

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 « BioSanté »

FACULTE de Pharmacie

EA 3842

Laboratoire de Chimie Analytique LACB

Année 2012

Thèse N°(..)

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / spécialité : Chimie Analytique et Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Tayssir IBRAHIM

## **Développement Instrumental et méthodologique des méthodes de fractionnement flux force en fibre creuse; applications aux biotechnologies**

Le 19 Décembre 2012

Thèse co-dirigée par Pr. Philippe CARDOT et Dr. Serge BATTU

### JURY

M. Bruno GRASSL	Professeur, Univ. Pau	PRESIDENT
M. Jean Pierre SOUCHARD	Professeur, Univ, TOULOUSE	RAPPORTEUR
M. Daniel DAUGERON	D.R., I.U.T, Univ, Clermont-F <sup>d</sup>	RAPPORTEUR
M. Jean Marie Launay	Professeur, PUPH. Univ. Paris V	EXAMINATEUR
M. Philippe CARDOT	Professeur, Univ. Limoges	EXAMINATEUR
M. Serge BATTU	D.R., Univ, Limoges	EXAMINATEUR

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 « BioSanté »

FACULTE de Pharmacie

EA 3842

Laboratoire de Chimie Analytique LACB

Année 2012

Thèse N°(..)

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / spécialité : Chimie Analytique et Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Tayssir IBRAHIM

## **Développement Instrumental et méthodologique des méthodes de fractionnement flux force en fibre creuse; applications aux biotechnologies**

Le 19 Décembre 2012

Thèse co-dirigée par Pr. Philippe CARDOT et Dr. Serge BATTU

### JURY

M. Bruno GRASSL	Professeur, Univ. Pau	PRESIDENT
M. Jean Pierre SOUCHARD	Professeur, Univ, TOULOUSE	RAPPORTEUR
M. Daniel DAUGERON	D.R., I.U.T, Univ, Clermont-F <sup>d</sup>	RAPPORTEUR
M. Jean Marie Launay	Professeur, PUPH. Univ. Paris V	EXAMINATEUR
M. Philippe CARDOT	Professeur, Univ. Limoges	EXAMINATEUR
M. Serge BATTU	D.R., Univ, Limoges	EXAMINATEUR



Je dédie cette Thèse à .....: اهداء الى:

*ma Syrie.....* بلدي الحبيب سوريا.....

*Ma chère SARAA.....* الغالية ثراء.....

*Mon ange Noor-Alsham.....* الملاك نور الشام.....

*Mes parents.....* أهلي.....

## REMERCIEMENTS

**A Monsieur Le Professeur Philippe CARDOT** : Professeur des Universités au laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges. Directeur de thèse.

Recevez, monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de votre Equipe de recherche. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir soutenu au cours de ces années... Merci pour tout Chef !

**A Monsieur Le Professeur Bruno Grassl** : IPREM-LCABIE UMR CNRS 5254, Technopôle Hélioparc Pau Pyrénées.

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

**A Monsieur Le Docteur Daniel Daugeron** : Lycée Paul Constans, Montluçon.

Veuillez recevoir, Monsieur, mes remerciements les plus respectueux pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être le rapporteur. Je tiens à vous exprimer l'expression de ma profonde reconnaissance.

**A Monsieur Le Professeur Jean Pierre Souchard** : Laboratoire des IMRCP, UMR CNRS 5623, Université Paul Sabatier, Toulouse.

Je suis très touché de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Soyez assuré, Monsieur de tout mon respect et de ma plus profonde gratitude.

**A Monsieur Le Docteur Serge BATTU** : MCF au laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges.

Je te remercie sincèrement pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton aide technique dans le domaine de la FFF...

**A Monsieur Le Professeur Jean Marie Launay** : U942 INSERM, Laboratoire de Biochimie Biologie Moléculaire, Paris V.

Veuillez recevoir, Monsieur, mes remerciements les plus respectueux pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail, je tiens à vous exprimer l'expression de ma profonde reconnaissance, si j'en crois les bibliographies, vous avez été dans le premier jury de thèse des méthodes de FFF en France.

*Mes remerciements s'adressent plus particulièrement :*

**A Madame Le Professeur Marie-Odile JAUBERTEAU-MARCHAN**

Professeur des Universités / Praticien Hospitalier au Laboratoire d'Immunologie Faculté de Médecine, Université de Limoges

Directrice de l'EA 3842 Homéostasie cellulaire et Pathologies.

Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche. Soyez assurée, Madame, de toute ma reconnaissance et de mon profond respect

A Mlle D.Cledat, Mme et M Basly, Laurant, et toute l'équipe de la LCAB pour leur gentillesse et leur soutien quotidien.

A tous mes collègues, mes amis et à l'ensemble de personnes qui m'ont entourées.

A la Ministère Syrienne de l'Enseignement Supérieur et à l'Université ALBA'ATH :

Merci de votre aide, et de l'occasion que vous m'avez donnée pour continuer mes études supérieures en France. Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance, et de mon grand respect.

Un grand merci à mes parents qui me manquent beaucoup surtout ces jours-ci, En effet, ce travail est l'aboutissement de tous vos sacrifices. Je ne trouve pas les mots assez forts pour vous remercier. Vous êtes pour moi l'exemple de l'amour, de la générosité, du courage et de la persévérance.

A mes Frères et à mes sœurs et à toute ma famille en **Syrie**.

Enfin à ma chère femme, celle avec qui j'ai la chance de partager la vie le bon et le mauvais et bien sur son soutien constant, Merci à toi et à mon petit ange NOOR ses yeux et sa sourire qui donne l'espérance, je te souhaite une vie pleine de bonheur.

## SOMMAIRE

REMERCIEMENT .....	1
<b>TABLE DE MATIERES.....</b>	<b>3</b>
<b>LIST DES FIGURES .....</b>	<b>5</b>
<b>LIST DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
INTRODUCTION GENERALE .....	8
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>10</b>
1) Principe général de la FFF .....	12
2) Théories de l'utilisation des fibres creuses HF5:.....	12
3) Système HF5.....	12
i.    Fibre creuse : .....	12
ii.   Type chimique de polysulfone (PSf).....	12
iii.  CUT-OFF :.....	12
iv.   HF Type.....	13
4) La Focalisation : .....	14
5) Différents Modèles : .....	14
a)    Model Brownien (normal).....	15
b)    Limites du modèle .....	15
c)    Modèle « Hyperlayer ».....	16
6) Protocole d'utilisation de la fibre creuse HF5.....	15
REFERENCES : .....	17
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>18</b>
Instrumentation des colonnes tubulaires (HF5) pour le tri cellulaire .....	19
1) Instrumentation, volume d'injection et concentration des cellules .....	19
2) Le problème des fortes concentrations : une répètabilité critique : .....	21
3) la collection des fractions : .....	23
a)    Le pool théorique en nombre de cellules .....	23
b)    Le paradoxe de la granulométrie .....	23
4) Profil multimodal.....	23
<b>ARTICLE 1: .....</b>	<b>25</b>
<b>“Instrumentation of Hollow Fiber Flow Field Flow Fractionation for selective cell elution” .....</b>	<b>26</b>
<b>CHAPITRE 2 .....</b>	<b>34</b>
Elution des protéines en mode « Brownien » dans une colonne HF5 :.....	35
1) Le concept de relaxation radiale : méthodologie de la détermination de position de focalisation dans la longueur de la colonne.....	35
2) Le profil de concentration radiale : le modèle brownien :.....	36

a) Les hypothèses mécaniques et hydrodynamiques :.....	36
b) Les hypothèses de modélisation et leur réalisme :.....	38
c) Les conséquences de la modélisation : détermination de (l') :.....	39
i. La notion du volume mort et son exploitation :.....	39
ii. La notion du pic système :.....	39
iii. Les équations ; le modèle :.....	41
3) Le concept de relaxation axial :.....	41
a) les équations de diffusions et l'élargissement de bande :.....	41
CONCLUSION .....	44
<b>ARTICLE 2 .....</b>	<b>45</b>
<b>"Flow and stop flow elution of proteins in hollow fiber field flow fractionation (HF5) systems."</b> .....	<b>46</b>
<b>CHAPITRE 3 .....</b>	<b>58</b>
Applications des instruments et des méthodologies HF5 développées dans les deux premiers chapitres à la séparation de protéines et au diagnostic/caractérisation des agrégats .....	59
1) Quelques paradoxes liés à la phase mobile et au concept de focalisation relaxation en mode brownien.....	59
2) Séparation des protéines :.....	60
3) Le cas particulier des agrégats .....	61
CONCLUSION .....	62
<b>ARTICLE 3 .....</b>	<b>63</b>
<b>"Proteins separations with HF5: From Instrumentation and protein separations to Aggregates Determination Applications"</b> .....	<b>64</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>74</b>
<b>Anex 1 .....</b>	<b>76</b>
<b>Anex 2 .....</b>	<b>81</b>



## List des Figures

### Figures de la partie bibliographique

Figure. 1 : La formule chimique du polysulfone .....	12
Figure. 2 Photo d'une section de fibre sèche .....	13
Figure. 3 Illustration schématique du principe général de la HF5 .....	14
Figure. 4 Séparation en mode normale.....	15
Figure. 5 Représentation du phénomène d'inversion stérique.....	15
Figure. 6 séparation en mode « steric hyperlayer » .....	16

### Figures Chapitre 1

Figure. 1 Effet de volumes de l'injection de « RBC samples » .....	20
Figure. 2 Mode brownien. Notion du pic système théorique.....	21
Figure. 3 high concentration RBC samples and granulometric analyses.....	22
Figure. 4 Isotonic Buffer Washed RBC.....	24

### Figures ARTICLE 1 .....

25

### Figures Chapitre 2

Figure. 1 Mode brownien. Effet de la relaxation sur le profil de concentration radial des protéines.....	35
Figure. 2 Mode brownien. Notion du pic système théorique.....	40
Figure. 3 Mode brownien. Notion du pic système expérimentale .....	40
Figure. 4 Mode brownien et focalisation en HF5, une focalisation axiale différentielle .....	41
Figure. 5 Nombre du plateaux théoriques à l'=50% .....	42

### Figures ARTICLE 2 .....

45

### Figures Chapitre 3

Figure. 1 Phase mobile : H <sub>2</sub> O, condition d'élution identique.....	59
Figure. 2 Application sur la mode normal, séparation de mélange des protéines par HF5.....	60
Figure. 3 Courbes théoriques estimées des profils de rétention de l'albumine et de ses polymères ..	61
Figure. 4 Agrégats de l'Albumine et les fractogrammes de la déconvolution .....	62

### Figures ARTICLE 3 .....

63

## List des Figures

Table. 1 Principaux champs radiaux mis en œuvre et technique de FFF correspondantes.....	11
Table. 2 HF's utilisées .....	13
Table. 3 Les valeurs calculé pour le D albumine et le D Ferritin a partir des données expérimentales de la figure 5 .....	43

## **ABBREVIATIONS**

BSA:	Bovine Serum albumin
CRC:	Colorectal Cancer Cell
Da :	Dalton (molecular weight unite)
DWS:	dry/Wet separation
EDTA:	EthylenDiamineTetraAcide
FER :	Ferritin
Fin :	Inlet flow
FIFFF:	Flow-Field Flow Fractionation
Frad :	Radial flow
Fout :	Outlet flow
Fax :	axial flow
FIB:	Fibrinogen
FSP:	Focalization system peak
GPC:	Gel permeation chromatography
GrFFF:	Gravitation Field Flow Fractionation
HF5 :	Hollow Fiber Flow-Field Flow Fractionation
I.D :	Internal Diameter
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
O.D :	Out Diameter
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PEEK:	PolyEtherEtherKetone
PSf :	Polysulfon
RBC:	Red Blood Cell
SdFFF :	Sedimentation Field Flow Fractionation
SEC :	Size exclusion chromatography
THY:	Thyroglobuline
TFZEL:	(ETFE) Ethylene tetrafluoroethylene
UF:	Ultrafiltration

## Liste des Symboles

$\delta$	Shortest distance of the particle from the accumulation wall
$a$	Particle radius
$c$	Concentration of the solute
$D$	Diffusion coefficient
$D'$	Corrected Diffusion coefficient
$d$	Particle diameter
$d_i$	Steric inversion diameter
$F$	Centrifugal force
$F_L$	Hydrodynamic lift forces
$I$	Attenuated light intensity
$J$	Flux of the solute
$k$	Boltzmann constant
$k'$	Capacity factor
$L$	Channel length
$l'$	<i>Effective</i> Channel length
$\lambda$	Light wavelength
$M$	Molecular weight
$m'$	Effective particle mass,
$n$	Effective refractive index
$N$	Particle number density
$N$	Plate number
$\rho$	Particle density
$r$	Particle radius
$R$	Retention ratio
$R_s$	Resolution
$S$	Selectivity
$\sigma$	Standard deviation
$T$	Absolute temperature
$t_0$	Void time
$t_r$	Retention time
$U$	Radial Flow Velocities,
$V_{inj}$	Injection Volume
$V_{geo}$	Geometrical volume
$\omega$	Fiber lumen diameter
$X$	Data points
$\gamma$	Permeation factor

## Introduction Générale

Depuis plus de 15 ans, les méthodes de Fractionnement par couplage Flux Force à champs multi gravitationnels (Sd FFF : Sédimentation Field Flow Fractionation) ont été développées à l'Université de Limoges et cette « initiative » instrumentale appliquée au tri cellulaire a connu un développement important. Bien que considérées comme des méthodes « exotiques », il y a encore dix ans, elles sont devenues le cœur de certaines applications de tri cellulaire en particulier dans le cadre de l'exploration de cellules souches et surtout de cellules souches cancéreuses.

Il existe donc maintenant, un outil analogue, en termes de performance de séparation à la chromatographie utilisable pour le tri cellulaire, Une fois les populations cellulaires triées, purifiées elles sont soumises à des investigations poussées dont les propriétés ont été, et sont largement intégrés sous le concept de celluleomique. Bien que depuis plus de 10 ans, les méthodes de FFF par sédimentation se trouvent confinées à l'analyse cellulaire, d'autres méthodes FFF (sous forme commerciales) ont reçu un accueil très favorable de la communauté scientifique : comme les méthodes FFF à champ hydrodynamique asymétrique. Elles s'avèrent peu efficaces en termes de séparation cellulaire et n'ont pas été explorées dans ce contexte pour des raisons assez simples liées à la faible population de spécialistes et à des performances potentielles réduites. Par contre ces méthodes dites asymétriques s'avèrent particulièrement intéressantes dans le cadre de l'étude de macromolécules ou de structures supra moléculaires. Par exemple les protéines couvrent une large gamme du taille, de forme, ou encore, s'associent en structure supra moléculaires comme les agrégats, les Ribosomes, mieux encore dans les membranes cellulaires, Certains de ces associations avec d'autres éléments conduisent à des structures plus organisées, comme mitochondries ou encore les noyaux cellulaires.

Il devient alors esthétiquement intéressant de regarder le développement de ces méthodes FFF dans le cadre de l'investigation des composants d'une cellule. Jusqu'à présent ces objectifs restaient limités par l'instrumentation des méthodes AF4 (Asymetrical Flow Field Flow Fractionation) car les volumes de ces appareillages ainsi que leurs capacités de charge s'avéraient peu ou pas compatibles avec l'analyse de populations cellulaires de masse et nombre réduit. Par contre, le récent développement des méthodes (AFFF) en fibre creuse apporte deux avantages importants : le premier est la facilité de construction de la colonne de séparation (une fibre) et le second est le très faible volume mort associé à ces fibres de l'ordre de 50 à 100 $\mu$ L. Ainsi le développement de micro méthodes de FFF devient possible, Avec ces fibres la HF5 ( AF4 en fibre creuse égale HF5) devient alors un outil intéressant à développer dans le cadre des biotechnologies en particulier dans le cas de la séparation, et la caractérisation de protéines, ou l'association supramoléculaires de très hauts poids moléculaires. Les méthodes HF5 en biotechnologie ont été développées historiquement à partir de fibres non commerciales et il devenait alors très important de pouvoir mettre à la disposition de la communauté scientifique des outils indépendants du fournisseur de fibre. C'est pourquoi le premier objectif de ce travail consiste à fabriquer un système HF5 à partir de fibres creuses commerciales et ces résultats seraient présentés dans le premier chapitre. La réussite de la conception d'une colonne HF5 d'abord, puis d'un système HF5 ensuite, a permis la mise en place de modes et procédures opératoires appliquées à la séparation des protéines ont présentés dans le second chapitre . Enfin, dans le cadre de l'investigation de l'élution des protéines, nous avons montré qu'une application industrielle majeure en biotechnologie était possible: Le diagnostic et la

caractérisation de polymères protéiques, ces polymères d'ordre 2 à 10 d'albumine ayant pu être caractérisés.

Enfin, on notera que les méthodes HF5 sont les seules méthodes capillaires de séparation de protéines de très hauts poids moléculaires respectant ainsi leurs caractéristiques structurales.

## 1) Principe général de la FFF

La technique de fractionnement par couplage Flux-Force (Field Flow Fractionation) a été développée vers la fin des années 1960 grâce aux travaux de J.C. Giddings [1-3], cette technique est souvent présentée comme l'une des méthodes séparatives les plus polyvalentes. En effet, la grande variété de champs utilisables, de configurations instrumentales et de modes d'éluion, permet d'envisager une infinité de conditions expérimentales à mettre en œuvre pour le tri, la séparation et la caractérisation de polymères, de colloïdes, ou de bioparticules (macromolécules et cellules) [1-6].

Paradoxalement, ce vaste champ d'investigation conduisant à de très larges champs d'application et le déficit d'instrumentation fiable disponible dans le commerce contraignant les équipes au développement de leur propre instrumentation, ont longtemps contribué à ce que cette méthode reste « confidentielle » malgré tout son potentiel [4, 5]. La FFF est une "superfamille" de techniques mettant en œuvre un principe commun dans un ensemble de dispositifs instrumentaux différents selon la nature des champs appliqués (Table 1) [3-5].

Champ radial appliqué	Technique correspondante
<b>Gradient hydrodynamique</b>	FFF Hydrodynamique : FIFFF ou AFIFFF, HF5 Sédimentation FFF (SdFFF)
<b>Sédimentation(Sd)</b>	Centrifugal FFF (SdFFF) Gravitationel FFF (GrFFF)
<b>Gradient Thermique</b>	FFF thermique: Th FFF
<b>Electrique</b>	FFF électrique : EI FFF
<b>Magnétique...</b>	FFF magnétique...

Table 1 : Principaux champs radiaux mis en œuvre et technique de FFF correspondantes.

Les différents types de méthode (liées au champ) sont listés dans ce tableau en fonction de leur fréquence d'utilisation.

La FFF hydrodynamique (cross-flow) est la technique de FFF la plus utilisée parmi les différentes techniques de FFF pour les raisons suivantes :

- Elle peut être appliquée à une vaste gamme de macromolécules et de particules (polymères, protéines et cellules) dont la taille peut varier de 1nm jusque plus de 50 µm [7].
- Une séparation adaptée aux analytes les plus fragiles, avec la quasi-absence des contraintes inhérentes aux méthodes chromatographiques (intrication/adsorption des analytes sur la phase stationnaire, effets délétères de la pression à l'intérieur de la colonne sur certains analytes...).
- Une sélectivité remarquable, comparable à celle observée avec d'autres techniques chromatographiques telles que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC ou Size-Exclusion Chromatography). Elle s'est notamment montrée efficace pour la séparation de protéines et d'agrégats de protéines.

Le champ doit :

- Etre suffisamment intense afin de former les couches de molécules les plus fines possibles dans l'épaisseur du canal.
- De fait, permettre une sélectivité suffisante pour la séparation la plus efficace possible.
- Permettre un développement facile et peu onéreux de l'instrumentation.

Il est possible d'ajuster, de contrôler ou de programmer l'intensité du champ appliqué.

## 2) Théories de l'utilisation des fibres creuses HF5:

A partir de la technique de (AFFFF) (Asymmetric Flow-Field Flow Fractionation), l'idée de l'utilisation d'une fibre creuse HF5 à la place du matériel conventionnellement utilisé (qui était à l'origine constitué d'un canal trapézoïdal), a été imaginée pour la première fois en 1974 par Lee [8].

Quelques dizaines d'années plus tard, les travaux de Jönsson et Carlshaf [9] ont permis de décrire les conditions d'utilisation des fibres creuses en FFF, et d'établir les formules de base décrivant les différents modes d'éluion. Nous avons développé dans le chapitre 2, une application originale appliquant ces équations au mécanisme de relaxation.

*Les Equations sont expliquées dans le chapitre 2*

## 3) Système HF5 :

la HF5 partage avec la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) une grande partie de son instrumentation (pompe, injecteurs système, détecteur, connexions tubulaires ....), mais là où la CLHP utilise une colonne remplie de phase stationnaire, la technique de HF5 utilise une membrane tubulaire poreuse, ne contenant aucun remplissage, phase stationnaire ou préparation de surface, comme décrit dans le premier chapitre de ce rapport, (Fig.1 /article.1)

### i. Fibre creuse

la membrane de la fibre est généralement préparée par utilisation de la méthode DWS (dry/wet phase séparation), il s'agit d'une technique de filage humide à sec pour constituer une fibre creuse à partir d'un mélange de trois composants contenant de la polysulfone, un additif (dont la nature est souvent confidentielle) et un solvant [11].

**Les caractéristiques principales d'une fibre creuse sont sa nature et son « cut-off ».**

### ii. Type chimique de polysulfone (PSf)

les polysulfones sont une famille de polymères thermostatiques très connus pour leur stabilité à haute température, la formule chimique de la PSf est :

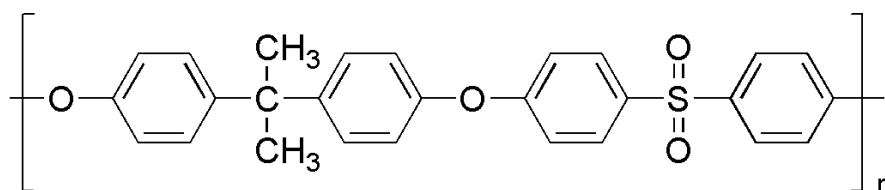


Figure. 1 : La formule chimique de la polysulfone (PSf) où n = (50-80).

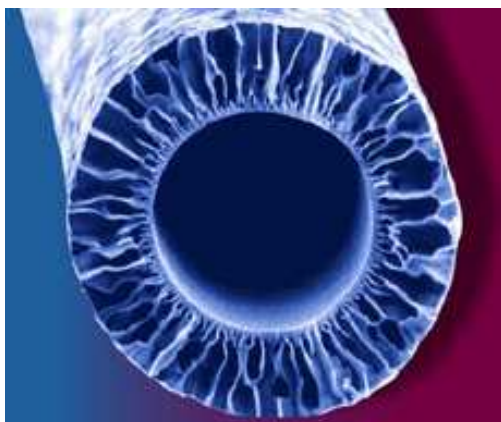
C'est un polymère amorphe, rigide, résistant aux chocs, peu sensible au fluage jusqu'à sa température de transition vitreuse, sa température d'utilisation peut aller de 0°C jusqu'à 150° C, par contre son pH d'utilisation reste analogue à celui de la chromatographie liquide haute performance (de 2 à 12).

### iii. Cut-off :

C'est une des propriétés caractéristiques de la fibre creuse, en fait, le cut-off (NMWL) fait référence aux poids moléculaires. Ainsi (suivant ce modèle) les membranes sont caractérisées par leur capacité à retenir les molécules d'une certaine masse donnée en Daltons. Pour résumer, une membrane ayant un cut-off de 30 000 retiendra 80 % à 90% des molécules possédant, une masse moléculaire supérieure à 30 000 Daltons. Ce qui ne veut ni dire que toutes les molécules de moins de 30 000 Daltons passeront, ni que toutes les molécules de plus de 30 000 Daltons seront retenues.

### iv. HF type

les membranes des fibres creuses utilisent généralement un cut-off du 6 à 100 kDa, sont faites de céramique ou de polymère, les fibres creuses de polysulfone sont massivement produites pour les applications telles que l'hémodialyse et l'ultrafiltration cellulaire, pour cela il constitue un bon choix pour la



Caracteristiques/HF	1	2
ID (mm)	0.9	0.5
L max par unité (cm)	22	24.5
Reference	UFB-30-5A	UFP-C-30-4MA
manufacture	Romicon	GE HEALTHCARE

Figure. 2 : Photo d'une section de fibre sèche

table. 2 : les deux fibre utilisées

fabrication d'un canal de séparation HF5, elles sont compatibles avec les analyses biologiques et sont

utilisées à l'heure actuelle pour la séparation des protéines, cellules, virus, bactéries ainsi que pour la séparation des polymères solubles synthétiques [9,12-14].

**Les fibres utilisées dans cette étude** ; deux fibres de différents diamètres ont été utilisées pour la colonne de HF5 (table 2),

toutes les deux sont constituées de polysulfone et ont un cut-off de 30 kDa. (La photo en microscopie électronique de la figure 2 correspond à la section d'une fibre non mouillée).

Les membranes commercialisées ont comme particularité d'être hydrophiles. En temps normal, ces fibres sont conditionnées dans une cartouche d'hémodialyse par « paquets » d'environ 400 fibres creuses. Les mentions présentes sur la notice du constructeur ne peuvent donc pas s'appliquer dans le cadre d'une méthode séparative de FFF. D'où la nécessité de requalifier ces fibres en fonction de nos conditions d'utilisation.

La première fibre (table 2 fibre 1) à été utilisée pour la réalisation de l'expérience du chapitre 1 et la deuxième (table 2 fibre 2) a été utilisée dans les expériences des chapitres 2 et 3.

#### 4) Les mode d'injection caractéristiques des méthodes (AF4 + HF5) :

L'élution des espèces à fort coefficient de diffusion impose à la population à séparer de se trouver dans un état d'équilibre entre la convection (due au champ) et la diffusion au moment de l'élution, Cela nécessite un certain temps de latence appelé temps de relaxation « focalisation », cet état d'équilibre peut être obtenu grâce à l'utilisation de deux flux axiaux opposés (figure 2/article1), Pour la phase mobile contenue dans la fibre, la seule sortie est donc la sortie radiale. Le débit radial induit correspond ainsi à la somme des débits. Après un certain temps de focalisation, les espèces ont atteint un état d'équilibre compatible avec leur mode d'élution.

##### Système de focalisation utilisé (figure 2/ article 1)

Pour des raisons évidentes de facilité de manipulation et de lisibilité du montage utilisé, un système automatisé est plus intéressant. Le montage qui permet la focalisation comprend donc un nouvel appareil, un système de focalisation à deux vannes ( $V_A$ ,  $V_B$ ), proposant deux positions. Les deux positions sont expliquées et détaillées ci-après.



- **Position « focalisation ».** (figure 2.A/article 1) :

C'est dans cette configuration que la focalisation prend tout son sens. En effet, les nouvelles connections modifient complètement le circuit. Comme vu précédemment lors de la focalisation le liquide doit pénétrer dans la colonne par les deux extrémités.

- **Position « élution ».** voir ( figure 2.B/article 1)

La pompe fait circuler la phase mobile, la phase mobile traverse ensuite la vanne d'injection à partir de laquelle l'échantillon est entraîné par le fluide. L'ensemble traverse la colonne et en est évacué par les deux sorties possibles ( axial et radial). Les molécules à séparer évacuées par la sortie axiale traversent le détecteur. De cette manière nous pouvons les quantifier en continu.

### 5) Les Modèles d'élution en FFF à champ hydrodynamique :

Tous les modèles s'appuient sur le même principe (Figure 3). Dans la « colonne » contenant la fibre creuse, le débit généré par la pompe HPLC est scindé en deux débits distincts, l'un traversant la membrane de la fibre creuse pour être évacué par la sortie radiale (débit radial), l'autre circulant sur la longueur de la fibre

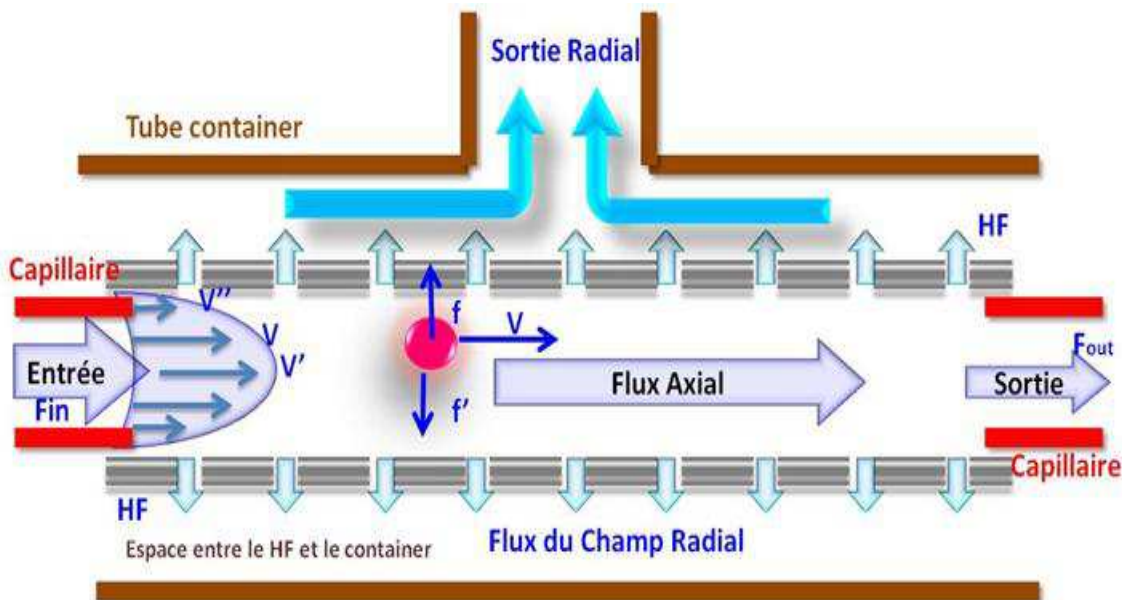


Figure 3 : illustration schématique du principe général de la HF5 : F est la force exercée par le champ hydrodynamique sur la particule, V est la vitesse de la particule qui dépend de sa position dans la lumière de fibre ( $V'' < V < V'$ ), F' est une force qui s'oppose à celle exercée par le champ externe. F et F' sont en équilibre.

creuse (avec toutes les molécules qui n'ont pas pu traverser le membrane) vers la sortie axiale de la fibre, puis vers le détecteur (débit axial). Ainsi, deux champs perpendiculaires apparaissent à l'intérieur de la colonne (le champ axial et le champ radial).

La phase mobile circulant sur la longueur de la fibre creuse suit un régime d'écoulement laminaire, où la répartition des vitesses est parabolique (la vitesse d'écoulement est nulle au niveau des parois internes de la fibre creuse, et est maximal au centre du flux). Le processus de séparation des différents analytes est basé sur ce principe.

#### a) Modèle Brownien (normal)

C'est le modèle établi pour des espèces où l'équilibre convection/diffusion est nécessaire c'est-à-dire les espèces dont la taille est négligeable devant l'épaisseur du canal.

Le champ axial fait progresser les molécules dans la colonne, et le champ radial applique sur la membrane une force  $F_{\text{champ radial}}$  ayant tendance à plaquer les molécules contre la membrane. À cette force s'oppose le

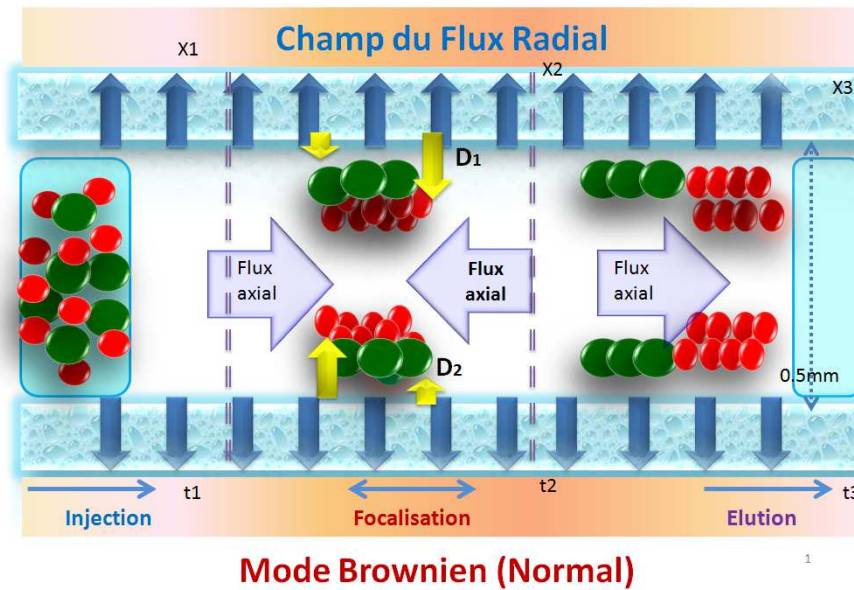


Figure (4) : Séparation en mode normal; avec la procédure de focalisation/relaxation.

phénomène de diffusion (ou mouvement brownien) des particules dans la phase mobile qui tend à les éloigner de la membrane. Lorsque les deux forces s'équilibrent, les particules avec les tailles les plus importantes diffusent le moins, et pour une convection donnée, seront les plus proches de la paroi et seront donc éluées moins vite. Par analogie avec la chromatographie, nous dirons qu'elles sont « retenues » [10].

b) Limites du modèle

L'interprétation générale de ce modèle repose sur plusieurs postulats :

- L'introduction de l'échantillon est suivie d'un temps de focalisation ou de relaxation permettant l'établissement de l'état d'équilibre (diffusion/convection).
- La migration des particules se fait selon un état de quasi-équilibre.

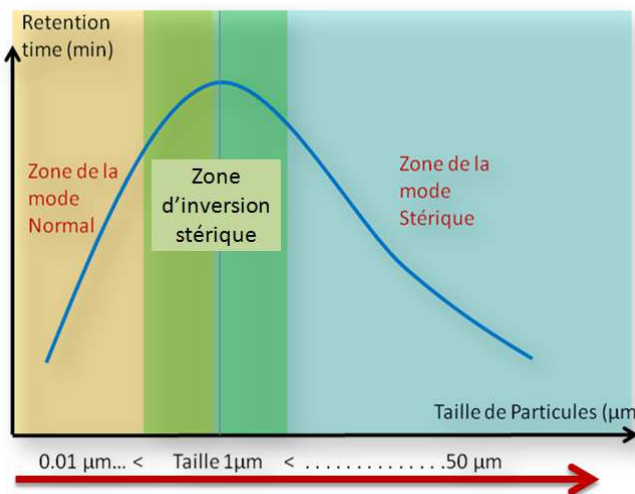


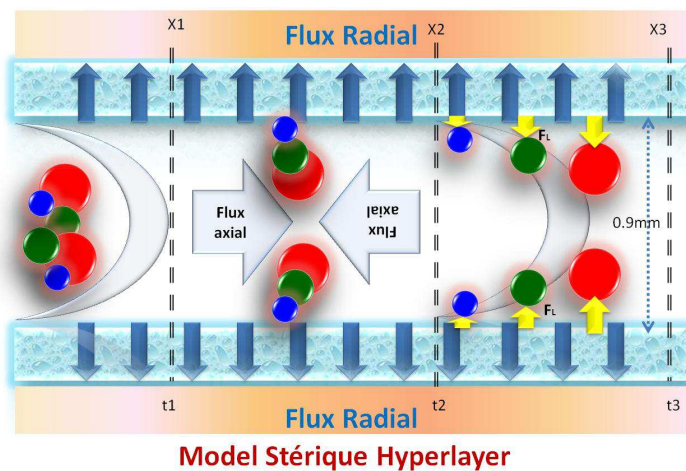
Figure (5) : Représentation du phénomène d'inversion stérique

- La vitesse de déplacement des particules est la même que celle du liquide à la même hauteur.

L'expérience a montré que le modèle n'est applicable qu'aux molécules de faible taille. En effet, comme le montre la figure (3), l'ordre d'élué des particules de taille supérieure à un micron est inversé par rapport à celui prévu par le modèle normal (brownien), les particules les plus grosses sont éluées avant les plus petites, on parle alors d'un phénomène d'inversion stérique, l'effet de convection devenant prépondérant par rapport à la diffusion. D'où la nécessité d'établir un autre modèle.

### c) Modèle "Hyperlayer"

Dans ce modèle d'élué, les particules et les molécules ont des tailles non négligeables devant le diamètre du canal ce qui rend l'effet de la diffusion négligeable. Les particules (ou les cellules) entraînées par le flux radial vers la paroi de la fibre HF5 sont confrontées à une force appelée la force de portance (en anglais : « lift force » [15]), obligeant les particules de taille plus imposante à se positionner plus près du centre de la colonne et donc à être éluées plus vite. A



l'action combinée du champ externe et des forces hydrodynamiques les particules se positionnent dans des lignes de flux particulières. Cette position d'équilibre dépend non seulement des caractéristiques des particules mais aussi des conditions expérimentales : intensité du champ externe et vitesse linéaire de la phase mobile. L'optimisation du rapport entre les débits (radial et axial) est donc très importante pour obtenir une bonne résolution dans la séparation des différentes populations de particules.

Figure.(6) ; Séparation en mode stérique hyperlayer, avec la procédure de focalisation/relaxation

## 6) Protocole d'utilisation de la fibre creuse HF5 :

Avant le premier usage, La fibre utilisée dans la colonne doit être pré-trempée avant de pouvoir être utilisée : le passage de l'eau ou des solutions aqueuses de tampon dans une fibre sèche ne permet pas d'établir un flux radial. Pour cela, nous commençons par faire circuler un mélange d'éthanol et d'eau (50/50 ou 80/20, volume à volume) pendant environ une heure en faible débit. Un rinçage à l'eau distillée pendant au moins 2 heures en débit convenable permet de l'équilibration de la membrane. N'importe quel type de phase aqueuse mobile est utilisable avec cette procédure. Cette procédure doit être répétée à chaque changement de membrane. De plus, la colonne obtenue ne sera utilisable une fois que les bulles d'air auront été complètement purgées.

Pour nettoyer la fibre creuse en cours de fonctionnement, il faut respecter l'indication du fabricant en faisant circuler une solution de NaOH à 0.5 M pendant environ une heure, puis en la rinçant à l'eau distillée pendant plusieurs heures.

### Références :

- [1].Giddings J.C. New separation concept based on a coupling of concentration and flow nonuniformities. *Separation Sci.*, 1 (1966) p. 123-125.
- [2].Giddings J.C. Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science*, 260 (1993) p. 1456-65.
- [3].Giddings J.C., The Field-Flow Fractionation Family: Underlying Principles, in *Field-Flow Fractionation Handbook*, Schimpf, M.E., Caldwell, K. and Giddings, J.C., Editors. 2000, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 3-30.
- [4].Kowalkowski T., Buszewski B., Cantado C. and Dondi F. Field-flow fractionation: theory, techniques, applications and the challenges. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 36 (2006) p. 129-135.
- [5].Reschiglian P., Zattoni A., Roda B., Michelini E. and Roda A. Field-flow fractionation and biotechnology. *Trends Biotechnol.*, 23 (2005) p. 475-483.
- [6].Myers M.N. Overview of field-flow fractionation. *J. Microcolumn Sep.*, 9 (1997) p. 151-162.
- [7]. Ratanathanawongs Williams,, In *Field-Flow Fractionation Handbook*: M. E Schimpf, K. D. Caldwell, J.-C. GIDDINGS, Eds. Wiley-Interscience: New York, 2000, Chapter 17.
- [8]. H.-L. Lee, J.F.G. Reis, J. Dohner, E.N. Lightfoot "Single-phase chromatography: solute retardation by ultrafiltration and electrophoresis." *AIChE J.*, 20 776-784 (1974).
- [9]. J. A. Jonsson and A. Carlshaf, "Flow Field-Flow Fractionation in Hollow Cylindrical Fibers," *Anal. Chem.*, 61,11-18 (1989).
- [10] J. C. Giddings, "Field-Flow Fractionation: Separation and Characterization of Macromolecular-Colloidal-Particulate Materials," *Science*, 260,1456-1465 (1993).
- [11] S.C. Pesek, W.J. Koros, Aqueous quenched asymmetric polysulfone hollow fibers prepared by dry/wet phase separation, *J. Membrane Science*. 88, (1994), Pages 1.
- [12] P. Reschiglian, B. Roda, A. Zattoni, B.-R. Min, M.-H. Moon "High Performance, Disposable Hollow Fiber Flow Field-Flow Fractionation for Bacteria and Cells. First Application to deactivated *Vibrio cholerae*," *J. Separation Science*, 25, (2002), 490.
- [13] Reschiglian, Pierluigi; Zattoni, Andrea; Roda, Barbara; Cinque, Leonardo; Melucci, Dora; Min, Byung Ryul; Moon, Myeong Hee. "Hyperlayer hollow-fiber flow field-flow fractionation of cells," *Journal of Chromatography, A* (2003), 985(1-2), 519-529.
- [14] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, L. Cinque, D. Parisi, A. Roda, F. Dal Piaz, M.H. Moon, B.R. Min, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 47-56.
- [15] K.D. Caldwell, T.T. Nguyen, M.N. Myers, J.C. Giddings, *Sep. Sci. Technol.* 14 (1979) 335.

# **CHAPITRE 1**

### **Instrumentation des colonnes tubulaires de fractionnement flux force à champ hydrodynamique radial (Hollow Fiber Flow Field Flow Fractionation : HF5) pour le tri cellulaire**

*Note à l'attention du lecteur : ce texte considère que le lecteur possède les notions fondamentales des sciences de la séparation et en particulier qu'il a déjà appréhendé les notions de fractionnement flux force, à la fois dans la variété des techniques utilisées et dans les modes d'injection (relaxation) et d'élution (Brownien et Inertiel)*

L'essentiel des résultats est présenté dans le rapport publié dans « Journal of Chromatography Biomedical Applications », et dont la copie est annexée dans les pages suivantes. Le point fondamental mis en évidence dans le cadre de ce travail est la complexité du mécanisme de relaxation des cellules sanguines dans la méthodologie HF5. Nous avons remarqué que plus les cellules sont grosses, plus elles focalisent vite. Un tel concept peut générer des conditions d'élution relativement difficiles à interpréter. En effet, on observe la balance des effets de rétention dus (a) à une relaxation suffisante ou non et (b) des effets du mode d'élution des cellules, décrit sous le terme d'inertiel (« steric/hyperlayer ») dans la littérature.

En résumé, si les cellules de caractéristiques différentes sont « suffisamment relaxées/focalisées» alors, leur ordre d'élution correspond au mode connu « steric/hyperlayer » qui prévoit que les cellules les plus grosses sont éluées les premières. A l'opposé, notre travail a également démontré que les cellules «relaxent» avec une cinétique qui dépend de leur taille, les plus grosses étant plus rapidement transportées vers les parois du canal que les plus petites. On remarque alors, que si le temps de relaxation n'est pas suffisant, les cellules les plus grosses sont éluées après les plus petites, ce qui induit l'analyse du mécanisme d'élution. Les conditions d'injection : concentration, volume, temps de relaxation/ focalisation, position de focalisation deviennent alors des conditions « critiques » permettant de maîtriser les séparations. Dans cette introduction au chapitre de tri cellulaire nous présentons les éléments importants, ayant participé à la démonstration du mécanisme de focalisation/relaxation des cellules et en particulier tous les éléments liés aux caractéristiques de l'injection.

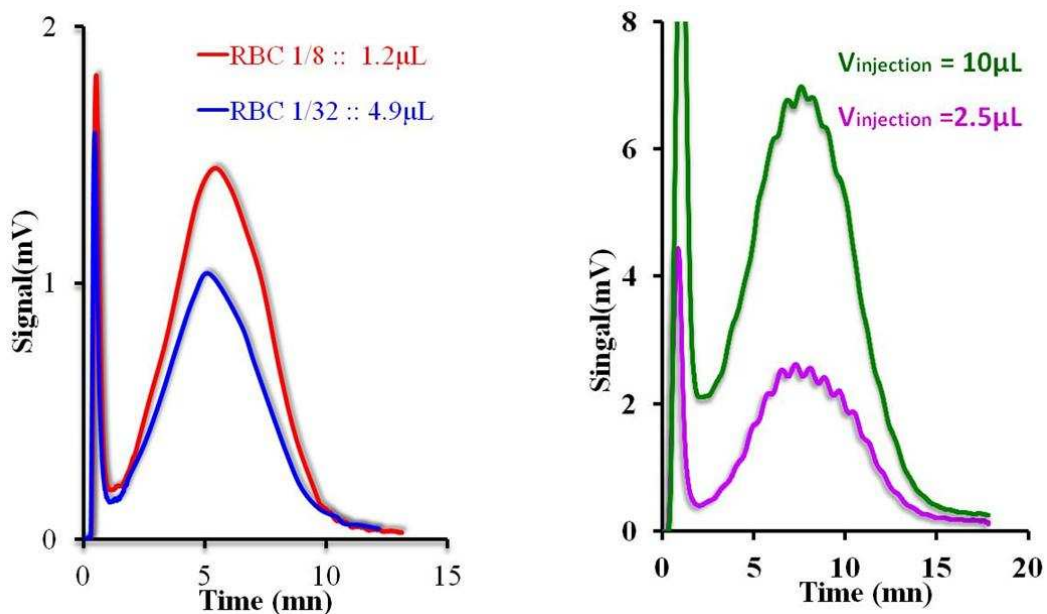
En termes de tri cellulaire, nous avons montré dans l'article l'importance de l'emploi de micro méthodes pour l'analyse de populations cellulaires de faible nombre. Ceci produit également un paradoxe puisque les outils d'analyses granulométriques ou morphologiques s'appuient sur la nécessité d'analyser un nombre suffisant de cellules. Ce contexte assez particulier est donc discuté dans cette introduction

#### **1) Instrumentation, volume d'injection et concentration des cellules**

La première étape de notre étude concerne les volumes d'injection des cellules, et leur concentration compatible avec un mode d'élution permanent d'un rendement supérieur à 80%. Dans un premier temps, des quantités équivalentes assez diluée de Globules rouges lavés ont été éluées. Les quantités correspondant environ à  $6 \cdot 10^5$  cellules dans le cas de l'injection d'une dilution 1/8 de GR lavés dans une boucle de  $1.2 \mu\text{L}$  et environ  $1.5 \cdot 10^5$  cellules (dilution 1/32) dans la boucle d'environ  $5 \mu\text{L}$ . on note que la balance volume/ dilution introduit une quantité de cellules équivalente dans les deux cas Les profils d'élution obtenus sont présentés dans la Figure 1-A. On observe que la quantité

## CHAPITRE 1

théorique de cellules éluées dans les deux cas sont analogues et devraient donc présenter des profils similaires. Le figure 1-A montre que les deux profils sont analogues avec une variation d'intensité de signal inférieure à 10% ce qui a été rencontré à plusieurs reprises dans d'autres méthodes de tri cellulaire par FFF, en particulier dans le cas des méthodes FFF de sédimentation (Gravitationnelle, Multi-gravitationnelle). On peut donc considérer, que la collection de fractions cellulaires d'environ 1 à  $2 \cdot 10^5$  cellules semble possible. Une autre façon d'éluier un grand nombre de cellules, est d'exploiter le phénomène de focalisation associé au mécanisme particulier de relaxation propre aux méthodes de fractionnement flux force avec champ hydrodynamique. Une suspension de concentration bien définie (1/8) est éluée soit dans un volume intermédiaire par rapport aux conditions de la figure 1-A, soit dans un volume correspondant pratiquement à 20% (10 $\mu$ L) du volume de la colonne effectivement utilisée pour l'éluion (volume total de la fibre 114  $\mu$ L, focalisation à 50% soit un volume effectif pour l'éluion d'environ 50 $\mu$ l). La Figure 1-B présente les deux profils obtenus, comme dans la figure 1-A, on remarque une corrélation entre l'intensité du signal (aire & hauteur) et la quantité de cellules injectée. On note également que la figure 1-B montre bien que le rapport 4/1 correspondant au rapport des boucles d'injection se retrouve dans l'intensité du signal. La figure 1-B confirme donc les potentialités apportées par la HF5 quant à l'analyse potentielle de sous fractions cellulaires, l'effet de focalisation des cellules lors du mécanisme de relaxation apparaît également très clairement. En effet, on remarque que les profils d'éluion correspondant à deux volumes d'injection très différents (2.5 à 10 $\mu$ L) présentent des caractéristiques d'élargissement de bande et de rétention très similaires. L'emploi d'un volume d'injection correspondant à plus de 20 % du volume effectif de la colonne d'éluion ne se traduit pas comme en chromatographie par un effet marqué (essentiellement d'élargissement de bande) ce qui confirme l'efficacité d'un phénomène de focalisation lors du mécanisme de relaxation.

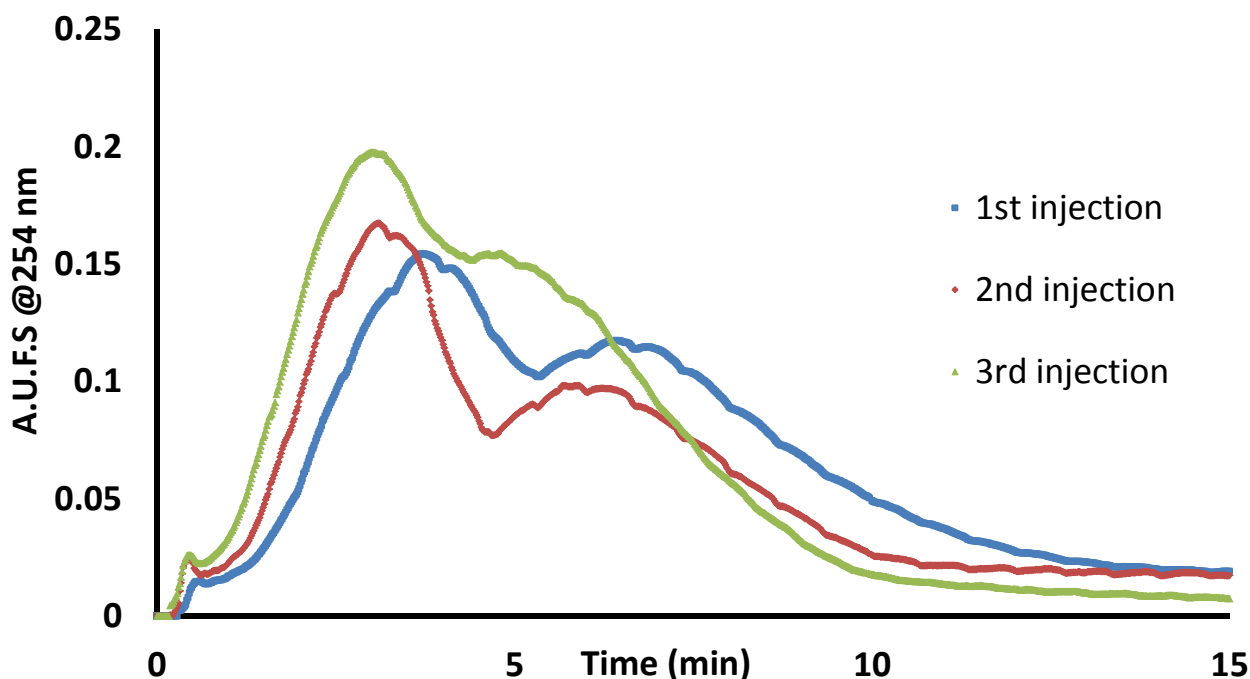


**Figure 1:** Channel 1mm diameter, 23 cm Length , effect of injection volumes of Red Blood cell samples on elution profiles: RBC suspensions were prepared by simple dilutions of total blood in PBS, the dilution used was systematically the 1/8 one when non specified. Fractograms A: IFI 0.21ml/mn. OA FI 0.07ml/mn. RFI 0.14ml/mn. mobile phase; isotonic PBS, focalisation ( 1min / 50%CL) Fractograms B: IFI 0.18 ml/mn. OA FI 0.05 ml/mn, Frad 0.13 ml/mn, mobile phase: isotonic PBS, focalisation (1min/50% CL). Column described in the J.Chromatography B report.

## CHAPITRE 1

### 2) Le problème des fortes concentrations : une répétabilité critique.

L'utilisation de concentrations définies dans le cadre du précédent paragraphe permet d'envisager la collection de fractions. La Figure 2 présente les résultats obtenus lors de l'élution d'une suspension de sang Total dilué au 1/10 dans une solution tampon PBS. Le temps de relaxation a alors été porté à 10 minutes. Lorsque ces résultats sont comparés à ceux de la Figure 1, on observe l'apparition d'un double pic d'espèces retenues associé à la disparition totale du signal au temps 30 secondes. Le profil de la figure 2 devient alors interprétable. Dans la Figure 1, le temps de focalisation permet la



**Figure 2 : repeatability of « concentrated samples in HF5. RBC:1/10 total blood dilution in isotonic phosphate buffer, 5 $\mu$ L injection. HF5: 10 cm Length, 10 min relaxation, (50% column length) IFI:0.28 mL/min external field varying from 30 to 40%.**

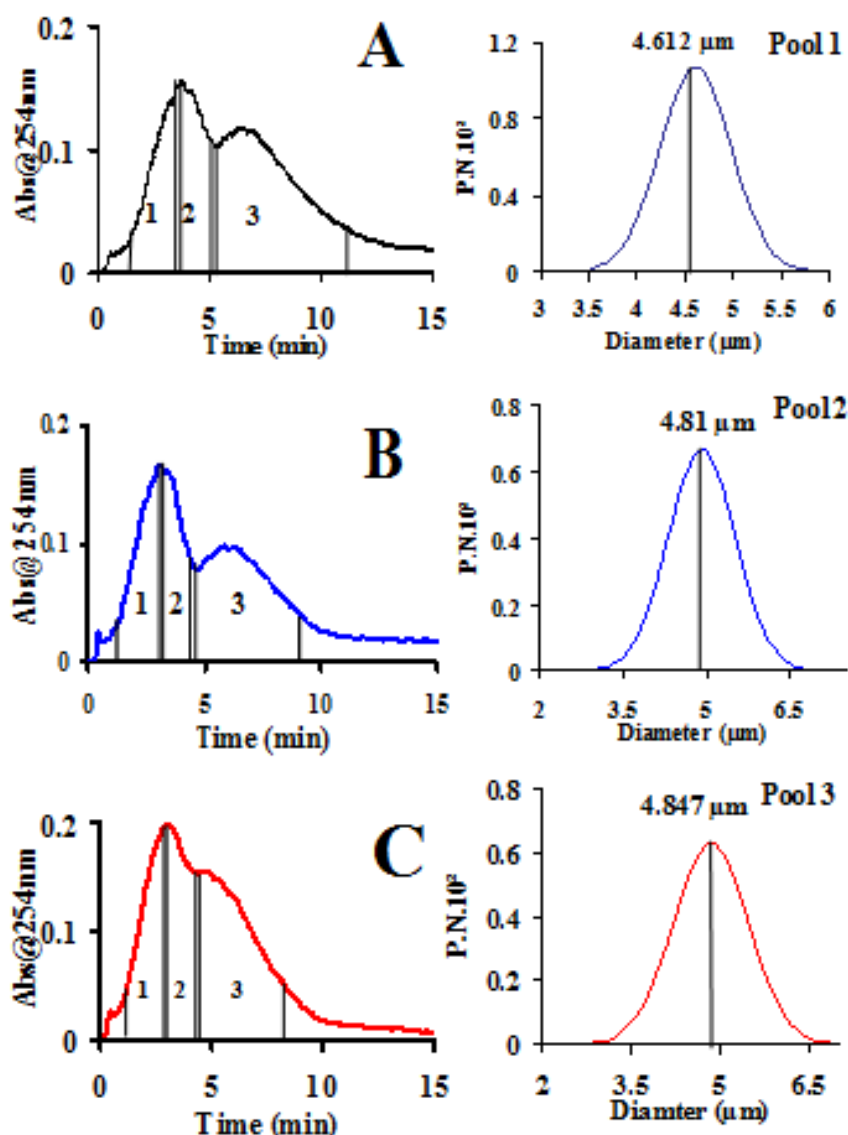
sédimentation des cellules, alors que les protéines plasmatique de PM >30000 occupent l'ensemble du lumen disponible de la fibre et sont alors éluées dans le volume mort de la colonne (temps voisin de 30 sec). Dans le cadre des conditions expérimentales de la Figure 2, on peut considérer que le temps de relaxation/focalisation de 10 minutes permet l'établissement d'un gradient de concentration des protéines dans le lumen de la fibre, leur permettant alors une rétention selon les caractéristiques décrites classiquement dans le modèle « brownien/normal ». On observe donc dans les profils de la figure 2, l'absence de signal au temps 30 sec et un double pic lié au signal provoqué par les protéines d'une part des cellules d'autre part, il va de soi que les deux composantes principales du mélange soit le groupe « protéines » à fort coefficient de diffusion et mécanisme d'élution « brownien » et le groupe cellules, composé en majorité de globules rouges ne sont pas parfaitement séparés. Les profils obtenus sont donc le résultat de la « convolution » du profil d'élution des protéines et de celui de globules rouges. Dans la zone de focalisation, la grande quantité de protéines prisonnières de la fibre associées à la forte charge cellulaire au contact de la paroi de la membrane pourrait expliquer les variations des ratios champs radial/axial mesurés dont la conséquence est une modification des temps de rétention.



## CHAPITRE 1

- **La non répétabilité : un problème sous estimé ; un facteur limitant pour la collection des Fractions**

La relative non répétabilité en termes de signal des éluions présentées dans la figure 2 provoque une dispersion des conditions de collection de fractions qui pourraient en limiter leur interprétation. Il apparaît clair que cette dispersion pourrait être réduite par l'emploi d'une instrumentation adaptée où les rapports des flux axial et radial pourraient être imposés indépendamment des rapport de perte de charge, ce qui impose l'ajour d'un diviseur de débit indépendant de la pression dont l'utilisation la plus courante aujourd'hui est en spectrométrie de masse. Quoiqu'il en soit 3 fractions ont systématiquement été collectées et regroupées pour pouvoir obtenir des fractions avec des quantités cellulaires suffisantes. Les résultats de l'analyse granulométrique sont présentés au regard des fractions collectées dans la Figure 3



**Figure 3 : high concentration RBC samples and granulometric analyses.**

RBC:1/10 total blood dilution in isotonic phosphate buffer, 5 $\mu$ L injection. HF5: 10 cm Length, 10 min relaxation, (50% column length) IFI:0.28 mL/min external field varying from 30 to 40%. Pool 1: 1.5 min, pool2:1.6 min, pool 3: 4.5 min coulter counter granulometric analyses after dyke 5 $\mu$ m particles calibration. P.N correspond to arbitrary units correlated to particle number.

### 3) La collection des fractions :

Les volumes de chaque fraction ont été adaptés pour balayer l'ensemble du profil de la façon la plus pertinente possible (dans le pic supposé de protéines et dans celui des cellules), la mesure Coulter multi canal après calibration par des billes de latex dans la gamme de taille des cellules permet l'établissement d'un profil granulométrique significatif qui est présenté en regard des fractogrammes sur la figure 3.

#### a) Le pool théorique en nombre de cellules

Une dilution au 1/10 du sang total permet de disposer d'un échantillon cellules /protéines contenant  $5 \cdot 10^5$  RBC/ $\mu$ L et 6 g/L de protéines. Les fractions ont été sélectionnées pour tenir compte de la possible interférence lors de la détection photométrique entre le signal des protéines et celui des cellules. Compte tenu du volume de la boucle d'injection et du temps important de focalisation avec une membrane dont l'état de surface n'a pas été optimisé pour limiter les possibles interactions membrane/échantillon, nous devons considérer qu'un temps de focalisation important pourrait le favoriser ces interactions ce qui forcément limitera le rendement au comptage des cellules. On peut donc considérer que l'échantillon comporte environ une quantité de cellules éluables de l'ordre de  $2.5 \cdot 10^6$  cellules dont une partie non négligeable interagit avec la membrane au moment de la focalisation. On prendra comme hypothèse un rendement de l'ordre de 60% soit environ  $1.5 \cdot 10^6$  cellules qui seront collectées sur environ 1.5mL. le volume moyen des fractions représente environ 0.3 mL pour la fraction 1, 0.5 mL pour la fraction 2 et 0.7 mL pour la fraction 3. Bien que la mesure Coulter se traduise par un rendement global largement inférieur à 60% dont les causes ne sont pas encore maîtrisées on remarque que l'essentiel des cellules est élué dans le pool 1 de plus faible volume et que le pool 3 qui représente la moitié du temps de collection de fractions représente moins du tiers des cellules éluées

#### b) Le paradoxe de la granulométrie

On remarque à l'analyse granulométrique que l'ordre d'éluion des cellules ne correspond pas au modèle « inertiel » d'éluion des particules microniques, puisque les cellules les plus grosses sont éluées les dernières. Ce résultat introduit toute la subtilité du mécanisme de relaxation /focalisation qui sera discuté de façon approfondie dans l'article qui suit.

### 4) Profil multimodal.

La particularité des méthodes HF5 permet l'éluion d'espèces à fort coefficient de diffusion en même temps que des espèces microniques ces deux « mondes » aux modes d'éluion différents peuvent donc co-éluer et provoquer en photométrie des profils complexes comme ceux des figures 2 et 3. Une méthode simple : le lavage de cellules, permet d'éliminer la composante protéique de l'échantillon et dans ce contexte on retrouve les profils monomodaux comme le montre l'exemple de la figure 4. Cette procédure sera systématiquement exploitée dans le cadre de l'article suivant.

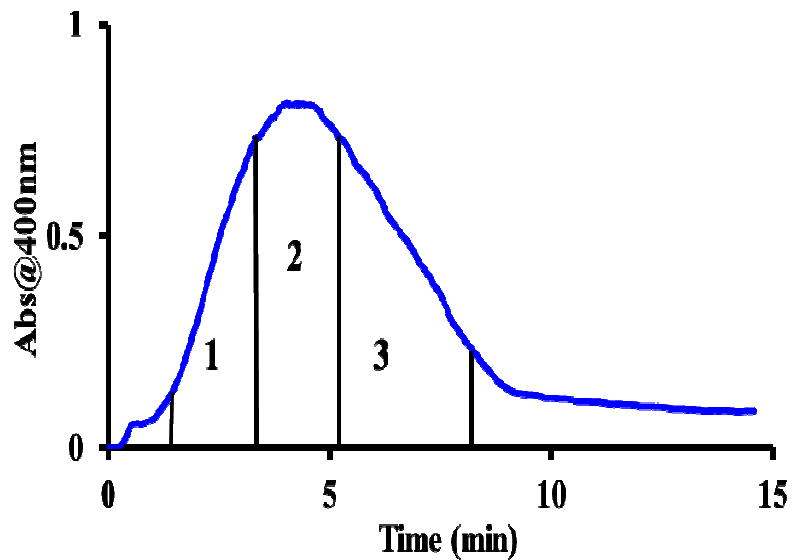


Figure 4 : Isotonic Buffer Washed RBC. IFI:0.28 mL/min. field ratio: 30% radial. Other conditions identical to figure 3

### Conclusions :

Le travail préliminaire présenté dans cette introduction permet de définir une série d'indications pour la collection des fractions cellulaires en HF5 : les suspensions cellulaires doivent être lavées, les quantités injectées de l'ordre de  $10^6$  cellules, Il est possible d'utiliser des volumes d'injections importants (>20% du volume de la colonne). **On remarque également que l'instrumentation présentée présente des limites en termes de répétabilité dans le cadre de l'éluion de quantités importantes de cellules.**

### ARTICLE 1

#### Journal of chromatography B

##### Instrumentation of hollow fiber flow field flow fractionation for selective cell elution

Tayssir Ibrahim<sup>a</sup>, Serge Battu<sup>a</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>b</sup>, Philippe Cardot<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Limoges, FR 3503 GEIST, EA 3842 “Homéostasie cellulaire et pathologies”, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Chimie Analytique et Bromatologie, 2, rue du Dr Marcland 87025 Limoges Cedex, France

<sup>b</sup> Université de Limoges, FR 3503 GEIST, UMR CNRS 7276 “Control de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations (CRIBL), Faculté de Médecine, 2, rue du Dr Marcland 87025 Limoges Cedex, France

##### Abstract

Hollow fiber flow field flow fractionation (HF5) columns can be built with minimized cost and instrumental skills by incorporation of commercial hollow fibers into holders made of classical chromatographic tubing and connectors. The proposed design leads to differential elution of human cells of different origin.

Suspensions of red blood cells (RBC) and adherent human colorectal cancer (CRC) cell lines were used. These CRC nucleated population have been linked to cell-to-cell and cell to instrument interactions that are limiting factors in terms of recovery and viability. These interactions can be limited depending on injection/elution conditions. By using RBC we observed that the focalization/relaxation step played a major role in the elution process. However, HF5 opens a large potential, which completes the diversity shown by SdFFF in cell sorting methodologies and technologies.

##### Remerciements

The expenses of this work were defrayed in part by the Ministère de l'Education Nationale, de la recherche et de la Technologie, the Conseil Régional du Limousin and by the Ligue contre le Cancer (Comité du Limousin). T. Ibrahim is the recipient of a grant from the Syrian Government.

# CHAPITRE 2

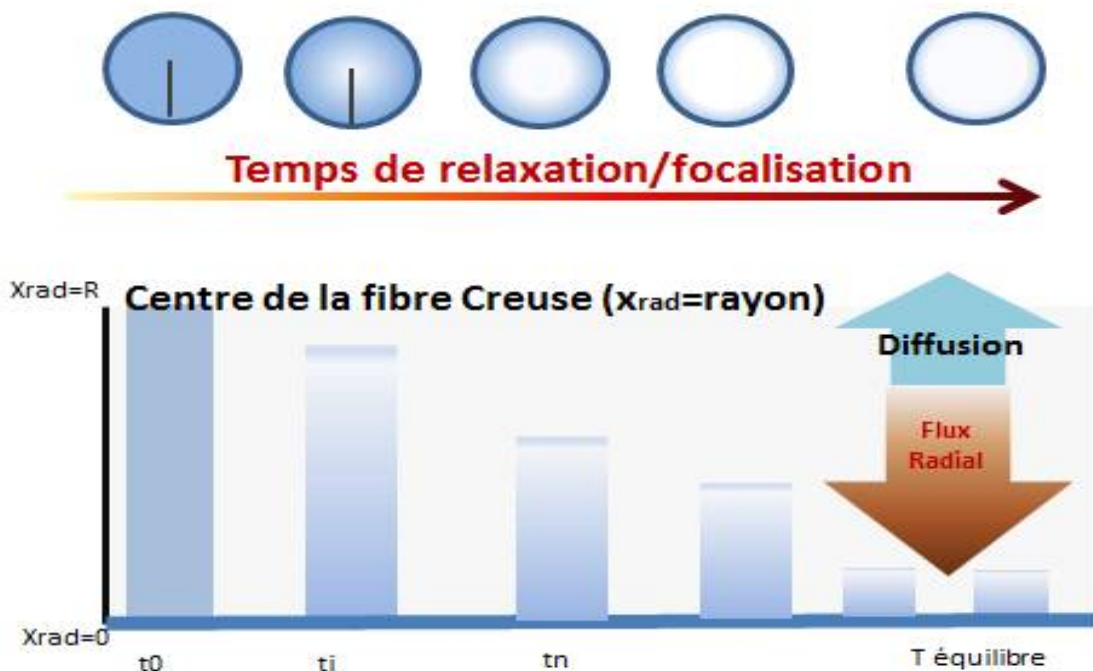
**Elution des protéines en mode « Brownien » dans une colonne HF5. Etude du mécanisme de relaxation focalisation**

*Note à l'attention du lecteur : ce texte considère que le lecteur possède les notions fondamentales des sciences de la séparation et en particulier qu'il a déjà appréhendé les notions de fractionnement flux force, à la fois dans la variété des techniques utilisées et dans les modes d'injection (relaxation) et d'élution (Brownien et Inertiel)*

L'essentiel des résultats est présenté dans un rapport qui sera soumis dans « Journal of Chromatography A », et dont la copie est annexée dans les pages suivantes dans un format concentré. Le point fondamental mis en évidence dans le cadre de ce travail est la complexité du mécanisme de relaxation des protéines en HF5. A la différence du mode de relaxation des cellules explicité dans le chapitre précédent, le mode d'élution qui en découle pour les protéines correspond bien à celui prévu par les modèles « convection/diffusion » où les protéines les plus grosses sont éluées après les plus petites. On supposera dans le texte qui suit que les notions de mode d'élution « convection/diffusion » encore appelé mode « Normal ou Brownien » sont connus.

**1) Le concept de relaxation radial : méthodologie de la détermination de position de focalisation dans la longueur de la colonne :**

L'élution des protéines en mode Brownien résulte de l'établissement d'un gradient de concentration dans la lumière de la fibre sous l'action combinée centripète du champ hydrodynamique et



**Figure 1 : Mode brownien. Effet de la relaxation sur le profil de concentration radial des protéines.**

Les temps  $t_0, t_i, t_{\text{équilibre}}$  correspondent aux différents temps de focalisation. La paroi poreuse de la fibre est figurée sur l'abscisse et l'ordonnée présente le rayon. Une coupe transversale de la fibre présente également le profil de concentration sur toute la « tranche » de fibre à l'endroit l' de focalisation. On définit l'ordonné par l'indice  $x_{rad}$ , avec comme référentiel  $x_{rad}=0$  à la paroi de la fibre et  $x_{rad}=R$  rayon intérieur de la fibre i.e rayon accessible aux molécules)

centrifuge de la diffusion comme le montre la séquence de la Figure 1. Après l'injection d'une solution de protéines dans le système HF5, on provoque l'établissement d'un régime d'équilibre stationnaire grâce à l'action combinée et opposée de deux flux axiaux dont les débits massiques sont réglés pour provoquer à la fois un débit résultant nul à la position de focalisation ainsi que pour créer l'intensité du flux centripète provoquant la convection des protéines vers les parois de la fibre.

**2) Le profil de concentration radial : le modèle brownien.**

Si l'on considère une des coupes transversale de la fibre creuse présentées en Figure 1 ( $t_1^0$ ), on peut définir un axe radial orienté de la périphérie de la lumière de la fibre vers son centre soit  $x_{rad}$  cet axe avec comme référentiel  $x_{rad}=0$  à la paroi interne de la fibre et  $x_{rad}=R$  centre de la fibre, R devient le rayon de la fibre accessible aux molécules. Si l'on analyse, le flux de molécules se dirigeant vers le centre à une hauteur  $x_{rad}$  donnée alors ce flux est décrit par l'équation suivante

$$J_{xrad} = U_{xrad}c(xrad) - D \frac{dc(xrad)}{dxrad} \quad (1) \text{ Ou } C_0 \text{ est la concentration à } X_{rad} = 0$$

A l'équilibre le flux radial  $J_{xrad}=0$  avec comme conséquence un profil de concentration radial exponentiel des protéines correspondant à l'équation suivante

$$C(xrad) = C_0 \exp\left(\frac{xrad.U_{xrad}}{D}\right) \quad (2)$$

L'endroit de la colonne de longueur L où s'établit cet équilibre est appelé position de focalisation (l'). Une des problématiques fondamentales présentée dans le rapport associé concerne la détermination effective de cette position l' qui dépend, sur le plan instrumental très fortement des valeurs relatives des débits axiaux en opposition. La méthodologie de la détermination de cette valeur l' repose sur un certain nombre d'hypothèses qu'il faut bien cerner pour en comprendre les limites potentielles.

**a) Les hypothèses mécaniques et hydrodynamiques**

Les premières contraintes mécaniques concernent la fibre elle-même. La première hypothèse, exprimée dans les équations 1 et 2 fait référence au rayon accessible aux molécules. Ces fibres sont fournies avec une information sur le diamètre moyen, fibre sèche du premier ordre (+/- 0.1 mm). Or une connaissance précise de cette valeur est nécessaire en FFF. Une mesure directe par analyse d'image est possible, mais le biais principal vient de la modification de caractéristiques liés à la mouillabilité par le solvant. Il est possible alors de mesurer par analyse d'image après mise au contact du solvant ou après congélation comme suggéré par certains groupes. Le second paramètre complexifiant la mesure du rayon de la fibre est lié aux conditions de pression exercée par le solvant lors de la filtration par la membrane. Il devient alors nécessaire de mesurer ce rayon dans ces conditions. Nous proposons une méthode indirecte conséquence du mode brownien, en effet il est possible de mesurer le temps d'élution d'un composé non affecté par le champ externe c.a.d. d'un composé dont le coefficient de diffusion est très grand devant l'effet de convection lié au champ ( $D \gg U$ ) ou bien un composé dont l'élution commence au temps  $t_0$  de la Figure 1 et se termine largement avant le temps  $t_i$  ( $t_i = t_0 + dt$ ). Dans ce cas il est établi que le volume de la fibre peut être

calculé à partir du temps d'élution d'un composé dont les caractéristiques viennent d'être définies dans les lignes précédentes.

$$t = \frac{V}{F_{rad}} \ln\left(\frac{F_{in}}{F_{in} - F_{rad}}\right) \quad (3)$$

Où  $F_{in}$  est le débit à l'entrée de la fibre ( $L=0$ ), et  $F_{rad}$  le débit radial et  $V$  le volume de la lumière de la fibre. Les hypothèses hydrodynamiques associées sont :

- La différence de pression entre l'intérieur de la fibre et l'extérieur est considérée comme constante tout le long de la membrane
- Il s'établit un profil parabolique de vitesse dans la lumière de la fibre

Il devient alors possible à partir de cette valeur de ( $t$ ) de déterminer le volume de la colonne et d'en déduire un Rayon de fibre moyen ( $R_a$ ). Dans le rapport nous avons montré que selon le type de molécule utilisé ces valeurs de  $R$  pouvaient différer. En effet, l'utilisation d'une molécule dont  $D \gg U$ , impose une molécule de petite taille perméable à la membrane dont le volume disponible dans la fibre comprend vraisemblablement l'épaisseur de la membrane. A l'inverse, l'emploi d'une molécule de grand poids moléculaire dont la distribution sera limitée à l'intérieur de la lumière de la fibre minimise potentiellement cette mesure de  $R_a$ . On peut considérer finalement cette valeur comme étant la plus fiable à partir du moment où le temps  $t$  mesuré est très inférieur à  $t$ -équilibre défini précédemment dans le Figure 1. Le rapport discute précisément des conditions d'emplois de ces molécules et montre clairement les limites des tempos d'élution compatibles avec une mesure fiable de cette valeur de  $R_a$ .

Se pose enfin la question d'une valeur de  $R$  variable en fonction des conditions expérimentales,  $R_a$  pourrait dépendre des conditions de pression radiales et de la différence de pression entre l'entrée et la sortie de la colonne, on pourrait alors considérer que la colonne n'est pas « rigide » mais que son diamètre serait adaptable ( $R_a$  augmenterait à forte pression ?). Ces hypothèses n'ont encore jamais été envisagées dans la littérature. Au stade de maturité où se trouve notre instrumentation les plages de pression envisageables sont encore trop restreintes pour apporter une réponse claire et la question reste posée. La notion du rayon effectif a donc impliqué que soient décrites quelques hypothèses sur la structure de la membrane ; homogénéité de porosité, d'épaisseur, de pression de filtration. La seconde hypothèse, d'origine hydrodynamique est le caractère laminaire de l'écoulement du liquide vecteur dans la lumière de la membrane. Si ce caractère peut être facilement admis dans le cas d'une configuration d'élution, qu'en est-il de la situation lors d'une configuration de relaxation/focalisation à la position  $l$  ? Peut-on considérer le volume de l'échantillon comme un « vrai tube » dont l'axe est centré sur la position  $l$  ? Dans ce cas, sa longueur (**Le**) est considérée comme négligeable devant la longueur de la fibre ou tout simplement homothétique au volume effectivement injecté.

Ainsi les premières hypothèses de la modélisation sont posées :

- $R$  rayon de la lumière de la fibre doit être évalué pour chaque condition expérimentale en particulier pour chaque débit d'entrée et pour chaque rapport de flux (radial /axial)



➤ Les hypothèses d'un profil parabolique axial même au voisinage d'une paroi par définition poreuse seront considérées comme valides, on précise alors que les irrégularités de la surface interne de la fibre seront d'ordre négligeable devant le rayon de la fibre et surtout que le volume de l'échantillon injecté reste de type « cylindre » parfait pendant la focalisation. *[Intuitivement on imagine facilement que la longueur de ce cylindre risque d'être modifiée au moment de la focalisation ( 2 flux opposés) et que ce volume peut se différencier en fonction des caractéristiques des éléments à séparer.]*

Les méthodes HF5 appartiennent au groupe des méthodes de FFF à champ hydrodynamique, c'est cet ensemble qui assure l'essentiel des applications FFF aujourd'hui. A partir des méthodes de flow FFF initiales [Giddings, Science,1994] se sont développées les méthodes à champs asymétriques Asymetrical Flow FFF, et l'on peut considérer les méthodes HF5 comme une de leur dérivée miniaturisée , NHF5 : Nano Hollow Fiber Flow Field Flow Fractionation. Dans ce contexte, et comme développé dans le rapport qui suit, un grand nombre de travaux ont commencé à formaliser une modélisation d'élution des protéines.

### b) Les hypothèses de modélisation et leur réalisme

Sous l'influence d'un champ hydrodynamique radial, une partie du flux entrant dans la colonne est expulsé au travers de la membrane, ceci se traduit par une diminution de la masse de phase mobile liquide en mouvement et l'on peut considérer qu'au fur et à mesure de sa migration la colonne la vitesse de la phase mobile diminue régulièrement, ainsi à chaque endroit (x) de la colonne la vitesse moyenne de la phase mobile dans la colonne peut s'exprimer par l'équation suivante :

$$\langle v \rangle(x) = \frac{V_{in} - f(x, L, V_{rad})}{\pi r^2} \quad (4)$$

$V_{in}$  est le débit à l'entrée de la colonne et le débit radial définit par :  $V_{rad}$

Si l'on considère que le débit axial est constant tout le long de la colonne, alors cette équation peut se simplifier par l'équation 5 :

$$\langle v \rangle(x) = \frac{V_{in} - (x/L)V_{rad}}{\pi r^2} \quad (5)$$

Ces hypothèses ont permis l'établissement de l'équation 3 à partir d'une simple intégration :

$$t_{0-L}^0 = \int_0^L \frac{\pi r^2}{V_{in} - (x/L)V_{rad}} dx = \frac{\pi r^2 L}{V_{rad}} \ln \left( \frac{V_{in}}{(V_{in} - V_{rad})} \right) \quad (6)$$

D'un point de vue pratique, une méthodologie permettant de mesurer avec précision la valeur décrite dans les équations 3, et 6 permet de définir avec précision la valeur effective du rayon de la fibre dans les conditions de pression de l'analyse (on note dans les équations 4 à 6 que  $R=r$ ).

Les équations 4 à 6 reposent donc sur l'hypothèse que le débit radial serait constant tout le long de la colonne. Quelle est donc la réalité de cette hypothèse. Le débit axial est créé par une différence de pression entre l'entrée de la colonne et la sortie, et si la structure de la membrane est homogène tout le long de la colonne, la différence de pression par unité de longueur de colonne pourra être considérée comme constante tout le long de la colonne. De même la pression à l'extérieur de la colonne est constante tout le long de celle-ci grâce au montage spécifique du conteneur de la fibre comme décrit instrumentalement dans le chapitre 1. En conséquence à chaque abscisse x le long de

la colonne, la différence de pression axiale est constante et la différence de pression radiale également, cette constance de différence de pression radiale permet de considérer que le débit radial conduisant le champ externe restera donc constant tout le long de la colonne.

### c) Les conséquences de la modélisation : détermination de l'

Que se passe-t-il alors dans le cas d'une focalisation ? après focalisation à la position l' dans la colonne, on considère que l'élution a lieu dans une colonne de longueur L-l', avec un débit d'entrée de type V(l') et un débit radial connu. Dans ce cas le temps d'élution d'un composé non affecté par le champ externe sera défini par les équations 7&8

$$t_{l'-L}^0 = \int_{l'}^L \frac{\pi r^2}{V_{in} - (x/L)V_{rad}} dx \quad (7)$$

$$t_{l'-L}^0 = \frac{\pi r^2 L}{V_{rad}} \ln \left( \frac{V_{in} - (l'/L)V_{rad}}{(V_{in} - V_{rad})} \right) \quad (8)$$

#### i. La notion de volume mort et son exploitation

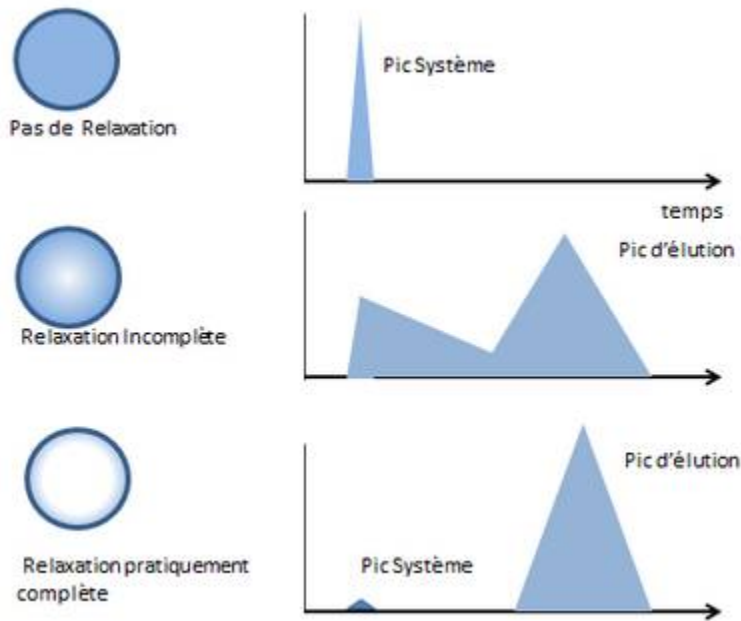
On remarque si l'on compare les équations 6 et 8 que l'on dispose d'une méthodologie de détermination précise de la position effective l' de focalisation. Ainsi l'élution sans relaxation d'une molécule « marqueur » permet de calculer le rayon effectif de la fibre et son élution avec focalisation permet la détermination de la valeur l' par le biais de l'équation 8. Un système de double élution permet alors de définir les conditions expérimentales précises. Une question bien décrite dans le rapport qui suit, se pose alors. Quelle doit être la nature d'un tel composé marqueur ? Comment le définir. C'est ainsi que l'on peut alors introduire une notion originale en HF5, celle de pic système.

#### ii. Notion du pic système.

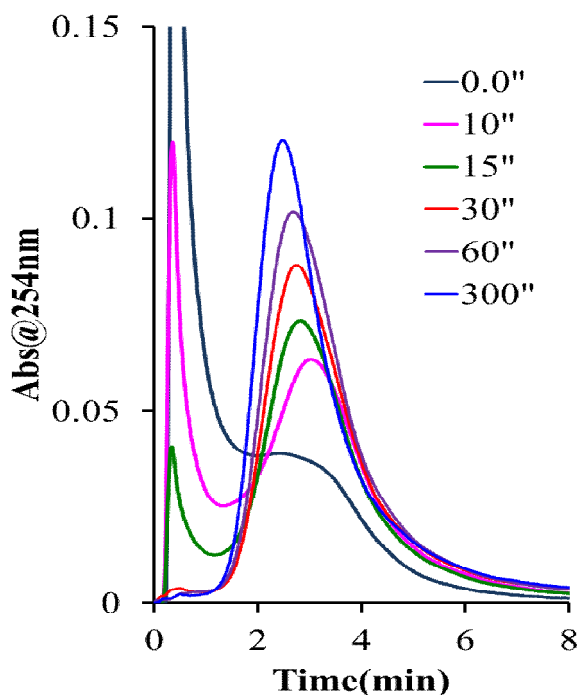
Le rapport montre bien la complexité de trouver un type de molécules capables d'occuper toute la lumière interne et seulement celle-ci pour pouvoir définir effectivement le volume de la fibre donc son rayon. Il existe un moyen décrit dans la figure 1. Il suffit d'éluer l'échantillon sans relaxation en considérant que le temps de cette élution reste très court devant celui d'un début de relaxation. Si le temps d'élution est largement inférieur au temps  $t_i$  de la Figure 1 alors l'échantillon lui-même devient le marqueur permettant le calcul du volume mort de l'ensemble de la colonne. La question devient plus délicate dans le cas d'une élution avec relaxation puisque dans ce cas les composants subissent les effets du champ ce qui conduit à un gradient de concentration radiale formalisée par les équations 1 & 2. L'analyse expérimentale des échantillons focalisés, soit des solutions d'un seul composant protéique soit des mélanges montre qu'il existe dans de nombreuses situations de focalisation, un premier pic correspondant au volume mort de la partie de colonne considérée (L-l').

Il devient possible alors d'exploiter ce profil pour déterminer l'. Il est évident que l'existence d'un pic résiduel lors d'un mécanisme de focalisation indique que celle-ci n'est pas complète, mais l'analyse des sélectivités et des résolutions dans le cas des mélanges protéiques montre que ce n'est en aucun

cas un facteur limitant. La figure 2 simule les cas de figures liés à cette relaxation incomplète et le lecteur remarquera dans le rapport suivant la corrélation avec les résultats expérimentaux obtenus qui s'est avérée surprenante. Plus précisément, obtenir une séparation « optimale » se réalisera en trois injections, la première pour la détermination de R, la seconde pour la détermination de l' et la troisième pour respecter la balance des masses et retrouver dans le profil l'intégralité des protéines injectées, cette séquence est décrit dans les Figure 1 et le Figure 2.



**Figure 2 : Mode brownien. Notion du pic système théorique** :Simulation de profils d'élution d'une protéine en solution en fonction de l'état de focalisation .



**Figure 3 : Mode brownien. Notion du pic système expérimental:** Simulation de profils d'élution d'une protéine en solution en fonction de l'état de focalisation . Influence du temps de focalisation sur les le profil d'élution de l'albumine. Evolution du pic système.F in 0.17ml/mn, F axial 0.07ml/mn, F radial 0.1ml/mn, applied field (41/59) , focalisation point (50%), injection volume 2.5µl , HF 9.5cm L x 0.5mm ID). Phase mobile PBS,

iii. Les équations : le modèle

A partir des équations 6 et 8 on peut calculer l'

$$l' = L \left( \frac{V_{in} - (V_{in} - V_{rad})e^A}{V_{rad}} \right) \quad (9) \quad \text{avec} \quad A = \frac{t^{l'-L} V_{rad}}{\pi r^2 L} \quad (10)$$

Ce modèle s'avère expérimentalement assez fiable, pour autant que le marqueur du profil d'éluion du pic système soit correctement choisi, le rapport présente une série de mesures expérimentales dans laquelle le marqueur de choix s'avère être le « mode du pic » et non pas son centre de gravité.

3) Le concept de relaxation axiale : à une différence de relaxation radiale correspond une différence de relaxation axiale :

Un argument vers une grande sélectivité des molécules à très hauts poids moléculaires, Le mécanisme de relaxation radial des protéines sous l'influence du champ radial d'origine hydrodynamique apparaît correspondre remarquablement aux modèles théoriques de la position l' de la focalisation. Mais s'il existe une relaxation radiale qu'en est-il d'une potentielle relaxation ou focalisation axiale. En effet lors de la focalisation l'échantillon de mélange de protéines se trouve axialement soumis à un double champ d'origine hydrodynamique exactement compensé à chaque ordonnée x<sub>rad</sub> pour une position axiale l' donnée. Ce concept peut être schématisé par la séquence de la figure 4 qui représente le mécanisme de focalisation dans le cas d'un mélange de protéines dont les caractéristiques de diffusion seraient très

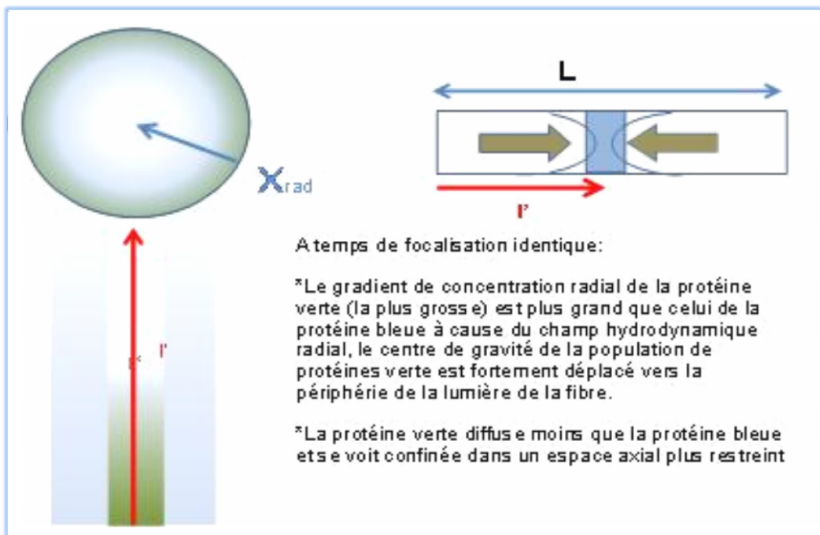


Figure 4: Mode brownien et focalisation en HF5. Une focalisation axiale différentielle ?

différentes.

a) Les équations de diffusions et l'élargissement de bande.

Si l'on analyse les équations d'élargissement de bande en HF5, on remarque que l'élargissement de la bande de chaque protéine, mono-disperse dans des conditions d'injection idéale peut s'exprimer par l'équation suivante

$$\frac{N}{tr} = \frac{tr}{\sigma_t^2} = \frac{Ucr^2}{4D} \quad (11)$$

Il est possible de tracer en fonction du temps de focalisation, les courbes N/Tr pour l'Albumine et la Ferritine dont les résultats sont présentés dans la figure suivante

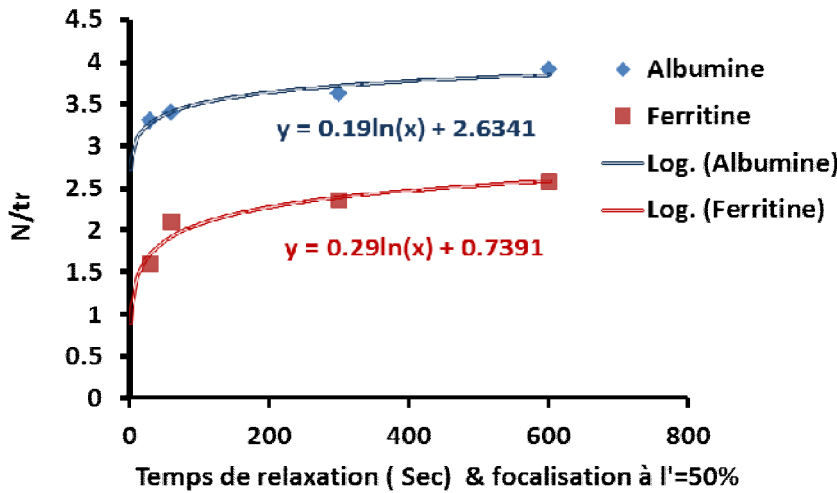


Figure 5 :

**Nombre de plateaux théoriques à l'=50%**

Note les courbes de tendance logarithmiques permettent d'interpoler les valeurs de N/tr à des valeurs de temps de relaxation proche de zéro mais à la position l' ce qui est irréalisable théoriquement.

A chaque valeur de temps de relaxation on obtient on peut calculer un rapport de ces deux valeurs de N/tr qui selon l'équation 11 doit rester constante. Ce n'est pas ce qui observé expérimentalement. L'origine de cette différence ne peut être attribuée à la polydispersité.

$$F_{\text{radial}} = 0.00266 \text{ cm}^3$$

$$U_{rc} = 7.1 \cdot 10^{-4} \text{ cm/s}$$

L'interpolation des courbes de tendance pour un temps de relaxation de l'ordre de 1 à 5 secondes permet de calculer les rapports de rapport N/tr( albumine) sur N/tr( ferritine) on remarque alors très simplement que ce rapport est de l'ordre de 0.41 pour les trois premières secondes. Si l'on analyse ce rapport à la lumière de l'équation 11 on s'aperçoit qu'il est directement corrélé aux coefficients de diffusion des deux protéines. Si la valeur du coefficient D est difficile à être déterminée expérimentalement, il existe une corrélation entre ces valeurs de D et le poids moléculaire des protéines. On admet généralement que D est de la forme suivante :

$$D = A(PM)^x \quad (12)$$

Avec A et x des variables qui dépendent de l'environnement, x est voisin de 0.5 en général. On considérera dans ce rapport que pour la ferritine et l'albumine les valeurs de A sont semblables et le ratio déterminé permet de calculer x puisque les équations 11 et 12 conduisent à la conclusion suivante :

$$\frac{\frac{N_{\text{albu}}}{tr_{\text{albu}}}}{\frac{N_{\text{ferritin}}}{tr_{\text{ferritin}}}} = 0.41 = \frac{D_{\text{ferritin}}}{D_{\text{albu}}} = \left[ \frac{440000^x}{67000^x} \right] \approx \frac{\sqrt{440000}}{\sqrt{67000}}$$

D'un point de vue pratique, on remarque qu'il y a une bonne corrélation en début de focalisation axiale à la position l'. Ce résultat impose une précision importante c'est que l'hypothèse de la relaxation radiale soit établie. On discrimine donc ici les relaxations. La détermination de A est facilitée par les données bibliographiques, D'où viendrait alors cette augmentation des rapports ?

Si l'on considère l'inverse du nombre de plateaux théorique on obtient dans un cas d'élution idéale la formule suivante

$$\frac{1}{N} = \frac{4D}{Ucr^2tr} \quad (13)$$

Avec Urc la vitesse linéaire du champ radial (débit divisé par la surface interne de la fibre). Donc Si Ucr est constant, le rapport 1/N pour un volume donné injecté (considéré généralement comme négligeable devant celui de la colonne) permet de calculer le coefficient de diffusion de la protéine.

Si l'on dispose de cette valeur de coefficient de diffusion on pourra alors calculer un paramètre dont la dimension sera homologue à celle du coefficient de diffusion à partir de la formule suivante dans le cas d'élution non idéale comme lors de l'influence du volume d'injection:

$$\frac{1}{N} - \frac{4D}{Ucr^2tr} = \frac{4D'}{Ucr^2tr} \quad (14)$$

Si on pose l'hypothèse de protéines peu polydisperses et dans le cas de séparations idéales pour chaque protéine éluee en HF5 la valeur D' sera très proche de zéro et surtout constante quel que soit le temps de focalisation à la position l'. Si cette valeur s'avère négative on peut considérer ce signe comme un indice pertinent de l'efficacité de cette focalisation.

Avec 
$$D' = \left[ \frac{1}{N} - \frac{4D}{Ucr^2tr} \right] \frac{Ucr^2tr}{4} \quad (15)$$

Si pendant le temps de focalisation le volume occupé par la molécule dans la zone d'injection est constante, cette valeur D' sera indépendante du temps de focalisation, si cette valeur D' diminue c'est qu'il existe un phénomène de « focalisation » amenant à une diminution de la contribution à la diffusion causée par la largeur initiale de la bande de molécule. A partir des données issues de la figure 5 il est possible de définir le tableau suivant et de calculer D' pour l'albumine et la ferritine, en considérant à partir des données de la littérature : D albumine = 7 .10<sup>-11</sup> et D ferritine=3.5 .10<sup>-11</sup>

Temps de relaxation	D' albumine X 10 <sup>-11</sup>	D'ferritine X 10 <sup>-11</sup>
30 Sec	-6.51	-0.0073
60 sec	-6.56	-0.28
300 sec	-6.55	-0.36
600 sec	-6.58	-0.4

Table. 1 Les valeurs calculé pour le D albumine et le D Ferritin a partir des données expérimentales de la figure 5

On remarque que la différence de contribution est d'un facteur de 10 et que la molécule qui diffuse le moins est aussi associée à une contribution très réduite. La valeur négative de  $D'$ , sa constance dans le cas de l'albumine et sa forte diminution dans le cas de la ferritine sont les marqueurs clairs d'une différence marquée du volume occupé par les deux molécules au moment du début de l'élution.

### Conclusions :

***A partir d'un simple prototype construit au laboratoire des séparations efficaces ont été obtenues pour des espèces macromoléculaires.*** HF5 entre dans le domaine des nano-séparations et ce chapitre montre bien que le mécanisme de relaxation/focalisation apparaît complexe mais porteur de remarquables potentiels en terme d'optimisation des séparations. ***On dispose maintenant d'une colonne dont la longueur de séparation peut être variable ( $l'$ ) et dont les volumes d'injections peuvent être modifiés in situ et différentiellement.***

## ARTICLE 2

### **Flow and stop flow elution of proteins in hollow fiber field flow fractionation systems.**

Tayssir Ibrahim<sup>1,3</sup>, Daniel Daugeron<sup>2</sup>, Serge Battu<sup>1</sup>, Issa-Ali Moustafa<sup>3</sup>, Philippe Cardot<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, EA 3842 « Homéostasie cellulaire et pathologies », Université de Limoges, Institut 145 GEIST, 2 rue du Dr Marcland, 87025 France Cedex

<sup>2</sup> IUT -Université Clermont 1, BP 86, 63172 Aubières Cedex, France

<sup>3</sup> Chemistry Dept, Université ALBA'ATH, Homs, Syria

\*Corresponding author: Prof. P. Cardot; Tel: +33 5 55 43 58 57; Email: [philippe.cardot@unilim.fr](mailto:philippe.cardot@unilim.fr)

#### **Abstract:**

Proteins are separated by Field Flow Fractionation (FFF) techniques, according to a mechanism described as “normal” or “Brownian”. In that elution mode, a primary relaxation step is performed and allows establishing a pseudo equilibrium convection diffusion stage which is at the origin of sample components retention. In a second step, elution is performed. In the case of the FFF sub-technique described as Hollow Fiber Flow Field Flow Fractionation (HF5), the position of that primary relaxation step is rather difficult to observe. It is therefore necessary to determine, at the end of the primary relaxation step, the effective position of the sample start ( $l'$ ) within the column length ( $L$ ). In that purpose a double sample injection is proposed. The first one is a flow injection of the sample to be analyzed whose profile allows determining the effective dimensions of the fiber under the field induced pressure and particularly the “effective fiber radius dimension”, the most critical parameter in HF5. Once that determination is effective, a classical stop flow/focalization procedure of the same sample is performed and properties of the elution profile are then used to determine the effective position of the sample during focalization in the fiber. This procedure was confronted in experiments using very different probes and applied to the separation of proteins.

**Key words:** Field Flow Fractionation, HF5, normal mode, focalization position, protein separations.



# CHAPITRE 3

**Chapitre 3 : Applications des instruments des méthodologies HF5 développées dans les deux premiers chapitres à la séparation de protéines et au diagnostic/caractérisation des agrégats.**

Ce chapitre présente les résultats obtenus dans le cadre de l'investigation des systèmes HF5 construits dans le premier chapitre et dont certaines propriétés ont été étudiées dans le second chapitre, grâce aux travaux menés dans ces deux premiers chapitres nous disposons de fibres dont le rayon intérieur est potentiellement adapté à la séparation des protéines, et qui sont insérées dans un système dont on maîtrise à la fois les volumes de connexion ainsi que les flux mis en œuvre. L'instrumentation et les méthodologies développées dans les précédents chapitres sont maintenant maîtrisées (focalisation: position dans la colonne et temps, détection). L'objectif de ce chapitre est double, il consiste à se donner les moyens de comparer les résultats de nos séparations avec celles de la littérature puis d'envisager des applications ou la mise en place de méthodologies particulières pour mettre en évidence quelques résultats originaux ou peu soulignés dans la littérature.

**1) Quelques paradoxes liés à la phase mobile et au concept de focalisation relaxation en mode brownien**

Classiquement on admet en FFF que les espèces éluées en mode brownien ne peuvent donner des profils bien individualisés que lorsque un mécanisme de relaxation primaire a été mis en œuvre, dans certaines conditions il est possible que la cinétique de relaxation axiale durant le temps de résidence dans la colonne conduit à l'élué de profils individualisés. Peu de résultats publiés présentent, pour le mode brownien de telles conditions. La figure suivante montre que lorsque une protéine est éluée dans un solvant type eau, environnement non salin à force ionique très faible et pH légèrement acide, l'albumine se comporte de façon analogue quelque soit le mode d'injection relaxation/focalisation ou non. On remarque que les profils d'élué sont similaires et que seules sont modifiés les fractions éluées retenues ou non. Un tel type de résultat ne s'est encore jamais retrouvé dans la littérature. Ce type de résultat montre clairement l'intérêt des méthodes HF5 en FFF puisque à cause de la dimension réduite du diamètre du canal les distances maximales parcourues par les protéines radialement sont faibles au regard des parcours qu'elles auraient à réaliser dans des conditions analogues comme dans le cas des méthodes dites de FFF asymétriques ou électriques.

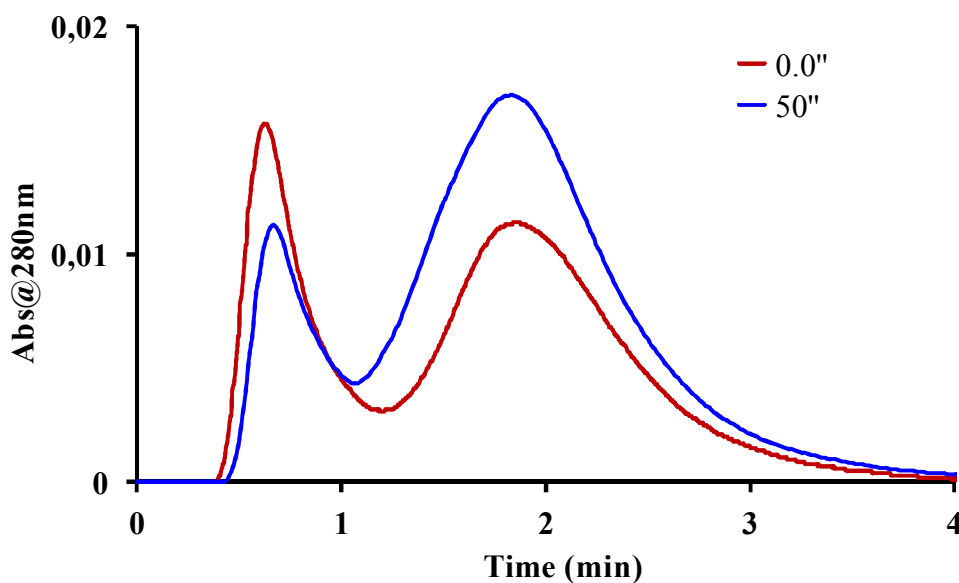
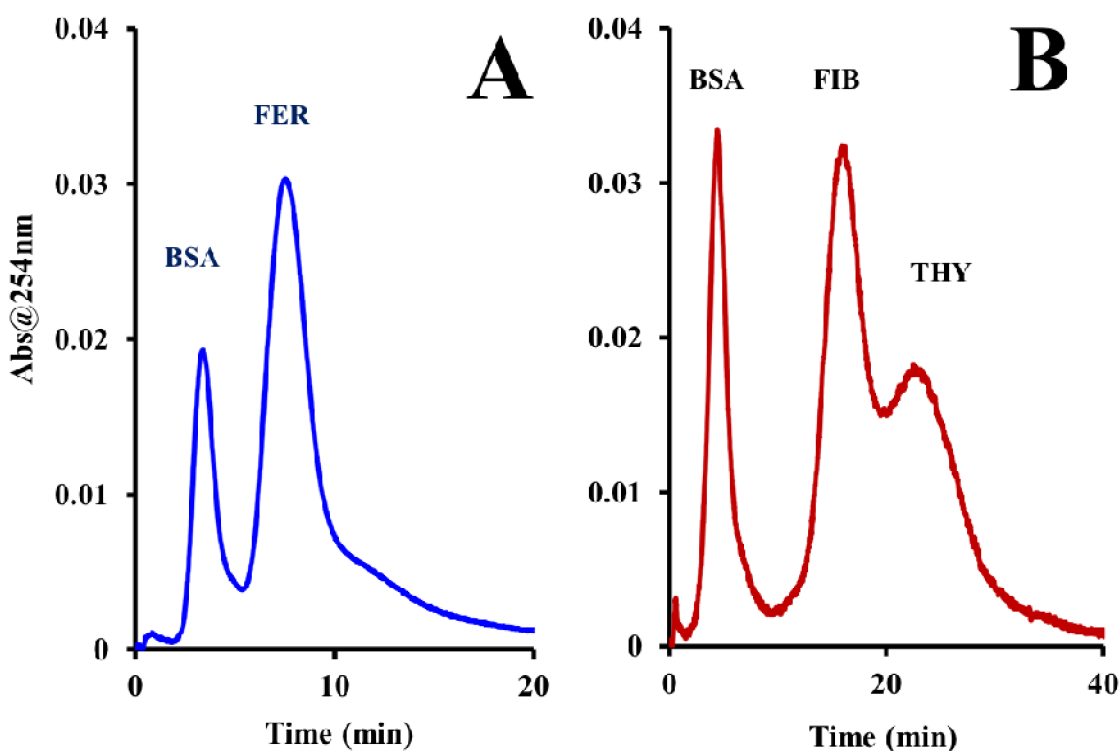


Figure.1 Phase mobile : H<sub>2</sub>O, condition d'élué identique Le profil rouge correspond à l'injection sans relaxation le profil bleu correspond à une relaxation 50% de 50 secondes

## 2) Séparation des protéines:

Quatre protéines de caractéristiques très différentes ont été éluées dans le système HF5 et les résultats sont présentés dans les fractogrammes de la figure ci dessous. On remarque que les sélectivités obtenues sont du même ordre que celles obtenues en chromatographie de filtration de gel. L'efficacité de ces séparations s'avère largement équivalente à ce que l'on rencontre en GPC. Par contre la maîtrise de la position et du temps de focalisation radial associés au concept de focalisation axial génère un potentiel remarquable d'optimisation. En effet, une combinaison adéquate focalisation (temps et position) avec un champ externe judicieusement choisi permet de limiter le temps de résidence de la protéine tout en générant une rétention suffisante permettant des séparations d'une certaine efficacité. En chromatographie plus la colonne est longue meilleur le potentiel de sélectivité, on remarque dans ce chapitre qu'il semble exister en HF5 un comportement différent autorisant l'emploi de colonne de longueur réduite en effet une réduction de près de 50% de la longueur se traduit par une diminution d'efficacité ou de résolution inférieure à 15% avec des conséquences importantes.



**Figure.2 Application sur la mode normal, séparation de mélange des protéines par HF5**

A; ( BSA 2g/L and FIR 3g/L), flux( $F_{in}=0.22$ ,  $F_{rad}=0.16$ ,  $F_{rad}=0.06$ )ml/mn, champ appliqué (28ax/72rad), volume d'injection 2.5 $\mu$ l , HF5 « 0.5cm, 0.5mm » ID (L x ID), focalisation 5mn

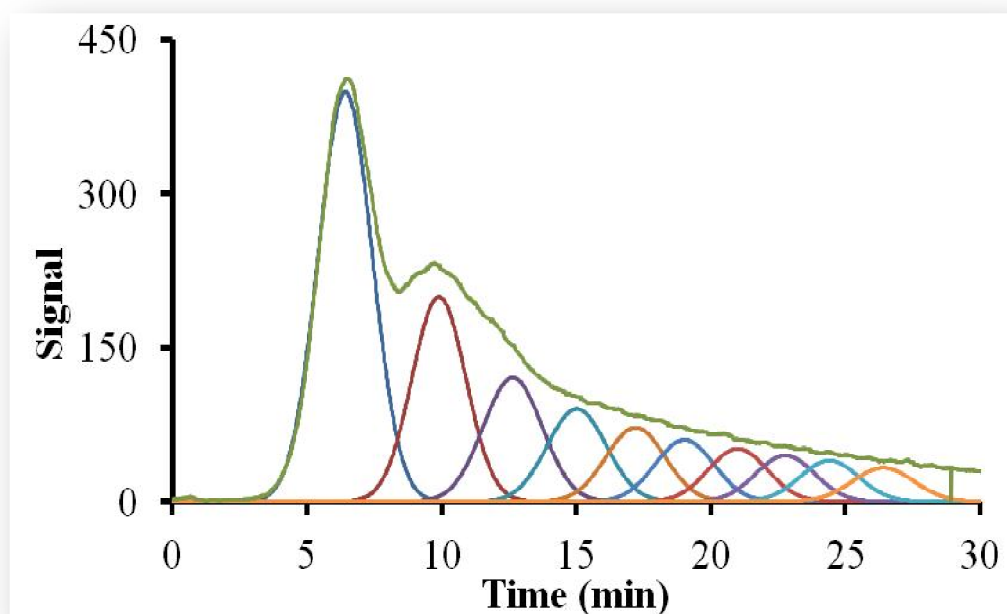
B; Mélange de (BSA2g, Thy2gr, Fib2gr), flow ( $F_{in}=0.28$ ,  $F_{rad}=0.2$ ,  $F_{rad}=0.08$ )ml/mn, « 23.5cm, 0.5mm » (L x ID), focalisation 15min, toutes les échantillons sont préparés dans la phase mobile ,point de focalisation 50%.

La Figure (2. A) ci dessus présente des conditions d'éluion ou de protéines de caractéristiques très différentes en terme et de masse moléculaire et de forme, on remarque de la séparation est complète en quelques minutes avec un temps de relaxation relativement faible puisqu' il intervient pour à peine 10% du temps total de séparation. Dans le cas de la figure (2.B) trois

protéines couvrant une gamme très large de taille ont été élués puisque entre thyroglobuline et albumine on retrouve un facteur dix en termes de taille. Il devient possible alors de d'évaluer la fonction taille en fonction du temps de rétention comme présentée dans les pages suivantes. La fonction de calibration correspond a une fonction en puissance ce qui se traduit sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage par une sensibilité temps/rétention presque constante une différence marquée avec les courbes d'étalonnage présentées en GPC surtout a voisinage des masses limites dites « diffusion ou d'exclusion ». Cette remarque indique quelles procédures de calibration de taille en fonction de la rétention s'avèrent plus robustes qu'en GPC. Ces points s'éloignent des objectifs initiaux de la thèse présentée, mais portent un potentiel important en terme de validation de méthodes et de fidélité de la détermination de la masse a partir de la rétention. On notera a cette occasion qu'il est possible d'obtenir des rétentions /séparation sur des fractions très courtes des colonnes HF5 (moins de 5cm) ce qui se traduit par des volumes d'élutions de l'ordre de quelques microlitres compliquant le choix d'un détecteur approprié. Ces techniques entrent dans le monde des micro/nano séparations. Ces résultats montrent que le système développe dans le cadre de ce travail est aussi efficace que ceux développés par les autres groupes ou même les quelques industries d'instrumentations concernées.

### 3) Le cas particulier des agrégats

Il est possible par voie chimique de provoquer la formation de polymères de protéines, le protocole est décrit dans le rapport. Par contre à partir des profils d'élution et des méthodes de calibrage temps de rétention/ masse moléculaire , il est possible de prévoir a la fois le temps d'élutions des polymères ainsi que d'évaluer leur élargissement de bande, ainsi, il est possible d'imaginer des profils d'élution de tels séries de polymères et d'en calculer l'enveloppe de convolution telle que présenté dans la figure suivante, dans laquelle on a modélisé la distribution de polymères d'albumine depuis le monomère jusqu' au décamère, il va de soi qu' une modélisation a des polymères supérieurs reste facile a réaliser.



**Figure.3** Courbes théoriques estimées des profils de rétention de l'albumine et de ses polymères (du stade dimère jusqu'au stade décamère)

Une procédure de déconvolution à partir d'un profil expérimental au sens des moindres carrés permet de déterminer une enveloppe théorique qui correspond à celle obtenue expérimentalement. Cette procédure a été appliquée lors de l'élution de polymères d'albumine comme le montre la figure (4). Ce type de méthodologie permet de prévoir la distribution de polymères élués à partir d'un processus de déconvolution. Ainsi, bien que limité à 6 types de polymères, le signal reconstruit à partir d'une série de proportions de différents polymères correctement déterminés permet de simuler le fractogramme expérimental. Selon notre protocole, la proportion de monomères est de 39%, de dimères 23%, de trimères (12%) et d'ordres supérieurs quadri, penta et hexa... (10, 8, 6, 4, ..%) Bien évidemment, une détection appropriée de type MALLS aurait été d'une grande aide. Néanmoins, on remarque que cette corrélation par analyse de déconvolution donne une image assez réaliste du profil obtenu expérimentalement.

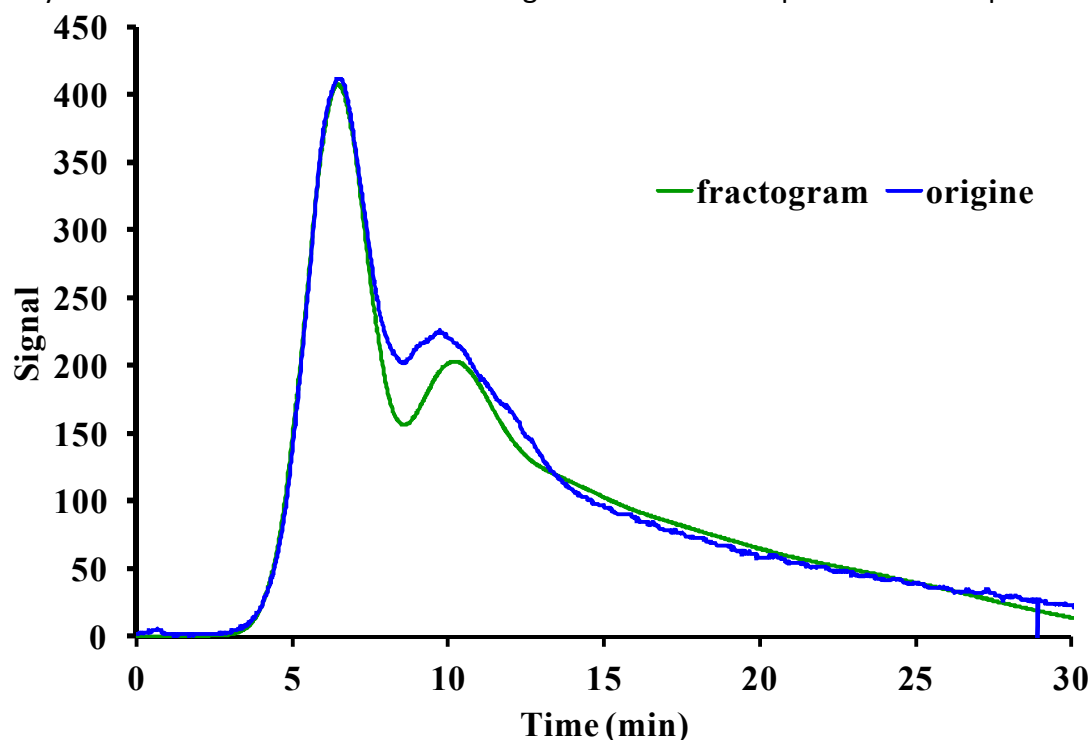


Figure.4 : Agrégats de l'Albumine et la fractogramme de la déconvolution

### Conclusions

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent que les méthodes HF5 développées au laboratoire sont aussi performantes que celles développées par d'autres équipes avec parfois une bien plus grande expérience. Ces travaux sont pionniers en France comme le montre la publication du premier chapitre. Plus important encore, la possibilité de calibration avec la mise en évidence précise de polymères de protéines et leur caractérisation indirecte placent ces techniques HF5 dans un contexte extrêmement concurrentiel en terme de contrôle de qualité. De nombreuses applications restent possibles en particulier si des structures types supramoléculaires doivent être étudiées comme celles résultant des interactions protéines-acides nucléiques. On remarque à cette occasion que le caractère "capillaire" de ces techniques leur ouvre un potentiel remarquable lié au respect de l'intégrité structurale de ces structures supramoléculaires.

# ARTICLE 3

## Conclusion Générale

Le développement de nouvelles méthodes instrumentales analytiques et caractérisée par trois étapes dont les images et les perceptions peuvent sembler opposées. En effet, une première étape longue ingrate et difficile consiste à construire le système instrumental. Cette construction passe par plusieurs niveaux: prototypes de faisabilité (bricolage) acquisition d'un savoir-faire particulier non formalisé par des procédures ou publications, bien qu'aujourd'hui l'emploi systématique de la photographie ou de la vidéo numérique permet l'acquisition, le maintien ou le transfert d'un grand nombre de notions « implicites » ou liées à des savoir-faire. L'intérêt scientifique et philosophique d'une telle démarche est d'aborder comme pionnier des territoires scientifiques vierges où jusqu'ici explorés par une infime minorité de la communauté scientifique. Une des conséquences immédiates est le développement d'une philosophie d'entraide ou de coopération de ces groupes « initiateurs » ou pionniers. Par contre, cette situation est très peu prisées surtout à une époque où communication /savoir / savoir-faire / et faire-savoir sont devenus des sciences à part entière ou pire encore, les fourches caudines de la réalisation de certains projets.

A partir donc de moyens simples ou choisis comme tels, la fabrication de ces prototypes, leur intégration dans un système d'exploitation et l'exploration de leurs propriétés devient alors une activité provocatrice dans laquelle « les forces de l'imagination et de l'originalité dépassent celle des moyens ». Cette étape reste l'incubateur nécessaire à la maturation des idées. Le premier chapitre de cette thèse représente bien cette étape de fabrication, d'expérimentation et dans ce travail de mise en exergue de certains effets au mieux sous-estimés, au pire évacués, comme le montre l'étude sur la relaxation des globules rouges dans différentes conditions d'osmolarité.

La seconde étape d'un travail de développement instrumental est l'évaluation de la corrélation instrument /applications, donc dans ce cas de la corrélation fibre / séparations. Cette évaluation passe par le développement d'une étape de formalisation des effets et de leur description. Elle nécessite des investissements intellectuels lourds, en matière de mathématiques, physique et sciences de l'ingénieur. A la suite de l'étape complexe de prototypage, la mise en place et le réglage de modèles corrélés plus ou moins empiriquement aux résultats expérimentaux reste la source de profondes satisfactions. Deux exemples particulièrement spécifiques de cette étape sont développés dans le cadre de ce travail. Le premier dans le chapitre 2, où la méthode proposée de détermination du point de focalisation, s'avère particulièrement pertinente malgré une série d'hypothèses restrictives. En effet malgré le grand nombre d'hypothèses sur le comportement hydrodynamique (rayon effectif, déformabilité, homogénéité de structure) de la fibre, les résultats expérimentaux s'avèrent remarquablement corrélés au modèle, au prix simplement de quelques précautions dans le mode de collection des données (sommet du pic au lieu du centre de gravité). Le second exemple est représenté par l'analyse du profil d'élution de la protéine albumine et de des polymères présenté dans le chapitre 3, un modèle de convolution du signal albumine et des signaux de ses polymères a permis de trouver à posteriori la composition d'une solution complexe, et ce résultat obtenu en fin de procédé de développement préjuge bien de la robustesse instrumentale et méthodologique de ce travail. Les premières publications sont réalisées, les modèles établis et publiés ou publiables, l'intérêt de la communauté scientifique se transforme et la phase de communication prend alors place.

Le développement réalisé, le prototype et le système de séparation bien en place, l'expertise appuyée par un savoir-faire unique permet la mise place de la phase d'exploration des applications potentielles de la méthode, pas de concurrence ; cet outil devient |sans prix | il sort d'un contexte de compétition et permet alors l'exploration effective, rentable de nouveaux domaines scientifiques. Cette étape, initiée par l'important travail sur les mécanismes de focalisation réalisé dans le chapitre 2, ou encore d'élution de cellules comme dans le chapitre 1 trouve son expression dans le chapitre 3 ou quelques notions importantes sont mises en évidence. Les prototypes « UNILIM » sont au niveau des standards (coopératif) internationaux, dans le domaine comme le montrent les séparations de protéines du chapitre 3. Plus encore, la démonstration de la pertinence des méthodes HF5 dans l'isolation et la caractérisation des agrégats protéiques ouvre un large panel d'applications pratiques.



## Anex 1: méthode de calcul des paramètres de pics par Mathematica

### Lire les Pics en 100 mV & 3Hz et Traiter un Pic Par la Méthode des moments

AnalChem N°44, Volume 11, Sept 72, p1733

<< Statistics`

## Chercher le Fichier et Vérifier que le fichier est uniquement en valeurs positives

```
Directory []  
FileNames []  
SetDirectory ["C:\Documents and Settings\HFFFFFF\Mes documents\datamathematica\Data"]  
FileNames []
```

C:\Documents and Settings\HFFFFFF\Mes documents\datamathematica\Data

C:\Documents and Settings\HFFFFFF\Mes documents\datamathematica\Data

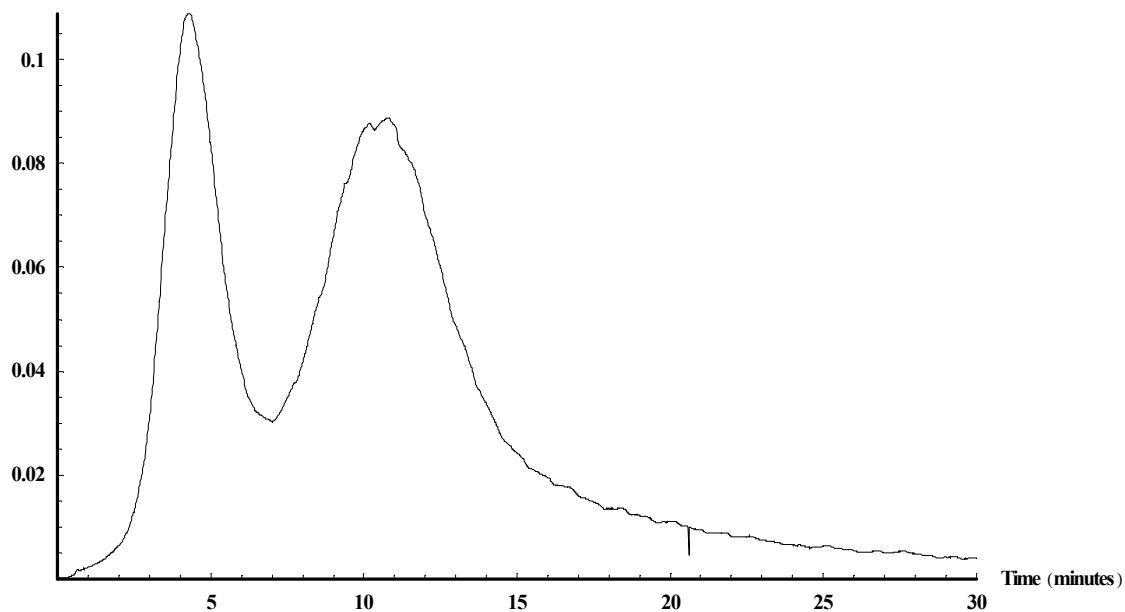
## Charger le Fichier

```
Lefichier = "syr084 .txt";  
Lcanal = 23.5 ;  
SecCanal = 0.025 ;  
Débit = 0.1 ;  
Null  
databrut = ReadList [Lefichier , {Real , Real }];  
temps = Map [#1[[1]] &, databrut ];  
Signal = Map [#1[[2]] &, databrut ];  
tempsmin = Min [temps ];  
tempsmax = Max [temps ];  
Signalmin = Min [Signal ];  
Signalmax = Max [Signal ];  
Lfich = Length [databrut ];  
$DefaultFont = {"Times -Bold", 16};  
(*Print [databrut ];*)
```

## Visualiser le Fichier

```
FigData = ListPlot [databrut , AxesLabel → {"Time (minutes)", "A.U.@254nm"}, PlotRange → {{0, tempsmax }, {Signalmin , Signalmax }},  
PlotJoined → True, AxesStyle → Thickness [0.005], PlotStyle → {Thickness [0.002], RGBColor [0, 0, 0]};  
Print ["début de l'abscisse à =", tempsmin ];  
Print ["fin de l'abscisse à =", tempsmax ];
```

AU@254nm



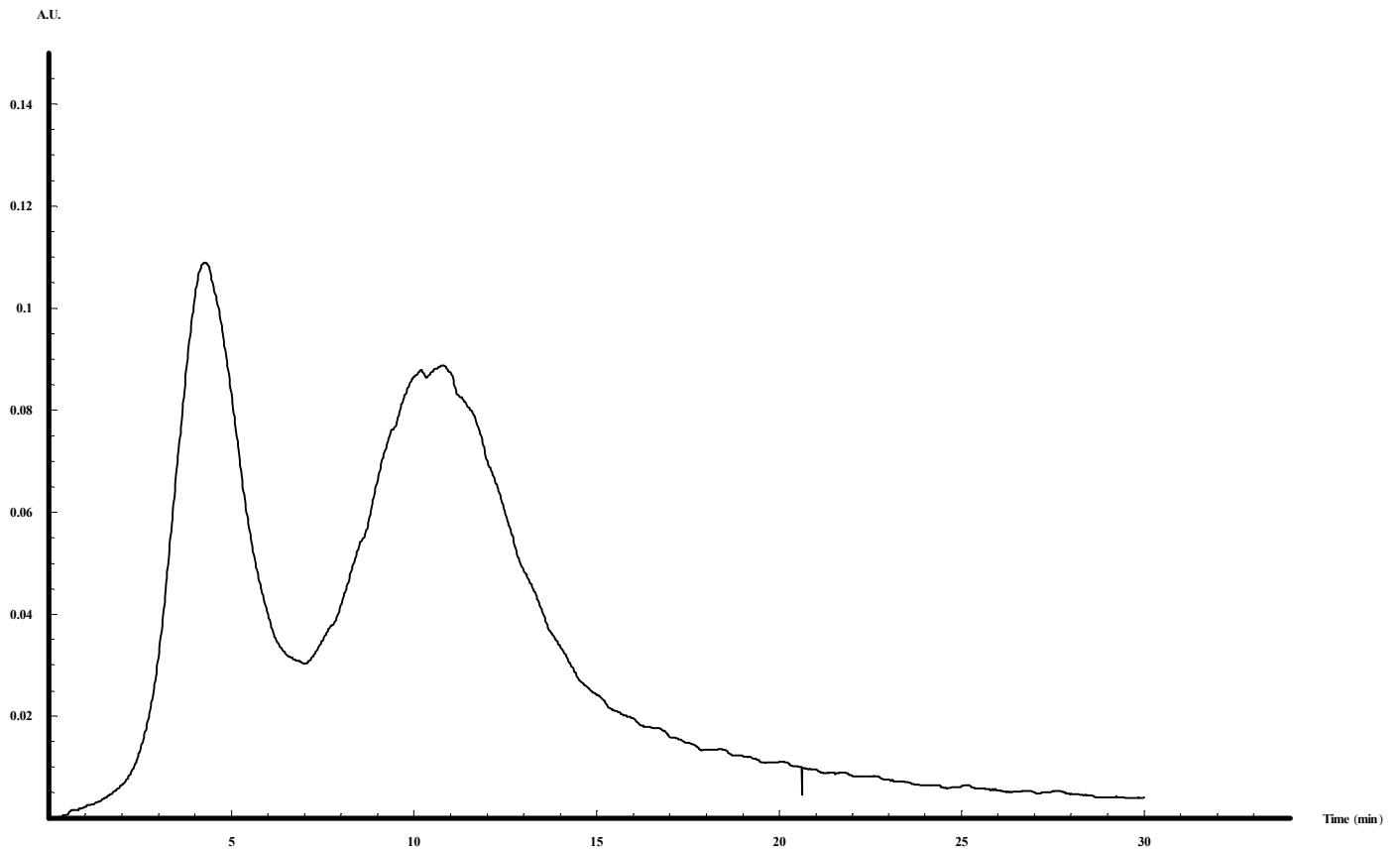
début de l'abscisse à =0.

fin de l'abscisse à=30.

## Zoomer Sur la zone d'intéret Réaliser une translation ( top départ)

Pour choisir l'origine des temps du fichier placer le curseur sur le graphique ci dessus, cliquer une fois et appuyer sur les touches ctrl alt e même temps et placer le curseur qui apparaît sur la courbe. Voir dans le carre inferieur gauche de la fenetre le parametre choisi ( valeur entiere correspondant à un point du fichier). Si départ différé définir le start et faire la translation. Les variables à paramétrer sont en rouge.

```
Clear Translate ;
Clear data ;
Clear EndZoom ;
Translate = 0;
EndZoom = 33.99 ;
PointMini = 0;
PointMaxi = 0.15;
Clear VisFichTrans ;
data = databout ;
For [i=0, i<Lfich, i++; data[[i, 1]] = data[[i, 1]] - Translate ];
temps = Map[#1[[1]] &, data];
Signal = Map[#1[[2]] &, data];
(*Print [temps];*)
$DefaultFont = {"Times-Bold", 16};
VisFichTrans = ListPlot [data, AxesLabel -> {"Time (min)", "A.U."}, PlotRange -> {{0, EndZoom}, {PointMini, PointMaxi}},
  PlotJoined -> True, AxesOrigin -> {0, PointMini}, AxesStyle -> Thickness [0.005], PlotStyle -> {Thickness [0.002], RGBColor [0, 0, 0]}]
tempsmin = Min [temps];
tempsmax = Max [temps];
Print [" début à ", tempsmin, " minutes fin à ", tempsmax, " minutes "];
```



- Graphics -

début à 0. minutes fin à 30. minutes

**Choisir a partir du graph ci dessus les bornes du profil a  
traiter par la methode des moments**

Preparation des donnees pour le calcul des moments par  
la methode du point le plus bas

Puis

On calcule maintenant les moments et tous les parametres du pic

```

Clear Borminf ;
Clear Bormsup ;
Clear Integration ;
Clear SignalIntegMin ;
Clear SignalInteg ;
Clear Mzéro ;
Clear Mun ;
Clear Mdeux ;
Clear Mtrois ;
Clear Mquatre ;
(* Note Borminf doit être sup à début et Bormsup doit être inf à fin*)
Borminf = 7.0 ;
Bormsup = 17.9 ;
For [i = 1, data [[i, 1]] < Borminf , i++; j = i];
For [i = j, data [[i, 1]] < Bormsup , i++; k = i];
debpt = j; finpt = k;
Integration = Take [data , {j, k}];
(*Print [Integration ] ;*)
SignalInteg = Map [#1[[2]] &, Integration ];
(*Print [SignalInteg ] ;*)
SignalIntegMin = Min [SignalInteg ];
SignalIntegMax = Max [SignalInteg ];
SignalInteg = SignalInteg - SignalIntegMin ;
base = SignalIntegMin ;
(* note integration par rapport au point le plus bas du signal dans la section *)
Mzéro = 0;
For [i = 0, i < Length [Integration ] , i++; Mzéro = Mzéro + (Integration [[i, 2]] - base)];
Print [Mzéro ];
Mun = 0;
For [i = 0, i < Length [Integration ] , i++; Mun = Mun + (Integration [[i, 2]] - base) * Integration [[i, 1]]];
Print [Mun ];
Mdeux = 0;
For [i = 0, i < Length [Integration ] , i++; Mdeux = Mdeux + (Integration [[i, 2]] - base) * (Integration [[i, 1]] - Mun / Mzéro) ^2];
Print [Mdeux ];
Mtrois = 0;
For [i = 0, i < Length [Integration ] , i++; Mtrois = Mtrois + (Integration [[i, 2]] - base) * (Integration [[i, 1]] - Mun / Mzéro) ^3];
Print [Mtrois ];
Mquatre = 0;
For [i = 0, i < Length [Integration ] , i++; Mquatre = Mquatre + (Integration [[i, 2]] - base) * (Integration [[i, 1]] - Mun / Mzéro) ^4];
Print [Mquatre ];
Skew = N[ $\frac{Mtrois}{\sqrt{Mdeux}^3}, 3$ ]; Excess = N[ $\frac{Mquatre / Mzéro}{(Mdeux / Mzéro) * (Mdeux / Mzéro)} - 3, 3$ ];
Print [Skew ];
Print ["fin moment "];
i = 1;
While [SignalInteg [[i]] < Max [SignalInteg ] , i = i + 1];
Vsom = i + 1;
Print ["index sommet ", Vsom ];
SSommet = Take [Integration , {Vsom - 2, Vsom + 2}];
FuncSom [x_] = Fit [SSommet , {1, x, x^2}, x];
Vals = Solve [D[FuncSom [x], x] == 0, x];
Valsommet = N[1 * x /. Vals [[1]]];
data [[j, 2]] = -SignalIntegMax / 100;
data [[k, 2]] = -SignalIntegMax / 100;
vardeb = 0;
varfin = 0;
varfin90 = 0;
vardeb90 = 0;
vardeb10 = 0;
varfin10 = 0;

For [i = 1, Integration [[i, 2]] < (Max [SignalInteg ] / 2), i++; vardeb = i - 1];
Print ["vardeb =", vardeb ];
For [i = vardeb + 2, Integration [[i, 2]] > (Max [SignalInteg ] / 2), i++; varfin = i + 1];
Print ["varfin =", varfin ];
Null

```

```

31.4162
358.075
195.78
269.906
3323.89
0.0985277
fin moment
index sommet229
vardeb=69
varfin=379
Clear vardebut90 ;
vardebut = 0;
For [i = 1, Integration [[i, 2]] < (Max [SignalInteg ] / 1.17647 ), i++, vardebut90 = i];

Print ["vardebut90 =", vardebut90 ];
For [i = vardebut90 + 2, Integration [[i, 2]] > (Max [SignalInteg ] / 1.17647 ), i++, varfin90 = i];
For [i = 1, Integration [[i, 2]] < (Max [SignalInteg ] * 0.15), i++, vardeb10 = i - 1];
Print ["vardeb10 =", vardeb10 ];
For [i = vardeb10 + 2, Integration [[i, 2]] > (Max [SignalInteg ] * 0.15), i++, varfin10 = i];
Print ["varfin10=", varfin10];

sd05 = (Integration [[varfin, 1]] - Integration [[vardeb, 1]]) / 2.355 ;
sd09 = (Integration [[varfin90, 1]] - Integration [[vardebut90, 1]]) / 1.14 ;
sd01 = (Integration [[varfin10, 1]] - Integration [[vardeb10, 1]]) / 3.896 ;
trainel = (Mun / Mzero) - Valsommet ;
Print ["tho=", trainel ];
vardebut90=148
vardeb10=1
varfin10=650
tho=0.597791

```

```

Print["Méthode du point le plus bas, Fichier= ", Lefichier];
Print["intégration entre ", data[[j, 1]], " et ", data[[k, 1]], " soit nbre pts=", k-j];
Print["RAPPORT d'ANALYSE DES PROFILS DE PICS"];
Print["Données de Rétention"];
Print["Temps des sommets: moment 1= ", Mun/Mzéro, " minutes,
Mode= ", Integration[[Vsom, 1]], " minutes, Regression Parabolique= ", Valsommet, " minutes"];
Print["Données de dispersion"];
Print["Déviation standard (moments)= ", NumberForm[N[(Mdeux/Mzéro)^0.5], 5],
" minutes, Skew= ", NumberForm[Skew, 1], " , Excess= ", NumberForm[Excess, 3]];
Print["Déviation standard (largeur de pic à 0.5 H) =", sd05, " minutes "];
Print["Déviation standard (largeur de pic à 0.85 H) =", sd09, " minutes "];
Print["Déviation standard (largeur de pic à 0.15 H) =", sd01, " minutes "];

Print["Données quantitatives"];
Print["Aire= ", Mzéro, " Minutes X A.U; Amplitude maximum du signal = ", Max[SignalInteg], " A.U."];
Print["Rapport Aire/Hauteur= ", Mzéro / (Max[SignalInteg] - Min[SignalInteg]), " minutes"];
Print["Nombre de plateaux théoriques (moments)= ",  $\frac{(Mun/Mzéro)^2}{Mdeux/Mzéro}$ , "
HETPmcm =", Lcanal /  $\frac{(Mun/Mzéro)^2}{Mdeux/Mzéro}$ , " cm"];
Print["Nombre de plateaux théoriques (0.15H)= ", ((Valsommet)^2) / sd01^2,
" HETP0.1=", Lcanal / (((Valsommet)^2) / sd01^2), " cm"];
Print["Nombre de plateaux théoriques (0.5H)= ", ((Valsommet)^2) / sd05^2,
" HETP0.5=", Lcanal / (((Valsommet)^2) / sd05^2), " cm"];
Print["Nombre de plateaux théoriques (0.85H)= ", ((Valsommet)^2) / sd09^2,
" HETP0.9=", Lcanal / (((Valsommet)^2) / sd09^2), " cm"];
VisFichCOND = ListPlot[data, AxesLabel -> {"Time (min)", "A.U."},
PlotRange -> {{tempsmin, tempsmax}, {Pointmini - Abs[Pointmini / 10], SignalIntegMax}},
AxesOrigin -> {0, Pointmini - Abs[Pointmini / 10]},
PlotJoined -> True, AxesStyle -> Thickness[0.005], PlotStyle -> {Thickness[0.002], RGBColor[0, 0, 0]};

```

Méthode du point le plus bas, Fichier = syr084.txt

intégration entre 7. et 17.9 soit nbre pts=653

RAPPORT d'ANALYSE DES PROFILS DE PICS

Données de Rétention

Temps des sommets: moment 1= 11.3978 minutes, Mode= 10.8 minutes, Regression Parabolique= 10.8 minutes

Données de dispersion

Déviation standard (moments)= 2.4964 minutes, Skew= 0.1 , Excess= -0.276

Déviation standard (largeur de pic à 0.5 H) =2.19391 minutes

Déviation standard (largeur de pic à 0.85 H) =2.04678 minutes

Déviation standard (largeur de pic à 0.15 H) =2.78063 minutes

Données quantitatives

Aire= 31.4162 Minutes X A.U; Amplitude maximum du signal = 0.089688 A.U.

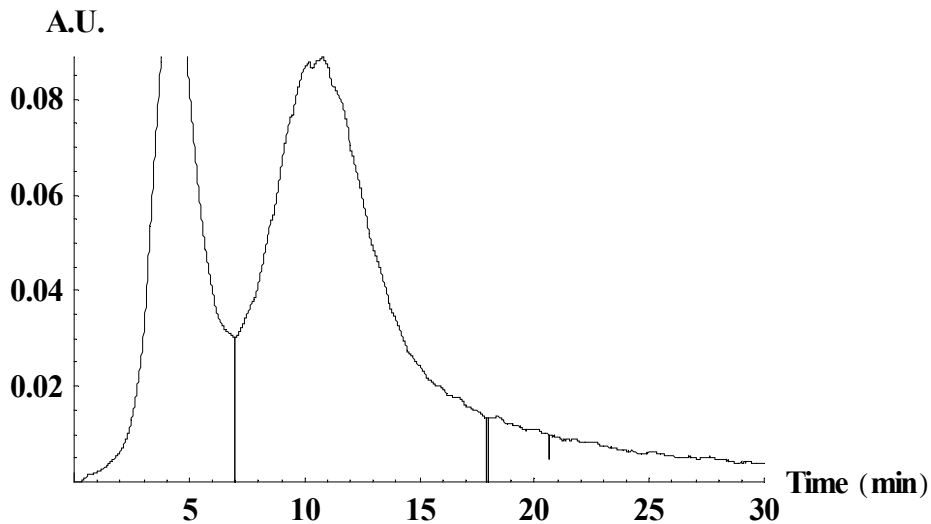
Rapport Aire/Hauteur= 350.283 minutes

Nombre de plateaux théoriques (moments)= 20.8461 HETP<sub>mcm</sub> =1.12731 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.15H)= 15.0856 HETP<sub>0.1</sub>=1.55778 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.5H)= 24.2331 HETP<sub>0.5</sub>=0.969749 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.85H)= 27.8422 HETP<sub>0.9</sub>=0.844042 cm



Null<sup>12</sup>

#### Données quantitatives

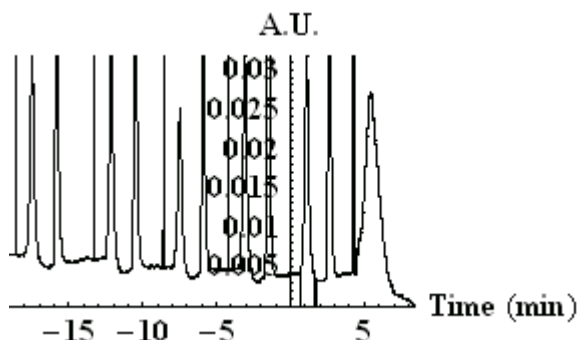
Aire= 1.6596 Minutes X A.U; Amplitude maximum du signal = 0.0284 A.U.

Rapport Aire/Hauteur= 58.4366 minutes

Nombre de plateaux théoriques (moments)= 53.9949 HETP<sub>mom</sub> =1.33346 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.5H)= 56.9746 HETP<sub>0.5</sub>=1.26372 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.85H)= 50.1898 HETP<sub>0.9</sub>=1.43455 cm



Null<sup>12</sup>

#### Données quantitatives

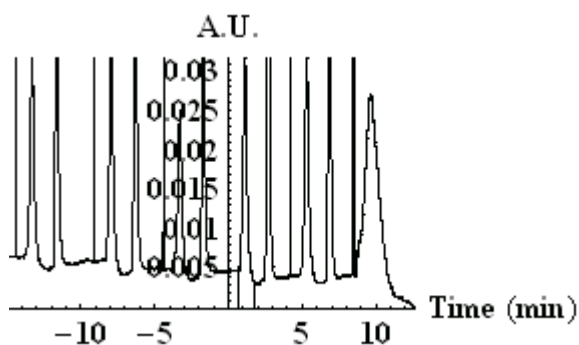
Aire= 1.695 Minutes X A.U; Amplitude maximum du signal = 0.0285 A.U.

Rapport Aire/Hauteur= 59.4737 minutes

Nombre de plateaux théoriques (moments)= 50.426 HETP<sub>mom</sub> =1.42784 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.5H)= 59.3131 HETP<sub>0.5</sub>=1.2139 cm

Nombre de plateaux théoriques (0.85H)= 54.0182 HETP<sub>0.9</sub>=1.33288 cm



**Anex 2** : table des matériels utilisés dans le system de séparation par HF5

Photo	Nom	Référence	Description	couleur
	Fibre creuse	UPF-30	ID: 0,8 mm OD: 1,5 mm	Blanc
	Peek tubing	1544	ID: 0,080" (2mm) OD: 1/8"	naturel
	Fingertight Fittings	6000-255	1/16"	Naturel
	Flangeless Ferrules	P-300	1/8"	Jaune
	ZDV Unions	U-352	1/16"	Métal
	Flangeless Nuts	P-335	1/8"	Naturel
	Crosses	P-723	1/8 "	Naturel
	Capillary peek tubing 1/32" OD	1578	90µm (.0035") IDx5"	Noir
	Fibre creuse	UPF-C-30-4MA	ID: 0,5 mm OD: 0,9mm	Blanc
	Natural peek® tubing	1538	ID: 0,040" (1mm) OD: 1/16"	Naturel
	Orange peek® tubing	1532	ID: 0,015" (0,50mm) OD: 1/16"	orange
	Nut, flangeless	P-206	1/16"	rouge

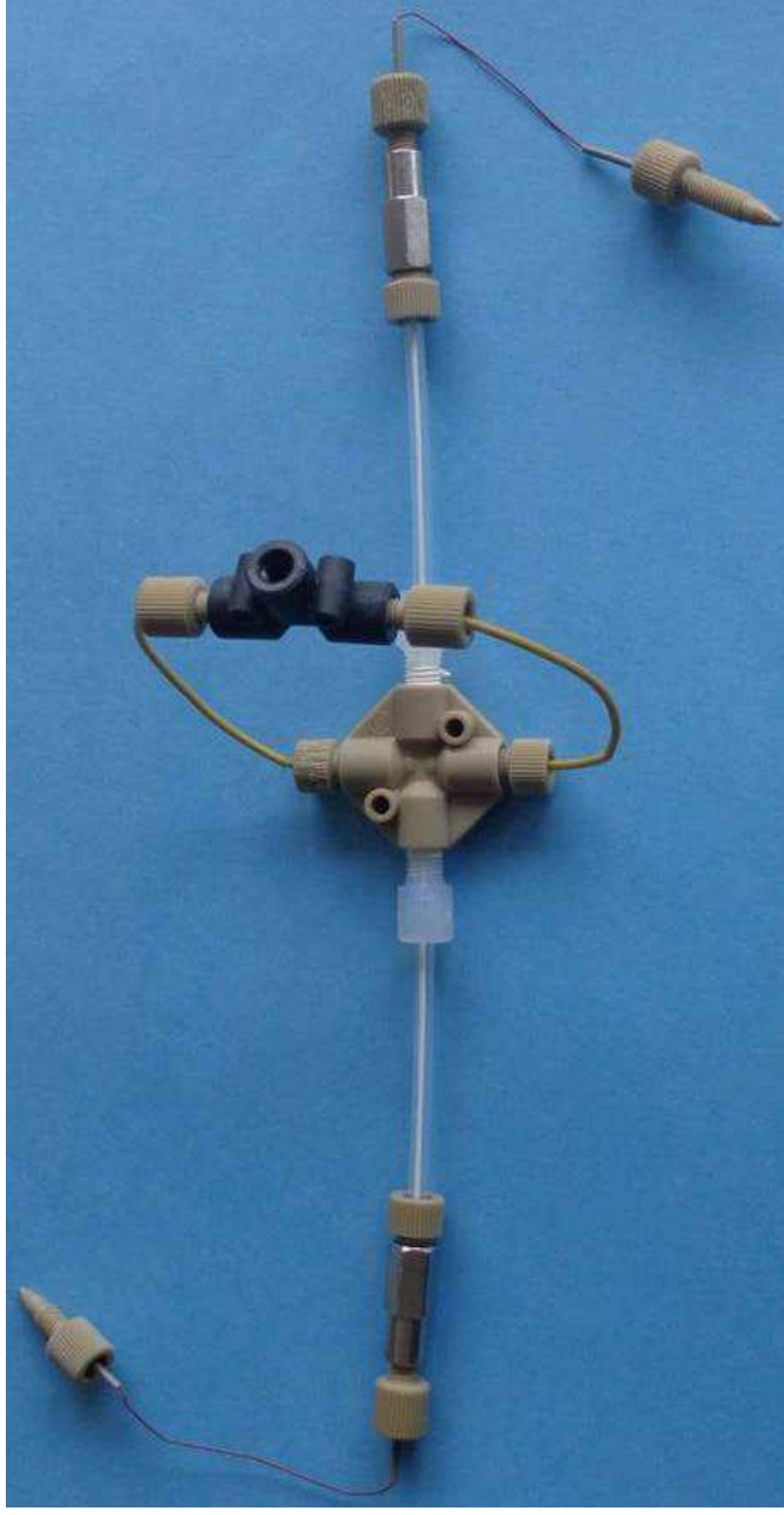


	Standar ZDV union	U-402	thru hole: 0,02" (0,5mm)	métal
	Tee peek®	P-714	Thru hole: 0,040" (1,02mm)	Naturel
	Ferrule Flangeless	P-200	1/6"	Bleu
	Fingertight Fittings	F-120	1/6"	Naturel
	Capillary peek tubing 360 µm (.0145") OD	1571	100µm (.004") IDx5"	rouge
	Seringue 100µl HPLC à aiguille amovible	2600706	(0,72mm/b/51mm) b = aiguille non biseautée	000
	Commutateur de Vanne Rheodyne	MXP7980-000	MXP Série II Nano 6v/2p Titane stator 0.10mm 345Bar maxi	nature
	Vanne manuelle Inox RHEODYNE	7060	7v/6p 1/16" Analytique Raccords 10-32	000
	Adaptateur Microtight PEEK	P-881	rouge 1/16" à 1/32" (avec raccords)	red

<b>TUBE PEEK (PolyEtherEtherKetone = Polyéther éther cétone)</b>				
<b>Jusqu'à 5000 psi, 100°C.</b>				
<b>Compatible tout solvant excepté DMSO, THF et Dichlorométhane (THF avec précaution)</b>				
Diamètre Extérieur	Diamètre Intérieur	Référence	couleur	
1/32"	0,0025" (65µm)	1579XL		
1/32"	0,0035" (90µm)	1578XL		
1/32"	0,005" (125µm)	1576XL		
1/32"	0,007" (175µm)	1577XL		
1/32"	0,008" (200µm)	1575XL		
1/32"	0,009" (225µm)	1580XL		
1/32"	0,010" (0,25mm)	1581XL		
1/32"	0,015" (0,40mm)	1568XL		
1/32"	0,020" (0,50mm)	1569XL		
1/16"	0,0025" (65µm)	1560XL		
1/16"	0,004" (100µm)	1561XL		
1/16"	0,005" (125µm)	1535XL		
1/16"	0,006" (150µm)	1562XL		
1/16"	0,007" (175µm)	1536XL		
1/16"	0,010" (0,25mm)	1531XL		
1/16"	0,010" (0,25mm)	1531BXL		
1/16"	0,015" (0,40mm)	1565XL		
1/16"	0,020" (0,50mm)	1532XL		
1/16"	0,030" (0,75mm)	1533XL		
1/16"	0,040" (1mm)	1538XL		
1/8"	0,062" (1,60mm)	1534XL		
1/8"	0,080" (2,00mm)	1544XL		
<b>TUBE RADEL (polyphenylsulfone) 200°C</b>				
1/16"	0,010" (0,25mm)	1210XL	Naturel	
1/16"	0,020" (0,50mm)	1220XL	Naturel	
1/16"	0,030" (0,75mm)	1230XL	Naturel	
1/8"	0,062" (1,6mm)	1235XL	Naturel	
<b>TUBE PFA (PerFluoro alkoxy Alcane = TEFLON)</b>				
1/16"	0,020" (0,50mm)	1512XL	Naturel	
1/16"	0,030" (0,75mm)	1514XL	Naturel	
1/16"	0,040" (1,00mm)	1507XL	Naturel	
1/8"	0,062" (1,55mm)	1509XL	Naturel	

## Méthodes de fractionnement flux force en fibre creuse (HF5)

### Hollow fiber flow-field flow fractionation



Exemple de colonne utilisée dans cette étude pour la séparation de protéines, fibre commerciale à 0.5mm ID, 30 kD de Cut-Off





### ***Résumé.***

Le développement d'un prototype de colonne de séparation en fibre creuse exploitant les concepts de fractionnement par couplage flux force à champ hydrodynamique asymétrique a été réalisé à partir de composants disponibles sur le marché. L'outil biocompatible, est intégré à une unité de chromatographie liquide où il remplace les colonnes classiques et a été utilisé pour l'étude de la rétention et la séparation de produits d'origine biologique. Le concept a été validé pour l'analyse de populations cellulaires (J. Chromatogr. B 901 (2012) 59-66) et pour la séparation de protéines. Un des points majeur de la Thèse réside dans la mise en place d'une méthodologie originale de détermination de la position de focalisation. Trois chapitres constituent le corps de la Thèse : chapitre 1 : Instrumentation et séparations cellulaires, chapitre 2 : Focalisation théorie et validation expérimentale, chapitre 3 Applications à la séparation de protéines

Mots Clés: HF5, Fibre Creuse, séparation de protéines, tri cellulaires, relaxation/focalisation, agrégats des protéines, position de focalisation.

### ***Abstract.***

A hollow fiber flow field flow fractionation system is set up from commercially available material. The system is biocompatible and was integrated into a classical HPLC system, simply replacing the classical column. The concept has been validated for cellular separations and analyses (J. chromatogr. B 901 (2012) 59-66 ), and for protein separations. One of the most critical part of the Thesis is linked to the innovative theoretical and methodological determination of the initial focalization position of the sample. The corpus of the thesis is developed in three chapters: chapter 1: instrumentation and cell separations, chapter 2 focalization theory and experimental validation, chapter 3 protein separations applications.

Keywords: HF5, Hollow fiber, proteins separation, focalisation/relaxation, proteins aggregate, focusing points

### *Résumé.*

Le développement d'un prototype de colonne de séparation en fibre creuse exploitant les concepts de fractionnement par couplage flux force à champ hydrodynamique asymétrique a été réalisé à partir de composants disponibles sur le marché. L'outil biocompatible, est intégré à une unité de chromatographie liquide où il remplace les colonnes classiques et a été utilisé pour l'étude de la rétention et la séparation de produits d'origine biologique. Le concept a été validé pour l'analyse de populations cellulaires (J. Chromatogr. B 901 (2012) 59-66) et pour la séparation de protéines. Un des points majeur de la Thèse réside dans la mise en place d'une méthodologie originale de détermination de la position de focalisation. Trois chapitres constituent le corps de la Thèse : chapitre 1 : Instrumentation et séparations cellulaires, chapitre 2 : Focalisation théorie et validation expérimentale, chapitre 3 Applications à la séparation de protéines

Mots Clés: HF5, Fibre Creuse, séparation de protéines, tri cellulaires, relaxation/focalisation, agrégats des protéines, position de focalisation.

### *Abstract.*

A hollow fiber flow field flow fractionation system is set up from commercially available material. The system is biocompatible and was integrated into a classical HPLC system, simply replacing the classical column. The concept has been validated for cellular separations and analyses (J. chromatogr. B 901 (2012) 59-66 ), and for protein separations. One of the most critical part of the Thesis is linked to the innovative theoretical and methodological determination of the initial focalization position of the sample. The corpus of the thesis is developed in three chapters: chapter 1: instrumentation and cell separations, chapter 2 focalization theory and experimental validation, chapter 3 protein separations applications.

Keywords: HF5, Hollow fiber, proteins separation, focalisation/relaxation, proteins aggregate, focusing points