégeage optique qui est une conjugaison de deux facteurs s'opposant : le piégeage d'une molécule polaire et l'augmentation de la température. La diminution du temps moyen d'induction s'explique par l'échauffement local de la solution qui provoque une diminution de la sursaturation. De plus, ces résultats montrent que le piégeage optique est plus efficace sous la polarisation circulaire. Un autre résultat majeur a été apporté par ce travail à savoir la mise en rotation du cristal de L-alanine lorsque l'instrument créant la polarisation est tourné (figure A1-15).

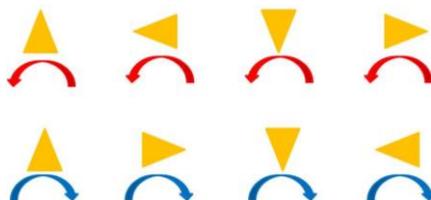


Figure A1-15 : Représentation schématique de la rotation des cristaux de L-alanine suivant la polarisation. En rouge, la polarisation circulaire gauche et en bleu, la polarisation circulaire droite. Figure adaptée de [Yuyama 2012c].

A1-6) L – Phenylalanine

La molécule de L - Phenylalanine a été cristallisée à l'interface air / solution ([Yuyama 2013a], [Yuyama 2013b]). La molécule a été étudiée à la fois dans D₂O et H₂O à 25°C (0,3 g dans 1 g de solvant) en l'exposant à un laser continu de longueur d'onde 1064 nm dont le faisceau est focalisé. Lorsque la solution à base de H₂O est exposée, un seul faciès est formé : une plaque anhydride au point focal. Cette phase formée est la plus stable jusqu'à 37°C [Kee 2011] ce qui a conduit à former l'hypothèse que l'élévation de température au point focal a conduit à la déshydratation du « liquid like cluster ».

Lorsque la solution à base de D₂O est exposée, de très nombreux cristaux d'une forme qui s'apparente à celle d'une aiguille se forment. Ces cristaux sont associés à la forme monohydrate et ne se forment pas au point focal mais à quelques millimètres de ce point. Cela montre l'existence d'une grande zone de concentration élevée avant la nucléation [Yuyama 2013b].

A1-7) 4 - (Diméthylamino) - N - méthyl - 4 - stilbazolium Tosylate (DAST)

Cette molécule organique a été cristallisée pour la première fois en 2002 [Tsunesada 2002]. La cristallisation a été obtenue suite à l'exposition à un laser nanoseconde à 1064 nm avec une longueur d'impulsion de 23 ns. Le résultat obtenu est une diminution importante du temps d'induction de 1,5 h – 3 h pour une sursaturation de 110 % à moins de 30 minutes pour une sursaturation de 130 %.

Dans une étude faite par l'équipe de Masuhara [Hosokawa 2005], le DAST a été cristallisé dans du méthanol. Son étude apporte des résultats intéressants concernant l'effet du taux de répétition. Un laser de 800 nm envoie des impulsions de 120 fs de 300 µJ/impulsion. Le taux d'irradiation a été de 20 Hz ou de 1 kHz et le faisceau focalisé pour une lentille de focale de 170 mm. Les résultats montrent la dépendance de la probabilité à la sursaturation mais aussi à la fréquence de répétition.

L'effet de la fréquence de répétition s'explique par la diffusion de la chaleur : l'accumulation de cette dernière est 100 fois plus importante à 1 kHz qu'à 20 Hz. Une forte accumulation de chaleur aboutira à la destruction du cluster si ce dernier n'a pas le temps de diffuser depuis le point focal. Ainsi, à 1 kHz il y a plus de chance de détruire un germe d'où finalement un taux de cristallisation plus élevé à 20 Hz.

A1-8) Hen Egg White Lysozyme

Le HEWL a été étudié sous plusieurs moyens de laser (nanoseconde, picoseconde et femtoseconde) et par plusieurs équipes. L'équipe de Tsuboi dans un article de 2007 a cristallisé le lysozyme par une pression de photon [Tsuboi 2007]. L'expérience s'est faite dans une solution de D₂O avec un laser NIR à 1064 nm continu et focalisé dans la solution.

A1-8-1) Sous laser continu

En plus des lasers impulsions, le HEWL a été exposé à des lasers continus. La solution de HEWL de concentration 30 mg/mL dans du D₂O a été exposée à un faisceau focalisé de longueur d'onde de 1064 nm à 23°C. Dans cette expérience, les molécules s'agrègent par le gradient induit par le champ électrique. Il y a un seuil à 250 mW et les expériences ont été menées à 300 mW ce qui impose un rayon de la particule de 20 nm (10 molécules) afin de provoquer le piégeage puis la nucléation. Ceci explique les temps longs pour obtenir les cristaux, plus d'une heure, car ce type d'agrégation de molécule de plus de 10 molécules de lysozymes est plutôt rare [Tsuboi 2007].

Une étude exhaustive de la croissance cristalline d'un cristal tétragonal de HEWL à partir d'un laser continu à 1064 nm dans D₂O a été rapporté [Tu 2014]. Le mécanisme proposé est celui du piégeage optique.

A1-8-2) Sous laser nanoseconde

L'étude du HEWL dans le cadre de *NPLIN* [Lee 2008b] a été menée en utilisant un laser nanoseconde (1064 nm et 532 nm) et un laser picoseconde à 532 nm. Le HEWL a été irradié par un faisceau polarisé linéairement. La solution de HEWL était placée dans un microbatch de 96 micropuits pour un volume de puit de 2µL. L'étude avec le laser picoseconde (100 ps, 30 Hz) a montré un taux élevé de nucléation avec un très haut taux de confiance pour les énergies les plus élevées : 83,3 % (0,223-0,257 GW/cm²). Pour le laser nanoseconde (532 nm, 4 ns, 20 Hz) les données sont représentées dans le tableau A1-2.

Densité surfacique (GW/mm ²)	Fréquence de nucléation (%)	Contrôle (%)
0,0032	34	23,5
0,0063	26	
0,0095	51,1	
0,026	53,3	
0,063	33,3	

Tableau A1-2 : Taux de nucléation du HEWL en fonction de la densité surfacique d'énergie. Tableau repris de [Lee 2008b].

Le tableau A1-3 montre les différents temps d'induction moyen de la nucléation à différentes concentrations. Celui-ci montre que plus la concentration est élevée plus le

temps induit est réduit. Cela montre l'effet de la nucléation induite par laser sur la réduction du temps de nucléation par rapport à la nucléation spontanée.

L'emploi du laser dans l'infrarouge a montré un taux de nucléation faible (30 %) pour une énergie surfacique pourtant beaucoup plus élevée 0,125 GW/cm² (de l'ordre de 3 fois au minimum) que celle employée par le laser à 532 nm. Cette forte diminution inattendue est due à une augmentation d'une température à l'intérieur de la solution de 7°C à 8°C (le coefficient d'absorption à 1064 nm est de 0,61 cm⁻¹) qui diminue la sursaturation globale et donc l'effet du laser.

Concentration (mg/mL)	Temps d'agitation (min)	Temps de cristallisation moyen NPLIN (exposition = 10 s) en h	Temps de cristallisation spontané moyen groupe contrôle en h
20	30	168	679,2
30	60	3,2	72
40	10	1	2,35

Tableau A1-3 : Temps de cristallisation moyen après exposition au laser (NPLIN) et spontanée. On note que plus la concentration est élevée, plus le temps d'induction de la nucléation se réduit. La différence entre temps d'induction par NPLIN et par la nucléation spontanée varie de 75 %, 95 % et 57 % respectivement. Tableau repris de [Lee 2008b].

A1-8-3) Sous laser femtoseconde

Une autre méthode a été mise au point en 2003 par l'équipe de Masuhara [Adachi 2003] et est nommé LIGHT pour LASER Irradiated Growth Technique. Elle permet l'obtention de la cristallisation par la focalisation d'un laser femtoseconde à 780 nm, une durée d'impulsion de 200 fs (1,95 nJ/impulsion) pour une répétition de 1 kHz et un temps d'exposition d'une minute. Le faisceau a été focalisé sur une gouttelette de 10 µL de concentration 25 mg/mL (2,5 % de chlorure de sodium, 0,1 M d'acétate de sodium, pH = 4,5) à 287 K. L'exposition des solutions de HEWL à différente fréquence du laser amène à d'intéressants résultats résumés dans le tableau A1-4 : il y a un intervalle en fréquence dans lequel cette dernière a une influence; en dehors, il y a soit aucune cristallisation soit une dénaturation de la solution. Par ailleurs, le nombre de cristaux augmente pour un nombre d'impulsions qui augmente.

Fréquence du laser (Hz)	Constatation
20	Aucune cristallisation
50	Cristallisation
100	Cristallisation
500	Dénaturation de la solution
1000	Dénaturation de la solution

Tableau A1-4 : Effet de la fréquence du laser sur le résultat de la nucléation. Tableau repris de [Adachi 2003].

Un travail fait état de l'augmentation de l'efficacité de la nucléation avec ou sans gel [Murai 2010]. Les conditions expérimentales restent proches de celles d'[Adachi 2003] à 23°C : longueur d'impulsion de 200 fs, longueur d'onde de 780 nm, taux de répétition de 1 kHz. Les résultats montrent que la cavitation a un effet capital dans la nucléation du HEWL. L'ajout de l'agarose permet de réduire les mouvements de convection et d'accroître l'efficacité de la nucléation. En effet, la bulle formée par le laser augmente localement la sursaturation et

une partie des molécules diffusent; l'ajout du gel réduit drastiquement la diffusabilité des molécules et conserve les zones de forte sursaturation.

L'étude de [Murai 2010] a été complétée par celle de [Nakayama 2013]. Dans cette étude effectuée par un laser femtoseconde de longueur d'onde 780 nm ou 800 nm, de largeur d'impulsion 200 fs avec un taux d'impulsion de 1000 Hz, le faisceau est focalisé. Les auteurs rapportent que cette focalisation implique le mécanisme de cavitation (figure A1-16). L'observation des bulles a aussi été faite dans le cas des molécules de paracétamol et de l'AcrB étudiées dans ce travail.

Deux paramètres influent sur la probabilité de cristallisation (figure A1-17): la concentration en gel et la distance du point focal à l'interface gel / solution. Une basse concentration en gel aboutit à aucune nucléation spontanée et aucune nucléation à 200 μm du point focal. A contrario, à une distance de 50 μm , la probabilité de nucléation augmente avec un accroissement pour une intensité impulsionnelle plus élevée. Néanmoins, pour une plus forte concentration de gel, on observe une nucléation spontanée ainsi que des probabilités plus ou moins égales entre les configurations 10 $\mu\text{J}/\text{impulsion}$, 200 μm et 20 $\mu\text{J}/\text{impulsion}$, 50 μm avec une nucléation amorcée un jour plus tôt dans le premier cas par rapport au second. La configuration 10 $\mu\text{J}/\text{impulsion}$, 50 μm a une probabilité de nucléer inférieure aux deux précédentes, le temps a un effet sur le taux de nucléation.

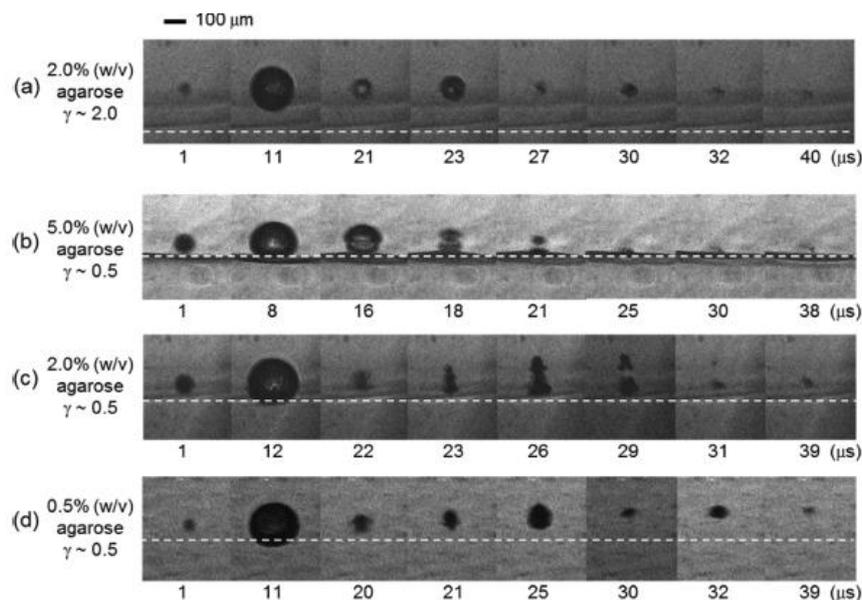


Figure A1-16 : Images de bulles de cavitation. Une seule impulsion de 30 μs a été envoyée. Figure reprise de [Nakayama 2013].

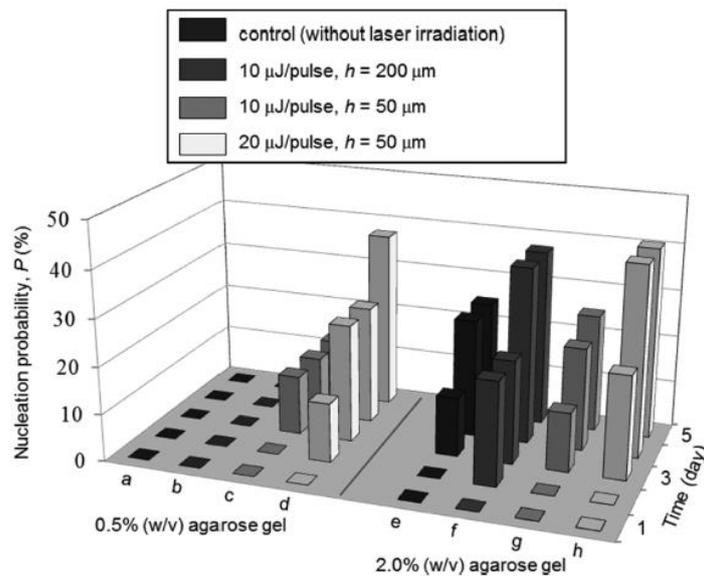


Figure A1-17 : Taux de nucléation du HEWL en fonction du temps après l'exposition, la concentration en gel d'agarose et la distance du point focal à l'interface gel / solution. Il est clairement montré l'influence de la distance du point focal à l'interface. Figure reprise de [Nakayamai 2013].

Les travaux de [Nakamura 2007] et de [Murai 2011] réalisés à partir de laser femtoseconde (taux de répétition de 1 kHz, longueur d'impulsion de 200 ns) focalisé (par une focale de 50 mm) et à une température de 20°C montrent un taux de nucléation similaire entre le taux de nucléation spontané et aux longueurs d'onde de 780 nm et 260 nm à différentes énergies. Il est à noter que l'absorption à 262 nm est bien plus élevée qu'à 780 nm (tableau A1-5). Le mécanisme qui est supposé dans ce travail est une nucléation induite par la formation de bulle au sein de la solution due au laser.

Energie (μJ / impulsion)	Taux de nucléation		
	Nucléation spontanée	$\lambda = 260 \text{ nm}$	$\lambda = 780 \text{ nm}$
0	0,65		
0,5		0,6	
0,7			0,65
1,5		0,85	
3			0,85
10		0,75	0,75

Tableau A1-5 : Taux de nucléation spontanée et en fonction de la longueur d'onde pour différente énergie. Tableau repris de [Murai 2011].

A1-9) Bovine Pancréatine Tynine

Une partie de l'étude du HEWL par l'équipe Garetz a consisté à étudier la molécule de BPT. Le protocole expérimental est différent puisque les solutions ont été exposées à seulement une impulsion par seconde venant d'un laser nanoseconde dans le proche infrarouge (1064 nm) et dans le vert (532 nm). Pour une même longueur d'onde (1064 nm), la densité de puissance influe directement sur le pourcentage des cellules qui ont nucléés. Le pourcentage de solution ayant nucléé augmente avec l'augmentation de la densité surfacique d'énergie.

A 1064 nm, pour une densité surfacique de $0,036 \pm 0,005 \text{ GW/cm}^2$, la fraction d'échantillon ayant nucléé est 5%, pour une densité de $0,125 \pm 0,031 \text{ GW/cm}^2$ cette fraction s'élève à 12

% au minimum. Lorsque le diamètre du faisceau pour une même énergie ($0,125 \pm 0,031$ GW/cm²) double, soit un passage de 1,5 mm à 3,5 mm, la fraction ayant nucléé passe de 12 % à 17,5 %.

La comparaison entre les résultats du laser NIR et du laser vert pour des valeurs similaires montre une plus grande efficacité dans la nucléation à 532 nm (10 % contre 5 %) pour une densité d'énergie plus faible à 532 nm ($0,0125 \pm 0,0075$ GW/cm² contre $0,036 \pm 0,005$ GW²/cm²) avec une durée d'impulsion une seconde inférieure à celui du NIR (5 ns) [Lee 2008b].

A1-10) Chlorure de potassium (KCl) et Bromure de potassium (KBr)

A1-10-1) Les travaux de l'équipe d'Andrew Alexander

A1-10-1-1) Chlorure de potassium

Le chlorure de potassium possède une structure cubique à face centrée à température ambiante et pas de polymorphe.

Dans une première série d'expérience [Dufus 2009], le KCl est dissous dans une solution aqueuse dans laquelle a été ajouté du sel d'agarose et exposé à une impulsion puis au laser (1064 nm, 6 ns de largeur d'impulsion, 5,5 mm de largeur) à 23°C. La présence du gel augmente les mouvements de diffusion au profit de la convection. Il a été démontré que la concentration du gel influe directement sur le nombre de cristaux obtenu : plus elle est élevée, plus le nombre de cristaux est lui aussi élevé.

Il existe un seuil à 7 MW / cm². La non linéarité aux concentrations d'agarose plus élevées est associée à une modification du mécanisme en jeu. Par ailleurs, l'efficacité des cristaux est meilleure pour une concentration d'agarose de 0,50 % w/w que celle de 0,75 % w/w. Cela est relié à un réarrangement de la structure du gel.

Une étude plus poussée [Alexander 2009] sur le chlorure de potassium a été faite en soumettant une gamme de sursaturation à 23°C de 1,053 à 1,102 (donnée de saturation à 23°C : 34,95 g pour 100 g de H₂O à un laser à 1064 nm avec une impulsion de l'ordre de 7 nanoseconde. Une seule impulsion laser suffit à déclencher la nucléation. Il n'y a pas eu de réaction aux changements de polarisation ce qui dans le cas de KCl en fait un phénomène indépendant de la polarisation mais, il existe une puissance seuil en-dessous de laquelle il n'y a aucun phénomène de nucléation. La valeur moyenne du seuil de nucléation ($6,4 \pm 0,5$ MW/cm²) semble indépendante de la sursaturation néanmoins, la dispersion des données est élevée laissant penser que la sursaturation a un effet même mineur. Dans le cas du KCl, il a été démontré que les impuretés de taille supérieure à 200 nm n'ont pas forcément un effet très important sur les résultats de la nucléation. Dans le cadre du chlorure de potassium et à partir des équations et des hypothèses de la théorie classique de la nucléation, la taille critique du cluster a été calculée à 1 nm [Alexander 2009].

Une troisième étude a été [Ward 2009] menée à 24,4 °C sur deux sursaturations 1,066 et 1,076 (donnée de saturation à 24,4°C : 35,37 g pour 100 g de H₂O). Elle a mis en évidence,

par l'utilisation l'emploi de deux longueurs d'impulsion différentes, que le paramètre pertinent pour quantifier l'efficacité de *NPLIN* est la densité de puissance. De plus, la longueur de l'impulsion n'a pas d'incidence sur la fraction d'échantillons qui ont nucléé (tableau A1-6).

Sursaturation	Configuration du laser	largeur d'impulsion (ns)	Densité d'énergie (MW / cm ²)	Fréquence d'échantillon ayant nucléée (%)
1,066	Free running	202	2,14	21 +/- 8
	Q switched	6	2,19	24 +/- 8
1,076	Free running	202	2,3	31 +/- 8
	Q switched	6	2,26	26 +/- 8

Tableau A1-6 : Caractéristique des configurations des lasers employés suivant la sursaturation ainsi que le résultat obtenu en terme de solution ayant nucléées. Tableau repris de [Ward 2009].

Suite aux résultats de cette étude, un mécanisme est proposé :

- (1) Le champ électrique du laser permet de concentrer du soluté dans un « *cluster* » qui devient critique même quand le champ du laser est arrêté.
- (2) La présence du champ électrique stimule le réarrangement structural d'un « *cluster* » sous critique en le faisant passer d'une forme « *liquid like* » à une forme cristalline.

A1-10-1-1) Bromure de Potassium

Une dernière étude [Ward 2012b] a analysé l'effet de la longueur d'onde et de la température sur le KCl et le KBr. Les expériences ont été faites à 23°C (données de saturation à 23°C : 4,688 mol/kg, à 33°C : 5,092 mol / kg pour KCl et 5,610 mol/kg pour KBr) pour une sursaturation de 1,060 aux deux températures. Deux longueurs d'onde ont été utilisées 1064 nm (6,3 ns) et 532 nm (5,3 ns) et les solutions exposées à une impulsion de polarisation linéaire. Le KBr possède la même structure cristalline que KCl.

L'efficacité de la nucléation est plus élevée à 532 nm qu'à 1064 nm et l'évolution de la nucléation est clairement non linéaire. Aux deux longueurs d'onde, l'efficacité de la nucléation est plus élevée pour le KCl que pour KBr et à température différente pour le KCl, l'efficacité est plus élevée à 33°C qu'à 23°C.

A1-10-2) Les travaux de l'équipe de Bruce Garetz

L'équipe de Bruce Garetz [Fang 2014] s'est intéressée à la cristallisation sans contenant en utilisant un dispositif de confinement électrodynamique décrit dans [Ehre 2011] et montrée dans la figure A1-18. Un tel dispositif permet d'effectuer une caractérisation *in situ* en utilisant soit un laser IR ou la spectroscopie Raman [Ehre 2011], soit une observation visuelle par une caméra CCD ou d'étudier le centre de la gouttelette par un laser non focalisé à 473 nm (50 mW) [Fang 2014]. Un tel dispositif permet d'induire la nucléation *via* un processus *NPLIN* dans des gouttes de KCl en lévitation [Fang 2014]. Le choix du KCl est motivé par son faible seuil de nucléation *NPLIN* (voir A1-9-1-1).

Une gouttelette est injectée dans le dispositif et est placée au centre du dispositif par un réglage manuel du voltage du courant continu. La température est maintenue à 21°C - 23°C avec une incertitude de 1°C. Une fois la molécule piégée, l'humidité relative est modifiée en ajoutant un gaz après évacuation de l'air. La modification de l'humidité modifie suffisamment les conditions pour obtenir des polymorphes différents. En effet et pour une autre molécule, il a été observé qu'une faible humidité relative induit la formation du polymorphe β de l'acide glutarique et une humidité relative élevée induit la formation du polymorphe α de l'acide glutarique [Ehre 2011].

Le laser employé par Fang *et al.* [Fang 2014] est un laser nanoseconde à 532 nm avec une durée d'impulsion de 1 ns, un taux de répétition de 1 kHz et focalisé. La densité d'énergie au point focal est de 55 MW/cm² (l'énergie de sortie du laser est de 3 mW). Les résultats montrent que pour des intensités comprises entre 2 MW/cm² et 20 MW/cm², la gouttelette n'est plus à l'équilibre dans le piège et se met en mouvement vers la base du dispositif. Cela a été observé à la fois pour des gouttelettes en sous-saturation et en sursaturation mais pas pour des densités d'énergies inférieures à 2 MW/cm². Il a été par ailleurs démontré que ce phénomène est indépendant de la taille de la gouttelette, de la concentration et du nombre de charge au sein de la solution. Ce phénomène est compris par les auteurs comme une perte de charge au sein de la gouttelette expliquant la rupture du confinement ce qui implique une diminution du nombre de molécule. Cette modification de l'équilibre a pour conséquence de limiter le temps d'exposition au laser à 0,1 s. Par ailleurs, la focalisation induite par la forme sphérique amenait le faisceau au centre de la gouttelette à 10 GW/cm² en dessous des 100 GW/cm² nécessaire pour former un plasma dans l'air.

Les résultats montrent que la nucléation par laser peut être induite dans ce genre de configuration avec un seuil en sursaturation de 1,20 à 22°C ce qui est bien plus élevé que la concentration minimale de 1,06 rapportée par les travaux d'Alexander *et al.* (voir A1-9-1-1). En utilisant un modèle basé sur la théorie classique de la nucléation, il a été démontré que la fréquence de nucléation dans le cadre de cette expérience est environ 200 000 fois supérieure à celle dans les solutions étudiées par d'Alexander *et al.* Toutefois, l'énergie interfaciale qui en est déduite est du même ordre de grandeur que celle connue. Les auteurs de l'étude concluent que le phénomène en présence est le même que celui observé par Alexander *et al.* dans des conditions de volume très différentes [Fang 2014].

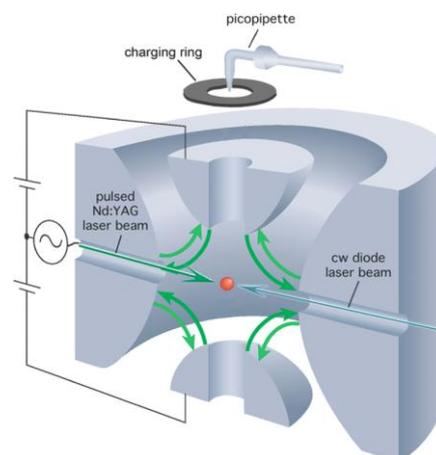


Figure A1-18 : Vue en coupe du système électrodynamique de confinement. Figure reprise de [Fang 2014].

A1-11) NaClO₃

Suite à l'étude du KCl, l'équipe d'Alexander a continué l'étude des sels en analysant l'effet de la méthode *NPLIN* sur le NaClO₃ [Ward 2011]. Un seuil en puissance est à nouveau observé. La nucléation commence à partir de 0,161 ± 0,013 GW/cm² et augmente de façon linéaire jusqu'à 0,22 GW/cm² (coefficient directeur de 15 ± 0,8 cm²/GW) pour atteindre un plateau dans la nombre d'échantillon nucléés de 78 % à 0,22 GW/cm². Chaque échantillon a été irradié par 50 impulsions lasers à une température de 259 °C.

L'apport principal suite à l'étude de cette molécule est la découverte d'un effet mémoire qui se produit uniquement sous *NPLIN*. Le NaClO₃ a un groupe d'espace chiral : P2₁3. Il existe donc deux polymorphes, un dextrogyre (noté d-SCl) et un lévogyre (noté l-SCl) (figure 1-43). Lorsqu'un composé d-SCl ou l-SCl est dissout dans une solution puis recristallisé sans laser, le type de cristal obtenu est aléatoire. Néanmoins, lorsque le laser est utilisé, un effet mémoire est obtenu : si l-SCl est dissout (resp. d-SCl), après l'exposition à *NPLIN* le cristal l-SCl est à nouveau obtenu (resp. l-SCl) à plus de 87% (tableau A1-7). Cet effet mémoire proviendrait de « cluster » non dissout à l'issue du processus de dissolution. Toutefois, il est remarquable que seul *NPLIN* réussisse à réactiver la cristallisation de ces « clusters ».

Une expérience a été menée pour vérifier que les impuretés jouent un rôle négligeable en laissant des échantillons exposés volontairement à l'air libre pour obtenir un dépôt d'impureté et un autre lot a été protégé. A nouveau, les résultats confirment la tendance révélée précédemment (tableau A1-8) et le rôle mineur joué par les impuretés.

Enantiomorphe		
Avant fusion	Après exposition <i>NPLIN</i>	Nombre d'échantillons
d	d	9
l	l	11
l	dl	1
d	l	1
d	dl	1

Tableau A1-7 : Résultats concernant l'effet mémoire induit par le laser sur 23 échantillons. La configuration cristalline est connue avant la dissolution (colonne de gauche), la configuration obtenue après *NPLIN* est précisée (colonne centre). Tableau repris de [Ward 2011].

Une explication a été proposée par l'équipe d'Alexander. Le NaClO₃ se décompose comme suit :



La formation de NaCl pendant le processus de dissolution permet à des « clusters » de NaClO₃ de résister à la dissolution jusqu'à 280°C. Néanmoins cette hypothèse souffre de ne pas avoir été vérifiée.

Bien que les conditions opératoires soient les mêmes que dans les autres molécules, les résultats diffèrent dans le cas du NaClO₃. En effet, une lumière polarisée ne permet pas d'aligner les « clusters » pour obtenir une structure cristalline et de surcroît, il est impossible de favoriser un polymorphe sur un autre par l'emploi d'une lumière polarisée. L'effet Kerr optique (hypothèse majeure pour *NPLIN*) n'opère pas dans ce cas car il aurait été issu de l'interaction entre le champ laser et la polarisation anisotropique des ions ClO₃⁻.

En résumé : la rétention de chiralité est expliquée par un effet indirect du laser qui active des « clusters » non dissous de NaClO₃ grâce à l'action de la molécule de NaCl créée par décomposition. Il s'agit de nucléation hétérogène [Ward 2011].

Enantiomorphe			
Traitement	Avant fusion	Après exposition NPLIN	Nombre d'échantillon
Exposé aux impuretés	d	d	2
	l	l	3
	d	dl	1
Protégé des impuretés	d	d	3
	l	l	3
	d	dl	1
	l	dl	1

Tableau A1-8 : Résultats concernant l'effet mémoire induit par le laser éliminant la possibilité des impuretés sur 14 échantillons : 6 exposés à la prise d'impuretés et 8 protégés de tout contact avant l'exposition. La configuration cristalline est connue avant la dissolution (colonne de gauche), la configuration obtenue après NPLIN est précisée (colonne centre).
Tableau repris de [Ward 2011].

A1-12) KNO₃

L'étude du KNO₃ [Jacob 2012] a été faite en employant un laser Nd:YAG à 532 nm avec une impulsion de 7 ns et une puissance de 200 mJ (la densité d'énergie vaut 57 MW/cm²). Le faisceau est focalisé par une lentille de focale 20 mm ce qui amène la densité d'énergie à 1500 MW/cm². Une seule impulsion a été employé à chaque fois dans les expériences. La nucléation est suivie par l'analyse de la turbidité Tu_t : une lampe au Xénon envoie un faisceau de lumière au sein de la solution dont le faisceau transmis est analysé par un photomultiplicateur. L'expérience a été conduite à 20°C sur différente sursaturation : 1,00; 1,05; 1,3; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 2,0. Seule l'énergie contenue dans le faisceau incident a été modifiée suivant la sursaturation. En effet, pour une sursaturation entre 1,00 et 1,3 l'énergie est de 1500 MW/cm² et pour une sursaturation entre 1,3 et 2,0 l'énergie est de 700 MW/cm². L'intérêt de la mesure de la turbidité c'est de pouvoir remonter aux constantes cinétiques d'accrétion et de dissociation et de connaître la concentration des nucleus.

La solution n'a pas d'absorption entre 300 nm et 800 nm. Par ailleurs, les auteurs font l'hypothèse que les espèces prédominantes dans la solution sont les ions K⁺ et NO₃⁻ liées par un très fort moment dipolaire. Le mécanisme proposé est une nucléation induite par une onde de choc dû à l'unique impulsion envoyée sur la solution. Après la dissolution et le refroidissement, la solution est soumise à l'onde de choc qui augmente localement la sursaturation et modifie la cinétique. En effet, la constante cinétique de dimérisation k_{dim} (M + M -> M₂) devient supérieure à celle de monomérisation k_{-dim} (M₂ -> M + M). Enfin, des « clusters » critiques se forment amenant à la cristallisation homogène.

A1-13) KMnO_4 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

L'équipe de Soare [Soare 2011] a mené des travaux sur KMnO_4 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Le laser employé émet à 532 nm une impulsion de 6 ns, le faisceau est focalisé par un objectif de microscope (x 20). KMnO_4 a été étudié à 29°C à différentes sursaturations : 1,07 %; 1,14 %; 1,21 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a été étudié à 22,5°C à deux sursaturations : 1,02 % et 1,04 %. De l'encre magenta a été ajoutée à la solution d'acide sulfurique pour faciliter l'absorption de l'énergie du laser. L'effet du laser se manifeste par la création d'une bulle au point focal du faisceau qui s'effondre en créant une sursaturation locale qui initie la cristallisation.

A1-14) Glucose Isomérase et cytochrome C

Dans l'étude [Murai 2011], le glucose Isomérase a été étudié en plus du HEWL dans les mêmes configurations : laser femtoseconde de longueurs d'onde de 260 nm et 780 nm pour une énergie de 2 μJ /impulsion. Les résultats montrent une absence de nucléation spontanée et un taux de nucléation induite par les lasers similaires (tableau A1-9). Il est à noter que l'absorption à 262 nm est bien plus élevée qu'à 780 nm. Ces résultats ont été confirmés par [Iefuji 2011] en incluant une nouvelle cible : le cytochrome C.

Energie	Taux de nucléation		
	Nucléation spontanée	$\lambda = 260 \text{ nm}$	$\lambda = 780 \text{ nm}$
0	0	0	0
2 μJ / impulsion	0	0,14	0,16

Tableau A1-9 : Taux de nucléation spontanée et en fonction de la longueur d'onde pour une énergie de 2 μJ /impulsion. Tableau repris de [Murai 2011].

A1-15) Anthracène

L'anthracène a été cristallisé à 25°C à la suite du DAST et du HEWL [Nakamura 2007b] à l'aide d'un laser femtoseconde à 1064 nm focalisé. La longueur d'impulsion est de 120 fs. Les énergies employées sont dans l'intervalle [0; 20,6] μJ par impulsion. Il existe un seuil en énergie dans la nucléation. Le mécanisme proposé pour la nucléation de l'anthracène est le phénomène de cavitation.

A1-16) Criblages de protéines

En plus des molécules détaillées ci-dessus (tableau A1-10), un criblage a été fait sur cinq molécules en utilisant un laser picoseconde [Yennawar 2010] : Ribonucléase B, Lysozyme, Myoglobine, Sorbitol dehydrogenase, Glucose dehydrogenase, Fructose dehydrogenase. Ces molécules ont cristallisé sous une polarisation linéaire (il n'a pas été observé de différence avec la polarisation circulaire) avec un laser picoseconde à 532 nm. Trois temps d'exposition : 30 s, 60 s et 90 s et trois énergies : 6 mW, 9 mW et 12 mW.

Protéine	laser - temps d'induction (h)	Spontanée - temps d'induction (h)
Lysozyme	3 à 4	48
Ribonucléase B	24	504
Sorbitol dehydrogenase	48	168
Glucose dehydrogenase	168	168
Myoglobin	24	168
Fructose dehydrogenase	504	/

Tableau A1-10 : Temps d'induction de la nucléation après exposition au laser comparée au temps d'induction de la nucléation spontanée. Tableau repris de [Yennemar 2010].

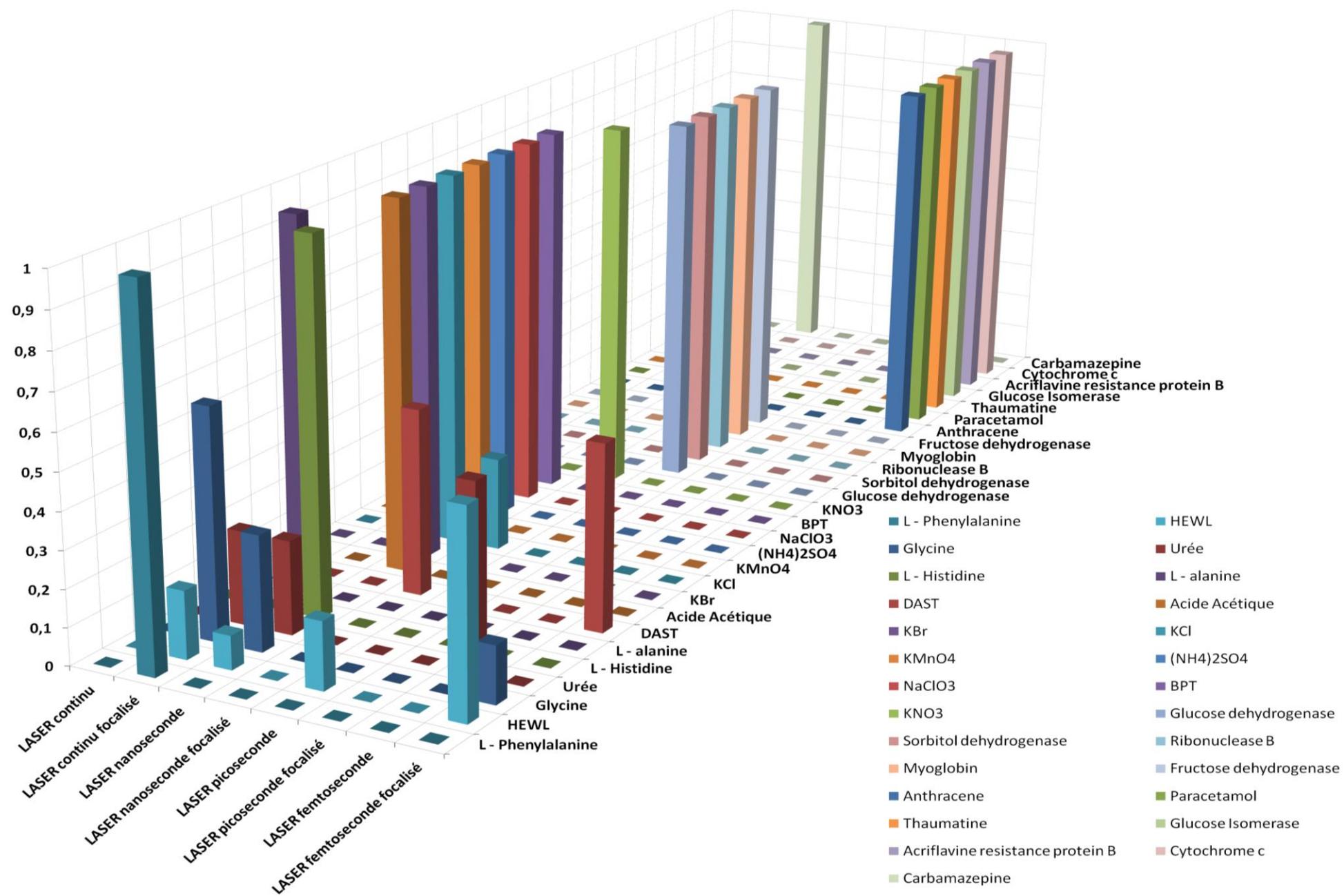
A1-17) Molécule d'intérêt pour la compréhension du phénomène : l'étude du CO₂

Le travail sur la molécule de CO₂ a montré la possibilité d'induire la formation de bulles dans des solutions sursaturées [Knott 2011a]. Le dioxyde de carbone étant sous forme gazeuse, il a fallu le dissoudre dans la solution aqueuse par un dispositif s'appuyant sur la loi de Henry. Ces solutions ont été exposées à un laser nanoseconde non focalisé et à trois longueurs d'onde : 1064 nm, 532 nm et 355 nm. Le taux de répétition est de 1 Hz sur une durée de 10 s. L'effet du laser est immédiat puisque en présence de CO₂, on observe l'apparition de bulle dans la solution. De plus, un effet de seuil est noté en énergie par impulsion suivant une décroissance exponentielle en fonction de la sursaturation.

A1-18) Carbamazepine

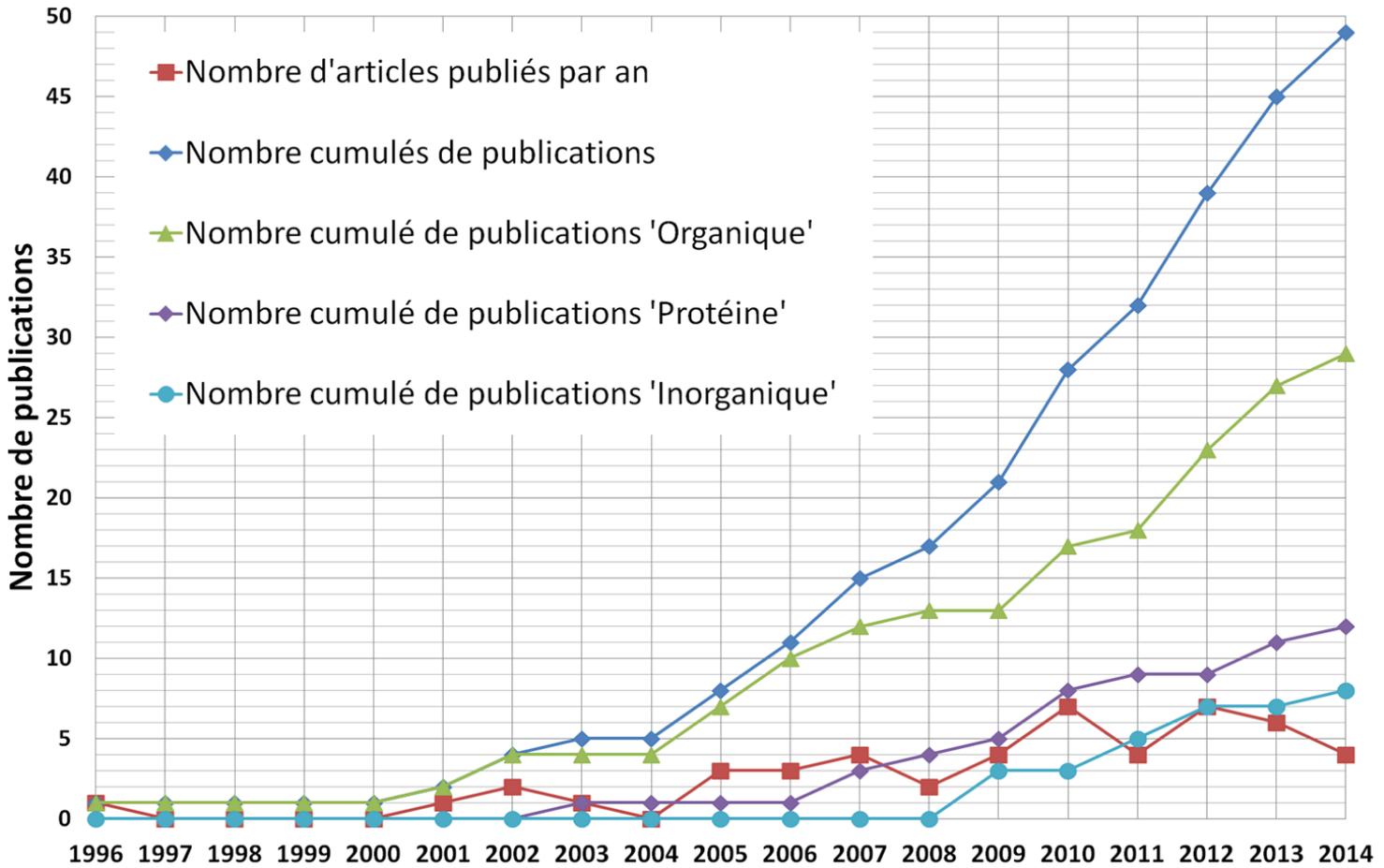
La molécule de carbamazepine a été étudiée au sein de notre équipe par Aziza Ikni. Il s'agit d'une étude approfondie faisant suite aux travaux préliminaires de [Miret 2009]. L'article relatant les résultats est mis à la fin de la thèse.

Annexe A2 : La figure ci-dessous montre la répartition de l'usage des différentes catégories de laser et de laser focalisé par molécules. La somme des contributions par catégorie de molécule fait 1 (100 %). Les molécules ont été placées afin d'obtenir la meilleure visibilité possible des histogrammes. La figure couvre l'ensemble des publications jusqu'au 1er juillet 2014 et ne comptabilise pas les articles publiés à partir du 1er juillet 2014.

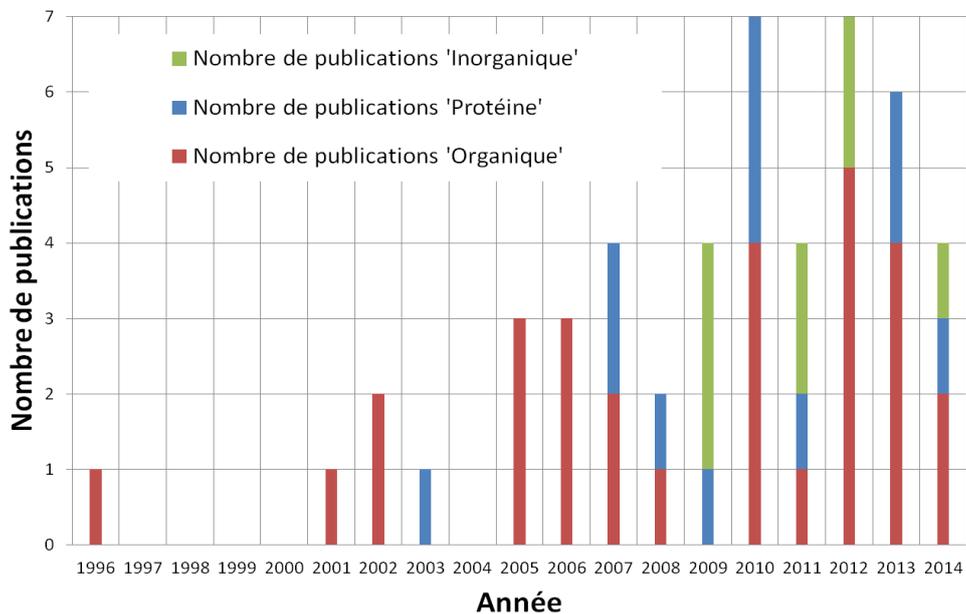


Annexe A3 : Statistiques concernant les publications liées au domaine *NPLIN*

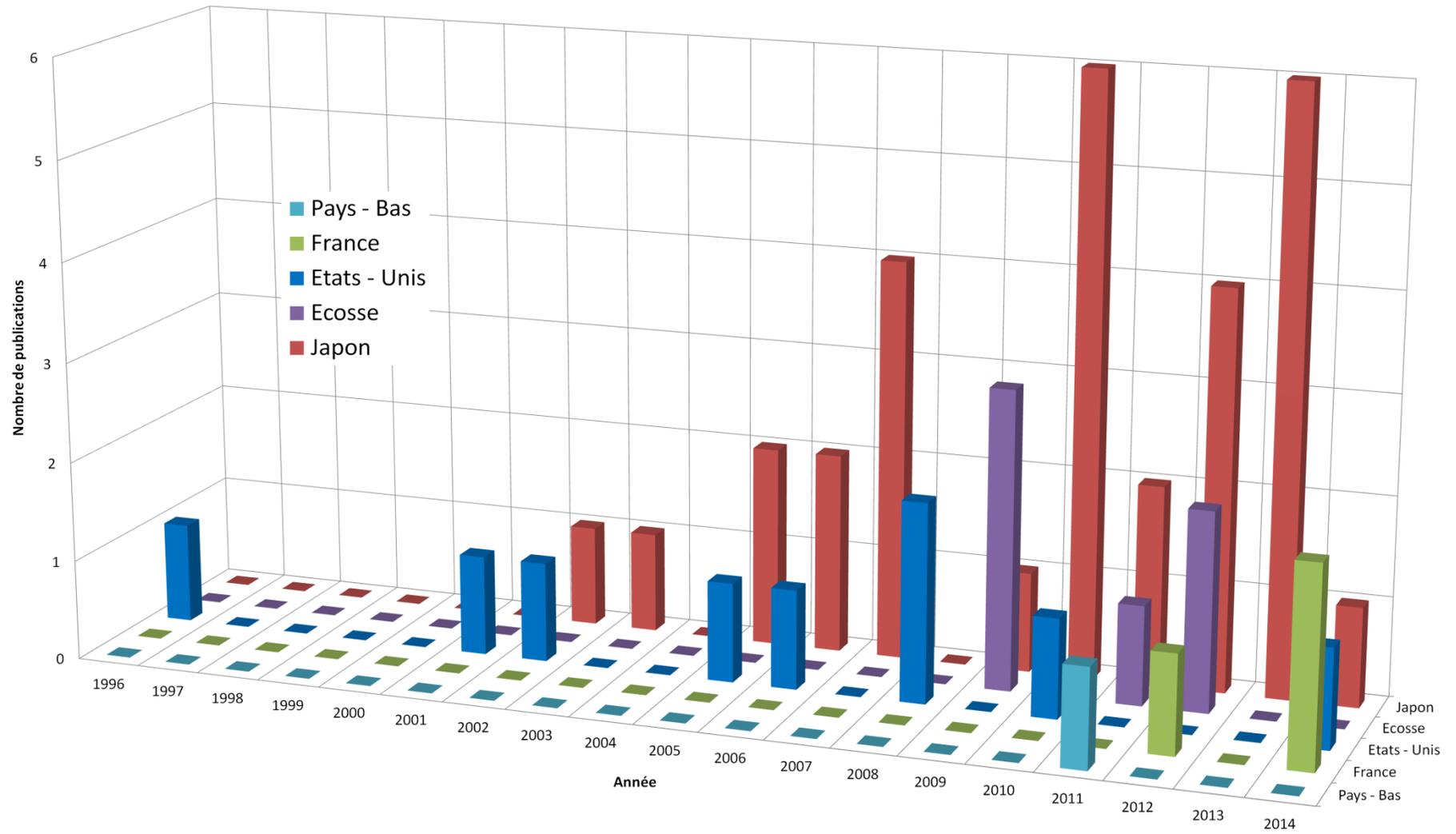
Annexe A3 – 1 : Evolution du nombre d'articles publiés liés au domaine *NPLIN*.



Annexe A3 – 2 : Evolution du nombre d'articles publiés par type de molécule.



Annexe A3 – 3 : Part des pays dans le volume des publications annuelles jusqu'au 1^{er} juillet 2014.



Annexe A4 : Liste des sigles utilisés pour définir la nucléation *NPLIN*.

A l'exception des sigles *LIGHT* et *NPLIN* qui sont des termes revendiqués par les auteurs, les autres sigles sont des compressions des titres des publications que nous avons effectués.

Acronyme	Définition	Références
NPLIN	Non Photochemical LASER Induced Nucleation	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 27, 28.
LIM	LASER Induced Method	13
LIGHT	LASER Irradiated Growth Technique	9
FLI	Femtosecond LASER Irradiation	10
FCWNILB	Focus Continous Waves Near Infared LASER Beam	29
LIN	LASER Induced Nucleation	8, 22
LIC	LASER Induced Cavitation	30
FLIN	Femtosecond LASER Induced Nucleation	11, 12, 15, 21, 23
PCWLB	Polarized Continous Waves LASER Beam	24
SLP	Single LASER Pulsed	25
SFL	Single Femtosecond LASER	26

Equivalence entre les numéros de la table et la bibliographie :

1 : [Garetz 1996], 2 : [Zaccaro 2001], 3 : [Garetz 2002], 4 : [Matic 2005a, 2005b], 5 : [Sun^A 2006], 6 : [Sun^A 2008], 7 : [Duffus 2009], 8 : [Knott 2011], 9 : [Adachi 2003], 10 : [Nakamura 2007a], 11 : [Murai 2010], 12 : [Nakayama 2013], 13 : [Tsunesda 2002], 14 : [Lee 2008], 15 : [Yoshikawa 2009], 16 : [Alexander 2009], 17 : [Ward 2009], 18 : [Ward 2011], 19 : [Ward, 2012a], 20 : [Ward 2012b], 21 : [Nakayama 2013], 22 : [Soare 2011], 23 : [Yuyama 2012a], 24 : [Uwada 2012], 25 : [Jacob 2012], 26 : [Liu^B 2013], 27 : [Clair 2014], 28 : [Ikni 2014], 29 : [Rungsimanon 2010a], 30 : [Murai 2011].

Annexe B : Solubilités extraites de la littérature

Annexe B1 : Valeurs de solubilité des polymorphes α et γ de la glycine dans D_2O , H_2O et en fonction du pH à différentes températures.

Méthodologie de relevé des points de solubilité : lorsque les valeurs associées aux températures étaient communiquées dans la publication, les données étaient retranscrites dans un fichier Excel avec si nécessaire adaptation des unités pour obtenir une température en °C et une solubilité en g/L. Lorsque seuls les graphiques étaient accessibles (soit par choix des auteurs soit par citation d'un article ou d'un livre inaccessible dans une publication accessible), un relevé précis du graphique a été fait via une règle de trois puis les unités étaient adaptées. L'erreur de retranscription est de l'ordre 0,3 mm soit moins de 1 %.

Annexe B1 - 1 : Solubilité dans H_2O en fonction de la température.

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe γ (g/L)
Yang 2008	5	141,1	5	127,1
Molécule	12,5	166,7	14	154,8
glycine	20	198,9	20	177
Solvant	25	226,8	25	202,1
H_2O	28,5	241,7	30	225,6
Polymorphe	33	259,6	37	260,7
α	36	283,1	42	286,1
γ	46	334,5	50	336,2
	50	354,2	57	375,6
	55	384,8	61	399,5

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Bonin-Paris 2011	35,170925	301,4072
Molécule	45,641	349,99815
glycine	54,188	400,70175
Solvant	61,666625	451,40535
H_2O		
Polymorphe		
α		

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Park 2003	8,623165	157,065175
Molécule	18,768065	183,69559
glycine	27,39123	206,52166
Solvant	45,144805	259,78249
H2O	50,7245	282,60856
Polymorphe	60,8694	316,847665
α		

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Ramasami 2002	15,21735	202,717315
Molécule	24,855005	252,1738
glycine	34,999905	301,630285
Solvant		
H2O		
Polymorphe		
α		

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Dunn 1933	0	143,1
Molécule	25	253,1
glycine	50	401,5
Solvant	75	574,9
H2O		
Polymorphe		
α		

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Seidell 1952	34,95725	303,51985
Molécule	40,08545	330,9843
glycine	44,999975	362,67405
Solvant	49,9145	391,12465
H2O	55,0427	423,9409
Polymorphe	59,957225	453,518
α		

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α (g/L)
Srinivasan ^A 2008	30	261,1
Molécule	35	283,3
glycine	40	311,1
Solvant	45	338,8
D2O	50	372,2
Polymorphe	55	411,1
α		

Annexe B1 - 2 : Solubilité dans H₂O et D₂O en fonction de la température.

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe α dans H ₂ O (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe α dans D ₂ O (g/L)
Jelinska-Kazimierzczuk 1996	17,05	208,506672	17,45	164,354185
Molécule	19,55	217,7153	18,25	168,889386
glycine	21,55	223,507152	20,15	175,111232
Solvant	23,05	231,715748	21,65	181,445521
H ₂ O	24,55	241,591064	22,85	187,405
D ₂ O	27,55	250,799692	24,75	193,664327
Polymorphe	30,05	263,216756	26,55	200,485869
α	32,55	273,800428	27,95	207,307411
	33,85	278,383908	29,35	213,26689
	34,55	283,592408	32,25	220,463242
	36,15	290,884308	33,55	227,772037
	37,55	301,176304	34,65	230,545631
	39,55	312,468332	36,05	235,080832
	40,55	317,885172	37,25	247,74941
	42,45	335,552404	38,55	251,609953
	44,05	342,969308	40,05	257,531951
	45,55	345,469388	41,25	270,687782
	46,55	354,261336	42,25	273,761224
	48,55	365,136684	44,55	285,680182
	51,55	380,470508	45,85	291,564699
	53,25	387,845744	47,55	300,59762
	55,05	403,262904	50,05	310,005351
	56,05	409,721444	52,55	323,535992
	58,35	417,846704	55,05	339,390455
			56,55	345,537339
			60,05	364,090434

Annexe B1 - 3 : Solubilité dans H₂O en fonction du pH à une température fixée.

Référence	pH	Solubilité du polymorphe γ (g/L)	pH	Solubilité du polymorphe γ (g/L)	pH	Solubilité du polymorphe γ (g/L)
Yang 2008 et 2006	0,35	302,7	0,35	319	2,48	365,76
Molécule	1,04	221,6	1,04	246,9	2,88	288,18
glycine	2,11	203,8	2,11	229,1	3,17	251,23
Solvant	2,78	187	3,11	213,4	3,61	233,99
H ₂ O	4,5	181,7	4,42	208,7	4,42	221,67
Température	5,5	178,1	6,04	201,4	5,38	210,45
20 °C	7,4	177	7,4	202,1	6,04	206,41
25 °C	8,5	184,3	8,89	203,5	6,89	215,92
Polymorphe	9,9	190,5	10,73	211,8	7,63	231,74
γ	10,73	198,2	11,37	217,8	8,89	277,87
α	11,37	201,4	12,53	232,8	9,78	351,61
	12,59	215,5	12,89	246,8	10,21	444,49
	13,6	251,8	13,37	263,5		
			13,7	284,1		

Nota bene : Yang 2006 correspond à [Lu 2006] dans la bibliographie. Ce choix a été fait car les mesures dans le pH ont été effectuées par le même groupe.

Référence	pH	Solubilité du polymorphe γ (g/L)
Carta 1996	0	263,0333664
Molécule	0,27	231,8807274
glycine	0,53	207,1087494
Solvant	0,73	206,808483
H ₂ O	1,11	206,2079502
Température	2	204,2562186
25 °C	3,02	203,6556858
Polymorphe	3,5	204,7816848
γ	4,5	200,2026222
	7	205,7575506
	8,98	203,5806192
	9,99	206,9586162
	11,51	199,3768896
	12,11	200,2026222
	12,49	210,561813
	13	229,1032632

Référence	pH	Solubilité du polymorphe γ (g/L)
Han 2012	3,2	347,3
Molécule	3,4	287,9
glycine	4,2	239
Solvant	6,3	226
H2O	8,4	233,8
Température	9,1	264,7
23 °C	9,6	302,2
Polymorphe		
γ		

Annexe B2 : Valeurs de solubilité des polymorphes A et B du L (+) histidine dans H₂O à différentes températures.

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Kitamura ^A 1993	15	32,5	15	35
Molécule	25	41	25	43,2
glycine	35	50,5	35	54
Solvant				
H ₂ O				
Polymorphe				
A				
B				

Annexe B3 : Valeurs de solubilité des polymorphes A et B du L (+) acide glutamique ainsi que du D (-) et DL acide glutamique dans H₂O à différentes températures.

Annexe B3 - 1 : Solubilité du L (+) acide glutamique dans H₂O en fonction de la température.

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Kitamura ^A 1989	14,5985	10,09173	14,5985	7,33944
Molécule	25,10942	13,76145	25,10942	10,09173
L (+) acide glutamique	35,0364	20,642175	35,0364	15,59631
Solvant	44,96338	28,44033	44,96338	22,93575
H2O			54,89036	32,11005
Polymorphe			66,56916	47,70636
A				
B				

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Scholl 2006	20	9,346590375	20	6,76136325
Molécule	25	11,136363	25	8,35227225
L (+) acide glutamique	30	13,12499925	30	9,94318125
Solvant	40	18,2954535	40	14,318181
H2O	45	21,87499875	45	17,10227175
Polymorphe	50	26,64772575	50	20,28408975
A			60	28,23863475
B				

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Sakata 1961	23,0625	10,3409085	23,0625	7,55681775
Molécule	30	13,92045375	30	10,3409085
L (+) acide glutamique	35	16,30681725	35	12,32954475
Solvant	40	19,090908	40	15,1136355
H2O	50	27,8409075	50	21,87499875
Polymorphe				
A				
B				

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Mo 2011a	20	9,36	20	7,02
Molécule	25	10,14	25	8,58
L (+) acide glutamique	30	14,04	30	10,14
Solvant	35	16	35	12,48
H2O	40	19,11	40	14,82
Polymorphe	45	21,84	45	16,77
A	50	27,7	50	19,9
B	55	32	55	23,4
			60	27,69

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Mo 2011b	19,85	9,78395818	19,85	6,99087496
Molécule	24,85	11,33567108	24,85	8,4935864
L (+) acide glutamique	29,85	15,03528131	29,85	9,98813093
Solvant	34,85	17,06067499	34,85	12,38103556
H2O	39,85	19,36374361	39,85	14,96994603
Polymorphe	44,85	23,97804776	44,85	16,96267207
A	49,85	26,83646626	49,85	19,95176113
B			54,85	23,74937428

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe B (g/L)
Manzurola 2002	5,5	3,5311032
Molécule	8	3,84007473
L (+) acide glutamique	10	4,45801779
Solvant	13	5,06124792
H2O	15	5,78218149
Polymorphe	18	6,13529181
B	20	7,07691933
	22,9	7,60658481
	25	8,57763819
	27,8	9,23972004
	30	10,26962514
	32,7	10,96113285
	35	12,57955515
	37,8	13,60946025
	40,8	14,80120758
	42,5	16,36077816
	45	18,17046855
	47,5	20,39212098
	50	21,73099761
	52,2	23,36413284
	55	24,8648517
	57	27,29248515
	59	30,0143772
	62	34,07514588
	64,5	36,23794659
	66,9	38,29775679
	69	42,38795133

Référence	T (°C)	Solubilité du polymorphe A (g/L)
Srinivasan ^A 2011	9,59994	5,6565635
Molécule	12,26659	6,464644
L (+) acide glutamique	14,39991	6,464644
Solvant	16,799895	7,2727245
H2O	19,19988	8,080805
Polymorphe	21,86653	8,8888855
A	24,53318	8,8888855
	27,19983	8,8888855
	29,86648	8,8888855
	31,9998	10,5050465
	34,66645	12,1212075
	36,79977	11,313127
	39,46642	12,929288
	42,13307	18,5858515
	44,79972	17,777771
	47,46637	20,2020125
	49,59969	24,242415
	52,26634	24,242415
	54,39966	26,6666565
	57,06631	26,6666565
	59,19963	31,5151395
	61,86628	33,939381
	64,53293	33,939381
	66,66625	44,4444275
	69,86623	46,868669
	71,99955	50,100991
	74,13287	58,9898765
	76,79952	64,64644
	79,46617	79,191889

Annexe B3 - 2 : Solubilité du D L acide glutamique dans H₂O en fonction de la température.

Référence	T (°C)	Solubilité (g/L)
Dalton 1933	0	8,55
Molécule	5	10,18
D L acide glutamique	10	12,13
Solvant	15	14,46
H ₂ O	20	17,22
Polymorphe	25	20,54
N/A	30	24,47
	35	29,16
	40	34,75
	45	41,41
	50	49,34
	55	58,8
	60	70,06
	65	83,5
	70	99,5
	75	118,6
	100	284,9

Référence	T (°C)	Solubilité (g/L)
Dunn 1933	0	8,309
Molécule	25	26,43
D L acide glutamique	50	81,65
Solvant		
H ₂ O		
Polymorphe		
N/A		

Annexe B3 - 3 : Solubilité du D (-) acide glutamique dans H₂O en fonction de la température

Référence	T (°C)	Solubilité (g/L)
Dalton 1933	0	3,41
Molécule	5	4,11
D (-) acide glutamique	10	4,95
Solvant	15	5,96
H ₂ O	20	7,17
Polymorphe	25	8,64
N/A	30	10,4
	35	12,52
	40	15,08
	45	18,16
	50	21,86
	55	26,82
	60	31,69
	65	38,16
	70	45,94
	75	55,32
	100	140

Référence	T (°C)	Solubilité (g/L)
Dunn 1933	0	3,451
Molécule	25	8,878
D (-) acide glutamique	50	22,28
Solvant		
H ₂ O		
Polymorphe		
N/A		

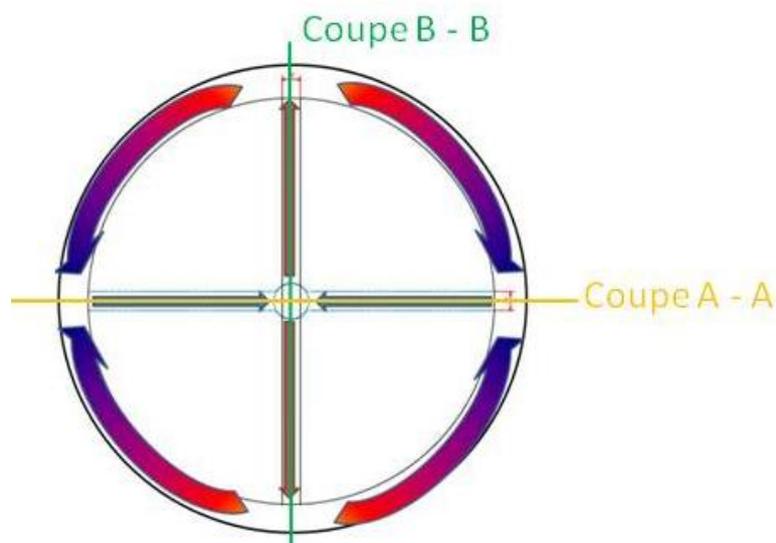
Annexe C : Développement du nouveau montage

Annexe C1 : gestion du fluide caloporteur

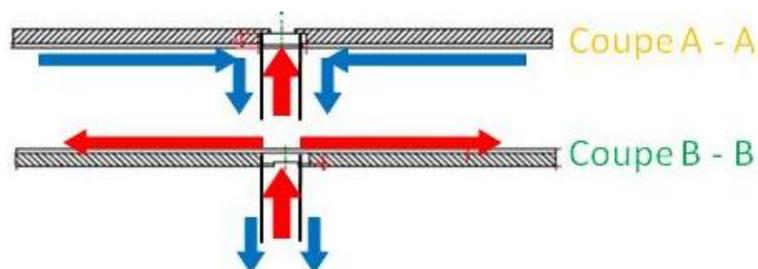
Annexe C1-1 : Photographie de l'intérieur de carrousel. La photographie montre le dessin du carrousel et les logements pour les tubes HPLC.



Annexe C1-2 : Schéma de principe de la gestion du fluide caloporteur dans le carrousel.



Annexe C1-3 : Schéma montrant la circulation d'eau dans les coupes A-A et B-B



Annexe C2

Secteur de l'expérience		Paramètres	État de contrôle	Nom de la partie	Intégrable avec LABVIEW
Informations générales		Date	Synchronisation ordinateur	-	-
		L'heure	Synchronisation ordinateur	-	-
		L'opérateur	Données utilisateur	-	-
		L'objectif	Données utilisateur	-	-
		Nombre d'échantillons	Données utilisateur	-	-
Spécifique aux échantillons	Solution	Molécule	Données utilisateur	Échantillon	Non
		Solvant	Données utilisateur	Échantillon	Non
		Sursaturation	Données utilisateur	Échantillon	Non
		PH	Données utilisateur	Échantillon	Non
	Tube	Type de tube	Données utilisateur	Échantillon	Non
Spécifique à l'exposition	Faisceau laser	Longueur d'onde	Données utilisateur	laser	Non
		Intensité du laser	Acquisition	Wattmètre	Oui
		Polarisation	Données utilisateur	Polarisateur	Non
		Rayon du faisceau	Données utilisateur	Condenseur	Non
	Shutter	Temps d'ouverture	Données utilisateur	Shutter	Oui
		Temps de fermeture	Données utilisateur	Shutter	Oui
		Positionnement du carrousel	Fixé constructeur	Moteur	Oui
		La vitesse de la rotation	Fixé constructeur	Moteur	Oui
Spécifique au contrôle température		Température	Acquisition	Circulateur thermostat, thermocouples	Oui
Spécifique au contrôle de la caméra		Positionnement du microscope	Fixé	Microscope Caméra	Non
		Positionnement de la platine du microscope	Fixé	Microscope	Non
		Temps maximum de mesure	Données utilisateur	Microscope Caméra	Oui
		Temps pour un échantillon	Données utilisateur	Microscope Caméra	Oui
		Nombre de photos pour une observation d'un échantillon	Données utilisateur	Microscope Caméra	Oui
		Agrandissement du microscope	Données utilisateur	Microscope	Oui
Spécifique à l'ordinateur		Fichier pour l'enregistrement des données	Données utilisateur	Ordinateur	Oui
		Fichier pour l'enregistrement des variables de la	Données utilisateur	Ordinateur	Oui

	manipulation			
	Fichier pour l'enregistrement des images	Données utilisateur	Ordinateur	Oui
	Laps de temps pour l'enregistrement des variables	Fixé	Ordinateur	Oui
	Séquences de la manipulation	Données utilisateur	Ordinateur	oui

Annexe C3 : Liste des spécifications établies sur la base du cahier des charges transmis à la société Arcale pour la programmation LABVIEW.

Aspects matériels

Installation matérielle

➤ **Pilotage du moteur**

SPE_2180_MAT_1

L'application devra pouvoir commander et acquérir les commandes et les données de lecture des codeurs provenant de la ressource matérielle / logicielle suivante :

- Le contrôleur de moteur de précision Newport SMC100CC (par liaison USB).

➤ **Pilotage du circulateur thermostaté**

SPE_2180_MAT_2

L'application devra pouvoir déterminer la température du bain thermostaté. L'application devra également pouvoir accéder à l'ensemble des paramètres du bain thermostaté.

Le cryothermostat sera piloté par USB.

➤ **Pilotage du « shutter »**

SPE_2180_MAT_3

L'application devra permettre le contrôle du « shutter » (ouverture, fermeture, ainsi que tous les paramètres). Le shutter sera piloté par USB via un convertisseur RS232.

➤ **Acquisition de la caméra**

SPE_2180_MAT_4

Le logiciel devra permettre d'acquérir les observations microscopiques via la caméra. La camera sera pilotée par Firewire.

➤ **Acquisition des températures**

SPE_2180_MAT_5

Le logiciel devra permettre d'acquérir la température de 3 thermocouples. L'acquisition des thermocouples se fera par un châssis USB Compact DAQ 9171 équipée d'une carte NI9211.

➤ **Acquisition de la puissance du Laser**

SPE_2180_MAT_6

Une acquisition de la puissance du rayon du Laser devra être mesurée grâce à un puissance-mètre (liaison USB).

➤ **Stockage périphérique**

SPE_2180_MAT_7

L'utilisation d'un périphérique de stockage externe au PC sera privilégiée. La solution d'un NAS (serveur de stockage en réseau) 2 baies sera implémenté, c'est-à-dire un serveur disposant de deux disques durs.

➤ **Architecture réseau**

SPE_2180_MAT_8

Au vu du nombre important d'appareils connectés en USB ou Ethernet, il sera nécessaire de prévoir un appareil de type HUB USB alimenté. Dans la mesure du possible, une préférence est émise pour le HUB USB alimenté ou carte PCI (express) - USB pour une simplification au niveau de l'adressage. Le choix peut dépendre de la configuration des ports USB du PC.

➤ **Affichage disponible**

SPE_2180_MAT_9

Le PC disposera de deux écrans permettant un affichage plus lisible de L'IHM.

- 1 écran permettant l'observation.
- 1 écran permettant le contrôle de l'expérience.

Aspects logiciels

Généralités

➤ **Systèmes d'exploitation supportés**

SPE_2180_LOGI_10

Le logiciel sera supporté par les systèmes d'exploitation Windows 7.

➤ **Environnement de développement**

SPE_2180_LOGI_11

Le logiciel sera développé en utilisant NI LABVIEW 2011 comme environnement de développement. En complément, pour l'acquisition des images provenant de la caméra, le Toolkit NI-IMAQ sera utilisé.

➤ **Ergonomie**

SPE_2180_LOGI_12

La prise en main de l'application devra être simple et fondée sur le design proposé ultérieurement via la réalisation d'une maquette.

➤ **Unités**

SPE_2180_LOGI_13

Les valeurs affichées seront systématiquement accompagnées de leur unité.

➤ **Résolution d'affichage**

SPE_2180_LOGI_14

Par défaut, l'application sera développée avec une résolution 1440*990. L'écran

d'observation sera développé avec une résolution plus importante de 1600*900.

➤ **Langage**

SPE_2180_LOGI_15

Par défaut, l'application sera développée en anglais, le manuel utilisateur sera également

rédigé en anglais.

Fonctionnement général

➤ **Saisie des données utilisateurs**

SPE_2180_LOGI_16

Le programme devra proposer à l'utilisateur la saisie de tous les paramètres donnés par l'utilisateur. Les paramètres sont définis dans les tableaux suivant :

Les informations concernant le laser ou le microscope seront proposées, et pourront être complétées dans le futur. Le logiciel proposera donc également un moyen de compléter le matériel.

➤ **Contrôle des appareils**

SPE_2180_LOGI_17

Le logiciel devra permettre le contrôle de tous les matériels indiqués en vert.

➤ **Configuration de ressource matérielle**

SPE_2180_LOGI_18

Le logiciel devra permettre de communiquer avec le puissance-mètre (liaison USB), avec le contrôleur de « shutter » (liaison RS232), avec le contrôleur de précision pour moteur (liaison RS232), avec la caméra (liaison FireWire directe avec le PC). Les ressources matérielles sont pilotées en utilisant les drivers des différents matériels.

➤ **Pilotage de l'expérience**

SPE_2180_LOGI_19

L'utilisateur devra pouvoir paramétrer différentes séquences préprogrammées par le logiciel.

➤ **Stockage des données**

SPE_2180_LOGI_20

Le stockage des données mesurées devra être facilement exploitable.

➤ **Affichages des résultats**

SPE_2180_LOGI_21

L'interface permettra à l'utilisateur d'observer les résultats de l'expérience pendant ou après une expérience. L'utilisateur pourra analyser jusqu'à 4 images en même temps.

➤ **Etape Expérience**

SPE_2180_LOGI_22

Le déroulement de l'expérience est divisé en étapes comme indiqué dans le tableau suivant :

Aspect graphique

➤ **Architecture design**

SPE_2180_LOGI_23

L'IHM devra permettre l'observation des résultats. L'accès aux observations pourra être effectué, via une recherche type Windows.

Une maquette proposant le design sera livrée en complément du document de conception.

➤ **Gestion de fenêtre**

SPE_2180_LOGI_24

Une mise en forme de type Windows sera proposée afin de pouvoir réduire ou fermer l'application.

➤ **Observation**

SPE_2180_LOGI_25

Un écran d'observation sera disponible afin de pouvoir venir analyser une capture. L'accès se fera par chronogramme. L'observation pourra être réalisée en même temps qu'une expérience se déroule. Durant cette phase, chaque échantillon sera associé à un état (occupé, libre, témoin).

➤ **Chronogramme de visualisation**

SPE_2180_LOGI_26

Dans le but de rendre plus lisibles les informations, un chronogramme sera mis en place. Il permettra de visualiser le moment d'exposition au laser de l'échantillon, le moment de l'image et la dernière image connue. Cela permet à l'utilisateur de repérer l'échantillon dans le temps de l'expérience.

➤ **Optimisation de l'affichage**

SPE_2180_LOGI_27

La configuration matérielle (2 écrans) permettra une optimisation de l'IHM. L'affichage des images (observation) sera traité sur le deuxième écran. Les paramètres de contrôle et autres indicateurs liés à l'expérience seront mis sur l'écran principal.

➤ **Affichage multiples observations**

SPE_2180_LOGI_28

Lors de l'étape de post traitement, il sera possible de voir les 4 images différentes réalisées, ainsi il est possible de les comparer facilement. La résolution d'affichage sera inférieure à la résolution de l'image sauvegardée.

Aspect logiciel

➤ **Initialisation du système**

SPE_2180_LOGI_29

Les paramètres liés aux appareils utilisés seront stockés dans un fichier XML et seront initialisés au démarrage de l'application.

➤ **Paramétrage des configurations systèmes**

SPE_2180_LOGI_30

Un menu permettra à l'utilisateur d'accéder aux fonctions des appareils afin de pouvoir modifier les paramètres qu'il souhaite changer. Ces paramètres pourront dans cette fenêtre de paramétrage être enregistrés dans le fichier XML afin de garder la dernière configuration au prochain démarrage de l'application.

➤ **Informations images**

SPE_2180_LOGI_31

Le système devra permettre d'associer à un temps donné toutes les informations des différents éléments. Si une image n'est pas associée à des informations, elle est considérée comme inexploitable.

Les informations associées sont les suivantes :

- Nom de l'image enregistré,
- Nom de la molécule,
- Solvant 1,
- Solvant 2,
- Solvant 3,
- pH,
- sursaturation réelle 1 (%),
- sursaturation réelle 2 (%),
- sursaturation réelle 3 (%),
- Exposition au Laser,
- Temps d'exposition laser demandé,
- Puissance laser (mJ),
- Longueur d'onde (nm),
- Polarisation Laser,
- Diamètre du laser (mm),
- Objectif du microscope utilisé,
- Température au moment de la capture de l'image,
- Commentaires si EP.

➤ **Option de pilotage de l'expérience**

SPE_2180_LOGI_32

L'expérience devra être pilotable de 3 façons différentes. On appelle séquence cette suite d'opération :

- Séquence Manuelle
 - Chaque élément doit être pilotable ou permettre l'acquisition de façon séparée. L'acquisition des images sera possible en effectuant des photos au coup par coup.
- Séquence Automatique

- Permet d'effectuer une collecte complète en suivant un ordre pré - défini
- Séquence Semi-automatique
 - Permet à l'utilisateur de choisir sa séquence (ordre, t_{exp} , t_{obs} , N_{photo}) pour chacun des tubes.

➤ **Optimisation mode automatique**

SPE_2180_LOGI_33

Lorsque le mode séquence automatique est sélectionné, la séquence automatique exposera puis observera un échantillon. La géométrie du carrousel permettant l'exposition et l'observation en parallèle la séquence prendra en compte ce point. Si un échantillon n'a pas d'observation nécessaire ni d'exposition, on passera aux échantillons suivants.

➤ **Maintenir l'optimisation**

SPE_2180_LOGI_34

Afin de maintenir le code malgré une modification de l'emplacement d'exposition et d'observation, le logiciel devra pouvoir prendre en compte que l'observation et l'exposition ne sont pas disposées face à face par rapport à l'axe du carrousel.

➤ **Vérification des paramètres contrôlés**

SPE_2180_LOGI_35

Le logiciel devra permettre la vérification entre les valeurs mesurées et les consignes données. La vérification se portera sur la puissance laser, la température ainsi que le contrôle du bain thermostaté.

➤ **Réalisation de la séquence**

SPE_2180_LOGI_36

Périodiquement des vérifications de positionnement, température, intensité du laser seront réalisées. Celles-ci permettront de vérifier le bon déroulement de la séquence. En cas de divergence de la mesure (intervalle à définir), chaque cas de divergence doit être traité au cas par cas. Les vérifications seront effectuées toutes les secondes.

➤ **Arrêt séquence**

SPE_2180_LOGI_37

A tout moment, il doit être possible d'arrêter la séquence en cours. Un raccourci clavier devra être prévu à cet effet. Un arrêt séquence aura le même effet que l'arrêt lié à une coupure de courant. Le dernier état connu réalisé sera mis en mémoire.

➤ **Sauvegarde des données lors d'une séquence**

SPE_2180_LOGI_38

Les données doivent être sauvegardées à chaque instant de façon à pouvoir être récupérées rapidement. Le stockage est effectué sur le NAS.

➤ **Reprise d'une séquence**

SPE_2180_LOGI_39

Après arrêt de la séquence, le logiciel doit être capable de reprendre là où il a été arrêté.

Le moment où il est considéré comme arrêté correspond au dernier état enregistré avant arrêt de la séquence. Si toutefois, un arrêt est effectué et que l'état n'est pas terminé donc non enregistré le processus en cours sera donc reproduit car considéré comme non réalisé.

➤ **Disque en Miroir**

SPE_2180_LOGI_40

Les disques du NAS seront des disques en miroir, cela correspond au RAID 1. Le RAID consiste à l'utilisation de 2 disques (dans notre cas) redondants, chaque disque contenant à tout moment exactement les mêmes données.

➤ **Arborescence des sauvegardes**

SPE_2180_LOGI_41

Une arborescence des fichiers de sauvegarde sera mise en place afin de sauvegarder de façon méthodique les images prises par la caméra. L'arborescence respectera l'arborescence proposée par ECP :

La racine où l'arborescence sera mise en place par défaut sera dans le NAS, l'utilisateur pourra toutefois changer le « directory ». L'utilisateur devra donc veiller à l'espace disponible au préalable.

Dossier de travail :

- Code manip
 - Data_experiences
 - Data_carrousel_in
 - Data_carrousel_out

- Suivi température de l'expérience.
 - Data_echantillon
 - Code_complet
 - Images
 - Code_complet-img_1.001.jpeg
 - Code_complet-img_1.001.txt
 - Code_complet-img_1.002.jpeg
 - Code_complet-img_1.002.txt
 - ...
 - Suivi wattmètre (pas de suivi température redondant avec le suivi manipulation)

➤ **Recherche discriminante**

SPE_2180_LOGI_42

Lors de la recherche des images à afficher, le logiciel devra proposer une recherche discriminante suivant les écrans.

Pour les images de la partie dynamique, une recherche orientera les images d'un même tube par rapport au temps. Dans l'autre partie, l'utilisateur pourra afficher l'image qu'il souhaite ; aucune recherche discriminante ne sera implémentée.

➤ **Sauvegarde et post-traitement des images**

SPE_2180_LOGI_43

La sauvegarde des images devra être faite sur un support physique, il faut également envisager la façon de pouvoir consulter les images alors que des mesures sont en cours, quelle que soit l'étape concernée. L'image sera sauvegardée dans la résolution la plus importante.

➤ **Observation des images pendant l'expérience**

SPE_2180_LOGI_44

L'observation des images post traitement se fera sous la forme suivante. Chaque image disposera de toutes les informations liées.

Ci-dessus un exemple d'IHM montrant le principe de chronogramme avec les informations propres à l'échantillon.

➤ **Acquisition des images**

SPE_2180_LOGI_45

L'acquisition des images se fera selon des caractéristiques précisées lors de réglages et tests de faisabilité (type d'images, résolution, fréquence d'échantillonnage...)

➤ **Acquisition de la puissance du Laser**

SPE_2180_LOGI_46

L'acquisition de la puissance sera réalisée avec une période de 500ms.

➤ **Informations des images**

SPE_2180_LOGI_47

Les informations liées à l'image (fichier TXT) seront les suivantes :

- Nom de l'image enregistrée,
- Nom de la molécule,
- Solvant 1,
- Solvant 2,
- Solvant 3,
- pH,
- sursaturation réelle 1 (%),
- sursaturation réelle 2 (%),
- sursaturation réelle 3 (%),
- Exposition au Laser,
- Temps d'exposition laser demandé,
- Puissance laser (mJ),
- Longueur d'onde (nm),
- Polarisation Laser,
- Diamètre du laser (mm),
- Objectif du microscope utilisé,
- Température au moment de la capture de l'image,
- Commentaires si EP.

➤ **Lecture du fichier de configuration carousel**

SPE_2180_LOGI_48

Un fichier de type CSV correspondant au document mis en annexe, permettra à l'utilisateur d'importer les informations. Le formalisme de fichier est figé ; l'utilisateur se devra donc de le respecter.

➤ **Génération d'un rapport**

SPE_2180_LOGI_49

Un rapport reprenant les informations précédemment listées sera implémenté dans un fichier de type CSV. Le format correspondra au fichier entrée/sortie présenté en annexe.

➤ **Séquence manuel : mode film**

SPE_2180_LOGI_50

La programmation d'un mode film sera possible. Cela correspondra à une capture d'une image à une fréquence d'acquisition à définir. En Mode film un warning sera activé afin

d'alerter l'opérateur que le logiciel réalise ce mode. Une réserve est émise sur ce point, des tests doivent être effectués sur le matériel afin de confirmer la fréquence d'acquisition en mode film (l'objectif est une fréquence de 1Hz).

➤ **Rampe de température**

SPE_2180_LOGI_51

En mode semi-automatique et manuel le logiciel peut être amené à effectuer une rampe de température programmée. Un Grafset correspondant au fonctionnement lors d'une séquence est mis en annexe.

Annexe C4 : Faces avant du logiciel LABVIEW

Seules les faces avant sont montrées dans cette annexe. La programmation en elle-même est trop lourde pour être mise en annexe.

Annexe C4 - 1

Zone de saisie des paramètres de l'expérience concernant les différents périphériques. Il s'agit de régler la température du bain thermostaté, de la puissance de sa pompe, la durée de l'ouverture du shutter ...

Annexe C4 - 2

Interface utilisateur de la programmation de la manipulation. Cet onglet permet de définir le dossier de travail, le code de la manipulation et de vérifier une dernière fois la construction du fichier Excel (voir annexe A6 SPE_2180_LOGI_52).

Annexe C4 - 3

Interface utilisateur du fonctionnement manuel. Ce mode permet d'observer et d'exposer à la demande un tube. L'opérateur choisit son ordre d'exposition et peut filmer autant de temps qu'il le souhaite. La partie droite du cadran donne les données en temps réel de la température du carrousel ainsi que l'énergie moyenne du faisceau. Le cadran à gauche permet la gestion de l'expérience en choisissant le tube à exposer, la possibilité de prendre des photos ou de faire un film. Il est possible de faire un programme de gestion de température.

Annexe C4 - 4

Interface utilisateur du fonctionnement semi automatique. Ce mode permet de modifier la séquence programmée dans le fichier Excel en changeant le statut vis à vis de l'exposition, de l'observation ou la durée de celles-ci. Une fois ces changements apportés, le logiciel effectue la séquence comme le ferait le mode automatique. Une variante permet dans ce mode de faire des rampes de température et de gérer le stockage des échantillons.

Annexe C4 - 5

Interface utilisateur du mode automatique. Par définition, ce mode est entièrement géré par le logiciel laissant seulement des informations comme la température et l'intensité du laser.

Annexe C4 - 6

Ecran de suivi de la nucléation. Il a été préféré quatre écrans plutôt qu'un seul. Les écrans à gauche permettent un suivi en temps réel avec un léger décalage pour l'image affichée en bas à gauche de l'ordre d'une image par seconde. Les écrans à droite permettent d'afficher des images déjà enregistrées pour une comparaison avec les prises en cours.

Annexe C4 - 1

Experiment NPLIN

Temperature (°C) Actual Beam measurement (mJ)
 Actual exposed tube Laser Emission
 Actual observed tube

Device configuration | Experiment data | Sequence | Manual mode | Run sequence

Shutter | Laser Beam Measurement | Motor controller | Cryothermostat | Thermocouple | Camera | Laser | Lens

Gentec Laser Beam Measurement

Beam measurement advanced configuration

COM port:

Lambda selected (nm):

Auto Range:

Current Range:

Correction Parameters:

Coef:

Offset:

Parameters validation

MENU

Annexe C4 - 2

Experiment NPLIN

Temperature (°C) Actual Beam measurement (mJ)
 Actual exposed tube Laser Emission
 Actual observed tube

Device configuration | Experiment data | Sequence | Manual mode | Run sequence

General informations

Working Folder:

Manipulation code:

Number of sample:

Sample Position	Sample Code	Name of molecule	Solvent 1	Solvent 2	Solvent 3	pH	Weight mg	Vol. 1 (µL)	Vol. 2 (µL)	Vol. 3 (µL)	Real 0.5 % à 20°C	Real 0.52 % à 20°C	Real 0.53 % à 20°C	Beam Exposition	Beam exp. times (sec)	Microscope Monitoring	Microscope time	Number of picture
28			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
29			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
30			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
31			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
71			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
72			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
73			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400
74			Eau			6.00	0.000	1000	0	0	145	0	0.0	<input checked="" type="checkbox"/>	0	2	0	400

Validate data

MENU

Annexe C4 - 3

Experiment NPLIN

Temperature (°C) Actual Beam measurement (mJ)
 Actual exposed tube Laser Emission
 Actual observed tube

Device configuration
Experiment data
Sequence
Manual mode
Run sequence

Carrousel command

Carrousel position under observation: Carrousel position under exposition:

⚠ don't set sample which isn't present in carrousel

Picture

Save Actual Image movie mode Movie State

Temperature command

Temperature Action: Fixed temperature

Fixed temperature T0 (°C):

Temperature ramp

Temperature (°C)	Time (min)	Tolerance (°C)	Pump Level
16	0	2	3
16	0	2	3
16	0	2	3

Shutter parameter

Open time (s):

Laser Measure

⚠ Each Measure are associated with sample

Acquisition Temperature graph

Thermocouple

Input Thermocouple (°C): Output Thermocouple (°C):

Beam measurement

Beam measurement (mJ):

● Fill place with tube non exposed

● Empty place

● Fill place to be exposed and/or observed

State Carrousel

Position tube	State
80	●
81	●
82	●
83	●
84	●
85	●
86	●
87	●
88	●
89	●
90	●

Annexe C4 - 4

Experiment NPLIN

Temperature (°C) Actual Beam measurement (mJ)
 Actual exposed tube Laser Emission
 Actual observed tube

Device configuration
Experiment data
Sequence
Manual mode
Run sequence

Type of sequence or mode

Semi-automatic

Automatic Semi-Automatic

 ⚠ don't set sample which isn't present in carrousel

Order	Sample	Exposition	Exposition time (s)	Monitoring	Monitoring time(s)	Number of picture
0	32	✓	60	2	120	60
1	33	✓	60	2	120	60
2	35	✓	60	2	120	60
3	36	✓	60	2	120	60
4	76	✓	60	2	120	60
5	77	✓	60	2	120	60
6	78	✓	60	2	120	60
7	79	✓	60	2	120	60
8	80	✓	60	2	120	60

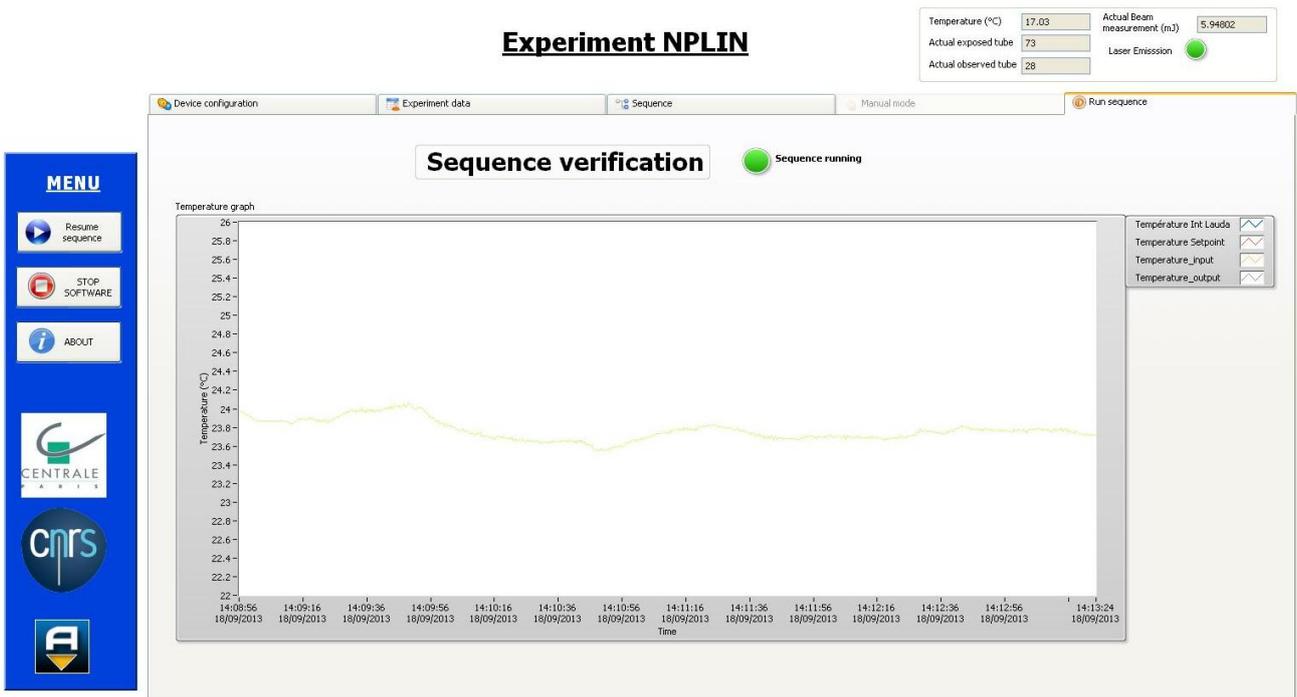
Temperature Action

Fixed temperature Actual Setpoint:

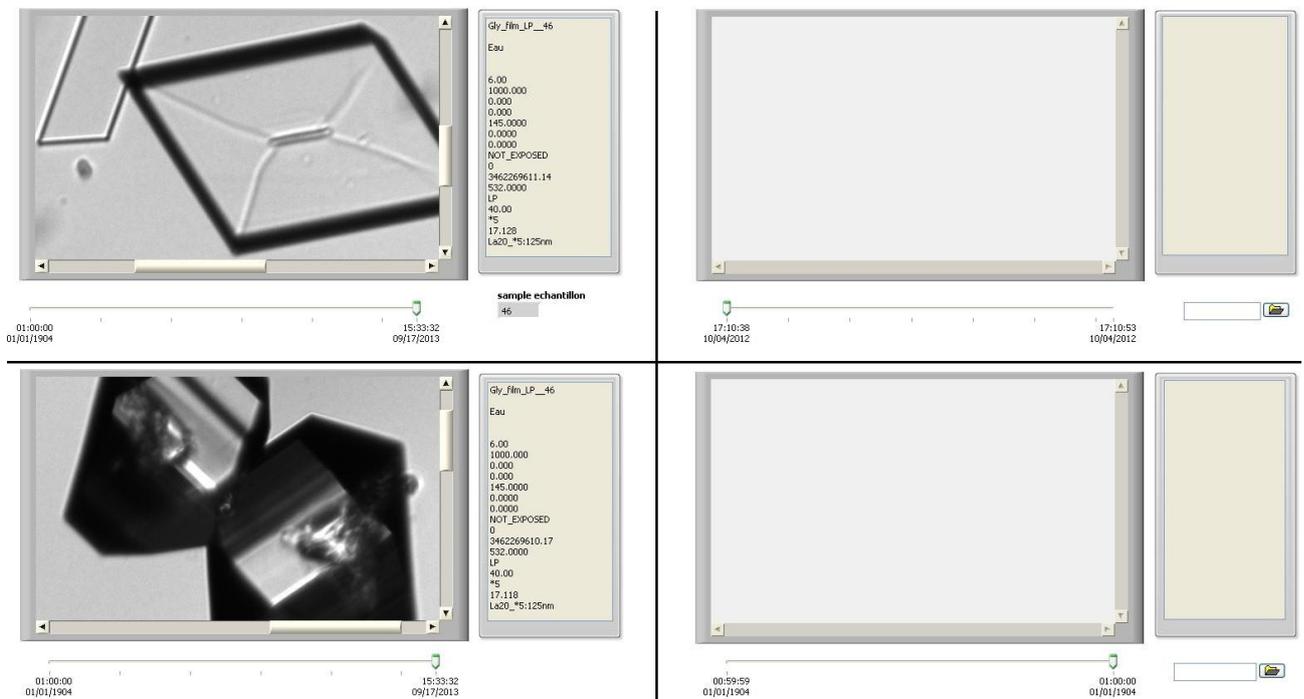
Fixed temperature Temperature ramp

Fixed temperature T0 (°C):

Annexe C4 – 5



Annexe C4 – 6



Annexe D : Mesures expérimentales de la solubilité de la glycine

Annexe D1 : Valeurs de la solubilité du polymorphe α de la glycine dans H₂O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au CINaM.

Molécule	T H ₂ O (°C)	S+ H ₂ O (g/L)	S- H ₂ O (g/L)	S H ₂ O moy (g/L)
glycine	11	166,9	163,7	165,3
Solvant	20	206,7	203,8	205,25
H ₂ O	27	242,3	240	241,15
Polymorphe	30	254,7	253,5	254,1
α	38,5	304,1	300,3	302,2

Annexe D2 : Valeurs de la solubilité du polymorphe α de la glycine dans D₂O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au CINaM.

Molécule	T D ₂ O (°C)	S+ D ₂ O (g/L)	S- D ₂ O (g/L)	S D ₂ O moy (g/L)
glycine	14,6	174,6	172,9	173,75
Solvant	21,5	209,7	208,7	209,2
D ₂ O	24,8	221,1	218,5	219,8
Polymorphe	30	246,8	244,3	245,55
α	40	299,7	299	299,35

Annexe E : Mesures expérimentales de la solubilité du L – (+) – Histidine

Annexe E1 : Valeurs de la solubilité du polymorphe B du L - (+) - Histidine dans H₂O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au CINaM.

Molécule	T H ₂ O (°C)	S H ₂ O (g/L)
glycine	10	31,5
Solvant	20	38,77
H ₂ O	25	42,95
Polymorphe	30	47,28
B	45	63,5

Annexe E2 : Valeurs de la solubilité du polymorphe B du L - (+) - Histidine dans D₂O et à différentes températures mesurée par la méthode des ajouts successifs au CINaM.

Molécule	T D ₂ O (°C)	S D ₂ O (g/L)
glycine	14,3	29,2
Solvant	24,8	36,75
D ₂ O	34	45,2
Polymorphe		
B		

Annexe F : Etude l'état initial de la solution

L'intérêt de déterminer l'état initial de la solution est apparu suite à l'hypothèse d'une mauvaise dissolution du polymorphe initial. En effet, si cela était confirmé, des agrégats ordonnés d'une taille de quelques dizaines de nanomètre de la symétrie du polymorphe γ ou du polymorphe α existeraient dans la solution. Au vu de nos résultats, la présence d'agrégat du polymorphe α n'aurait pas d'incidence car c'est le polymorphe principalement formé mais il en est autrement pour le polymorphe γ . Cela aurait pour effet d'accroître le taux de formation du polymorphe γ .

Dès lors, une série d'expérience a été envisagée afin de connaître déjà s'il existe des agrégats dans des solutions de glycine. Une représentation schématique de telles mesures est donnée dans la figure F1.

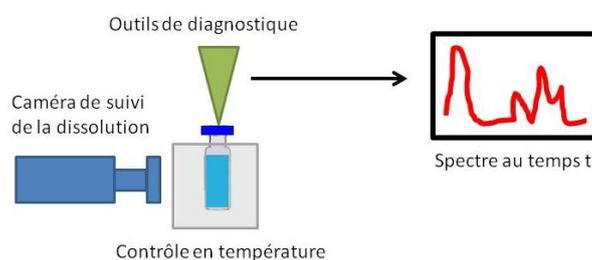


Figure F1 : Représentation schématique d'une mesure expérimentale afin de déterminer l'état initial de la solution.

La première méthode envisagée est la DLS (*Dynamic Light Scattering*) qui permet une mesure *in situ* non destructive. Le seul handicap posé par cette méthode est la rupture du contrôle en température. La DLS a été essayée avec un appareil en cours de développement, le VASCO Flex, dans la société Cordouan située en Gironde (figure F2).

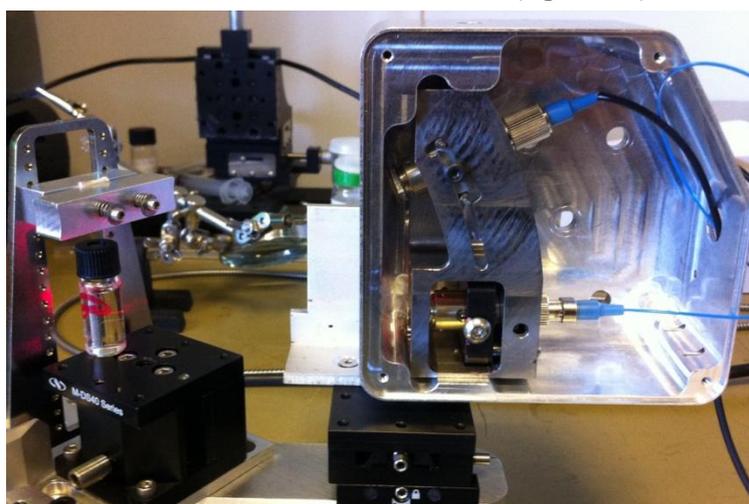


Figure F2 : Image du dispositif VASCO Flex en cours de développement par la société Cordouan.

Les mesures ont été conduites sur 4 échantillons de solution de glycine (sursaturation allant de 100 % à 130 %, nommés G100 à G130). Les mesures ont été effectuées directement dans les flacons d'origine à température ambiante comprise entre 23 et 25°C (figure F2). Dans le

cas du G100 nous avons effectués des mesures avec le flacon fermé sur une durée de 8 heures (240 acquisitions) afin de voir si on observait un début de cristallisation.

Il faut surtout regarder ces mesures d'un point de vue qualitatif car excepté pour l'échantillon G100, les corrélogrammes mesurés sont difficilement exploitables pour avoir une analyse de taille précise. Néanmoins, les résultats de l'analyse et l'observation visuelle des corrélogrammes permettent d'en déduire quelques informations qualitatives.

La mesure de la solution G100 met en évidence majoritairement des objets situés autour de 300 - 350 nm avec une polydispersité importante. L'analyse donne des résultats très cohérents typique d'une solution monomodale. La DLS n'a pas mis en évidence d'objets gros (*i.e.* > 1 μm) mais on a observé cependant à l'œil nu la présence de ce qui semble être un début de cristallisation déposé sur le fond du flacon. Par ailleurs sur la durée des 8 h de mesure, on n'observe pas de dérive notable et significative de la taille qui indiquerait un début de germination ou d'agrégation des objets de 300 nm.

La mesure de la solution G110 présente une décroissance monotone et relativement régulière et lente sans jamais relaxé sur l'échelle de temps observée. Ceci est la signature de la présence de gros objets (*i.e.* > 5 μm); l'analyse situe ces objets autour 7 - 10 μm . Il faut néanmoins considérer ces chiffres comme indicatifs car le corrélogramme est difficilement exploitable par les algorithmes d'inversion.

La mesure de la solution G120 montre une double dynamique sur le corrélogramme avec une décroissance relativement rapide sur le début et une deuxième composante beaucoup plus lente. L'analyse associe la décroissance rapide à des objets de l'ordre de 400 nm de diamètre alors que la décroissance lente est associée à des objets beaucoup plus gros de l'ordre de 10 - 20 μm . Là encore ces résultats doivent être considérés qualitativement car les corrélogrammes restent difficiles à exploiter pour les algorithmes d'inversion.

La mesure de la solution G130 présente également une dynamique de relaxation à deux composantes. L'analyse de Padé n'a pas permis d'extraire la taille équivalente à la relaxation rapide (on peut la supposer autour de quelques centaines de nm par comparaison avec G120). La relaxation lente est associée à des objets autour 50 – 60 μm .

En conclusion, on touche ici aux limites de mesurabilité de taille par la technique DLS (limitations des modèles théoriques qui reposent sur l'hypothèse du mouvement Brownien), mais on voit qu'il est néanmoins possible de mettre en évidence qualitativement la présence de gros objets et d'objets (< 1 μm).

La DLS ne permet pas de déterminer l'ordre du l'agrégat ce que permettrait faire la RMN en évaluant l'environnement chimique du carbone. La RMN a été essayée à l'ICMO à Orsay sans apporter des résultats suite à des ennuis techniques successifs. Néanmoins, l'emploi de cette méthode ne doit pas être rejeté car elle offre la possibilité d'effectuer des mesures *in situ* avec un contrôle en température et donc d'étudier l'agrégation en fonction de l'évolution de la température.

Bibliographie

A

[Aber 2005] Janice E. Aber, Stephen Arnold, Bruce A. Garetz; Strong dc Electric Field Applied to Supersaturated Aqueous Glycine Solution Induces Nucleation of the γ Polymorph; Phys Rev Lett vol. 94, 145503 (2005).

[Adachi 2003] Hiroaki Adachi, Kazafumi Takano, Youichiroh Hosokawa, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Hiroyoshi Matsumura, Masashi Yoshimura, Yasuo Tsunaka, Masaaki Morikawa, Shigenori Kanaya, Hiroshi Masuhara, Yasushi Kai, Takatomo Sasaki; Laser Irradiated Growth of Protein Crystal; Japanese Journal of Applied Physics Vol. 42 (2003) pp. L798 - L800, Part 2, N° 7B, 15 July 2003.

[Ajimonoto 1963] Ajimonoto; Coinc. Aminoacids, British patent N° 908735, Chemical Abstract, 58, 468B 1963.

[Albrecht 1939] G. Albrecht, R. B. Corey; The Crystal Structure of Glycine; J. Am. Chem. Soc., 61, 1087-1103 (1939).

[Alexander 2009] Andrew J. Alexander, Philip J. Camp; Single pulse, single crystal laser-induced nucleation of potassium chloride; Crystal Growth and Design 2009, Vol. 9 N°2, 958 - 963.

[Allen 2002] K. Allen, R. J. Davey, E. Ferrari, C. Towler, G. J. Tiddy; The Crystallization of Glycine Polymorphs from Emulsions, Microemulsions, and Lamellar Phases; Crystal Growth & Design, 2, 6, 523-527 (2002).

[Asahi 2008] T. Asahi, T. Sugiyama, H. Masuhara; Laser Fabrication and Spectroscopy of Organic Nanoparticles; Accounts of Chemical Research, vol. 41, n°12, 1790-1798, 2008.

[Ashkin 1970] A. Ashkin; Acceleration and Trapping of particules by radiation pressure; Physical Review Letters, Vol n°24, 4, 1970.

[Astier 2008] Jean-Pierre Astier, Stéphane Veessler; Using Temperature To Crystallize Proteins: A Mini-Review; Crystal Growth and Desing, Vol. 8, N°12, 2008.

B

[Baran 2005] Jan Baran, Henryk Ratajczak; Polarised IR and Raman spectra of the γ –glycine single crystal; Spectrochimica Acta Part A, 61 (2005), 1611-1626.

[Brabec 2000] Thomas Brabec, Ferenc Krausz; Intense few-cycle laser fields: Frontiers of nonlinear optics; Review of Modern Physics, vol. 72, n°2, 2000.

[Bauer^A AF3640] Michel Bauer; Cristallisation et polymorphisme, description du phénomène; Techniques de l'ingénieur, AF 3640.

[Bauer^A AF3642] Michel Bauer; Cristallisation et polymorphisme, applications; Techniques de l'ingénieur, AF 3642.

[Bauer^B 2001] J. Bauer, S. Spanton, R. Henry, J. Quick, W. Dziki, W. Porter, J. Morris; Pharm. Res.; 2001, 18, 859.

[Bavière 2006] Tristan Bavière, Frédéric Laeuffer, Anne Spasojevic (dir.); Cristallisation et caractérisation de phases polymorphes de molécules pharmaceutiques par la méthode NPLIND; Ecole Centrale de Paris, Projet de deuxième année, 2006.

[Bellani 2007] Samuele Bellani, Elisabeth Bothschafter, Daniel Dregely, Salah Hadj-Messaoud, Pierre Becker (dir.), Anne Spasojevic (dir.); Vers la maîtrise structurale des matériaux moléculaires : aspects expérimentaux et théoriques; Ecole Centrale de Paris, Projet de deuxième année, 2007.

[Belloni 2014] Jacqueline Belloni, Anne Spasojevic-de Biré, Sébastien Sorgues, Mehran Mostafavi, Philippe Scoufflaire, Nour-Eddine Ghermani; Nucléation/Croissance des cristaux déclenchée par impulsion laser; Actualité chimique, juil.-août-sept.-oct. 2014 - n° 387-388-389, pp 77-84.

[Bernal 1931] J. D. Bernal; The Crystal Structure of the Neutral Amino Acids and Related Compounds; Z. Kristallographie, 78, 363-369 (1931).

[Bernstein 2002] J. Bernstein, Polymorphism in Molecular Crystals; Clarendon, Oxford, 2002.

[Boistelle 1985] R. Boistelle; Concepts de la cristallisation en solution; Actualités Néphrologiques, Flammarion, Médecine-Science Paris 1985, pp 159-202.

[Boldyreva 2003a] E. V. Boldyreva, H. Ahsbahs, H.-P. Weber; A comparative study of pressure-induced lattice strain of α - and γ -polymorphs of glycine; Volume 218, Issue 3/2003 (Sep 2009), Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials.

[Boldyreva 2003b] E. V. Boldyreva, T. N. Drebushchak, E. S. Shutova; Structural distortion of the α , β , and γ polymorphs of glycine on cooling; Zeitschrift für Kristallographie - Crystalline Materials, Volume 218, Issue 5/2003 (Sep 2009).

[Boldyreva 2003c] E. V. Boldyreva, V. A. Drebushchak, T. N. Drebushchak, I. E. Paukov, Y. A. Kovalevskaya, E. S. Shutova; Polymorphism of Glycine, Thermodynamic aspects, Part I. Relative stability of the polymorphs; Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, vol. 73 (2003) 409 – 418.

[Bonin-Paris 2011] Johanne Bonnin-Paris, Stéphane Bostyn, Jean Louis Havet, Henri Fauduet; Determination of the metastable zone width of glycine aqueous solutions for batch crystallizations; Chem. Eng. Comm.; 198:1004-1017, 2011.

[Bouchard 2007] Solubility of Glycine Polymorphs and Recrystallization of β -glycine; J. Chem. Eng. Data, 2007, 52, 1626 - 1629.

[Boyd 2008] R. W. Boyd; Nonlinear optics; 3rd ed. Academic press, 2008.

[Braga 2009] Dario Braga, Fabrizia Grepioni, Lucia Maini, Marco Polito; Crystal Polymorphism and Multiple Crystal Forms; Struct Bond (2009) 132: 25–50.

[Brautlecht 1923] C. A. Brautlecht, N. F. Eberman; J. Amer. Chem. Soc., 45 (1923) 1934.

[Budayova-Spano 2000] Monika Budayova-Spano, Sylvaine Lafont, Jean Pierre Astier, Christine Ebel, Stéphane Veessler; Comparison of solubility and interactions of aprotinin (BPTI) solutions in H₂O and D₂O, Journal of Crystal Growth, vol. 217 (2000) 311 - 319.

C

[Carta 1996] Renzo Carta, Giuseppe Tola; Solubilities of L-Cystine, L-Tyrosine, L-Leucine, and Glycine in Aqueous Solutions at Various pHs and NaCl Concentrations; J. Chem. Eng. Data, 1996, 41, 414 - 417.

[Carter 1994] Phillip W. Carter , Andrew C. Hillier , M. D. Ward; Nanoscale Surface Topography and Growth of Molecular Crystals: The Role of Anisotropic Intermolecular Bonding; J. Am. Chem. Soc., 1994, 116 (3), pp 944–953.

[Cashell 2004] Caitriona Cashell, David Corcoran, B. Kieran Hodnett; Effect of Amino Acid Additives on the Crystallization of L-Glutamic Acid; Crystal Growth & Design, Vol. 5, No. 2, 2005.

[Chattopadhyay 2005] Soma Chattopadhyay, Deniz Erdemir, James M. B. Evans, Jan Ilavsky, Heinz Amenitsch, Carlo U. Segre, Allan S. Myerson; SAXS Study of the Nucleation of Glycine Crystals from a Supersaturated Solution; Crystal Growth and Design, 2005, Vol. 5, N°2, 523 - 527.

[Chen 2010] J. Chen, B. L. Trout; J. Phys. Chem. B, 2010, vol. 114, 13764-13772.

[Chen 2011] Jie Chen, Bipul Sarma, James M. B. Evans, Allan S. Myerson; Pharmaceutical Crystallization; Cryst. Growth Des. 2011, 11, 887–895.

[Cheong 2010] D. W. Cheong, Y. D. Boon, Cryst. Growth Des., 2010, vol. 10, 4146-5158.

[Chew 2007] J. W. Chew, S. N. Black, P. S. Chow, R. B. H. Tan, K. J. Carpenter; Cryst. Eng. Comm., 2007, vol. 9, 128-130.

[Chiang 2013] Wei-Yi Chiang, Anwar Usman, Hiroshi Masuhara; Femtosecond Pulse-Width Dependent Trapping and Directional Ejection Dynamics of Dielectric Nanoparticles; J. Phys. Chem. C 2013, 117, 19182–19188.

[Chongprasert 2001] S. Chongprasert, S. A. Knopp, S. L. Nail ; Characterization of Frozen Solutions of Glycine; J. Pharmaceutical Sciences, 90, 11, 1720 – 1728 (2001).

[Chow 2008] Kwok Chow, Henry H. Y. Tong, Susan Lum, Albert H. L. Chow; Engineering of Pharmaceutical Materials : An Industrial Perspective; Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 97, n°8, august 2008.

[Clair 2014] Bertrand Clair, Aziza Ikni, Wenjing Li, Philippe Scouflaire, Vincent Quemener, Anne Spasojević-de Bire; A new experimental setup for high-throughput controlled non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN): application to glycine crystallization; J. Appl. Cryst. (2014). 47, doi:10.1107/S160057671401098X.

[Cölfen 2008] Denis Gebauer, Antje Völkel, Helmut Cölfen; Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters; Science, vol. 322, 19 December 2008.

[Corvis 2010] Yohann Corvis, Philippe Négrier, Mathieu Lazerges, Stéphane Massip, Jean-Michel Léger, Philippe Espeau; Lidocaine/L-Menthol Binary System: Cocrystallization versus Solid-State Immiscibility; J. Phys. Chem. B 2010, 114, 5420–5426.

[Corvis 2012] Yohann Corvis, Philippe Négrier, Stéphane Massip, Jean-Michel Léger, Philippe Espeau; Insights into the crystal structure, polymorphism and thermal behavior of menthol optical isomers and racemates; Cryst. Eng. Comm., 2012, 14, 7055–7064.

[Corvis 2013] Yohann Corvis; Etudes physico-chimiques de composés biologiques et pharmaceutiques auto-assemblés et de leurs interactions. Applications à la formulation de médicaments originaux à partir de co-cristaux, de dispersions solides ou de liquides eutectiques; Habilitation à Diriger des Recherches, 30 mai 2013.

D

[Daldrup 2011] Jan-Bernd Grosse Daldrup, Christoph Held, Gabriele Sadowski, Gerhard Schembecker; Modeling pH and Solubilities in Aqueous Multisolute Amino Acid Solutions; Ind. Eng. Chem. Res. 2011, 50, 3503–3509.

[Dalton 1933] John B. Dalton, Carl L. A. Schmidt; THE SOLUBILITIES OF CERTAIN AMINO ACIDS IN WATER, THE DENSITIES OF THEIR SOLUTIONS AT TWENTYFIVE DEGREES, AND THE CALCULATED HEATS OF SOLUTION AND PARTIAL MOLAL VOLUMES; J. Biol. Chem. 1933, 103:549-578.

[Dawson 2005] Alice Dawson, David R. Allan, Scott A. Belmonte, Stewart J. Clark, William I. F. David, Pamela A. McGregor, Simon Parsons, Colin R. Pulham, Lindsay Sawyer; Effect of High Pressure on the Crystal Structures of Polymorphs of Glycine; *Crystal Growth and Design*, 2005, Vol n°5, N°4, 1415-1427.

[Davey 1997] R. J. Davey, N. Blagden, G. D. Potts, R. Docherty; Polymorphism in Molecular crystals: Stabilization of a Metastable Form by Conformational Mimicry; *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, vol. 119, 1767-1772.

[Davey 2002] R. J. Davey, J. Garside ; From molecules to Crystallizers, Oxford University Press, 2002.

[Degand 2010] François Degand, Anthony Grisey, Hubert Leterme, Josselin Prevost, Thomas Rousseau, Philippe Scouflaire (dir.), Anne Spasojevic (dir.); Study of the Non Photochemical Light Induced Nucleation method on the Carbamazepine; Ecole Centrale de Paris, Projet de deuxième année, 2010.

[Destro 2000] R. Destro, P. Roversi, M. Barzaghi, R. E. Marsh; Experimental Charge Density of α -Glycine at 23 K; *J. Phys. Chem. A*, 104, 1047-1054 (2000).

[Dhanasekaran 2013] P. Dhanasekaran, K.Srinivasan; Nucleation control, separation and bulk growth of metastable α -L-glutamic acid single crystals in the presence of L-tyrosine; *Journal of Crystal Growth*, 364 (2013) 23–29.

[Dharmayat 2006] Spoorthi Dharmayat, Jorge Calderon De Anda, Robert B. Hammond, Xiaojun Lai, Kevin J. Roberts, Xue Z. Wang; Polymorphic transformation of L-glutamic acid monitored using combined on-line video microscopy and X-ray diffraction; *Journal of Crystal Growth* 294 (2006) 35-40.

[Di Profio 2013] Gianluca Di Profio, Mika T. Reijonen, Rocco Caliendo, Antonietta Guagliardi, Efrem Curcio, Enrico Drioli; Insights into the polymorphism of glycine : membrane crystallization in an electric field; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, vol.15, 9271-9280.

[Dong 2011] Yao-Da Dong, Ben J. Boyd; Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science; *International Journal of Pharmaceutics* 417 (2011) 101 – 111.

[Drebushchak 2002] V. A. Drebushchak, E. V. Boldyreva, T. N. Drebushchak, E. S. Shutova; Synthesis and Calorimetric Investigation of Unstable β -Glycine; *J. Crystal Growth*, 241, 266-268 (2002).

[Duffus 2009] Carla Duffus, Philip J. Camp, Andrew J. Alexander; Spatial control of crystal nucleation in agarose gel; *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 11676 - 11677

[Dunn 1933] Max S. Dunn, Frank J. Ross, Lee S. Read; The solubility of the amino acids in water; *The Journal of Biological Chemistry*, vol n°103, n°2

E

[Ehre 2011] David Ehre, Ke Fang, Janice E. Aber, Stephen Arnold, Michael D. Ward, Bruce A. Garetz; Polymorphism in Containerless Crystallization; *Crystal Growth and Design* (2011) 11, 4572–4580.

[El Bazi 2011] Wail El Bazi, *Cristallisation continue et semi-continue de la glycine : Etude de l'influence d'un anti-solvant*; Conservatoire National des Arts et Métier (ED 390), 2011.

[Erdemir 2007] Deniz Erdemir, Soma Chattopadhyay, Liang Guo, Jan Ilavsky, Heinz Amenitsch, Carlo U. Segre, Allan S. Myerson; Relationship between Self-Association of Glycine Molecules in Supersaturated Solutions and Solid State Outcome; *Physical Review Letters* 99 (2007) 115702.

[Erdemir 2009] Deniz Erdemir, Alfred Y. Lee, Allan S. Myerson; Nucleation of Crystals from Solution : Classical and Two-Step Models; *Accounts of Chemical Research*, vol. 42, n°5, 2009, 621-629.

F

[Fang 2014] Ke Fang, Stephen Arnold, Bruce A. Garetz; Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation in Levitated Supersaturated Aqueous Potassium Chloride Microdroplets; *Crystal Growth and Design*, vol. 14 (2014) 2685 - 2688.

[Ferrari 2003] Elena S. Ferrari, Roger J. Davey, Wendy I. Cross, Amy L. Gillon, Christopher S. Towler; Crystallization in Polymorphic Systems : The Solution-Mediated Transformation of β to α Glycine; *Crystal Growth & Design*, Vol. 3, No. 1, 2003.

[Ferrari 2004] Elena S. Ferrari, Roger J. Davey; Solution-Mediated Transformation of α to β L-Glutamic Acid: Rate Enhancement Due to Secondary Nucleation; *Crystal Growth and Design*, 2004, vol.4, n°5, 1061-1068.

[Fischer 1901] E. Fischer, E. Fourneau; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1901, 34, 2868.

[Friant - Michel 2010] P. Friant-Michel, M. F. Ruiz-Lopez; Glycine dimers : structure, stability and medium effects; *Chem. Phys. Chem.*, Vol.11 (2010) 3499-3504.

[Furuta 2008] Kenji Furuta, Hiroaki Horiuchi, Hiroshi Hiratsuka, Tetsuo Okutsu; Photochemically Induced Nucleation of Ribonuclease A Enhanced by a Stable Protein Dimer Produced from the Photochemical Reaction of Tyr Residual Groups; *Crystal Growth & Design*, Vol. 8, No. 6, 2008.

G

[Gao 2009] Y. Y. Gao, C. Xie, J. K. Wang; Effects of low magnetic field on batch crystallisation of glycine; *Materials Research Innovations*, 2009, vol. 13, n°2.

[Garetz 1996] B. A. Garetz, J. E. Aber, N. L. Goddard, R. G. Young, A. S. Myserson; Nonphotochemical, Polarization-Dependant, Laser-Induced Nucleation in Supersaturated Aqueous Urea Solutions; *Physical Review Letters* (1996), Vol. 77, n° 16.

[Garetz 2002] Bruce A. Garetz and Jelena Matic; Polarization Switching of Crystal Structure in the Nonphotochemical Light-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous Glycine Solutions; *Physical Review Letters* (2002), Vol. 89, n° 17.

[Garti 1997] Nissim Garti, Hadassa Zour; The effect of surfactants on the crystallization and polymorphic transformation of glutamic acid; *Journal of Crystal Growth* vol. 172 (1997) 486-498.

[Gebauer 2014] Denis Gebauer, Matthias Kellermeier, Julian D. Gale, Lennart Bergström, Helmut Cölfen; Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation; *Chem. Soc. Rev.*, 2014, DOI : 10.1039/c3cs60451a.

[Ginde 1992] Rajiv M. Ginde, Allan S. Myerson; Cluster size estimation in binary supersaturated solutions; *Journal of Crystal Growth* 116 (1992) 41 - 47.

[Gomez 1961] M. R. Gomez, J. E. Gotham, J. S. Meyer; *Pediatrics*, 1961, vol. 28 (6), 935-942.

[Goryainov 2006] S.V. Goryainov, E.V. Boldyreva, E.N. Kolesnik; Raman observation of a new (ζ) polymorph of glycine ?; *Chemical Physics Letters* 419 (2006) 496–500.

[Grant 1984] D. J. W. Grant, M. Mehdizadeh et al.; Non-linear van't Hoff solubility temperature plots and their pharmaceutical interpretation; *International Journal of Pharmaceutics* (1984) Vol. 18, 25-38.

[Guggenheim 1959] E. A. Guggenheim; *Thermodynamics. An advanced treatment for chemists and physicists*; Amsterdam, 1959.

H

[Haleblian 1969] J. Haleblian, W. McCrone; Pharmaceutical application of polymorphism; *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, p. 911-929 (1969).

[Hamad 2008] Said Hamad, Colan E Hughes, C Richard A Catlow, Kenneth D M Harris; Clustering of glycine molecules in aqueous solution studied by molecular dynamics simulation; The Journal of Physical Chemistry B, 07/2008, 112(24), 7280-7288.

[Hammadi 2009a] Zoubida Hammadi, Jean-Pierre Astier, Roger Morin, Stéphane Veesler; Spatial and Temporal Control of Nucleation by Localized DC Electric Field; Crystal Growth & Design, Vol. 9, No. 8, 2009.

[Hammadi 2009b] Zoubida Hammadi, Stéphane Veesler; New approaches on crystallization under electric fields; Progress in Biophysics and Molecular Biology 101 (2009) 38-44.

[Han 2007] Guangjun Han; NEW INSIGHTS INTO CRYSTALLIZATION : FROM THERMODYNAMICS TO POLYMORPHISM AND KINETICS; Université de Singapour, 2007.

[Han 2010] G. Han, K. S. Poornachary, P. S. Chow, R. B. H. Tan; Cryst. Growth Des., 2010, vol.10, 4883-4889.

[Han 2012] Guangjun Han, Pui Shan Chow, Reginald B. H. Tan; Direct Comparison of α - and γ -Glycine Growth Rates in Acidic and Basic Solutions : New Insights into Glycine Polymorphism; Crystal Growth and Design, 2012, 12, 2213 - 2220

[Heredia 2012] Alejandro Heredia, Vincent Meunier, Igor K. Bdikin, José Gracio, Nina Balke, Stephen Jesse, Alexander Tselev, Pratul K. Agarwal, Bobby G. Sumpter, Sergei V. Kalinin, Andrei L. Kholkin; Nanoscale Ferroelectricity in Crystalline γ -Glycine; Adv. Funct. Mater., 2012; DOI : 10.1002/adfm.201103011.

[Hirayama 1980] N. Hirayama, K. Shirakata, Y. Ohashi, Y. Sasada; Structure of α Form of Glutamic Acid. α - β Transition; Bull. Chem. Soc. Jpn., vol. 53 (1980) 30-35.

[Huang 2004] L. F. Huang, W. Q. Tong; Adv Drug Deliver Rev; 56. 321 - 334, 2004.

[Hollenbeck 1980] R. G. Hollenbeck; Determination of differential heat of solution in real solutions from variation in solubility with temperature. Journal of Pharmaceutical Science, 1980, Vol. 69, 1241-1242.

[Hosokawa 2005] Yoichiroh Hosokawa, Hiroaki Adachi, Masashi Yoshimura, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki, Hiroshi Masuhara; Femtosecond Laser-Induced Crystallization of 4-(Dimethylamino)-N-methyl-4-stilbazolium Tosylate; Crystal Growth and Design, 2005, Vol. 5, N°3, 861 - 863.

[Hotta 1996] Jun-ichi Hotta, Keiji Sasaki, Hiroshi Masuhara; A Single Droplet Formation from Swelled Micelles by Radiation Pressure of a Focused Infrared Laser Beam; J. Am. Chem. Soc., 1996, Vol. 118, 11968 - 11969.

[Hotta 1998] Jun-ichi Hotta, Keiji Sasaki, Hiroshi Masuhara, Yotaro Morishima; Laser-Controlled Assembling of Repulsive Unimolecular Micelles in Aqueous Solution; The Journal of Physical Chemistry B, volume 102, number 40, october 1, 1998.

[Huang 2008] Jun Huang, Thomas C. Stringfellow, Lian Yu; Glycine Exists Mainly as Monomers, Not Dimers, in Supersaturated Aqueous Solutions : Implications for Understanding Its Crystallization and Polymorphism; Journal of American Chemical Society, 2008, 130, 13973 - 13980.

[Hughes 2009] C. E. Hughes, K. D. M. Harris; New J. Chem., 2009, vol. 33, 713- 716.

I

[Iefuji 2011] Natsuko Iefuji, Ryota Murai, Mihoko Maruyama, Yoshinori Takahashi, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori, Yuichi Koga, Kazufumi Takano, Shigenori Kanaya; Laser-Induced nucleation in protein crystallization : Local increase in protein concentration induced by femtosecond laser irradiation; Journal of Crystal Growth 318 (2011) 741 - 744.

[Iitaka 1954] Y. Iitaka, Proc. Jpn. Acad., 1954, 30, 109.

[Iitaka 1958] Y. Iitaka; The Crystal Structure of γ -Glycine; Acta Cryst., 11, 225-226 (1958).

[Iitaka 1959] Y. Iitaka; Crystal Structure of β -Glycine; Nature, 183, 4658, 390-391 (1959).

[Iitaka 1961] Y. Iitaka; The Crystal Structure of γ -Glycine; Acta Cryst., 14, 1-10 (1961).

[Ikni 2014] Aziza Ikni, Bertrand Clair, Philippe Scoufflaire, Stéphane Veessler, Jean-Michel Gillet, Nouha El Hassan, Françoise Dumas, Anne Spasojevic-de Biré; Experimental Demonstration of the Carbamazepine Crystallization from Non-photochemical Laser-Induced Nucleation in Acetonitrile and Methanol; Cryst. Growth Des, dx.doi.org/10.1021/cg500163c.

[Isacson 2008] O. Isacson, J. H. Kordower; Ann. Neurol. 2008, vol. 64 (suppl.), S122-S138.

[Izmailov 1999] Izmailov, A., F., Myerson, A., S. & Arnold, S. (1999). J. Cryst. Growth, 196, 234 - 242.

J

[Jacob 2012] Jasmine A. Jacob, Sébastien Sorgues, Alexandre Dazzi, Mehran Mostafavi, Jacqueline Belloni; Homogeneous Nucleation-Growth Dynamics Induced by Single Laser Pulse in Supersaturated Solutions; Crystal Growth and Design 2012, 12, 5982 - 5985.

[Jawor-Baczynska 2012] Anna Jawor-Baczynska, Jan Sefcik, Barry D. Moore; 250 nm Glycine - Rich Nanodroplets Are Formed on Dissolution of Glycine Crystals But Are Too Small To Provide Productive Nucleation Sites. Crystal Growth and Design, 2013, Vol. n°13, 470-478

[Jelinska-Kazmierczuk 1996] M. Jelinska-Kazmierczuk, J. Szydlowski; Isotope effect on the Solubility of Amino Acids in Water; Journal of solution Chemistry, vol n°25, n°12, 1996.

[Jiang 2009] Shanfeng Jiang; Crystallization Kinetics in Polymorphic Organic Compounds; Master of Science in Biochemical Engineering, Technische Universiteit Delft, 2009.

K

[Kashchiev 2005] Dimo Kashchiev, Peter G. Vekilov, Anatoly B. Kolomeisky; Kinetics of two-step nucleation of crystals; The Journal of Chemical Physics, vol. 122, 244706 (2005).

[Kee 2011] N. C. S. Kee, P. D. Arendt, L. M. Goh, R. B. H. Tan, R. D. Braatz; Nucleation and growth kinetics estimation for L-phenylalanine hydrate and anhydrate crystallization; Cryst. Eng. Comm., 2011, 13, 1197.

[Kirk-Othmer 1991] Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, New York, 1991.

[Kitamura^A 1989] Mitsutaka Kitamura; POLYMORPHISM IN THE CRYSTALLIZATION OF L-GLUTAMIC ACID; Journal of Crystal Growth 96 (1989) 541-546.

[Kitamura^A 1993] Mitsutaka Kitamura; Crystallization Behavior and Transformation Kinetics of L-Histidine Polymorphs; Journal of Chemical Engineering of Japan, vol. 26, n°3, 1993.

[Kitamura^A 2002] Mitsutaka Kitamura; Controlling factor of polymorphism in crystallization process; Journal of Crystal Growth 237–239 (2002) 2205–2214.

[Kitamura^A 2003] Mitsutaka Kitamura; Control of Polymorphism in Crystallization of Amino Acid; Dev. Chem. Eng. Mineral Process; vol.11 (5/6), pp. 579-602, 2003.

[Kitamura^B 2003] Noboru Kitamura, Fumihiko Kitagawa; Optical trapping - chemical analysis of single microparticules of single particles in solution; Journal of Photochemistry and Photobiology C : Photochemistry Reviews, 4 (2003) 227-247.

[Kitano 2005] H. Kitano, S. Murakami, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi, T. Sasaki; J. Biosci. Bioeng, 2005, Vol. 100, 50-53.

[Knott 2011a] Brandon C. Knott, Jerry L. LaRue, Alec M. Wodtke, Michael F. Doherty, Baron Peters; Communication : Bubbles, Crystals, and laser-induced nucleation; The Journal of Chemical Physics 134, 171102 (2011).

[Knott 2011b] B. C. Knott, B. Peters, M. F. Doherty; A simulation test of the optical Kerr mechanism for laser-induced nucleation; J. Chem. Phys. 134, 154501 (2011).

[Koizumi 2010] H. Koizumi, K. Fujiwara, S. Uda; Role of the Electric Double Layer in Controlling the Nucleation Rate for Tetragonal Hen Egg White Lysozyme Crystals by Application of an External Electric Field; *Cryst. Growth Des.*, 2010, vol. 10, 2591-2595.

[Krausz 2009] Ferenc Krausz, Misha Ivanov; Attosecond physics; *Reviews of Modern Physics*, vol. 81, 2009.

[Kuhs 2014] Manuel Kuhs, Jacek Zeglinski, Åke C. Rasmuson; Influence of History of Solution in Crystal Nucleation of Fenoxycarb: Kinetics and Mechanisms; *Cryst. Growth Des.*, 2014, 14 (3), pp 905–915.

[Kumar 2011] R. Ashok Kumar, R. Ezhil Vizhi, N. Vijayan b, D. Rajan Babu; Structural, dielectric and piezo electric properties of non linear optical γ -glycine single crystals; *Physica B* 406 (2011) 2594–2600.

[Kunihisa 1974] K. S. Kunihisa; Crystal Growth of γ -Glycine; *J. Crystal Growth*, 23, 351-352 (1974).

[Kustov 2006] A. V. Kustov, V. P. Korolev; The Thermodynamic Characteristics of Solution of L- α -Histidine and L- α -Phenylalanine in Water at 273-373 K; *Russian Journal of Physical Chemistry A*, vol.82, n°11, 2008.

L

[Langan 2002] P. Langan, S. A. Mason, D. Myles, B. P. Schoenborn; Structural Characterization of Crystals of α -Glycine During Anomalous Electrical Behavior; *Acta Cryst.*, B58, 728-733 (2002).

[Larson 1986] M. A. Larson; *J. Garside; Chemical Engineering Science*, 41 (1986) 1285.

[Laval 2007] P. Laval, J.-B. Salmon, M. A. Joanicot; microfluidic device for investigating crystal nucleation kinetics; *J. Cryst Growth*, 2007, 303 (2), 622 - 628.

[Lee 2008a] In Sung Lee, James M. B. Evans, Deniz Erdemir, Alfred Y. Lee, Bruce A. Garetz, Allan S. Myerson; Nonphotochemical Laser Induced Nucleation of Hen Egg White Lysozyme Crystals; *Crystal Growth and Design*, Vol. 8, N° 12, 2008.

[Lee 2008b] In Sung Lee, Ki Tae Kim, Alfred Y. Lee, Allan S. Myerson; Concomitant Crystallization of Glycine on Patterned Substrates : The Effect of pH on the Polymorphic Outcome; *Crystal Growth & Design*, Vol. 8, No. 1, 2008.

[Lehmann 1972] MOGENS S. LEHMANN, THOMAS F. KOETZLE, WALTER C. HAMILTON; Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid components. VIII: the crystal and molecular structure of the β -form of the amino acid L-glutamic acid; *J. Cryst. Mol. Struct.* (1972) 2, 225-233

[Lehmann 1980] M. S. Lehmann, A. C. Nunes; A short Hydrogen Bond between Near Identical Carboxyl Groups in the α Modification of L-Glutamic Acid; Acta Cryst. (1980), B36, 1621-1625.

[Leyder 2013] Stéphanie Leyder; Ionisation nonlinéaire dans les matériaux diélectriques et semiconducteurs par laser femtoseconde accordable dans le proche infrarouge; Thèse de doctorat, Université Aix-Marseille, 2013.

[Lindenberg 2009] C. Lindenberg, M. Mazzotti; Effect of temperature on the nucleation kinetics of α L-glutamic acid; J. Cryst. Growth, 2009, vol. 311, 1178

[Liu^A 2008] Zhimin Liu, Lin Zhong, Pinliang Ying, Zhaochi Feng, Can Li; Crystallization of metastable β glycine from gas phase via the sublimation of α or γ form in vacuum; Biophysical Chemistry 132 (2008) 18–22.

[Liu^B 2013] Tsung-Han Liu, Takayuki Uwada, Teruki Sugiyama, Anwar Usman, Yoichiro Hosokawa, Hiroshi Masuhara, Ting-Wei Chiang, Chun-Jung Chen; Single femtosecond laser pulse-single crystal formation of glycine at the solution surface; Journal of Crystal Growth 366 (2013) 101 - 106.

[Llinas 2008] Antonio Llinas, Jonathan M. Goodman; Polymorph control : past, present and future; Drug Discovery Today, volume 13, numbers 5/6, march 2008.

[Lloyd 1973] K. G. Lloyd, O. Hornykiewicz; Nature 1973, vol. 243, 521-532.

[Lo 1989] P.Y. Lo; PhD Dissertation, Polytechnic University, New York (1989).

[Long 2011] Bingwen Long, Jing Li, Yuhong Song, Junqi Du; Temperature Dependent Solubility of α -Form L-Glutamic Acid in Selected Organic Solvents: Measurements and Thermodynamic Modeling; Ind. Eng. Chem. Res., 2011, vol. 50, 8354-8360.

[Lu 2006] Jie Lu, Xiu-Juan Wang, Xia Yang, Chi-Bun Ching; Solubilities of Glycine and Its Oligopeptides in Aqueous Solutions; J. Chem. Eng. Data, 2006, 51, 1593 - 1596

M

[Madden 1972a] J. J. Madden, E. L. McGandy, N. C. Seeman, Marjoei M. Harding, A. Hoy; The Crystal Structure of the Monoclinic Form of L-Histidine; Acta Cryst. (1972), B28, 2382.

[Madden 1972b] J. J. Madden, E. L. McGandy, N. C. Seeman; The Crystal Structure of the Orthorhombic Form of L-(+)-Histidine; Acta Cryst. (1972), B28, 2377.

[Manzurola 2002] Emanuel Manzurola, Alexander Apelblat; Solubilities of L-glutamic acid, 3-nitrobenzoic acid, p-toluic acid, calcium-L-lactate, calcium gluconate, magnesium-DL-aspartate, and magnesium-L-lactate in water; J. Chem. Thermodynamics, 2002, vol. 34, 1127-1136.

[Marsch 1958] R. E. Marsh; A Refinement of the Crystal Structure of Glycine; *Acta Cryst.*, 11, 654-663 (1958).

[Matic 2005a] Jelena Matic; Polytechnic university of New York; PhD, 2005.

[Matic 2005b] Jelena Matic, Xiaoying Sun, Bruce A. Garetz; Intensity, Wavelength, and Polarization Dependence Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation in Supersaturated Aqueous Urea Solutions; *Crystal Growth and Design*, Vol. 5, N° 4, 2005.

[Markel 2010] A. L. Markela, A. F. Achkasovb, O. I. Prokudinaa, T. A. Alekhinaa, E. V. Boldyreva, V. V. Boldyrev; Different Effects of α and γ Polymorphs of Glycine on Behavior of GC Rats Predisposed to Catalepsy; *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2010, Vol. 434, pp. 235–238.

[Markel 2011] Arcady L. Markel, Andrey F. Anchkasov, Tatiana A. Alekhina, Olga I. Prokudina, Marina A. Ryazanova, Tatiana N. Ukolova, Vadim M. Efimov, Elena V. Boldyreva, Vladimir V. Boldyrev; Effects of the alpha- and gamma-polymorphs of glycine on the behavior of catalepsy prone rats; *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 98 (2011) 234-240.

[Masuhara 2011] Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama, Thitiporn Rungsimanon, Ken-ichi Yuyama, Atsushi Miura, Jing-Ru Tu ; Laser-trapping assembling dynamics of molecules and proteins at surface and interface; *Pure Appl. Chem.*, Vol. 83, No. 4, pp. 869–883, 2011.

[Matsuo 2002] Hiroshi Matsuo, Yoshihisa Suzuki, Seiji Sawamura; Solubility of α -amino acids in water under high pressure : glycine, l-alanine, l-valine, l-leucine, and l-isoleucine; *Fluid Phase Equilibria* 200 (2002) 227–237.

[Mc Crone 1965] W. C. Mc Crone; *Polymorphism in Physics and Chemistry of the Organic Solid State*; Vol. 2, Wiley Interscience, 1965, pp. 726-767.

[Mc Crone 1969] W. C. Mc Crone, J. Haleblan; *Pharmaceutical Applications of Polymorphism*, (with J. Haleblan), in *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, 911-29, 1969.

[Miret 2009] David Miret; Non Photochemical Light Induced Nucleation. A tool to crystallize polymorphs on demand ? Application to carbamazepine; Polytechnic Insitute of New York University, Ecole Centrale Paris, 2009.

[Miura 2013] Atsuhi Miura, Yan-Hua Huang, Hiroshi Masuhara; Single crystal formation of amino acid with high temporal controllability by combining femtosecond and continuous wave laser trapping; *Appl. Phys. B* (2013) 112:473-477.

[Mo 2011a] Yuxin Mo, Leping Dang, Hongyuan Wei; L-Glutamic Acid Polymorph Control Using Amino Acid Additives; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2011, vol. 50, 10385-10392.

[Mo 2011b] Yuxin Mo, Leping Dang, Hongyuan Wei; Solubility of α -form and β -form of L-glutamic acid in different aqueous solvent mixtures; Fluid Phase Equilibria 300 (2011) 105-109.

[Molliet 2008] Annabelle Molliet; Molecular Dynamics Simulations of Glutamic Acid in Solution; Heriot-Watt University, PhD, 2008.

[Murai 2010] Ryota Murai, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoshinori Takahashi, Mihoko Maruyama, Shigeru Sugiyama, Gen Sasaki, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori; Enhancement of femtosecond laser-induced nucleation of protein in a gel solution; Applied Physics Letter, 96, 043702 (2010).

[Murai 2011] Ryota Murai, Hiroshi Y. Yoshikawa, Hitoshi Hasenka, Yoshinori Takahashi, Mihoko Maruyama, Shigeru Sugiyama, Hiroaki Adachi, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Yusuke Mori; Influence of energy and wavelength on femtosecond laser-induced nucleation of protein.; Chemical Physics Letters 510 (2011) 139 - 142.

[Murakami 2004] A. Murakami, H. Kitano, H. Adachi, H. Matsumura, K. Takano, T. Inoue, Y. Mori, M. Doi, T. Sasaki; Jpn J. Appl. Phys., Part 2, 2004, Vol. 43, L873-L876.

[Murli 2003] Chitra Murli, Surinder M. Sharma, S. Karmakar, S. K. Sikka; α -Glycine under high pressures: a Raman scattering study; Physica B 339 (2003) 23–30.

[Murli 2005] Chitra Murli, Susy Thomas, Sugandhi Venkateswaran, Surinder M Sharma; Raman spectroscopic investigation of α -glycine at different temperatures; Physica B 364 (2005) 233–238.

N

[Nakamura 2007a] Kazuhiko Nakamura, Yosuke Sora, Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiroh Hosokawa, Ryota Murai, Hiroaki Adachi, Yusuke Mori, Takatomo Sasaki, Hiroshi Masuhara; Femtosecond laser-induced crystallization of protein in gel medium; Applied Surface Science 253 (2007) 6425 - 6429.

[Nakamura 2007b] Kazuhiko Nakamura, Yoichiroh Hosokawa, Hiroshi Masuhara; Anthracene Crystallization Induced by Single-Shot Femtosecond Laser Irradiation : Experimental Evidence for the Important Role of Bubbles; Crystal Growth and Design, 2007, Vol n°7, N°5, 885-889.

[Nakayama 2013] Satoshi Nakayama, Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Masateru Kurata, Mihoko Maruyama, Shigeru Sugiyama, Yusuka Aoki, Yoshinori Takahashi, Masashi Yoshimura, Seiichiro Nakabayashi, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Kazufumi Takano, Satoshi Murakami, Yusuke Mori; Effect of Gel-Solution Interface on Femtosecond Laser-Induced Nucleation of Protein; Crystal Growth and Design, 2013, 13, 1491-1496.

O

[Okutsu 2004] T. Okutsu, K. Nakamura, H. Haneda, H. Hiratsuka; *Crystal Growth and Design*, Vol. 4 (2004) 113–115.

[Okutsu 2005] T. Okutsu, K. Furuta, T. Terao, H. Hiratsuka, A. Yamano, N. Ferté, S. Veessler; *Light-Induced Nucleation of Metastable Hen Egg-White Lysozyme Solutions Crystal*; *Growth Design* (2005) vol. 5, 1393–1398.

[Okutsu 2007] T. Okutsu, K. Sugiyama, K. Furuta, I. Watanebe, H. Mori, K. Obi, K. Horota, H. Horiuchi, G. Sasaki, S. Veessler, H. Hiratsuka; *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* (2007), 190, 88–93.

[Oh 2006] J. H. Oh, B. G. Swanson ; *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2006, 83, 1007 – 1014.

[Ono 2004] T. Ono, J. H. ter Horst, P. J. Jansens; *Quantitative Measurement of the Polymorphic Transformation of L-Glutamic Acid Using In-Situ Raman Spectroscopy*; *Crystal Growth and Design*, vol. 4, n° 3, 2004.

[Ostwald 1897] W. Ostwald; *Studien über die bildung und umwandlung fester körper*; *Z Physik Chem*, 22, (1897), 289-330.

P

[Park 2003] K. Park, J. M. B. Evans, A. S. Myerson; *Determination of solubility of polymorphs using differential scanning calorimetry*; *Crystal Growth and Design*, 2003, 3, 991 - 995

[Perlovich 2001] G. L. Perlovich, L. K. Hansen, A. Bauer-Brandl; *The Polymorphism of Glycine, Thermochemical and structural aspects*; *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol.66 (2001) 699 – 715.

[Puel 2005] F. Puel, S. Veessler, D. Mangin; *Cristallisation – aspects théoriques* ; *Techniques de l'ingénieur* ; T12710, 1-16, 2005.

[Pradhan 1998] Anjali A. Pradhan, Juan H. Vera; *Effect of acids and bases on the solubility of amino acids*; *Fluid Phase Equilibria*, vol. 152 (1998), 121-132.

Q

R

[Rabesiaka 2006] M. Rabesiaka; Compréhension et contrôle des mécanismes mis en jeu dans la cristallisation de composés d'intérêt pharmaco - cosmétique : application à la glycine et à la Dihydroxyacétone; Thèse de l'université Pierre et Marie Curie, Paris, 2006.

[Rabesiaka 2010] Mihasina Rabesiaka, Mehrez Sghaier, Bernard Fraisse, Catherine Porte, Jean-Louis Havet, Emma Dichi; Preparation of glycine polymorphs crystallized in water and physico chemical characterizations; Journal of Crystal Growth 312 (2010) 1860 – 1865.

[Ramasami 2002] P. Ramasami; Solubilities of amino acids in water and aqueous sodium sulfate and related apparent transfer properties; J. Chem. Eng. Data, 2002, 47, 1164 - 1166.

[Revalor 2009] Eve Revalor; Nucléation en présence de champs externes : Application aux principes actifs pharmaceutique; Université Paul Cezanne Aix - Marseille III, 2009.

[Roelands 2006] C. P. Mark Roelands, Shanfeng Jiang, Mitsutaka Kitamura, Joop H. ter Horst, Herman J. M. Kramer, Pieter J. Jansens; Antisolvent Crystallization of the Polymorphs of L-Histidine as a Function of Supersaturation Ratio and of Solvent Composition; Crystal Growth & Design, Vol. 6, No. 4, 2006.

[Roelands 2007] C. P. M. Roelands, J. H. ter Horst, H. J. M. Kramer, P. J. Jansens ; AiChE J., 2007, vol. 53, 354 – 362.

[Rodriguez-Spons 2004] B. Rodriguez-Spong, C. Price, A. Jayasankar, A. J. Matzger, N. Rodriguez-hornedo; Adv Drug Deliver Rev; 56, 241-274, 2004.

[Rungsimanon 2010a] Thitiporn Rungsimanon, Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara, Norimitsu Tohnai, Mikiji Miyata; Control of Crystal Polymorph of Glycine by Photon Pressure of a Focused Continuous Wave Near-Infrared Laser Beam; Journal of Physical Chemistry Letters, 2010, 1, 599-603.

[Rungsimanon 2010b] Thitiporn Rungsimanon, Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Crystallization in Unsaturated Glycine/ D_2O Solution Achieved by Irradiating a Focused Continuous Wave Near Infrared Laser. Crystal Growth and Design, 2010, Vol. n°10 4686 - 4688.

S

[Sakai 1992] H. Sakai, H. Hosogai, T. Kawakita, K. Onuma, K. Tsukamoto; Transformation of α - to γ -Glycine; J. Crystal Growth, 116, 421 - 426 (1992).

[Sakata 1961] Y. Sakata; STUDIES ON POLYMORPHISM OF L-GLUTAMIC ACID .2. MEASUREMENT OF SOLUBILITIES; AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY (1961) Vol. 25, N° 11.

[Sankar 2010] S. Sankar, MR. Manikandan, S.D. Gopal Ram, T. Mahalingam, G. Ravi; Gel growth of α and γ glycine and their characterization; Journal of Crystal Growth 312 (2010) 2729 – 2733.

[Schöll 2006a] Jochen Schöll, Davide Bonalumi, Lars Bonalumi, Lars Vicum, Marco Mazzotti; In Situ Monitoring and Modeling of the Solvent-Mediated Polymorphic Transformation of L-Glutamic Acid; Crystal Growth and Design, 2006, vol. 6, n°4, 881-891.

[Schöll 2006b] J. Schöll, L. Vicum, M. Müller, M. Mazzotti; Precipitation of L-Glutamic Acid: Determination of Nucleation Kinetics; Chem. Eng. Tech, vol. 29 (2), 257 - 264.

[Sear 2012] R. P. Sear; The non-classical nucleation of crystals : microscopic mechanisms and applications to molecular crystals, ice and calcium carbonate; International Materials Reviews, 2012, Vol n°57, N°6.

[Seidell 1952] A. Seidell, W. F. Linke; Solubility of Inorganic and Organic Compounds, 3rd edition, Van Nostrand Co., New York (1952).

[Shahidzadeh-Bonn 2008] Noushine Shahidzadeh-Bonn, Salima Rafai, Daniel Bonn, Gerard Wegdam; Salt Crystallization during Evaporation : Impact of Interfacial Properties; Langmuir 2008, 24, 8599-8605.

[Shen 2008] Xinchun Shen, Wenqing Wang, Yan Gong, Yan Zhang; Dynamical Spin Chirality and Magnetoelectric Effect of α -Glycine; Acta Physico-Chimica Sinica, 2008, 24 (12), 2153-2158.

[Shi 2005] Yulei Shi, Li Wang; Collective vibrational spectra of α – and γ – glycine studied by terahertz and Raman spectroscopy; J. Phys. D: Appl. Phys., vol. 38, 3741-3745, 2005.

[Smith 2000] Q. R., Smith; J. Nutr, 2000, vol. 130, 1016S-1022S.

[Soare 2011] Anamaria Soare, Rory Dijkink, Marcos Rodriguez Pascual, Chao Sun, Peter W. Cains, Detlef Lohse, Andrzej I. Stankiewicz, Herman J. M. Kramer; Crystal Nucleation by Laser-Induced Cavitation; Crystal Growth and Design 2011, 11, 2311 - 2316.

[Srinivasan^A 2007] K. Srinivasan, J. Arumugam; Growth of non-linear optical γ -glycine single crystals and their characterization; Optical Materials 30 (2007) 40–43.

[Srinivasan^A 2008] K. Srinivasan; Crystal growth of α and γ glycine polymorphs and their polymorphic phase transformation; Journal of Crystal Growth, 311 (2008) 156 - 162.

[Srinivasan^A 2011] K. Srinivasan, P. Dhanasekaran; Nucleation control and crystallization of L - glutamic acid polymorphs by swift cooling process and their characterization; Journal of Crystal Growth 318 (2011) 1080 - 1084.

[Srinivasan^B 2011] T.P. Srinivasan, R. Indirajith, R. Gopalakrishnan; Growth and characterization of α and β - glycine single crystals; Journal of Crystal Growth 318(2011) 762 – 767.

[Sudha 2014] C. Sudha, K. Srinivasan; Nucleation control and separation of paracetamol polymorphs through swift cooling crystallization process; Journal of Crystal Growth, *in press*.

[Sugimura 1994] A. Sugimura, M. Iwamoto, O.-Y. Zhong-can; Phase transition of molecular orientation at the liquid–air interface; Physical Review E, 50 (1994) 614–617.

[Sugita 1988] Y.-H. Sugita; Agric. Biol. Chem., 1988, vol. 52, 3081 – 3085.

[Sugiyama 2007] Teruki Sugiyama, Takuji Adachi, Hiroshi Masuhara; Crystallization of Glycine by Photon Pressure of a Focused CW Laser Beam; Chemistry Letters Vol.36, N°12 (2007).

[Sugiyama 2009] Teruki Sugiyama, Takuji Adachi, Hiroshi Masuhara; Crystal Growth of Glycine Controlled by a Focused CW Near-infrared Laser Beam; Chemistry Letters Vol.38, N°5 (2009).

[Sugiyama 2011] Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Laser-Induced Crystallization and Crystal Growth; Chem. Asian J., 2011, 6, 2878 – 2889.

[Sugiyama 2012] Teruki Sugiyama, Ken-Ichi Yuyama, Hiroshi Masuhara; Laser Trapping Chemistry : From Polymer Assembly to Amino Acid Crystallization; ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, 1946–1954, 2012, Vol. 45, No. 11

[Sun^A 2006] Xiaoying Sun, Bruce A. Garetz; Supersaturation and Polarization Dependence of Polymorph Control in the Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation (NPLIN) of Aqueous Glycine Solutions; Crystal Growth and Design, 2006, vol. 6, N°3, 684 - 689.

[Sun^A 2008] Xiaoying Sun, Bruce A. Garetz, Allan S. Myerson; Polarization Switching of Crystal Structure in the NonPhotochemical Laser-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous L-Histidine; Crystal Growth and Design, Vol. 8, N° 5, 1720 - 1722, 2008.

[Sun^B 2013] Dajun D. Sun, Ping I. Lee; Evolution of Supersaturation of Amorphous Pharmaceuticals: The Effect of Rate of Supersaturation Generation; Mol. Pharmaceutics 2013, 10, 4330–4346.

[Surovtsev 2011] N. V. Surovtsev, V. K. Malinovsky, E. V. Boldyreva; Raman study of low-frequency modes in three glycine polymorphs; The Journal of Chemical Physics, Vol. 134, 045102, 2011.

[Svang-Ariyaskul 2009] Apichit Svang-Ariyaskul, William J. Koros, Ronald W. Rousseau; Chiral separation using a novel combination of colling crystallization and a membrane barrier : Resolution of DL-glutamic acid; *Chemical Engineering Science*, vol. 64 (2009), 1980-1984.

[Sypek 2012] Katarzyna Sypek, Iain S. Burns, Alastair J. Florence, Jan Sefcik†; In Situ Monitoring of Stirring Effects on Polymorphic Transformations during Cooling Crystallization of Carbamazepine; *Cryst. Growth Des.* 2012, 12, 4821–4828.

T

[Tam 1975] A. Tam, G. Moe, W. Happer; Particle Formation by Resonant Laser Light in Alkali-Metal Vapor; *Phys. Rev. Lett.* 35, 1630–1633 (1975).

[Trask 2007] Andrew V. Trask; An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property; *Mol. Pharmaceutics*, 2007, 4 (3), pp 301–309.

[True 2011] Alan B. True, Konstanze Schroeck, Timothy A. French, Charles A. Schmuttenmaer; Terahertz Spectroscopy of Histidine Enantiomers and Polymorphs; *J. Infrared Milli Terahz Waves* (2011), vol. 32, 691-698.

[Tsai 2005] L. H. Tsai, *J. Biomed. Sci.*, 2005, vol. 12, 255-266.

[Tsuboi 2007] Yasuyuki Tsuboi, Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura; Crystallization of Lysozyme Based on Molecular Assembling by Photon Pressure; *Japanese Journal of Applied Physics Vol.* 46, N° 49, 2007, pp L1234 - L1236.

[Tsunesada 2002] F. Tsunesada, T. Iwai, T. Watanabe, H. Adachi, M. Yoshimura, Y. Mori, T. Sasaki; High-quality crystal growth of organic nonlinear optical crystal DAST; *Journal of Crystal Growth* 237-239 (2002) 2104-2106.

[Tu 2014] Jing-Ru Tu, Atsushi Miura, Ken-ichi Yuyama, Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama; Crystal Growth of Lysozyme Controlled by Laser Trapping; *Cryst. Growth Des.*, 2014, 14, 15-22.

[Tyndall 1896] J. Tyndall; *Philos. Mag.* (1896), 37, 384.

U

[Usman 2013a] Anwar Usman, Wei-Yi Chiang, Takayuki Uwada, Hiroshi Masuhara; Polarization and Droplet Size Effects in the Laser-Trapping-Induced Reconfiguration in Individual Nematic Liquid Crystal Microdroplets; *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, 4536-4540.

[Usman 2013b] Anwar Usman, Wei-Yi Chiang, Hiroshi Masuhara; Optical trapping of nanoparticles by ultrashort laser pulses; *Science Progress* (2013), 96(1), 1-18.

[Uwada 2012] Takayuki Uwada, Sho Fuji, Teruki Sugiyama, Anwar Usman, Atsushi Miura, Hiroshi Masuhara, Katsuhiko Kanaizuka, Masa-aki Haga; Glycine Crystallization in Solution by CW Laser-Induced Microbubble on Gold Thin Film Surface; Applied Materials and Interfaces, 2012, 4, 1158-1163.

V

[Veesler 2003] S. Veesler, F. Puel, G. Fevotte; Polymorphisme dans les procédés de cristallisation en solution; STP PHARMA PRATIQUES, volume 13, N°2, mai/juin 2003.

[Veesler 2006] Stéphane Veesler, Kenji Furuta, Hiroaki Horiuchi, Hiroshi Hiratsuka, Natalie Ferté, Tetsuo Okutsu; Crystals from Light : Photochemically Induced Nucleation of Hen Egg-White Lysozyme; Crystal Growth and Design, Vol. 6, N° 7, 2006.

[Veesler 2009] Organic Process Research & Development (2009), 13, 1338 - 1342 : "A rapid Method for Screening Crystallization Conditions and Phases of an Active Pharmaceutical Ingredient".

[Vekilov 2004] Peter G.Vekilov; Two-step mechanism for the nucleation of crystals from solution; Journal of Crystal Growth 275 (2005) 65–76

[Vekilov 2010] Peter G. Vekilov; The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution; Nanoscale, 2010, 2, 2346–2357.

[Vivares 2005] D. Vivares, E. Kaler, A. Lenhoff; Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.; 2005, 61, 819–825.

W

[Wang 2011] L. G. Wang, H.-S. Chai; Revisit on Dynamic Radiation Forces Induced by Pulsed Gaussian Beams; Opt. Express 2011, 19, 14389 – 14402.

[Ward 2009] Martin R. Ward, Iain Ballingall, Matthew L. Costen, Kenneth G. McKendrick, Andrew J. Alexander; Nanosecond pulse width dependence of Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation of potassium chloride; Chemical Physics Letters, 481 (2009) 25 - 28.

[Ward 2011] Martin R. Ward, Gary W. Copeland, Andrew J. Alexander; Chiral hide-and-seek : Retention of enantiomorphism in laser-induced nucleation of molten sodium chlorate; J. Chem. Phys. 135, 114508 (2011).

[Ward 2012a] Martin R. Ward, Stephanie McHugh, Andrew J. Alexander; Non-Photochemical laser-induced nucleation of supercooled glacial acetic acid; Phys. Chem. Chem. Phys., 2012, 14, 90 - 93.

[Ward 2012b] Martin R. Ward, Andrew J. Alexander; Nonphotochemical Laser-Induced Nucleation of Potassium Halides : Effects of Wavelength and Temperature; *Crystal Growth and Design*, 2012, 12, 4554 - 4561.

[Ward 2013] Martin R. Ward, Stanley W. Botchway, Andrew D. Ward, and Andrew J. Alexander; Second-harmonic scattering in aqueous urea solutions : evidence for solute clusters ?; *Faraday Discuss.*, 2013, DOI: 10.1039/C3FD00089C.

[Weissbuch 1990] I. Weissbuch, F. Frolow, L. Addadi, M. Lahav, L. Leiserowitz; Oriented crystallization as a tool for detecting ordered aggregates of water-soluble hydro-phobic alpha-amino acids at the air–solution interface; *Journal of American Chemical Society*, vol.112 (1990) 7718–7724.

[Weissbuch 1994] I. Weissbuch, L. Leiserowitz, M. Lahav; “Tailor-Made” and Charge-Transfer Auxiliaries for the Control of the Crystal Polymorphism of Glycine; *Adv. Matter.*, 6, 952-956 (1994).

[Wille 1966] R. L. Wille, E. S. Lutton ; *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 1966, 43, 491 - 496.

[Wöhler 1832] F. Wöhler, J. Liebig ; *Ann. Pharm.*, 1832, 3, 249-282.

[Wu 2010] Han Wu, Nik Reeves-McLaren, Simon Jones, Radoljub I. Ristic, J. Patrick A. Fairclough, Anthony R. West; Phase Transformations of Glutamic Acid and Its Decomposition Products; *Crystal Growth and Design*, 2010, vol.10, 988-994.

X
Y

[Yani 2012] Y. Yani, P. S. Chow, R. B. H. Tan; *Cryst. Growth Des.*, 2012, vol. 12, 4771-4778.

[Yang 2008a] Xia Yang, Xiujuan Wang, Chi Bun Ching; Solubility of Form α and Form γ of Glycine in Aqueous Solutions; *J. Chem. Eng. Data*, 2008, 53, 1133 - 1137.

[Yang 2008b] Xia Yang, Jie Lu, Xiu-Juan Wang, Chi-Bun Ching; Effect of sodium chloride on the nucleation and polymorphic transformation of glycine; *Journal of Crystal Growth* 310 (2008) 604–611.

[Yamaguchi 2008] Atsushi Yamaguchi, Yoichiroh Hosokawa, Guillaume Louit, Tsuyoshi Asahi, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara; Nanoparticle injection to single animal cells using femtosecond laser-induced impulsive force; *Appl. Phys. A* (2008) 93: 39-43.

[Yennawar 2010] Neela Yennawar, Sava Denev, Venkataraman Gopalan, Hemant Yennawar; Laser-improved protein crystallization screening; *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, Acta Cryst.* (2010) F66, 969 - 972.

[Yogambal 2014] C. Yogambal, D. Rajan Babu, R. Ezhilvizhi; Investigations on the nucleation kinetics of γ -glycine single crystal; *Physica B* 433 (2014) 112–116.

[Yokota 2006] Masaaki Yokota, Norihito Doki, Kenji Shimizu; Chiral Separation of a Racemic Compound Induced by Transformation of Racemic Crystal Structures: DL-Glutamic Acid; *Crystal Growth and Design*, 2006, vol.6, n°7, 1588-1590.

[Yoshikawa 2006a] Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiroh Hosokawa, Hiroshi Masuhara; Explosive Crystallization of Urea Triggered by Focused Femtosecond Laser Irradiation; *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 45, N° 1, 2006, L23 - L26.

[Yoshikawa 2006b] Hiroshi Y. Yoshikawa, Yoichiroh Hosokawa, Hiroshi Masuhara; Spatial Control of Urea Crystal Growth by Focused Femtosecond Laser Irradiation; *Crystal Growth and Design*, Vol. 6, N° 1, 302 - 305, 2006.

[Yoshikawa 2009] Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Shigeru Sugiyama, Gen Sasaki, Tomoya Kitatani, Yoshinori Takahashi, Hiroaki Adachi, Hiroyoshi Matsumura, Satoshi Murakami, Tsuyoshi Inoue, Kazufumi Takano, Yusuke Mori; Femtosecond laser-induced nucleation of protein in agarose gel; *Journal of Crystal Growth* 311 (2009) 956 - 959.

[Yoshikawa 2014] Hiroshi Y. Yoshikawa, Ryota Murai, Hiroaki Adachi, Shigeru Sugiyama, Mihoko Maruyama, Kazufumi Takano, Hiroyoshi Matsumura, Tsuyoshi Inoue, Satoshi Murakami, Hiroshi Masuhara, Yusuke Mori; Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding; *Chem. Soc. Rev.* 2014.

[Yu 2002] L. Yu, K. Ng; Glycine Crystallization During Spray Drying: The pH Effect on Salt and Polymorphic Forms; *J. Pharmaceutical Sciences*, 91, 11, 2367-2375 (2002).

[Yuyama 2010a] Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Millimeter-Scale Dense Liquid Droplet Formation and Crystallization in Glycine Solution Induced by Photon Pressure; *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2010, Vol n°1, 1321 - 1325.

[Yuyama 2010b] Ken-ichi Yuyama, Kei Ishiguro, Thitiporn Rungsimanon, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Single droplet formation and crystal growth in urea solution induced by laser trapping; *Proc. of SPIE*, vol. 7762, 776236.

[Yuyama 2012a] Ken-ichi Yuyama, Thitiporn Rungsimamon, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Formation, Dissolution, and Transfer Dynamics of a Millimeter-Scale Thin Liquid

Droplet in Glycine Solution by Laser Trapping; Journal of Physical Chemistry C, 2012, Vol.116, 6809 - 6816.

[Yuyama 2012b] Ken-ichi Yuyama, Thitiporn Rungsimamon, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Selective Frabrication of α – and γ – Polymorph of Glycine by Intense Polarized Continuous Wave Laser Beams; Crystal Growth and Design, 2012, 12, 2427-2434.

[Yuyama 2012c] Ken-ichi Yuyama, Kei Ishiguro, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Laser trapping dynamics of L-alanine depending on the laser polarization; Optical Trapping and Optical Micromanipulation IX, Proc of SPIE, Vol. 8458, 84582D, 2014.

[Yuyama 2013a] Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Laser Trapping and Crystallization Dynamics of L-Phenylalanine at Solution Surface; J. Phys. Chem. Lett, Vol. 4, 2436 - 2440.

[Yuyama 2013b] Ken-ichi Yuyama, Chi-Shiun Wu, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara; Laser trapping-induced crystallization of L-Phenylalanine through its high-concentration domain formation; Photochem. Photobiol. Sci. DOI : 10.1039/c3pp50276g.

Z

[Zaccaro 2001] Julien Zaccaro, Jelena Matic, Allan S. Myerson, Bruce A. Garetz; Nonphotochemical, Laser-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous Glycine Produces Unexpected γ -Polymorph; Crystal Growth and Design, 2001, Vol.1, N°1, 5 - 8.

[Zahn 2004] Dirk Zahn; Atomistic Mechanism of NaCl Nucleation from an Aqueous Solution; Phys. Rev. Lett. 92, 040801.

Articles publiés en relation avec la thèse

■ *A new experimental setup for high-throughput controlled non-photochemical laser-induced nucleation : application to glycine crystallization*; Bertrand Clair, Aziza Ikni, Wenjing Li, Philippe Scouflaire, Vincent Quemener and Anne Spasojevic-de Biré; **J. Appl. Cryst.** (2014). **47**, 1252–1260.

■ *Experimental Demonstration of the Carbamazepine Crystallization from Non-photochemical Laser-Induced Nucleation in Acetonitrile and Methanol*; Aziza Ikni, Bertrand Clair, Philippe Scouflaire, Stéphane Veesler, Jean-Michel Gillet, Nouha El Hassan, Françoise Dumas, and Anne Spasojević-de Biré; **Cryst. Growth Des.** (2014) [dx.doi.org/10.1021/cg500163](https://doi.org/10.1021/cg500163).

Le volumineux *Supporting Information* n'a pas été inséré. Il est librement téléchargeable sur le site *Crystal Growth and Design*.

A new experimental setup for high-throughput controlled non-photochemical laser-induced nucleation: application to glycine crystallization

Bertrand Clair,^{a,b} Aziza Ikni,^{a,b} Wenjing Li,^{a,b} Philippe Scoufflaire,^{a,c} Vincent Quemener^d and Anne Spasojević-de Bire^{a,b*}

^aEcole Centrale Paris, Grande Voie des Vignes, 92290 Châtenay-Malabry, France, ^bCNRS, UMR 8580, Laboratoire 'Structures Propriétés et Modélisation des Solides', Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France, ^cCNRS, UPR 288, Laboratoire d'Energétique Moléculaire et Macroscopique, Combustion (EM2C), Grande Voie des Vignes, 92290 Châtenay-Malabry, France, and ^dARCALE, 1 rue des Pénitents Blancs, BP 71028, 31010 Toulouse Cedex 6, France.
Correspondence e-mail: anne.spasojevic@ecp.fr

Non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN) has been a growing field of study since 1996, and more than 40 compounds including organics, inorganics and proteins have now been probed under various conditions (solvents, laser types, laser beams *etc.*). The potential advantages of using this technique are significant, in particular polymorphic control. To realize these benefits, the objective is a carefully designed experimental setup and highly controlled parameters, for example temperature and energy density, in order to reduce the uncertainty regarding the origin of nucleation. In this paper, a new experimental setup designed to study NPLIN is reported. After a full technical description of the present setup, the different functionalities of this device will be illustrated through results on glycine. Glycine crystals obtained through NPLIN nucleate at the meniscus and exhibit different morphologies. The nucleation efficiency, as a function of the supersaturation of the solution used and the laser beam energy density, has also been established for a large number of samples, with all other parameters held constant.

© 2014 International Union of Crystallography

1. Introduction

There is tremendous pressure on the pharmaceutical industry to understand the polymorphism of drugs in order to control and produce the most stable and effective polymorphs. Complete knowledge of the polymorphs of a compound and their stability is required to obtain US Food and Drug Administration (FDA) approval in the case of solid-state formulations. However, despite such FDA approval, unstable polymorphs have inadvertently been placed on the market (Datta & Grant, 2004). There is a growing awareness of the effects of polymorphism or pseudo-polymorphism on the properties of drugs, such as their physical and chemical stability, solubility, dissolution rate, bioavailability and mechanical properties, and the resulting consequences for the manufacturing process (Rodriguez-Spong *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004). Finally, the development of new generic drugs has induced new studies showing that polymorphism can play a significant role in differentiating between the generic and innovative forms (Shekunov & York, 2000; Mangin *et al.*, 2009).

Ideally, the experimental study of polymorphism implies control over polymorphic crystallization and mastery of the search for new polymorphs. Several methods have been developed for inducing crystallization using an external

constraint on the system, including electric fields (Taleb *et al.*, 2001), ultrasound (Virone *et al.*, 2006) and light irradiation (Sun & Garetz, 2006). In some cases, these methods enable spatial or temporal control of the nucleation with varying success. Among these methods, laser-induced nucleation (LIN) has shown great potential. In recent years, LIN experiments have been carried out on inorganic, organic and protein molecules. Table 1 summarizes the different characteristics of the experimental setups currently available around the world.

The experimental setups considered in this paper are those for which a laser has induced nucleation of crystals after irradiation of a supersaturated solution or a liquid. Garetz *et al.* (1996) called this phenomenon non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN), while other authors use a variety of acronyms (see Table S1[†]). We decided to extend the use of the acronym NPLIN for all experiments that take the form represented in Fig. S1. Within this framework, we eliminate crystal growth experiments *via* a laser beam for which the initial compound is already a crystalline material [see, for example, Yoshikawa *et al.* (2006) and Sugiyama *et al.* (2009)].

[†] Supporting information discussed in this paper is available from the IUCr electronic archives (Reference: RG5062).

Table 1

Description of the 15 NPLIN experimental setups.

Setup number	Laser type†	Wavelength (nm)	Sample holder number environment‡	<i>In situ</i> observation technique§	<i>Ex situ</i> observation technique	Characterization technique¶	Compounds	References
M0	P-ns-foc	532, 1064	8	SHG (5)		SHG (5), PXRD (2,3,5,6)	Glycine, urea, histidine, glacial acetic acid	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
M1	P-fs-foc	780, 800	2, m	CCD camera (10, 11, 13)	Photography	SCXRD (12), fluorescence (11)	Lysozyme, ribonuclease B, sheep liver sorbitol dehydrogenase, glucose dehydrogenase, fructose dehydrogenase, myoglobin, paracetamol	9, 10, 11, 12, 13
M2	P-fs-foc	800	9, c, m			SCXRD	4-(Dimethylamino)- <i>N</i> -methyl-4-stilbazolium tosylate	14, 15
M3	P-fs-foc	800	4	CCD camera	Photography		Anthracene	16
M4	P-ns-foc, P-ps-foc	532, 1064	3, m		Photography		Lysozyme, bovine pancreas trypsin	17
M5	P-fs-foc	780	2	CCD camera	Photography		Lysozyme, thaumatine	18
M6	P-ps-foc	532	6		Photography, crossed polarizer-analyser	Fluorescence	4'- <i>n</i> -Pentyl-4-cyanobiphenyl	19
M7	P-ns-foc	532, 1064	7		Photography (23, 24)		KCl, KBr	20, 21, 22, 23, 24
M8	CW-foc	1064	5	CCD camera	Photography (26)	FTIR	Glycine	25, 26, 27
M9	CW-foc	1064	2, c	CCD camera	Photography	Morphology	Glycine	28
M10	P-fs-foc	780	1	CCD camera	Photography	Morphology	Glucose isomerase	29
M11	P-ns-foc	532	2	CCD camera	Photography	Morphology	KMnO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄	30, 31
M12	CW-foc	1064	2	CCD camera, Raman (34)	Photography (33, 34), spectroscopy (34)	Morphology (33, 34), fluorescence (33, 34), Raman (35)	Glycine, lysosyme	32, 33, 34
M13	P-ns-foc	532	7	Light-scattering turbidity analysis	AFM image		KNO ₃	35
M14	P-fs-foc	800	5	CCD camera	Photography	Morphology, SCXRD	Glycine	36
This work	P-ns-foc	532	10, c, m	CCD camera	Photography	Morphology, PXRD, SCXRD	Glycine, carbamazepine	This work, 37, 38

† Laser type: P = pulsed, CW = continuous-wave, ns = nanosecond, fs = femtosecond, ps = picosecond, nfoc = non-focused, foc = focused. ‡ The numbers refer to Fig. 1; additionally, m = multi-batch, c = temperature control. § SHG = second-harmonic generation. ¶ Characterization techniques of the molecule and/or the polymorphs crystallized: PXRD = powder X-ray diffraction, SCXRD = single-crystal X-ray diffraction, FTIR = Fourier transform infrared spectroscopy. References: (1) Garetz *et al.* (1996); (2) Zaccaro *et al.* (2001); (3) Garetz & Matic (2002); (4) Matic *et al.* (2005); (5) Sun & Garetz (2006); (6) Sun *et al.* (2008); (7) Alexander & Camp (2009); (8) Knott *et al.* (2011); (9) Adachi *et al.* (2003); (10) Nakamura, Sora *et al.* (2007); (11) Murai *et al.* (2010); (12) Yennawar *et al.* (2010); (13) Nakayama *et al.* (2013); (14) Hosokawa *et al.* (2005); (15) Tsunesada (2002); (16) Nakamura, Hosokawa *et al.* (2007); (17) Lee *et al.* (2008); (18) Yoshikawa *et al.* (2009); (19) Sun & Garetz (2009); (20) Alexander & Camp (2009); (21) Ward *et al.* (2009); (22) Ward *et al.* (2011); (23) Ward & Alexander (2012); (24) Ward *et al.* (2012); (25) Rungsimanon *et al.* (2010); (26) Yuyama *et al.* (2012); (27) Nakayama *et al.* (2013); (28) Yuyama *et al.* (2010); (29) Iefuji *et al.* (2011); (30) Soare *et al.* (2011); (31) Murai *et al.* (2011); (32) Yuyama *et al.* (2012); (33) Uwada *et al.* (2012); (34) Tsuboi *et al.* (2007); (35) Jacob *et al.* (2012); (36) Liu *et al.* (2013); (37) Spasojevic-de Biré (2013); (38) Ikni *et al.* (2014).

In this paper, the NPLIN acronym does not give any information on the nucleation mechanism and does not give any restriction on that mechanism, it just implies that there is no chemical transformation of the compound.

Four main sections can be used to describe the experimental setup: (i) the laser; (ii) the sample holder; (iii) the observation equipment; and (iv) the characterization technique. A small number of experiments were performed using a continuous-wave (CW) laser, while the others were performed with a pulsed laser (P). Therefore, we distinguish five experimental categories of the laser setup: (i) pulsed nanosecond focused laser (P-ns-foc); (ii) pulsed nanosecond non-focused laser (P-ns-nfoc); (iii) pulsed femtosecond focused laser (P-fs-foc);

(iv) pulsed femtosecond non-focused laser (P-fs-nfoc); and (v) continuous-wave focused laser (CW-foc).

The wavelengths used were 532, 780, 800 and 1064 nm. Fig. 1 shows schematic representations of the different sample holders, which differ in their geometry [a bubble, a high-performance liquid chromatography (HPLC) glass vial, a spectroscopic tube or an assay tube] and volume (from 2 µl to 10 ml) and which focus the beam in various ways (a camera, a lens or the cylindrical wall of the assay tube). Some of these sample holders are part of a multi-batch system, and for some of them the temperature is controlled (Table 1). The crystal analysis techniques have been classified into two main categories: (i) *in situ* ones, *i.e.* techniques that are embedded in the

experimental setup; and (ii) *ex situ* ones, *i.e.* techniques that require the crystalline material to be taken away to perform the observation. In the characterization technique column of Table 1, we have reported the methods used for identification of the crystal and/or polymorphic forms.

The nucleation of glycine using the NPLIN method exhibits an interesting property, namely the capability to produce a particular polymorph according to the incident polarization of the laser beam (Sun & Garetz, 2006; Sun *et al.*, 2008). This was only observed for glycine in a particular range of supersaturation (1.45–1.65 at room temperature). In this range, the α polymorph was produced using circular polarization and the γ polymorph was produced using linear polarization (Sun & Garetz, 2006). Similar behaviour was observed in the case of L-(+)-histidine (Sun *et al.*, 2008).

Working within the context of pharmaceutical polymorphism, we report in this paper a new experimental setup for high-throughput NPLIN under controlled experimental conditions. The first experimental device based on the setup of Matić (2004) has quickly reached its limits in terms of the real control of nucleation and crystallization using the NPLIN method. We have therefore established the requirements of an NPLIN experiment in order to ensure good quality and reproducible measurements. After a brief description of the methodology necessary to perform a conclusive NPLIN experiment, and in order to illustrate the use of this new device, some results on glycine crystallization will be presented and discussed. Using this device, we have properly demonstrated the effect of the laser beam on a glycine solution and recorded fast nucleation after exposure.

2. Materials and methods

2.1. Experimental requirements and solutions used

Nucleation is a process the outcome of which depends on a large number of factors, including ones that sometimes escape direct control. In particular, standard macroscopic thermodynamics and standard macroscopic kinetics do not apply, mainly because the nucleating medium is heterogeneous. Minor impurities also certainly have a role. Therefore, it is

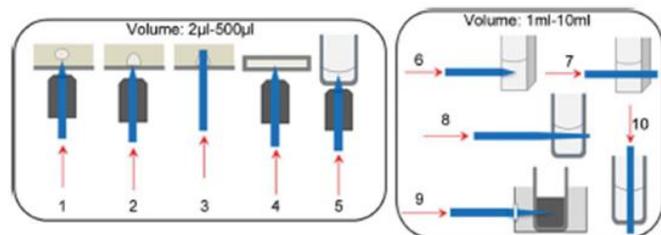


Figure 1 Schematic representations of the different sample holders available in the NPLIN experimental setups. Sample holders 1–5 correspond to a volume of 2–500 μl , while sample holders 6–10 correspond to a volume of 1–10 ml. Focusing is done through objectives (1, 2, 4, 5) or a lens (6, 9). An unwanted focusing by a factor of 1.53 is due to the cylindrical assay tube in 8 (Matić, 2004). The laser beam, whatever its wavelength, is represented by a blue line. Red arrows indicate the direction of the beam.

crucial to be able to perform numerous experiments under the same experimental conditions. Considering the influencing factors in the nucleation process, primarily temperature should be controlled and monitored, and the energy density of the laser beam must be monitored. Visual monitoring of crystallization through microphotographs is also necessary. Taking these general requirements into account, we have designed and built a multipurpose high-throughput experimental setup, with special attention paid to the software (see Table S2). We chose to use different methods for characterization: *in situ* by visual control of the morphology, and *ex situ* after filtering of the solution, using powder X-ray diffraction (PXRD) and single-crystal X-ray diffraction (SCXRD) measurements and scanning electron microscopy (SEM) observations. Figs. 2 and 3 show schematic representations of our new experimental device, while Fig. 4 shows how the experimental design was implemented. The following is a detailed description of the experimental setup.

A rotating sample holder or carousel was designed and built, to hold 90 HPLC glass vials with a radius of 340 mm under control of a step-by-step motor (URS100BCC; Newport Micro Control). The carousel is an assembly of three pieces, which allow water flow in order to control the temperature of the exposed and monitored samples. Because of the rotating configuration, the input and output water flows are on the same axis in two different pipes. Inside the carousel, an intermediate piece was created with two levels in order to

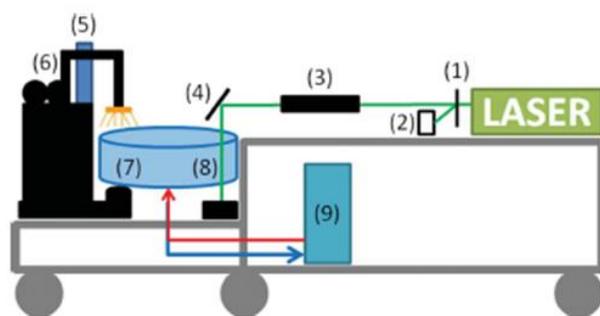


Figure 2 Schematic representation of the experimental setup. (1) Laser, (2) watt meter, (3) condenser, (4) mirror, (5) camera, (6) inverted microscope, (7) observation area, (8) exposure area and (9) cryothermostat. The red arrow indicates the inwards flow and the blue arrow the outwards flow. The whole setup is mounted on a trolley (grey).

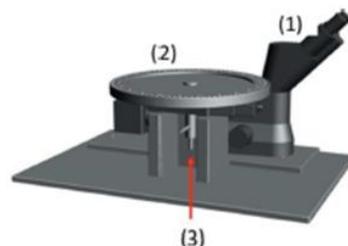


Figure 3 Three-dimensional computer-aided design of the carousel. (1) Inverted microscope, (2) 90 holes for HPLC tubes and (3) heat-transfer fluid circulation.

manage the input and output flows (see Fig. S2). The water flow is controlled by a cryothermostated bath (Lauda) in a closed circuit. The temperature control device operates in the range 278–333 K. Three temperature sensors permit temperature monitoring; one measures the temperature at the entrance of the pipe, another measures that at the outlet of the pipe, and the third is mobile and can be inserted inside the carousel. Changing the fluid type would allow the use of the system at lower or higher temperatures.

The apparatus uses an Nd:YAG laser with a wavelength of 532 nm (beam 7 mm in diameter, pulse of 7 ns, 300 mJ). The diameter of the laser beam is reduced by a beam reducer in order to increase the laser energy density. This reduction of the laser beam diameter can be done in two ways: (i) a laboratory-made telescope, with nitrogen gas circulation to avoid plasma discharge at the focal point, reduces the beam diameter by a factor of two; and (ii) a commercial HEBX-3X condenser (Melles Griot) reduces the beam by a factor of three. The beam is directed onto the solution using a mirror at the end of the optic line. This vertical configuration was chosen because the insertion of the beam through a cylindrical face induces strong focusing by a factor of two (Fig. 1, sample holder No. 8). This focusing is not controlled and must be avoided. Therefore, we decided to use chromatography tubes exposed from the top through a glass plate. For the safety of the experimenter, the vertical beam is directed towards the ground. This approach also allows us to minimize the quantity of compound required, where necessary. In order to measure the exact laser energy density received by the sample, a homemade glass plate is positioned just after the shutter to collect 3% of the outgoing beam; a watt meter (QE25LB-S-MB; Excell Technology France) is used to monitor the beam power continuously at all times. To control the exposure time precisely, a programmable shutter (SC05/SH 10; Thor Lab) is positioned inside the beamline. A Glan polariser with a quarter-wave plate (Melles Griot) can be added to modify the

polarization and produce elliptical or circular polarization. Observation of *in situ* crystallization is performed using an inverted microscope (Nikon MA100) with a CCD camera (Q imaging) connected to the automated system. The microscope is placed at an angle of 180° to the laser exposure path, enabling analysis of the solution 1 s after exposure to the laser beam. All the equipment is installed on a cart that includes space for the laser and its supply circuit. A mobile hood can be installed during the experiments for the safety of the experimenter.

2.2. Automation

A computer program was developed to control and manage each step of the experiment, using the *LABVIEW* framework (National Instruments). Firstly, the user programs the control of peripheral instruments, such as bath temperature. The exposure sequence is then programmed through an Excel (Microsoft) file, which allows the input of sample information, such as laser exposure characteristics and the observation time. From this point on, there are three modes: manual, automatic and semi-automatic. The manual mode is fully managed by the operator, allowing step-by-step exposure and the possibility to record observations for a long time. The automatic mode executes the programmed sequence in the Excel file. The semi-automatic sequence works like the automatic one, but parameters related to laser exposure, observation setup and temperature can be changed by the experimenter just before running a sequence. This software allows real-time recording of the temperature and beam intensity while the exposure and observation steps are performed.

2.3. Glycine nucleation and crystallization

2.3.1. Sample preparation. Supersaturated glycine solutions were prepared by dissolution of glycine in distilled water. The

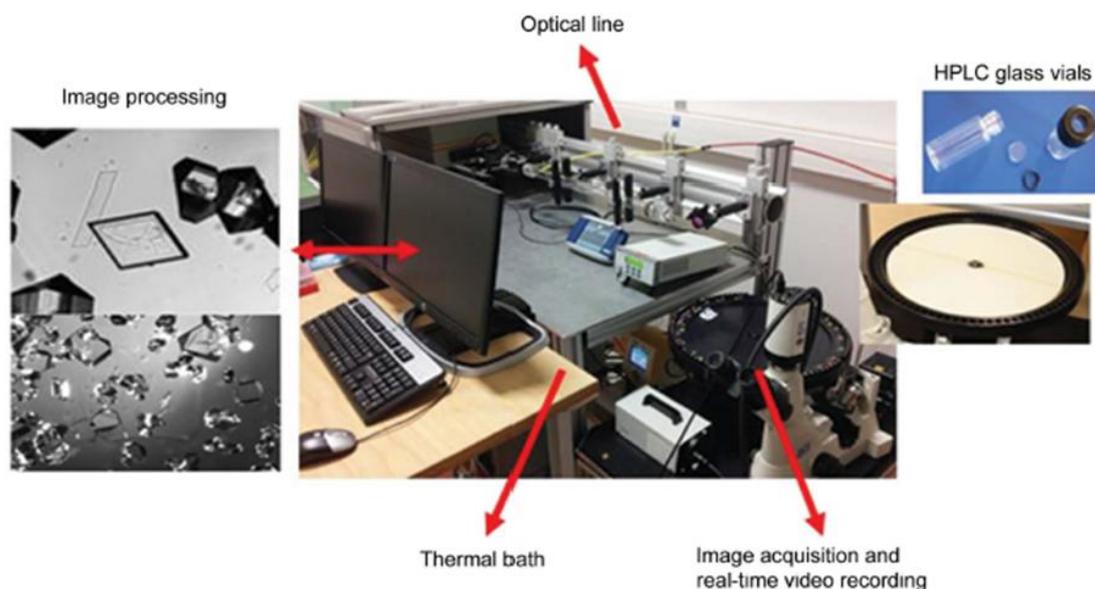


Figure 4
Photographs of the experimental setup.

solutions used to demonstrate the NPLIN effect were prepared in the range of supersaturation constant ($C = S/S_0$) from 1.0 to 2.0 at a temperature of 290 K using the solubility curve published by Yang *et al.* (2008) (Fig. 5). The initial compound, tested using PXRD before dissolution, was the γ polymorph, except for Figs. 7, 8 and 10 below, where an initial α -glycine polymorph was used (see Table S3).

A mass of glycine corresponding to the supersaturation range at 290 K, calculated using the glycine solubility curve, was placed in an HPLC tube and water (1 ml) was added. The tube was stored inside the sample holder at a temperature of 333 K, in order to dissolve the glycine by thermal diffusion and concentration-gradient convection. The dissolution route is the following: samples were kept for 36 h at 333 K, then a cooling slope of 0.2 K min^{-1} was applied until the exposure temperature (290 K) was reached. That temperature was maintained for 12 h before laser exposure (aging time).

2.3.2. Laser-induced nucleation. The Nd:YAG laser was used in a range of settings that supplies energy from 50 to 320 mJ. The energy density is calculated per surface unit and per time unit (pulse of 7 ns). The beam size and shape were determined using optical marking paper before each experiment. The beam shape is elliptical and its surface slowly decreases with the age of the laser. For the HEBX 3.0 condenser, the beam surface area is $S = 0.0615 \text{ cm}^2$, while for the homemade condenser, $S = 0.2375 \text{ cm}^2$, except for Fig. 10 below, where the beam surface is 0.1385 cm^2 . The exposure time was 1 min. The beam has a vertical linear polarization at 99%. A quarter-wave plate was used to produce circularly polarized light. It was controlled using a Glan polarizer, checking the Malus law (Chappert, 1977) before the exposure of the sample to the laser.

2.3.3. Polymorph characterization. The determination of the initial powder polymorph or that obtained using the laser was accomplished using PXRD. SEM experiments enabled the structural characterization of the initial powder. Crystals obtained after spontaneous nucleation or NPLIN were ground in a mortar. PXRD data were recorded at room temperature on a Bruker D2 Advance powder diffractometer. For morphological characterization, single crystals were probed using a Bruker D8 single-crystal diffractometer at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. Methodology for NPLIN study

The key point of any NPLIN study is to demonstrate that the laser has induced nucleation while without the laser there

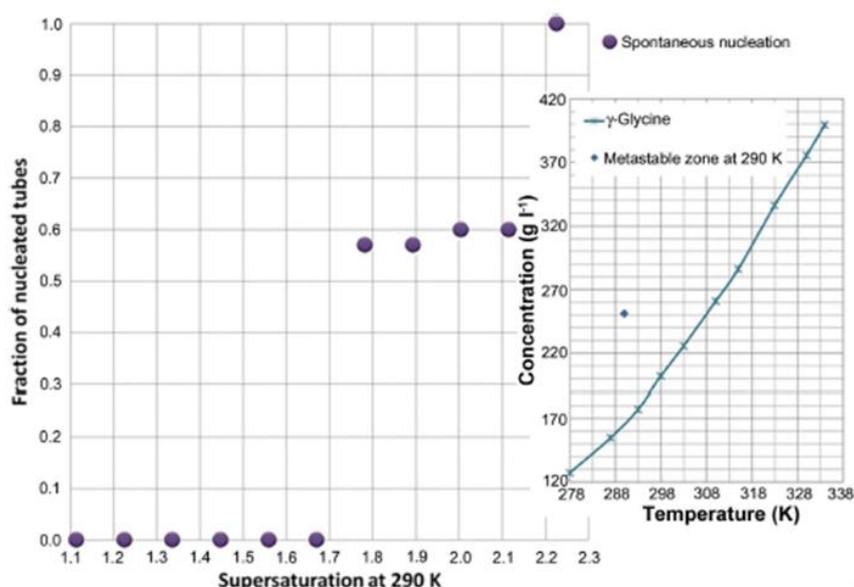


Figure 5

The spontaneous nucleation efficiency of glycine at 290 K after 168 h (one week). Each point represents the results from ten tubes. (Inset) The solubility curve for γ -glycine (Yang *et al.*, 2008) and the limit of the metastable zone (blue point).

would be no nucleation. To achieve this task, three steps have to be performed prior to the NPLIN experiments: (i) characterization of spontaneous crystallization under similar conditions (method of dissolution, temperature, supersaturation, pH *etc.*) to those used for the NPLIN method, leading to determination of the induction time in spontaneous crystallization; (ii) determination of the solubility curve under similar conditions; and (iii) determination of the metastable zone. The potential to achieve thermodynamically metastable states is a characteristic feature of first-order phase transitions (Kaschchiev, 1991). Starting from the initial phase, supersaturating the solution during a time interval t_i leads to the formation of a new phase, manifested by the appearance of crystals. The time interval t_i separating these two phases is referred to as the induction time and is used as a measure of the ability of the system to remain in a metastable equilibrium. It can therefore be used to determine the metastable limit of the initial phase. Indeed, it allows us to determine the critical supersaturation below which the initial phase can remain long enough without losing its metastability. These tasks have been described extensively by Revalor *et al.* (2010). Therefore, knowing the temperature, supersaturation and induction time for a given molecule in a given solvent, NPLIN experiments can be performed.

3.2. Application to glycine

Glycine has six polymorphs, three of which have been known at room temperature for many years, namely the α (Albrecht & Corey, 1939; Marsh, 1958), β (Fischer, 1905; Iitaka, 1958) and γ (Iitaka, 1958, 1960, 1961) polymorphs. Three other polymorphs (δ , ϵ and ζ) can be produced from

high-pressure experiments, starting from the γ form (Boldyreva *et al.*, 2003; Goryainov *et al.*, 2006; Dawson *et al.*, 2005). The most stable polymorph at room temperature and ambient pressure is the γ form, but the kinetically favoured form at room temperature is the α polymorph (Boldyreva *et al.*, 2003). The γ polymorph is formed in acidic or basic solutions (Yu & Ng, 2002) and in deuterated solutions (Iitaka, 1961). Using NPLIN with a nanosecond pulsed laser, the γ form was produced unexpectedly (Zaccaro *et al.*, 2001), and it was selectively produced using polarization (Garetz & Matić, 2002; Sun & Garetz, 2006) or with a femtosecond pulsed laser (Liu *et al.*, 2013). Glycine has also been crystallized by NPLIN with a femtosecond CW laser (Rungsimanon *et al.*, 2010; Uwada *et al.*, 2012; Yuyama *et al.*, 2012).

The metastable zone at 290 K is determined according to the methodology described below. This temperature was chosen to enable comparison with the NPLIN results of Sun & Garetz (2006), in which the polarization switching phenomenon was only observed at this temperature when using the 532 nm wavelength. The solubility curve determined by Yang *et al.* (2008) was used as a reference (Fig. 5). Spontaneous nucleation over a range of supersaturations (Fig. 5) was studied after 7 d. If n samples nucleate, the nucleation fraction is then given by n/N . A plot of N is reported in Fig. 5. Observations were made after 36 h and after 168 h. From a thermodynamic point of view, for a supersaturation range between $\beta = 1.10$ and $\beta = 1.68$ and for a time less than 168 h, it can be considered that we are in the metastable zone. This limit is indicated by a blue point in the insert of Fig. 5. Therefore, the critical supersaturation is $\beta_{c,290}(168) = 1.68$. This illustrates how the limit of the metastable zone is dependent on the time of observation.

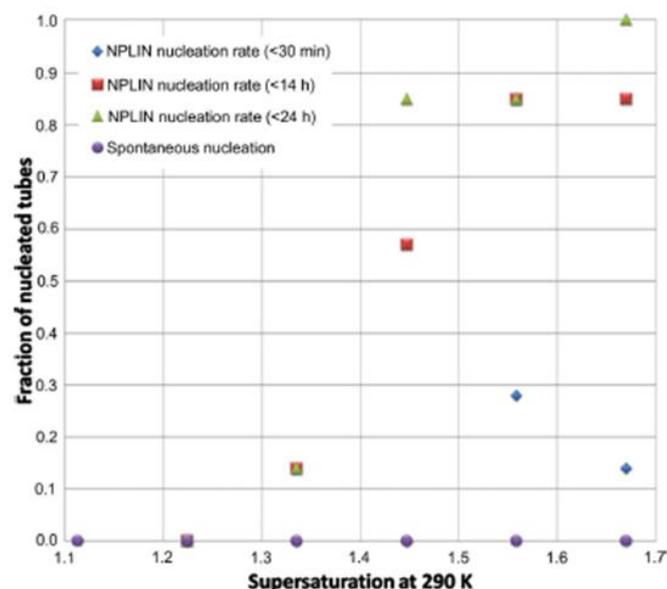


Figure 6
The NPLIN nucleation efficiency of aqueous glycine solutions at 290 K at different times after irradiation. Time t_0 corresponds to the end of the laser exposure (exposure time 60 s, energy 680 MW cm⁻², linear polarization). Each point represents results from ten samples.

Using the semi-automatic mode of the apparatus, we have performed a number of experiments of nucleation induced by laser at a given supersaturation, laser energy and linear polarization. The results are reported in Fig. 6. The frequency of occurrence of nucleated samples was recorded several times after exposure to the laser (Fig. 6) through microscopic observation, and checked by visual observation in the case of nucleation starting at the meniscus in the geometry described in Fig. 1 (sample holder No. 10).

From this figure, it is clear that the laser has induced nucleation in the metastable zone. Below a supersaturation of 1.68, no spontaneous nucleation was recorded up to 168 h, whereas using NPLIN nucleation occurred quickly, reducing the induction time (in hours) by at least a factor of seven. Below a supersaturation of 1.34 no NPLIN nucleation was recorded, confirming the results of Sun & Garetz (2006) in this range with a similar energy (460 MW cm⁻² for $\lambda = 1064$ nm). The nucleation efficiency according to the injected power inside the solution (MW cm⁻²) is reported (Fig. 7). Up to an energy density of 600 MW cm⁻², the average efficiency increases, but it then drops for energies up to 720 MW cm⁻². This figure, based on two experiments carried out with the same parameters on two different occasions, shows good reproducibility up to 600 MW cm⁻² and expresses divergence at the highest energy.

Using the manual mode of the apparatus, we have observed optically both spontaneous (Fig. 8a) and NPLIN crystallization (Fig. 8b). Our sample holder (Fig. 1 No. 9) is the only one for which the laser beam goes through the air–solution interface (meniscus). One can observe (red circles) the shadow of a crystal that falls down from the concave meniscus. The microscope objective was focused on the bottom of the HPLC glass vial. Later, one can observe (blue circles) another crystal that falls down to the bottom of the tube. Crystal

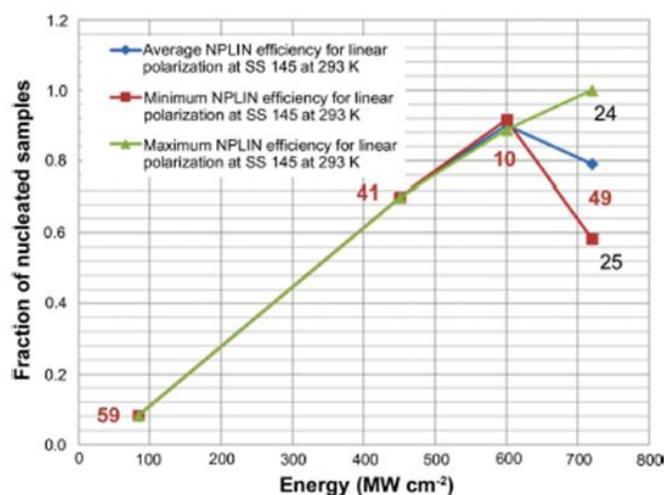


Figure 7
The NPLIN nucleation efficiency of aqueous glycine solutions at various energy densities (83, 450, 600 and 720 MW cm⁻²) for a supersaturation (SS) of 1.45 for two different experiments. The average efficiency is plotted in blue. The number of samples used for each point is indicated in red.

growth can be observed for the crystal (blue circles) from $t_{\text{NPLIN}} = 360$ s to $t_{\text{NPLIN}} = 1291$ s.

A video is available in the supporting information. The morphology of these crystals is completely different (Fig. 9). Photographs extracted from the film show that complete crystallization is achieved in about 20 min. These recorded images are reproducible from one sample to another. The first observable crystals can be formed quickly after the exposure time. In a second period, crystals falling from the meniscus arrived after about 4 min, once they had reached a critical size subject to gravity. The action of the meniscus as a nucleation site in HPLC glass vials has been reported by Liu *et al.* (2013). They used a femtosecond laser focused on different places (the meniscus, the bottom of the HPLC glass vial and in the volume of the solution) and showed that the meniscus is a highly preferential place for nucleation.

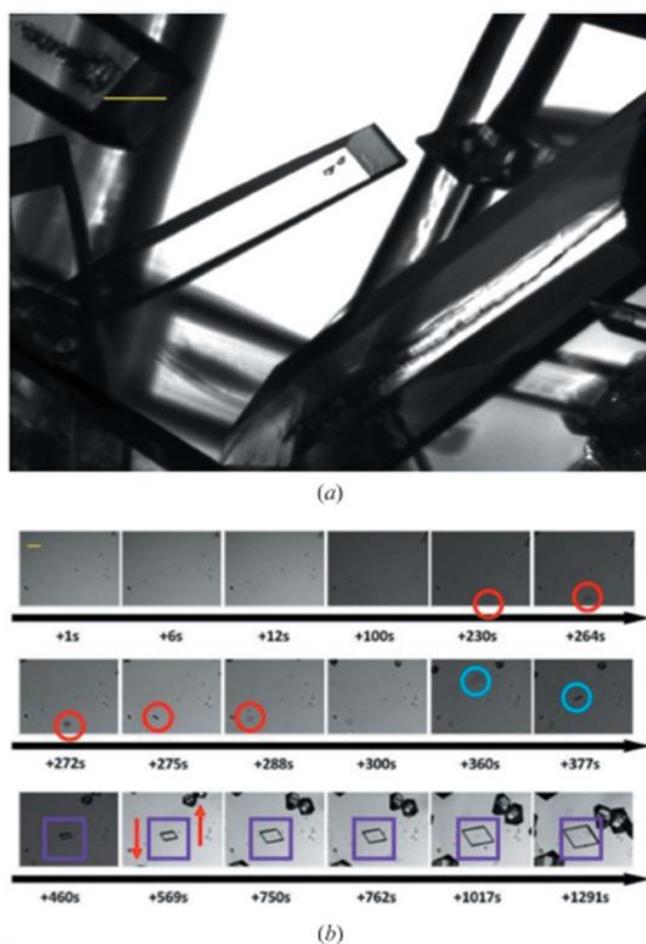


Figure 8 Apparatus used in manual mode to follow the crystallization. (a) Spontaneous crystallization $\beta_{290} = 200\%$. Crystallization was observed using a $2.5\times$ Nikon objective. (b) NPLIN and crystallization. Time t_0 corresponds to the end of the laser exposure (exposure time 60 s, energy 1.4 GW cm^{-2} , linear polarization, supersaturation = 1.6 at 290 K). Crystallization was observed using a $5\times$ Nikon objective. The red and blue circles show the fall of a crystal coming from the meniscus, which is shown by the shadow. The violet squares show the growth of a crystal; the same behaviour is observed for two different morphologies, shown by red arrows. The scale is given by the yellow lines, which represent $104 \mu\text{m}$.

The polymorphs were identified through single-crystal X-ray diffraction. Spontaneous nucleation always gives the same rod-like morphology, as described previously in the literature (Toth *et al.*, 2005; Srinivasan & Arumugam, 2007; Rabesiaka *et al.*, 2010; Srinivasan, 2011). The three distinct morphologies obtained by NPLIN are all the α glycine polymorph (Fig. 9). Comparison between spontaneous morphologies (Fig. 8a) and NPLIN morphologies (Figs. 8b and 9) shows the formation of morphologies not observed in α spontaneous nucleation. The laser therefore has an impact on the morphology. The morphology reported in the second line of Fig 9 looks similar to those obtained by Masuhara *et al.* (2011) with a CW laser at 1064 nm. The other two morphologies have not been clearly reported through an NPLIN experiment. Despite the fact that the single-crystal experiment has clearly identified an α polymorph, one cannot exclude the possibility that some β crystals exist, since the NPLIN morphology reported in the third line of Fig 9 is quite similar to those reported by Ferrari *et al.* (2003) grown from a mixture of water and ethanol. A transformation from β to α cannot be excluded, since polymorphic transformation has been reported in solution (Srinivasan, 2008), keeping the same morphology.

We have thus shown that the laser has an effect on the resulting morphologies. The influence of supersaturation linked to polarization has also been studied (Fig. 10). Our results show an influence of the circular polarization above a supersaturation of 1.56, with increasing γ nucleation. Below this value, there is a high nucleation rate of the α polymorph. This behaviour is observed for linear polarization whatever the supersaturation. The influence of polarization is not as strong as reported by Sun & Garetz (2006). This could be because of the incoming beam direction, which was modified in our new device [see Fig. 1 No. 8 (Sun & Garetz) and No. 10 (this work)], implying a higher energy for the setup of Sun & Garetz (2006).

Initial polymorph	Spontaneous crystallization	NPLIN crystallization	
α			α
α			α
γ			α

Figure 9 Polymorphic identification of morphologies of glycine, showing the initial polymorph powder (SEM photography) and spontaneous and NPLIN crystallization. For each of these last two, first column: microphotography from our experimental device; second column: single-crystal diffractometer photography. Crystals were identified through single-crystal diffraction. The scale is given by the coloured lines (yellow represents $104 \mu\text{m}$, red $200 \mu\text{m}$ and blue $52 \mu\text{m}$).

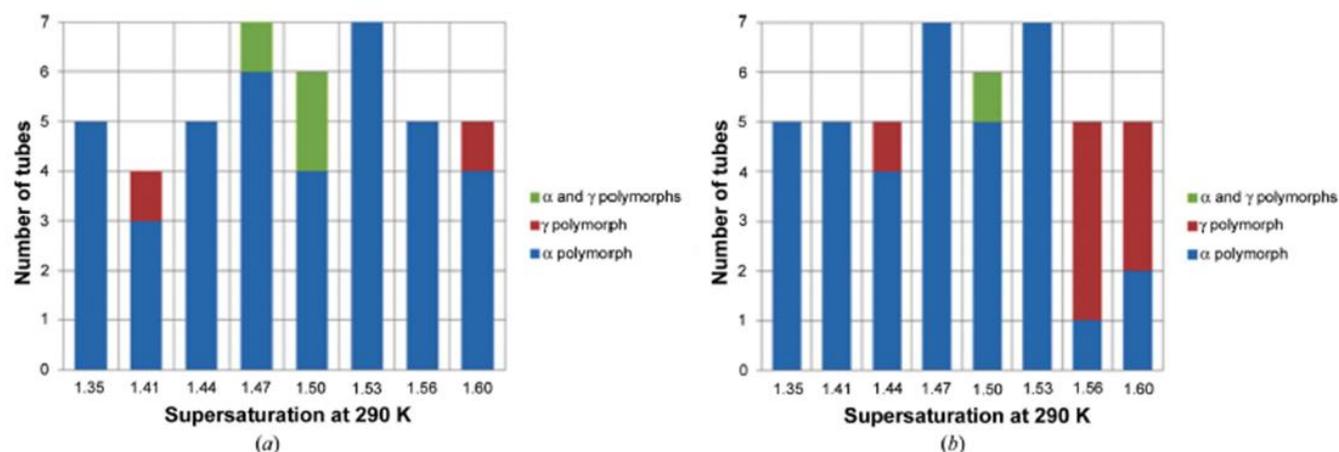


Figure 10

The nucleation rate of the α and γ polymorphs as a function of the supersaturation ratio at 290 K at an energy of 910 MW cm^{-2} . (a) Linear polarization and (b) circular polarization.

4. Conclusions

In this paper, we have adopted a new definition of experiments belonging to the non-photochemical light-induced nucleation (NPLIN) technique, despite the fact that some authors have not used this terminology in their papers. We consider that a laser which induces nucleation of a compound in solution or in the liquid state can be classed as an NPLIN experiment if the molecules forming the crystal thus obtained are not chemically modified by a light-matter interaction. A zwitterionic form is considered chemically similar in our definition. We have reviewed the different experimental setups available around the world, leading to 15 setups and nine sample-holder types covered by 40 references, including three review papers (Masuhara *et al.*, 2011; Sugiyama *et al.*, 2009; Yoshikawa *et al.*, 2014). Based on this literature and on our own laboratory experience, we have designed a new experimental setup which enables the study of a large number of samples (90) under highly controlled conditions (temperature, laser energy density, time exposure, air, moisture). A methodology has been developed based on a systematic study of the metastable zone prior to laser exposure. Using the knowledge of this metastable zone, we have performed NPLIN of several samples. We have chosen to illustrate the capacity of our experimental setup on glycine, the most studied compound *via* the NPLIN technique. Our results show that the laser stimulates nucleation inside the metastable zone [critical supersaturation constant $\beta_{c,290}(168) = 1.68$], where no spontaneous nucleation occurs. A video recorded in real time shows a short induction time (several minutes in order to detect a crystal with the camera mounted on a microscope). Particular crystal morphologies induced by the laser have been observed which are not produced by spontaneous nucleation. All the crystals formed have been identified as belonging to the α polymorph through single-crystal X-ray diffraction experiments. Furthermore, we have observed that glycine nucleates at the air-solution interface before falling down to the bottom of the tube. Nucleation efficiency *via* a laser in a non-photochemical manner has been demonstrated

at different supersaturations or laser beam energies. The higher the supersaturation constant value, the better the nucleation efficiency. A maximum efficiency is observed for glycine nucleation as a function of laser energy density, despite a slight reproducibility divergence for the highest energy. Formation of the γ -glycine polymorph is favoured with circular polarization at high supersaturation. Using the new experimental device reported in this paper, we are currently working on carbamazepine (Ikni *et al.*, 2014) and sulfathiazole (Spasojevic-de Biré *et al.*, 2014), two drugs which are highly polymorphic.

The authors warmly thank Stephane Veessler (CINaM, UMR 7325, CNRS, Campus de Luminy, Marseille, France) for fruitful discussions. We thank the technical support staff of the EM2C Laboratory (Erica Jean-Bart and Jérôme Beauvier) for their very efficient participation in the project. We also thank Jelena Matić (former PhD student at the Polytechnic University of New York, USA) and Nour Eddine Ghermani (UMR 8612, Université de Paris Sud, Châtenay-Malabry, France) for their useful suggestions on the manuscript. This project was supported by an ANR P2N grant 2010, 'NPLIN_4_drug'.

References

- Adachi, H., Takano, K., Hosokawa, Y., Inoue, T., Mori, Y., Matsumura, H., Yoshimura, M., Tsunaka, Y., Morikawa, M., Kanaya, S., Masuhara, H., Kai, Y. & Sasaki, T. (2003). *Jpn. J. Appl. Phys.* **42**, L798–L800.
- Albrecht, G. & Corey, R. B. (1939). *J. Am. Chem. Soc.* **61**, 1087–1103.
- Alexander, A. J. & Camp, P. J. (2009). *Cryst. Growth Des.* **9**, 958–963.
- Boldyreva, E. V., Drebuschak, T. N. & Shutova, E. S. (2003). *Z. Kristallogr.* **218**, 366–376.
- Chappert, A. (1977). *Etiene Louis Malus (1775-1812) et la Théorie Corpusculaire de la Lumière*. Paris: Vrin.
- Datta, S. & Grant, D. J. W. (2004). *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 42–57.
- Dawson, A., Allan, D. R., Belmonte, S. A., Clark, J., David, W. I. F., McGregor, P. A., Parsons, S., Pulham, C. R. & Sawyer, L. (2005). *Cryst. Growth Des.* **5**, 1415–1427.

- Ferrari, E. S., Davey, R. J., Cross, W. I., Gillon, A. L. & Towler, C. S. (2003). *Cryst. Growth Des.* **3**, 53–60.
- Fischer, E. (1905). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **38**, 2914–2925.
- Garetz, B. A., Aber, J. E., Goddard, N. L., Young, R. G. & Myerson, A. S. (1996). *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3475–3476.
- Garetz, B. A. & Matić, J. (2002). *Phys. Rev. Lett.* **89**, 175501.
- Goryainov, S. V., Boldyreva, E. V. & Kolesnik, E. N. (2006). *Chem. Phys. Lett.* **419**, 496–500.
- Hosokawa, Y., Adachi, H., Yoshimura, M., Mori, Y., Sasaki, T. & Masuhara, H. (2005). *Cryst. Growth Des.* **5**, 861–863.
- Huang, L. F. & Tong, W. Q. (2004). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 321–334.
- Iefuji, N., Murai, R., Maruyama, M., Takahashi, Y., Sugiyama, S., Adachi, H., Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T., Mori, Y., Koga, Y., Takano, K. & Kanaya, S. (2011). *J. Cryst. Growth*, **318**, 741–744.
- Iitaka, Y. (1958). *Acta Cryst.* **11**, 225–226.
- Iitaka, Y. (1960). *Acta Cryst.* **13**, 35–45.
- Iitaka, Y. (1961). *Acta Cryst.* **14**, 1–10.
- Ikni, A., Clair, B., Scoufflaire, P., Veessler, S., Gillet, J.-M., El Hassan, N., Dumas, F. & Spasojević-de Biré, A. (2014). *Cryst. Growth Des.* In the press. doi:10.1021/cg500163c.
- Jacob, J. A., Sorgues, S., Dazzi, A., Mostafavi, M. & Belloni, J. (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 5980–5985.
- Kashchiev, D., Verdoes, D. & Vanrosmalen, G. M. (1991). *J. Cryst. Growth*, **110**, 373–380.
- Knott, B. C., LaRue, J. L., Wodtke, A. M., Doherty, M. F. & Peters, B. (2011). *J. Chem. Phys.* **134**, 171102.
- Lee, I. S., Evans, J. M. B., Erdemir, D., Lee, A. Y., Garetz, B. A. & Myerson, A. S. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**, 4255–4261.
- Liu, T. H., Uwada, T., Sugiyama, T., Usman, A., Hosokawa, Y., Masuhara, H., Chiang, T. W. & Chen, C. J. (2013). *J. Cryst. Growth*, **366**, 101–106.
- Mangin, D., Puel, F. & Veessler, S. (2009). *Org. Process Res. Dev.* **13**, 1241–1253.
- Marsh, R. E. (1958). *Acta Cryst.* **11**, 654–663.
- Masuhara, H., Sugiyama, T., Rungsimanon, T., Yuyama, K., Miura, A. & Tu, J. R. (2011). *Pure Appl. Chem.* **83**, 869–883.
- Matić, J. (2004). PhD thesis, Polytechnic University of New York, USA.
- Matić, J., Sun, X. & Garetz, B. A. (2005). *Cryst. Growth Des.* **5**, 1565–1567.
- Murai, R., Yoshikawa, H. Y., Hasenka, H., Takahashi, Y., Maruyama, M., Sugiyama, S., Adachi, H., Takano, K., Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T. & Mori, Y. (2011). *Chem. Phys. Lett.* **510**, 139–142.
- Murai, R., Yoshikawa, H. Y., Takahashi, Y., Maruyama, M., Sugiyama, S., Sasaki, G., Adachi, H., Takano, K., Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T. & Mori, Y. (2010). *Appl. Phys. Lett.* **96**, 043702.
- Nakamura, K., Sora, Y., Yoshikawa, H. Y., Hosokawa, Y., Murai, R., Adachi, H., Mori, Y., Sasaki, T. & Masuhara, H. (2007). *Appl. Surf. Sci.* **253**, 6425–6429.
- Nakamura, K., Hosokawa, Y. & Masuhara, H. (2007). *Cryst. Growth Des.* **7**, 885–889.
- Nakayama, S. *et al.* (2013). *Cryst. Growth Des.* **13**, 1491–1496.
- Rabesiaka, M., Sghaier, M., Fraisse, B., Porte, C., Havet, J.-L. & Dichi, E. (2010). *J. Cryst. Growth*, **312**, 1860–1865.
- Revalor, E., Hammadi, Z., Astier, J.-P., Grossier, R., Garcia, E., Hoff, C., Furuta, K., Okustu, T., Morin, R. & Veessler, S. (2010). *J. Cryst. Growth*, **312**, 939–946.
- Rodriguez-Spong, B., Price, C., Jayasankar, A., Matzger, A. J. & Rodriguez-Hornedo, N. (2004). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 241–274.
- Rungsimanon, T., Yuyama, K., Sugiyama, T., Masuhara, H., Tohna, N. & Miyata, M. (2010). *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 599–603.
- Shekunov, B. Y. & York, P. (2000). *J. Cryst. Growth*, **211**, 122–136.
- Soare, A., Dijkink, R., Pascual, M. R., Sun, C., Cains, P. W., Lohse, D., Stankiewicz, A. I. & Kramer, H. J. M. (2011). *Cryst. Growth Des.* **11**, 2311–2316.
- Spasojević-de Biré, A. (2013). *Int. Innov.* pp. 45–49.
- Spasojević-de Biré, A., Li, W. & Ikni, A. (2014). Unpublished results.
- Srinivasan, K. (2008). *J. Cryst. Growth*, **311**, 156–162.
- Srinivasan, K. (2011). *J. Cryst. Growth*, **311**, 156–162.
- Srinivasan, K. & Arumugam, J. (2007). *Opt. Mater.* **30**, 40–43.
- Sugiyama, T., Adachi, H. & Masuhara, H. (2009). *Chem. Lett.* **38**, 482–483.
- Sun, X. & Garetz, B. A. (2006). *Cryst. Growth Des.* **6**, 684–689.
- Sun, X. & Garetz, B. A. (2009). *Phys. Rev. E*, **79**, 021701.
- Sun, X., Garetz, B. A. & Myerson, A. S. (2008). *Cryst. Growth Des.* **8**, 1720–1722.
- Taleb, M., Didierjean, C., Jelsch, C., Mangeot, J. P. & Aubry, A. (2001). *J. Cryst. Growth*, **232**, 250–255.
- Toth, J., Kardos-Fodor, A. & Halasz-Peterfi, S. (2005). *Chem. Eng. Process.* **44**, 193–200.
- Tsuboi, Y., Shoji, T. & Kitamura, N. (2007). *Jpn. J. Appl. Phys.* **46**, L1234–L1236.
- Tsunesada, F., Iwai, T., Watanabe, T., Adachi, H., Yoshimura, M., Mori, Y. & Sasaki, T. (2002). *J. Cryst. Growth*, **237–239**, 2104–2106.
- Uwada, T., Fuji, S., Sugiyama, T., Usman, A., Miura, A., Masuhara, H., Kanaizuka, K. & Haga, M. (2012). *Appl. Mater. Interfaces*, **4**, 1158–1163.
- Virone, C., Kramer, H. J. M., Van Rosmalen, G. M., Stoop, A. H. & Bakker, T. W. (2006). *J. Cryst. Growth*, **294**, 9–15.
- Ward, M. R. & Alexander, A. J. (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 4554–4561.
- Ward, M. R., Ballingall, I., Costen, M. L., McKendrick, K. G. & Alexander, A. J. (2009). *Chem. Phys. Lett.* **481**, 25–28.
- Ward, M. R., Copeland, G. W. & Alexander, A. J. (2011). *J. Chem. Phys.* **135**, 114508.
- Ward, M. R., McHugh, S. & Alexander, A. J. (2012). *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 90–93.
- Yang, X., Wang, X. & Ching, C. B. (2008). *J. Chem. Eng. Data*, **53**, 1133–1137.
- Yennawar, N., Denev, S., Gopalan, V. & Yennawar, H. (2010). *Acta Cryst. F* **66**, 969–972.
- Yoshikawa, H. Y., Hosokawa, Y. & Masuhara, H. (2006). *Cryst. Growth Des.* **6**, 302–305.
- Yoshikawa, H. Y., Murai, R., Adachi, H., Sugiyama, S., Maruyama, M., Takahashi, Y., Takano, K., Matsumura, H., Inoue, T., Murakami, S., Masuhara, H. & Mori, Y. (2014). *Chem Soc Rev.* **43**, 2147–2158.
- Yoshikawa, H. Y., Murai, R., Sugiyama, S., Sasaki, G., Kitatani, T., Takahashi, Y., Adachi, H., Matsumura, H., Murakami, S., Inoue, T., Takano, K. & Mori, Y. (2009). *J. Cryst. Growth*, **311**, 956–959.
- Yu, L. & Ng, K. (2002). *J. Pharm. Sci.* **91**, 2367–2375.
- Yuyama, K., Rungsimanon, T., Sugiyama, T. & Masuhara, H. (2012). *Cryst. Growth Des.* **12**, 2427–2434.
- Yuyama, K., Sugiyama, T. & Masuhara, H. (2010). *J. Phys. Chem. Lett.* **1**, 1321–1325.
- Zaccaro, J., Matic, J., Myerson, A. S. & Garetz, B. A. (2001). *Cryst. Growth Des.* **1**, 5–8.

Supporting information

Table S1 Acronyms used in various papers for describing the LASER induced nucleation experiments.

Acronym		References
NPLIN	Non Photochemical LASER Induced Nucleation	1,2,3,4,5,6,7,17,19,20,21,22,23,24,38,
LIM	LASER Induced Method	15
LIGHT	LASER Irradiated Growth Technique	9
FLI	Femtosecond LASER Irradiation	10
FCWNILB	Focus Continous Waves Near Infared LASER Beam	25
LIN	LASER Induced Nucleation	8,30
LIC	LASER Induced Cavitation	31
FLIN	Femtosecond LASER Induced Nucleation	11,13,18,27,32
PCWLB	Polarized Continous Waves LASER Beam	33
SLP	Single LASER Pulsed	36
SFL	Single Femtosecond LASER	37

1 = (Garetz et al., 1996), 2 = (Zaccaro et al., 2001), 3 = (Garetz & Matic, 2002), 4 = (Matic et al., 2005), 5 = (Sun & Garetz, 2006), 6 = (Sun et al., 2008), 7 = (Alexander & Camp, 2009), 8 = (Knott et al, 2011), 9 = (Adachi et al., 2003), 10 = (Nakamura, Sora et al., 2007), 11 = (Murai et al., 2010), 12 = (Yennawar et al., 2010), 13 = (Nakayama et al., 2013), 14 = (Hosokawa et al., 2005), 15 = (Tsunesada, 2002), 16 = (Nakamura, Hosokawa et al., 2007), 17 = (Lee et al., 2008), 18 = (Yoshikawa et al., 2009), 19 = (Sun & Garetz, 2009), 20 = (Alexander & Camp, 2009), 21 = (Ward et al., 2009), 22 = (Ward et al., 2011), 23 = (Ward & Alexander, 2012), 24 = (Ward et al., 2012), 25 = (Rungsimanon et al., 2010), 26 = (Yuyama et al., 2012), 27 = (Nakayama et al., 2013), 28 = (Yuyama et al., 2010), 29 = (Iefuji et al., 2011), 30 = (Soare et al., 2011), 31 = (Murai et al., 2011), 32 = (Yuyama et al., 2012), 33 = (Uwada et al., 2012), 34 = (Tsuboi et al., 2007), 35 = (Jacob et al., 2012), 36 = (Liu et al., 2013), 37 = (Spasojevic-de Biré, 2013), 38 = (Ikni et al., 2014).

Table S2 Needs and solution developed in our high-throughput NPLIN experimental setup.

	Needs	Solutions
Sample holder	Use small quantity of chemicals	HPLC tube
	Have a better experimental statistics	A sampler holder designed to carry 90 tubes
	Avoid focusing from the tube	Beam comes from the top of the tube through planar glass plate
	Keep temperature constant	Design the sample holder to allow a coolant flow.
	Expose each sample to the LASER and observe each samples	Design of a rotatiting carrousel controlled by a step by step motor.
	Allow entry of the beam from the top	Plug hole with a glass plate. The seal will be provided by a joint
Temperature control	Control sample's temperature	Coolant flow
	Distribute the coolant	Cryothermostat (closed circuit)
	Control coolant's temperature	Thermocouples
Optical path	Control exposure time	Electronic shutter
	Record beam intensity	Wattmeter
	Real time recording of the beam intensity	Deviation of a small part of the beam using a thin glass plate
	Redirect beam to the tube at 90°	Mirror
<i>In situ</i> following	Follow <i>in situ</i> nucleation	Optical <i>in situ</i> following
		Inverted microscope
	Record real time nucleation	CCD Camera
Automation	Have a versatile automated high-throughput experiment	Write a complete specifications manual
		LabView programming
Ergonomy	Access to the information at any time of the experiment	Development of a human / machine interface
	Safe of the operator environment	Movable cover to completely isolate the optical region of the outer
	Permit movement of the handling	Mobile trolley

Table S3 Initial polymorph used in this paper and experimental conditions.

Figure	Initial polymorph	Product	Supersaturation	Temperature (K)	mass (mg) for one mL
5	γ	Sigma Aldrich G 7126	1.11 - 2.23	290	205.2 (1.1) - 317.13 (1.7)
6	γ	Sigma Aldrich G 7126	1.11 - 1.68	290	205.2 (1.1) - 279.8 (1.5)
7	α	Peptides international	1.45	293	287.3
8a	α	Peptides international	1.8	290	358.02
8b	α	Peptides international	1.45	290	270.5
10	α	Peptides international	1.35 - 1.6	290	251 (1.35) - 297 (1.6)

Figure S1 Non-Photochemical LASER-induced Nucleation experiments definition.

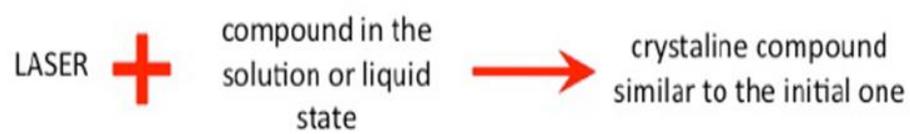
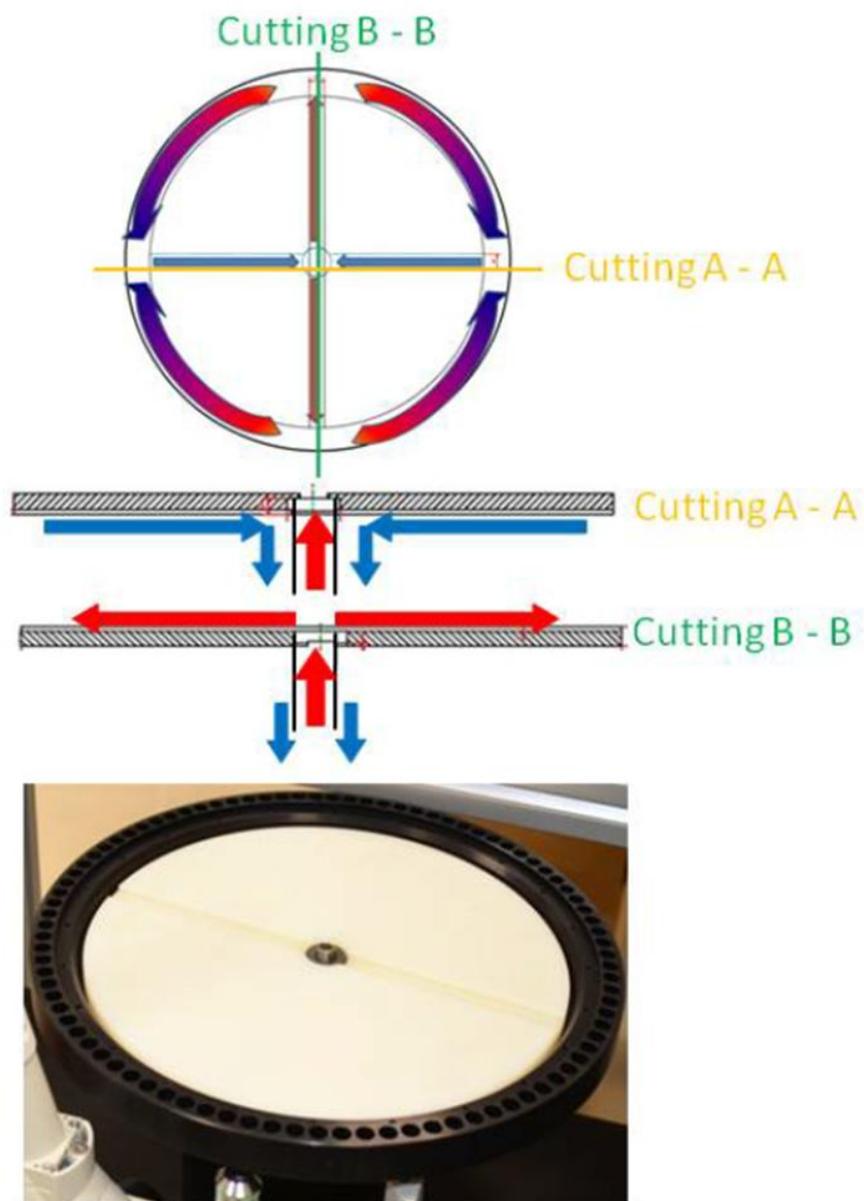


Figure S2 Schematic representation of the fluid inside the carousel setup.



Experimental Demonstration of the Carbamazepine Crystallization from Non-photochemical Laser-Induced Nucleation in Acetonitrile and Methanol

Published as part of the *Crystal Growth & Design virtual special issue IYCr 2014 - Celebrating the International Year of Crystallography*.

Aziza Ikni,^{†,‡} Bertrand Clair,^{†,‡} Philippe Scouflaire,^{†,§} Stéphane Veessler,^{||} Jean-Michel Gillet,^{†,‡} Nouha El Hassan,^{†,‡} Françoise Dumas,[⊥] and Anne Spasojević-de Biré^{*,†,‡}

[†]Ecole Centrale Paris, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France

[‡]CNRS, UMR 8580, Laboratory "Structures Propriétés et Modélisation des Solides" (SPMS), Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France

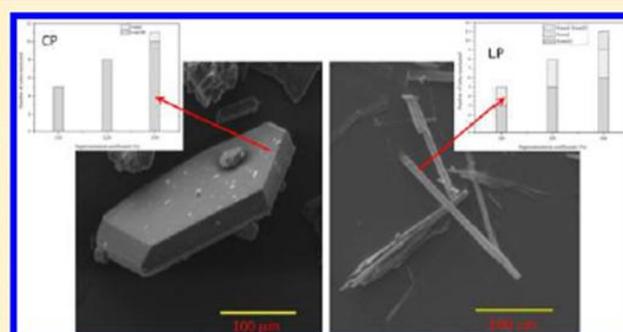
[§]CNRS, UPR 288, Laboratory "Energétique Moléculaire et Macroscopique, Combustion" (EM2C), Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France

^{||}CINaM-CNRS, Aix-Marseille Université, Campus de Luminy F-13288 Marseille, France

[⊥]CNRS, UMR 8076, Laboratory BIOCIS, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France

S Supporting Information

ABSTRACT: This paper reports for the first time the crystallization of the carbamazepine (CBZ) molecule in two solvents (methanol and acetonitrile) using the non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN) technique. The metastable zone of CBZ is first determined experimentally for different temperatures in both solvents. Then, the prepared solutions are irradiated by a 532 nm wavelength nanosecond pulsed laser and permitted to obtain CBZ crystals of phases I and III. The impact of laser power and polarization (circularly (CP) and linearly (LP)) on the CBZ crystallization efficiency in both solvents is determined through experiments. According to the results, the crystallization efficiency is significantly higher in methanol than in acetonitrile, and it is higher in solutions irradiated by CP laser than those by LP laser. Moreover, the irradiation of an acetonitrile solution by a LP laser results in CBZ phase III crystals. An *ab initio* determination of the interaction energy of different pairs of CBZ has been carried-out that enables the explanation of the nucleation in acetonitrile for both polarizations. In methanol, only CBZ phase III is obtained, which is in agreement with the ability of methanol to create noncovalent interactions preventing the CBZ phase I and II nucleation.



1. INTRODUCTION

Crystallization is an important separation and purification process employed to produce a wide variety of materials in industries. Crystallization plays a vital role in the pharmaceutical industry since it is a process that is used during final and intermediate stages of the manufacturing process of active pharmaceutical ingredients (APIs). The operating conditions of the crystallization process determine the physical properties of the APIs such as the crystal purity, phase, shape, and size distribution. Moreover, these properties determine the efficiency of downstream operations, such as filtration, drying, and formulation, and the product effectiveness, such as bioavailability and shelf life. For pharmaceutical APIs that

exhibit various phases or stereoisomers, the crystallization process also affects the phase produced and the extent of chiral separation.¹ Indeed, different phases of a drug substance can have different chemical and physical properties. These properties can affect the ability to process or manufacture the drug substance and the drug product, as well as on drug product stability, dissolution, and bioavailability. Therefore, polymorphism can affect the quality, safety, and efficacy of the drug product.^{2–6} Many examples are reported in literature; see,

Received: January 29, 2014

Revised: May 29, 2014

for instance, the report on ritonavir and rotigotine.⁶ These works highlight the importance of polymorphism study during the process of manufacturing of drugs. All these examples clearly show that it is highly important to make the required polymorphic form, because the other forms may not show the desired effects. Therefore, polymorphism control is an important step. Within this context, the work described in this paper aims at demonstrating experimentally the crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs) using the non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN) technique. The carbamazepine ($C_{15}H_{12}N_2O$, CBZ) molecule (Figure 1a) was selected mainly because, in pharmaceutical research, it

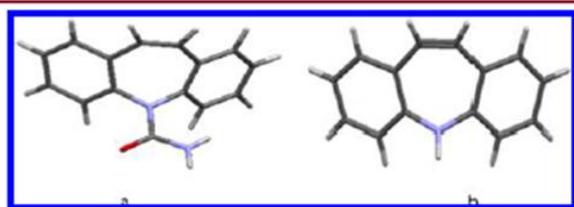


Figure 1. Molecular structure of carbamazepine (a) and iminostilbene (b).

has been extensively studied as a model compound for solid-form discovery and control since it is known to form four different anhydrous phases (or four different polymorphs). The complete list of references, with the different nomenclature of these four CBZ polymorphs is reported by Grzesiak et al.⁸ The lattice data for the four crystallographic forms are summarized in Table S1 provided as Supporting Information. In addition to these four polymorphic forms, more than 60 solvates, hydrates, and cocrystals have been identified and characterized.^{9,10} According to experimental⁸ and computational results,⁹ the theoretical stability order of the four polymorphs at ambient temperature and at 0 K is phase III > phase I > phase IV > phase II. The commercially available form is phase III. It can be crystallized from various solvents with high dielectric constants.

This paper begins with a bibliographical description of the works reported in literature that deal with crystallization mainly based on the NPLIN technique. It presents the possibility of obtaining CBZ crystals in methanol and acetonitrile using the NPLIN technique. We show that CBZ nucleation is launched and controlled by the laser power in the metastable zone and define the experimental conditions to produce good quality CBZ crystals. We measure the CBZ metastable zone in methanol and acetonitrile at different temperatures: 5, 20, 30, and 40 °C. The solutions are irradiated by a 532 nm wavelength laser. Moreover, different laser power values and polarizations, linear and circular, are used to study the impact of laser on crystallization efficiency as well as on polymorphic form. Finally, an *ab initio* determination of the interaction energy of different CBZ molecule pairs are performed in order to understand the behavior of the nucleation in acetonitrile within the two polarizations.

2. BRIEF BIBLIOGRAPHIC SURVEY OF UNUSUAL POLYMORPHISM AND NUCLEATION CONTROL TECHNIQUES

Research on polymorphism and material properties of active drug compounds is an integral part of drug development. In this paper, we will not discuss the usual approach consisting of studying the effect of the solute concentration, temperature,

medium of crystallization, and hydrodynamics on the crystallization and polymorphism,^{2,11} but we will focus on crystallization experiments based on the use of a laser as an external field. It should be noted that other external fields were also reported in the literature, such as ultrasound,^{12–14} magnetic field, and electric field.^{15–18} The main objective of using external fields is nucleation control.¹⁹ The impacts of an externally applied field on the crystal growth in solutions were highlighted by Voss²⁰ and Oxtoby.²¹ This field influences nucleation, through molecular orientation, as well as density fluctuation. The most documented technique is the light induced nucleation technique that can be subdivided into two categories: photochemical light-induced nucleation (PLIN) and non-photochemical laser-induced nucleation (NPLIN). In PLIN experiments, the light has sufficient energy to cause ionization or to create radicals that subsequently react to produce nucleation centers,²² whereas in the NPLIN experiments, the laser is at wavelength in the nonabsorbing zone of the solute molecule.⁷ In the following, we will give an overview of the work reported in literature for both categories.

2.1. Photochemical Light-Induced Nucleation. The PLIN technique is a nucleation process that is accompanied by a chemical reaction induced by light. This was first reported in solution by Tyndall²³ and then in the vapor phase as laser snow.²⁰ Then, many papers were reported in the literature as detailed in this section. Indeed, Okutsu et al.²² found an effect of laser radiation on the nucleation of benzophenone in ethanol/water mixed solution. The irradiation of supersaturated solutions results in the formation benzopinacol precipitants, which is related to photochemistry phenomena. The obtained crystal was composed of benzopinacol produced from excited benzophenone through a benzophenone ketyl radical. Later, Okutsu et al.²⁴ showed that the irradiation of a metastable supersaturated lysozyme solution by a xenon lamp induces nucleation. It was observed that irradiation of lysozyme molecules in solution enhances the attractive interaction between molecules in solution. They also observed that there is an irradiation time beyond which the protein is denatured. Veessler et al.²⁵ proposed seeding nonirradiated solutions of lysozyme with limited amounts of irradiated lysozyme solution, in order to avoid denaturation of protein by excessive irradiation. Moreover, it was demonstrated by absorption experiments that the irradiation of lysozyme,²⁵ thaumatin,²⁶ and ribonuclease²⁷ produces photochemical intermediates, neutral radicals, which enhance nucleation.

However, the fact that the PLIN involves a chemical reaction and a formation of radicals could be undesirable in some cases. This limitation can be overcome through the use of the NPLIN technique as explained hereafter.

2.2. Non-Photochemical Laser-Induced Nucleation. In this case, the laser wavelength is chosen so that it will not be absorbed by the solution, and therefore the nucleation is not accompanied by a photochemical reaction. NPLIN was first observed by Tam et al.²⁸ These authors studied cesium vapors with small amount of hydrogen and observed that upon irradiation by a laser, some particles appeared, which they identified as cesium-hybrid crystals. More recently Garetz et al.^{29,30} have reported experimental results showing that polymorphism control can be achieved through NPLIN. The first experiments were done with supersaturated urea solutions.⁷ From analysis of the obtained results, they suggested that the optical Kerr effect was responsible for the alignment of molecules due to the electric field. Since then, extensive

research was carried out in this area, and numerous papers were reported in literature as summarized on Table 1. Note that some of these papers do not use the NPLIN term for defining the reported experiment. In this paper, we use the acronym NPLIN for all the experiments in which a supersaturated solution irradiated using a laser results in the formation of a crystalline compound without change of its chemical formula.

These works can be decomposed into four main categories: small organic molecules, inorganic molecules, protein molecules, and miscellaneous. These categories are briefly described hereafter. For all these categories, the laser that is employed to enhance nucleation is either of pulsed or continuous type and could be focalized or not. In the case of pulsed type laser, the laser pulse duration is nanosecond, femtosecond, or picosecond range. An analysis of the experimental setups used in these experiments has been described by Clair et al.³¹

2.2.1. Small Organic Molecules. Glycine,^{29,30,32–36} urea,^{7,37} L-histidine,³⁸ 4-(dimethylamino)-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST),^{39,40} and glacial acetic acid⁴¹ molecules have been crystallized by means of the NPLIN method.

Garetz et al.³⁰ demonstrated experimentally the nucleation of glycine in aqueous supersaturated solutions using a nanosecond unfocalized pulsed laser. The paper reports that the control of polymorphism of glycine was achieved through the control of laser polarization (linear polarization (LP) or circular polarization (CP)) in a specific range (1.46–1.55) of supersaturated solution. According to their conclusions, the LP laser results in γ polymorph and the CP laser leads to α polymorph, which is called switch window. The provided interpretation for the nucleation is based on the reorientation of the molecules under an intense electromagnetic field, and crystallization is triggered by the optical Kerr effect. Rungsimanon et al.³³ studied the crystallization of glycine in unsaturated heavy water solution by irradiating the solution with a LP continuous and focalized laser type at a 1064 nm wavelength. The obtained crystal is of γ form. The control mechanism was explained in terms of a local variation of a supersaturation value induced by laser trapping of the liquid-like clusters and the subsequent temperature increase. According to the paper, this form cannot be obtained by the classical crystallization techniques. Yuyama et al.³⁴ demonstrated that under specific solution conditions: supersaturated or undersaturated or saturated and under specific laser polarization, it is possible to achieve a selective crystallization of α and γ polymorphs of glycine. According to their results, supersaturated/saturated solutions irradiated by a low power CP laser enhances γ crystal formation, while for unsaturated solution, LP laser at a specific power (1.4 W) increases the probability of γ crystals formation. Recently Liu et al.³⁶ have demonstrated a femtosecond laser-induced crystallization of glycine in its aqueous supersaturated solution. They found that crystal morphology of crystals prepared by cavitation bubble formation upon femtosecond irradiation into solution depends on the laser repetition rate. Lower repetition rate of femtosecond laser irradiation tends to result in single crystal formation. Moreover, they found an increase in crystallization probability at air/solution interface, which means an important interplay between molecular adsorption and spatial limitation of mechanical stress induced by bubble formation and then cavitations. However, the authors did not give information about the obtained polymorphic form.

Sun et al.³⁸ reported polarization switching of polymorphs in laser irradiated L-histidine supersaturated solutions in the range 1.4–1.6. CP laser leads to orthorhombic A polymorph, whereas

LP laser leads to a mixture of both orthorhombic A and orthorhombic B crystalline forms.

Regarding DAST, Hosokawa et al.⁴⁰ demonstrated experimentally the efficiency of femtosecond laser pulses in the crystallization of supersaturated methanol solutions of DAST.

2.2.2. Small Inorganic Molecules. The application of the NPLIN technique to the inorganic molecules was demonstrated, for the first time, by Alexander et al.^{42–45} on the crystallization of KCl. Later, other works were reported in the literature concerning KBr,⁴⁵ NaClO₃,⁴⁶ KMnO₄ and (NH₄)₂SO₄,⁴⁷ and KNO₃.⁴⁸ According to Alexander and Camp,⁴² a single, 7 ns pulse of near-infrared (1064 nm) laser light is sufficient to grow a single crystal of supersaturated aqueous potassium chloride in the range 1.05–1.10. Moreover, the nucleation is likely enhanced through the isotropic electronic polarization of subcritical KCl clusters by laser light and a decrease in the free-energy surface on which a small proportion of the clusters become supercritical. The work reported by Duffus et al.⁴³ on the same molecule in agarose gel permitted spatial control of crystal nucleation using NPLIN and demonstrated that the NPLIN efficiency depends on the peak power density of the laser pulse and not on the total energy delivered to the solution. Ward and Alexander⁴⁵ studied the impact of both laser wavelength and temperature on the NPLIN of KCl and KBr from supersaturated aqueous solutions. They reported that solutions irradiated with 532 nm pulses resulted in a lower threshold power to nucleation than 1064 nm pulses. Ward et al.⁴⁶ have also investigated NPLIN in molten sodium chlorate (NaClO₃). They demonstrated a propensity toward nucleation of the same enantiomorph (levorotatory or dextrorotatory) of the cubic phase that was used prior to melting. The nucleation mechanism is most likely heterogeneous.

2.2.3. Proteins Molecules. Many experimental studies were reported in literature; the most studied protein is hen egg-white lysozyme (HEWL). The first report of the NPLIN of protein molecules was by Adachi et al.⁴⁹ They used a focused femtosecond laser pulse of 780 nm wavelength in order to induce nucleation of HEWL. It was observed that the number of nucleated HEWL crystals strongly depends on laser irradiation conditions. Indeed, the number of created crystals increases with the number of laser pulses. The following reported works focused on the nucleation of the same protein in an aqueous solution^{50,51,56} or in gel solution media.^{52,53,57} To study the nucleation of HEWL in a solution, Lee et al.⁵⁰ employed unfocalized nanosecond and picosecond pulsed lasers, instead of a focused femtosecond pulsed laser. They noticed that NPLIN in lysozyme solutions was more efficient with shorter aging time, 532 nm wavelength, higher peak intensity, and shorter pulse duration. According to their conclusions, the nucleation mechanism could be attributed to electric-field-induced reorganization in conjunction with the increased concentration fluctuations. Tsuboi et al.⁵¹ demonstrated the nucleation of lysozyme in heavy water by photon pressure generated by a continuous wavelength 1064 nm laser beam during 1–2 h. They observed lysozyme molecular aggregates. For the sake of understanding the nucleation mechanism of proteins, the solution is replaced by a gel.⁵³ In free solution, when an external field is applied its effect is counteracted by rehomogenizing the solution by convection; therefore different authors^{53–55} proposed the use of a gel medium (poly(ethylene glycol), PEG 6000, or agarose gel) to suppress diffusion of clusters, nuclei, and crystals in

Table 1. NPLIN on Different Compounds as Reported in the Literature^a

compound	solvent	year	ref	laser type	λ (nm)	polymorph control through laser polarization
urea	water	1996	7	P, ns, nloc	1064	
		2005	37	P, ns, nloc	1064	
glycine	water	2001	28	P, ns, nloc	1064	supersaturated solutions: γ polymorph (LP); α polymorph (CP)
		2002	29	P, ns, nloc	1064	
		2006	32	P, ns, nloc	1064	
	heavy water	2010	33	CW, foc	1064	saturated/supersaturated solutions: CP laser irradiation enhances γ -polymorph; LP irradiation enhances α -polymorph. unsaturated solutions: LP irradiation enhances γ -polymorph; CP irradiation enhances α -polymorph.
		2012	34	CW, foc	1064	
L-histidine	water	2012	35	CW, foc	1064	supersaturated solutions: CP light favors the formation of polymorph A; LP light favors the formation of a mixture of polymorphs A and B
		2013	36	P, fs, foc	780	
		2008	38	P, ns, nloc	532	
DAST	water	2002	39	P, ns, foc	1064	
		2005	40	P, fs, foc	800	
glacial acetic acid	methanol	2012	41	P, ns, nloc	1064	
KCl	water	2009	42	P, ns, nloc	1064	
		2009	43	P, ns, nloc	1064	
KCl and KBr	water	2009	44	P, ns, nloc	1064	
		2012	45	P, ns, nloc	532	
NaClO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ and KMnO ₄ KNO ₃	methanol/ethanol water	2011	46	P, ns, foc	1064	
		2011	47	P, ns, foc	532	
		2012	48	P, ns, foc	532	
lysozyme	sodium acetate buffer	2003	49	P, fs, foc	780	Protein
		2008	50	P, ns, nloc	1064	
lysozyme/BPT	heavy water/sodium acetate buffer/NaCl	2007	52	CW, foc	1064	
lysozyme	sodium acetate buffer/gel medium (PEG 6000)	2007	53	P, fs, foc	780	
		2009	54	P, fs, foc	780	
lysozyme, thaumatin	agarose gel/N-[2-acetamido]-2-					

D

dx.doi.org/10.1021/cg500163c | Cryst. Growth Des. XXXX, XXX, XXX–XXX

Table 1. continued

compound	solvent	year	ref	laser type	λ (nm)	polymorph control through laser polarization
lysozyme	iminodiacetic acid (ADA)	2010	56	P, fs, foc	780	
lysozyme, ribonuclease B, sorbitol dehydrogenase, glucose dehydrogenase, fructose dehydrogenase, myoglobin	agarose gel/NaAc buffer	2010	57	P, ps, foc	532	
lysozyme	sodium acetate buffer	2011	58	P, fs, foc	780	
	agarose gel/sodium acetate buffer/NaCl	2013	59	P, fs, foc	780/800	
supercooled 4- <i>n</i> -pentyl-4-cyanobiphenyl (5CB)		2012	60	P, ns, nfoc	1064	
liquid crystal						
alkali-metal vapor		1975	26	CW, foc	589	
carbonated water		2011	61			

*P = pulsed laser; CW = continuous wave laser. Pulsation length: fs = femtosecond; ps = picosecond; ns = nanosecond; foc = focalized, nfoc = not focalized, LP = linear polarization, CP = circular polarization.

crystallization experiments in presence of external fields. According to Nakamura et al.⁵³ the femtosecond laser-induced shockwave and cavitation bubble generation processes are key factors for crystallization. Later, similar experimental works^{54–58} confirmed the provided explanation for the nucleation mechanism in these experimental conditions.

2.2.4. Miscellaneous. This category concerns NPLIN of liquid crystals or gas bubbles. For instance, Sun and Garetz⁶⁰ studied a single-component liquid crystalline phase transition in supercooled 40-*n*-pentyl-4-cyanobiphenyl. According to their results, the nematic director showed a tendency to align with the linear polarization vector of the laser, and the authors concluded that the order is transferred by enhancing fluctuations in the nematic phase in the direction of the electric field of the laser. Moreover Knott et al.⁶¹ demonstrated that laser pulses of similar duration, intensity, and wavelengths can induce the nucleation of CO₂ bubbles in carbonated water. They have shown that the threshold pulse energy to induce CO₂ nucleation decreases with an increase of solution supersaturation.

From the above overview, summarized in Table 1, we can note that most of the reported works have dealt with nucleation of molecules in aqueous supersaturated solutions. The work presented in this paper addresses the nucleation of organic molecule in organic solvents.

3. MATERIALS, METHODS, AND EXPERIMENTS

3.1. Material. Commercial carbamazepine (>99%, polymorph III powder) was obtained from Enzo Life Sciences company and stored at 4 °C. Absolute methanol (>99.8%) and acetonitrile (>99.9%), purchased from Merck (Darmstadt, Germany), were used as the crystallization solvents.

3.2. Laser Irradiation Bench Setup and Parameters. An overview of the homemade setup that we specially developed for the NPLIN experiments is given in Figure 2. An annular laser light beam is generated by a Quanta-ray Q-switched Nd:YAG laser, producing a 10 pulses per second train of linearly polarized 7 ns laser pulses at 532 nm. The irradiation duration time control is achieved using a shutter, Thor Lab (SC05/SH 10). For all the experiments, the exposure duration is 1 min. The reduction of the laser beam diameter could be done through two types of equipment, a laboratory made telescope with a nitrogen gas circulation for avoiding plasma discharge at the focal point and a commercial condenser (HEBX-3X from Melles Griot). This equipment permits reduction of the beam size from 7 to 3.5 mm. The linearly polarized light is converted to circular polarization by sending it through a Glan polarizer followed by a quarter wave plate. A mirror is employed to reflect the beam by 90° in order to direct it toward the HPLC tube. The laser power is measured right after the laser source by making use of a mirror that reflects a portion of the laser beam, and its intensity is measured using a wattmeter (QE2SLB-S-MB). More details on the experimental set up can be found in Clair et al.³¹

After preparing the solutions in the tubes and then placing them on the thermostatic sample holder in a circulating bath at 20 °C, we adjust the different parameters of the laser used to irradiate the tubes. The sample holder is then set to rotation in order to irradiate the 90 tubes one by one with the laser beam. However, it should be noted that for the CP laser, the power intensity is limited to 0.35 GW/cm². Each tube is observed under an inverted microscope, and microphotographs are taken using a CCD camera connected to the microscope at regular time intervals in order to follow the evolution of the crystallization. For each tube, the first microphotograph was taken right after irradiation with the laser, and the last one was taken 3 h after irradiation. The different microphotographs were then digitally stored in a computer for further analysis.

3.3. The CBZ Metastable Zone and Spontaneous Nucleation. In order to demonstrate the impact of laser radiation on the formation

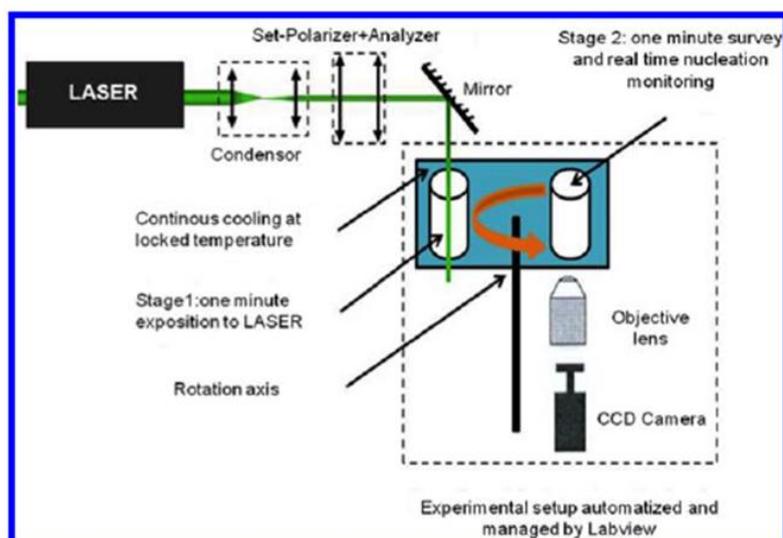


Figure 2. Schematic representation of motorized laser irradiation setup.

Table 2. Experimental Conditions for Metastable Zone Width Determination

supersaturation coefficient (β , %)	CBZ concn (mg/mL in acetonitrile)				CBZ concn (mg/mL in MeOH)			
	5 °C	20 °C	30 °C	40 °C	5 °C	20 °C	30 °C	40 °C
110	24.6	38.7	52.8	71.2	47.8	72.8	98.2	132.8
120	26.8	42.2	57.6	77.7	52.2	79.4	107.1	144.9
130	29.1	45.7	62.4	84.2	56.5	86.1	116.1	157.0
140	31.3	49.2	67.2	90.7	60.9	92.6	125.0	169.1
150	33.6	52.8	72.0	97.2	65.2	99.3	133.9	181.2

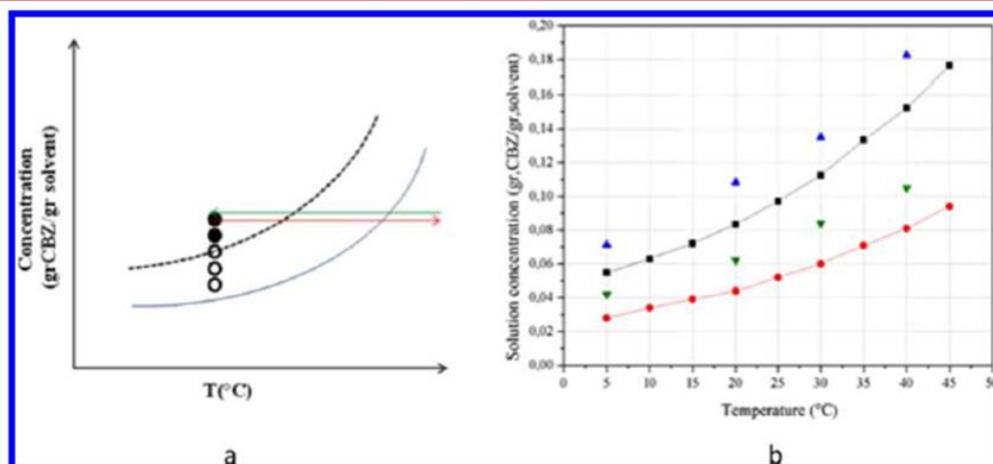


Figure 3. (a) Schematic illustration of the method used to determine the metastable zone of CBZ with in situ microscopy: CBZ solubility (blue curve); metastable limit zone (black curve); heat to complete dissolution (red arrow); cool to supersaturation (green arrow). Circles illustrate different solution concentrations tested at the chosen temperature: empty circles (not crystallized); filled circles (crystallized). (b) Metastable zone limit of carbamazepine (phase III) in methanol (blue symbols) and in acetonitrile (green symbols). Red and black symbols correspond, respectively, to solubility curves of CBZ in acetonitrile and methanol according to ref 63.

of crystals, it is necessary to start by determining the CBZ metastable zone for a given solvent. The potential to reach thermodynamically metastable states is a characteristic feature of the first order phase transition.⁶² Starting from the initial phase, supersaturating the solution during a time interval t_1 leads to the formation of a new phase originating with the appearance of crystals. The time interval t_1 separating these two phases is referred to as the induction time and is used as a measure of the ability of the system to remain in a metastable equilibrium. It can therefore be used to determine the metastability limit of the initial phase. Indeed, it allows us to determine the critical

supersaturation coefficient (β_c) below which the initial phase can stay long enough without losing its metastability. One can define $t_{in} = t_{st} + t_{exp} + t_{NPLIN}$ where t_{st} corresponds to the time necessary for the solution to reach the nucleation temperature (20 °C in our case), $t_{st} \in [24, 48]$ h; t_{exp} corresponds to the duration of the laser exposure; $t_{exp} = 1$ min; t_{NPLIN} corresponds to the duration between the end of the exposure and the observation of the crystal using the microscope; $t_{NPLIN} \in [0.3, 3]$ h.

It should be noted that in the case of solution irradiation by laser (NPLIN experiment), the induction time t_{NPLIN} is considered to be the

minimum time required for the nucleation to take place right after irradiation.

The determination of the metastable zone of the studied carbamazepine (polymorph III) in methanol and acetonitrile solutions follows the above-described procedure. To that end, the experimental setup used for screening crystallization conditions and to investigate solution mediated phases transitions of an active pharmaceutical ingredient is described by Detoisien et al.¹¹ It is composed of a multiwell setup (ANACRISMAT, France) that consists of a two-dimensional (X and Y) motorized stage mounted on a Nikon (Eclipse TE2000-U) inverted optical microscope used in conjunction with an adapted Peltier temperature control unit (± 0.1 °C). The motorized stage is designed to carry two blocks of 12, 24, or 48 wells according to the used vials. We used standard HPLC glass vials (diameter 12 mm) with 1 mL of solvent in which crystals of carbamazepine could be observed. Sequential image acquisitions are performed automatically and periodically (from minutes to hours), by using a digital camera.

We carried out a series of experiments that consist of preparing different solutions at different supersaturation coefficients β , stored and observed at different temperatures (5 °C, 20 °C, 30 and 40 °C). The experimental conditions are summarized in Table 2. The supersaturation coefficient β is defined by $C/C_s \times 100\%$, where C is the solution concentration and C_s is the solubility at a given temperature ranging from 5 to 45 °C.⁶³ From preliminary experimental works, we have chosen to work with supersaturation values in the range of 110% to 150%. The observation of the nucleation in the different prepared solutions at different instants using the microscope allowed us to measure the time required for crystals to appear in each sample. This time was noted as the induction time (t_i) for each sample. Consequently, we considered the critical supersaturation coefficient β_c to be the concentration value under which the solutions did not crystallize after a time sufficiently long enough t_i . The schematic illustration of the method used to determine the metastable zone of CBZ with in situ microscopy is given in Figure 3a. In order to study the spontaneous nucleation efficiency as a function of supersaturation, the observation of solution is carried out after the time duration t_i . The supersaturation coefficient values are always chosen within the range of the values that were used above and permitted to determine the metastable zone width.

3.4. Supersaturated Solution Preparation for NPLIN. Four sets of experiments were performed using a total of 360 supersaturated solutions irradiated with a laser at 532 nm of linear and circular polarizations, respectively. For each set, three different concentrations were prepared. For each solution concentration, 30 identical glass tubes were prepared at 20 °C. The 30 glass tubes were divided into three groups. Each group of glass tubes is irradiated using different laser energies.

According to the results obtained in the previous section and the determination of the critical supersaturation $\beta_{c,T,S}(t)$, the prepared supersaturated solutions in methanol and acetonitrile had coefficient β values of 110%, 120%, and 130%. In the case of methanol, 72.82, 79.44, and 86.06 mg, of CBZ were weighed out and deposited into in each of the glass tubes. In the case of acetonitrile, 38.72, 42.24, and 45.76 mg were used. For each solution, 1 mL was added to each tube. We used classical chromatography tubes that were adapted to fit our experimental needs.³¹ The heating dissolution method was then used by placing the tubes altogether in a bath (carousel holder) for about 15 h at 50 °C. After complete dissolution, the solutions were cooled to 20 °C and then were aged from 1 to 2 days before irradiation by laser light at 20 °C. This aging time permits the formation of clusters within the solutions, thus increasing the probability of nucleation. The requirement for sample aging was reinforced by subsequent work on glycine^{29,30,32} and L-histidine.³⁸

Moreover, proper experimental conditions were adopted in order to avoid photochemical reaction resulting orange coloration (see section 4.2).

3.5. CBZ Crystal Characterization. The characterization of the obtained crystals forms was done both by single crystal X-ray diffraction (Bruker Diffraction D8 system at room temperature) and by morphology observation under microscope (SEM).

3.6. CBZ Theoretical Calculations. In order to obtain a good and coherent estimate of the interaction energy for each pair of molecules, a full *ab initio* computation was carried out using the same quantum chemistry model within the functional density theory framework (M06-2X/cc-PVTZ), available from the Gaussian09 software.⁶⁴

The choice for the M06-2X hybrid functional⁶⁵ was made in order to ensure a reliable account for both short-range and diffuse type interactions within and between rather remote molecules. The correlation consistent triple- ζ basis set⁶⁶ is known to be a good compromise between CPU time to be devoted to each computation and the flexibility that is required for giving a sufficient freedom for the electrons to reproduce the subtleties imposed by the chemical bond formations. For each crystalline form, the molecular geometries were taken from experimental results. However, in many cases, because the published structures were obtained by classical single crystal X-ray diffraction, only the position of hydrogen atoms had to be determined from *ab initio* optimizations. Such an additional step is expected to be of significant importance because many components of the interaction energies can safely be assumed to rely on hydrogen interplay.

The computation of the interaction energy between two molecules A and B is of course obtained from the subtraction $\Delta E = E_{A-B} - (E_A + E_B)$ where E_{A-B} is the energy for the pair system, while E_A and E_B are the respective energies of isolated molecule A and molecule B. All the geometries are here kept frozen because the purpose is to evaluate the interaction energy, not the bonding energy. In that respect, it should be noted that some pairs were found to be not bonded, that is, the energy for the A–B system was higher than the sum of the energies for each optimized subsystem.

However, if the interaction energy were to be estimated from the above-mentioned subtraction, a significant spurious bias would be introduced from the basis set superposition error (BSSE) effect. This is well documented,⁶⁷ and it is here sufficient to remind the reader that, because the chosen (limited) basis set cannot account for all possible electrons behaviors, electrons in system A–B are offered more degrees of freedom than those in isolated subsystems A or B. The reason is simply that each basis function is centered on a nucleus, and as such, for a given quantum chemistry model, the more atoms, the richer the basis set, and the wider it spans the configuration space. BSSE effects are thus very well-known for affecting in large part the estimate in bonding energies and, in our case, interaction energies: part of the difference in energies between A–B and (A, B) originates from a mere change in the basis set. In order to overcome that issue, one is thus led to compute each subsystem (isolated molecules) using the basis set pertaining to the full system. The interaction energy is now estimated using $\Delta E^{AB} = E_{A-B}^{AB} - (E_A^{AB} + E_B^{AB})$, where the superscript now indicates that the full A–B basis set is used for each subsystem. In the case of bonding computations, this calculation is the first step of a method referred to as the "counterpoise correction".

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. CBZ Metastable Zone and Spontaneous Nucleation. Figure 3b shows the solubility curves of CBZ (polymorph III) in methanol and acetonitrile reported in the literature,⁶³ as well as metastable zone that we determined experimentally. As shown in Figure 3b, the critical supersaturation β_c coefficient for the CBZ at 20 °C is about 130% in methanol and about 140% in acetonitrile leading to $\beta_{c,20,\text{methanol}}(72) = 130\%$ and $\beta_{c,20,\text{acetonitril}}(72) = 140\%$. These supersaturation values correspond to a concentration of 0.108 g of CBZ for the case of methanol and 0.062 g for the case of acetonitrile. In this metastable zone, nucleation did not occur and no crystals were observed during an induction time of 72 h. By following the protocol described above for the case of methanol, the metastable zone for acetonitrile is also determined. The width of the metastable zone is higher in acetonitrile than in methanol. Based on these experimental results, for a supersaturation lower than $\beta_{c,20,\text{methanol}}(72)$, the solution could be

considered as metastable. Therefore, for NPLIN experiments, all the supersaturated solutions were prepared with a supersaturation coefficient lower than 130%. As a result, any crystallization from solution in these conditions under irradiation by an external field (laser in this case) could be taken as being due to laser, and therefore laser can be considered as the cause of the induced nucleation. It should be noted that, for each experiment, new HPLC tubes for our experiments were used in order to avoid any heterogeneous or seeded nucleation.

After determining the metastable zone width, we also evaluated the impact of the solvent on the spontaneous nucleation efficiency. To that end, different supersaturated solutions in two solvents (methanol and acetonitrile) were prepared and stored in an environment at 20 °C for a period of time sufficiently long (>72 h) to allow for spontaneous nucleation to begin. Figure 4 shows the fraction of tubes that

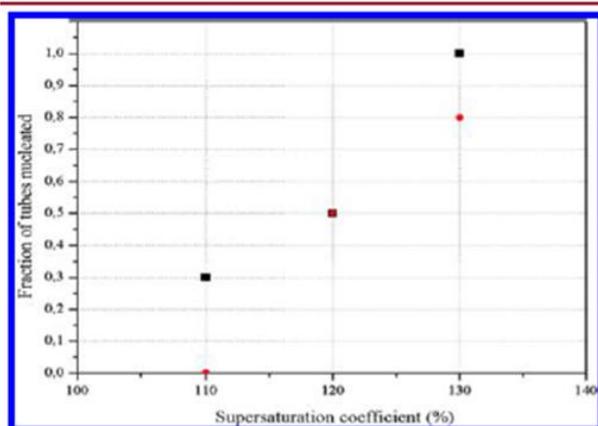


Figure 4. Fraction of CBZ solution nucleated after $t > 72$ h as a function of supersaturation coefficient in the absence of laser irradiation: red symbols correspond to acetonitrile and black symbols correspond to methanol at 20 °C. At $t \leq 72$ h, no crystal was observed.

have crystallized as a function of supersaturation coefficient. The results clearly show that CBZ nucleation efficiency is higher in methanol than in acetonitrile. This is in agreement with a higher solubility of CBZ in methanol (64 mg/mL) compared with that in acetonitrile (35.2 mg/mL) at 20 °C.⁶³ The influence of solubility on the nucleation rate can be explained by the classical nucleation theory.⁶⁸ The classical nucleation equation predicts that under constant supersaturation the rate of nucleation is faster in systems with higher solubility. In both solvents, the CBZ crystal is of form III as identified by its morphology and habit. These results characterize the spontaneous nucleation of CBZ in acetonitrile and methanol and will be used for the purpose of comparison with the case of NPLIN.

4.2. Photochemical Reaction Inhibition. During the experimental preliminary study, it was observed that CBZ solutions yield an orange coloration upon exposure to the pulsed nanosecond laser with wavelength of 532 nm and an energy density in the range (0.3–0.45 GW/cm²). The hypothesis behind the orange coloration is a photochemical reaction. Consequently, in order to showcase the impact of laser energy, as well as the polarization, on the nucleation efficiency, it is necessary to exclude any possibility of nucleation due to photochemical reactions. This has been accomplished by first characterizing the photochemical reaction. One notices a

yellow-orange solution coloration as shown in Figure 5. An IR spectroscopy characterization allows us to identify the nature of

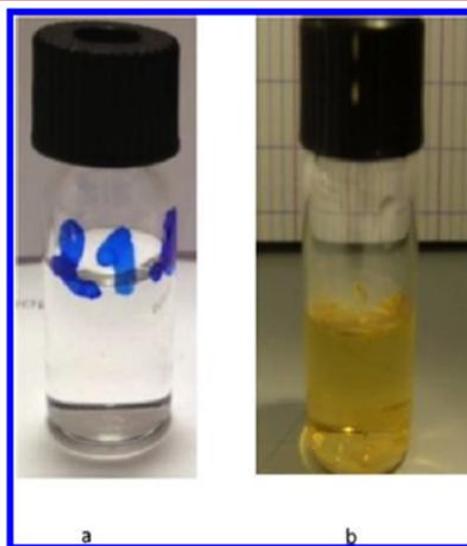


Figure 5. CBZ in methanol solution color change after laser irradiation: (a) before irradiation; (b) after irradiation.

the chemical compound responsible for the coloration. The obtained spectra are provided in the Supporting Information. According to the results of the characterization of the CBZ in methanol solution and works reported in the literature,^{8,70} iminostilbene (IMS) is the compound responsible for the coloration (Figure 1b). The analysis of the chemical formulas of both CBZ and IMS indicates similarities between the two chemical structures except that, in the IMS molecule, the CONH₂ is substituted by a hydrogen atom. This can be explained by the fact that the bond N–CONH₂ is broken due to laser irradiation. Furthermore, according to previous studies,⁷¹ the binding energy of the N–CONH₂ bond is the weakest in the CBZ molecule. The hypothesis made regarding the origin of the hydrogen atom is either water molecules within the solvent or in the ambient atmosphere through hydrolysis⁷² or the solvent itself (methanol) through photolysis.⁷³ To reduce the probability of generating IMS, strict anhydrous conditions were respected when preparing the solutions mainly by working in an inert atmosphere and by a pretreatment of the solvents with molecular sieves.⁷⁴ This is achieved by developing a specific experimental bench composed of three main blocks: glove box, argon gas bottle, and vacuum pump. The schematic diagram of the bench is detailed in the Supporting Information. The hypotheses regarding the origin of the transformation of CBZ to IMS, and thus the presence of a hydrogen in the solution, were validated by repeating the previous experiments respecting strict anhydrous conditions as described and by observing the absence of solution color change after laser irradiation. It has to be noticed that IMS is known as one of the most important metabolites of CBZ.^{75,76}

4.3. CBZ Nucleation and Crystallization from NPLIN.

4.3.1. CBZ Polymorphs and Induction Time Reduction. The crystal habit of CBZ, grown from pure methanol or acetonitrile under different conditions, is observed under the microscope and shown in Figure 6. In the case of acetonitrile, the CBZ habits are either needle-like or prisms as shown in Figure 6a,b,

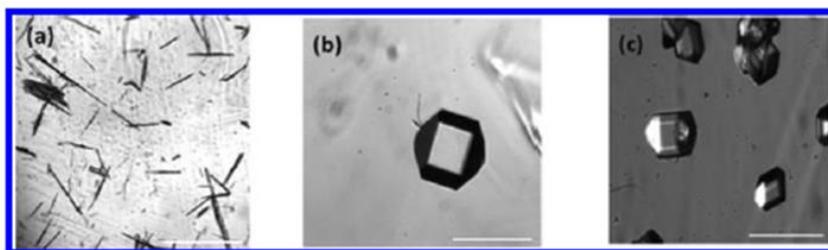


Figure 6. Micrographs of crystals obtained by laser irradiation of CBZ solutions (a, b) in acetonitrile and (c) in methanol; scale bar 100 μm .

respectively. The obtained habits were also confirmed by using scanning electron microscopy (SEM; Figure 7). According to

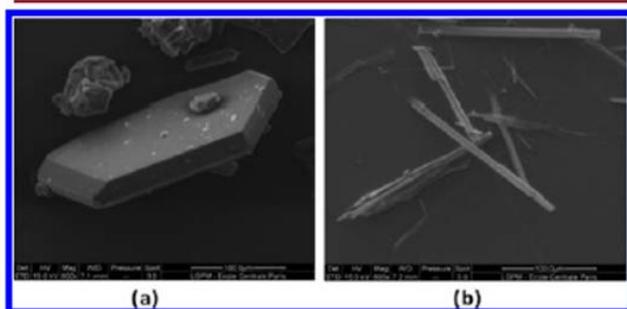


Figure 7. SEM micrographs of CBZ crystals produced by NPLIN in acetonitrile: (a) phase III and (b) phase I.

the reports in refs 77 and 78, a needle-like habit could be polymorph I or II, while a prism one is polymorph III. For more precise identification, single X-ray crystal diffraction of both forms are compared with that reported in the Cambridge Structure Database (CSD).^{8,69} Results are given in Table 3 and confirm that the needle-like habit corresponds to polymorph I and prism habit to polymorph III.

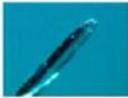
For the sake of estimating the induction time after laser solution irradiation, we depicted in Figure 8 the evolution of solution nucleation as a function of the time. According to the results given in Figure 8, 20 min after laser solution irradiation

was necessary for nucleation to occur (dark dots). Simultaneously, a sample tube containing the same solution and prepared in the same conditions but not exposed to laser required more than 72 h for the nucleation to begin. Despite the aging time (24–48 h), the exposed solutions remain in a metastable state, while spontaneous nucleation occurs after 72 h. These results clearly demonstrate that the energy brought by the laser to the irradiated solution fosters nucleation and greatly reduces the induction time. Moreover, it confirms that laser beam power acts upon the primary nucleation. It should be noticed that the nucleation occurs at the bottom of tubes.

4.3.2. Impact of Irradiation Energy and Laser Polarization on the Nucleation Efficiency. The study of the dependence of nucleation efficiency on laser intensity is carried out on a large number of identical samples that were prepared in strictly controlled conditions in order to minimize the variation between samples.^{60,78} We have exposed N samples to a given laser intensity and counted the number of nucleated samples at this laser intensity. If n samples nucleate, the nucleation fraction is then given by n/N .

The nucleation efficiency depends on the supersaturation coefficient β as well as on the laser irradiation energy density. Indeed, this is confirmed by the curves drawn in Figure 9 that give the nucleation fraction as a function of energy density for different supersaturation coefficient values and laser polarization. One can easily remark that for both solvents and polarization types (linear and circular), the higher β (within the metastable zone) and the irradiation energy density are, the

Table 3. Characterization of Crystals Obtained by Laser Irradiation of CBZ Solutions by Single Crystal X-ray Diffraction

Crystal tested by D8		Recode from CSD CBMZPN01		Recode from CSD CBMZPN11
Space group	$P2_1/n$	$P2_1/n$	P-1	P-1
a ($^\circ$), α ($^\circ$)	7.533(4), 90	7.537(1), 90	5.275(5), 84.19(3)	5.1705(6), 84.124(4)
b ($^\circ$), β ($^\circ$)	11.154(6), 92.81(2)	11.156(2), 92.86(2)	20.720(14), 87.88(3)	20.574(2), 88.008(4)
c ($^\circ$), γ ($^\circ$)	13.896(7), 90	13.912(3), 90	22.383(17), 85.37(4)	22.245(2), 85.187(4)
Lattice system	P-Monoclinic	P-Monoclinic	Triclinic	Triclinic
Crystal Habit	Prisms	Prisms	Needle	Needle

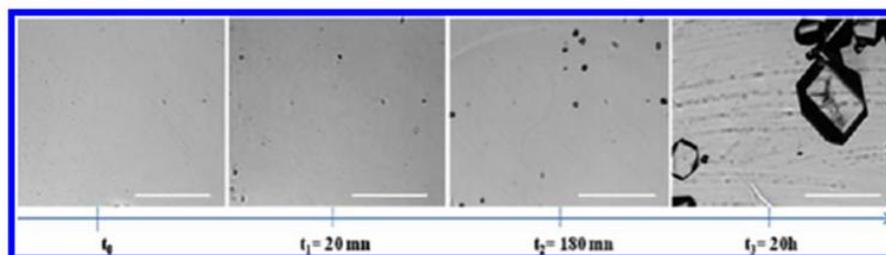


Figure 8. *In situ* monitoring of nucleation progress after irradiation: CBZ in acetonitrile, supersaturation coefficient 130%, laser energy density 0.3 GW/cm², LP, irradiation time 1 min, scale bar 100 μm.

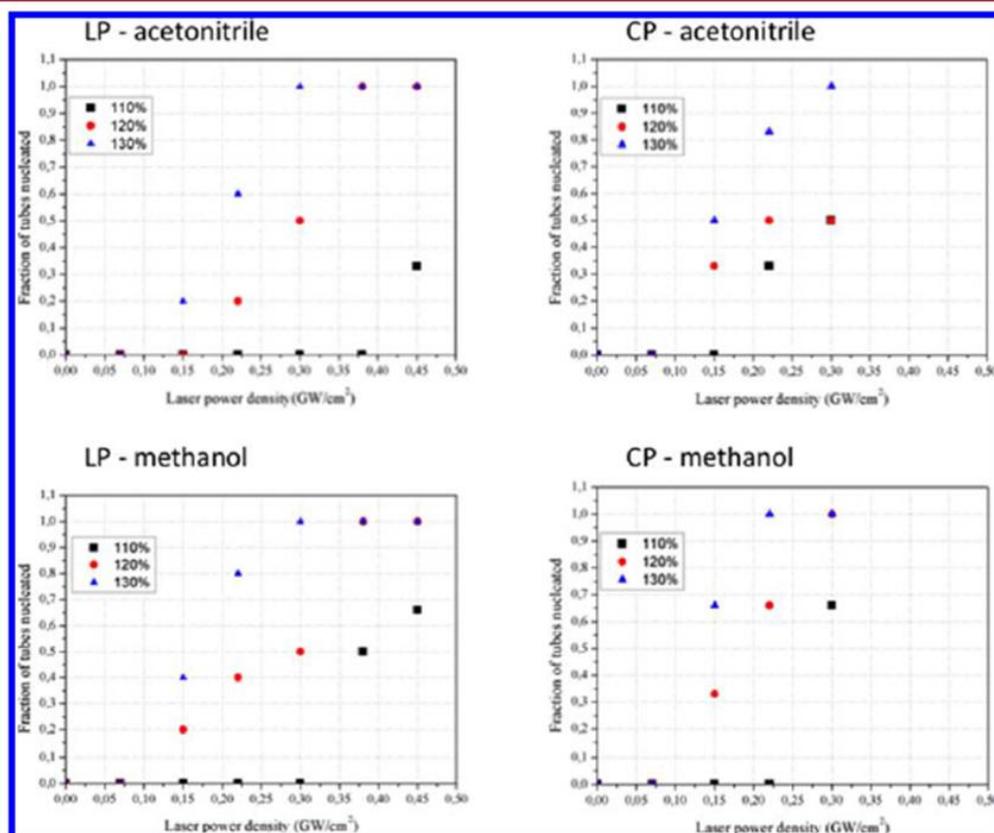


Figure 9. Impact of laser energy and polarization on CBZ nucleation in both methanol and acetonitrile.

higher the fraction of nucleated solution is. Moreover, for both solvents, the nucleation efficiency is slightly higher with the CP laser than the LP laser. However, by comparing the solvent effect on CBZ nucleation, one can notice that the nucleation (for $\beta = 110\%$) starts at a higher irradiation energy density level for acetonitrile. This observation confirms the importance of solubility on nucleation: the higher the solubility, the easier the nucleation as pointed out previously.

4.3.3. Impact of Laser Polarization on CBZ Nucleated Polymorphs. For three different values of β in acetonitrile and methanol and for linear and circular laser polarizations, we represented in Figure 10 the number of tubes that resulted in CBZ polymorphs of type I or type III. The analysis of these graphs indicates that in acetonitrile, the polymorph type is influenced by the laser polarization. In the case of LP, nucleated crystals are mixtures of polymorphs I and III, but in the case of CP, nucleated crystals are mainly polymorph III. In the case of the methanol, the resulting polymorph is phase III, and it is

laser polarization independent. The identification has been done by single crystal X-ray diffraction for some crystals and extended to all samples by optical identification of the habit.

It should be noticed that the CBZ molecule is the first organic drug molecule for which we demonstrate that laser polarization has an impact on the crystal polymorphic form; laser polarization impact has been reported in small organic molecules such as glycine and histidine. According to Sun et al.,³² the polymorphism of glycine was absolutely controlled by switching the laser polarization in a specific range of supersaturation values (1.46–1.55), leading to γ -polymorph and α -polymorph for LP and CP, respectively. Outside of this supersaturation window, different polarizations yield the same polymorph. Yuyama et al.³⁴ demonstrated that under specific solution conditions, supersaturated or undersaturated or saturated, and under specific laser polarization, it is possible to achieve a selective nucleation of α and γ polymorphs of glycine. According to their results, for the supersaturated or

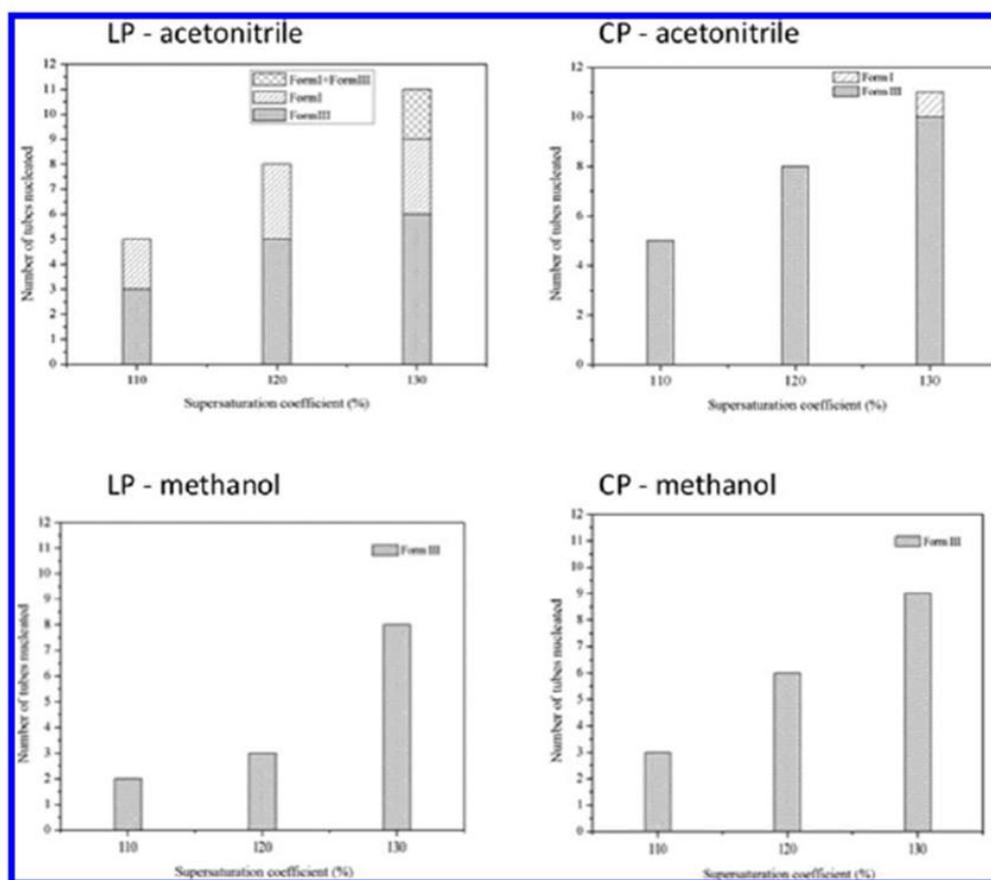


Figure 10. Impact of supersaturation coefficient and laser polarization on the CBZ nucleation and crystal forms. laser energy density 0.3 GW/cm^2 .

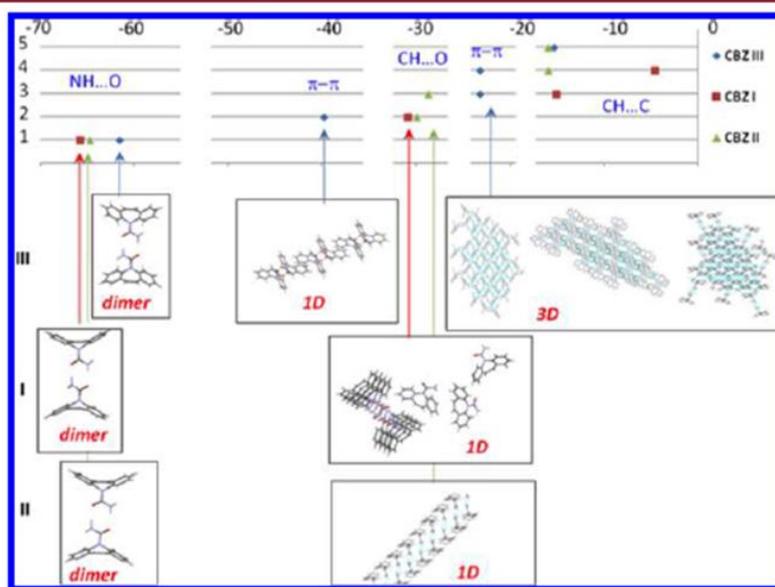


Figure 11. Interaction energy (kJ mol^{-1}) for CBZ polymorphic forms I, II, and III versus the rank of the interaction energy (1 is the strongest interaction for each polymorph). The interaction type is indicated in blue in each range of interaction energy. The packing corresponding to the different ranges of interaction is given for each polymorph in decreasing order of stability. Symmetry of these packings is indicated in red. The green triangle corresponds to the average values over the four independent molecules of the asymmetric unit. For form III with the interaction energy less than -23 kJ mol^{-1} the projection along a , b , and c axes is given in order to better demonstrate the 3-D character of the packing.

saturated solutions, the probability of γ -crystal preparation upon CP laser irradiation became higher at lower power

compared with the LP one. Conversely, in the unsaturated solution, the LP laser irradiation provided highest preparation

probability of γ -form crystal compared with the CP one. Polarization switching has also been reported for L-histidine.³⁸

5. SOME INSIGHT ON THE PUTATIVE POLARIZATION SWITCHING NUCLEATION MECHANISM

One of the hypotheses of NPLIN polarization switching is based on the pre-existence of molecular clusters in the supersaturated solution. The provided explanation supposes that the pre-existing rod-like clusters preferentially crystallize with a LP laser beam while a disk-like cluster will interact with a CP laser beam.³² In order to estimate the symmetry of the pre-existing clusters, we have to make the following assumptions: (i) the symmetry of the preclusters could be predicted through the symmetry of the final crystal packing; (ii) the nucleation is driven by the noncovalent bonds present in the final polymorphs; (iii) the relative strength of these noncovalent bonds in the final polymorphs is considered as the major criterion for predicting the symmetry of the preclusters.

We have identified in three CBZ polymorphs, I, II, and III, the different pairs of molecules formed by a CBZ molecule chosen as being a center molecule, and each neighbor molecule is linked by a noncovalent bond (hydrogen bond or a short contact) to this center molecule. We have excluded the CBZ form IV according to the crystal habits observed after NPLIN nucleation, which differ from those observed by Lang et al.⁷⁹ Pairs of molecules, symmetry cards, and numbering are given in Figures S5, S6, and S7, Supporting Information. For each pair, we have calculated the theoretical interaction energy as defined in section 3.6 (reported in Table S2, Supporting Information). For CBZ form III, the interaction energy determined from an experimental charge density previously conducted by El Hassan et al.⁷¹ is also provided. Figure 11 represents the different arrangements as a function of the interaction energy value. CBZ polymorph I presents four independent molecules in the asymmetric unit. A careful examination of the equivalent pairs permits reduction of the number of independent pairs from 28 to 16 (Table S3, Supporting Information). Only the average value of the interaction energy calculated over the four molecules of the asymmetric unit of CBZ form I is given in Figure 11. As the energy decreases, one can observe different behaviors. For an interaction energy less than -64 kJ mol^{-1} , the three polymorphs exhibit dimer clusters. At that energy level, one can consider that there is no difference among the three polymorphs. For an interaction energy less than -39 kJ mol^{-1} , CBZ form III presents a 1-D symmetry (rod-like), which means that, using the first two strongest interactions, the clusters that are formed in the supersaturated solution would appear as a chain. When an interaction energy less than -28 kJ mol^{-1} is considered, CBZ form I presents a 1-D symmetry using the first two strongest interactions, while CBZ form II is of 1-D symmetry using the first three strongest interactions. For an energy interaction less than -23 kJ mol^{-1} , CBZ form III is of 3-D symmetry, which takes into account the first four interactions.

It appears therefore that at an energy less than -23 kJ mol^{-1} , CBZ form I and CBZ form II exhibit a more rod-like behavior than CBZ form III. These results seem to be in agreement with the polarization switching observed with the acetonitrile solvent. The aforementioned analysis relies on the assumption that the nucleation is driven by the noncovalent interactions existing in the final crystal. This assumption makes use of the reported work on the nucleation theory based on the bond orientational order.⁸⁰

As reported in Figure 10, the CBZ nucleation through the NPLIN technique in methanol solvent gives only polymorphic form III. We have examined the noncovalent interactions that exist between a CBZ molecule and a fragment $\text{C}\equiv\text{N}$ and OH via the use of the CSD.⁸¹ Among 59 structures including true polymorphs, hydrates, solvates, and cocrystals (70 hits), none shows a noncovalent interaction such as $(\text{NH}\cdots\text{N}, \text{CH}\cdots\text{N})$ with the nitrile moiety, while $\text{CH}\cdots\text{O}, \text{NH}\cdots\text{O},$ and $\text{OH}\cdots\text{O}$ are present in a dozen of structures (Figure S6, Supporting Information). Therefore, in the CBZ supersaturated solution in methanol, the solvent could easily make short contacts inhibiting the formation of phase I or II. Methanol solvent could be seen as a crystallization inhibitor of CBZ form I. As shown in Figure 11, phase III could easily crystallize through its π - π interaction.

Moreover, the fact that one has crystallized phase III and phase I is consistent with the relative stability of the first two most stable phases of CBZ.⁸

6. CONCLUSION

The work presented in this paper demonstrates for the first time the application of NPLIN on drugs. The experimental work focused on the nucleation of CBZ molecules in methanol and in acetonitrile. The metastable zone of CBZ was determined at different temperatures in both solvents and for different supersaturated solutions. Spontaneous nucleation requires at least 72 h, and crystals of phase III were observed. For NPLIN experiments, the nucleation evolution of both solutions after irradiation by laser beam of different energy density levels was monitored by collecting photographs of the observed tube at regular time intervals. Irradiating the solutions with laser (NPLIN) triggers enhancement of nucleation in the metastable zone and reduction of the induction time from 72 h to about 24 h and 20 min. It should be noted that 24 h time lapse corresponds to the aging time, while 20 min corresponds to the induction time after irradiation. It should be noticed that in a incompletely anhydrous solution, a PLIN phenomenon has been observed instead of a NPLIN experiment when the solution is sufficiently anhydrous. The nucleation efficiency depends both on the supersaturation coefficient and on the laser energy density. It was indeed found that the nucleation efficiency increases with the energy density carried by the laser beam. Moreover, the CP laser beam polarization leads to a slightly higher nucleation efficiency than the LP laser. The laser polarization affects the type of resulting polymorph. The irradiation of acetonitrile by CP laser results in phase III crystal, while LP laser produces phase I and phase III. The theoretical interaction energy was calculated and permitted us to check that the CBZ form I is rod-like. This is in agreement with the reported explanation supposing that the pre-existing rod-like clusters preferentially crystallize with a LP laser beam while a disk-like cluster interacts with a CP laser beam.³²

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Details of the lattice data for the four anhydrous polymorphic forms of CBZ extracted from the Cambridge Database (CSD), theoretical and experimental interaction energy (kJ mol^{-1}) data for CBZ polymorphs III, I, and II, symmetry card and noncovalent interaction labels for CBZ polymorphs I, II, and III, spontaneous nucleation efficiency in methanol and acetonitrile, FT-IR spectra of anhydrous CBZ polymorph III and iminostilbene, schematic diagram of the experimental

bench, pairs of molecules used in the calculation of CBZ forms I, II, and III and results of the noncovalent interaction in the structures reported in the CSD that contain a CBZ molecule. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: anne.spasojevic@ecp.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Pr Nour Eddine Ghermani (Institut Gallien, University Paris-Sud) for single crystal diffraction measurements and constructive discussion. This project has been funded through an ANR P2N project NPLIN_4_drug.

REFERENCES

- (1) Shekunov, B. Y.; York, P. J. *Cryst. Growth* **2000**, *211*, 122–136.
- (2) Mangin, D.; Puel, F.; Veessler, S. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1241–1253.
- (3) Rodriguez-Spong, B.; Price, C.; Jayasankar, A.; Matzger, A. J.; Rodriguez-Hornedo, N. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 241–274.
- (4) Huang, L. F.; Tong, W. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 241–274.
- (5) Price, S. L. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 301–319.
- (6) Chemburkar, S. R.; Bauer, J.; Deming, K.; Spiwek, H.; Patel, K.; Morris, J.; Henry, R.; Spanton, S.; Dziki, W.; Porter, W.; Quick, J.; Bauer, P.; Donaubauber, J.; Narayanan, B. A.; Soldani, M.; Riley, D.; McFarland, K. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 413–417.
- (7) Garetz, B. A.; Aber, J. E.; Goddard, N. L.; Young, R. G.; Myerson, A. S. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3475–3476.
- (8) Grzesiak, A. L.; Lang, M.; Kim, K.; Matzger, A. J. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2261–2271.
- (9) Florence, A. J.; Johnston, A.; Price, S. L.; Nowell, H.; Kennedy, A. R.; Shankland, N. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1918–1930.
- (10) Lohani, S.; Zhang, Y. G.; Chyall, L. J.; Mouglin-Andres, P. F.; Muller, X.; Grant, D. J. W. *Acta Crystallogr.* **2005**, *E61*, 1310–1312.
- (11) Detoisien, T.; Forite, M.; Taulelle, P.; Teston, J.; Colson, D.; Klein, J. P.; Veessler, S. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 1338–1342.
- (12) Virone, C.; Kramer, H. J. M.; Van Rosmalen, G. M.; Stoop, A. H.; Bakker, T. W. J. *Cryst. Growth* **2006**, *294*, 9–15.
- (13) Ruecroft, G.; Hipkiss, D.; Ly, T.; Maxted, N.; Cains, P. W. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9*, 923–932.
- (14) Lyczko, N.; Espitalier, F.; Louisnard, O.; Schwartztruber, J. *Chem. Eng. J.* **2002**, *86*, 233–241.
- (15) Taleb, M.; Didierjean, C.; Jelsch, C.; Mangeot, J. P.; Capelle, B.; Aubry, A. *J. Cryst. Growth* **1999**, *200*, 575–582.
- (16) Moreno, A.; Sasaki, G. *J. Cryst. Growth* **2004**, *264*, 438–444.
- (17) Penkova, A.; Gliko, O.; Dimitrov, I. L.; Hodjaoglu, F. V.; Nanev, C.; Vekilov, P. G. *J. Cryst. Growth* **2005**, *275*, e1527–e1532.
- (18) Hammadi, Z.; Veessler, S. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2009**, *101*, 38–44.
- (19) Revalor, E.; Hammadi, Z.; Astier, J. P.; Grossier, R.; Garcia, E.; Hoff, C.; Furuta, K.; Okutsu, T.; Morin, R.; Veessler, S. *J. Cryst. Growth* **2010**, *310*, 939–946.
- (20) Voss, D. *Science* **1996**, *274*, 1325–1325.
- (21) Oxtoby, D. W. *Nature* **2002**, *420*, 277–278.
- (22) Okutsu, T.; Nakamura, K.; Haneda, H.; Hiratsuka, H. *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 113–115.
- (23) Tyndall, J. *Philos. Mag.* **1869**, *37*, 384–394.
- (24) Okutsu, T.; Furuta, K.; Terao, T.; Hiratsuka, H.; Yamano, A.; Ferté, N.; Veessler, S. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1393–1398.
- (25) Veessler, S.; Furuta, K.; Horiuchi, H.; Hiratsuka, H.; Ferté, N.; Okutsu, T. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 1631–1635.
- (26) Okutsu, T.; Furuta, K. K.; Watanebe, I.; Mori, H.; Obi, K.; Horota, K.; Horiuchi, H.; Sasaki, G.; Veessler, S.; Hiratsuka, H. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2007**, *190*, 88–93.
- (27) Furuta, K.; Horiuchi, H.; Hiratsuka, H.; Okutsu, T. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1886–1889.
- (28) Tam, A.; Moe, G.; Happer, W. *Phys. Rev. Lett.* **1975**, *35*, 1630–1633.
- (29) Zaccaro, J.; Matić, J.; Myerson, A. S.; Garetz, B. A. *Cryst. Growth Des.* **2001**, *1*, 5–8.
- (30) Garetz, B. A.; Matić, J. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, No. 175501.
- (31) Clair, B.; Ikri, A.; Scouffaire, P.; Quemener, V.; Spasojević-de Biré, A. *J. Appl. Cryst.* **2014**, DOI: 10.1107/S160057671401098X.
- (32) Sun, X.; Garetz, B. A.; Myerson, A. S. *Cryst. Growth Des.* **2006**, *6*, 684–689.
- (33) Rungsimanon, T.; Yuyama, K.; Sugiyama, T.; Masuhara, H. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 4686–4688.
- (34) Yuyama, K.; Rungsimanon, T.; Sugiyama, T.; Masuhara, H. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 2427–2434.
- (35) Uwada, T.; Fuji, S.; Sugiyama, T.; Usman, A.; Miura, A.; Masuhara, H.; Kanaizuka, K.; Haga, M. *Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 1158–1163.
- (36) Liu, T. H.; Uwada, T.; Sugiyama, T.; Usman, A.; Hosokawa, Y.; Masuhara, H.; Chiang, T. W.; Chen, C. J. *J. Cryst. Growth* **2013**, *366*, 101–106.
- (37) Matić, J.; Sun, X.; Garetz, B. A. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1565–1567.
- (38) Sun, X.; Garetz, B. A.; Myerson, A. S. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1720–1722.
- (39) Tsunesada, F.; Iwai, T.; Watanabe, T.; Adachi, H.; Yoshimura, M.; Mori, Y.; Sasaki, T. *J. Cryst. Growth* **2002**, *237*, 237–239.
- (40) Hosokawa, Y.; Adachi, H.; Yoshimura, M.; Mori, Y.; Sasaki, T.; Masuhara, H. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 861–863.
- (41) Ward, M. R.; Mc Hugh, S.; Alexander, A. J. *Phys. Chem.* **2012**, *14*, 90–93.
- (42) Alexander, A. J.; Camp, P. J. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 958–963.
- (43) Duffus, C.; Camp, P. J.; Alexander, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11676–11677.
- (44) Ward, M. R.; Ballingall, I.; Costen, M. L.; Mc Kendrick, K. G.; Alexander, A. J. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *481*, 25–28.
- (45) Ward, M. R.; Alexander, A. J. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 4554–4561.
- (46) Ward, M. R.; Copeland, G. W.; Alexander, A. J. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, No. 114508.
- (47) Soare, A.; Dijkink, R.; Pascual, M. R.; Sun, C.; Cains, P. W.; Lohse, D.; Stankiewicz, A. I.; Kramer, H. J. M. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 2311–2316.
- (48) Jacob, J. A.; Sorgues, S.; Dazzi, A.; Mostafavi, M.; Belloni, J. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 5980–5985.
- (49) Adachi, H.; Takano, K.; Hosokawa, Y.; Inoue, T.; Mori, Y.; Matsumura, H.; Yoshimura, M.; Tsunaka, Y.; Morikawa, M.; Kanaya, S.; Masuhara, H.; Kai, Y.; Sasaki, T. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2003**, *42*, L798–L800.
- (50) Lee, I. S.; Evans, J. M. B.; Erdemir, D.; Lee, A. Y.; Garetz, B. A.; Myerson, A. S. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 4255–4261.
- (51) Tsuboi, Y.; Shoji, T.; Kitamura, N. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2007**, *46*, L1234.
- (52) Sugiyama, T.; Adachi, T.; Masuhara, H. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 1480–1481.
- (53) Nakamura, K.; Sora, Y.; Yoshikawa, H. Y.; Hosokawa, Y.; Murai, R.; Adachi, H.; Mori, Y.; Sasaki, T.; Masuhara, H. *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 6425–6429.
- (54) Yoshikawa, H. Y.; Murai, R.; Sugiyama, S.; Sasaki, G.; Kitatani, T.; Takahashi, Y.; Adachi, H.; Matsumura, H.; Murakami, S.; Inoue, T.; Takano, K.; Mori, Y. *J. Cryst. Growth* **2009**, *311*, 956–959.
- (55) Hammadi, Z.; Astier, J. P.; Morin, R.; Veessler, S. *Cryst. Growth Des.* **2009**, *9*, 3346–3347.
- (56) Murai, R.; Yoshikawa, H. Y.; Takahashi, Y.; Maruyama, M.; Sugiyama, S.; Sasaki, G.; Adachi, H.; Takano, K.; Matsumura, H.

- Murakami, S.; Inoue, T.; Mori, Y. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *96*, No. 043702.
- (57) Yennawar, N.; Denev, S.; Gopalan, V.; Yennawar, H. *Acta Crystallogr.* **2010**, *F66*, 969–972.
- (58) Murai, R.; Yoshikawa, H. Y.; Hasenka, H.; Takahashi, Y.; Maruyama, M.; Sugiyama, S.; Adachi, H.; Takano, K.; Matsumura, H.; Murakami, S.; Inoue, T.; Mori, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *510*, 139–142.
- (59) Nakayama, S.; Yoshikawa, H. Y.; Murai, R.; Kurata, M.; Maruyama, M.; Sugiyama, S.; Aoki, Y.; Takahashi, Y.; Yoshimura, M.; Nakabayashi, S.; Adachi, H.; Matsumura, H.; Inoue, T.; Takano, K.; Murakami, S.; Mori, Y. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 1491–1496.
- (60) Sun, X.; Garetz, B. A. *Phys. Rev. E* **2009**, *79*, No. 021701.
- (61) Knott, B. C.; LaRue, J. L.; Wodtke, A. M.; Doherty, M. F.; Peters, B. J. *Chem. Phys.* **2011**, *134*, No. 171102.
- (62) Kashchiev, D.; Verdoes, D.; Vanrosmalen, G. M. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 373–380.
- (63) O'Mahony, M. A.; Maher, A.; Croker, D. M.; Rasmuson, A. C.; Hodnett, B. K. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 1925–1932.
- (64) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- (65) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (66) Dunning, T. H., Jr. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007–23.
- (67) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553–566.
- (68) Mullin, J. W. *Crystallization*, 4th ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 2001.
- (69) Kuramshina, G. M.; Mogi, T.; Takahashi, H. *J. Mol. Struct.* **2003**, *661–662*, 121–139.
- (70) McNaught, A. D.; Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed.; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.
- (71) El Hassan, N.; Ikni, A.; Gillet, J. M.; Spasojević-de Biré, A.; Ghermani, N. E. *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 2887–2896.
- (72) Buenker, R. J.; Olbrich, G.; Schuchmann, H. P.; Schurmann, B. I.; von Sonntag, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4362–4368.
- (73) Bradley, D.; Williams, G.; Lawton, M. J. *Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351–8354.
- (74) Mathieu, O.; Picot, M. C.; Gelisse, P.; Breton, H.; Demoly, P.; Hillaire-Buys, D. *Pharmacol. Rep.* **2011**, *63*, 86–94.
- (75) Dzodić, P. L.; Zivanović, L. J.; Protić, A. D.; Zecević, M. L.; Jocić, B. M. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 1059–1068.
- (76) Rustichelli, C.; Gamberini, G.; Ferioli, V.; Gamberini, M. C.; Ficarra, R.; Tommasini, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 41–54.
- (77) Ceolin, R.; Toscani, S.; Gardette, M. F.; Agafonov, V.; Dzyabchenko, A.; Bacheti, B. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1062–1065.
- (78) Spasojević - de Biré, A. *Int. Innovation* **2013**, 45–49.
- (79) Lang, M.; Kampf, J. W.; Matzger, A. J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 1186–1190.
- (80) Russo, J.; Tanaka, H. *AIP Conf. Proc.* **2013**, *1518*, 232–237.
- (81) Allen, F. H. *Acta Crystallogr.* **2002**, *B58*, 380–388.

Annale de congrès

- *Contribution to the understanding of the putative NPLIN polarization switching mechanism through crystalization of carbamazepine, sulfathiazole and glycine; A. Spasojevic-de Biré(*), A. Ikni, W. Li, B. Clair, P. Scouflaire, N. El Hassan, J-M. Gillet, **ISIC 19 (2014)**.*

Contribution to the understanding of the putative NPLIN polarization switching mechanism through crystallization of carbamazepine, sulfathiazole and glycine

A. Spasojevic-de Biré^{1,2}, A. Ikni^{1,2}, W. Li^{1,2}, B. Clair^{1,2}, P. Scoufrière^{1,3}, N. El Hassan^{1,2}, J-M. Gillet^{1,2}

¹Ecole Centrale Paris;

¹CNRS, UMR 8580 Laboratoire « Structures, Propriétés et Modélisation des Solides » (SPMS);

²CNRS, UPR 288, Laboratoire « Energétique Moléculaire et Macroscopique, Combustion » (EM2C);
Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry Cedex FRANCE

Keywords: Non-Photochemical LASER-Induced Nucleation, carbamazepine, sulfathiazole, glycine, energy interaction, *ab initio* calculations, crystal packing, metastable limit

Introduction

The Non-Photochemical LASER-Induced Nucleation (NPLIN) emerged as a reproducible observation in the last 10 years with around 40 publications (figure 1). We consider that a LASER, which induces nucleation of the compound in solution or in a liquid state, belongs to an NPLIN experiment if the crystal obtained is chemically identical to the initial one. A zwitter ionic form is considered chemically similar in our definition. It enables the nucleation of single crystals from supersaturated solutions by shining the sample holder with a high power LASER (Pulsed at a nano-second or femto-second, Continuous Wave with a focused or unfocused beam). Three groups appear to concentrate their work on NPLIN. Garetz and co-worker in USA who have initially demonstrated on histidine and glycine the potentiality of the NPLIN method [1]; Alexander and co-worker in United Kingdom who have focalized their research on the understanding the mechanism, through studies of KCl and KBr [2]; Masuhara and co-worker have made an extensive study on organic and protein compounds [3]. In opposite to the first two groups, they have mainly used a femto-second pulsed LASER or a continuous wave LASER. It has been shown that it is possible therefore to control the number of crystals and their size, as well as to orient their growth among various polymorphs and various directions by modulating the LASER power and its polarization. A few phenomenological or quantitative theories describing this process have emerged such as optical Kerr effect, bubble cavities, shock waves etc... but the NPLIN mechanism(s) remain under controversial. Besides this fundamental aspect, the control of the polymorphism of molecules of pharmaceutical interest is important since the nature of the polymorph in the tablet changes its ability to the dissolution test and more generally its bioavailability. NPLIN could represent a method of high potentiality in the context of the pharmaceutical industry.

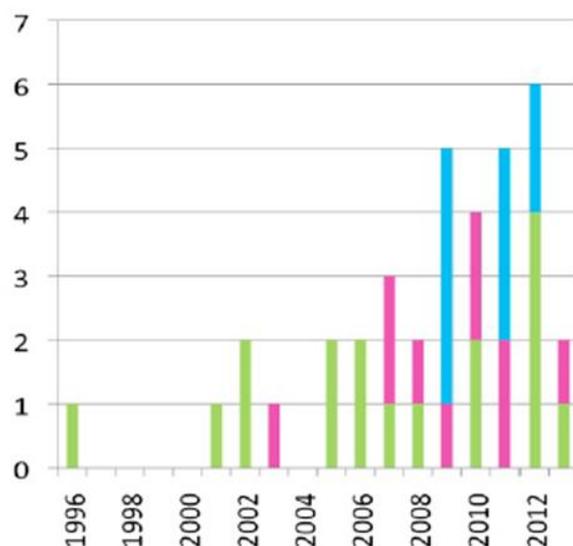


Figure 1. NPLIN publication statistics (blue: inorganic compounds, green: organic molecules; rose: proteins).

The aim of this paper is to give some new insights on the NPLIN of organic molecules (mainly drugs) using a Pulsed nanosecond LASER. This contribution to the understanding of the mechanism will be given through various methods (figure 2):

- an *in situ* observation of the solution, before, during and after the LASER irradiation (step 2) via an optic follow up of the sample;
- the use of a whole experimental methodology from a complete description of the solution before irradiation (step 1) to the fine characterization of the crystal obtained by high resolution X-ray diffraction leading to experimental binding energy interactions (step 3);
- a simulation methodology: estimation of the binding energy of the clusters from *ab initio* quantum calculations.

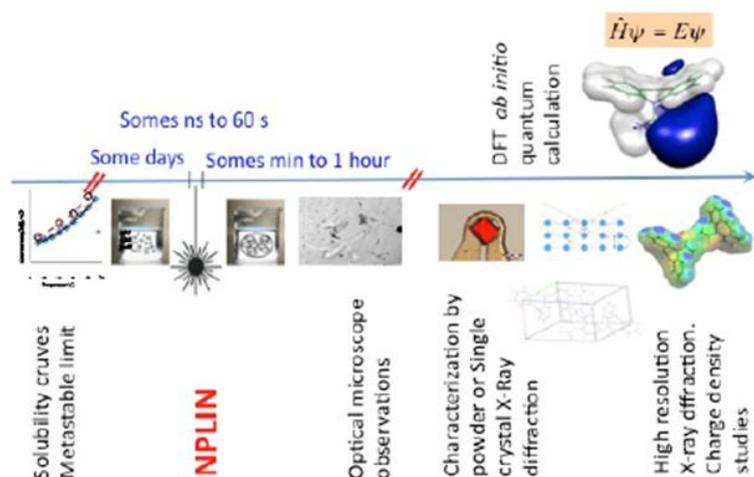


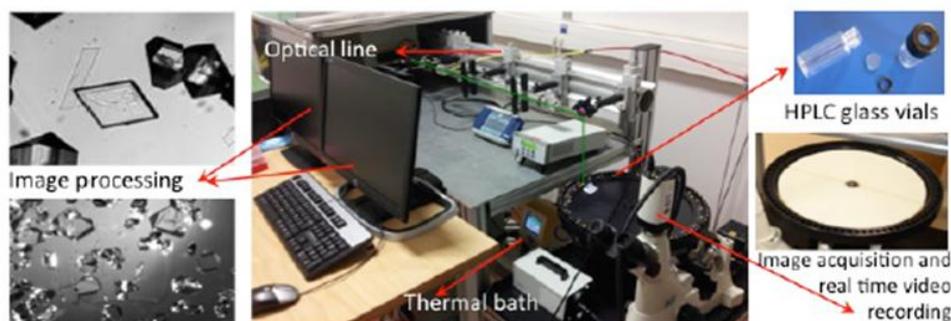
Figure 2. Schematic representation of the methodology. The blue arrow represents the experimental path. The three steps mentioned in the text are separated with red slanted line.

In this paper, we focus on three molecules for the following main reasons: i) carbamazepine (four polymorphs), an anti-epileptic drug, which could be considered as the most popular polymorph drug model; ii) sulfathiazole (five polymorphs), an anti-bacterial drug, which have been selected according to the predictive study (see § 6.) iii) glycine

(five polymorphs), a simple amino acid which exhibits properties against schizophrenia and catalepsy [4]; glycine was the first compound for which a polarization switching using NPLIN has been demonstrated [1]. We will briefly present the main results on the NPLIN experiments for the three molecules. We will also give some insight into the putative mechanism of the polarization switching from *ab initio* quantum calculations and from prediction through a systematic crystal packing type determination *via* an analysis of the Cambridge Structural Database (CSD).

1. Material and methods

Nucleation is a stochastic phenomenon [5]; it is therefore crucial to be able to perform numerous experiments under the same experimental conditions. Considering the influencing factors in the nucleation process, primarily temperature should be controlled and monitored, and the energy density of the LASER beam also has to be monitored. Furthermore, a visual monitoring of crystallization through microphotographs is necessary. Taking into account these general needs, a multipurpose high-throughput experimental setup has been designed. We chose to use different methods for characterization: *in situ* by a visual control of the morphology, *ex situ* after filtering of the solution, through Powder X-Ray Diffraction, Single Crystal X-ray Diffraction measurements, Scanning Electron Microscopy observations and Raman scattering. Figure 3 shows how the experimental design was implemented. A full *ab initio* computation was carried out using the same quantum chemistry model within the density functional theory framework



(M06-2X/cc-PVTZ). More details are available in Ikni *et al.* [6].

Figure 3. Photographs of the experimental setup. Crystals of glycine (top left) and carbamazepine (bottom left) See [7] for more details.

2. NPLIN experiments on carbamazepine (CBZ)

The metastable zone of the CBZ was determined at different temperatures in methanol and in acetonitrile and different supersaturated solutions were used, leading to $\beta_{c,20, \text{methanol}}(72) = 130\%$ and $\beta_{c,20, \text{acetonitrile}}(72) = 140\%$ at 20°C for 72 hours. The nucleation evolution of both solutions after irradiation by LASER beam of different energy density levels was monitored by depicting photographs of the observed tube at regular time intervals. CBZ crystals appear at the bottom of the HPLC tubes. Irradiating the solutions by LASER permitted to launch nucleation in the metastable zone and to reduce the induction time from 72 h to about 20 min. The nucleation efficiency depends both on the supersaturation coefficient as well as on the LASER energy density. It was indeed found that the nucleation efficiency increases with the energy density carried by the LASER beam. Moreover, the CP LASER beam polarization leads to a slightly higher nucleation

efficiency than the LP polarization. The LASER polarization affects the type of resulting polymorph. The irradiation of acetonitrile by CP laser results in form III crystal while LP laser produces form I and form III (figure 3).

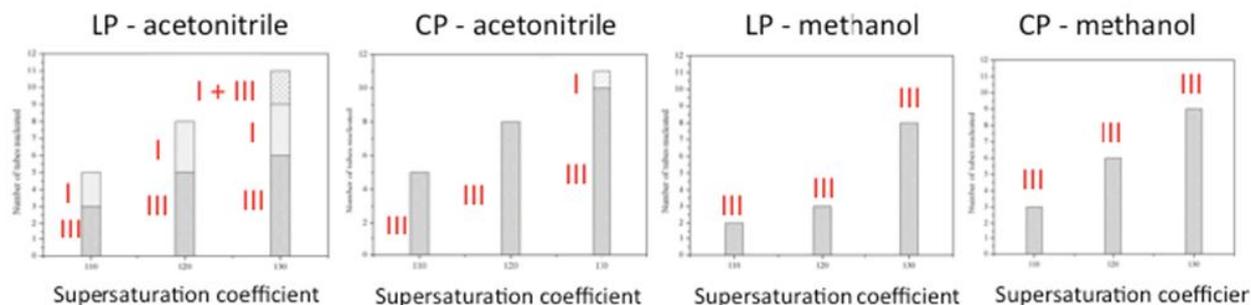


Figure 3. NPLIN polarization switching of CBZ in methanol and acetonitrile under different polarization and different supersaturation (110, 120 and 130%). The bar corresponds to the number of nucleated tubes.

3. Preliminary NPLIN experiments on sulfathiazole (ST)

The metastable limit has been determined and it corresponds to $\beta_{c,25, \text{water} / \text{ethanol} 1:1} = 170 \%$. Spontaneous and NPLIN nucleation under LP or CP polarization are presented in figure 4. The main conclusions which could be drafted are i) a drastic reduction of the induction time, 20 mn after irradiation more than 2/3 of the tubes have nucleated while references tubes have not crystallized; ii) for a given supersaturation the minimum energy needed for inducing nucleation of 2/3 of the nucleated tubes is 0.5 GW/cm^2 ; iii) the exposition time (from 10 to 60 s) has no influence on the nucleation. Further investigations will be performed at least with 1 pulse; iv) the nucleation takes place at the bottom of the tube; v) the morphologies observed on Figure 4 are quite different. Characterization of the different polymorphs by SCXRD is in progress but according to similar morphology already reported in the literature it seems that NPLIN with LP has induced a mixture of form I, III and IV [8].

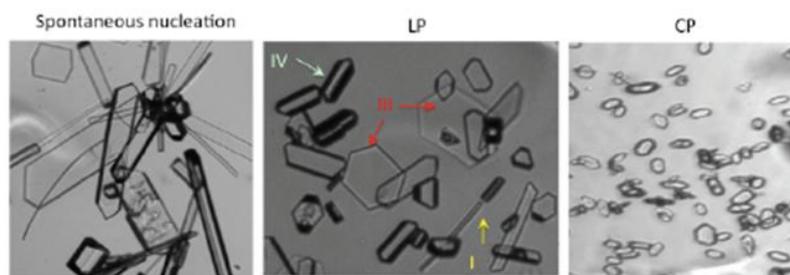


Figure 4. *In situ* monitoring of nucleation progress: sulfathiazole in water/ethanol, supersaturation coefficient 130%, laser intensity 0.5 GW/cm^2 , a) spontaneous nucleation, b) LP; c) CP; irradiation time: 1 min. Probable polymorph assignation is indicated.

4. NPLIN experiments on glycine (GLY)

We have chosen to illustrate the capability of our experimental setup on glycine, a small amino acid, which could be considered as a model compound for polymorphism studies. Furthermore, glycine is the organic molecule, which is the most studied compound *via* NPLIN technique. Results show that LASER stimulates the nucleation inside the metastable zone (critical supersaturation constant $\beta_{c,17} = 150 \%$) where no spontaneous nucleation occurs. Real time recording video shows a short induction time (some minutes in order to have a crystal detection with the camera mounted on a microscope). Particular morphologies of crystals induced by the LASER have been observed those are not produced by spontaneous nucleation (figure 5). All the formed crystals have been identified as belonging to α polymorph through single crystal X-ray diffraction experiments. Furthermore, we have observed that glycine nucleates at the air / solution interface before falling down to the bottom of the tube.

Nucleation efficiency *via* a LASER in a non-photochemical way has been evidenced at different supersaturations or laser beam energy: the higher the supersaturation constant value the better the nucleation efficiency is. A maximum is observed for the glycine nucleation efficiency as a function of the LASER energy density.

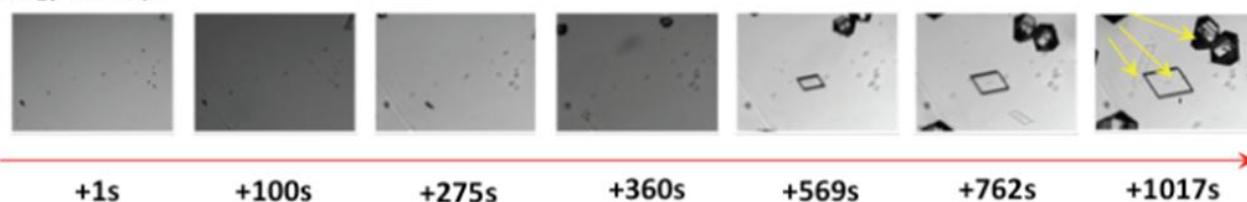
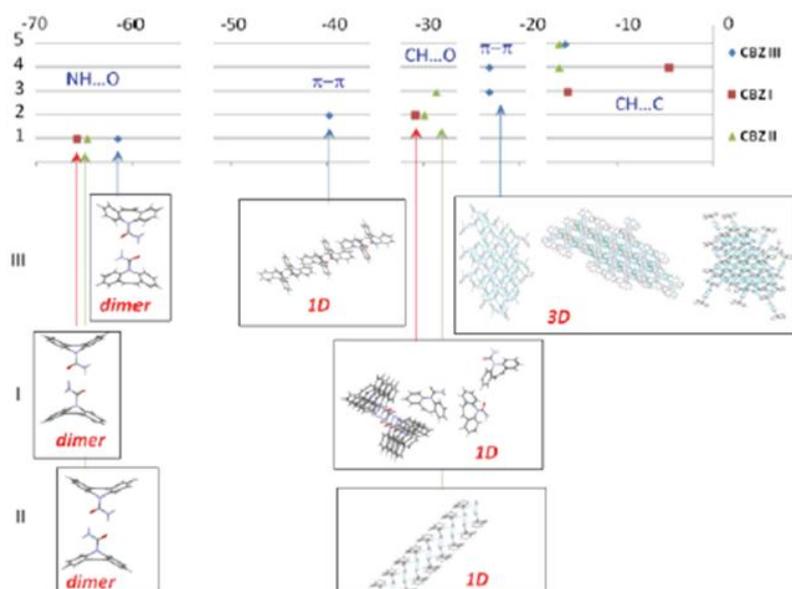


Figure 5. User manual mode to follow the crystallization. The t_0 corresponds to the end of the LASER exposure (exposure time = 60s, energy = 0.25 GW/cm², linear polarization, supersaturation = 145 % at 17°C). Three different morphologies are indicated with a yellow arrow.

5. Insight the putative polarization switching mechanism

One of the hypothesis of the NPLIN polarization switching is based on the pre-existence of molecular clusters in the supersaturated solution. The provided explanation supposes that the pre-existing clusters of rod-like type preferentially crystallize with a LP LASER beam while a disk-like behavior will interact with a CP LASER beam [1]. In order to estimate the symmetry of the pre-existing clusters, we have to make the following assumptions: i) the symmetry of the pre-clusters could be predicted through the symmetry of the final crystal packing; ii) the nucleation is driven by the non-covalent bonds present in the final polymorphs; iii) the relative intensity of these non-covalent bonds in the final polymorphs is considered as the major criterion for predicting the symmetry of the pre-clusters.

We have applied this methodology to the compounds studied (carbamazepine, sulfathiazole, glycine). We



present here the final results for carbamazepine (figure 6).

Figure 6. Interaction energy (KJ.mol⁻¹) for CBZ polymorphic form I, II and III versus the rank of the interaction energy (1 is the strongest interaction for each polymorph). The interaction type is indicated in blue in each range of interaction energy. The packing corresponding to the different range of interaction is given for each polymorph in decreasing order of stability. Symmetry of these packing is indicated in red. The green triangle corresponds to the average values over the four independent molecule of the asymmetric unit. For the form III with the interaction energy < -23 KJ.mole⁻¹ the projection along a, b and c axis is given in order to better demonstrate the 3-D character of the packing.

In three CBZ polymorphs, I, II and III we have identified the different pairs of molecules formed by a CBZ molecule chosen as being a center molecule and each neighbor molecule linked by a non covalent bond (hydrogen bond or a short contact) to this center molecule. We have excluded the CBZ IV according to the crystal habits observed after NPLIN nucleation, which differ from those observed by Lang *et al.* [9] For each pair, we have calculated the theoretical interaction energy as defined in section 1. For CBZ III, the interaction energy determined from an experimental charge density study previously conducted by El Hassan *et al.* [10] is also compared. Figure 6 shows the different arrangements as a function of the interaction energy value. As the energy decreases, one can observe different behaviors. For an energy interaction < -64 kJ.mol⁻¹, the three polymorphs exhibit dimer clusters. At that energy level one can consider that there is no difference between the three polymorphs. For an interaction energy < -39 kJ.mol⁻¹ CBZ III presents a 1-D

symmetry (rod-like) which means that, using the first two strongest interactions, the clusters formed in the supersaturated solution would look as a chain. When considering an interaction energy < -28 kJ.mol⁻¹, CBZ I presents a 1-D symmetry using the first two strongest interactions, while CBZ II is of 1-D symmetry using the first three strongest interactions. For an energy interaction < -23 kJ.mol⁻¹, CBZ III is of 3-D symmetry that takes into account the first four interactions. It therefore appears that, at an energy < -23 kJ.mol⁻¹ CBZ I and CBZ II exhibit a more rod-like behavior than CBZ III. These results seem to be in agreement with the polarization switching observed with the acetonitrile solvent. The aforementioned analysis relies on the assumption that the nucleation is driven by the non-covalent interactions existing in the final crystal. This assumption makes use of the reported work on the nucleation theory based on the bond orientational order [11].

As reported on Figure 3, the CBZ nucleation through NPLIN technique in methanol solvent gives only the polymorphic form III. We have examined the non-covalent interactions, which exist between a CBZ molecule and a fragment C≡N and OH via the use of the CSD. Among 59 structures including true polymorphs, hydrate, solvate and cocrystals (70 hints) Not one shows a non-covalent interaction such as (NH...N, CH...N) with nitrile moiety, while CH...O, NH...O and OH...O are present in a dozen of structures. Therefore in the CBZ supersaturated solution in methanol, the solvent could easily make short contacts enabling the formation of form I or II. Methanol solvent could be seen as a crystallization inhibitor of CBZ I. As shown in Figure 11, form III could easily crystallize through its π - π interaction. Moreover, the fact that one has crystallized form III and form I is coherent with the relative stability of the first two most stable forms of CBZ.

6. Toward the construction of a tool for predicting the compounds suitable for a polarization switching under NPLIN experiments

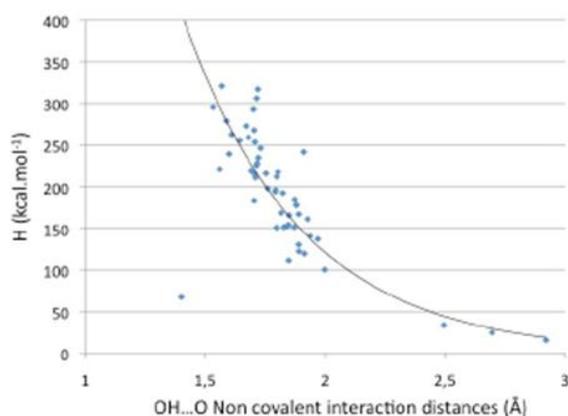
The methodology described previously implies that quite long *ab initio* calculations (especially in the correct choice of the basis set according to the non-covalent interactions present in the compound) were done for each molecules studied *via* NPLIN. Within these calculations it has been demonstrated that crystal packing of 1D-type preferentially interact with a LP LASER beam while a crystal packing of 2D-type preferentially interact with a CP LASER beam. These observations have to be modulated with the solvent interactions, which could exist at the place of the non-covalent molecule – molecule interaction. In order to identify the potential existing polymorph drugs, which could be good candidates for NPLIN, it is therefore important to know, for each compound, the crystal packing type (dimmer, 1D, 2D, 3D) of each true polymorph. That characterization is sometimes reported in the litterature but in a too empiric way; this information is not suitable for our purpose.

We have therefore developed the following methodology: i) we have extracted from the whole CSD all the compounds which present more than one structure reported. This has been done using Excel[®] macro on the data file available from CSD. Starting with 229 855 structures, it falls to 10 346 structures corresponding to 4541 different molecules – 729 having more than 2 polymorphs (coordination compounds, and co-crystals where eliminated); ii) Using another Excel[®] macro tool, we have classified the different results in different Excel sheets according to the number of the different polymorphs; iii) a third Excel[®] macro tool has been used for eliminating the different structures for a same polymorph (such as measurement at different temperatures, pressures or radiation). At this last step we obtain a database of polymorphs.

Once the database of the polymorphs determined, the next task concerns the determination of all non-covalent interactions existing in each polymorph. The development of an automatic process using the cif file and the algorithm existing in Mercury[®] is under progress. In order to validate this point of our methodology, we have extracted around twenty molecules leading to fifty independent polymorphs (mainly drugs with no primary toxicity when manipulating). For these structures we have determined manually, using Mercury[®], all the non-covalent interactions existing in each structure and saved each interactomic distance.

After this, the third task consists in determining the relative rank (in terms of strength) of the non-covalent interactions inside each polymorph. For achieving this goal, the direct use of the non-covalent interaction interactomic distances is meaningful only for a same type of interaction (NH...O, CH...O, ...). The determination of the energy of each non-covalent bond could be a meaningful criteria for classifying all the interactions. According to the work of Espinosa *et al.* [12], it is possible to determine the energy of each bond through the analysis of the total electron density obtained from an experimental high resolution single-crystal X-ray diffraction study. Hence, using the properties of the bond critical point for each interaction (ρ ,

∇, \dots), it is possible to calculate the energy according to Abramov formula [13]. Therefore one has different abacus for each type of bonds as shown on figure 7 for the OH...O interaction. Using recent charge density studies, we have completed for each type of interaction the plot connecting the interatomic distance and the energy at the bond critical point and determined the equation of each curve fit. Using plots presenting the



energy gap between energy density for each interaction versus the energy of the strongest interaction it has been possible to determine how many interactions have to be taken into account for characterization of polymorph type. A final use of Mercury[®] with these retained interaction, has allowed us to establish the tendency of the crystal packing (0-D, 1-D, 2-D, 3-D). The polymorphs, which would be good candidates for NPLIN polarization switching would be those which exhibit at least one polymorph of 1-D type and one of 2-D type. This is the methodology that have led us to study the sulfathiazole NPLIN experiments.

Figure 7. Energy density at the bond critical point of OH...O bond function of the H...O distance.

Conclusions

In this paper, we have shown, that using a well defined methodology and a fully controlled experimental setup, it is possible to use LASER beam in order to induce nucleation of carbamazepine, sulfathiazole and glycine. In all cases, NPLIN reduces drastically the induction time from some days to some minutes. Despite the same experimental device, the nucleation site is either the bottom of the HPLC tube (CBZ, ST) or the meniscus (GLY). The nucleation rate generally increases with the energy density. The use of different polarization of the LASER beam leads to different morphologies and at least different mixtures of polymorphs. The putative polarization switching mechanism has been studied through two different approaches, but both having the same goal, the characterization of the crystal packing type of each polymorph. The first approach, which is based on the interaction energy determination of the pairs of molecules of each polymorph, lead to a quantification of the non-covalent energy interaction, a ranking of these interactions and therefore the characterization of the crystal packing type. The second approach is based on an analysis of the CSD by, using the abacus connecting interatomic distances and energy density interaction.

Acknowledgments The authors would thank Stéphane Veessler (CINaM, UMR 7325 CNRS, Marseille, France) and Nour Eddine Ghermani (Institut Gallien, UMR 8612 CNRS, Châtenay-Malabry, France) for constructive discussions.

References

- [1] a) Garetz, B.A.; Matic, J. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 175501 (2002) b) Sun, X.; Bruce, A.; Garetz, B.A.; Myerson, A.S. *CG&D*, **8**, 1720-1722. (2008) [2] a) Alexander, A.J.; Camp, P.J. *CG&D n*, **9**, 958-963 (2009) b) Ward, M.R.; Ballingall, I.; Costen, M.L.; McKendrick K.G.; Alexander, A.J. *Chemical Physics Letters*, **481**, 25-28 (2009) [3] a) Sugiyama, T.; Adachi, T.; Masuhara, H. *Chemistry Letters*, **38** (2009) b) Yuyama, K.; Rungsimanon, T.; Sugiyama, T.; Masuhara, H. *CG&D* **12**, 2427-2434 (2012) c) Nakamura, K.; Sora, Y.; Yoshikawa, H.; Hosokawa, Y.; Murai, R.; Adachi, H.; Mori, Y.; Sasaki, T.; Masuhara, H. *Applied Surface Science* **253**, 6425-6429 (2007) [4] Markel, AL; Achkasov, AF; Alekhina, TA; Prokudina, OI; Ryazanova, MA; Ukolova, TN; Efimov, VM; Boldyreva, EV; Boldyrev, VV *Pharmacology Biochemistry And Behavior*, **98**, 234-240 (2011) [5] Izmailov, A., F., Myerson, A., S., Arnold, S. *J. Cryst. Growth*, **196**, 234-242 (1999) [6] Ikni, A., Clair, B., Scouflaire, P., Veessler, S., Gillet, J-M., El Hassan, N. *Dumas, F., Spasojević-de Biré, A. CG&D.* (2014) in press [7] a) Spasojević - de Biré, S., *International innovation*, 45-49 (2013) b) Clair, B.; Ikni, A.; Scouflaire, P.; Quemener, V.; Spasojević-de Biré, A. *J. App. Cryst.* (2014) in press [8] Kordikowski, A.; Shekamov, T; York, P *Pharmaceutical Research*, **18**, 682-688 (2001) [9] Lang, M.; KampF, J.W.; Matzger, A. *J. J. Pharma.Sci.*, **91**, 1186-1190 (2002) [10] El Hassan, N.; Ikni, A.; Gillet, J.M.; Spasojevic-de Biré, A.; Ghermani, N.E. *CG&D*, **13**, 2887-2896 (2013) [11] Russo, J.; Tanaka, H. *AIP Conference Proceedings*, **1518**, 232-237 (2013) [12] Espinosa, E; Molins, E); Lecomte, C. *Chem. Phys. Lett.*, **285**, 170-173 (1998) [13] Abramov, Y. A. *Acta Crystallogr.*, **A53**, 264-272 (1997)

Autres articles évoquant les résultats obtenus

■ *Nucléation/croissance des cristaux déclenchée par impulsion laser*; Jacqueline Belloni, Anne Spasojević-de Biré, Sébastien Sorgues, Mehran Mostafavi, Philippe Scoufflaire et Nour-Edine Ghermani; **L'actualité chimique - juil.-août-sept.-oct. 2014 - n° 387-388-389, pp77-84.**

■ *Learning about crystal formation*, **International Innovation (2013) pp 44-46.**

Nucléation/croissance des cristaux déclenchée par impulsion laser

Jacqueline Belloni, Anne Spasojević-de Biré, Sébastien Sorgues, Mehran Mostafavi, Philippe Scoufflaire et Nour-Edine Ghermani

Résumé Le principe des études présentées dans cet article sur la nucléation et croissance des cristaux est de provoquer une onde de choc grâce à une impulsion laser sur une solution sursaturée métastable (« non photochemical laser-induced nucleation »). Des noyaux surcritiques sont ainsi générés et grossissent en cristaux par accretion des molécules environnantes. Des systèmes synchronisés avec l'impulsion permettent d'en étudier la structure selon la polarisation du faisceau laser ou de mesurer la constante de vitesse rapide de croissance.

Mots-clés Cristallographie, transition de phase, laser pulsé, croissance cristalline, nucléation, solution sursaturée, polymorphisme.

Abstract Nucleation and crystallization by laser pulse

The principle of the nucleation and crystallization studies presented in this article is to induce through a laser pulse a shockwave in a supersaturated metastable solution. Supercritical nuclei are generated and grow into crystals by accretion of surrounding molecules ("non photochemical laser-induced nucleation"). Pulse-synchronized set-ups are used to observe their structure depending on the light polarization or to measure the fast growth rate constant.

Keywords Crystallography, phase transition, pulsed laser, crystal growth, nucleation, supersaturated solution, polymorphism.

La cristallisation est le processus de la transition de phase de molécules isolées, à l'état liquide, dissous ou gazeux, vers l'état solide ordonné d'un cristal. C'est un phénomène très répandu, que ce soit dans la nature où elle est présente dans de nombreux domaines tels que le climat (formation de la neige, *figure 1* [1-2]), la géologie (formation des roches et des concrétions par dépôt, *figure 2*), la biominéralisation (formation des os ou des coquillages), ou qu'elle soit exploitée dans l'industrie (métallurgie, purification par cristallisation, formulation, pharmacocinétique, synthèse de grands cristaux purs, marais salants...).

Il est bien établi que la morphologie, la structure et la taille finale des cristaux dépendent essentiellement des conditions de sursaturation de leur naissance (*voir encadré 1*) et de l'anisotropie des vitesses de leur croissance dans les différents axes du cristal, comme le montre la *figure 1* pour les flocons de neige. Il est donc essentiel de comprendre ces mécanismes afin de pouvoir contrôler les spécificités du cristal final.

Cette dynamique de la transition vers le cristal est le plus souvent provoquée par le refroidissement d'un liquide, l'évaporation du solvant d'une solution, l'addition d'un autre liquide ou d'un sel. Elle peut également être consécutive à une réaction chimique dont le produit est insoluble dans le milieu réactionnel initial (ou précipitation). Cependant, le processus de la nucléation est lui-même beaucoup plus rapide que ces changements de température et ces durées d'évaporation ou de mélange,

si bien que sa vitesse et son mécanisme échappent à la mesure. C'est aussi le cas des observations de la croissance d'agrégats cristallins se formant à la suite d'une réaction chimique, même induite très rapidement par une impulsion

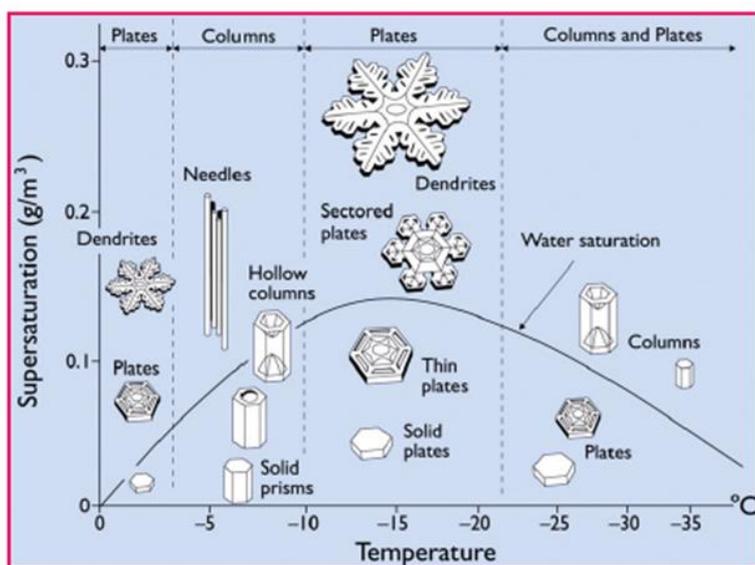


Figure 1 - Différents types de morphologie de flocons de neige formés dans l'air à pression atmosphérique en fonction de la température et de la sursaturation de l'eau, comparables aux conditions d'un nuage dense (d'après [2]).



Figure 2 - Vasques de Pamukalle (Turquie).
Dépôts de carbonate de calcium provenant de sources thermales (photo J. Belloni, DR).

d'électrons [3] ou par microfluidique [4], car ces réactions sont moins rapides que la nucléation elle-même.

Une approche nouvelle pour étudier la dynamique de la cristallisation, en absence de toute réaction chimique et sans avoir recours à un refroidissement ou un mélange, consiste à préparer des solutions sursaturées, donc thermodynamiquement métastables à une température fixée (encadré 1), mais qu'un choc suffit à faire cristalliser. B.A. Garetz et son équipe ont montré qu'une onde de choc créée par des impulsions laser, sans aucune action photochimique, pouvait pourtant provoquer la cristallisation de solutions sursaturées d'urée [5-6]. Ils ont appelé cette méthode « non-photochimical laser induced nucleation » (NPLIN), depuis appliquée à d'autres molécules, notamment par les équipes de H. Masuhara [7-8] et de A.J. Alexander [9]. Nous décrivons ici comment l'onde de choc induite par une impulsion laser permet de provoquer à un moment défini la formation d'un grand nombre de noyaux surcritiques et d'étudier, en fonction des conditions de la transition, soit les différentes structures de cristaux caractérisées par microscope optique, diffusion Raman et diffraction des rayons X, soit d'en étudier la dynamique de croissance en couplant l'impulsion laser unique avec une méthode de détection optique résolue en temps.

Principe des expériences

La première étape consiste à préparer une solution sursaturée métastable des molécules que l'on souhaite faire cristalliser, par dissolution par chauffage de la quantité adéquate de cristaux supérieure à la solubilité ((1) sur la figure 3), puis refroidissement sans vibration jusqu'à par exemple la température ambiante ((2) sur la figure 3). Le domaine de la métastabilité est limité supérieurement par la courbe correspondant à l'équilibre thermodynamique entre les molécules isolées et les dimères qui forment la première étape de la cristallisation [11-13]. Au-delà, la cristallisation est spontanée et immédiate. Cette courbe est représentée en tirets rouges mais seule une valeur par défaut peut être connue. En deçà, la limite de zone métastable $s(\tau)$ est définie comme le rapport maximum à la concentration saturée d'un soluté dans un solvant pour laquelle les cristaux ne se forment qu'au bout d'un temps τ .

La longueur d'onde de l'impulsion laser est choisie de telle sorte qu'elle n'est pas absorbée par l'état métastable qui est

Encadré 1

Métastabilité des systèmes sursaturés

Alors qu'un changement d'état à un autre correspond à une équivalence thermodynamique entre les deux, cinétiquement, le changement d'état n'est pas strictement réversible. En effet, avant de basculer d'un état de molécules isolées, sans interaction entre elles, vers un état condensé ordonné, le système passe souvent, particulièrement s'il est très pur, par un état métastable de durée plus ou moins longue, alors que la transition inverse est spontanée. On assiste ainsi par exemple à la surfusion de l'eau pure, restant liquide dans un état métastable bien au-dessous de 0 °C, alors que la glace fond toujours à 0 °C à la pression atmosphérique. C'est d'ailleurs pourquoi cette température de la glace fondante (et non du gel de l'eau !) a été définie comme référence de l'échelle des températures Celsius. De même, on peut préparer des solutions métastables sursaturées, caractérisées par un indice $s = c_{\text{sursat}}/c_{\text{sat}}$, en dissolvant à chaud une quantité très grande de soluté puis en refroidissant sans à-coups la solution jusqu'à la température ambiante sans qu'elle ne précipite, alors que la limite de solubilité du composé à cette température est largement franchie. Lorsqu'un liquide est très chargé en gaz dissous grâce à une surpression du gaz, puis qu'il est brusquement ramené à la pression ambiante, il se trouve dans un état métastable de sursaturation, et l'excès de gaz s'échappe alors plus ou moins rapidement en bulles...

La théorie classique de la nucléation [10] nous apprend que, dans un système sursaturé, l'étape de croissance d'un cristal ne devient spontanée qu'au-delà d'une taille minimale critique d'un noyau. Elle est donc précédée par l'étape de nucléation, plus lente car la dissociation l'emporte sur la croissance, jusqu'à ce que des fluctuations dans les conditions du milieu permettent la formation de quelques noyaux surcritiques. La métastabilité dure d'autant plus que la probabilité de cette formation est faible. Nous avons montré, dans un modèle moléculaire de la nucléation [11-12], que la métastabilité à l'état de monomères et sa cinétique de cristallisation, très ralentie par rapport à la transition inverse de la dissociation de l'état condensé, résultaient à la fois : a) de l'augmentation de l'énergie moyenne de liaison entre les monomères en fonction de la nucléarité de l'agrégat en construction, qui ressort des calculs théoriques et des expériences sur les agrégats en phase gazeuse, et b) de la nécessité cinétique de construire l'agrégat d'abord par une dimérisation initiale de monomères. En effet, la probabilité cinétique de rencontre simultanée de plus de deux espèces est bien plus faible que pour deux. La construction du noyau surcritique commence donc par une dimérisation, suivie de l'addition successive de molécules jusqu'à la nucléarité critique. La durée de la métastabilité avant cristallisation spontanée dépend alors de la température et de la probabilité d'amorcer cette dimérisation, et de sa poursuite par addition de molécules sur le dimère jusqu'à la nucléarité critique requise par la théorie classique de la nucléation.

Lorsqu'un seul petit cristal est plongé dans la solution métastable, il sert de germe de croissance vers un grand monocristal qui concentre toutes les molécules sursaturées sans que d'autres cristaux ne soient formés. Il est bien connu que la métastabilité est extrêmement sensible même aux impuretés solides, parfois à certaines surfaces de récipients, qui servent de germes exogènes à la croissance des cristaux et aussi aux chocs qui favorisent les fluctuations locales de concentration.

transparent pour celle-ci. Aucune réaction photochimique n'est donc produite. En revanche, l'onde de choc provoquée par l'impulsion crée dans l'échantillon, à température constante, des fluctuations de concentration qui de ce fait peut localement excéder la concentration nécessaire à la formation de dimères et amorcer une croissance avec l'addition des molécules suivantes sur les dimères ((3) sur la figure 3) jusqu'à atteindre la nucléarité critique pour une croissance

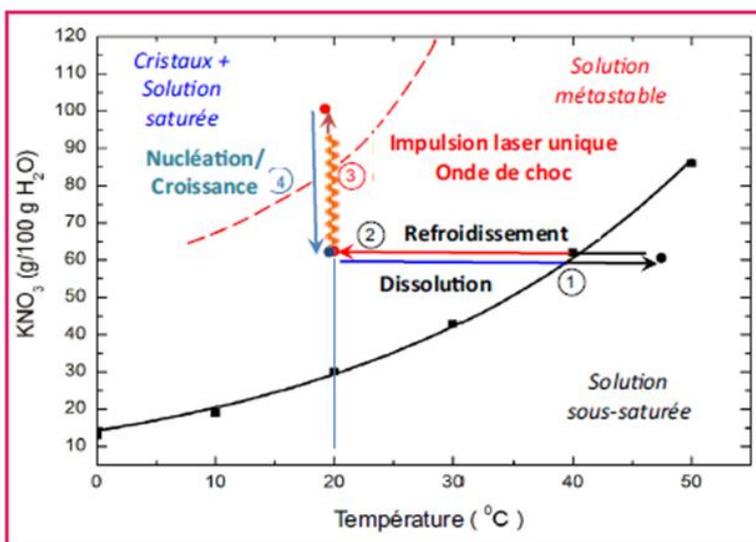


Figure 3 - Diagramme des phases stables et métastable de solutions d'un soluté dans l'eau (ici KNO_3) et principe de l'expérience [13].

1) Dissolution par chauffage au-delà de la courbe de solubilité des cristaux en excès par rapport à la saturation. 2) Refroidissement jusqu'à l'ambiante, sans vibration, de cette solution qui devient sursaturée et métastable. 3) Absorption d'une impulsion unique de laser dont l'onde de choc provoque localement une augmentation de concentration suffisante pour créer les noyaux surcritiques. 4) Très rapidement, ces noyaux grossissent et la concentration de la solution en excès revient à l'état stable de saturation en présence de cristaux en excès. La courbe en tirets symbolise la transition spontanée entre les molécules dissoutes et les dimères, qui constitue la limite de la métastabilité, mais les données ne sont pas connues. La limite de $s(\tau)$ pour une métastabilité pendant un temps τ est située à une concentration inférieure.

spontanée. Remarquons toutefois qu'à tout instant, cette addition coexiste avec des réactions de dissolution qui freinent partiellement la croissance. Après relaxation du choc et la fin de cette étape de nucléation, ces cascades de réactions ont abouti à la formation d'un certain nombre de noyaux critiques qui, à concentration de sursaturation et température constantes, peuvent, conformément à la théorie classique de la nucléation, croître spontanément ((4) sur la figure 3). Les impulsions laser ont donc le double rôle de créer des noyaux surcritiques en grand nombre par rapport aux noyaux formés aléatoirement avec le temps, et tous dans un même temps qui est négligeable par rapport à l'échelle des temps de leur croissance. Ainsi, on obtient un comportement homogène des noyaux en croissance. Par ailleurs, le train d'impulsions ou l'impulsion unique peuvent être synchronisés avec le départ d'une observation directe en fonction du temps des cristaux en croissance.

Nucléation/croissance et structure des cristaux

Montage expérimental

Le montage expérimental a été réalisé de façon à assurer un contrôle de la température, de la puissance du laser, ainsi qu'un grand nombre d'expériences dans les mêmes conditions (figure 4) [14]. La densité d'énergie du laser YAG-Nd (longueur d'onde de 532 nm, faisceau de 7 mm de diamètre, pulse de 7 ns, 300 mJ) est réduite d'un facteur 3 grâce à un condenseur. Quatre-vingt-dix tubes de chromatographie en verre pouvant être remplis, entre 0,2 et 2 mL sont disposés

dans le carrousel et sont tour à tour exposés au faisceau laser et observés optiquement à l'aide d'un microscope optique inverse. L'analyse des cristaux obtenus se fait *in situ* par la prise de photographies à travers le microscope et *ex situ* par différentes techniques : diffusion Raman, diffraction des rayons X sur poudre et diffraction des rayons X sur monocristal. Les paramètres analysés sont l'efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie du laser, de la sursaturation, de la durée d'exposition, le lieu de nucléation (ou plus exactement de la visualisation des cristaux dès qu'ils sont détectables au microscope), la morphologie et la nature du polymorphe obtenu (encadré 2).

Nucléation induite par laser de la carbamazépine et de la glycine

Pour démontrer l'impact du laser sur la nucléation [21], nous avons travaillé avec la carbamazépine [22] et la glycine [14]. L'anti-convulsant carbamazépine ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$) est considéré comme un composé modèle dans l'étude du polymorphisme car il présente quatre polymorphes (le polymorphe III est le plus stable) et une trentaine de pseudo-polymorphes. La glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) est un acide aminé pour lequel Zaccaro *et coll.* [6] ont obtenu une nucléation de la forme α ou de la forme γ en fonction de la polarisation. Il faut au préalable déterminer la limite de la zone métastable pour les solutions sursaturées des deux composés dans différents solvants. L'utilisation de solutions sursaturées dont la sursaturation est inférieure à $s(\tau)$ (où τ est une durée de métastabilité suffisante, choisie pour pouvoir installer les échantillons et les soumettre à l'impulsion laser avant une cristallisation spontanée) permet de s'assurer que la nucléation est bien induite par l'impulsion ou le train d'impulsions laser. Enfin, un soin tout particulier doit être apporté pour éviter tout choc ou toute impureté dans la préparation des solutions. Ensuite, les solutions métastables sont exposées au laser pendant une minute. L'efficacité de la nucléation en fonction de la densité d'énergie pour la polarisation circulaire est représentée sur la figure 5. Ainsi, pour des solutions dont la sursaturation est inférieure à la sursaturation $s_c(\tau)$, l'action du laser induit la nucléation puis la cristallisation des molécules. La caractérisation de la structure cristalline des composés obtenus a montré qu'il

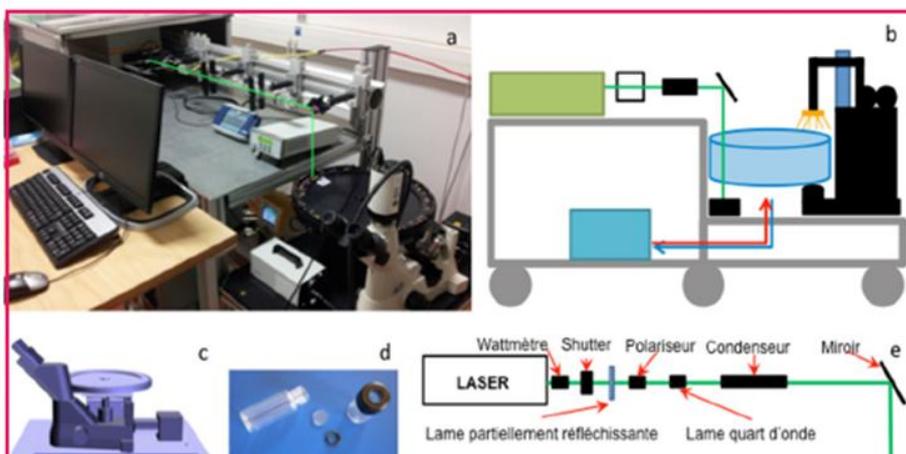


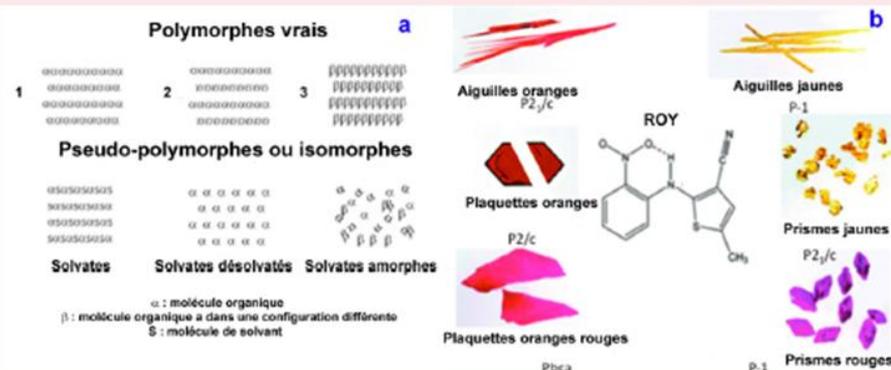
Figure 4 - Montage expérimental développé à l'École Centrale Paris.

a) Photographie de l'ensemble expérimental ; b) schéma de principe ; c) carrousel porte-échantillons et microscope inverse ; d) tubes HPLC ; e) ligne optique. L'ensemble des éléments est piloté par un logiciel développé sous LabView. Un polariseur et une lame quart d'onde sont interposés dans le faisceau pour permettre de transformer le faisceau laser linéaire en un faisceau circulaire.

Encadré 2

Polymorphisme et industrie pharmaceutique

Le polymorphisme est défini par l'aptitude d'une molécule donnée à exister à l'état solide sous différentes structures cristallines (figure a) qui ont des arrangements ou des conformations différents des molécules dans la maille cristalline [15]. Il signifie essentiellement que dans différents polymorphes, la même molécule existe dans différentes orientations. Si cette différence est liée à un type d'empilement cristallin, le polymorphisme est dit d'empilement ou de position, et si elle est due à la différence de conformation, il est appelé polymorphisme de conformation [16]. Par exemple, le 5-méthyl-2-[(2-nitrophényl)amino]-3-thiophénecarbonitrile, connu sous le nom de ROY (« red, orange and yellow »), peut cristalliser en neuf formes différentes [17], dont six sont représentées sur la figure b. Les différents polymorphes présentent non seulement des formes, mais aussi des couleurs différentes. Selon W.C. Mc Crone : « Chaque composé a différentes formes polymorphiques et, de manière générale, le nombre de formes connues d'un composé donné est proportionnel au temps et à l'énergie consacrés à la recherche sur ce composé » [18]...



a) Représentation schématique de l'empilement cristallin de polymorphes et de pseudo-polymorphes. b) Différentes formes polymorphiques de la molécule ROY [15].

Le pseudo-polymorphisme (ou isomorphisme) concerne l'inclusion dans la structure cristalline d'une quantité stœchiométrique au soluté de molécules de solvant, créant une entité différente de celle de départ : il ne s'agit plus alors de la même phase. Si le solvant est de l'eau, on parle d'hydrate, et s'il s'agit de solvant organique, de solvate. Les polymorphes ont des structures cristallines différentes et donc en général des énergies de réseau impliquant des propriétés physico-chimiques également différentes : température de fusion, solubilité, vitesse de dissolution, propriétés optiques ou réactivité chimique. Pour ces raisons, ils jouent un rôle considérable dans l'utilisation finale du produit, et c'est pourquoi un intérêt grandissant leur est porté, aussi bien au niveau académique qu'industriel.

Dans le domaine pharmaceutique, le polymorphisme concerne plus de 80 % des molécules de principe actif. Les différences de propriétés physico-chimiques engendrées par les différences de structures peuvent avoir des conséquences dramatiques en termes de biodisponibilité, processabilité galénique, stabilité [19-20]. Ainsi, le polymorphisme peut affecter la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique porte un intérêt croissant à la compréhension des relations entre les propriétés de l'état solide et les comportements des principes actifs.

s'agissait bien de la glycine ou de la carbamazépine et d'une nucléation non photochimique induite par laser.

Vers le contrôle du polymorphisme via la polarisation du laser

Le contrôle du polymorphisme via la polarisation du laser a été obtenu sur la glycine par Zaccaro *et coll.* [6], Sun *et coll.* [23] avec un laser pulsé à 1 064 et 532 nm, et par Yuyama *et coll.* [24] dans D₂O avec un laser continu à 1 064 nm. Les figures 6a et 6b montrent la proportion des polymorphes α et γ de la glycine dans H₂O en fonction de la sursaturation et de la polarisation. À haute sursaturation, la proportion de glycine γ est plus importante sous polarisation circulaire, en cohérence avec les travaux antérieurs. En exposant une solution de carbamazépine dans l'acétonitrile à différentes concentrations pendant une minute à un faisceau laser polarisé circulairement, on obtient une majorité de polymorphe III (figure 6c), alors

qu'en utilisant un faisceau laser polarisé linéairement, il est possible d'obtenir dans une partie des tubes la nucléation du polymorphe I (figure 6d). Il s'agit de la première mise en évidence de l'effet de la polarisation sur un principe actif.

Contribution à la compréhension du mécanisme de nucléation en fonction de la polarisation

Selon la polarisation du laser (linéaire ou circulaire), des proportions différentes de carbamazépine I et III ou de glycine α et γ ont été obtenues. L'une des interprétations expliquant l'effet de la polarisation du laser lors d'une nucléation par NPLIN est basée sur la préexistence de clusters moléculaires dans la solution sursaturée. Les clusters de symétrie bâtonnet seront ceux qui conduiront à un cristal lorsque la polarisation du laser est linéaire et les clusters de symétrie disque seront le point de départ des cristaux se formant avec un faisceau laser circulaire [6]. Afin d'estimer la symétrie des clusters préexistants, nous avons posé les hypothèses suivantes : i) la symétrie des pré-clusters peut être prédite à partir de la symétrie de l'empilement cristallin ; ii) la nucléation est régie par les liaisons non covalentes présentes dans le polymorphe final ; et iii) l'intensité relative de ces liaisons non covalentes dans les polymorphes cristallisés est considérée comme le critère majeur pour prédire la symétrie des pré-clusters.

Nous avons identifié pour les trois formes I, II et III, les différentes paires de molécules formées par une molécule de carbamazépine (CBZ) choisie comme étant une molécule centrale, et chaque molécule voisine est liée par une liaison non covalente à cette molécule centrale. Pour chaque paire, nous avons calculé l'énergie d'interaction *ab initio* en utilisant Gaussian [25] et la structure moléculaire des rayons X sur monocristal

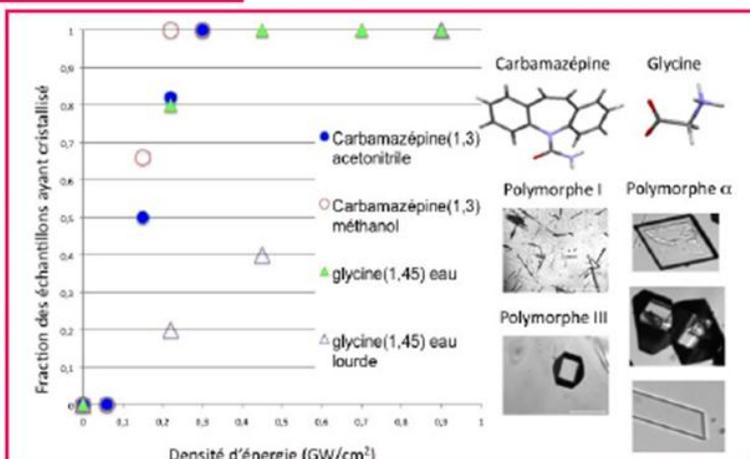


Figure 5 - Efficacité de la nucléation pour la carbamazépine ($s = 1,30$) dans l'acétonitrile et le méthanol et pour la glycine ($s = 1,45$) dans H₂O et D₂O en fonction de la densité d'énergie dans le cas d'une polarisation circulaire. Photos des cristaux générés par NPLIN.

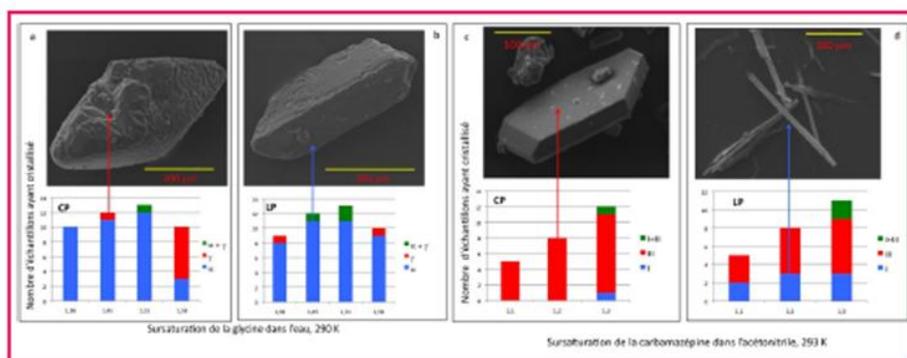


Figure 6 - Contrôle du polymorphisme via la polarisation du laser.

a) et b) Glycine dans H_2O [19]; densité d'énergie $0,9 \text{ GW cm}^{-2}$; c) et d) Carbamazépine dans l'acétonitrile [20]; densité d'énergie $0,3 \text{ GW cm}^{-2}$. Images des cristaux polymorphes prises au microscope électronique.

[26]. Pour CBZ III, l'énergie d'interaction a également été déterminée précédemment par El Hassan *et coll.* à partir d'une étude expérimentale de la densité de charge [26]. Pour une énergie d'interaction $< -64 \text{ kJ mol}^{-1}$, les trois formes polymorphes présentent des agrégats de type dimères. À ce niveau d'énergie, on peut considérer qu'il n'y a pas de différence entre les trois polymorphes. Pour une énergie d'interaction $< -39 \text{ kJ mol}^{-1}$, CBZ III présente une symétrie 1-D (bâtonnet), ce qui signifie qu'en utilisant les deux premières interactions fortes, les groupes formés dans la solution sursaturée ont un arrangement sous forme de chaîne. Lorsqu'on considère une énergie d'interaction $< -28 \text{ kJ mol}^{-1}$, CBZ I présente une symétrie 1-D en utilisant les deux interactions les plus fortes, tandis que CBZ II est de symétrie 1-D en utilisant les trois premières interactions les plus fortes. Pour une énergie d'interaction $< -23 \text{ kJ mol}^{-1}$, CBZ III est de symétrie 3-D en prenant en compte les quatre premières interactions. Il apparaît donc qu'à une énergie d'interaction $< -23 \text{ kJ mol}^{-1}$, les formes I et II présentent un comportement plus semblable à un bâtonnet que la forme III. Ces résultats sont en accord avec l'effet de la polarisation du laser sur les polymorphes de CBZ obtenus dans le solvant acétonitrile [22].

Dynamique, mécanisme et vitesse de nucléation/croissance

Une variante récente de la méthode NPLIN permet d'accéder à la dynamique elle-même de la création et de la croissance des cristaux, donc au mécanisme et à la vitesse, en couplant l'impulsion avec une détection optique rapide et en choisissant des conditions où les lois de la cinétique homogène sont applicables [13].

Montage expérimental

Afin de mesurer la vitesse de fixation des molécules sur un cristal en croissance, la spécificité de ce montage est basée, contrairement aux précédents qui privilégiaient l'observation morphologique ou structurale de cristaux isolés, sur l'observation par des mesures optiques rapides d'une nombreuse population de petits cristaux. Pour cela, le laser doit être capable de générer, en une impulsion unique, une onde de choc suffisamment énergétique pour produire une grande concentration de noyaux qui épuisent ensuite dans leur croissance l'excès de molécules sursaturées sans jamais devenir des cristaux de taille trop grande qui les ferait sédimenter. Ainsi, ils restent distribués d'une manière homogène dans tout le volume. Le laser Nd: YAG

émet après le doubleur des impulsions à 532 nm avec une durée de 7 ns à mi-hauteur et une énergie de 200 mJ et une densité de puissance de $5,7 \times 10^7 \text{ W cm}^{-2}$. De plus, le faisceau est focalisé par une lentille de focale 20 mm , portant cette densité à $1,5 \times 10^{10} \text{ W cm}^{-2}$. Pour maintenir sa stabilité, le laser fonctionne à la cadence de 10 Hz et est ramené à $0,5 \text{ Hz}$ juste avant d'ouvrir l'obturateur pour laisser passer une seule impulsion (figure 7). Par ailleurs, l'impulsion unique du laser est synchronisée avec un montage spectrophotométrique résolu en temps qui permet de mesurer l'évolution temporelle de l'intensité de lumière transmise à travers les cristallites en croissance.

Afin de produire une concentration élevée de cristaux, la sursaturation des solutions, préparées suivant le schéma de la figure 3, doit être élevée. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur le sel très soluble de nitrate de potassium KNO_3 , ou salpêtre, dont les molécules sont en outre incolores dans le visible et n'absorbent donc pas le faisceau laser. Sa courbe de solubilité est représentée sur la figure 3. La concentration à saturation est de $c_{\text{sat}} = 2,7 \text{ mol L}^{-1}$, et la sursaturation étudiée la plus élevée est de $c_{\text{sursat}} = 5,3 \text{ mol L}^{-1}$. Compte tenu des concentrations étudiées, les ions K^+ et NO_3^- du sel sont appariés en molécules neutres KNO_3 . Dans les conditions de sursaturation la plus élevée, la métastabilité ne dure que $\tau = 10 \text{ min}$. Chaque échantillon est donc préparé juste avant de le soumettre à l'impulsion. L'onde de choc produite par l'impulsion unique du laser provoque la formation d'un très grand nombre de noyaux qui croissent rapidement en cristaux. Le montage optique résolu en temps (figure 7) détecte cette croissance grâce à l'extinction de la lumière transmise, ou turbidité, due à la diffusion par les cristaux formés d'une manière homogène dans tout le volume de la solution. La turbidité est donnée par la relation $Tu = \ln(I_0/I_t)/l$, où I_0 et I_t sont

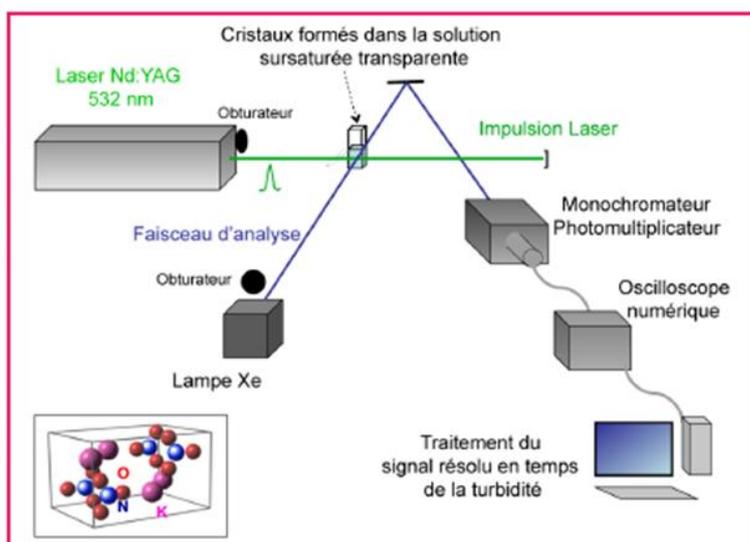


Figure 7 - Schéma du montage expérimental au Laboratoire de Chimie physique [13].

Un dispositif spectrophotométrique résolu en temps permet d'observer directement la croissance rapide dans la cellule de la turbidité provoquée par la formation de cristaux dans une solution sursaturée métastable soumise à l'onde de choc d'une impulsion laser intense. Les cellules optiques sont en polystyrène, à usage unique, et de section $0,5 \text{ cm}$ pour le parcours du faisceau laser et 1 cm pour le faisceau d'analyse. Le volume de solution est de $0,5 \text{ cm}^3$. Insert : maille orthorhombique de KNO_3 ($a = 5,4142 \text{ \AA}$; $b = 9,1659 \text{ \AA}$; $c = 6,4309 \text{ \AA}$) [27].

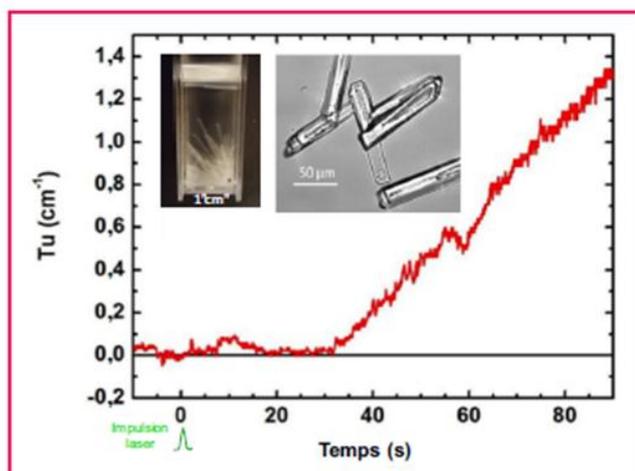


Figure 8 - Variation de la turbidité en fonction du temps dans une solution sursaturée de KNO_3 à $4,35 \text{ mol L}^{-1}$, après une impulsion laser avec une densité de puissance de $7 \times 10^9 \text{ W cm}^{-2}$. Inserts : aiguilles de KNO_3 formées finalement et image en microscopie optique.

respectivement l'intensité de lumière transmise avant impulsion et au temps t , et l est le parcours optique. La turbidité est proportionnelle à la concentration des molécules incluses dans les cristaux avec un coefficient $\gamma = (30 \pm 4) \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Elle est mesurable dès que quelques millièmes de la concentration des molécules en sursaturation ont cristallisé. Dès la fin de l'expérience, des cristaux sont déposés sur une lame de verre, rincés et séchés, afin qu'ils soient stables, en vue des observations en microscopie optique ou par force atomique (AFM). Sinon, au contact de la solution saturée, une très lente « maturation d'Ostwald » tendrait à faire progresser la taille de quelques cristaux sous forme d'aiguilles à travers le gel aux dépens des cristallites.

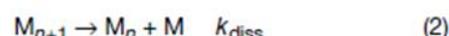
Cinétique de la cristallisation

La figure 8 présente un signal de turbidité en fonction du temps dans le cas où la densité de puissance du laser est deux fois plus faible que les spécifications ci-dessus. On constate alors que la cristallisation n'est pas instantanée mais s'étend sur des dizaines de secondes. Dans une première étape, quelques petits cristaux se forment mais ils grossissent au-delà de la taille de sédimentation, et après cette sédimentation, la solution redevient momentanément transparente. Ensuite, depuis le fond de la cellule, ils continuent à grossir pendant des minutes en longues aiguilles de plusieurs mm qui s'interposent dans le faisceau d'analyse et la turbidité croît à nouveau. L'épaisseur finale de ces cristaux est d'environ $30 \mu\text{m}$ (figure 8, inserts). Ces phénomènes de formation de cristaux visibles à l'œil ressemblent à ceux de la littérature, mais la croissance n'est pas homogène dans tout le volume de la solution (la forme des signaux cinétiques dépend de la position du faisceau d'analyse par rapport au fond de la cellule), et les lois de la cinétique homogène ne sont pas applicables.

En revanche, lorsque la densité de puissance du laser est de $1,5 \times 10^{10} \text{ W cm}^{-2}$, la cristallisation est instantanée (figure 9). Des noyaux de croissance sont formés en si grand nombre sous l'onde de choc de l'impulsion que les cristallites auxquels ils donnent naissance agrègent chacun une partie des molécules sursaturées mais ne deviennent jamais assez gros pour sédimenter. Finalement, ils restent en suspension

figée, séparés par un très mince film de solution saturée, comme dans une sorte de gel (figure 9, insert) [13].

L'analyse des cinétiques de croissance permet d'en déterminer le mécanisme. La caractéristique la plus remarquable de ces signaux est que la turbidité croît linéairement avec le temps, et ceci depuis l'origine. On voit que les pentes augmentent rapidement en fonction de l'indice initial de sursaturation. Les conditions homogènes de la croissance de la population des cristaux dans tout le volume nous autorisent à analyser quantitativement les signaux. Nous verrons que la concentration des noyaux surcritiques initiaux est très faible par rapport à celle des molécules et que la probabilité de coalescence entre deux noyaux doit être négligée. La croissance des cristaux se produit donc par accrétions successives de molécules sur les noyaux avec la vitesse k_{acc} , coexistant avec des pertes partielles par dissolution avec la vitesse k_{diss} jusqu'à l'équilibre $c_{\text{sat}} = k_{\text{diss}}/k_{\text{acc}}$:



La concentration totale $c_t = Tu/\gamma$ des molécules incluses dans les cristallites augmente linéairement avec le temps et est elle-même égale au produit de la concentration des cristaux $c_{n,t}$ par le nombre de molécules n_t par cristal en croissance $c_t = n_t \times c_{n,t}$. Une analyse détaillée [13] des cinétiques linéaires conduit à conclure qu'à une sursaturation donnée, la concentration $c_{n,t}$ des cristaux est en fait indépendante du temps et est égale à la concentration initiale des noyaux critiques formés en fin de l'impulsion laser mais aussi à la concentration finale des cristaux. Aucun nouveau noyau n'est formé par la suite et les cristaux ne fusionnent pas. La taille finale des cristallites, obtenue par AFM (figure 10), permet de connaître le nombre final n_f de molécules par cristal, et par conséquent la concentration des cristaux $c_n = (c_{\text{sursat}} - c_{\text{sat}})/n_f$ qui est constante tout au long de la croissance et égale à celle des noyaux. Par exemple, à $s = 1,95$, la taille finale des cristallites est de $(600 \pm 100) \text{ nm}$ en diamètre moyen, $n_f = (1,4 \pm 3) \times 10^9$ molécules par cristal et $c_n = (1,8 \pm 1) \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. En fin de croissance, l'épaisseur moyenne du film de solution saturée séparant les cristallites est estimée

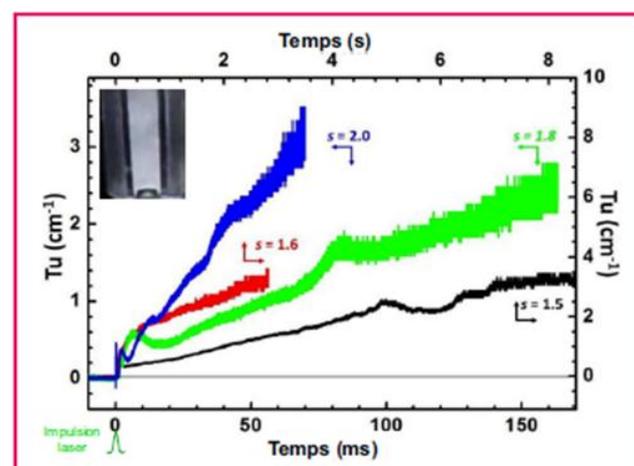


Figure 9 - Évolution en fonction du temps de la turbidité des cristaux de KNO_3 après l'onde de choc d'une impulsion laser de $1,5 \times 10^{10} \text{ W cm}^{-2}$ dans des solutions sursaturées avec divers indices de sursaturation $s = c_{\text{sursat}}/c_{\text{sat}}$. Notez que l'échelle des temps est 50 fois plus longue pour $s = 1,5$ ou $1,6$ que pour $s = 1,8$ ou 2 . Insert : suspension figée des petits cristaux à $s = 2$ à l'état final.

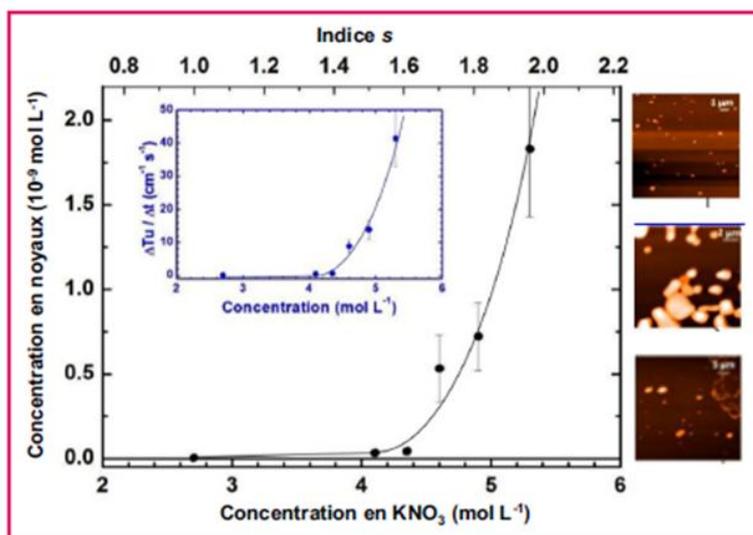


Figure 10 - Variation en fonction de l'index de sursaturation $s = [\text{KNO}_3]_{\text{sursat}} / [\text{KNO}_3]_{\text{sat}}$ de la concentration en noyaux critiques. Inserts : images AFM des cristaux en fin de croissance pour $s = 1,6$ (1 800 nm), $s = 1,8$ (800 nm) et $s = 1,95$ (600 nm) [13].

à 700 nm seulement, ce qui explique que les mouvements des cristaux dans la suspension soient figés. Connaissant la vitesse de croissance mesurée de la turbidité $\Delta Tu / \Delta t$ (figure 10, insert), et les concentrations c_n de M_n et c_{sursat} de M dans les équations (1) et (2), on peut, pour la première fois, déterminer les constantes de vitesse bimoléculaire d'accrétion d'une molécule sur un cristal en croissance aussitôt après la nucléation : $k_{\text{acc}} = (3,0 \pm 0,6) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et de dissolution monomoléculaire $k_{\text{diss}} = (8 \pm 2) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs sont plus faibles que la limite de diffusion et suggèrent une énergie d'activation nécessaire pour la réorientation favorable et la désolvation des molécules avant de s'intégrer au réseau cristallin. Mais elles sont encore très rapides puisqu'en bilan, elles correspondent à l'addition d'une molécule sur chaque cristal à chaque 1,3 nanoseconde. Remarquons aussi que la constante de vitesse est déterminée à partir de la concentration de M_n mais qu'elle est bien indépendante de n , alors que la taille des cristaux augmente beaucoup au cours de la cinétique observée, et que les sites possibles de fixation des nouvelles molécules se multiplient sur les facettes et les arêtes. Nous avons donc été amenés à conclure que le seul nombre invariant de sites de fixation sur le cristal était celui de ses sommets sur lesquels la constante de vitesse d'accrétion devait être bien plus grande que sur les autres sites, pourtant plus nombreux. Ceci peut jouer un rôle dans la structure en fines aiguilles des cristaux que l'on observe lorsque les conditions sont réunies justement pour qu'ils grandissent (figure 8). Remarquons que c'est sous cette forme d'aiguilles que le salpêtre se forme lentement par capillarité sur les murs humides des caves.

Pour toutes les autres conditions de sursaturation étudiées (figure 9), la connaissance des constantes k_{acc} et k_{diss} donne accès aux concentrations des cristaux, donc des noyaux critiques, ainsi qu'aux tailles finales qui sont en bon accord avec les observations par AFM, et qui augmentent quand la sursaturation est plus faible. On constate que la concentration des noyaux critiques est très faible mais qu'elle augmente très vite en fonction de la sursaturation (figure 10). Bien que la formation des noyaux se produise pendant l'impulsion et soit trop rapide pour être directement observée, la première étape en est la dimérisation de deux molécules

dont la vitesse dépend du carré de leur concentration instantanée. La croissance du dimère jusqu'à la nucléarité surcritique se produit ensuite pendant la relaxation par accrétions de molécules successives qui sont des processus proportionnels à la concentration. Nous attribuons donc la variation très marquée de la concentration des noyaux à la première dimérisation.

Perspectives

La méthode NPLIN appliquée à des solutions sursaturées a montré toutes ses possibilités pour mieux comprendre la nucléation/croissance des cristaux, soit qu'on s'intéresse à leur structure sous diverses formes, éventuellement de grande taille, soit qu'on s'intéresse au mécanisme et à la cinétique de croissance après une impulsion unique d'une population de cristallites restant en suspension. De nombreux systèmes inorganiques ou organiques peuvent être ainsi examinés, à partir de solutions sursaturées mais aussi de liquides purs surfondus. De plus, la méthode NPLIN s'avère prometteuse dans le cadre de l'étude du polymorphisme de substances actives pharmaceutiques. Après une étude poussée des différents paramètres impliqués dans la nucléation (température, sursaturation, solvant, densité d'énergie...), il est possible d'envisager un contrôle du polymorphe à cristalliser en fonction de la polarisation du laser.

Références

- [1] Furukawa Y., Fascination of snow crystals: how are their beautiful patterns created? (www.lowtem.hokudai.ac.jp/ptd/ice/english/aletter.html).
- [2] Libbrecht K.G., The physics of snow crystals, *Rep. Prog. Phys.*, 2005, 68, p. 855.
- [3] Belloni J., Mostafavi M., In *Studies in Physical and Theoretical Chemistry 87. Radiation Chemistry: Present Status and Future Trends*, C.D. Jonah, B.S.M. Rao (eds), Elsevier, 2001, p. 411-452.
- [4] Abécassis B., Testard F., Spalla O., Gold nanoparticle superlattice crystallization probed *in situ*, *Phys. Rev. Lett.*, 2008, 100, p. 115504.
- [5] Garetz B.A., Aber J.E., Goddard N.L., Young R.G., Myerson A.S., Non-photochemical, polarization-dependent, laser-induced nucleation in supersaturated aqueous urea solutions, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, 77, p. 3475.
- [6] Zaccaro J., Matic J., Myerson A.S., Garetz B.A., Nonphotochemical, laser-induced nucleation of supersaturated aqueous glycine produces unexpected gamma-polymorph, *Crystal Growth & Design*, 2001, 1, p. 5.
- [7] Masuhara H., Sugiyama T., Rungsimanon T., Yuyama K., Miura A., Tu J.R., Laser-trapping assembling dynamics of molecules and proteins at surface and interface, *Pure Appl. Chem.*, 2011, 83, p. 869.
- [8] Yoshikawa H.Y. et al., Laser ablation for protein crystal nucleation and seeding, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, 43, p. 2147.
- [9] Alexander A.J., Camp P.J., Single pulse, single crystal laser-induced nucleation of potassium chloride, *Crystal Growth & Design*, 2009, 9, p. 958.
- [10] Zeldovitch J.B., On the theory of new phase formation, cavitation, *Acta Physicochim. URSS*, 1943, 18, p. 1.
- [11] Belloni J., Pernot P., Role of nuclearity-dependent properties of small clusters in the nucleation process and thermal hysteresis at the phase transition, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, p. 7299.
- [12] Belloni J., Mostafavi M., Les agrégats, précurseurs des nanoparticules, *L'Act. Chim.*, 2011, 348, p. 13.
- [13] Jacob J.A., Sorgues S., Dazzi A., Mostafavi M., Belloni J., Homogeneous nucleation-growth dynamics induced by single laser pulse in supersaturated solutions, *Crystal Growth & Design*, 2012, 12, p. 5980.
- [14] Clair B., Ikni A., Scouffaire P., Quemener V., Spasojević-de Biré A., A new experimental setup for a high throughput controlled Non-Photochemical LASER-Induced Nucleation (NPLIN). Application to glycine crystallization, *J. App. Cryst.*, 2014, doi:10.1107/S160057671401098X, sous presse.
- [15] Bemstein J., *Polymorphism in Molecular Crystals*, Clarendon, 2002.
- [16] Yu L., Reutzel-Edens S.M., Mitchell C.A., Crystallization and polymorphism of conformationally flexible molecules: problems, patterns, and strategies, *Org. Process Res. Dev.*, 2000, 4, p. 396.
- [17] Yu L., Color changes caused by conformational polymorphism: optical crystallography, single-crystal spectroscopy, and computational chemistry, *J. Phys. Chem.*, 2002, A106, p. 544.
- [18] McCrone W.C., Polymorphism, in *Physics and Chemistry of the Organic Solid State*, D. Fox, M.M. Labes, A. Weissberger (eds), Wiley Intersci., 1965, 2, p. 725.
- [19] Rodriguez-Spons B., Price C., Jayasankar A., Matzger A.J., Rodriguez-Hornedo N., General principles of pharmaceutical solid polymorphism, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, 56, p. 241.

Learning about crystal formation

At Ecole Centrale Paris, Professor Anne Spasojević-de Biré is working to improve the NPLIN technique, a procedure that induces crystal formation in supersaturated solutions. Here, she describes some of her methodology along with some common problems faced in drug development

THE SPASOJEVIĆ-DE BIRÉ NETWORK'S SIX-STEP METHODOLOGY¹

STEP 1 Preparation of supersaturation solution; determination of the stability curves and the metastable limit zone (@spms.ecp and @cinam.marseille)

STEP 2 Exposure of the supersaturated solution to the LASER beam (@em2c.ecp)

STEP 3 Observation and characterisation (@spms.ecp and @ipsit.u-psud)

STEP 4 Charge density study of the molecule, which has crystallised through NPLIN method (@spms.ecp and @institut Gallien.u-psud)

STEP 5 Theoretical study (*ab initio* and molecular dynamics) (@spms.ecp and @em2c.ecp)

STEP 6 Thermodynamic study of the relative stability of the different polymorphs (@pcim.Paris V)

¹Steps 2 and 3 will be reproduced at IDA @ens-Cachan, using fluorescence spectrometer for characterisation



NON PHOTOCHEMICAL LASER INDUCED NUCLEATION (NPLIN) is a technique that allows control nucleation. It makes use both of a LASER beam intensity to induce and enhance nucleation, as well as LASER polarisation (circular, linear) to control the polymorphic form. In brief, a LASER light (532 nm, 7 ns, 10 Hz) is applied on a supersaturated solution of an organic species. This solution is metastable; that is, it contains more molecules than the solubility curve requires. Therefore, one might say we are under the limit of the metastable zone.

In order to induce nucleation, an external field has to be applied. This is done through the exposition of a LASER light on the supersaturated solution. Some minutes to hours thereafter, crystallites of some nanometres are detected via an optical microscope, indicating that nucleation has been induced by LASER. The term 'non-photochemical' is used to indicate that there is no chemical transformation of the molecules. This method was been accidentally discovered by Professor Bruce A Garetz (Polytechnic University of New York, USA).

HYPOTHETICAL MECHANISMS

The mechanism of NPLIN is still under discussion in the community. The first hypothesis proposes that re-nucleated

clusters exist in the supersaturated solution before exposition, and that alignment would prefigure the different polymorphs. Therefore, if the polarisability tensor of the cluster is rod-like (1D crystal packing), then a linear polarisation LASER beam will induce nucleation, while a disk-like cluster (2D crystal packing) will nucleate with circular LASER. This putative mechanism, called Non-linear Kerr Effect (NKE), was developed to explain the selective nucleation of glycine. However, molecules such as glacial acetic acid (GAA) don't exhibit this behaviour and show the limit of this explanation, since the structure of GAA has two perpendicular directions in the crystal lattice, which don't allow nucleation through the aforementioned mechanism.

It is also hypothesised that LASER can induce a shock wave or bubble formation (by local heating) in the solution increasing locally supersaturation leading on the nucleation. In order to validate or disprove the Garetz hypothesis, and beside NPLIN experiments, charge density studies (experimental and theoretical) and molecular dynamics calculation are performed. The very precise and fine characterisation of the electronic structure, coupled with the electrostatic potential and the energy interaction, will allow us to give some insight in the mechanism.

COLLABORATIONS

Our methodology is based on a multidisciplinary approach, pulling together different research communities dealing with nucleation and crystallisation, fluorescence, experimental and *ab initio* charge density, molecular dynamics, and experimental thermodynamics. These four communities generally don't work together. Focusing on the same problem with different eyes is itself a relatively novel area!

The next steps will be to follow in situ the nucleation just after the LASER exposition. This could be done using fluorescence technique on fluorescent molecules. We are just beginning this approach, which deals with observation of objects measuring between 10 Å to nanometres.

A change of phase

Researchers in France are using LASERs to elicit phase changes specifically by inducing crystallisation to occur. The question is how to control and exploit this phenomenon

CRYSTALLISATION IS THE process by which liquid solute forms solid crystals. It is a fundamental part of separation and purification employed in a wide range of materials and pharmaceutical industries – with the majority of orally administered medications formed of crystalline structures. The conditions at the time of crystallisation determine a variety of different crystal properties such as purity, shape and size distribution. Differences in these properties have knock-on effects in compound manufacture, primarily affecting the efficiency of processes such as filtration, drying and formulation. On top of this, these differences can carry important functional consequences, for example by affecting the efficacy, bioavailability and shelf life of a drug. These differences are difficult to control and consequently carry a huge economic burden.

Drugs that exhibit phase differences or stereoisomerism are further affected by the exact crystallisation process. A particular example of this is the extent of chiral separation. It is well documented that different polymorphs of an active pharmaceutical ingredients carry with them different chemical and physical properties. Factors affected include bioavailability and drug stability, as well as dissolution and the ease with

which a drug can be processed or manufactured. The study of polymorphism and crystallisation of pharmaceutical compounds is therefore tantamount to reducing the ever increasing costs of bringing a drug to market.

Another pressing issue in the pharmaceutical industry is the tendency of drugs with multiple polymorphic states to transition spontaneously from one conformation to another – with unpredictable effects on the action of a drug. This carries serious consequences that would ideally be avoided.

IS THERE A SOLUTION?

The recent accidental discovery of non photochemical laser induced nucleation (NPLIN) by Professor Bruce A Garetz et al. forms the basis of work set to tackle this problem. By applying of a LASER light (532nm, 7ns, 10Hz) to a supersaturated solution of the desired organic species nucleation and therefore crystallisation can be induced very simply – some minutes to hours later, nanocrystals can be detected through an optical microscope. The intensity of the LASER allows nucleation to be induced or enhanced and the type of LASER polarisation – be it linear or circular –

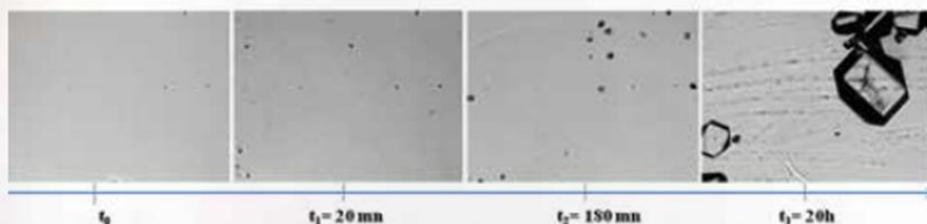
enables the polymorphic form of the compound that crystallises to be controlled. Despite this exciting and novel method of controlling the process of crystallisation, few groups in the world actually use this method due to a general lack of information outlining the important characteristics required for NPLIN. Consequently, the mechanisms involved are also poorly understood.

Professor Anne Spasojević-de Biré of the Laboratoire Structures Propriétés et Modélisation des Solides (SPMS), France, seeks to bridge this gap, by building on the basic science involved and furthering our collective understanding of the mechanisms involved, the conditions required and the molecular consequences of particular conformations.

The main objective of Spasojević-de Biré's group is to develop NPLIN such that it is an efficient and controlled process widely applicable to the field of medicine crystallisation. Her work combines expertise and methods from experimental, theoretical and empirical disciplines.

ACTIVITIES SO FAR

The researchers have thus far devised a complete experimental methodology for approaching the task, which not only aims to fully describe the solute solution before during and after irradiation, but also seeks to fully characterise the crystalline products obtained and predict binding energy interactions. This involves the selection of relevant compounds – in this case fluorescent compounds that form polymorphic structures. The team is utilising a specially developed synchronised fluorimeter to make in situ measurements of the solute's



CAPTION TO FOLLOW

INTELLIGENCE

SMS COMMUNICATIONS NANOSCALE NUCLEATION INDUCED BY POLARISED LIGHT.

CONTROL OF CRYSTAL POLYMORPHISM: APPLICATION TO ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

OBJECTIVES

To develop non-photochemical light-induced nucleation such that it is an efficient and controlled process widely applicable to the field of medicine crystallisation.

KEY COLLABORATORS

Ecole Centrale Paris*, Châtenay-Malabry, France • SPMS UMR 8580 CNRS: **Professor J-M Gillet**, **Professor H Dammak**, **Dr N Gulblin**, **Dr N El Hassan** (postdoc), **Dr H Yang** (postdoc), **A Ikni** (PhD), **B Clair** (PhD), **X Shi** (PhD), **W Li** (PhD) • EM2C UPR 288 CNRS: **P Scoufflaire**, **Dr Y Chalopin** • Université Paris-Sud*, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France • Institut Gallien UMR 8612: **Professor N-E Ghermani** • Institut Paris Sud d'Innovation thérapeutique, IFR 141: **Dr F Dumas** • Université Paris V, Faculté de Pharmacie, Paris, France • PCIM, ERA 4066: **Dr P Espeau**, **Dr Y Corvis**, **C Alzina** (postdoc) • Ecole Normale Supérieure de Cachan*, Cachan, France • Institut d'Alembert, FR 3242 CNRS: **Dr R Pansu**, **Dr V Genot**, **J-P Audibert** • Université d'Aix-Marseille, Marseille, France • CINAM, UMR 7325 CNRS: **Dr S Veester**, **Dr N Candoni**, **Dr H Zoubida**

*Institutions belonging to the new Paris-Saclay campus and their researchers to the LABEX CHARMMAT, LASIPS and LERMIT.

CONTACT

Professor Anne Spasojević-de Biré

Ecole Centrale Paris
Laboratoire Structures Propriétés et Modélisation des Solides (SPMS)
UMR 8580 du CNRS
Grande Voie des Vignes
Cedex 92295 Châtenay-Malabry, France

T +33 1 41 13 15 90
E anne.spasojevic@ecp.fr

www.spms.ecp.fr

ANNE SPASOJEVIĆ-DE BIRÉ obtained a degree in Chemistry at the University Pierre and Marie Curie, Paris VI in 1985 and defended her PhD on the study of the electron deformation density of carbyne chromium complexes at the University Pierre and Marie Curie, Paris VI in 1989. Her research activity is mainly based on the experimental determination of the electron and electrostatic properties of molecules of pharmaceutical interest.



behaviour immediately before, during and after exposure to LASER pulses. The fluorescence spectra, lifetime and polarisation of the sample depend on aggregate shape, stoichiometry and orientation. Analysis of the data generated will therefore yield information regarding the crystalline conformation of the aggregates that form. Complementary to this form of analysis, a characterisation method using a dynamic light scattering (DLS) setup will be developed for in situ measurements, allowing the study of the formation and growth of nuclei. This will enable the identification of the precise interactions leading to the stabilisation of the formation of certain nuclei. "Dimers and oligomers exhibit red shifted fluorescence spectra due to the stabilisation of excited states by de-dipolar coupling between molecules. Using time resolved single photon counting, we can follow the dynamic of aggregates in the nanosecond range and should be able to probe the equilibrium shift within the population of aggregates induced by the NPLIN laser," Spasojević-de Biré elaborates. The data obtained relating to NPLIN's influence on nucleation rate and polymorphism will be used to determine the potential for NPLIN to be used for phase control of a drug.

The crystals produced through NPLIN will then require identification and further analysis. Spasojević-de Biré's group will use powder X-ray crystallography in order to identify the compounds produced after LASER exposure and the compounds will be further characterised, with particular focus on the functionally relevant properties of the given polymorph leading to a description of the experimental binding energy interactions of each compound. Electron density and electrostatic properties of each compound will be analysed through high resolution X-ray diffraction experiments, which will inform theoretical *ab initio* determination of a given compound's electronic and electrostatic

properties. Other important data, including the binding energy of some crystal clusters, will be determined both experimentally and theoretically, and these can then be compared with the values deduced from those of molecular modelling methods. "Real-world predictions from atomic simulations will provide insight on the pathway that solvated organic molecules follow toward nucleation," Spasojević-de Biré notes.

"To this end, experimental conditions such as temperature, concentration, pH and polarisation of light will be closely followed by our theoretical method."

Electrostatic parameters, such as the compound's electric moments and atomic charge, can be used in further experiments, a noteworthy example being the modelling and docking of drugs into protein binding sites, where force field choice is a fundamental problem.

Spasojević-de Biré is also considering ~10 active molecules, investigating the influence that polymorphism has on the physico-chemical properties of a given drug. This carries a specific focus on drugs that have notorious problems associated with them due to their apparent polymorphic behaviour.

PROJECTED IMPACT

The wider implications of the work are evident – simplification of synthesis methods will carry great financial savings, particularly given the intensive efforts that currently go into producing specific polymorphisms of drugs. In spite of this, polymorphs can still convert from less to more stable states, and so identifying the most stable form during the phase of drug discovery will save significant time and effort. Spasojević-de Biré's work marks the development of a remarkable investigative tool, enabling us to probe the relationship between isomerism and function in unprecedented ways.

Spasojević-de Biré's work marks the development of a remarkable investigative tool, allowing us to probe the relationship between isomerism and function in unprecedented ways



CAPTION TO FOLLOW

