

La calorimétrie et la santé

Résumé Cet article illustre l'apport de la titration calorimétrique isotherme (ITC), de l'analyse calorimétrique différentielle (DSC) et de la microcalorimétrie à fluxmètre thermique dans le domaine pharmaceutique : étude des interactions entre un principe actif et sa cible ou son excipient (application à la dialyse, à l'évaluation de la cytotoxicité des métaux), étude de la stabilité de ces principes actifs et contrôle de leur vieillissement par détection de leurs produits de dégradation (nouvelles phases ou nouvelles molécules). Il aborde enfin l'étude, surtout par ITC, de la dépollution par adsorption des métaux lourds, des colorants et des radionucléides à partir de solutions aqueuses.

Mots-clés **Titration calorimétrique isotherme (ITC), cytotoxicité des métaux, stabilité du principe actif, transition polymorphique, mesure calorimétrique de pureté, dépollution par adsorption, calorimétrie.**

Abstract **Calorimetry and health: study of efficiency and stability of pharmaceutical active ingredients, depollution and decontamination**

This paper explains the part of isothermal titration calorimetry (ITC), differential scanning calorimetry (DSC) and heat flowmeter microcalorimetry in the pharmaceutical field: study of the interactions between an active substance and its target or excipient (with application to blood dialysis or to the evaluation of metals cytotoxicity), study of active ingredients stability, and monitoring of aging by detecting the degradation products. Depollution and decontamination by adsorption of heavy metals, dyes or radioactive waste from aqueous solutions is also examined, and the interest of liquid adsorption calorimetry is illustrated.

Keywords **Isothermal titration calorimetry (ITC), metal cytotoxicity, active ingredient stability, polymorphic transition, calorimetric determination of purity, depollution by adsorption.**

Ce sont plusieurs caractéristiques différentes des expériences calorimétriques qui rendent la calorimétrie intéressante dans le domaine de la santé. C'est d'abord sa très grande sensibilité, avec la possibilité de mesurer, par microcalorimétrie à fluxmètre thermique, un effet aussi faible que le μJ , qui est exploitée dans l'étude de l'interaction d'un principe actif avec sa cible. C'est ensuite la rapidité et la facilité d'emploi de l'analyse calorimétrique différentielle (DSC) qui permet de contrôler l'état de vieillissement d'un médicament stocké et de déterminer l'état physique dans lequel s'y trouve le principe actif. C'est enfin la possibilité d'opérer aussi bien avec des suspensions qu'avec des lits d'échantillon qui permet d'étudier, dans tous les cas, l'adsorption de polluants en solution.

Interactions d'un principe actif avec sa cible ou son excipient

L'étude de l'interaction d'un principe actif avec sa cible ou encore avec l'excipient auquel il va être associé est bien sûr primordiale. Pour être complète, cette étude doit nous donner accès d'une part à la structure de l'ensemble que peuvent former ces deux entités, et d'autre part aux équilibres et aux énergies d'interaction en jeu. La détermination de la structure est le domaine de la biologie structurale, qui s'appuie sur des méthodes comme la résonance magnétique nucléaire, la spectrographie X et la modélisation moléculaire. La détermination des équilibres et des énergies en jeu est le domaine de la thermodynamique qui s'appuie en grande partie sur la calorimétrie. Or la calorimétrie, notamment sous forme de « titration calorimétrique isotherme », se prête tout particulièrement à l'étude de systèmes biologiques très divers, en solution ou en suspension, et présente l'intérêt de ne pas interférer avec les réactions étudiées, étant donné que le détecteur (le plus souvent un fluxmètre thermique) est extérieur au système sous observation.

La titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ou ITC, pour « isothermal titration calorimetry ») peut être considérée comme une expérience de titration conduite au cœur d'un calorimètre qui a la double fonction de détecteur (pour le titrage) et d'appareil de mesure de l'enthalpie de réaction. Elle est isotherme, ce qui facilite aussi bien l'exploitation des résultats thermodynamiques que la reproduction de conditions favorables aux systèmes biologiques étudiés. Les calorimètres à fluxmètre thermique, du type Tian-Calvet, sont très adaptés à ce type d'étude, à la fois parce qu'ils se prêtent bien au fonctionnement en système ouvert imposé par l'introduction d'un réactif et parce qu'ils ont la sensibilité très élevée habituellement nécessaire pour ce type d'étude.

Dans certaines conditions, l'ITC permet un accès simultané à l'énergie de Gibbs standard de réaction ΔG° ainsi qu'à l'enthalpie ΔH° et à l'entropie ΔS° correspondantes [1-2], ce qui en fait un outil thermodynamique très complet, comme nous allons l'illustrer ci-après.

La dialyse du sang : interactions entre toxines urémiques et protéines

Cette illustration de l'utilité de l'ITC s'inscrit dans le domaine médical et plus précisément dans celui de l'insuffisance rénale, c'est-à-dire d'un dysfonctionnement dans l'épuration du sang. Il s'en suit une accumulation de solutés définis comme toxines urémiques. Les patients ont recours à une purification extracorporelle du sang par hémodialyse, qui s'appuie sur un phénomène osmotique. Lors des séances de dialyse, le sang est séparé d'une solution isotonique, le dialysat, par une membrane mésoporeuse dont les pores ont des diamètres compris entre 2 et 10 nm. Sous l'effet du gradient de concentration, les molécules suffisamment petites diffusent du sang vers le dialysat. Toutefois, certaines toxines présentent des taux d'élimination relativement faibles. L'indoxylsulfate et le para-crésyl

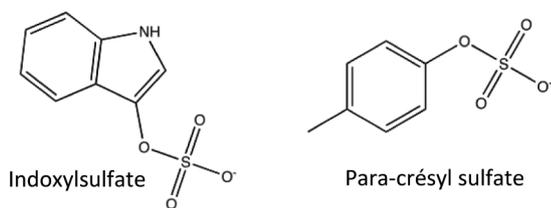


Figure 1.

sulfate (figure 1) sont deux molécules typiques de ces toxines suffisamment petites pour diffuser à travers la membrane mais pourtant mal éliminées.

Une des hypothèses avancées pour expliquer cette élimination insuffisante est une très forte interaction avec une protéine du plasma sanguin, ce que la calorimétrie devrait permettre de vérifier. L'ITC est en effet une technique de choix pour étudier l'interaction de ces deux toxines avec une protéine. Parmi les protéines qui circulent, l'albumine, qui constitue plus de 50 % des protéines du plasma, est connue pour lier divers composés, des médicaments aux acides gras, et sa concentration plasmatique est élevée, de l'ordre de 30 à 40 g L⁻¹. De plus, des études structurales ont mis en évidence une interaction entre l'indoxylsulfate et l'albumine. L'indoxylsulfate serait situé dans une poche hydrophobe et présenterait des interactions de type électrostatique à l'entrée de cette dernière (figure 2) [3].

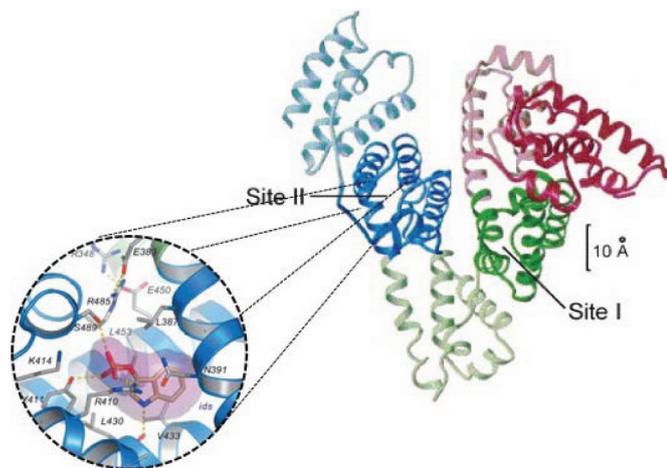


Figure 2 - Représentation de l'indoxylsulfate (en mauve) dans une poche hydrophobe de l'albumine (site II).

Or l'étude réalisée sur l'indoxylsulfate et l'albumine par ITC met en évidence une interaction bimoléculaire avec une constante d'affinité modérée, de l'ordre de 2 000. Les paramètres thermodynamiques associés sont une enthalpie réactionnelle $\Delta H^\circ = -36 \text{ kJ mol}^{-1}$ et une entropie réactionnelle $\Delta S^\circ = -65 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Ces signes et valeurs de ΔH° et ΔS° sont fréquemment rencontrés dans le cas d'interaction électrostatique avec modification de conformation de protéine, ce qui confirmerait donc l'étude structurale. Ces valeurs traduisent l'aspect exothermique de la réaction (ΔH°) due à l'interaction électrostatique, le caractère négatif de la variation d'entropie suggérant une modification de la conformation de la protéine. La même étude a été effectuée avec le para-crésyl sulfate. Les deux « signatures thermodynamiques » de ces interactions sont présentées dans la figure 3.

Les proportions des contributions ΔH° et ΔS° à l'enthalpie libre de réaction ΔG° sont similaires pour les deux toxines, ce qui

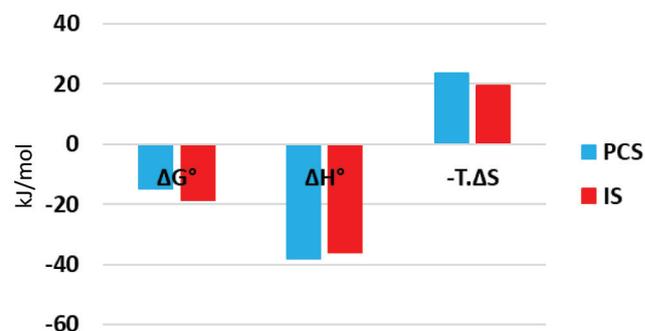


Figure 3 - Signatures thermodynamiques des interactions de l'indoxylsulfate (IS, en rouge) et du para-crésyl sulfate (PCS, en bleu) avec l'albumine humaine.

semble donc impliquer des interactions de même nature, donc probablement pour un même site. L'existence d'une compétition entre les deux toxines pour le même site de liaison a pu être effectivement vérifiée par une mesure d'interaction entre l'indoxylsulfate et l'albumine saturée à 50 % de para-crésyl sulfate : cette interaction baisse notablement en présence de para-crésyl sulfate, comme l'indiquent les plus faibles valeurs aussi bien de la constante d'affinité ($K_a = 1\ 100$) que de l'enthalpie de réaction ($\Delta H^\circ = -15 \text{ kJ mol}^{-1}$), mais surtout le changement de signe de l'entropie de réaction ($\Delta S^\circ = 11 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). Ainsi, la nature réversible de l'interaction associée à la faible affinité et à la compétitivité de l'interaction semble exclure une forte liaison à l'albumine comme explication des faibles taux d'élimination rencontrés en hémodialyse. Il est donc plus raisonnable d'incriminer, peut-être simultanément, d'une part une diffusion trop lente de ces deux toxines à travers la membrane, et d'autre part leur adsorption à la surface d'un système vasculaire dont on évalue l'étendue (c'est-à-dire l'aire interne de tous les vaisseaux sanguins) aux environs de 700 m². Ces deux hypothèses sont encore à vérifier.

L'ion Al³⁺ endommage-t-il l'ADN ?

L'aluminium est largement utilisé à l'heure actuelle (emballages, ustensiles de cuisine, colorants, médicaments...). Toutefois son innocuité est encore débattue, notamment son rôle dans certains types de cancer et la détermination de son interaction avec l'ADN permettrait d'apporter des éléments de discussion. Si une grande partie des interactions mesurées en ITC peuvent être traitées comme précédemment à l'aide d'un modèle impliquant une classe de sites identiques, certaines interactions concernant notamment des polymères ou l'ADN présentent des mécanismes plus complexes, l'interaction d'un ligand avec un site diminuant l'affinité du site voisin [4]. C'est pourquoi si l'interaction de Al³⁺ avec l'ADN est traitée selon le modèle simplifié ci-dessus, on aboutit à des paramètres thermodynamiques erronés. En effet, cette liaison est gouvernée par des interactions coulombiennes entre la charge positive du cation métallique et les charges négatives des phosphates de l'ADN. Les charges négatives sont donc neutralisées au fur et à mesure de l'interaction, ce qui diminue la constante d'affinité au fur et à mesure de la saturation puisque la densité de charge de l'ADN décroît proportionnellement. Le caractère fortement endothermique de la réaction (figure 4a) traduit une forte modification de la distribution spatiale des contre-ions au voisinage des groupements phosphate de la molécule d'ADN. Cette isotherme représente la chaleur normée par la quantité de matière injectée en fonction du rapport Al³⁺/ADN. Dans ce cas, la modification de la constante d'affinité en fonction de la force ionique permet

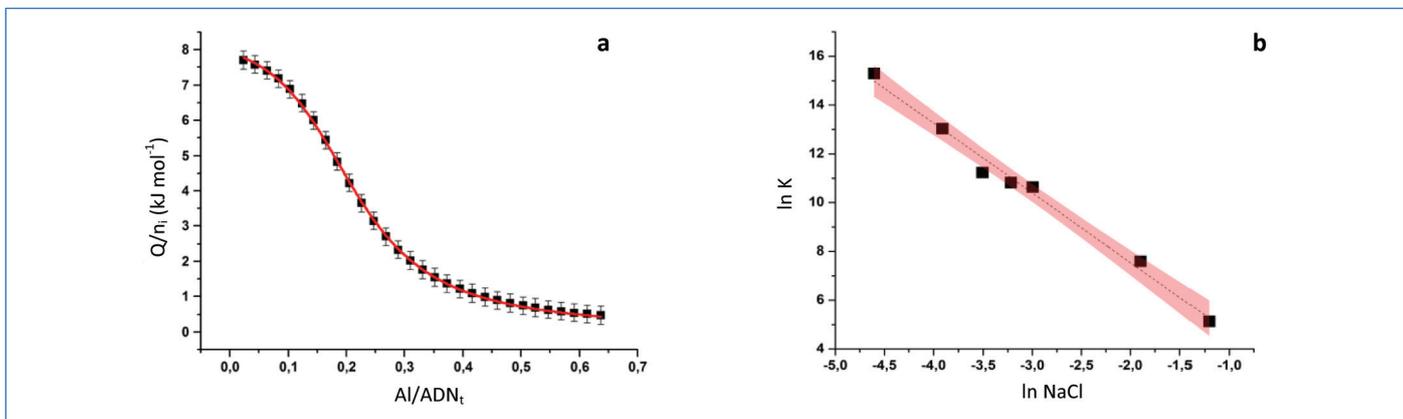


Figure 4 - a) Isotherme d'interaction de Al^{3+} avec l'ADN en conditions physiologiques ; b) dépendance de la constante d'affinité avec la concentration en NaCl.

d'une part de valider la nature électrostatique de l'interaction due à l'écrantage des charges, et d'autre part d'isoler dans l'interaction la composante purement électrostatique [5]. La linéarité du graphe représentant le logarithme de la constante d'affinité en fonction du logarithme de la concentration en NaCl (figure 4b) peut être exprimée par l'équation suivante [6] :

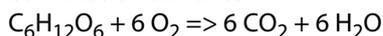
$$\ln(K_a) = \ln(K_{NE}) - n \cdot \ln[NaCl]$$

où K_{NE} représente la constante d'affinité de la partie non électrostatique, $[NaCl]$ la concentration en sel et n la quantité de matière en contre-ions déplacés lors de l'interaction.

La linéarité observée dans la figure 4b permet de constater que la partie non électrostatique de l'interaction est quasi nulle. D'autre part, la valeur de la pente permet de déterminer que la liaison d'un Al^{3+} sur l'ADN entraîne le déplacement de 2,8 charges portées par les contre-ions. Ces résultats permettent d'obtenir une compréhension des mécanismes gouvernant l'interaction. La liaison de l' Al^{3+} à l'ADN modifie localement la répartition des charges négatives de l'ADN. Cette modification locale du champ électrique peut perturber les interactions de l'ADN avec les enzymes de réparation et les rendre moins efficaces. Par contre, les énergies en jeu, qui suggèrent une interaction électrostatique, permettent d'exclure que les brins d'ADN subissent un dommage direct par rupture de liaisons covalentes.

Bioénergétique : cytotoxicité des métaux

Il est très facile de mettre en évidence par calorimétrie l'effet d'un composé toxique sur du matériel cellulaire vivant en étudiant sa bioénergétique cellulaire. En effet, d'un point de vue thermodynamique, l'ensemble des processus depuis la glycolyse jusqu'à la chaîne respiratoire peut se résumer en la réaction de combustion suivante :



dont l'enthalpie est ΔH° (glucose, 310 K, s) = - 2 808 kJ mol⁻¹. L'enthalpie étant une fonction d'état, sa valeur ne dépend pas du nombre d'étapes, très élevé dans un cycle biochimique. Ceci veut dire que quel que soit le mécanisme sous-jacent, la thermogénèse (ou production de chaleur) cellulaire est liée de la même manière à la consommation de glucose.

La toxicité du cadmium (qui se manifeste sur les fonctions digestive, respiratoire et surtout rénale) appelle d'autant plus l'attention que son absorption, qui est assez générale (que ce soit par l'alimentation ou par inhalation, notamment de fumée de cigarette) est cumulative, son élimination du corps humain se faisant avec une demi-période supérieure à dix ans. Pour

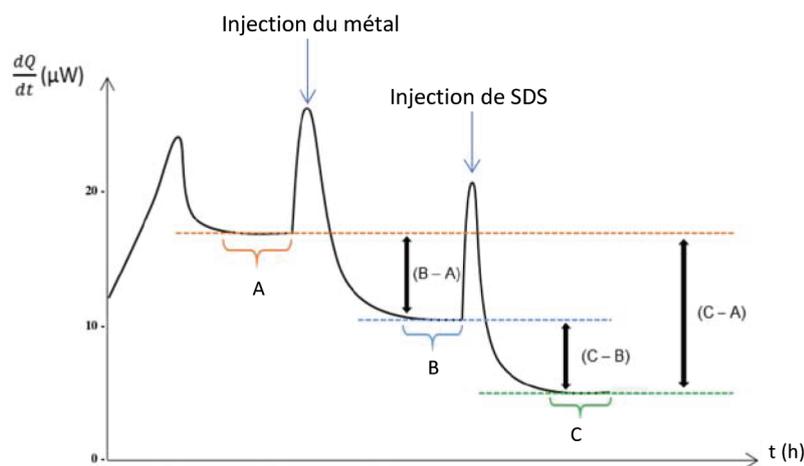


Figure 5 - Enregistrement calorimétrique type: A) thermogénèse de fibroblastes ; B) thermogénèse après exposition ; C) ligne de base (d'après [7]).

évaluer la toxicité du cadmium sous forme Cd^{2+} (et donc son effet sur la bioénergétique cellulaire), des cellules de peau ou « fibroblastes » en suspension dans un milieu cellulaire (1 million par mL) sont placées dans un calorimètre et le débit thermique est enregistré au cours du temps (figure 5) [7]. Après un premier pic dû à l'introduction de la seringue dans la cellule de mesure du calorimètre et après avoir atteint un premier palier thermique (en A sur la figure), une solution contenant le métal est ajoutée. Le deuxième pic correspond à l'enthalpie de dilution de la solution de Cd^{2+} dans le milieu cellulaire. Ensuite, la thermogénèse décroît sous l'effet toxique de Cd^{2+} jusqu'à un nouvel état métabolique. Une fois le nouveau palier atteint (B), une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) est injectée afin de détruire la cellule (ce qui se traduit par un troisième pic, correspondant à la dilution du SDS et l'explosion des fibroblastes), ceci permettant de définir la ligne de base correspondant au plateau C qui est celle du système en l'absence de tout métabolisme.

Ainsi, la différence de débit thermique entre A et B correspond à l'effet du métal sur la thermogénèse cellulaire tandis que la différence entre les plateaux initial et final A et C correspond à la thermogénèse physiologique des cellules de peau, qui dégage une puissance thermique de 15 ± 5 pW par cellule. Les mesures réalisées à plusieurs concentrations en Cd^{2+} ont montré que l'inhibition de la thermogénèse est proportionnelle à la dose d'exposition. Le cadmium a donc un effet direct sur le catabolisme du glucose et altère la voie métabolique qui fournit l'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire.

Stabilité des principes actifs pharmaceutiques

Pour enregistrer un médicament en France, une autorisation de mise sur le marché (AMM) doit être délivrée par les autorités de la santé. Les exigences françaises sont celles de l'Europe qui reprennent intégralement les règles internationales de l'ICH (International conference on harmonisation, ou Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain). La stabilité d'un médicament ou d'un principe actif est son aptitude à conserver ses propriétés physiques, chimiques, microbiologiques et biologiques pendant toute sa période de validité. Le principe actif est le constituant du médicament qui définit son activité et sa toxicité intrinsèques. Ses propriétés physico-chimiques sont affinées pendant la phase de développement en vue du médicament final. Le vieillissement pourra affecter considérablement ces propriétés : apparition de produits de dégradation toxiques, diminution d'activité. Plus de 90 % des médicaments sont administrés par voie orale, le plus souvent sous une forme solide à partir de laquelle le principe actif doit passer dans la circulation sanguine. L'état solide choisi doit donc être conservé tout au long de son utilisation. L'étude de stabilité du principe actif est le fondement de la stabilité du médicament [8].

Pourquoi la calorimétrie ?

L'analyse calorimétrique différentielle (DSC) et la microcalorimétrie isotherme sont présentes dans la pharmacopée européenne qui décrit les techniques et exigences d'analyse des médicaments. La DSC, qui permet des mesures rapides, est particulièrement bien adaptée à l'industrie, grâce aussi à sa polyvalence, son automatisation et son couplage possible à des mesures par IR, rayons X, thermogravimétrie et spectrométrie de masse [8-14]. Les phénomènes observés en DSC sont reliés à la thermodynamique et à la règle des phases de Gibbs. Toute forme solide peut être affectée par des variations de température, de pression ou d'humidité avec des changements de phase obéissant aux règles thermodynamiques. Ces changements sont accompagnés d'effets endothermiques ou exothermiques mesurables par DSC. C'est la raison pour laquelle la DSC est unique pour l'étude des transitions polymorphiques qu'on souhaite éviter au cours du stockage, du transport et de la manutention du principe actif et du médicament. Les formes polymorphes d'un principe actif ayant des solubilités différentes, il peut s'ensuivre des problèmes au niveau de la dissolution du médicament.

Un exemple qui a profondément marqué l'industrie pharmaceutique est celui du ritonavir, un médicament antirétroviral utilisé pour le traitement de l'infection par le VIH. En effet, en 1998, Abbott, qui le commercialisait depuis dix-huit mois sous le nom de Norvir®, a dû arrêter sa production après qu'on ait découvert sa transformation inattendue en un polymorphe peu soluble. Une année entière – pendant laquelle on peut estimer à 250 millions de dollars le montant des ventes perdues – a été nécessaire pour la refonte des procédés de fabrication et de conservation de ce médicament et pour en obtenir à nouveau l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis.

Le polymorphisme peut avoir un impact extrêmement important sur l'activité biologique et la toxicité et les autorités de contrôle internationales, qui veillent à l'efficacité et à l'innocuité des médicaments, sont préoccupées par le contrôle de leurs transitions polymorphiques et donc de leur stabilité.

Pour cette raison, elles y ont consacré plusieurs chapitres (recouvrant vrai polymorphisme, solvates, hydrates, état amorphe) dans le dossier AMM, dont l'arbre de décision de la directive ICH Q6 pour les spécifications de qualité. L'étude de la transition vitreuse des formes amorphes, qui est très facilement suivie par DSC, est particulièrement importante pour les formes solides inhalées, dont on doit éviter la forme amorphe. En effet, la taille des particules doit rester assez faible pour permettre la pénétration dans les poumons ; or en général, les formes amorphes se transforment en forme cristalline sous l'effet de l'humidité, avec augmentation de la taille des particules et donc diminution d'activité. La microcalorimétrie isotherme est récemment utilisée en routine grâce aux mesures de très faibles énergies des recristallisations de la phase amorphe en forme cristalline. Par ailleurs, c'est encore l'application de la thermodynamique qui permet de calculer la somme des impuretés formant un eutectique avec le principe actif, et donc de déterminer la pureté de ce dernier.

Variété des objectifs et des paramètres des études de stabilité

Les objectifs des études de stabilité sont multiples :

- connaître très tôt les facteurs influençant les caractéristiques de qualité du principe actif en vue du médicament désiré ;
- identifier les produits de dégradation et leurs mécanismes de formation ;
- identifier les paramètres physico-chimiques de l'état solide, particulièrement le polymorphisme ;
- développer les méthodes analytiques permettant de séparer et de détecter les impuretés de la synthèse et les produits de dégradation ;
- fixer les périodes de contrôle ;
- choisir l'emballage et les conditions de stockage ;
- définir les conditions de transport et de manutention ;
- fixer les conditions de stockage et de manipulation de la substance de référence utilisée pour déterminer la teneur du principe actif et du médicament.

De même, les paramètres susceptibles d'agir sur la stabilité sont nombreux :

- la nature du sel choisi pour principe actif ;
- la forme de l'état solide, métastable ou stable, amorphe ou cristallin, hydraté ou non ;
- la taille des particules ;
- les impuretés résiduelles de la synthèse, notamment métalliques, la nature du solvant ;
- les conditions de l'environnement : température, lumière, atmosphère oxydante, humidité ;
- la nature de l'emballage.

Les essais de « stress », sur les conditions de la décomposition forcée en fonction du pH, de la température, de l'humidité, de la présence d'oxygène etc. sont menés dès le début du développement et font partie du dossier d'enregistrement. Ils orientent le choix du sel et des méthodes analytiques permettant de suivre la dégradation. Le dossier de stabilité selon la directive ICH Q1 doit obéir au protocole fixé par les autorités pour les lots de phases cliniques, les lots de transposition à l'échelle industrielle, les lots de mise sur le marché, puis enfin les lots de suivi de production. Les températures, le degré d'humidité, les durées de stockage et la dégradation sous l'action de la lumière sont fixés. Un modèle d'évaluation des résultats est donné. Un changement de synthèse ou même seulement de site de production engendre une nouvelle étude de stabilité.

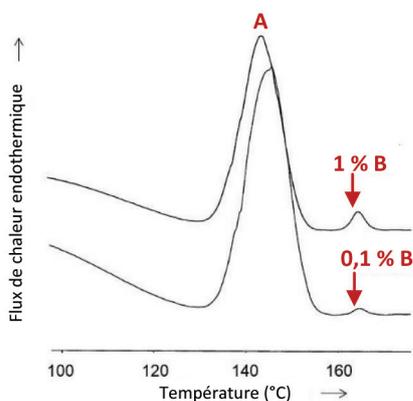


Figure 6 - Sensibilité de la DSC pour détecter la transformation en forme cristalline B d'une forme A thermodynamiquement instable pendant son stockage (courbes réalisées avec des appareils DSC-2 ou DSC-7 de Perkin Elmer).

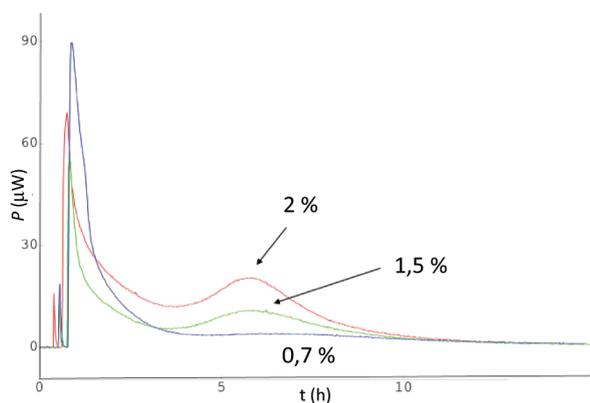


Figure 7 - Détermination de la teneur en produit amorphe par microcalorimétrie sous atmosphère de diméthylformamide (obtenu avec l'instrument Thermal Activity Monitor de Thermometrics).

Effets du polymorphisme sur la stabilité

Bien qu'il soit difficile de quantifier le polymorphisme par DSC en raison des facteurs de cinétique inhérents à cette technique, sa sensibilité pour détecter des traces de forme stable dans une forme métastable peut être mise à profit. C'est le cas dans l'exemple de la *figure 6* : lors d'un changement d'échelle dans la production, une forme B non détectée auparavant est apparue dans la forme A choisie. Les traces de forme B accélèrent la transformation lors du stockage, de sorte que les lots ne pouvaient être stockés raisonnablement si des traces de forme B étaient présentes [13]. On voit sur la figure qu'une

concentration de 0,1 % est encore facilement détectée. C'est donc cette méthode qui a permis de suivre la fabrication et les conditions de stockage de ce principe actif au réfrigérateur. En parallèle, une nouvelle formule du médicament solubilisant cette nouvelle forme a été développée.

La microcalorimétrie isotherme permet de son côté de mesurer précisément les énergies de recristallisation des formes amorphes sous l'effet de vapeurs d'eau ou de solvant. L'exemple donné dans la *figure 7* concerne un médicament administrable par inhalation en développement. Il faut éviter la forme amorphe pouvant recristalliser avec augmentation de la taille des particules qui risquent alors de ne pas atteindre correctement les poumons. Cette figure montre la facilité avec laquelle cette technique permet de ne détecter que 1,5 % d'amorphe, ce qui n'est d'ailleurs pas une limite [14]. Là aussi, la technique est utilisable en routine.

Détermination de pureté par DSC

La DSC permet de mesurer, aux faibles concentrations molaires (< 2 %), la concentration totale des impuretés formant un eutectique avec le principe actif, par application de la loi de van't Hoff, sans nécessité de disposer d'une référence pure du principe actif [12, 15], à condition qu'il n'y ait pas de dégradation au point de fusion de la molécule. La présence d'impuretés eutectiques se manifeste sur le liquidus du diagramme de phase par l'élargissement du pic de fusion final et l'abaissement de la température de fusion. La *figure 8a* montre bien cet effet qualitativement et la *figure 8b* présente le résultat du calcul de pureté correspondant pour moins de 2 % molaires d'impuretés. Il est dit généralement que c'est une méthode de mesure absolue de la pureté. Toutefois, la nature des différentes impuretés doit être déterminée car leur structure et leur qualification permettent de les introduire dans les spécifications analytiques du principe actif. C'est donc au début du développement que la DSC est une aide fort utile, quand la méthode chromatographique ne sépare pas les impuretés ou que la détection choisie est inappropriée. Elle est également précieuse lorsque des changements de synthèse ou même de site de production font apparaître d'autres produits de dégradation, soit par suite de l'autocatalyse d'une impureté, ou d'un changement polymorphique, ou d'une modification de taille des particules ou de la présence de traces de solvants résiduels. Cette même détermination de pureté permet enfin de valider la bonne stabilité des principes actifs en fin de durée de stockage [8].

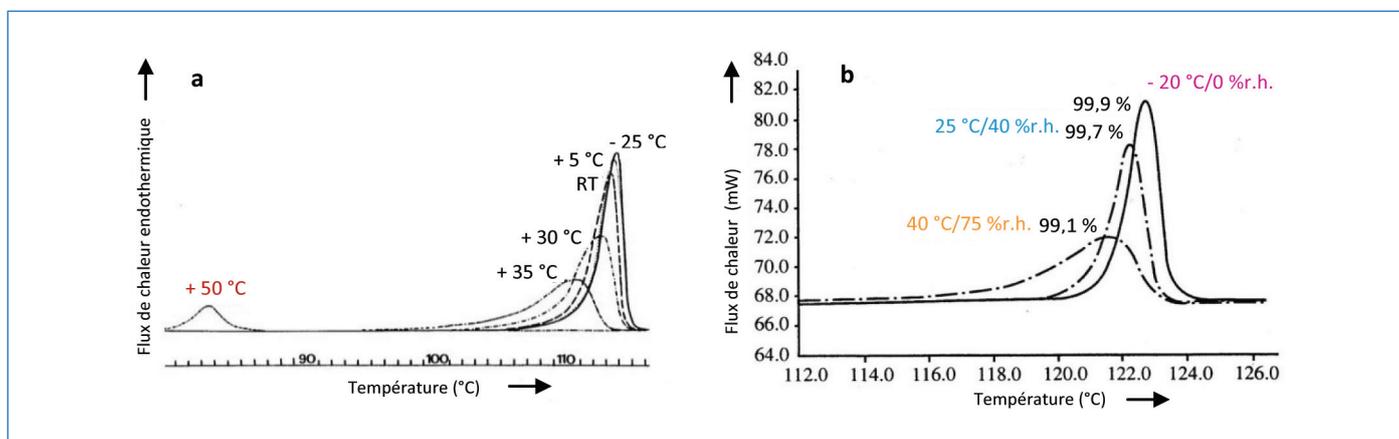


Figure 8 - a) Courbes de DSC d'échantillons de stéroïde stockés trois mois aux températures indiquées, selon le protocole d'étude de la stabilité ; b) analyses de pureté par DSC d'échantillons d'un principe actif « stressés » pendant quatre semaines aux températures et aux taux d'humidité indiqués (courbes réalisées avec des appareils DSC-2 ou DSC-7 de Perkin Elmer).

La *figure 8a* concerne le premier exemple que nous avons rencontré qui nous démontrait l'intérêt d'utiliser la DSC. Ce stéroïde en phase de recherche, abandonné par la suite, était stocké à température ambiante puisqu'aucune dégradation n'avait été mise en évidence par chromatographie. Pourtant, les mesures de DSC des échantillons stockés à différentes températures montrent que cette substance devient extrêmement instable, même à température modérée [15].

La *figure 8b* donne les résultats d'analyse de pureté par DSC d'un principe actif en phase de recherche, stocké dans différentes conditions de température et d'humidité, montrant une dégradation que ne révélait pas la chromatographie [8]. Dans ces deux cas de substances non commercialisées, les méthodes d'analyse de pureté par chromatographie ont dû être révisées, les produits de dégradation isolés et les conditions d'emballage et de stockage modifiées.

Les programmes de stabilité à long terme concernent la qualité définitive des lots de principe actif. Le résultat de DSC de la *figure 9*, obtenu après l'essai de photo-stabilité du principe actif soumis à une illumination de $1\ 200\ \text{klux h}^{-1}$ selon la directive ICH Q1, montre aussi une dégradation que la chromatographie ne permettait pas de détecter. Un emballage protégeant le principe actif de la lumière permet d'éviter cette dégradation.

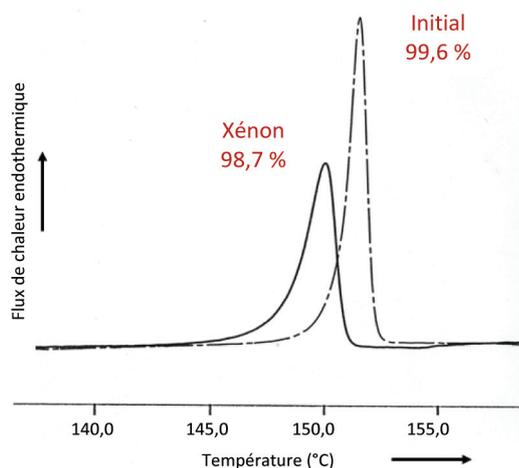


Figure 9 - Courbes de DSC pour un principe actif avant et après « stress » sous l'effet d'une insolation avec une lampe au xénon, selon la directive ICH Q1 (courbes réalisées avec des appareils DSC-2 ou DSC-7 de Perkin Elmer).

Dépollution et décontamination par adsorption

Diversité des polluants et des matériaux adsorbants

Les procédés développés pour traiter en phase liquide la pollution des eaux, des sols ou des sédiments utilisent très souvent des matériaux adsorbants. Ces polluants peuvent être organiques (colorants, résidus médicamenteux, pesticides...), mais aussi minéraux ou métalliques (nitrate, plomb, arsenic, cadmium, chrome, mercure, zinc, cyanure...). De manière générale, un matériau dédié à la dépollution doit donc être fortement adsorbant en termes de quantité et d'affinité, en lien avec une aire spécifique élevée. Ces adsorbants peuvent être d'origine synthétique, élaborés « à façon » pour adapter leurs propriétés (cristallochimiques, surfaciques) aux performances recherchées. À l'opposé, ils peuvent être d'origine naturelle (argiles, zéolithes...), bénéficiant d'un coût modéré et d'importantes quantités disponibles, mais souffrant de la variabilité de ces mêmes ressources naturelles (impuretés, hétérogénéités...). Qu'il s'agisse de matériaux minéraux,

organiques ou hybrides, de matériaux à charge ionique variable ou permanente, il existe de très nombreuses déclinaisons de leurs caractéristiques texturales, structurales et physico-chimiques permettant d'accéder à des solutions performantes pour capter des polluants d'un large spectre. Compte tenu de la diversité des couples adsorbat/adsorbant, les forces motrices responsables de l'adsorption, de l'échange, de la complexation, sont très variables. Pour mieux les étudier, des études thermodynamiques complètes doivent être effectuées. Cela peut être réalisé à partir d'isothermes d'adsorption déterminés à différentes températures. Cependant, bien que cette approche indirecte soit possible, la mesure directe des enthalpies d'adsorption par calorimétrie est considérée comme plus fiable et doit être préférée.

Complémentarité des deux techniques calorimétriques couramment utilisées

Plusieurs méthodes sont disponibles, parmi lesquelles la calorimétrie à flux de liquide et la titration calorimétrique isotherme, ou ITC, sont les plus courantes. La calorimétrie à flux de liquide est une mesure en mode dynamique durant laquelle une solution percole à travers le solide adsorbant. Lorsque le solvant est remplacé par une solution de soluté (dans le solvant), la chaleur de déplacement du solvant par le soluté adsorbé est mesurée et rapportée à la quantité adsorbée. Cette procédure en mode dynamique et continu offre l'avantage de faire circuler des solutions à concentration, pH, force ionique... fixes et imposés. Il est possible de réaliser des cycles d'adsorption/désorption, et ainsi d'évaluer la réversibilité du phénomène. Cependant, cette même circulation peut aussi générer la lixiviation du matériau, voire des chemins préférentiels de circulation, ne donnant pas accès à la totalité de la surface réactive. La quantité d'adsorbant est très faible (10-50 mg) compte tenu du volume de la cellule de mesure (50 μL) et l'acquisition point par point en fait une procédure assez longue. Il existe peu d'appareils permettant ces mesures, ce qui en fait une méthode peu commune. En revanche, les systèmes dits de titration calorimétrique sont plus courants. Les mesures en ITC sont répandues en phase homogène (complexation métal/ligand par exemple), mais elles le sont beaucoup moins à l'interface solide/liquide sur des suspensions de particules. Dans cette configuration, la suspension contenant le matériau est titrée par addition de la solution contenant l'espèce à adsorber. Le flux de chaleur correspondant est alors enregistré, intégré, puis rapporté à la quantité adsorbée pour chacune des injections. Il s'agit aussi d'une méthode point par point, mais les injections successives en font une mesure moins fastidieuse qu'en mode dynamique. On mesure alors ce que l'on appelle les enthalpies molaires différentielles, c'est-à-dire des grandeurs enthalpiques molaires partielles. Ces appareils sont plus récents, plus sensibles et plus économes en soluté adsorbable que les calorimètres à flux de liquide, et permettent de travailler à plus faible concentration. Le maintien d'une agitation régulière assure un bon mélange entre le solide et l'espèce à adsorber, mais cette agitation peut en retour générer une dérive de ligne de base en particulier si la viscosité varie (exemple de la floculation des particules). Cette procédure de titrage présente l'inconvénient de laisser le pH et la force ionique libres, et la procédure de soustraction des contributions thermiques dues à la dilution est assez délicate. Les outils calorimétriques utilisés dans le domaine de la dépollution permettent de mieux comprendre l'adsorption des différents polluants en mettant en évidence des effets ténus

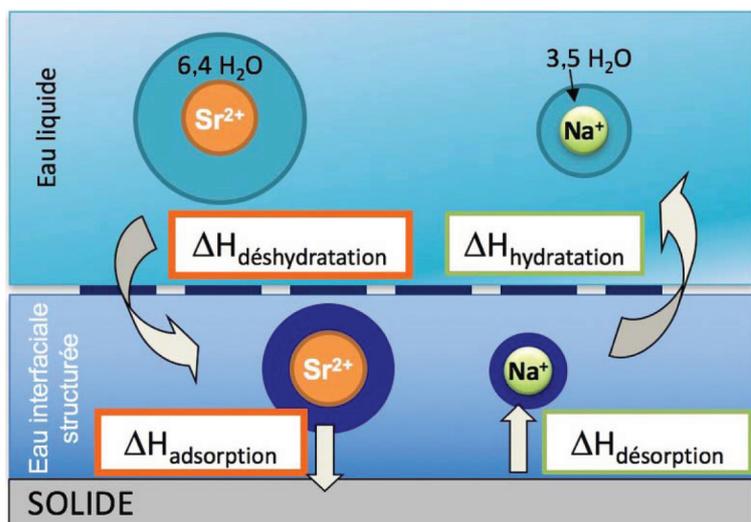


Figure 10 - Différentes contributions à l'enthalpie de déplacement lors de l'échange strontium/sodium : adsorption des ions Sr^{2+} , relargage des ions Na^+ , déshydratation partielle du Sr^{2+} adsorbé et réhydratation du Na^+ libéré.

par exemple à la spécificité des ions, au confinement dans les matériaux poreux, ou à la physico-chimie de surface du matériau adsorbant.

Adsorption de métaux lourds

Nous devons préciser pour commencer que ce que l'on appelle couramment une enthalpie d'adsorption en solution est toujours, en réalité, une enthalpie de déplacement puisque l'espèce à adsorber doit déplacer soit le solvant, soit une autre espèce précédemment adsorbée. Ce que l'on mesure par calorimétrie englobe donc au minimum une enthalpie d'adsorption et une enthalpie de désorption. À cela s'ajoutent souvent les enthalpies correspondant à d'autres phénomènes. Ainsi, dans le cas des matériaux échangeurs lamellaires, comme les argiles de type smectites ou les hydroxydes doubles lamellaires, respectivement échangeurs de cations et d'anions, il peut s'agir de l'adsorption des autres espèces présentes (hydroxyles ou carbonates très souvent présents naturellement), de l'intercalation de ces espèces, de la co-adsorption possible des contre-ions, du démouillage des surfaces, et enfin de la réhydratation des espèces désorbées et de la déshydratation des espèces adsorbées.

La figure 10 montre les quatre composantes de l'enthalpie de déplacement dans le cas de l'adsorption du strontium sur une surface déjà chargée de sodium. Elles correspondent respectivement à l'adsorption du strontium, au relargage du sodium, à la déshydratation partielle du Sr^{2+} au niveau de la couche d'eau interfaciale structurée, et enfin à la réhydratation du Na^+ au moment de sa libération dans l'eau liquide. Expérimentalement, c'est la contribution totale qui est mesurée, mais le challenge est de remonter à chacune des contributions individuelles, ou *a minima* au couple adsorption/désorption et au couple déshydratation/hydratation. Si les propriétés d'hydratation des ions en solution sont référencées dans la littérature, plusieurs inconnues subsistent dans le schéma de la figure 10. En effet, au niveau de l'interface où l'eau interfaciale est plus structurée et plus dense qu'en phase liquide, le nombre de molécules d'eau dans la coquille d'hydratation des ions n'est pas connu. Le rapport entre adsorption et désorption est aussi une inconnue importante que l'on cherche à déterminer. C'est grâce aux mesures calorimétriques qu'il a été possible de mettre en évidence, dans les systèmes silices/métaux lourds,

que l'enthalpie de déplacement est majoritairement corrélée à l'enthalpie d'hydratation des ions [16], ce qui en fait la force motrice majeure de la sorption des ions, en lien avec la spécificité des ions.

Adsorption de colorants ou de radionucléides dans les matériaux lamellaires

De nombreux travaux ont été menés par calorimétrie sur l'adsorption de cations, en particulier des radionucléides, sur des argiles [17]. Les travaux sur l'adsorption d'anions sur des matériaux lamellaires sont beaucoup moins répandus. Sur des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) qui sont considérés comme des argiles anioniques, la diffraction des rayons X permet de mettre en évidence les évolutions structurales provoquées par l'adsorption. Mais c'est grâce à la calorimétrie, et plus spécifiquement à l'ITC, qu'il est possible de discriminer les forces d'interactions entre les polluants ciblés (ici des colorants) et le solide. Sur des HDL à base de magnésium et d'aluminium, des séries de colorants (MO pour « Methyl Orange », OII pour « Orange II », et OG pour « Orange G ») et d'oxo-anions (HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-}) ont été adsorbées. Ces anions plus ou moins toxiques présentent des capacités d'adsorption similaires, mais diffèrent par leurs enthalpies intégrales molaires de déplacement (qui sont calculées à partir d'expériences calorimétriques où l'adsorption a été conduite jusqu'à l'obtention d'un plateau de saturation sur l'isotherme d'adsorption ; l'enthalpie intégrale de déplacement alors mesurée est rapportée à la mole d'adsorbable). On voit sur la figure 11 que le déplacement des ions nitrate par des anions chromate ou sulfate est pratiquement athermique, alors que par du « Methyl Orange », il est fortement exothermique. De telles informations permettent de classer les fortes ou faibles interactions entre les matériaux adsorbants et tel ou tel polluant comme ces colorants azoïques (tels les anioniques de cette figure) ou les chromates.

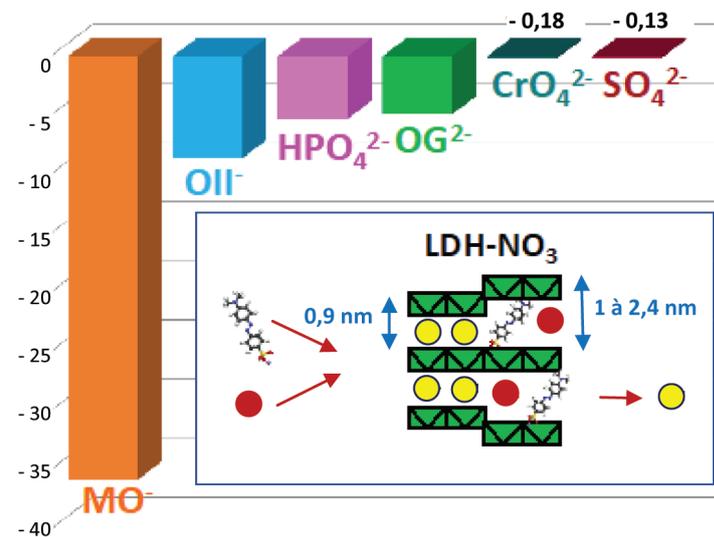


Figure 11 - Enthalpie de déplacement d'ions nitrate NO_3^- par des colorants anioniques (MO : « Methyl Orange » ; OII : « Orange II », OG : « Orange G ») ou des oxo-anions (HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-}) sur des hydroxydes doubles lamellaires à base de magnésium et d'aluminium. Dans l'encadré, les disques jaunes représentent les ions nitrate déplacés par l'adsorption du colorant ou de l'oxo-anion, lui-même capable d'élargir l'espace inter-feuillets [18].

Grâce à cette évaluation des enthalpies de déplacement, il est possible d'établir des échelles d'interactions entre des matériaux et des radionucléides (strontium, césium...) en présence d'autres ions compétiteurs (calcium, sodium...). Dans le cas

du traitement d'effluents contaminés ou d'eaux de refroidissement lors d'incidents nucléaires comme celui de Fukushima, les matériaux doivent être en mesure d'adsorber sélectivement les radionucléides et non les ions compétiteurs qui sont aussi présents dans l'effluent à traiter, dans l'eau de mer ou celle du fleuve contaminé. Les approches calorimétriques peuvent alors aider les industriels sur le choix du meilleur matériau adsorbant à utiliser (ce sont souvent des échangeurs de type zéolithe, résine échangeuse, matériau lamellaire...), en sélectionnant celui qui est en mesure de retenir une plus grande quantité de radionucléides, et surtout avec une enthalpie de déplacement supérieure à celle des ions compétiteurs [18-19].

Améliorer l'adsorption de métaux lourds ou de polluants organiques

Les enthalpies d'adsorption sont fortement conditionnées par les propriétés intrinsèques des matériaux adsorbants. C'est pourquoi, pour piéger des radionucléides, des métaux lourds ou des polluants organiques, on doit adapter soit la porosité, soit la physico-chimie des surfaces. C'est ainsi qu'on peut voir sur la *figure 12* que l'enthalpie de déplacement correspondant à l'adsorption de cadmium est quatre fois plus élevée sur une silice non poreuse que sur une silice poreuse d'une largeur de pore moyenne de 4 à 6 nm. Cette illustration montre que, outre les effets d'hydratation décrits précédemment, le confinement dans les matériaux poreux et la répartition des sites de surfaces modifient notablement les forces d'adsorption [20].

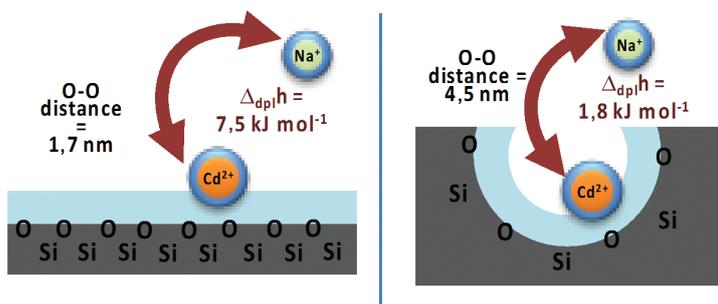


Figure 12 - Lors de l'adsorption/échange de Cd^{2+} , l'enthalpie de déplacement mesurée est quatre fois plus élevée sur une silice non poreuse (à gauche) que sur une silice poreuse.

Dans le cas de la rétention de polluants organiques, les caractéristiques hydrophiles ou hydrophobes des surfaces sont déterminantes dans les processus d'adsorption. Les charbons actifs de différentes sources sont très couramment utilisés pour l'adsorption de molécules organiques [21]. Leur physico-chimie de surface a une incidence directe sur les affinités d'adsorption et sur les enthalpies d'adsorption mesurées. La sorption de molécules hydrophobes est aussi possible sur des silices nanostructurées modifiées. Ces solides, appelés ici mésophases ou mésostructures, sont des matériaux mésoporeux dans lesquels le tensioactif utilisé pour obtenir la nanostructuration est toujours présent, le matériau n'ayant pas subi la calcination destinée habituellement à extraire cet agent structurant. Des molécules non polaires comme le chlorophénol peuvent ainsi être plus facilement retenues dans la porosité du matériau, et plus particulièrement dans le cœur hydrophobe créé par les tensioactifs [22]. Puisque les mesures calorimétriques sont sensibles à tout changement d'état des molécules adsorbées, on observe sur de tels systèmes différentes enthalpies et des effets entropiques plus ou moins

marqués. Ceci témoigne d'une évolution de l'ordre local et démontre que le chlorophénol présente différents environnements locaux et différents niveaux de confinement, en fonction de la taille de la molécule tensioactive présente dans la porosité. Par ailleurs, les énergies d'interaction entre ces mésostructures et des solutés comme le phénol, le 3-chlorophénol, le 3,5-dichlorophénol, ou la p-toluidine ont aussi été déterminées par microcalorimétrie, montrant ainsi qu'elles varient avec le caractère hydrophobe de ces molécules [23].

Adsorption de Cr(VI) sur des matériaux ionosiliciques hybrides

Ces dernières années, des matériaux innovants de type ionosilice [24], constitués de sous-structures ioniques, ont été identifiés comme d'excellents adsorbants [25-26], présentant des capacités bien supérieures aux produits commerciaux tels que les résines échangeuses. C'est par calorimétrie qu'il a été possible de montrer l'incidence des propriétés de surface des matériaux sur les forces d'interaction des ions chromate au cœur du matériau. La *figure 13* montre l'adsorption de chromate sur des solides hybrides poreux préparés à partir de précurseurs ammonium oligosilylés. Les matériaux obtenus sont composés de sous-structures à base d'amine protonée (ionosilice 1 ou HTrisN sur la *figure 13*), d'ammonium méthylé (ionosilice 2 ou MeTrisN), ou encore tétrasilylé (ionosilice 3 ou TetraN). Près de 90 % des sites sont accessibles, et l'accessibilité des sites est similaire pour tous les matériaux. Par contre, l'enthalpie de déplacement intégrale évaluée par ITC (*figure 13* en bas) est la plus élevée pour le matériau ionosilicique HTrisN, et la plus faible pour le matériau ionosilicique TetraN qui présente une sous-structure cationique avec le plus fort encombrement stérique. Pour cette famille de matériaux capables

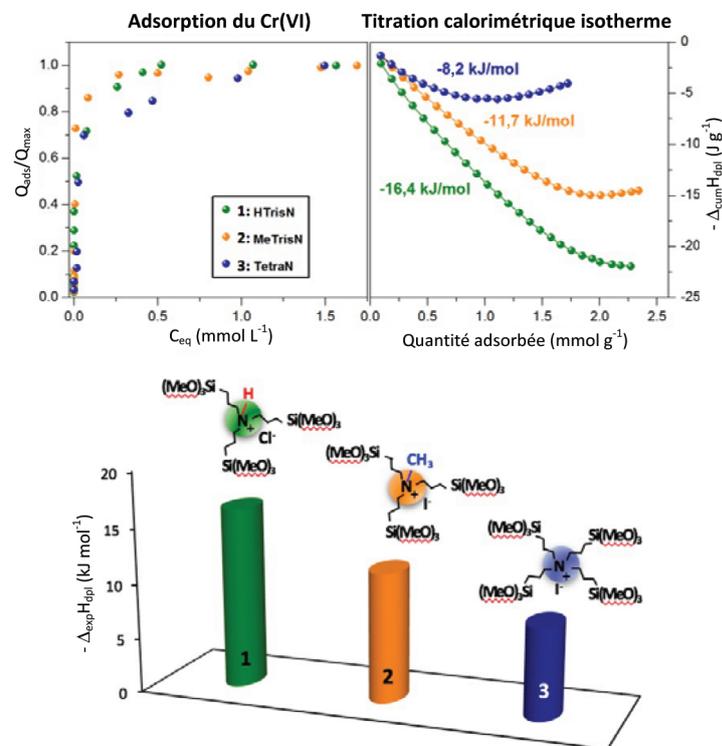


Figure 13 - Propriétés d'adsorption des ionosilices 1, 2 et 3 préparées à partir des structures ioniques (HTrisN pour la sous-structure amine protonée, MeTrisN pour l'ammonium méthylé et TetraN pour l'ammonium tétrasilylé). Isothermes d'adsorption de chrome Cr(VI) (en haut à gauche) et évolution des enthalpies différentielles de déplacement correspondantes (en haut à droite) en fonction de la quantité adsorbée. Sur la figure du bas, les hauteurs des trois colonnes représentent les enthalpies intégrales de déplacement [26].

de piéger la même quantité de chromate, seule l'ITC a montré que l'énergie d'interaction dépendait de l'encombrement stérique des sites d'adsorption et de leur caractère plus ou moins hydrophile. Sur des matériaux similaires, des effets d'empilement π entre les cycles aromatiques du matériau et de l'espèce adsorbée ont été observés lors de l'adsorption d'un médicament comme le p-aminosalicylate [25].

[1] Sari J.C., Gilli R., Peyrot V., Briand C., A microcalorimetric method using a minimal quantity of reactant to determine protein-ligand binding parameters, *Thermochim. Acta*, **1989**, 147, p. 119.

[2] Bruylants G., Bartik K., Utilisation de la calorimétrie à titrage isotherme pour l'étude des interactions entre (bio)molécules, *Chimie Nouvelle*, **2005**, 88, p. 9.

[3] Ghuman J., Zunsain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *J. Mol. Biol.*, **2005**, 353, p. 38.

[4] McGhee J., von Hippel P., Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice, *J. Mol. Biol.*, **1974**, 86, p. 469.

[5] Lounis F.M., Chamieh J., Leclercq L., Gonzalez P., Geneste A., Prelot B., Cottet H., Interactions between oppositely charged polyelectrolytes by ITC: effect of ionic strength and charge density, *J. Phys. Chem. B*, **2017**, 121, p. 2684.

[6] Privalov P.L., Dragan A.I., Crane-Robinson C., Interpreting protein/DNA interactions: distinguishing specific from non-specific and electrostatic from non-electrostatic components, *Nucleic. Acids. Res.*, **2011**, 39, p. 2483.

[7] Belliaro C., Gallice P., Chaspoul F., Corréard F., Bergé-Lefranc D., Effect of Ni(II), Cd(II) and Al(III) on human fibroblast bioenergetics, a preliminary comparative study, *J. Therm. Calorim.*, **2016**, 123, p. 2543.

[8] Giron D., Le principe actif, fondement de la stabilité du médicament, *STP Pharma Pratiques*, **2005**, 15, p. 1.

[9] Giron D., Le polymorphisme, *Labo-Pharma*, **1981**, 307, p. 151.

[10] Bauer M., Le polymorphisme, son origine, ses caractéristiques, ses conséquences, dans le domaine pharmaceutique, *STP Pharma Pratiques*, **1999**, 9, p. 354.

[11] Giron D., Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates, *Thermochim. Acta*, **1995**, 248, p. 1.

[12] Masse J., Bauer M., Billot P., Broquaire M., Chauvet A., Doveze J., Garinot O., Giron D., Popoff C., Analyse calorimétrique différentielle, Rapport d'une commission SFSTP, *STP Pharma Pratiques*, **1997**, 7, p. 253.

[13] Giron D., Mutz M., Garnier S., Solid state of pharmaceutical compounds: impact of the ICHQ6 guideline on industrial development, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2004**, 77, p. 709.

[14] Giron D., Monnier S., Mutz M., Piéchon P., Buser T., Stowasser F., Schulze K., Bellus M., Comparison of quantitative methods for analysis of polyphasic pharmaceuticals, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2007**, 89, p. 729.

[15] Giron D., Place of DSC purity analysis in pharmaceutical development, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **1995**, 44, p. 217.

[16] Prelot B., Lantenois S., Charbonnel M.-C., Marchandeu F., Douillard J.M., Zajac J., What are the main contributions to the total enthalpy of displacement accompanying divalent metal adsorption at the silica-electrolyte interface?, *J. Colloid Interface Sci.*, **2013**, 396, p. 205.

[17] Rotenberg B., Morel J.P., Marry V., Turq P., Morel-Desrosiers N., On the driving force of cation exchange in clays: insights from combined microcalorimetry experiments and molecular simulation, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2009**, 73, p. 4034.

[18] Darmograi G., Prelot B., Geneste A., Martin-Gassin G., Salles F., Zajac J., How does competition between anionic pollutants affect adsorption on Mg-Al layered double hydroxide? Three competition schemes, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, 120, p. 10410.

[19] Alby D., Salles F., Geneste A., Prelot B., Zajac J., Charnay C., Microwave-assisted hydrothermal synthesis of manganate nanoflowers for selective retention of strontium, *J. Haz. Mat.*, **2019**, 368, p. 661.

[20] Prelot B., Lantenois S., Chorro C., Charbonnel M.-C., Zajac J., Douillard J.M., Effect of nanoscale pore space confinement on cadmium adsorption from aqueous solution onto ordered mesoporous silica: a combined adsorption and flow calorimetry study, *J. Phys. Chem. C*, **2011**, 115, p. 19686.

[21] Morlay C., Laidin I., Chesneau M., Joly J.-P., Charbons actifs et traitement des eaux, *L'Act. Chim.*, **2006**, 295-296, p. 95.

[22] Denoyel R., Rey E.S., Solubilization in confined surfactant mesophases, *Langmuir*, **1998**, 14, p. 7321.

[23] Hanna K., Beurroies I., Denoyel R., Desplandier-Giscard D., Galarneau A., Renzo F.D., Sorption of hydrophobic molecules by organic/inorganic mesostructures, *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, 252, p. 276.

[24] Prelot B., Hesemann P., Les matériaux poreux ionsiliciques appliqués à la dépollution, *L'Act. Chim.*, **2018**, 430-431, p. 55.

[25] Thach U.D., Prelot B., Hesemann P., Design of ionsilicas: tailoring ionsilicas for the efficient adsorption of p-aminosalicylate, *Sep. Purif. Technol.*, **2018**, 196, p. 217.

[26] Thach U.D., Prelot B., Pellet Rostaing S., Zajac J., Hesemann P., Surface properties and chemical constitution as crucial parameters for the sorption properties of ionsilicas: the case of chromate adsorption, *ACS Appl. Nano Mater.*, **2018**, 1, p. 2076.

David BERGÉ-LEFRANC,

maître de conférences à la Faculté de pharmacie, Université d'Aix-Marseille.

Courriel : david.berge-lefranc@univ-amu.fr

Danièle GIRON,

retraitée de Novartis, Bâle.

Courriel : danièle.giron2@orange.fr

Bénédicte PRELOT,

chargée de recherche au CNRS, Institut Charles Gerhardt de Montpellier, Univ. Montpellier, CNRS, ENSCM (UMR 5253), équipe AIME.

Courriel : benedicte.prelot@umontpellier.fr

