

UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1999



THESE N° 323/A

**LE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE
FLUX FORCE (FFF) :**
THEORIE ET EXPERIMENTATION



THESE

POUR LE

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 21 juin 1999

par

Stéphane QUINTANS

né le 13 octobre 1974 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur Philippe CARDOT PRESIDENT
Monsieur Serge BATTU, Maître de Conférences JUGE
Monsieur Jean-Jacques BONNIN, Docteur en Pharmacie JUGE

**UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE**

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOU Jean-Louis

BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE

BERNARD Michel

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PARASITOLOGIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE
CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT

OUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :

POMMARET Maryse

A mes parents,

*je vous remercie pour votre aide et votre soutien,
votre présence et votre attention tout au long de mes études.
Avec toute mon affection et ma gratitude.*

A Anne,

avec tout mon amour.

A tous mes amis.

A mon président de thèse,

*Monsieur CARDOT Philippe,
Professeur de Chimie Analytique.*

*Vous me faites l'honneur de diriger et de juger cette thèse,
recevez l'expression de mes sincères remerciements.*

A mes juges,

*Monsieur BATTU Serge,
Maître de conférences.*

*Vous avez accepté le sujet de cette thèse,
soyez assuré de toute ma gratitude.*

*Monsieur BONNIN Jean-Jacques,
Docteur en Pharmacie.*

*Vous avez accepté d'être membre de ce jury,
soyez assuré de toute ma reconnaissance.*

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE

- I- Modèle général d'élution en FFF : modèle brownien
- II- Notion de rétention en FFF
- III- Modèle stérique
- IV- Modèle inertiel de rétention de particules microniques en FFF avec champ gravitationnel

CHAPITRE 2 : DONNEES SPECIFIQUES DE LA FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE

- I- La FFF avec champ hydrodynamique asymétrique
 - I-1- Mécanismes d'élution en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique
 - I-2- Elution de type brownien en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique
 - I-3- Procédures d'injection et de relaxation avec effet de focalisation

CHAPITRE 3 : VITESSE DE SEPARATION, RETENTION ET DISPERSION EN FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE

- I- Effets de la dimension du canal et du débit. Aspects théoriques
- II- Calcul du facteur de rétention en FFF asymétrique
- III- Le profil de vitesse
- IV- La rétention
- V- Comparaison des profils de vitesse dans des canaux de géométries différentes

CHAPITRE 4 : LA CONSTRUCTION D'UN SEPARATEUR DE FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE, EXPERIMENTATION

- I- Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique
- II- Modèle de fabrication
- III- Système d'analyse
- IV- Expérimentation
 - IV-1- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle
 - IV-2- Injection de Dextran T2000 bleu
 - IV-3- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle et de Dextran T2000 bleu

CONCLUSION

Présentation générale des méthodes de Fractionnement par couplage Flux Force
La FFF, une famille de méthodes
La FFF, un outil de mesure
Les applications biomédicales et biologiques de la FFF

BIBLIOGRAPHIE

NOMENCLATURE

INTRODUCTION

Les développements rapides de la biochimie, de la microbiologie et des biotechnologies, aussi bien que ceux des sciences des polymères et des particules, demandent un large panel de techniques permettant l'isolement et la caractérisation des macromolécules ou d'espèces supramoléculaires comme les particules (virales par exemple). Aujourd'hui, les techniques les plus employées dans ces buts sont la chromatographie de perméation de gel [1], l'ultracentrifugation [2] et l'électrophorèse [3]. Bien que ces méthodes soient efficaces, il existe un besoin toujours plus pressant de nouvelles méthodes. Les méthodes classiques sont limitées, en particulier pour les composés de très haut poids moléculaire, il est donc important de poursuivre le développement de techniques de séparation et de caractérisation pour de telles applications.

Le Fractionnement par couplage Flux Force (FFF) [4, 5, 6, 7, 8, 9] est une famille de méthodes de séparation particulièrement bien adaptée à la séparation en fonction de la taille des molécules et d'espèces supramoléculaires dont la taille varie de 1000 daltons à 50 μm de diamètre. Le principe fondamental de la FFF a été décrit la première fois par Giddings [10] en 1966 et la méthode s'est développée depuis en de nombreuses sous-techniques. Le facteur commun de toutes les méthodes de FFF réside dans l'établissement d'un écoulement d'un fluide en régime laminaire dans un canal de forme parallélépipédique dont l'épaisseur est très faible devant la longueur (figure 1). Un champ est appliqué perpendiculairement à l'écoulement du liquide et agit sur les différents composants à séparer, en les accumulant vers l'une des deux parois du canal, que l'on qualifie alors de paroi d'accumulation. Si les types d'interactions sont exploités de façon à ce que chaque type de composant soit accumulé à des distances spécifiques de la paroi d'accumulation, alors ils migreront le long du canal à cette distance et donc avec des vitesses spécifiques, ce qui permettra de les séparer.

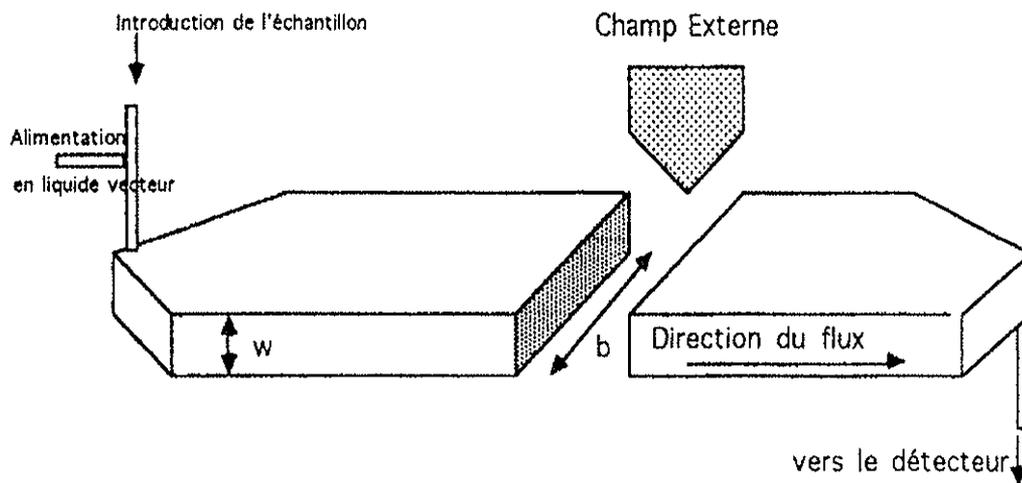


Figure 1 : Le canal de séparation en FFF

Bon nombre de types de champs ont été proposés, certains ont permis le développement de techniques de séparation très efficaces.

La FFF de sédimentation [11, 12, 13] a été la première sous technique disponible commercialement. Dans cette technique, le canal est inséré dans une centrifugeuse et peut être mis en rotation à des vitesses différentes qui dépendent du type et du nombre des constituants du mélange à séparer. Globalement, les composants sont séparés par leur différence de masse et de densité, ainsi que par leur différence de taille.

La méthode de FFF thermique [14, 15] est une technique bien adaptée à la séparation des composés organiques. Ici, le champ est un gradient thermique créé lorsque les parois supérieure et inférieure du canal sont thermostatées à des températures différentes. Avec une plaque chaude et une plaque froide, il s'établit une diffusion thermique de la plaque chaude vers la plaque froide.

Ce processus n'est pas encore bien compris [16], cependant on a remarqué que cette méthode est très efficace dans la séparation des polymères organiques, mais le liquide vecteur doit aussi être un solvant organique.

La méthode de FFF avec champ hydrodynamique [17] semble être la plus universelle et la plus polyvalente. Elle utilise un champ hydrodynamique créé par l'écoulement d'un flux au travers du canal, ce champ hydrodynamique devient le moteur de la rétention. Puisque tous les types d'espèces seront plus ou moins soumis à ce champ, toute molécule pourra donc, potentiellement, être retenue dans un tel appareillage. Les limitations de performances sont alors celles de l'appareillage. Avec un champ hydrodynamique, la sélectivité des séparations se fonde sur les différences de coefficient de diffusion, ce qui permet de séparer les espèces en fonction de leur taille et de leur forme.

CHAPITRE 1 :
GENERALITES SUR LE FRACTIONNEMENT
PAR COUPLAGE FLUX FORCE

Un même principe général de séparation permet l'analyse et la purification de composés aussi variés que des polymères organiques (FFF thermique), des particules microniques (FFF de sédimentation) comme les cellules du sang, ou encore des protéines et des virus par les méthodes de FFF avec champ hydrodynamique.

Toutes les techniques de FFF ont en commun le mode d'élution décrit ici :

I- Modèle général d'élution en FFF : modèle brownien

Il est possible de formaliser l'effet de concentration (figure 2) ; en effet, le flux J , dans la direction du champ d'une suspension de particules introduites dans le canal de FFF, dépend de la distance (x) à la paroi d'accumulation (le plus souvent la paroi d'accumulation est la paroi inférieure).

$$J(x) = U(x)C(x) - D(x) \frac{dC(x)}{dx} \quad (1)$$

Le premier terme ($U(x)C(x)$) représente le terme convectif lié à l'action du champ externe. $U(x)$ est la vitesse des particules à la distance (x) de la paroi d'accumulation et $C(x)$ la concentration en particules. Compte tenu du référentiel choisi, $U(x)$ est négative et s'écrit ($-|U(x)|$).

Le deuxième terme de l'équation représente la loi de Fick : il décrit la diffusion des particules contre le gradient de concentration de l'espèce considérée, $D(x)$ est le coefficient de diffusion de cette espèce.

A l'équilibre, le flux J est nul en tout point (x) et l'équation (1) devient :

$$U(x)C(x) = D(x) \frac{dC(x)}{dx} \quad (2)$$

L'intégration de l'équation (2) donne le profil de concentration des particules $C(x)$ à l'équilibre (équilibre= $J(x)=0$) dans la section du canal. Compte tenu de la très faible épaisseur du séparateur et en supposant que l'on travaille à une dilution suffisante, on peut considérer que $U(x)$ et $D(x)$ sont constants le long de l'axe x . Dans ce cas l'intégration de l'équation différentielle du premier ordre (2) est simplifiée et fournit l'expression suivante :

$$\frac{C(x)}{C_0} = \text{Exp} \left(-x \frac{|U|}{D} \right) \quad (3)$$

dans laquelle C_0 représente la concentration des particules à la paroi d'accumulation d'abscisse ($x=0$). Pour des suspensions suffisamment diluées, on remarque que le profil relatif de concentration $C(x)/C_0$ ne dépend que d'un seul paramètre I , égal à :

$$I = \frac{D}{|U|} \quad (4)$$

cette constante d'espace du profil exponentiel d'équilibre, dû à la fois au champ externe et à la diffusion, est du point de vue de la FFF une caractéristique essentielle de l'espèce considérée.

En FFF, il est commode d'utiliser le paramètre sans dimension λ , défini comme le rapport de la hauteur caractéristique des particules à l'épaisseur du canal w :

$$\lambda = I/w = \frac{D}{|U|w} \quad (5)$$

Si l'on considère que le liquide vecteur en écoulement dans le séparateur provoque un profil de vitesse, assimilable à celui d'un fluide circulant entre deux plaques parallèles de dimensions infinies (en pratique la largeur des canaux utilisés est de 80 à 200 fois plus grande que l'épaisseur), alors la résolution des équations de la mécanique des fluides fournit l'expression d'un profil parabolique de vitesse où u est la vitesse moyenne du fluide dans la section du canal :

$$V(x) = 6u \left[\frac{x}{w} - \frac{x^2}{w^2} \right] \quad (6)$$

u peut être exprimé à partir du profil de vitesse :

$$u = \frac{1}{w} \int_0^w V(x) dx \quad (7)$$

u est relié au débit Q du liquide par la relation :

$$u = Q / (wb) \quad (8)$$

dans laquelle b est la largeur du canal et w son épaisseur.

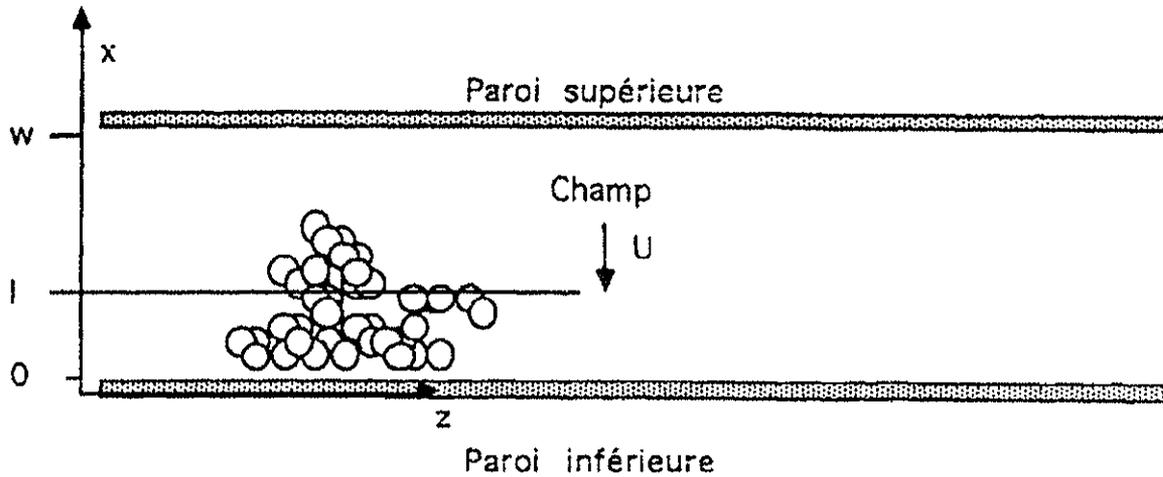


Figure 2 : Représentation schématique du profil de concentration des particules dans l'épaisseur d'un canal de FFF

II- Notion de rétention en FFF

Comme en chromatographie, on caractérise la rétention d'une espèce par son facteur de rétention R , défini comme le rapport de la vitesse moyenne de migration de l'espèce dans le séparateur v (axe z) à la vitesse moyenne du liquide vecteur dans le canal (u). En pratique, si t_r est le temps moyen de l'élution d'une suspension de particule ($t_r = L/v$) où L est la longueur du canal, si t_0 est le temps d'élution d'une espèce n'interagissant pas avec le champ et se déplaçant à la vitesse moyenne du fluide ($t_0 = L/u$), on mesure le facteur de rétention R par :

$$R = v/u \quad (9) \quad R = t_0 / t_r \quad (10)$$

Il est évident, lors de l'élution des particules dans le profil parabolique de vitesse, que le profil transversal des particules est perturbé, ce qui complique le calcul de R . En fait, ce calcul est considérablement simplifié si l'on suppose que la migration des espèces à séparer s'effectue en état de quasi-équilibre, c'est-à-dire qu'à chaque transfert élémentaire dz des particules, s'établit quasi instantanément un nouvel état d'équilibre transversal.

Cette hypothèse est en pratique justifiée par le fait que le nombre de Péclet est petit. On obtient la vitesse moyenne de déplacement des particules en pondérant le profil de vitesse par le profil relatif de concentration :

$$v = \frac{\left\langle \frac{C(x)}{C_0} v(x) \right\rangle}{\left\langle \frac{C(x)}{C_0} \right\rangle} \quad (11)$$

où le symbole $\langle \rangle$ représente une valeur moyenne dans l'épaisseur du canal, ce qui donne :

$$\left\langle \frac{C(x)}{C_0} v(x) \right\rangle = \frac{1}{w} \int_0^w \frac{C(x)}{C_0} v(x) dx \quad (12)$$

$$\left\langle \frac{C(x)}{C_0} \right\rangle = \frac{1}{w} \int_0^w \frac{C(x)}{C_0} dx \quad (13)$$

Les profils de concentration et de vitesse sont donnés respectivement par les équations (3) et (6). Après intégration des équations (12) et (13) et combinaison avec les équations (5), (9) et (11), on obtient :

$$R = 6\lambda \left(\coth \left[\frac{1}{2\lambda} \right] - 2\lambda \right) \quad (14)$$

Il est remarquable que le facteur de rétention d'une espèce ne dépende que du paramètre caractéristique de l'espèce I . On note que R tend vers zéro quand I tend vers zéro. Ainsi, cette dernière équation (14) représente le résultat d'un premier modèle théorique du mécanisme de rétention des particules en FFF basé sur l'équilibre entre la convection due au champ et la diffusion, c'est ce que l'on appelle le mécanisme brownien de la rétention en FFF. Il décrit de façon satisfaisante le comportement des espèces analysées par de nombreuses sous techniques (FFF thermique, FFF hydraulique, FFF centrifugationnelle). R augmente de façon monotone avec I , c'est-à-dire avec le rapport $D/|U|$. Des espèces diffusant rapidement et/ou peu entraînées par le champ possèdent un facteur de rétention supérieur et sont donc éluées plus rapidement que des espèces diffusant faiblement et/ou interagissant fortement avec le champ.

Il est cependant nécessaire de préciser que cette interprétation générale du mécanisme de rétention en FFF repose sur plusieurs postulats.

Le premier, non encore décrit, suppose que l'introduction de l'échantillon en tête de colonne soit suivie d'un temps d'attente d'établissement de l'état d'équilibre avant la mise en écoulement, ce temps dit de relaxation peut être important.

Le deuxième considère que la migration des particules dans le séparateur s'effectue selon un profil de concentration de quasi-équilibre, ce qui impose des débits faibles donc un temps d'analyse parfois long.

Le troisième postulat se base sur le fait que la vitesse de déplacement des particules est la même que celle du liquide à la même hauteur.

III- Modèle stérique

Le modèle précédent, bien que justifié dans certains mécanismes d'élution de macromolécules ou de particules, suppose des particules ponctuelles et ne peut être exact que tant que le rapport a/l est petit (a = rayon de la particule, l est défini par l'équation (4)). En FFF gravitationnelle, par exemple, lors de l'élution de particules microniques, on doit tenir compte de la taille finie des particules et de leur exclusion du voisinage de la paroi. Giddings a développé un modèle dit stérique [44] lorsque le rapport a/w n'est plus négligeable devant λ . Ce modèle applique l'équation classique de la rétention en FFF à un canal fictif de même axe que le canal réel et d'épaisseur $w-2a$. En tenant compte de la vitesse des parois de ce canal fictif par rapport au canal réel, on obtient l'expression de la rétention :

$$R = 6(\alpha - \alpha^2) + 6\lambda(1 - 2\alpha) \left[\coth \left[\frac{1 - 2\alpha}{2\lambda} \right] - \frac{2\lambda}{1 - 2\alpha} \right] \quad (15)$$

avec $\alpha = (a/w)$ où w est l'épaisseur du canal et a le rayon de la particule.

Le développement au premier ordre de l'équation (15) en α et λ conduit à :

$$R = 6\alpha - 6\lambda \quad (16)$$

et lorsque λ tend vers 0, R s'exprime comme le profil de vitesse :

$$R = 6(\alpha - \alpha^2) \quad (17)$$

Cette expression de R est identique à celle que l'on obtiendrait en supposant que les particules viennent en contact avec la paroi d'accumulation et qu'elles voyagent à la vitesse du fluide en leur centre, plus la particule est grosse, plus son centre est élevé par rapport à la paroi d'accumulation et donc plus sa vitesse est grande.

Ce modèle prévoit ainsi que R augmente, donc que le temps de rétention diminue quand le rayon (a) de la particule augmente. Dans ce cas, l'ordre de rétention doit être inversé par rapport au modèle classique. C'est bien ce qui est observé dans le cas de particules microniques soumises à un champ gravitationnel ou centrifugationnel (figure 3).

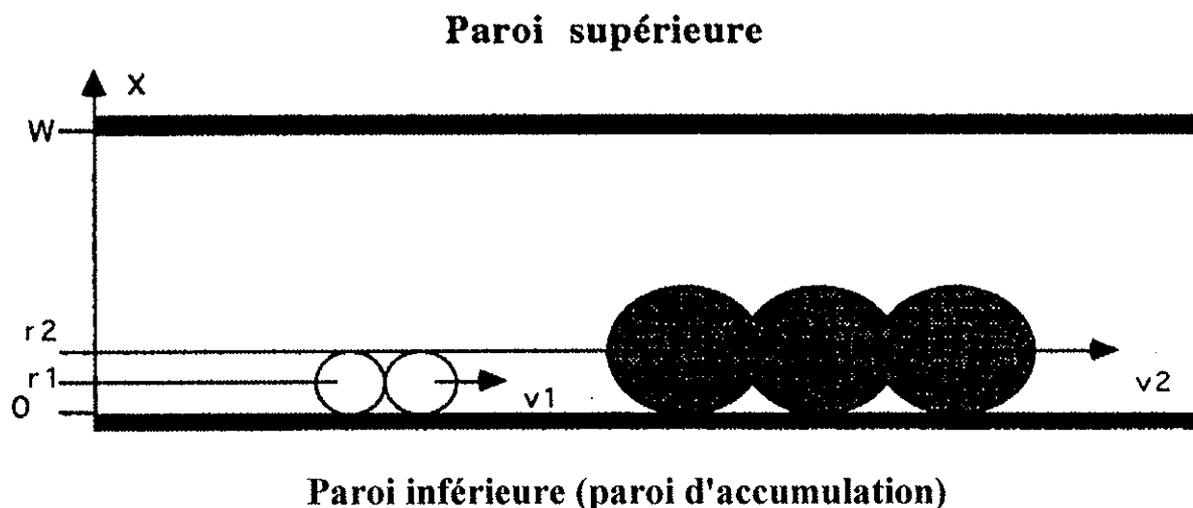


Figure 3 : Schéma du mécanisme stérique d'élution des particules
 r_1 , r_2 rayons des particules, v_1 et v_2 vitesses des particules

En pratique, si ce modèle tient bien compte de l'inversion de rétention observée, il néglige un fait expérimental important : l'observation d'une forte dépendance du facteur de rétention avec la vitesse moyenne du fluide vecteur. Giddings & coll. tentent d'évaluer ce phénomène en introduisant dans les équations (16) et (17) un facteur γ de façon empirique. Ce facteur γ représente une première approche de la prise en compte de l'effet d'inertie supposé être à l'origine de l'influence du débit du liquide vecteur sur la rétention. Toutefois, cette première approche essentiellement empirique ne permet pas de prédire la rétention et vise tant bien que mal à adapter le modèle aux résultats expérimentaux.

IV- Modèle inertiel de rétention de particules microniques en FFF avec champ gravitationnel

Un des phénomènes expérimentaux essentiels de la rétention des particules microniques en FFF avec champ gravitationnel est la variation du volume, donc du facteur de rétention, en fonction du débit, ce qui modifie les performances de séparation

A l'aide des calculs de la mécanique des fluides et en posant quelques hypothèses simplificatrices, un modèle théorique a été développé, rendant compte de ce phénomène expérimental ; il a permis de montrer qu'une particule en mouvement dans un écoulement laminaire est soumise, dans le cas de la FFF gravitationnelle, à deux forces : la première est le poids de la particule dans le liquide, la seconde est une force, dite force hydrodynamique, dont l'expression est complexe. Une particule migre donc dans le canal à une position d'équilibre telle que force hydrodynamique et poids s'annulent.

L'hypothèse selon laquelle les effets d'inertie sont responsables, au moins en partie, de l'influence importante du débit est justifiée par les observations sur la focalisation radiale des particules dans des tubes capillaires («tubular pinch effect»). La prise en compte de ce phénomène a nécessité la construction d'un modèle de rétention des particules qui ne néglige pas, dans les calculs de la mécanique des fluides, le terme d'inertie comme cela se fait classiquement. La prise en compte de cet effet introduit une force d'inertie que l'on appellera force hydrodynamique, laquelle vient s'exercer sur les particules dans la direction du gradient de vitesse.

L'expression de cette force latérale (FI) dans le cas de particules sphériques non pesantes (c'est-à-dire de même densité que celle du liquide vecteur) pour une géométrie identique à celle du canal de FFF a été établie. Cette force latérale dépend de façon complexe de (x/w) , où x est la distance du centre de la sphère à la paroi d'accumulation (en absence d'écoulement) et w l'épaisseur du canal. L'amplitude de cette force latérale est d'autant plus élevée que la taille de la particule est grande. Elle croît rapidement avec la vitesse moyenne de la phase mobile ; ces phénomènes sont à l'origine de la variation de rétention observée avec la vitesse du liquide vecteur pour les particules microniques en FFF gravitationnelle. Cette force latérale est exprimée par :

$$|F_1| = \frac{a^4 u^2 \rho_l f\left(\frac{x}{w}\right)}{w^2} \quad (18)$$

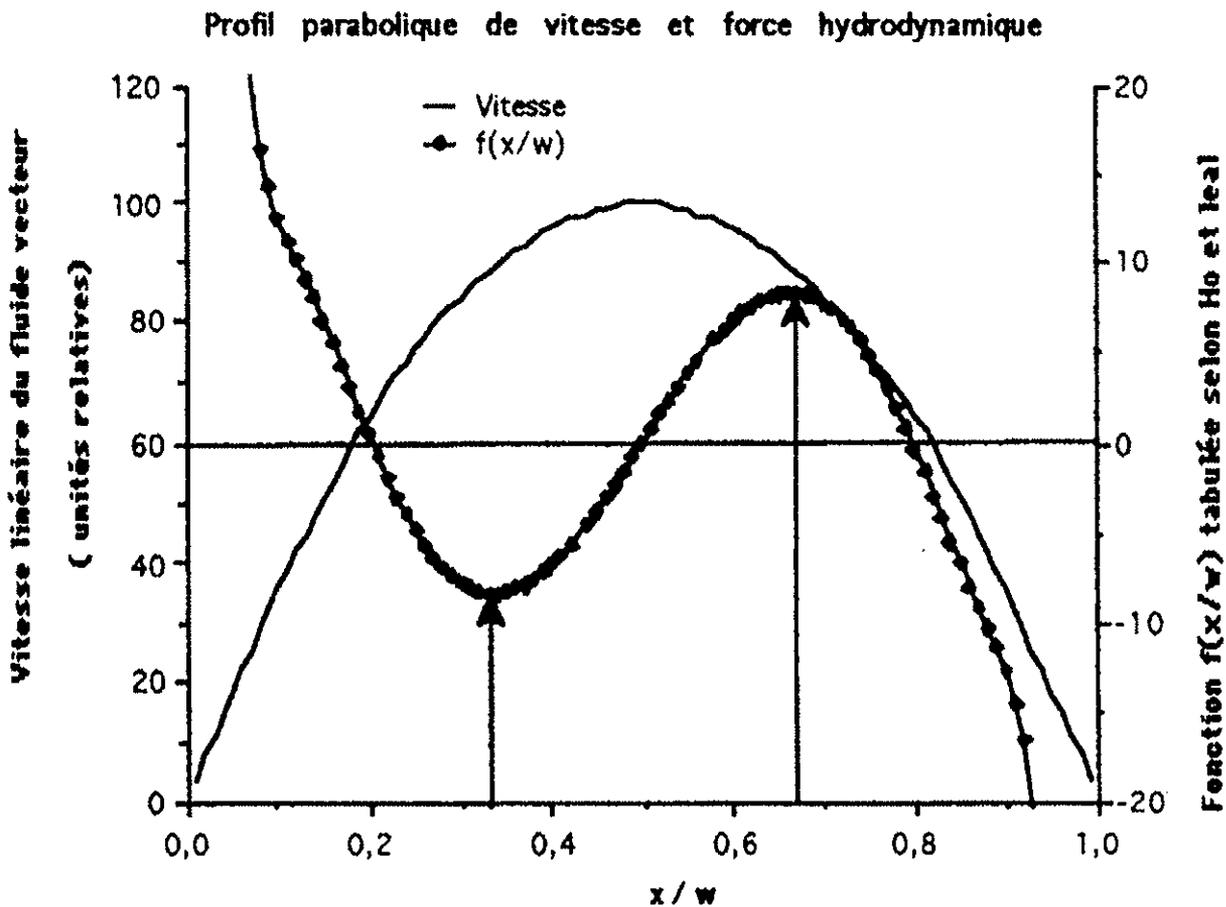
On remarque qu'elle est proportionnelle à la densité du fluide vecteur, au carré de la vitesse moyenne et à la puissance 4 du diamètre de la particule. L'étude de la fonction $f(x/w)$ permet de disposer de valeurs de $f(x/w)$ tabulées, pour un canal de longueur infinie.

L'analyse de cette fonction montre qu'il existe, pour les particules, trois positions (x/w) pour lesquelles cette fonction est nulle, donc pour lesquelles la force latérale devient nulle. Ces trois positions sont $(x/w)=0,2$; $(x/w)=0,5$; $(x/w)=0,8$. Cette fonction est antisymétrique autour de l'axe $(x/w)=0,5$ et compte tenu de l'intensité de $f(x/w)$ autour de cet axe, cette position d'équilibre est instable. Donc pour une particule dont le centre de gravité est situé au voisinage d'une paroi, la force est centripète et tend à diriger cette particule dans une ligne de flux de plus grande vitesse. Lorsque cette même particule est située au voisinage de l'axe, cette force est centrifuge et dirige les particules dans une ligne de flux de moins grande vitesse. L'expression de cette force hydrodynamique, définie pour des particules sans poids en écoulement dans un canal parallélépipédique, est utilisée dans le cas de la FFF.

Pour qu'il y ait séparation, l'effet du champ externe (le poids dans le cas de la FFF gravitationnelle), doit pouvoir s'exercer, ce qui impose une nouvelle hypothèse dans laquelle on considère que, pour des particules pesantes en mouvement dans le fluide vecteur, l'amplitude de cette force latérale et ses caractéristiques ne sont pas affectées.

Ce modèle tient compte du profil de concentration des particules résultant de l'effet du poids, de la force hydrodynamique, du mouvement brownien des particules et de l'exclusion stérique au voisinage de la paroi.

(Figure 4).



Il est possible d'obtenir une image simplifiée du modèle en considérant les effets majeurs qui agissent sur une particule, c'est-à-dire le poids P et la force d'inertie FI .

L'action combinée de ces deux forces tend à diriger la particule perpendiculairement à l'axe de translation vers une position d'équilibre où elles s'annulent.

Ce que l'on peut exprimer par :

$$FI + P = 0 \quad (19)$$

Ce modèle simplifié permet d'interpréter simplement et de prédire, de façon qualitative, l'influence des différents paramètres sur la rétention. Il repose sur le postulat qu'une particule migre dès le début du canal à sa position d'équilibre. Il est bien évident que le temps d'attente de cette position d'équilibre dépend, pour une population donnée, de la position d'origine des particules. Il peut être relativement important, ce qui constitue certainement une limite à la justesse du modèle. De ce point de vue, on peut considérer trois zones en fonction de la position d'origine des particules :

- celle où les particules sont à une position d'origine telle que $0 < (x/w) < 0,2$, zone dans laquelle la fonction $f(x/w)$ est dirigée dans le sens contraire du poids : les particules auront tendance lors de leur migration axiale à remonter vers une position d'équilibre où force et poids s'annulent ;

- pour une position d'origine située dans l'intervalle $0,2 < (x/w) < 0,5$, où force hydrodynamique et poids s'additionnent pour diriger les particules vers la position d'équilibre,

- enfin pour (x/w) comprise entre 0,5 et 1, les particules tendront vers une position d'équilibre voisine de $(x/w)=0,8$ ou inférieure à $(x/w)=0,2$ selon que la force d'inertie en $(x/w)=0,66$ est supérieure ou non au poids. On peut réduire la quantité de particules dans cette zone en ne mettant en marche l'écoulement du liquide vecteur qu'après un temps suffisant, suivant l'introduction des particules, pour permettre leur sédimentation dans la zone $(x/w) < 0,5$.

Le principal intérêt de ce modèle simplifié est qu'il permet de décrire l'influence de la vitesse du liquide vecteur sur le facteur de rétention. Soit une particule de rayon a , de densité ρ_p , mise en translation dans un canal de hauteur w , par un liquide vecteur de densité ρ_l , à une vitesse moyenne u , la position d'équilibre $(x/w)_{eq}$ est calculée en tenant compte du poids de la particule dans le liquide vecteur (P) :

$$|P| = \frac{4}{3} p a^3 [\rho_p - \rho_l] G \quad (20)$$

on obtient l'expression de $f(x/w)$:

$$f\left[\frac{x}{w}\right]_{eq} = \frac{4}{3} p \frac{\rho_p - \rho_l}{\rho_l} G \frac{w^2}{a u^2} \quad (21)$$

Cette dernière équation permet de connaître pour une particule de rayon a , dans un canal d'épaisseur w et pour un débit donné, sa position x dans l'épaisseur du canal, donc sa rétention. Cette approche permet de prévoir, dans une certaine mesure, les effets de divers paramètres influençant la rétention en FFF gravitationnelle. Si (x/w) est trouvé inférieur à (a/w) , on considère alors que l'on est dans un régime stérique et que la vitesse de migration de la particule est égale à $v(a)$. Dans les autres cas, l'influence du poids vient déplacer vers la paroi inférieure la position d'équilibre de la particule liée à la seule force hydrodynamique, ce qui implique que l'on trouvera toujours $(x/w)_{eq}$ inférieur à 0,2. La fonction $f(x/w)$ décroissant de façon monotone avec (x/w) pour (x/w) inférieur à 0,2, ce modèle permet d'interpréter qualitativement l'influence des principaux paramètres opératoires.

Si le rayon a augmenté, la dernière équation montre que $f[(x/w)_{eq}]$ diminue, donc que le rapport $(x/w)_{eq}$ augmente : ceci indique que plus les particules sont grosses, plus elles seront éluées rapidement. Le modèle inertiel prévoit donc le même ordre d'éluition des particules selon la taille que le modèle stérique. Si le débit du liquide vecteur augmente, $f[(x/w)_{eq}]$ diminue comme l'inverse du carré de la vitesse linéaire moyenne (u), donc le facteur de rétention des particules augmente. Le débit joue donc un rôle important et, pour une même espèce, déterminer le facteur de rétention minimal associé au régime stérique impose de travailler à des débits faibles. L'exploitation de ces équations permet de la même façon de prévoir l'influence des autres paramètres opératoires, comme l'épaisseur du canal ou la densité du liquide vecteur ou des particules, sur l'ordre d'éluition des particules.

Les prévisions autorisées par ce modèle sont essentiellement qualitatives. Elles reposent sur le postulat de la migration des particules en état de quasi-équilibre (position $(x/w)_{eq}$), postulat que l'on peut concevoir à de très faibles débits, mais qui risque de ne plus être réaliste lors de vitesses linéaires importantes. Or, il est impossible que toute la population particulaire à éluer se trouve après injection à cette position $(x/w)_{eq}$. Selon la position de chaque particule lors de la mise en mouvement du fluide vecteur, on devra tenir compte d'un temps d'attente de cette position d'équilibre. Par ailleurs, la fonction $f(x/w)_{eq}$ a été calculée pour des particules de même densité que le fluide vecteur et rigoureusement sphériques.

Or la FFF gravitationnelle fait naturellement appel à des particules pesantes. Il n'est pas établi que les valeurs de la fonction $f(x/w)_{eq}$ seraient alors les mêmes. De plus les hypothèses définies concernent des particules sphériques et non déformables. En biologie, les cellules ne sont pas sphériques et sont déformables (lymphocytes, hématies). Il est donc plus que probable que la fonction $f(x/w)_{eq}$ serait modifiée. Les distributions de tailles, de volumes et de densités des cellules sont des éléments compliquant l'évaluation des potentialités du séparateur et augmentant les difficultés de séparation.

CHAPITRE 2 :
DONNEES SPECIFIQUES DE LA FFF
AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE

C'est à cause du potentiel important d'applications de cette méthode (séparation de protéines, de particules virales, de cellules) qu'elle a toujours attiré les groupes de recherche en FFF. Deux groupes en particulier ont participé aux développements initiaux de cette technique au début des années 1970. En 1974, une technique dérivée était publiée [17, 18], dans laquelle des fibres poreuses circulaires permettaient les séparations. Le fluide vecteur pénètre dans la fibre à une extrémité, et pendant son passage dans la fibre, un flux radial vers l'extérieur de la fibre est créé par l'intermédiaire d'une pompe aspirante. Deux ans plus tard, les premiers résultats réalisés dans un canal parallélépipédique furent publiés [19, 20]. Dans ce cas, le flux transversal est créé en poussant un liquide dans le canal mais de façon perpendiculaire et en récupérant le même flux à l'endroit de la paroi d'accumulation. Enfin une troisième technique, qui emploie aussi un canal parallélépipédique, appelée FFF par pression ou chromatographie de polarisation était publiée en 1979 [21]. Depuis cette époque, la plupart des objectifs de recherche, tant dans le domaine théorique, que dans celui des modes opératoires [22] et dans celui des applications [23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44] concerne le modèle avec canal parallélépipédique. Des développements importants, dont le principe de la FFF avec champ hydrodynamique utilisée avec le mode d'élution inertiel [34] ont permis les applications de la FFF à des particules de la taille du micron. L'introduction de variants à gradients [35, 36] a permis un embryon d'optimisation. C'est en parallèle que d'autres équipes ont développé la méthode utilisant des fibres creuses dont le principal avantage réside dans leur simplicité opératoire. Quoi qu'il en soit, des séparations rapides et efficaces ont été difficiles à obtenir [37].

Le problème général des variantes de la FFF avec champ hydrodynamique est qu'elles ne présentent pas encore les efficacités prévues par les modèles théoriques.

Que ce soit dans les modèles construits avec un canal parallélépipédique ou dans ceux construits avec des fibres creuses, l'incapacité à obtenir expérimentalement l'efficacité calculée réside dans la construction et la structure des parois du canal. On souhaite obtenir des surfaces parfaitement planes et dont la porosité soit la plus précise possible. La taille des pores doit être choisie en fonction des applications (elle doit être dix fois plus petite que la taille de la plus petite particule) et dans la plupart des cas il faut utiliser des membranes d'ultrafiltration, pour éviter de perdre des espèces lors de leur accumulation au voisinage de l'une des parois. Dans les modèles à canal parallélépipédique, la membrane est portée par un fritté poreux pour assurer qu'il reste plan malgré la pression.

I- La FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

En 1986, une nouvelle variante de la méthode était proposée [22], la paroi supérieure poreuse étant alors simplement remplacée par une plaque de verre. Cette modification du canal impose que le champ hydrodynamique soit créé de façon différente. Ainsi, le flux dans le canal assume les deux fonctions, d'une part le flux axial de migration et le flux transversal qui induit le champ. On utilise des restricteurs aux extrémités du canal pour moduler les rapports de débits (transversal et longitudinal). Malheureusement, la vitesse de migration moyenne ne peut être régulée indépendamment du flux transversal.

I-1- Mécanismes d'élution en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

Bien que des espèces dont les diamètres varient de 5 nm à 50 μm puissent être retenues dans le canal de FFF, différents mécanismes de séparation seront employés selon qu'il s'agit d'espèces sub microniques ou non.

Les plus petites seront séparées selon le mode brownien et les autres selon les modes stérique ou inertiel [6].

I-2- Elution de type brownien en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

Le mode d'élution brownien [41] se fonde sur l'équilibre provoqué par la convection induite par le champ externe qui mène les espèces vers la paroi d'accumulation et la diffusion qui emmène les espèces dans la direction opposée. Dès que l'état d'équilibre est atteint, les centres de gravité des différents composants du mélange se trouvent à différentes hauteurs dans l'épaisseur du canal.

En fait, pour un champ hydrodynamique donné, la distance moyenne I de la paroi d'accumulation à laquelle les composants d'une espèce se trouvent à l'équilibre dépend uniquement de leur coefficient de diffusion. Comme c'est le profil de concentration à l'équilibre qui détermine la vitesse moyenne de migration de l'espèce dans le canal, les différents composants d'un mélange seront élués en fonction de leur coefficient de diffusion, les espèces les plus petites dont le coefficient de diffusion est le plus grand seront éluées les premières.

On obtient de meilleurs résultats si on peut produire un équilibre entre l'effet convectif lié au champ et à la diffusion avant de débiter l'élution [41, 42, 43]. Ceci est facilement réalisable, on parle alors de relaxation, quand on soumet le soluté au champ externe avant de débiter l'élution.

Le phénomène d'éluion d'un ensemble de composés conduit inévitablement à un phénomène appelé élargissement de bande qui, dans un canal idéal, serait dominé par les effets de non équilibre. L'éluion modifie l'état d'équilibre parce que les différents solutés sont transportés à des vitesses différentes en fonction de leur position par rapport à la paroi d'accumulation, bien évidemment les solutés ne se distribuent pas dans toute la longueur du canal, car le soluté va diffuser de façon à restaurer l'état d'équilibre précédemment installé. Un moyen très simple de diminuer l'élargissement de la bande et d'augmenter le champ hydrodynamique qui force les espèces au voisinage de la paroi d'accumulation. Ainsi les distances de diffusion sont diminuées ce qui réduit l'élargissement de la bande. C'est pour la même raison qu'une augmentation du coefficient de diffusion et une vitesse axiale plus faible conduisent également à une efficacité plus grande.

I-3- Procédures d'injection et de relaxation avec effet de focalisation

Comme on cherche à obtenir un état d'équilibre dynamique des composés du mélange avant l'éluion, cet état est atteint dans la plupart des variantes de la FFF en arrêtant simplement le débit du liquide vecteur au moment de l'injection.

Alors, le champ externe est le seul phénomène qui agit sur les espèces à séparer et au bout d'un certain temps, cet état d'équilibre est atteint.

Dans le cas de la FFF asymétrique, une approche différente a été envisagée, puisque le champ est nul dès que l'on supprime le flux. On utilise donc une méthode qui sera appelée relaxation par opposition de flux, trois conduits sont installés dans le canal, à une extrémité arrive le fluide vecteur, à l'autre on peut soit collecter les éluants soit envoyer un flux opposé qui sera le flux de focalisation.

A quelque distance de l'orifice d'entrée du liquide vecteur, un système d'injection est mis en place. Au moment de l'injection le fluide vecteur entre par chaque extrémité dans le canal et les rapports de débits sont ajustés de façon à ce que le flux axial moyen au voisinage de l'injecteur soit nul.

Ainsi, les solutés injectés sont dirigés vers une zone de focalisation et vers la paroi d'accumulation du canal. Il en résulte un effet simple, les espèces sont alors uniquement dirigées vers la paroi d'accumulation, et il n'y a pas d'élargissement de zone, l'effet de focalisation au contraire dû aux deux flux opposés minimise la zone d'injection. On a montré [45] que les différents composants des mélanges injectés relaxent très rapidement. Plus important encore, on remarque qu'aucune efficacité n'est perdue même si le champ pendant la relaxation est plus faible que pendant l'élution. L'intérêt du point d'injection séparé [46, 47] réside dans la diminution et même la disparition d'hétérogénéité du flux d'élution à l'entrée du canal, enfin des volumes même très grands peuvent être injectés puisque le solvant en excès est éliminé.

CHAPITRE 3 :
VITESSE DE SEPARATION, RETENTION ET DISPERSION
EN FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE
ASYMETRIQUE

I- Effets de la dimension du canal et du débit. Aspects théoriques

Le mécanisme de rétention en FFF asymétrique se base sur un certain nombre d'hypothèses qui vont grandement simplifier le modèle [46].

Premièrement, on pose l'hypothèse que la vitesse vers la paroi d'accumulation du liquide vecteur (le champ hydrodynamique) est constante tout le long du canal même si la vitesse axiale varie.

Deuxièmement, on considère qu'il n'y a aucune perturbation du profil parabolique de vitesse (régime laminaire).

Enfin, on considère que le canal est formé de deux parois parallèles de dimensions infinies, ce qui signifie que l'influence des côtés du canal est considérée comme négligeable. Bien évidemment, le champ hydrodynamique provoque une distorsion du profil parabolique de vitesse, mais on ne sait pas encore à quel point il influence les résultats expérimentaux.

En FFF avec champ hydrodynamique classique, les effets du champ sur le profil axial de vitesse ont été étudiés [47] et il a été remarqué que ces phénomènes de distorsions sont en fait négligeables dans la plupart des conditions opératoires. Pour les canaux de FFF asymétrique (figure 5), l'effet de la perte de charge tout le long du canal a été étudié en fonction de la perte de charge de la membrane.

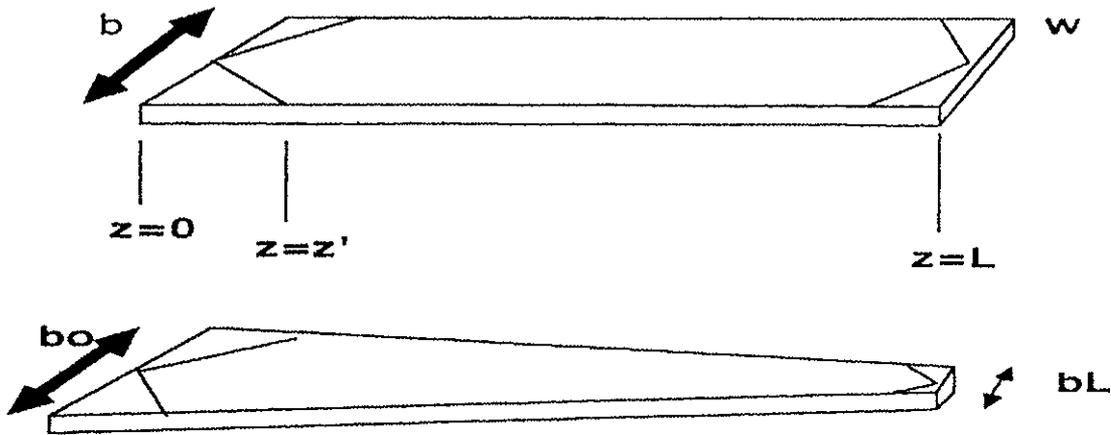


Figure 5 :

Géométrie des canaux en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

On remarque alors que pour des membranes d'ultrafiltration, la restriction due à la membrane est si importante que les différences de champ en fonction de la position le long du canal sont vraiment négligeables [48, 49].

II- Calcul du facteur de rétention en FFF asymétrique

Dans le mode d'élution brownien, les molécules sont dirigées vers la paroi d'accumulation à cause du champ hydrodynamique et s'établit un profil de concentration exponentiel dont l'équation générale est :

$$C = C_0 \exp\left(\frac{-x}{l} \left[1 - \frac{x^2}{w^2} + \frac{x^3}{2w^3} \right]\right) \quad (22)$$

C_0 est la concentration des particules à la paroi d'accumulation. C'est la concentration en particules à la distance x de la paroi d'accumulation, w est l'épaisseur du canal. l est la distance moyenne du centre de gravité de la population de particules et c'est le rapport $l=D/|u_0|$, avec $|u_0|$ la vitesse transversale du liquide due au champ hydrodynamique et D le coefficient de diffusion.

Le développement polynomial dans l'expression (22) est caractéristique du canal asymétrique et vient de la vitesse transversale non uniforme du fluide vecteur lorsqu'il traverse l'épaisseur du canal.

Bien entendu, des travaux antérieurs ont montré [46] que, dans la plupart des conditions opératoires de la FFF en mode brownien, ce développement est voisin de 1 et peut donc être négligé. On préfère en général exprimer l sans dimension en employant le paramètre :

$$\lambda = l/w \quad (23)$$

III- Le profil de vitesse

Avec des canaux asymétriques, il faut prendre en compte le gradient de vitesse axial dans le canal. Si la géométrie du canal est rectangulaire, la vitesse axiale moyenne du liquide vecteur à l'abscisse z , $\langle v \rangle$, est donnée par [46] :

$$\langle v \rangle = \langle v \rangle_0 - \frac{|u_0|}{w} z \quad (24)$$

Dans l'équation (24), $\langle v \rangle_0$ est la vitesse axiale du liquide vecteur au moment de son entrée dans le canal, cette équation n'est valable que si l'on pose l'hypothèse que le flux au travers de la membrane d'accumulation est constant sur toute la longueur du canal.

Ainsi il s'établit dans le canal un gradient de vitesse axial linéaire, à chaque abscisse z du canal, il est possible de connaître la vitesse $\langle v(z) \rangle$ moyenne et donc de pouvoir calculer la vitesse $\langle v(z,x) \rangle$ en tout point du canal.

Si on utilise un canal trapézoïdal, le gradient de vitesse n'est plus linéaire, à cause de la perte de liquide due au champ sur segment élémentaire du canal et à cause de la diminution de largeur due à la géométrie trapézoïdale de ce même canal, finalement la vitesse linéaire moyenne au point z est le débit divisé par la surface transversale du canal depuis l'injection jusqu'au point z ($A(z)$), et devient [50] :

$$\langle v \rangle = \frac{V_{in} - |u_0| A(z)}{w b(z)} \quad (25)$$

w est l'épaisseur du canal et $b(z)$ la largeur du canal au point z , $b(z)$ dépend de la géométrie du canal et pour un canal trapézoïdal on peut exprimer $b(z)$ par :

$$b(z) = b_0 - z(b_0 - b_L)/L \quad (26)$$

L est la longueur du canal, b_0 et b_L les largeurs à l'abscisse $z=0$ et à l'abscisse $z=L$.

On peut de la même façon évaluer $A(z)$ par :

$$A(z) = \int_0^z b(z) dz = b_0 z - \frac{z^2(b_0 - b_L)}{2L} \quad (27)$$

La combinaison de l'équation (25) et de l'équation (27) permet d'écrire l'équation suivante :

$$\langle v \rangle = \frac{V_{in} - |u_0| \left(b_0 z - \frac{(b_0 - b_L) z^2}{2L} \right)}{w \left(b_0 - (b_0 - b_L) \frac{z}{L} \right)} \quad (28)$$

qui décrit la vitesse linéaire du fluide vecteur dans le canal trapézoïdal.

V_{in} est le débit à l'entrée du canal, b_0 et b_L sont les largeurs du trapèze au début et à la fin du canal, L est la longueur de ce canal.

IV- La rétention

La rétention en FFF est mesurée par le facteur de rétention R , calculé par la relation suivante :

$$R = V / \langle v \rangle \quad (29)$$

où V est la vitesse moyenne de migration du centre de gravité du soluté étudié et $\langle v \rangle$ la vitesse moyenne du fluide vecteur. On peut alors définir le volume mort du canal et le temps d'éluion d'une espèce non retenue.

En effet, le volume mort du canal s'exprime par la relation suivante :

$$t^0 = \int_0^L \frac{dz}{\langle v \rangle} \quad (30)$$

Dans un canal rectangulaire l'expression de $\langle v \rangle$ est simple, pour un canal trapézoïdal, cette expression vient de l'équation (28). En utilisant les débits volumiques donnés par la relation $|u_0| = V_c \cdot w / V^\circ$, où V° est le volume mort géométrique du canal, V_c le débit du champ hydrodynamique et V_{out} le débit à la sortie du canal.

On obtient alors l'expression suivante :

$$t^o = \frac{V^\circ}{V_c} \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \right) \quad (31)$$

En pratique, il est difficile de définir le début et la fin du canal au sens du calcul car les extrémités du canal sont découpées pour éviter des effets de turbulence. De plus, la migration des espèces à éluer dépend du point de focalisation z' . C'est pourquoi on préfère calculer le volume mort à partir du point de focalisation. En tenant compte de la découpe du canal aux extrémités, on peut modifier l'expression de la géométrie du canal. Il devient alors possible d'exprimer le temps d'élution d'un composé non retenu par :

$$t^o = \int_{z'}^z \frac{dz}{\langle v \rangle} = \int_{z'}^L \frac{wb(z)}{V_{in} \cdot |u_0| \cdot (A(z) - y)} dz \quad (32)$$

Dans cette expression, y est la diminution de l'aire due à la géométrie de l'extrémité du canal, l'équation (32), après intégration peut être écrite sous une forme plus simple c'est à dire :

$$t^o = \frac{V^\circ}{V_c} \ln \left(1 + \frac{V_c}{V_{out}} \left(1 - \frac{A(z') - y}{A_{tot}} \right) \right) \quad (33)$$

A_{tot} est l'aire de la paroi d'accumulation, $A(z')$ est l'aire du canal à partir du point de focalisation. Soit sous une forme plus explicite pour un canal trapézoïdal :

$$t^0 = \frac{V^0}{V_c} \ln \left[1 + \frac{V_c}{V_{\text{out}}} \left(1 - \frac{w \left(b_0 z' - \frac{(b_0 - b_L)}{2L} z'^2 - y \right)}{V^0} \right) \right] \quad (34)$$

V- Comparaison des profils de vitesse dans des canaux de géométries différentes

Le gradient de vitesse dans le canal influence la vitesse de migration des solutés en chaque point (z) du canal et joue donc un rôle dans le mécanisme d'élargissement de bande. Pour pouvoir définir la géométrie du canal la plus appropriée, il devient donc important de pouvoir comparer les gradients de vitesse dans différents canaux et de les comparer à celui produit dans un canal symétrique qui est constant.

La vitesse du liquide vecteur est définie par :

$$\langle v \rangle = V / (bw) \quad (35)$$

Avec V le débit du fluide vecteur dans le canal, b la largeur du canal et w l'épaisseur. Bien évidemment, $\langle v \rangle$ pourrait être choisi indépendamment de l'amplitude du débit de liquide vecteur à la sortie du canal.

Une comparaison des gradients de liquide vecteur dans les différentes configurations de canal aura un intérêt si les canaux à comparer ont la même longueur, la même hauteur et la même surface et si les conditions de débit sont définies pour obtenir les mêmes facteurs de rétention et les mêmes temps de rétention. On obtiendra les mêmes facteurs de rétention si l'on impose la même intensité du champ hydrodynamique. Pour obtenir les mêmes temps de rétention, on adaptera le débit pour obtenir le même temps mort.

Avec les canaux trapézoïdaux, on s'arrange pour que les débits à la sortie du canal soient les mêmes, alors les temps d'élution d'un composé non retenu dans ces canaux seront les mêmes (équation 31). Dans un canal symétrique, c'est à dire rectangulaire, ce même temps est déterminé par le débit dans le canal ($t_0 = V_0/V$). On adaptera ce débit en utilisant l'équation (31). L'équation est alors :

$$V = V_c (\ln(v_c \sqrt{V_{out}} + 1))^{-1} \quad (36)$$

L'équation (36) permet de définir le débit dans le canal symétrique en fonction du débit dans le canal trapézoïdal. Il est possible de définir des conditions de comparaison plus générales si l'on normalise les équations de vitesses linéaires en fonction des vitesses de la phase mobile à la sortie du canal, $\langle v \rangle L$. Si l'on choisit ce paramètre pour le canal asymétrique, son expression devient :

$$\langle v \rangle L (as) = V_{out} / (bw) \quad (37)$$

Il est alors possible d'exprimer les vitesses linéaires normalisées, c'est-à-dire le rapport sans dimension :

$$\langle v \rangle / \langle v \rangle L (as) \quad (38)$$

Ces valeurs normalisées peuvent être calculées en fonction du rapport z/L .

Comme, pour une géométrie donnée du canal, les seules valeurs expérimentales qu'il est possible d'obtenir sont les débits volumiques V_c et V_{out} , ces deux valeurs sont aussi les seules sur lesquelles on peut influencer pour modifier le gradient. On obtient donc l'expression suivante pour un canal rectangulaire :

$$\frac{\langle v \rangle}{\langle v \rangle L(as)} = 1 + \frac{V_c}{V_{out}} \left(1 - \frac{z}{L} \right) \quad (39)$$

Pour un canal de type trapézoïdal l'expression est bien plus complexe :

$$\frac{\langle v \rangle}{\langle v \rangle L(as)} = \frac{x+1}{2} \left[\frac{1 + \frac{V_c}{V_{out}} \left(1 - \frac{z}{L} \left(\frac{2x - (x-1)(z/L)}{x+1} \right) \right)}{x - (x-1)(z/L)} \right] \quad \text{avec } x = b_o/b_l \quad (40)$$

Il apparaît donc qu'il n'est pas possible d'obtenir une vitesse linéaire dans le canal, ceci va donc fortement compliquer toute évaluation de l'élargissement de la bande d'éluion.

CHAPITRE 4 :
LA CONSTRUCTION D'UN SEPARATEUR DE FFF AVEC
CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE
EXPERIMENTATION

I- Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique
asymétrique

Un moyen efficace de provoquer un champ transversal est d'utiliser le champ hydrodynamique provoqué par le passage d'un liquide au travers de l'épaisseur du canal. Le champ peut aussi être provoqué par le liquide vecteur lui-même. Dans un tel système, la paroi d'accumulation devient une membrane semi-perméable. On distingue donc deux méthodes présentant une conception instrumentale différente. La première technique emploie deux flux perpendiculaires : le canal dont la paroi d'accumulation est formée par une membrane semi-perméable est construit de la même façon que dans les appareils de FFF de sédimentation ou gravitationnelle. Par contre, dans le cas de la FFF avec champ hydrodynamique asymétrique (figure 6), le canal est trapézoïdal car il s'établit un gradient de flux dans la longueur du canal. Walhund et Litzén ont montré que cette technique est très simple de mise en œuvre et possède quelques avantages, dont celui de permettre de focaliser l'échantillon à l'injection ce qui augmente fortement les performances de cette technique. Il est possible de suivre l'élution des espèces dans le canal par une visualisation directe à partir de la plaque supérieure, ce qui permet de s'assurer que les espèces parcourent bien le canal.

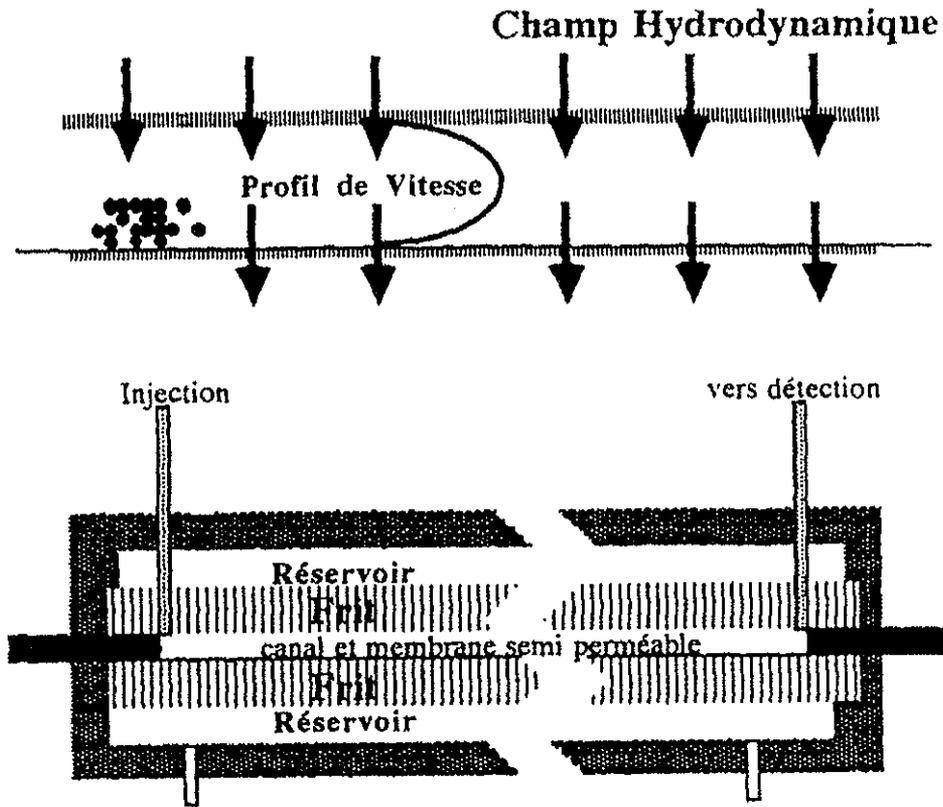


Figure 6 :

Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique symétrique

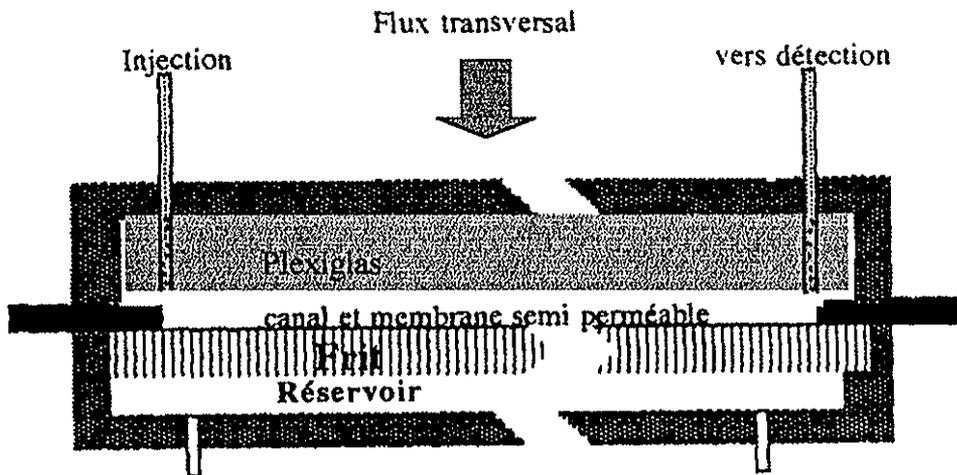


Figure 7 :

Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

Quelques interrogations se posent en effet quant au réel mode d'élution dans les séparateurs de flow FFF, où il a été envisagé que les solutés migrent en partie dans le fritté supérieur (figure 6) modifiant complètement le mode d'élution qui s'apparente plus alors à la chromatographie hydrodynamique. C'est pour éliminer cette dernière interrogation qu'il a été choisi de développer un appareillage de type FFF asymétrique (figure 7).

II- Modèle de fabrication (figure 8)

Deux feuilles de plexiglas enserrant sous pression une plaque de plexiglas disposée sur les parois du canal trapézoïdal découpé dans une feuille de mylar.

Dimension du canal : 250 μm d'épaisseur, 30 cm de long et 1 cm de large, soit un volume de 0,72 ml (29x1x0,025).

Le fritté de polyéthylène sur lequel est posé un fritté en acier est inséré dans une encoche de la pièce inférieure de plexiglas.

La membrane d'ultrafiltration de 30 KD est tendue sous le canal.

Du silicone, déposé sur la face absorbante de la membrane, assure l'étanchéité du système lors du serrage.

Les tubes d'entrée et de sortie sont des tubes bleus de 20 cm de long.

Les tubes de sortie du flux transversal sont des tubes oranges de même longueur qui sont reliés pour faire passer le flux transversal dans un restricteur de pression.

Un second restricteur de pression est placé à la sortie du système d'analyse.

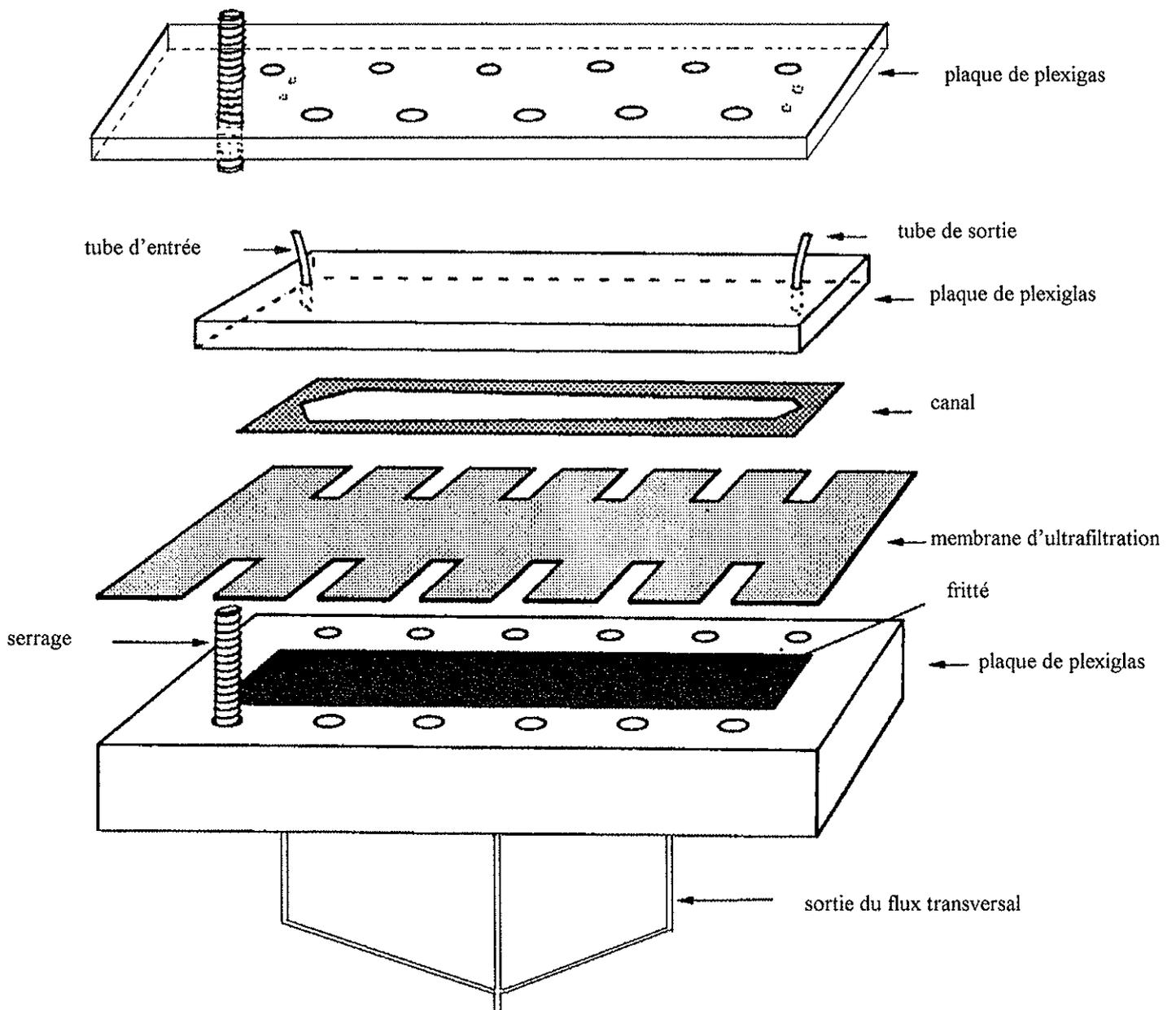


Figure 8 :

Schéma de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

III- Système d'analyse

La réalisation du système d'analyse requiert une pompe à débit réglable, une vanne d'injection de l'échantillon, un séparateur FFF, un détecteur UV, deux restricteurs de pression et un système d'acquisition (figure 9).

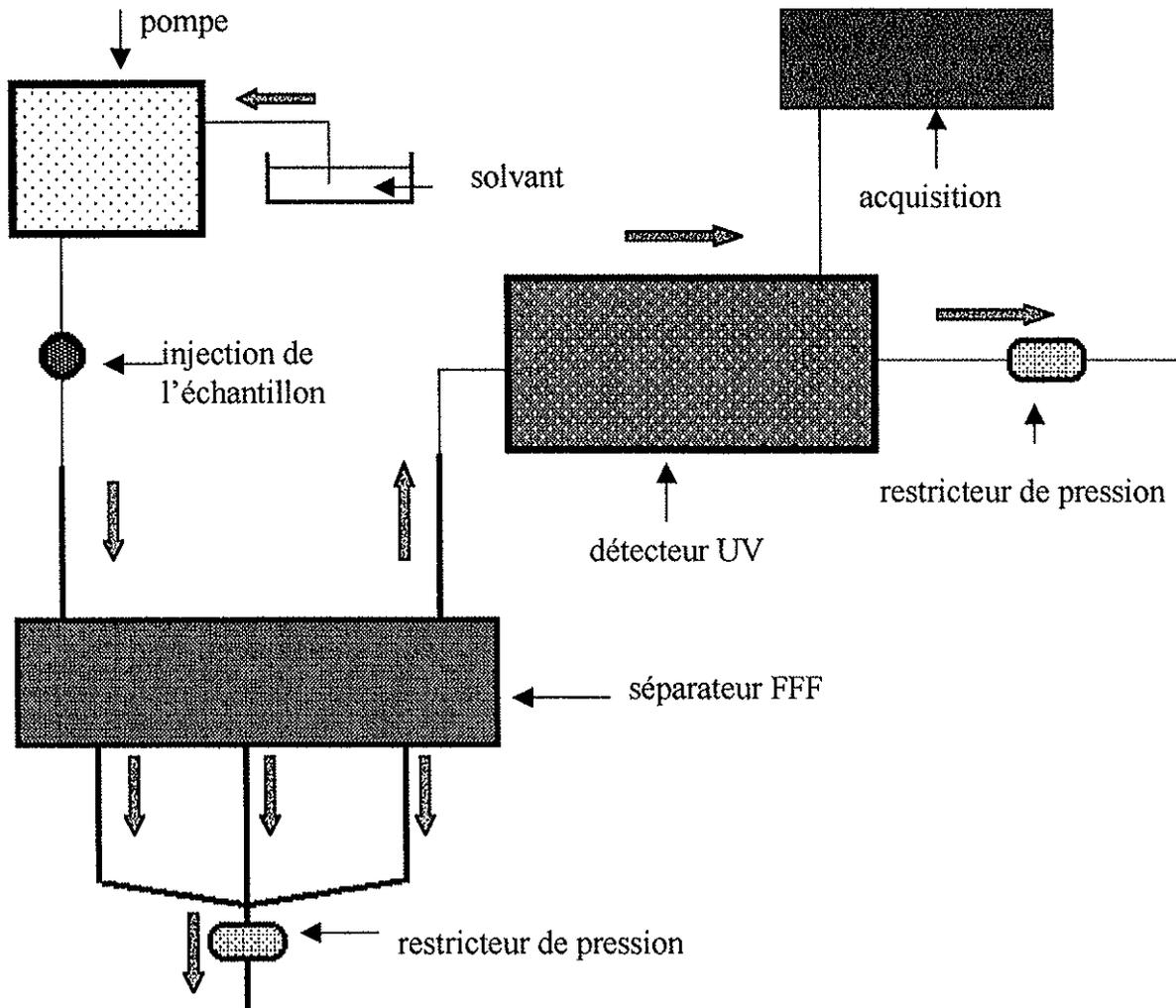


Figure 9 :

Schéma du système d'analyse par FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

IV- Expérimentation

On va injecter du parahydroxybenzoate de méthyle (figure 10), du Dextran T2000 bleu (figure 11, figure 12) puis ces deux molécules simultanément (figure 13).

On déterminera ainsi l'aptitude du système à retenir et séparer les molécules.

L'injection de l'échantillon est effectuée directement sur le trajet de la phase mobile qui est de l'eau pure.

Les restricteurs de pression situés à la sortie du système et à la sortie du flux transversal vont permettre d'ajuster le rapport $V_{out}/V_{membrane}$ et créer ainsi un champ transversal plus ou moins important.

La détection UV est mesurée à une longueur d'onde de 254 nm.

IV-1- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle

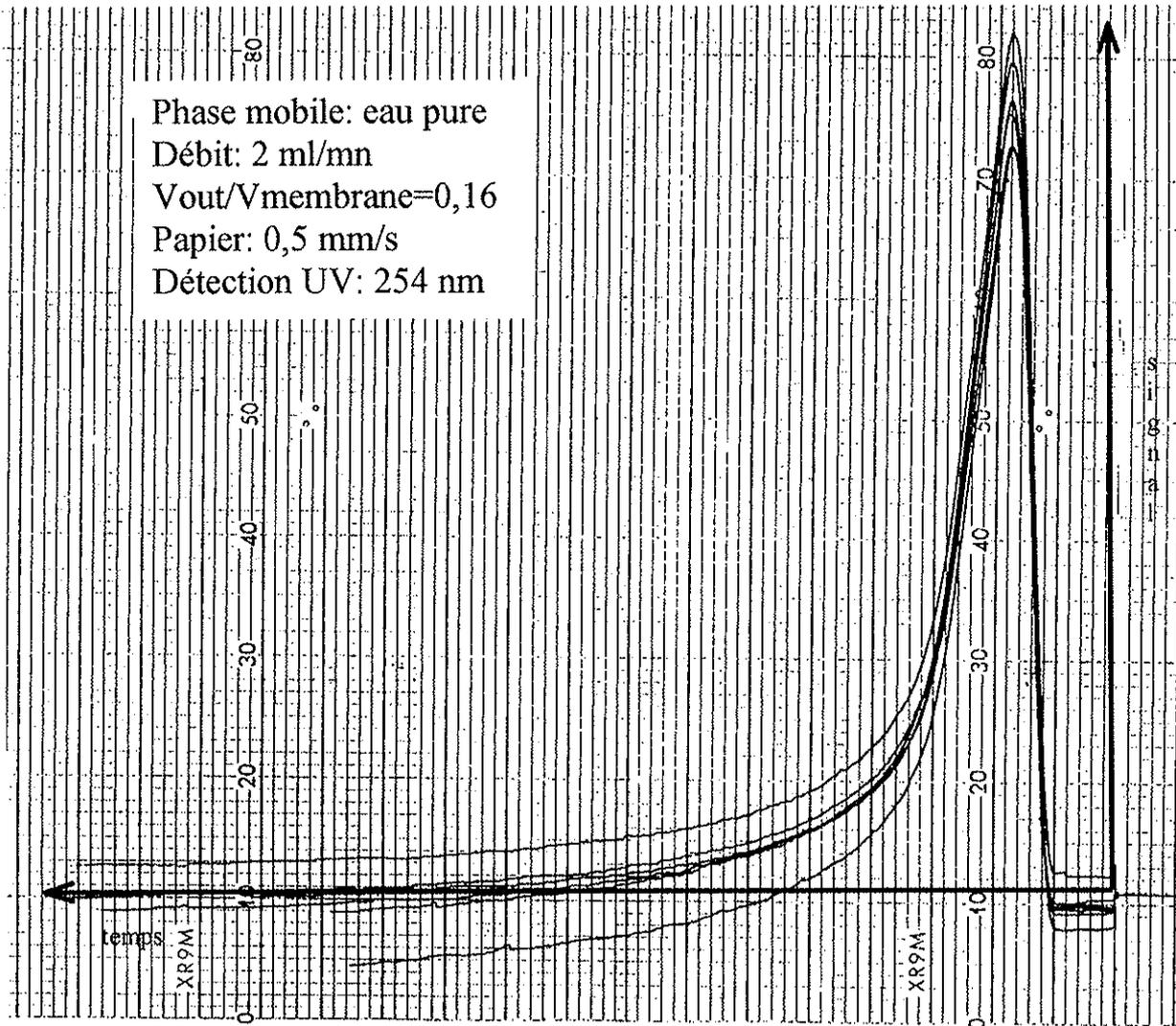


Figure 10 : Pic du parahydroxybenzoate de méthyle

Le parahydroxybenzoate de méthyle n'est pas retenu.

On obtient un pic reproductible (correspondant au volume mort), on a donc une bonne répétabilité des injections (figure 10).

IV-2- Injection de Dextran T2000 bleu

IV-2-1- 1^{ère} injection

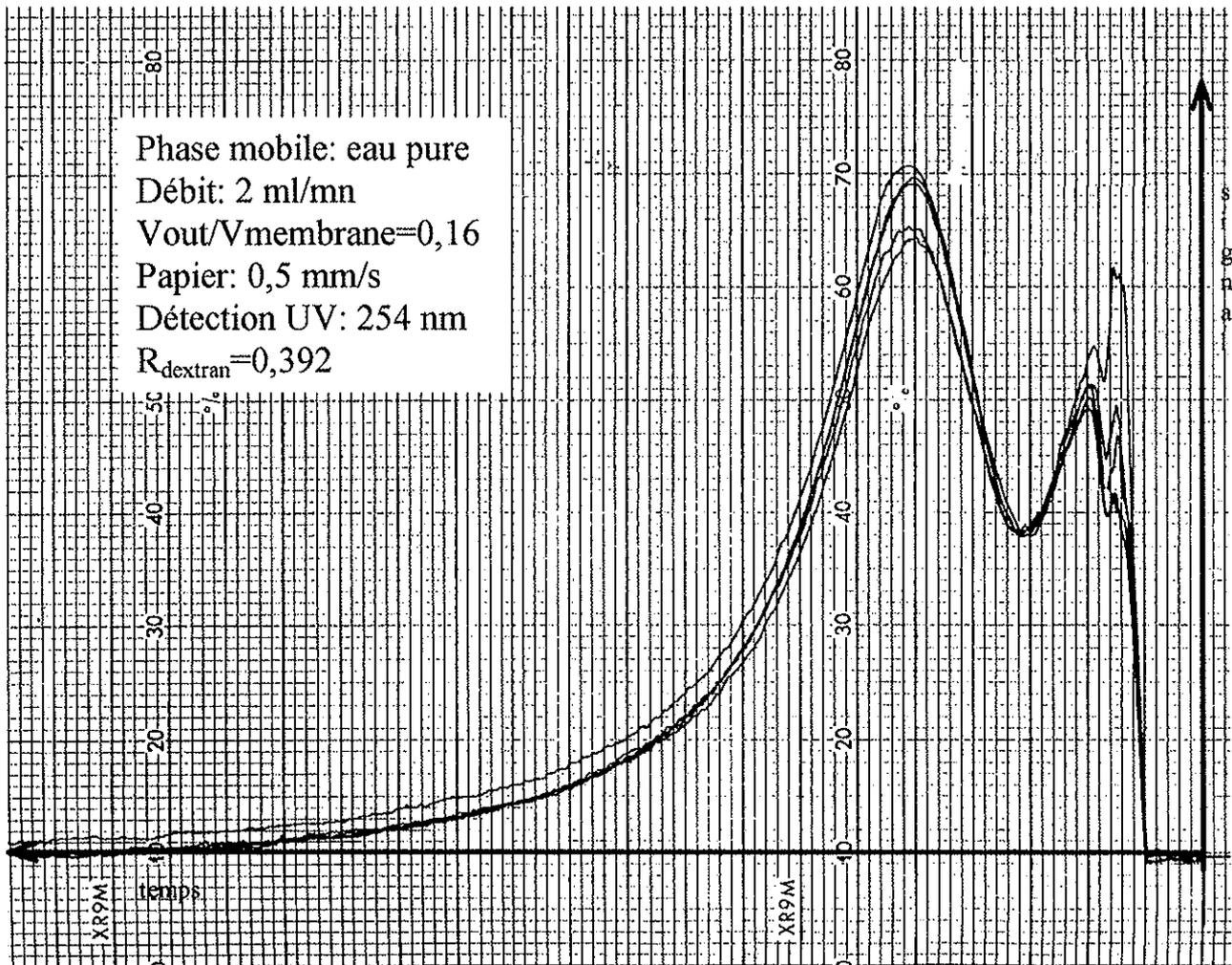
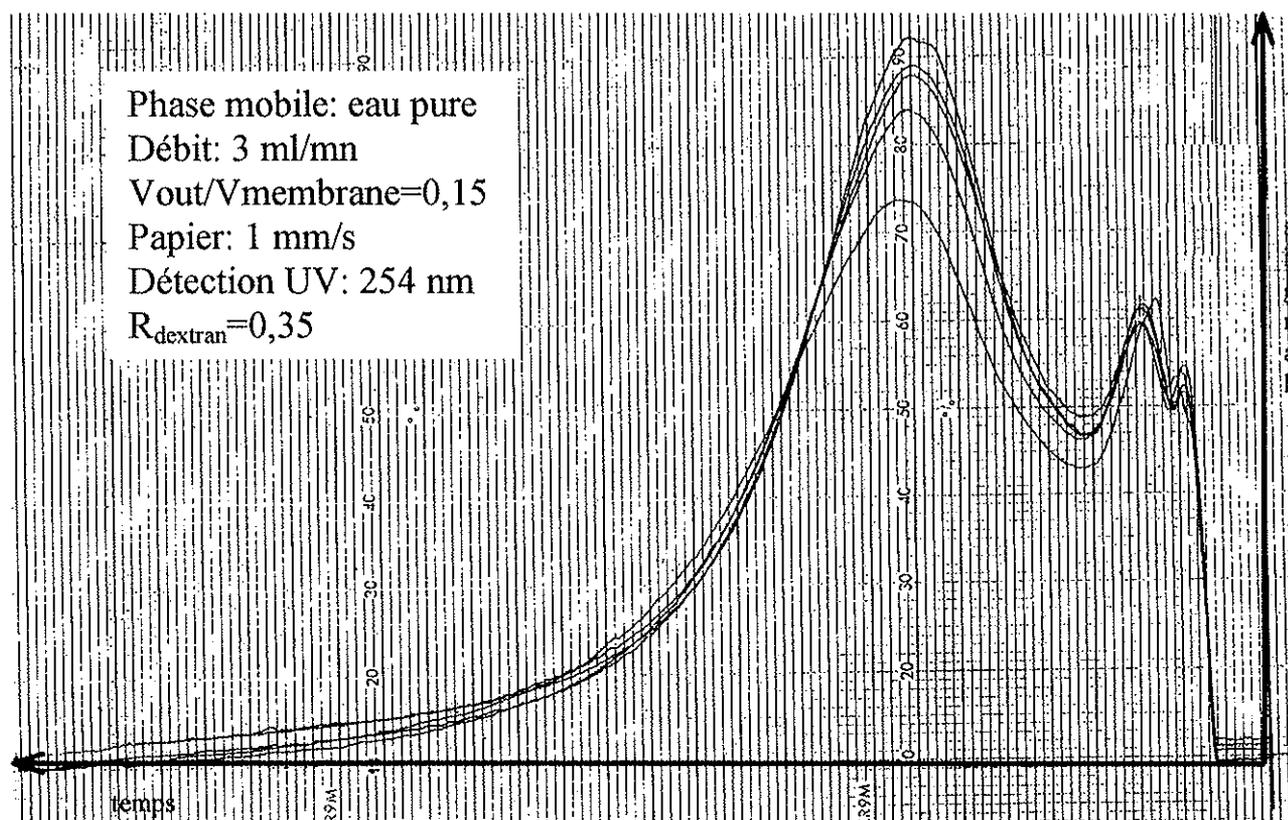


Figure 11 : Pic du Dextran (1^{ère} injection)

Le système de séparation par FFF asymétrique paraît efficace puisque le Dextran est retenu ($R=0,392$) (figure 11).

IV-2-2- 2^{ème} injectionFigure 12 : Pic du Dextran (2^{ème} injection)

Le Dextran est retenu ($R=0,35$) (figure 12).

L'effet de champ est ici plus puissant et la vitesse horizontale plus faible par rapport à la première injection puisque :

$$V_{out}/V_{membrane} \text{ injection 1} > V_{out}/V_{membrane} \text{ injection 2.}$$

La rétention est comparable à celle observée lors de l'injection 1.

$R_{\text{injection 1}}$ et $R_{\text{injection 2}}$ sont sensiblement identiques : la rétention obtenue pour le dextran est reproductible.

IV-3- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle et de Dextran T2000 bleu

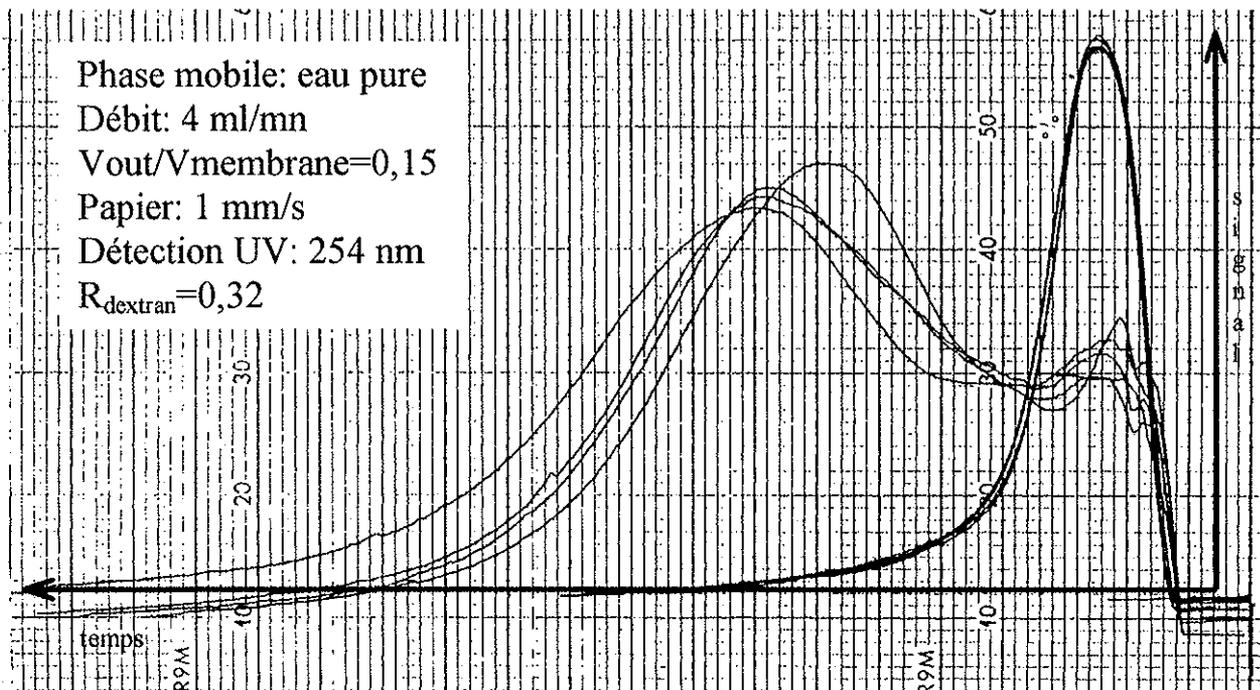


Figure 13 : Pics du parahydroxybenzoate de méthyle et du Dextran

Les pics obtenus sont bien distincts, la rétention du Dextran est différente de celle du parahydroxybenzoate de méthyle (non retenu) (figure 13).

Le système de Fractionnement par couplage Flux Force a permis de retenir spécifiquement le Dextran du parahydroxybenzoate de méthyle, ce système permet donc de séparer des molécules.

CONCLUSION

Les méthodes de séparation par Fractionnement par couplage Flux Force (FFF) forment une famille très polyvalente de techniques d'élution permettant à la fois la séparation et la mesure de caractéristiques physiques, biophysiques et même biologiques. Les espèces concernées sont de type moléculaire, macromoléculaire, supramoléculaire et même organisé comme les organites cellulaires ou les cellules elles-mêmes. Avec les méthodes de la FFF, des mélanges complexes (macromolécules, espèces colloïdales, particules) sont séparés en fractions simples permettant analyse et mesure. Les paramètres directement analysés par ces méthodes comprennent : la masse, la taille, la densité, la charge, le coefficient de diffusion, elles prennent aussi en compte leur interaction avec différents matériaux. Il est aussi possible de lui coupler soit en ligne soit de façon séquentielle des outils d'analyse spécifiques (cytométrie en flux par exemple dans le cas de séparation de cellules).

Présentation générale des méthodes de Fractionnement par couplage Flux Force

Le principe de séparation est simple : il repose sur la rétention différentielle de différentes espèces par un écoulement liquide dans un canal parallélépipédique de faible épaisseur ; les différentes espèces sont éluées une à une à la sortie du séparateur où elles sont détectées. Les caractéristiques d'élution (temps d'élution par exemple) sont en relation (et ce de façon parfois rigoureuse) avec les caractéristiques physico-chimiques de ces espèces. Si nécessaire, les différentes fractions sont collectées et analysées par microscopie, par diffusion de la lumière (petit angle ou autre), ou encore par analyse élémentaire.

La notion de séparation est souvent une étape clef de l'analyse de structures macro ou supra-moléculaires organisées (liposomes, cellules) caractérisées par une polydispersité multiparamétrique, c'est pourquoi l'explosion récente de l'analyse des espèces macro ou supra moléculaires (biologie moléculaire, génie génétique, biotechnologies) demande que soit mis à sa disposition un ensemble de concepts parfois innovants présentant un vaste domaine d'application, une forte résolution ainsi qu'une grande polyvalence. A cet égard, le Fractionnement par couplage Flux Force comble de nombreuses lacunes technologiques et méthodologiques en apportant de nouvelles spécificités.

Par exemple, dans le domaine cellulaire, la FFF permet de purifier les cellules selon leur taille et à taille égale de séparer celles qui ont la même densité, puis à taille et densité équivalente d'isoler celles qui sont les plus déformables. Le second intérêt est la rapidité du tri qui permet d'imaginer la FFF comme outil de complément de la cytométrie en flux dans le tri cellulaire ; il est aussi possible de purifier des virus, immunoglobulines, liposomes et plasmides en quelques minutes.

Inventée par le professeur J.C. Giddings dans les années 60, une vingtaine d'années furent nécessaires pour définir l'architecture instrumentale, le domaine d'application ainsi que les principes méthodologiques d'utilisation.

Quoiqu'il en soit, l'analyse de la littérature scientifique permet de remarquer une explosion des applications de cet ensemble de méthodes. Même s'il faut admettre que le développement de la FFF n'en est qu'à ses balbutiements malgré vingt ans d'expériences, cette famille d'outils de séparation présente une diversité remarquable tant dans le domaine des techniques employées que dans celui des applications.

C'est cette remarquable diversité qui est à l'origine de son potentiel important à long terme.

Le mécanisme de la FFF combine des éléments de la chromatographie et de techniques de séparations induites par un champ comme l'électrophorèse, l'ultra-centrifugation et la dialyse.

Comme en chromatographie, c'est une technique d'élution qui prend ses racines dans un déplacement liquidien différentiel : comme toutes les techniques qui dépendent d'un champ, la FFF requiert l'emploi d'un champ ou d'un gradient, ce champ agit de façon non conventionnelle et ne provoque pas directement la séparation. En effet, le champ est appliqué de façon orthogonale à l'écoulement et dirige les différentes espèces à séparer dans les différentes lignes de vitesse d'un écoulement laminaire en régime stationnaire, établi entre les deux parois d'un canal de très faible épaisseur dont la géométrie générale est présentée ci-dessous (figure 14).

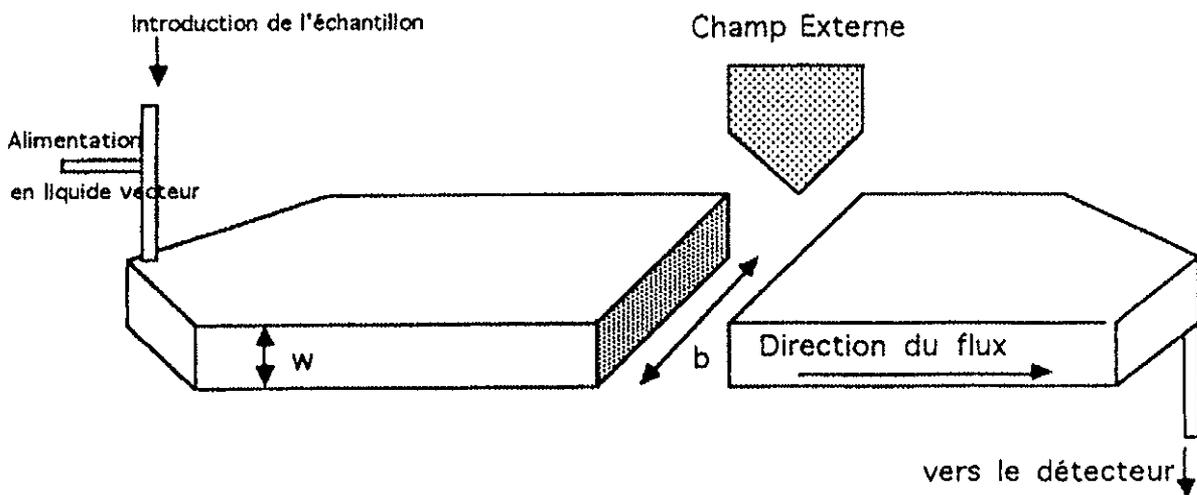


Figure 14 :
Schéma général du canal de séparation en FFF

Ce sont les vitesses linéaires différentes, provoquées par l'écoulement laminaire qui provoquent la séparation le long de l'axe du canal. L'orientation perpendiculaire du champ et de l'axe de séparation permet de distinguer les méthodes de FFF de toutes les méthodes traditionnelles fonctionnant grâce à un champ ou à un gradient.

Le principe de séparation de la FFF est expliqué dans la figure suivante (figure 15) où deux populations (N : noir et B : blanc) sont séparées parce que leur centre de gravité se trouve dans deux lignes de vitesse différentes.

Dans l'épaisseur du canal, le profil de vitesse est parabolique (liquides newtoniens en régime stationnaire) comme on l'observe lors de l'écoulement entre deux plaques parallèles de longueur et largeur infinies. L'écoulement entraîne les populations N et B vers la sortie du canal. Comme la vitesse de translation des populations N et B dépend de la position moyenne des particules dans l'épaisseur du canal, on peut la contrôler par le champ externe agissant de façon orthogonale. Ce champ externe doit être fort pour entraîner les différentes espèces au voisinage de la paroi d'accumulation. Les composants sous l'effet du champ se distribuent selon un profil de concentration : plus il est important au voisinage de la paroi d'accumulation, plus le centre de gravité de la population sera près de cette paroi, plus les lignes de vitesse du flux seront faibles, plus l'élution de cette espèce sera lente. Dans la figure ci-dessous (figure 15), les composants N sont plus retenus que les composants B.

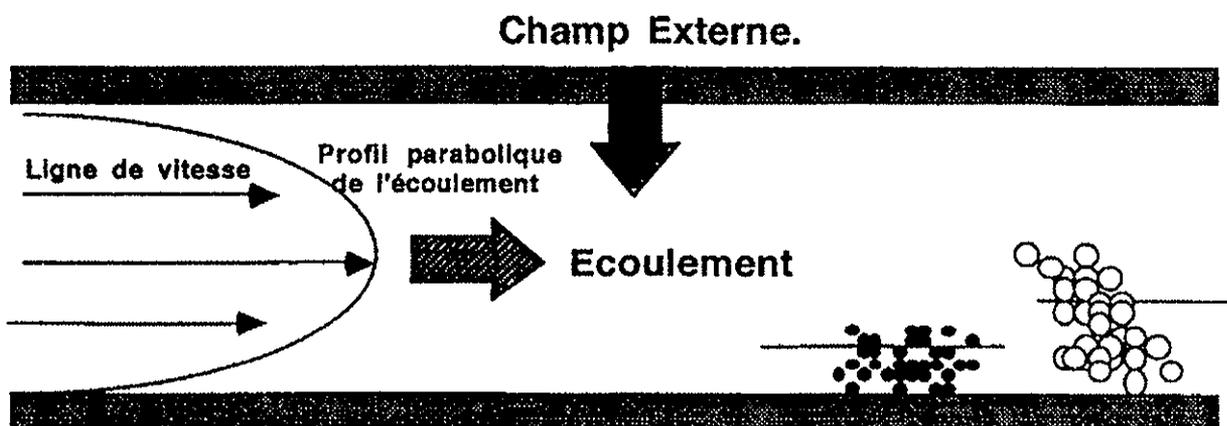


Figure 15 :

Principe de séparation d'espèces sub microniques en FFF

En fait, à partir de ce modèle simple on peut décrire différents mécanismes (parfois avec des résultats très différents).

Ces différents mécanismes dépendent de facteurs qui provoquent la distribution des particules dans l'épaisseur du champ : diffusion, effets dits stérique, inertiel ou de lubrification, densité du liquide vecteur, pH, phénomènes d'interaction particules-parois, effets de rééquilibrage (profil de concentration modifié à chaque instant par l'écoulement).

On distingue le mode d'élution dit «normal », lorsque la taille des particules est négligeable devant l'épaisseur du canal, il permet la séparation de la plupart des macromolécules et des espèces colloïdales ou submicrométriques.

En fait deux autres mécanismes existent : les modes d'élution stérique et inertiel que l'on observe en particulier lorsque les espèces présentent une taille non négligeable devant l'épaisseur du canal.

La FFF, une famille de méthodes

Il existe quatre méthodes principales qui diffèrent selon le type de champ : FFF avec champ gravitationnel (centrifugation), FFF avec champ hydrodynamique (symétrique ou non), FFF avec champ thermique ou électrique.

La force gravitationnelle ou centrifuge permet de définir le groupe des techniques de FFF par sédimentation, dans sa version la plus évoluée, le canal se trouve à la périphérie d'un rotor de centrifugeuse : les espèces peuvent être séparées selon plusieurs paramètres qui sont la masse effective, la taille, la différence de densité. Il est aussi possible de combiner des programmations de champ (vitesse de rotation). Il est à noter que ces méthodes n'ont rien à voir avec la centrifugation ou l'ultracentrifugation.

Le champ hydrodynamique est un champ encore plus universel que la sédimentation. On peut séparer des particules dont les tailles sont voisines du nanomètre, une membrane semi-perméable sur la paroi d'accumulation et un écoulement perpendiculaire à l'axe de séparation provoquent le champ transversal. L'instrumentation qui en découle est plus simple (figure 16) et permet de s'affranchir de différences de densités.

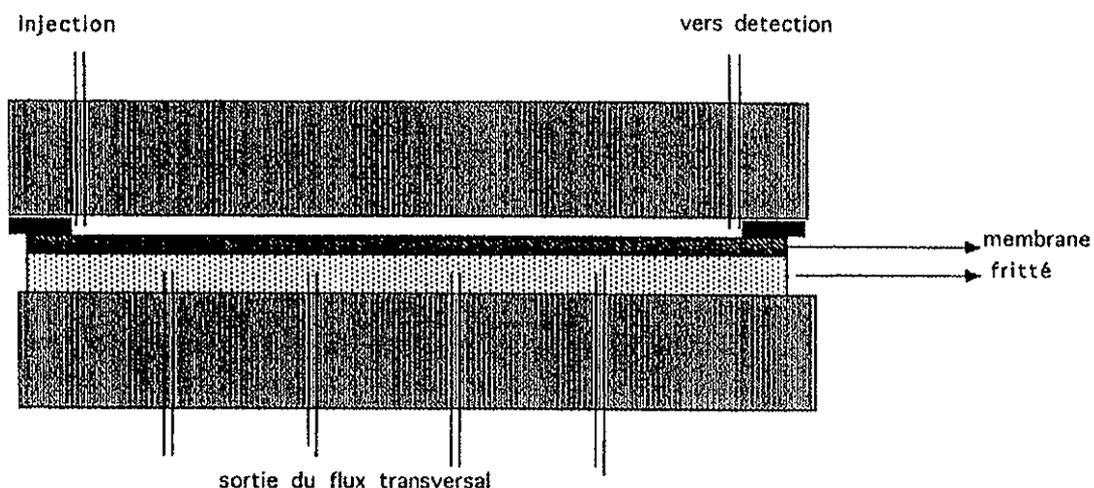


Figure 16 :

Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique

La FFF, un outil de mesure

Comme la rétention est dominée par des forces induites par le champ externe, il est possible de convertir la rétention en caractéristiques physico-chimique ou biophysique. Il est possible de déterminer la masse, la taille, la densité, la charge des espèces, leur coefficient de diffusion. La précision de ces mesures est augmentée par les capacités de fractionnement car les espèces dont on mesure les caractéristiques sont purifiées. Ce type d'approche permet de développer un second objectif qui est la compréhension des phénomènes physico-chimiques mis en jeu.

Les applications biomédicales et biologiques de la FFF

Bien que cette famille de méthodes soit mal connue en biologie, on observe son émergence dans quelques domaines bien précis, ce qui permet d'imaginer ses voies de développement futur.

Depuis les petites protéines jusqu'aux complexes cellulaires, la FFF permet de séparer des agrégats de protéines, des protéines conjuguées, des espèces particulières à base de protéines (prions), des lipoprotéines, des virus, acides nucléiques, des colloïdes biologiques, des polysaccharides, émulsions pharmaceutiques, chromosomes, bactéries [51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60].

BIBLIOGRAPHIE

- 1- J.C. GIDDINGS;
Sep. Sci. 1, 123 (1966).
- 2- E. GRUSHKA, K.D. CALDWELL, M.N. MYERS, J.C. GIDDINGS;
Separation and Purification Methods, Vol. 2, pp 127 (E.S. PERRY,
C.J. VAN OSS, E. GRUSHKA Eds) M. DEKKER, NEW YORK (1974).
- 3- J.C. GIDDINGS;
J. Chromatogr. 125, 3, (1976).
- 4- J.C. GIDDINGS, L.K. SMITH, M.N. MYERS;
Anal. Chem. 48,1987, (1976).
- 5- J.C. GIDDINGS, M. MARTIN, M.N. MYERS;
J. Chromatogr. 158, 419, (1978).
- 6- M. MARTIN, I. IGNATIADIS, R. REYNAUD;
Fuel 66, 1436, (1987).
- 7- K.D. CALDWELL, L.F. KESNER, M.N. MYERS, J.C. GIDDINGS;
Science 176, 296 (1972).
- 8- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG, M.N. MYERS;
Anal. Chem. 46, 1917, (1974).
- 9- F.J. YANG, M.N. MYERS, J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem. 46, 1924, (1974).

- 10- J.J. KIRKLAND, W.W. YAU, W.A. TURNER, J.W. GRANT;
Anal. Chem. 52,1984, (1980).
- 11- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG. , M.N. MYERS;
Anal. Chem. 48,1126,(1976).
- 12- T.C. SCHU-NK, J. GORSE, M.F. BURKE;
Sep. Sci. & Tech. 19 (10), 653, (1984).
- 13- J.C. GIDDINGS, M.N. MYERS;
Sep. Sci. & Tech. 13,637,(1978).
- 14- J.C. GIDDINGS, M.N. MYERS;
Sep. Sci. & Tech. 19, 307, (1984).
- 15- M. MARTIN;
in Particles Size Analysis, J. WILEY & Sons CHICHESTER, pp 65, (1987).
- 16- J.C. GIDDINGS, M.N. MYERS, K.D. CALDWELL, S.R. FISHER;
in Method of Biochemical Analysis, Vol. 26, (Dr D. GLICK Ed.)
J. WILEY & Sons, NEW York pp 79 (1980).
- 17- K.D. CALDWELL, Z.Q. CHENG, P. HRADECKY, J.C. GIDDINGS;
Cell. Biophysics 6, 233, (1984).
- 18- J.C. GIDDINGS;
J. Chem. Phys., 49, 81, (1968).

- 19- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG;
Science 1993, 1244 (1976).
- 20- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG;
Anal. Chem. 48-1126 (1976).
- 21- H.L. LEE, J.F.G. RIES, J. DOHNER, E.N. LIGHTFOOT;
A.I.C.H.E. j., 20-776 (1974).
- 22- Anne LITZEN;
Doctoral thesis at UPPSALA UNIVERSITY (1992).
- 23- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG and M.N. MYERS;
J. Virol. , 21, 131, (1977).
- 24- J.C. GIDDINGS, G.C. LIN and M.N. MYERS;
J. Colloid Interface Sci. , 81, 395 (1978).
- 25- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG and M.N. MYERS;
Anal. Biochem., 81, 395, (1977).
- 26- J.C. GIDDINGS, G.C. LIN and M.N. MYERS;
J. Liq. Chromatogr., 1, 1, (1978).
- 27- S.L. BRIMHALL, M.N. MYERS, K.D. CALDWELL, and J.C.GIDDINGS;
Polym. Mater. Sci. Eng., 50,48,(1984).
- 28- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG and M.N. MYERS;
Sep. Sci., 12, 499, (1977).

- 29- K.G. WAHLUND et Anne LITZEN;
J. Chrom., 461, p. 73, (1989).
- 30- R. BECKET, Z. JUE, J.C. GIDDINGS;
Env. Sci. Technol., 21, 289-299, (1987).
- 31- R.BECKET, J.C.BIGELOW, J.C.GIDDINGS;
An. Chem. Societ., (1988).
- 32- S.K. RATANATHANAWONGS, J.C. GIDDINGS;
J. Chromatogr. 476, 341-356, (1989).
- 33- S.K. RATANATHANAWONGS, J.C. GIDDINGS;
Polym. Mater. Sci. Eng. 65, 24-26, (1991).
- 34- P. CARDOT;
Thèse (1988).
- 35- J.C. GIDDINGS, K.D. CALDWELL, J.F. MOELMER,
T.H. DICKINSSON, M.N. MYERS ;
Anal. Chem., 51, 30-33, (1979).
- 36- S.K. RATANATHANAWONGS, J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem., 64, 6-15, (1992).
- 37- F.J. YANG, M.N. MYERS, J.C. GIDDINGS;
Anal Chem. Correspondance, 49, 659-662, (1977).

- 38- J. GRANGER, J. DODDS, D. LECLERC, N. MIDOUX;
Chem. Engn. Sci., 41, 3119-3128, (1986).
- 39- S.L. BRIMHALL, M.N. MYERS, K.D. CALDWELL, J.C. GIDDINGS;
J. Polym. Sci., 22, 339-345, (1984).
- 40- K.G. WAHLUND, J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem., 59, 1332-1339, (1987).
- 41- J.C. GIDDINGS, F.J. YANG, M.N. MYERS ;
Anal. Chem. 48, p. 1126, (1976).
- 42- J.C. GIDDINGS, M.N. MYERS, K.D. CALDWELL, S.R. FISHER;
Methods of biochemical analysis, Vol. 26, 79-136, (1980).
- 43- K.D. CALDWELL, S.L. BRIMHALL, Y. GAO, J.C. GIDDINGS;
J. Appl. Polym. Sci., 36, 703-719, (1988).
- 44- M.N. MYERS, J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem. 54, 2284-2289, (1982).
- 45- J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem. 58, 735-741, (1986).
- 46- J.C. GIDDINGS, M.R. SCHURE, M.N. MYERS, G.R. VELEZ;
Anal. Chem. 56, 2099-2102, (1984).
- 47- P.S. WILLIAMS, S.B. GIDDINS, J.C. GIDDINGS;
Anal. Chem. 58, 2397-2403, (1986).

- 48- J.M. DAVIS;
Anal. Chem. Acta. 246, 161-169, (1991).
- 49- J.C. GIDDINGS;
Sep. Sci. Technol., 21, 831-813, (1986).
- 50- A. LITZEN, K.G. WAHLUND;
Anal. Chem. 63, 1001, (1991).
- 51- GIDDINGS;
Anal. Chem 592 A. (1995).
- 52- LITZEN, GARN, WIDMER;
Journal of biotechnology 37, 291-295, (1994).
- 53- LITZEN, WALTER, KRISHOLICK, WAHLUND;
Analytical biochemistry 212, 469-498, (1993).
- 54- MARTIN E SHIMPF;
Indian Journal of technology, Vol. 31, pp 443-457, (1993).
- 55- MYEONG HEE MOON, GIDDINGS;
Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis. Vol. 11, n°10,
pp 911-920, (1993).
- 56- GIDDINGS;
Science Vol. 260, (4 June 1993).

- 57- ANDREUX, MERINO, RENARD, FORESTIER, CARDOT;
Experimental Hematology, 21, 326-330, (1993).
- 58- WAHLUNG, LITZEN;
J. Chromatogr., 461, 73-87, (1989).
- 59- GIDDINGS, YANG, MYERS;
Analytical biochemistry , 81, 395-407, (1977).
- 60- LITZEN, WAHLUND;
J. Chromatogr., 476, 413-421, (1989).

Nomenclature

a :	Rayon de la particule
b :	Largeur du canal
k :	Constante de Boltzmann
$I = D/I U $:	Constante d'espace du profil d'équilibre
$v(x)$:	vitesse d'écoulement du liquide vecteur à la distance x de la paroi d'accumulation
t_0 :	Temps d'élution d'une espèce non soumise au champ externe
t_r :	Temps d'élution d'une espèce soumise au champ externe
u :	Vitesse moyenne du fluide dans la section du canal
vin :	Débit du fluide à l'entrée du canal
vout :	Débit du fluide à la sortie du canal
x :	Distance de la paroi d'accumulation au centre de gravité de la particule
w :	Epaisseur du canal
C(x) :	Concentration des particules
D(x) :	Coefficient de diffusion d'une espèce (particules)
FI :	Force hydrodynamique
G :	Accélération du champ de la pesanteur.
J, J(x) :	Flux de particules dans la direction du champ externe
P :	Poids de la particule
Q :	Débit du liquide vecteur. $Q = uw b$
$R = v/u$:	Facteur de rétention, v est la vitesse d'élution de la particule
U(x) :	Vitesse des particules dans la direction du champ
α :	Rapport a/w
ρ_l :	Densité du liquide vecteur
ρ_p :	Densité de la particule
η :	Viscosité du liquide
$\lambda = I/w$:	Paramètre sans dimension
A(z) :	Aire du canal au point z

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p1
CHAPITRE 1 : <u>GENERALITES SUR LE FRACTIONNEMENT PAR COUPLAGE FLUX FORCE</u>	p4
I- Modèle général d'élution en FFF : modèle brownien	p4
II- Notion de rétention en FFF	p7
III- Modèle stérique	p10
IV- Modèle inertiel de rétention de particules microniques en FFF avec champ gravitationnel	p12
CHAPITRE 2 : <u>DONNEES SPECIFIQUES DE LA FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE</u>	p18
I- La FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p19
I-1- Mécanismes d'élution en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p20
I-2- Elution de type brownien en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p20
I-3- Procédures d'injection et de relaxation avec effet de focalisation	p21
CHAPITRE 3 : <u>VITESSE DE SEPARATION, RETENTION ET DISPERSION EN FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE</u>	p23
I- Effets de la dimension du canal et du débit. Aspects théoriques	p23
II- Calcul du facteur de rétention en FFF asymétrique	p25
III- Le profil de vitesse	p26
IV- La rétention	p27
V- Comparaison des profils de vitesse dans des canaux de géométries différentes	p29
CHAPITRE 4 : <u>LA CONSTRUCTION D'UN SEPARATEUR DE FFF AVEC CHAMP HYDRODYNAMIQUE ASYMETRIQUE, EXPERIMENTATION</u>	p32
I- Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p32
II- Modèle de fabrication	p34
III- Système d'analyse	p36
IV- Expérimentation	p37
IV-1- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle	p38
IV-2- Injection de Dextran T2000 bleu	p39
IV-2-1- 1 ^{ère} injection	p39
IV-2-2- 2 ^{ème} injection	p40
IV-3- Injection de parahydroxybenzoate de méthyle et de Dextran T2000 bleu	p41
CONCLUSION	p42
Présentation générale des méthodes de Fractionnement par couplage Flux Force	p42
La FFF, une famille de méthodes	p47
La FFF, un outil de mesure	p48
Les applications biomédicales et biologiques de la FFF	p48
BIBLIOGRAPHIE	p49
NOMENCLATURE	p56

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Le canal de séparation en FFF	p2
Figure 2 : Représentation schématique du profil de concentration des particules dans l'épaisseur d'un canal de FFF	p7
Figure 3 : Schéma du mécanisme stérique d'élution des particules	p11
Figure 4 : Graphe de la fonction $f(x/w)$ de la force hydrodynamique et du profil parabolique de vitesse pour des espèces éluées à la position x/w dans l'épaisseur du canal	p14
Figure 5 : Géométrie des canaux en FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p24
Figure 6 : Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique symétrique	p33
Figure 7 : Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p33
Figure 8 : Schéma de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p35
Figure 9 : Schéma du système d'analyse par FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p36
Figure 10 : Pic du parahydroxybenzoate de méthyle	p38
Figure 11 : Pic du Dextran (1 ^{ère} injection)	p39
Figure 12 : Pic du Dextran (2 ^{ème} injection)	p40
Figure 13 : Pics du parahydroxybenzoate de méthyle et du Dextran	p41
Figure 14 : Schéma général du canal de séparation en FFF	p44
Figure 15 : Principe de séparation d'espèces sub microniques en FFF	p45
Figure 16 : Principe de l'appareil de FFF avec champ hydrodynamique asymétrique	p47

BON A IMPRIMER N° 323

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

QUINTANS (Stéphane).

— Le fractionnement par couplage flux force (FFF) : théorie et expérimentation. —
56 p.; 16 ill.; 30 cm (Thèse : Pharmacie; Limoges, 1999).

RESUME :

Le fractionnement par couplage flux force (FFF) est une famille de méthodes de séparation et de caractérisation de particules et de macromolécules.

Elles sont basées sur le couplage d'un écoulement laminaire avec une force perpendiculaire.

Plusieurs modèles théoriques d'élution (brownien, stérique, inertiel) permettent d'expliquer ce fractionnement.

Le fractionnement par couplage flux force avec champ hydrodynamique asymétrique est une technique dans laquelle le champ perpendiculaire est provoqué par le fluide vecteur lui-même.

Un modèle de fabrication ainsi qu'un système d'analyse ayant permis la rétention de Dextran sont ici proposés .

Le fractionnement par couplage flux force est un outil de mesure en plein développement, au bénéfice d'applications biomédicales et biologiques toujours en quête de nouvelles méthodes d'analyse.

MOTS CLES :

- fractionnement
- couplage flux force
- champ hydrodynamique asymétrique

JURY : Président : M. le Professeur Philippe CARDOT.
Juges : M. Serge BATTU, Maître de Conférences.
: M. Jean-Jacques BONNIN, Docteur en Pharmacie.